UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ALINE DAMICO DE AZEVEDO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DE COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS E DE MICROENCAPSULADOS BIODEGRADÁVEIS DE L,L-LACTÍDEO E GLICOL ETILÊNICO

RIO DE JANEIRO

2010

Aline Damico de Azevedo

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DE COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS E DE MICROENCAPSULADOS BIODEGRADÁVEIS DE L,L-LACTÍDEO E GLICOL ETILÊNICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Profa. Dra. Cheila Gonçalves Mothé (EQ/UFRJ)
Profa. Dra. Shu Hui Wang (USP)

Rio de Janeiro

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

A994s Azevedo, Aline Damico de.

Síntese, Caracterização de Copolímeros Anfifílicos e de Microencapsulados Biodegradáveis de L,L-Lactídeo e Etileno Glicol/ Aline Damico de Azevedo. – 2010.

xxii, 143 f.: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadoras: Cheila Gonçalves Mothé e Shu Hui Wang

1. Copolímeros. 2. Triblocos de PLLA-PEG-PLLA. 3. Poli(l,l-lactídeo). 4. Poli(glicol etilênico). 5.Microencapsulamento. 6. Anfifílicos. 7. Caracterização. 8. Biodegradabilidade – Teses. I. Mothé, Cheila Gonçalves (Orient.). II. Wang, Shu Hui (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 547.7

Aline Damico de Azevedo

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DE COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS E DE MICROENCAPSULADOS BIODEGRADÁVEIS DE L,L-LACTÍDEO E GLICOL ETILÊNICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 22 de julho de 2010.

_____

Profª Drª. Cheila Gonçalves Mothé - EQ/ UFRJ (Presidente da Banca)

_____

Profª. Drª. Glaucia Barbosa Candido Alves Slana - FIOCRUZ

_____

Prof. Dr. Jo Dweck - EQ/UFRJ

_____

Profª. Drª. Maria José de Oliveira C. Guimarães - EQ/UFRJ

_____

Profª. Drª. Rosangela Sabbatini Capela Lopes - IQ/UFRJ

_____

Prof. Dr. Walker Soares Drumond - POLI/USP

O caminho de Deus é perfeito; a palavra do Senhor é provada: é um escudo para todos os que nele confiam.
Porque, quem é Deus senão o Senhor? E quem é rochedo senão nosso Deus?
Deus é o que me cinge de força e aperfeiçoa o meu caminho.

Salmo 18:30-32

Esta Tese foi realizada na Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ-UFRJ) com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esta tese aos meus amados sobrinhos:

KARINE & LUCAS.

Amo vocês!

As minhas orientadoras Profa. Dra. Cheila Gonçalves Mothé e Profa. Dra. Shu Hui Wang pela amizade, companheirismo, orientação, compreensão, dedicação e incentivo em todos os momentos deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo por ter me dado, entre muitas outras coisas, a vida e a oportunidade de estudar e concluir esta tese.

- A minha amiga e mãe Sandra Rettori Damico pelo incentivo para eu retornar a estudar e concluir esta tese, pois se não fosse ela, nem teria começado.

- Ao Engenheiro Químico Dr. Walker S. Drumond que disponibilizou seu tempo em ajudar-me na síntese dos copolímeros PLLA-PEG-PLLA na USP.

- Ao Profº Drº Rubén Sinisterra por ter disponibilizado seu laboratório para a confecção dos microencapsulados na UFMG.

- Ao Químico (M.Sc.) Frederico B. de Souza que disponibilizou seu tempo em ajudar-me na síntese do microencapsulamento da tetraciclina nos copolímeros PLLA-PEG-PLLA na UFMG.

- A Profª Drª Karen S. Pereira por disponibilizar seu laboratório para a Análise Microbiológica dos copolímeros desenvolvidos no DEB/EQ/UFRJ.

- A Química Industrial (M.Sc.) Cristiane Vieira e a Profª Drª Carla R. Araújo pela realização das análises TG/DTG, DTA e DSC no DPO/EQ/UFRJ.

- As minhas colegas de Doutorado Iara M., Kátia F. e Michelle G. pelo companheirismo e incentivo durante toda trajetória de conclusão desta tese.

- A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Resumo da tese apresentada à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências (D. Sc).

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO DE COPOLÍMEROS ANFIFÍLICOS E DE MICROENCAPSULADOS BIODEGRADÁVEIS DE L,L-LACTÍDEO E GLICOL ETILÊNICO

ALINE DAMICO DE AZEVEDO

Orientadoras: Profª Dra. Cheila Gonçalves Mothé
Profª Dra. Shu Hui Wang

Copolímeros anfifílicos, à base de segmentos hidrofóbicos de poli(l,l-lactídeo) (PLLA) e de segmentos hidrofílicos de poli(glicol etilênico) (PEG), foram sintetizados por polimerização em massa usando o catalisador 2-etil hexanoato de estanho. Estes copolímeros foram utilizados como matriz para a preparação de microesferas de tetraciclina encapsuladas pelo método de dupla emulsão com evaporação do solvente. A morfologia dos materiais foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Microscopia Óptica (OM). Suas composições e propriedades térmicas foram avaliadas por Infravermelho com Transformada de Fourier método de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR), Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e Análise Térmica (TG / DTG, DTA e DSC). SEM e OM mostrou o predomínio da forma esférica, no entanto, foi possível distinguir três padrões: superfície rugosa ou lisa ou com colapsos (rupturas). A presença das absorções características de cada homopolímero nos espectros de NMR e FTIR indicou a presença dos segmentos PEG e PLLA, sugere a ligação covalente entre eles e apresentaram estabilidade térmica e a integridade estrutural do copolímero PLLA-PEG-PLLA nas microesferas com a tetraciclina encapsulada. Por Análise Térmica foi possível ver a influência da tetraciclina nas temperaturas de transição vítrea (T_g), de cristalização (T_c) e de fusão (T_m) dos copolímeros de PLLA-PEG-PLLA (DSC), enquanto os resultados por TG indicaram que as microesferas mantiveram o perfil de decomposição térmica similar aos seus copolímeros de origem.

Abstract of thesis presented to Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Science.

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION OF AMPHIPHILIC COPOLYMERS AND BIODEGRADABLE MICROENCAPSULATED OF L,L-LACTIDE AND ETHYLENE GLYCOL

ALINE DAMICO DE AZEVEDO

ADVISERS: Profª. Drª. Cheila Gonçalves Mothé
Profª Drª. Shu Hui Wang

Amphiphilic copolymers, based on hydrophobic poly(l,l-lactide) (PLLA) blocks and hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG) blocks, were synthesized by mass polymerization using stannous 2-ethylhexanoate. These copolymers were used as the matrix material for the preparation of tetracycline-loaded microspheres by double-emulsion-solvent evaporation technique. The morphology of these materials was characterized by using Scanning electron microscopy (SEM) and Optical microscopy (OM). Their compositions and thermal properties were evaluated by Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Thermal Analysis (TG/DTG, DTA and DSC). SEM and OM showed the predominance of the spherical shape, however it was possible to distinguish three patterns: rough or smooth surface or unbalanced collapsed volume. The presence of the characteristic absorptions of each homopolymer in NMR and FTIR spectra indicates the presence of the PEG and PLLA blocks, suggests the covalent bond between them and showed thermal stability and structural integrity of the PLLA-PEG-PLLA copolymer' microspheres enclosing tetracycline. By Thermal analysis it was possible to see the marginal influence of tetracycline in the glass transition (T_g), crystallization (T_c) and melting (T_g) temperatures of the PLLA-PEG-PLLA copolymers (DSC), while the results of TG showed that the microspheres maintained the thermal decomposition profile similar to their origin's copolymers.

Parte desta tese foi apresentada nos seguintes congressos / revistas científicas:

- Azevedo, A. D., Mothé, C. G., Wang, S. H. e Drummond, W. S. "Thermal Analysis of Biodegradable Triblock Copolymer Poly(l-lactide)-b-Poly(ethylene glycol)-b-Poly(l-lactide) (PLLA-PEG-PLLA)". Apresentado no 14th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry / VI Brazilian Congress on Thermal Analysis and Calorimetry, E23, São Pedro, São Paulo, Set/2008.

- Mothé, C. G., Azevedo, A. D., Drummond, W. S. e Wang, S. H. "Thermal Properties of Amphiphilic Biodegradable Triblock Copolymer of L,L-Lactide and Ethylene Glycol". Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 101, n. 1, p. 229-233, 2010.

- Aline D. de Azevedo, Cheila G. Mothé, Walker S. Drumond, Shu H. Wang, Frederico B. de Souza, Rubén D. Sinisterra. "Microencapsulamento de Tetraciclina em Copolímero de L,L-Lactídeo e Etileno glicol: Síntese e Caracterização por Análise Térmica e SEM". VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, São Paulo, 25-28/Abril/2010

SUMÁRIO

Página

Capítulo 1 Introdução..... 01

Capítulo 2 Objetivos..... 07

Capítulo 3 Justificativa..... 09

Capítulo 4 Fundamentos Teóricos..... 11

4.1 PLA – Poli (ácido láctico)……..... 14

4.2 PEG – Poli(glicol etilênico)……. 18

4.3 Síntese do Tribloco PLLA-PEG-PLLA……... 20

4.4 Tetraciclina…….. 22

4.5 Microencapsulamento…….. 23

4.6 Métodos de Caracterização…….. 30

4.6.1 Análise Microbiológica..... 30

4.6.2 Análise Térmica..... 31

4.6.2.1 Termogravimetria (TG)/ Termogravimetria Derivada (DTG)..... 31

4.6.2.2 Análise Térmica Diferencial (DTA)..... 34

4.6.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)..... 35

4.6.3 Difração de Raios X (XRD)..... 36

4.6.4 Espalhamento de Luz Laser de Baixo Ângulo para Análise de Tamanho de Partícula (LALLS)..... 38

4.6.5 Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)..... 41

4.6.6 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)..... 44

4.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)..... 47

4.6.8 Microscopia Óptica (OM)..... 49

Capítulo 5 Materiais e Métodos..... 51

5.1 Reagentes..... 52
5.2 Solventes..... 52
5.3 Equipamentos..... 52
5.4 Métodos de Preparo..... 54
5.4.1 Preparação dos Copolímeros de PLLA-PEG-PLA..... 54
5.4.2 Preparação do Microencapsulamento pelo método de dupla emulsão por evaporação do solvente..... 57
5.5 Métodos de Caracterização..... 60
5.5.1 Análise Microbiológica..... 60
5.5.2 Análise Térmica..... 60
5.5.2.1 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)..... 60
5.5.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)..... 60
5.5.3 Difração de Raios X (XRD)..... 60
5.5.4 Espalhamento de Luz Laser de Baixo Ângulo para Análise de Tamanho de Partícula (LALLS)..... 61
5.5.5 Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)..... 61
5.5.6 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)..... 61
5.5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)..... 61
5.5.8 Microscopia Óptica (OM)..... 61

Capítulo 6 Resultados e Discussão..... 62
6.1 Caracterização dos Copolímeros..... 63
6.1.1 Análise Microbiológica..... 63
6.1.2 Análise Térmica..... 64
6.1.2.1 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)..... 64
6.1.2.2 Análise Térmica Diferencial (DTA)..... 66
6.1.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)..... 67
6.1.3 Difração de Raios X (XRD)..... 70
6.1.4 Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com

Transformada de Fourier pelo método de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)..... 72
6.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)..... 74
6.1.6 Microscopia Óptica (OM)..... 78
6.2 Caracterização dos Microencapsulados..... 80
6.2.1 Análise de Tamanho de Partícula (método LALLS)..... 80
6.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)..... 83
6.2.3 Microscopia Óptica (OM)..... 90
6.2.4 Análise Térmica..... 95
6.2.4.1 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)..... 95
6.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)..... 105
6.2.5 Difração de Raios X (XRD)..... 110
6.2.6 Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)..... 111
6.2.7 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)..... 117
6.2.7.1 Núcleo de Hidrogênio (^{1}H-NMR)..... 117
6.2.7.2 Núcleo de Carbono 13 (^{13}C-NMR)..... 120

Capítulo 7 Conclusões..... 123

Capítulo 8 Sugestões..... 127

Referências Bibliográficas..... 129

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 4.1: Ilustração da autoassociação de copolímero anfifílico (micela) e sua relevância a liberação de droga..... 12
Figura 4.2: Copolímeros: hidrogéis inteligentes, estímulo-resposta, liberação modulada da droga (círculos)..... 13
Figura 4.3: Ilustração do ciclo de vida do PLA..... 14
Figura 4.4: Formas isoméricas do ácido láctico..... 16
Figura 4.5: Síntese de PLLA por polimerização de abertura de anel (ROP)..... 16
Figura 4.6: Diferentes isômeros de lactídeo..... 17
Figura 4.7: Esquema de reação de síntese do poli(glicol etilênico)..... 18
Figura 4.8: Representação esquemática da aplicação do PEG em copolímero dibloco PLA/PEG..... 18
Figura 4.9: Formação do alco-óxido a partir do catalisador..... 20
Figura 4.10: Etapa da abertura do anel l,l-lactídeo e propagação da cadeia..... 21
Figura 4.11: Coiniciador como possível agente de transferência..... 21
Figura 4.12: Copolímero Tribloco PLLA-PEG-PLLA..... 21
Figura 4.13: Estrutura química da tetraciclina..... 22
Figura 4.14: Estruturas biológicas formadas a partir da autoassociação..... 23
Figura 4.15: Ilustração da conseqüência da autoassociação: a origem da vida..... 24
Figura 4.16: Ilustração da formação da corona e núcleo na autoassociação dos copolímeros triblocos de formato A-B-A..... 25
Figura 4.17: Estratégia de encapsulação: liberação do fármaco na célula-alvo..... 25
Figura 4.18: Ilustração esquemática da ilustração de liberação de droga..... 26
Figura 4.19: Passos básicos do microencapsulamento por evaporação do solvente..... 28
Figura 4.20: Curva termogravimétrica característica de uma reação em um único estágio..... 32
Figura 4.21: Comparação de curvas de TG e DTG para reações sobrepostas..... 33
Figura 4.22: Curva típica obtida pela técnica DTA..... 34
Figura 4.23: Curva típica obtida no DSC..... 35
Figura 4.24: Ilustração da Lei de Bragg..... 36
Figura 4.25: Esquema de um difratômetro de raios X..... 37

Figura 4.26: Cristal de NaCl (a) e seu difratograma (b)..... 37
Figura 4.27: Diâmetros médios equivalentes..... 38
Figura 4.28: Processo de difração a laser..... 39
Figura 4.29: Ilustração da técnica espalhamento de luz no instrumento Mastersize 2000..... 40
Figura 4.30: Diagrama esquemático do caminho da radiação infravermelha no acessório ATR..... 43
Figura 4.31: Origem do Deslocamento Químico: o movimento dos elétrons gera um campo $\vec{B}'$ que se opõe ao campo externo $\vec{B}_0$..... 45
Figura 4.32: Representação esquemática da interação spin-spin através das ligações químicas..... 46
Figura 4.33: Diagrama esquemático dos componentes relevantes de um microscópio eletrônico de varredura..... 48
Figura 4.34: Constituintes principais do microscópio óptico..... 50
Figura 5.1: Câmara "Glove-box" utilizada para a preparação dos copolímeros..... 55
Figura 5.2: Diagrama de blocos do procedimento de copolimerização..... 56
Figura 5.3: Fotografia dos três copolímeros obtidos..... 57
Figura 5.4: Diagrama de blocos do procedimento de microencapsulamento..... 59
Figura 6.1: Sobreposição das curvas de TG dos três copolímeros..... 64
Figura 6.2: Sobreposição das curvas de DTG dos três copolímeros..... 65
Figura 6.3: Sobreposição das curvas de DTA dos três copolímeros..... 66
Figura 6.4: Curva de DSC para o copolímero 1..... 67
Figura 6.5: Curva de DSC para o copolímero 2..... 68
Figura 6.6: Curva de DSC para o copolímero 3..... 69
Figura 6.7: Difratograma do copolímero 1..... 70
Figura 6.8: Difratograma do copolímero 3..... 70
Figura 6.9: Espectro de FTIR-ATR do copolímero 1..... 72
Figura 6.10: Espectro de FTIR-ATR do copolímero 2..... 72
Figura 6.11: Espectro de FTIR-ATR do copolímero 3..... 73
Figura 6.12: Micrografia do copolímero 1 (ampliação de 500 vezes)..... 74
Figura 6.13: Micrografia do copolímero 1 (ampliação de 1000 vezes)..... 74
Figura 6.14: Micrografia do copolímero 2 (ampliação de 500 vezes)..... 75
Figura 6.15: Micrografia do copolímero 2 (ampliação de 1000 vezes)..... 75

Figura 6.16: Micrografia do copolímero 3 (ampliação de 500 vezes)..... 76
Figura 6.17: Micrografia do copolímero 3 (ampliação de 1000 vezes)..... 76
Figura 6.18: Fotografia óptica do copolímero 1..... 78
Figura 6.19: Fotografia óptica do copolímero 2..... 78
Figura 6.20: Fotografia óptica do copolímero 3..... 79
Figura 6.21: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 1.. 80
Figura 6.22: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 2.. 80
Figura 6.23: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 3.. 80
Figura 6.24: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 4.. 81
Figura 6.25: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 5.. 81
Figura 6.26: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 6.. 81
Figura 6.27: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 7.. 82
Figura 6.28: Micrografia do microencapsulado 1 (ampliação de 500 vezes)..... 83
Figura 6.29: Micrografia do microencapsulado 1 (ampliação de 1500 vezes)..... 83
Figura 6.30: Micrografia do microencapsulado 4 (ampliação de 500 vezes)..... 84
Figura 6.31: Micrografia do microencapsulado 4 (ampliação de 1500 vezes)..... 84
Figura 6.32: Micrografia do microencapsulado 7 (ampliação 500 vezes)..... 85
Figura 6.33: Micrografia do microencapsulado 2 (ampliação 500 vezes)..... 86
Figura 6.34: Micrografia do microencapsulado 2 (ampliação 1500 vezes)..... 86
Figura 6.35: Micrografia do microencapsulado 5 (ampliação 500 vezes)..... 87
Figura 6.36: Micrografia do microencapsulado 5 (ampliação 1500 vezes)..... 87
Figura 6.37: Micrografia do microencapsulado 3 (ampliação 500 vezes)..... 88
Figura 6.38: Micrografia do microencapsulado 3 (ampliação 1500 vezes)..... 88
Figura 6.39: Micrografia do microencapsulado 6 (ampliação 500 vezes)..... 89
Figura 6.40: Micrografia do microencapsulado 6 (ampliação 1500 vezes)..... 89
Figura 6.41: Fotografia óptica da tetraciclina..... 90
Figura 6.42: Fotografia óptica do microencapsulado 1..... 91
Figura 6.43: Fotografia óptica do microencapsulado 4..... 91
Figura 6.44: Fotografia óptica do microencapsulado 7..... 92
Figura 6.45: Fotografia óptica do microencapsulado 2..... 93
Figura 6.46: Fotografia óptica do microencapsulado 5..... 93
Figura 6.47: Fotografia óptica do microencapsulado 3..... 94
Figura 6.48: Fotografia óptica do microencapsulado 6..... 94

Figura 6.49: Curvas de TG/DTG e DTA da tetraciclina..... 95
Figura 6.50: Curva de TG da tetraciclina..... 96
Figura 6.51: Curva de DTA da tetraciclina..... 96
Figura 6.52: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 1..... 97
Figura 6.53: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 2..... 98
Figura 6.54: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 3..... 99
Figura 6.55: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 4..... 100
Figura 6.56: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 5..... 101
Figura 6.57: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 6..... 102
Figura 6.58: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 7..... 103
Figura 6.59: Curva de DSC da tetraciclina..... 105
Figura 6.60: Sobreposição das curvas de DSC dos microencapsulados 1, 4 e 7 (a partir do copolímero 1)..... 106
Figura 6.61: Sobreposição das curvas de DSC dos microencapsulados 2 e 5 (a partir do copolímero 2)..... 107
Figura 6.62: Sobreposição das curvas de DSC dos microencapsulados 3 e 6 (a partir do copolímero 3)..... 108
Figura 6.63: Difratograma do microencapsulado 3..... 110
Figura 6.64: Espectro de FTIR-ATR da tetraciclina..... 111
Figura 6.65: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 1..... 112
Figura 6.66: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 2..... 112
Figura 6.67: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 3..... 113
Figura 6.68: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 4..... 114
Figura 6.69: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 5..... 114
Figura 6.70: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 6..... 115
Figura 6.71: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 7..... 115
Figura 6.72: Espectro de FTIR-ATR da fase solúvel e do clorofórmio..... 116
Figura 6.73: Espectro de FTIR-ATR da fase insolúvel..... 116
Figura 6.74: Espectro de ^{1}H-NMR da tetraciclina em água deuterada..... 117
Figura 6.75: Espectro de ^{1}H-NMR do microencapsulado 4 em clorofórmio deuterado... 118
Figura 6.76: Espectro de ^{1}H-NMR do microencapsulado 6 em clorofórmio deuterado... 119
Figura 6.77: Espectro de ^{13}C-NMR da tetraciclina em água deuterada..... 120
Figura 6.78: Espectro de ^{13}C-NMR do microencapsulado 4 em clorofórmio deuterado... 121

Figura 6.79: Espectro de ^{13}C-NMR do microencapsulado 6 em clorofórmio deuterado... 122

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 4.1: Posição das bandas características dos grupos funcionais na técnica IR..... 42

Tabela 5.1: Composição de copolímeros baseados em PLLA e PEG..... 54

Tabela 6.1: Valores de diâmetro médio e desvio padrão dos microencapsulados..... 82

Tabela 6.2: Dados termogravimétricos obtidos nas curvas TG/DTG referentes à tetraciclina, copolímeros e microencapsulados..... 104

Tabela 6.3: Dados térmicos obtidos na curva DTA referentes à tetraciclina, copolímeros e microencapsulados..... 104

Tabela 6.4: Temperaturas de transição vítrea, de cristalização e de fusão observadas nas curvas de DSC dos materiais sintetizados..... 109

LISTA DE SIGLAS

APHA	*American Public Health Association* (Associação Americana de Saúde Pública)
DEB	Departamento de Engenharia Bioquímica
DDS	*Drug Delivery Systems* (Sistemas de Liberação de Droga)
DPO	Departamento de Processos Orgânicos
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EQ	Escola de Química
FTIR-ATR	Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método de Reflexão Total Atenuada
LALLS	*Low Angle Laser Light Scattering* (Espalhamento de Luz Laser de Baixo Ângulo)
NMR	*Nuclear Magnetic Resonance* (Ressonância Magnética Nuclear)
OM	*Optical Microscopy* (Microscopia Óptica)
PCL	poli(ε-caprolactona)
PDLA	poli(d,l-lactídeo)
PEG	poli(glicol etilênico)
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-glicólico)
PLLA	poli(l,l-lactídeo)
ROP	*Ring Opening Polimerization* (Polimerização por Abertura do Anel)
SEM	*Scanning Eletronic Microscopy* (Microscopia Eletrônica de Varredura)
TG	Termogravimetria
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
XRD	*X Rays Diffraction* (Difração de Raios X)

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Copolímeros com natureza anfifílica têm despertado o interesse por apresentarem a propriedade de auto-organização (formação de micelas coloidais) em meio aquoso (GRIFFITH, 2000; HOFFMAN, 2002) alterando as propriedades de dissociação e erosão, e, por sua vez, melhorando a biodistribuição e biocompatibilidade dos polímeros citados anteriormente no controle de liberação da droga como nanopartículas (YANG & ALEXANDRIDIS, 2000; KAWASHIMA, 2001).

A tecnologia de liberação controlada de fármacos envolve campos multidisciplinares da ciência (química, física, biologia, ciências de matérias, polímeros entre outros) e apresenta grandes desafios. Avanços nesta tecnologia podem contribuir de forma a assegurar uma concentração adequada do fármaco no plasma sanguíneo (PILLAI & PANCHAGNULA, 2001; FREIBERG & ZHU, 2004; KIM *et al*., 2009) e o micro e o nanoencapsulamento tem sido um método alternativo para otimizar tal efeito terapêutico (GRIFFITH, 2000).

Nanodispositivos preparados a partir de poli(hidroxi ácidos) tendo como grupo radical diferentes estruturas, cuja importância é devido a biodegradabilidade apresentada, podem ser exemplificados por poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(trimetilenocarbonato) (PTMC), poli(ε-caprolactona) (PCL) e entre outros. A facilidade de copolimerização por reação de abertura do anel dos monômeros constituintes amplia e flexibiliza as propriedades destes sistemas biodegradáveis (ALLENDER *et al.*, 2000; BREINTENBACH, LI & KISSEL, 2000; BAJPAI *et al*., 2008).

Copolímeros biodegradáveis na forma de diblocos (formato AB) ou triblocos (formatos ABA ou BAB) de segmentos originários do PLA, tais como poli(l,l-lactídeo) (PLLA), poli(d,l-lactídeo) (PDLA), copolímero poli(ácido lático-co-ácido glicólico) PLGA (segmento A) e de poli(glicol etilênico) (PEG) (segmento B) têm sido enfatizados os estudos de síntese e caracterização na última década por apresentarem biodegradabilidade e potencial para aplicação como nanossistemas portadores de fármaco (JEONG, BAE & KIM, 2000; KUMAR, RAVIKUMAR & DOMB, 2001; HASIRCI *et al*., 2001; JEONG, KIM & BAE, 2002). Entretanto, somente nos últimos anos que os copolímeros de formato de triblocos estão sendo estudados com maior ênfase.

Huang, Chung & Tzeng (1997) concluíram que o copolímero dibloco PLA-PEG possui maior hidrofilicidade e menor temperatura de transição vítrea em relação ao homopolímero PLA. As microesferas obtidas desse dibloco, com encapsulamento de droga hidrofílica – lidocaína – pelo método de emulsão óleo/água, eram mais porosas e possuíam uma permeabilidade mais adequada à liberação do fármaco citado.

Em outro trabalho, Huang, Chung & Tzeng (1999) identificaram que a introdução de poli(glicol etilênico) nos homopolímeros de ácido láctico diminuiu a acidez dos produtos degradados, aumentou a taxa de degradação do sistema e a taxa de liberação de drogas pelo sistema copolimérico.

Nakada e colaboradores (1998) confirmaram em pesquisas *in vivo* que nanopartículas de tribloco PLA-PEG-PLA possuíam a habilidade de evadir-se da captura pelo sistema retículo endotelial prolongando, assim, a permanência no sistema circulatório. Esse tempo de permanência era em função dos seguintes fatores: concentração, tamanho e distribuição de massa molar do segmento PEG no copolímero.

Matsumoto e colaboradores (1999) pesquisaram a liberação *in vitro* de progesterona a partir de microesferas de PLA e PLA-PEG-PLA. A velocidade de liberação da droga era afetada por fatores relacionados à composição do copolímero, principalmente a porosidade. A velocidade de liberação aumentava com o acréscimo do conteúdo do segmento de PEG no copolímero. A adição de surfatante também alterou a porosidade das microesferas. Este resultado foi atribuído em parte a uma maior molhabilidade das mesmas, propiciada pelo PEG e surfatante. A distribuição da massa molar do copolímero também foi considerada um importante parâmetro no controle da velocidade de liberação do fármaco.

Tobio e colaboradores (2000) estudaram a comparação entre os sistemas de liberação de droga (*Drug Delivery Systems* - DDS) convencionais e os DDS a partir do copolímero PLA-PEG e concluíram que o recobrimento das nanopartículas com PEG tem um papel fundamental na estabilidade dos DDS no fluido intestinal e no acesso destas a corrente sanguínea e a circulação linfática; as nanoesferas PEG-PLA apresentaram maior tendência em transportar o principio ativo na corrente sanguínea que no sistema linfático. A camada de PEG facilitou a adsorção e transporte de fármacos através das mucosas até a circulação que flexibilizará a administração do DDS por rotas alternativas como a tópica, a nasal, a vaginal e inclusive a oral.

Govender e colaboradores (2000) publicaram a incorporação da droga hidrofílica, procaína, em diblocos de PLA-PEG com segmento fixo de PEG (5 kDa) e variando os segmentos de PLA (3-110 kDa). Concluíram que os diâmetros dos nanoparticulados (forma esférica) aumentaram proporcionalmente ao peso molecular de PLA nos mesmos, porém a eficiência de liberação da droga não dependia dessa variação no segmento PLA.

Molina e colaboradores (2001) prepararam hidrogéis portadoras de albumina de soro bovino (ASB) e de fibrinogênio a partir de tais copolímeros utilizando o método de separação de fase. A divisão das moléculas de ASB a partir da matriz apresentou comportamento

parabólico, típico de sistemas monolíticos de entrega de droga enquanto que a difusão do fibrinogênio apresentou um comportamento linear sugerindo que a matriz funciona com um reservatório para a droga.

Lui e colaboradores (2001) avaliaram a aplicabilidade do copolímero PLA-PEG-PLA como sistema parenteral portador da droga anticâncer adrimicina. Micelas com estreita distribuição de tamanho foram preparadas pelo método de difusão do solvente. A eficiência de incorporação do fármaco aumentou com o acréscimo do tamanho do segmento de PLA no copolímero e tais características tornaram as micelas PLA-PEG-PLA promissoras como portadoras de drogas.

Liggins & Burt (2002) desenvolveram diblocos de metoxipoli(glicol etilênico) (MePEG) e poli (*d*,*l*-lactídeo) (PDLA) por polimerização em massa via abertura de anel do meso lactídeo na presença do catalisador octanoato de estanho. Observaram que o sistema poliéter-poliéster desenvolvido como micela carregadora de droga hidrofóbica como o paclitaxel foi satisfatória, pois o comportamento térmico do copolímero possuiu propriedades numerosas em relação aos seus homopolímeros, além do perfil de miscibilidade do paclitaxel no copolímero foi mais eficiente que nos homopolímeros.

Kissel, Li & Unger (2002) prepararam microesferas a partir de poli(d,l-ácido láctico) (PDLLA) PDLLA-PEG-PDLLA e PLA portando os fármacos, lidocaína e hidrocloreto de propanolol, e pesquisadas as taxas de liberação *in vitro*. A velocidade de liberação de ambos os fármacos foi geralmente maior nas microesferas do copolímero devido a maior porosidade das mesmas. Também observaram que a velocidade de liberação da droga hidrofílica (propanolol) foi geralmente maior que a droga hidrofóbica (lidocaína).

Lin, Juang & Lin (2003) pesquisaram a liberação de droga anticâncer indomethacin em micelas obtidas a partir de diversos copolímeros triblocos poli(lactona)-PEG-poli(lactona), sendo os blocos de lactonas formados por PLA, poli(valerolactona) (PVL) ou PCL. A taxa de liberação da droga nas micelas tornou-se independente da composição dos copolímeros nos primeiros cinco dias, entretanto, apos este período uma dependência como tamanho do bloco de poli(lactona), ou seja, as micelas com maiores blocos de poli(lactona) apresentaram uma menor taxa de liberação do fármaco. O efeito da natureza hidrofóbica da lactona foi também pesquisado, uma reduzida taxa de liberação foi observada em micelas PVL-PEG-PVL e PCL-PEG-PCL, quando a composição molar foi maior que 40/1/40, a partir desta composição, a liberação de droga foi inferior a 40% em um intervalo de 14 dias. A liberação do fármaco em micelas PLA-PEG-PLA foi mais rápida que as anteriores, este comportamento foi atribuído à fraca interação entre o copolímero PLA e a droga encapsulada no sistema polimérico.

Ruan & Feng (2003) pesquisaram a taxa de liberação do paclitaxel (uma das mais poderosas drogas anticâncer) em microesferas de tribloco de PLA-PEG-PLA e em microesferas do copolímero PLGA. Em estudo prévio, a liberação do fármaco em microesferas de PLGA mostrou-se extremamente vagarosa com uma liberação de apenas 50% em 3 meses, quando para um tratamento efetivo de câncer, normalmente é necessário uma liberação contínua de droga em um período entre 1 semana a 1 mês. Esperava-se que a junção dos blocos PEG hidrofílicos a cadeia do PLA hidrofóbico facilitasse a liberação da droga a partir das microesferas. De fato, a liberação do fármaco a partir dos microencapsulados de PLA-PEG-PLA mostrou-se muito mais rápida que as mesmas de PLGA, 50% *versus* 18% em 1 mês. Este resultado foi parcialmente atribuído à morfologia porosa dos mesmos, pois foram preparados adicionando-se acetona ao solvente orgânico, apresentando, assim, uma morfologia bastante porosa e, consequentemente, uma taxa de liberação do fármaco maior.

Hiemstra e colaboradores (2006) observaram reologicamente que triblocos de PLLA-PEG-PLLA e PDLA-PEG-PDLA formaram hidrogéis em concentrações mais baixas que os respectivos diblocos, forneceram uma gelificação mais rápida e maior módulo de armazenamento devido ao aumento da densidade de ligações reticuladas, promovendo assim um uso melhor dos triblocos como hidrogéis injetáveis para liberação de proteínas terapêuticas *in vivo*, pois os mesmos são biodegradáveis.

Em trabalho posterior, Hiemstra e colaboradores (2007) estudaram a introdução de diferentes proteínas, como lisozina, IgG e rhIL-2 nos hidrogéis estereocomplexos sintetizados de PDLA-PEG e/ou PLLA-PEG. Concluíram na liberação *in vitro*, que a lisozina possuiu cinética de primeira ordem com 90% de liberação em 10 dias, a IgG seguiu a cinética de ordem zero com 50% de liberação em 16 dias e a proteína terapêutica rhIL-2 seguiu uma cinética de ordem zero com liberação de 75% em apenas 7 dias. Estudos de liberação *in vivo* perceberam que os sistemas contendo os hidrogéis estereocomplexos de PEG-PLA e a proteína rhIL-2 promoveram uma taxa de liberação menor entre 1 a 2 semanas, em relação aos sistemas contendo somente a proteína rhIL-2.

Copolímeros anfifílicos nos formatos de ABA e BAB de PLA (A) e PEG (B) também foram estudados por He e colaboradores (2007) e foram capazes de formar nanomicelas (40-200 nm) em meio aquoso e de serem utilizados como liberadores de fármacos hidrofóbicos como paclitaxel, com eficiência de incorporação de 30 a 40%. Concluíram que a liberação controlada-difusão é menor nos copolímeros de formato BAB e tal liberação é influenciada pelo tamanho dos segmentos de PLLA, enquanto que o segmento PEG possuiu maior influencia nas características físico-químicas das nanomicelas.

Lee e colaboradores (2008) observaram as propriedades de separação de fases na superfície dos triblocos e diblocos constituídos por PLLA. Concluíram que os triblocos são mais capazes de aumentar a estabilidade tridimensional e a atividade biológica de fármacos macromoleculares hidrofílicos tais como proteínas e enzimas.

Fernanéz-Carbadilho e colaboradores (2008) observaram que a incorporação do PEG em matrizes de PLA e de PLGA reduziu a temperatura de transição vítrea (T_g) do sistema final polimérico, originando microesferas de superfície mais porosa que os homopolímeros. Tais sistemas poderiam ser utilizados como liberadores de droga destinados à administração parenteral.

Xu e colaboradores (2009) estudaram a possibilidade de encapsulamento de fármacos como o paclitaxel (droga hidrofóbica) e doxorrubicina (droga hidrofílica) em nanofibras de PEG-PLA. As propriedades de solubilidade delas nas nanofibras foram responsáveis por seus comportamentos de liberação. A taxa de liberação da doxorrubicina foi mais rápida do que a do paclitaxel. Embora o comportamento da liberação da doxorrubicina não fosse afetado pelo paclitaxel, a taxa de liberação do paclitaxel foi acelerada pela presença da doxorrubicina. Os resultados anticancerosos prometedores sugeriram que um único portador para a entrega da multidroga possa ser útil no desenvolvimento do dispositivo copolimérico para a terapia.

Os trabalhos anteriormente citados evidenciam a utilização de monômeros originários do ácido láctico e glicol etilênico para síntese de copolímeros no formato di e triblocos com alto potencial de estudo científico e tecnológico, interesse da presente tese.

O Capítulo 2 apresentará o objetivo geral e os específicos da tese.

O Capítulo 3 mostrará a justificativa pertinente da presente tese.

O Capítulo 4 mostrará os fundamentos teóricos dos materiais envolvidos na síntese dos copolímeros e do fármaco, do microencapsulamento e das técnicas de caracterização utilizadas na presente tese.

O Capítulo 5 apresentará os materiais e os equipamentos envolvidos na síntese e na caracterização dos copolímeros e microencapsulados, além de apresentar os métodos de preparo dos mesmos.

O capítulo 6 mostrará os resultados das técnicas de caracterização dos materiais desenvolvidos na presente tese, além de confrontar com resultados obtidos de outros pesquisadores na área de Ciência de Materiais e Microencapsulamento.

O Capítulo 7 apresentará as conclusões da presente tese e o Capítulo 8, as sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a utilização de copolímeros biodegradáveis de poli(*l,l*-lactídeo)-*b*-poli(glicol etilênico)-*b*-poli(*l,l*-lactídeo) (PLLA-PEG-PLLA) como um sistema de proteção de fármacos (no caso particular, a tetraciclina), possibilitando, no futuro, o uso de tais copolímeros como sistemas de liberação de droga (*Drug Delivery Systems* - DDS).

Objetivos Específicos

Sintetizar os copolímeros triblocos de poli(*l,l*-lactídeo)-*b*-poli(glicol etilênico)-*b*-poli(*l,l*-lactídeo) (PLLA-PEG-PLLA);

Realizar o microencapsulamento da tetraciclina nos copolímeros sintetizados pela técnica de dupla emulsão com evaporação do solvente;

Caracterizar os copolímeros e os microencapsulados por Análise Térmica, tais como: Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

Caracterizar os copolímeros e os microencapsulados por Difração de Raios X (XRD), Espectrometria de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR), Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Microscopia Óptica (OM);

Avaliar a presença de micro-organismos (mesófilos aeróbios) nos copolímeros sintetizados com metodologia proposta pela *American Public Health Association* (APHA);

Determinar o tamanho de partícula dos microencapsulados pela técnica de Espalhamento de Luz Laser de Baixo Ângulo (LALLS);

Caracterizar os microencapsulados obtidos por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR).

CAPÍTULO 3

JUSTIFICATIVA

A indústria farmacêutica sintetiza novos fármacos e, em muitas vezes, devido a sua estreita faixa terapêutica (ou devido ao seu caráter tóxico ou lábel), necessitam de dispositivos para sua proteção e transporte através do organismo, ou seja, necessitam serem recobertos para atravessar as diversas membranas do organismo sem serem degradados (FRISBEE, COLLIN & McGINITY, 2000; BAJPAI *et al*., 2008).

Alguns sistemas de liberação de fármacos destinam-se a liberar o fármaco no organismo de modo que seja absorvido com rapidez e completamente, enquanto outros devem liberar o princípio ativo lentamente para que a ação do fármaco seja prolongada. Sendo assim, um sistema de liberação prolongada objetiva eliminar as mudanças cíclicas na concentração de fármaco no plasma, observada após a administração de um sistema de liberação convencional, permitindo uma redução da freqüência de doses, justificando assim estudo científico e tecnológico nessa área com intuito de melhorar a qualidade de vida humana.

Entre as diferentes estratégias disponíveis para alcançar um controle na liberação de fármacos estão os sistemas copoliméricos, pois sua diversidade e versatilidade (caráter anfifílico, biodegradabilidade, velocidade de degradação e características físicas e mecânicas) atende as necessidades para um efeito terapêutico mais contínuo da droga, sendo capazes de conduzir os fármacos a mucosa gastrintestinal e liberá-los aos sítios específicos de forma a aumentar a eficiência e minimizar os efeitos tóxicos (BAE *et al*., 2000; LUCKE *et al*., 2000; VILA *et al*., 2002).

Copolímeros anfifílicos constituídos por poli(*l*,*l*-lactídeo) (PLLA) e por poli(glicol etilênico) (PEG) são exemplos interessantes para estudo cientifico e tecnológico pois o poli(*l*,*l*-lactídeo) apresenta disponibilidade comercial, biocompatibilidade, facilidade de síntese e biodegradabilidade e o poli(glicol etilênico) possui baixa toxicidade, solubilidade em água, alta flexibilidade da cadeia, propriedade mucoadesiva e, principalmente, a capacidade de promover estabilização estérea na superfície da nanopartícula quando em solução aquosa.

Assim, a presente tese visa o desenvolvimento de copolímeros a base de PLLA e PEG e de microencapsulamento de um fármaco (por exemplo, um antibiótico, a tetraciclina) neste sistema copolimérico para liberação controlada bem como a caracterização físico-química desses sistemas.

CAPÍTULO 4

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

A síntese de copolímeros biodegradáveis e anfifílicos (polímero hidrofóbico + polímero hidrofílico) contribui para o ramo da nanociência/nanotecnologia, pois os mesmos podem se autoassociarem em microestruturas como micelas e podendo, assim, transportar com segurança a droga até o alvo, ilustrado na Figura 4.1 (THORCHILIN, 2001; HARADA & NAGASAKI, 2001).

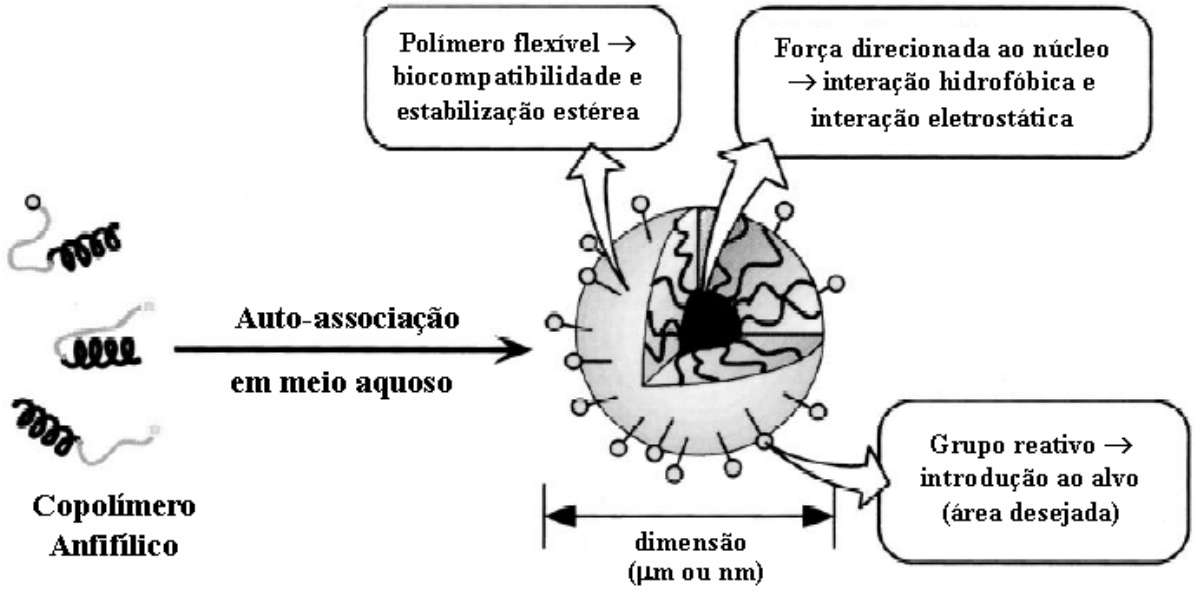

Figura 4.1: Ilustração da autoassociação de copolímero anfifílico (micela) e sua relevância a liberação de droga. (Fonte: KATAOKA, HARADA & NAGASAKI, 2001)

A síntese de copolímeros é mais favorável do que as misturas mecânicas conhecidas como blendas, pois além de combinar as propriedades dos homopolímeros, propicia a propriedades adicionais ao material por efeito sinergético. A copolimerização gera macromoléculas capazes de se auto-organizar e a ligação covalente entre os blocos pode promover a miscibilidade entre as partes não similares (JARRET *et al*., 2000; KUMAR *et al*., 2007).

A copolimerização representa uma valiosa estratégia para preparar materiais poliméricos (hidrogéis) com propriedades físico-químicas e biodegradabilidades ajustadas com a composição química e cristalinidades dos segmentos que compõe o copolímero, Figura 4.2. As características de um copolímero dependem não só da concentração relativa e propriedades das unidades repetitivas, mas também da microestrutura.

O conhecimento e o entendimento da ligação dessas variáveis (alterações de pH, temperatura, solvente e força iônica) tornarão possível o planejamento de novos materiais

com combinações de propriedades (BAJPAI *et al*., 2001; KISSEL, LI & UNGER, 2002; RIESS, 2003; HAN, NA & BAE, 2003; AAEMER *et al*., 2004).

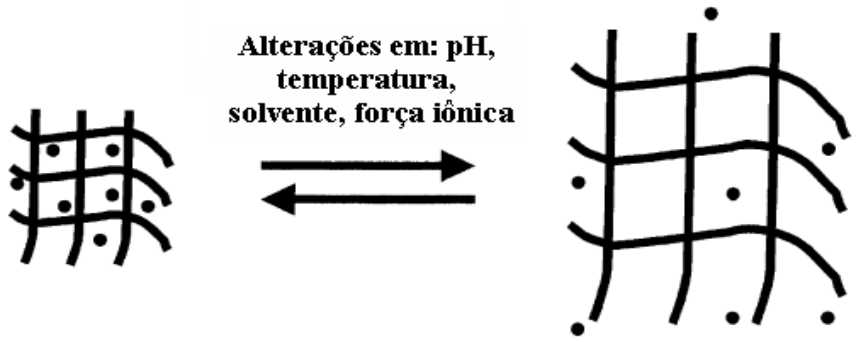

Figura 4.2: Copolímeros: hidrogéis inteligentes, estímulo-resposta, liberação modulada da droga (círculos). (Fonte: BAJPAI *et al*., 2001)

As variadas estruturas que podem formar copolímeros (bloco, alternado e estatístico), poliésteres baseados em poli(ácido láctico) (PLA) suas formas emantioméricas (PDLA e PLLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e copolímero de poli(ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (PLGA), são os melhores biomateriais para projetos na área biomédica, especialmente em ortopedia e liberação controlada de drogas em função das características de biocompatibilidade, degradação e reabsorção em meio aquoso (REZENDE & DUEK, 2003; MALLARDÉ *et al*., 2003; KIM & PARK, 2004; MATSUMOTO *et al*., 2005; MOTTA & DUEK, 2006; KIM, CHUNG & PARK, 2006; HONG, REIS & MANO, 2008).

As próximas seções deste capítulo apresentarão uma revisão bibliográfica dos homopolímeros (PLLA e PEG) que formam o copolímero proposto, objeto de estudo desta tese, além de apresentar a rota de síntese da copolimerização e a aplicação como sistemas de liberação de droga (DDS).

4.1 PLA - Poli(ácido láctico)

Ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanóico) é um ácido orgânico encontrado em vários produtos de origem animal. Desde a década de 60 do século passado, as vantagens desse material na área médica foram pesquisadas e reveladas e, em seguida, a fabricação desses polímeros foi realizada em escala industrial.

A Figura 4.3 apresenta o ciclo de vida do polímero de ácido láctico, tal monômero pode ser reproduzido tanto por processos de fermentação quanto pelas rotas químicas; entretanto, a primeira opção ainda é mais adotada por sua simplicidade e baixo custo. A fermentação ocorre normalmente em processos por bateladas ou contínuos e os parâmetros importantes na fermentação são valores de pH, temperatura, atmosfera e em alguns casos, agitação. Após o processo de fermentação, em muitos casos, o ácido lático obtido é purificado para uma polimerização seguinte, gerando o poli(ácido láctico) (PLA) por policondensação (PC) (JACOBSEN *et al*., 2000; GUPTA & KUMAR, 2007).

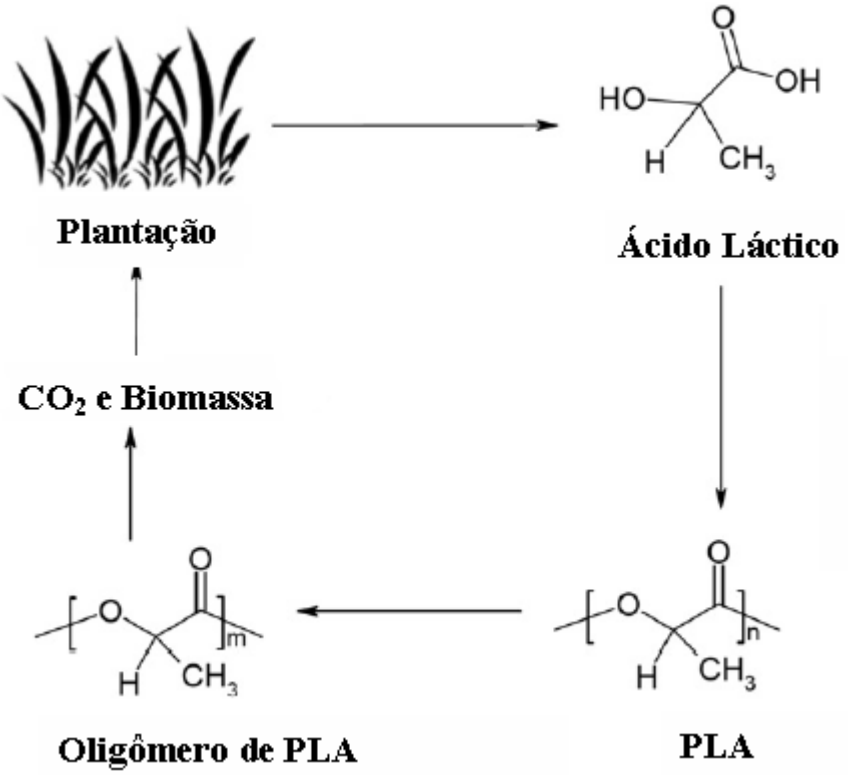

Figura 4.3: Ilustração do ciclo de vida do PLA. (Fonte: GUPTA & KUMAR, 2007)

O processo de biodegradação e bioadsorção dos poli(α-hidroxi ácidos) é descrito na literatura como uma sucessão de eventos (restante do ciclo apresentado na Figura 4.3). Inicialmente, exposto ao meio aquoso, o material sofre hidratação. Com a presença das

moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa ponderal média e pela perda de suas propriedades mecânicas (METTERS, ANSETH & BOWMAN, 2000; EDLUND & ALBERTSSON, 2003; DENG *et al.*, 2007; GUPTA & KUMAR, 2007). A taxa de degradação é influenciada por fatores de configuração estrutural, como grau de copolimerização, cristalinidade, massa molar, morfologia, quantidade de monômero residual e porosidade.

A bioadsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos com características dos metabólitos orgânicos, especialmente os ácidos do ciclo de Krebs. Para os PLAs, ao terminar a hidrólise do material, a degradação segue o processo de oxidação do ácido láctico, que por sua vez são convertidos em ácido pirúvico. Na presença da acetil coenzima A, ocorre liberação de CO_2 e, consequentemente, a decomposição em citrato, que ao ser incorporado no ciclo de Krebs, resultará na formação de CO_2 e H_2O, podendo sua eliminação ser feita através da urina, fezes e da respiração. Nenhuma quantidade significativa de acumulo de resíduos da degradação é encontrada em órgãos vitais. O material foi então absorvido e eliminado (EDLUND & ALBERTSSON, 2003; DENG *et al.*, 2007; GUPTA & KUMAR, 2007).

Tais polímeros são derivados de monômeros produzidos pelo metabolismo do corpo humano, a degradação desses materiais é segura para usos ‘in vivo’. Muito embora o PLGA seja utilizado e considerado como o mais importante dos polímeros biodegradáveis, o aumento da acidez local devido a sua degradação pode levar a uma irritação durante sua utilização. Em implantes de PLGA, tem-se estudado o uso de sais básicos para controlar o pH no meio local (MURAKAMI *et al.*, 2000; KRICHELDORF, 2001).

O ácido láctico contém um carbono α assimétrico, o qual é descrito tipicamente na forma D ou L, em termo de isomeria clássica, apresentados na Figura 4.4. Esses homopolímeros, PDLA e PLLA, apresentam propriedades físico-químicas semelhantes, são opticamente ativos em relação ao feixe de luz polarizada, enquanto que o PLA racêmico tem características bastante diferentes. Por exemplo, as temperaturas de transição vítrea (T_g) de ambos são em torno de 60ºC, mas PLLA apresenta uma cristalinidade elevada com seu ponto de fusão, T_m de 170ºC; enquanto o PLA racêmico é completamente amorfo (SÖDERGÅRD & STOLT, 2002).

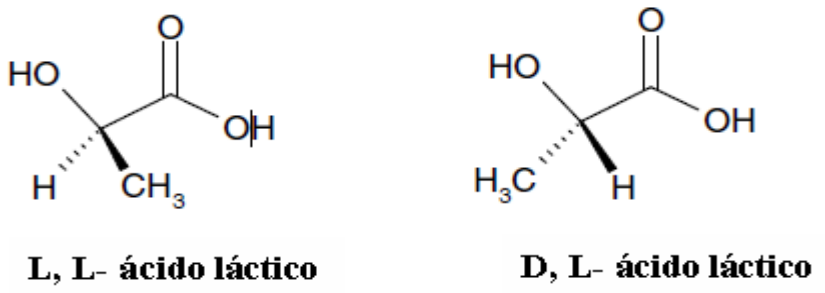

Figura 4.4: Formas isoméricas do ácido láctico. (Fonte: GUPTA & KUMAR, 2007)

As propriedades de polímeros baseados em ácido láctico variam dependendo dos estereoisómeros. Tais polímeros podem ser fabricados por diversas rotas e a nomenclatura dos mesmos se difere por tais rotas de síntese. Polímeros derivados do ácido láctico pela policondensação (PC) são geralmente definidos como poli(ácido láctico) (PLA), enquanto os que são preparados por polimerização via abertura de anel (*ring opening polimerization*-ROP) são chamados polilactídeos (Figura 4.5).

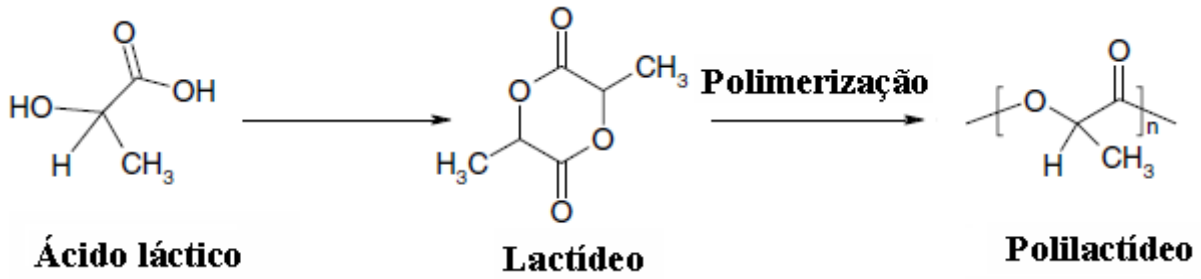

Figura 4.5: Síntese de PLLA por polimerização de abertura de anel (ROP). (Fonte: GUPTA & KUMAR, 2007)

Devido aos dois estereoisômeros do ácido láctico, o lactídeo opticamente ativo correspondente pode ser encontrado em duas formas diferentes, isto é, *D*,*D*-lactídeo e *L*,*L*-lactídeo (Figura 4.6). Além disso, o lactídeo pode ser formado por uma molécula de *D*- e outra de *L*- ácido láctico, formando o *D*,*L*-lactídeo (meso-lactídeo), Figura 4.6. O aumento da cristalinidade pode ser manipulado também pela adição de uma tensão de orientação, induzindo a aproximadamente 10ºC acima de sua temperatura de transição vítrea (T_g) reorientando as cadeias durante o processamento do material (LIM, AURAS & RUBINO, 2008).

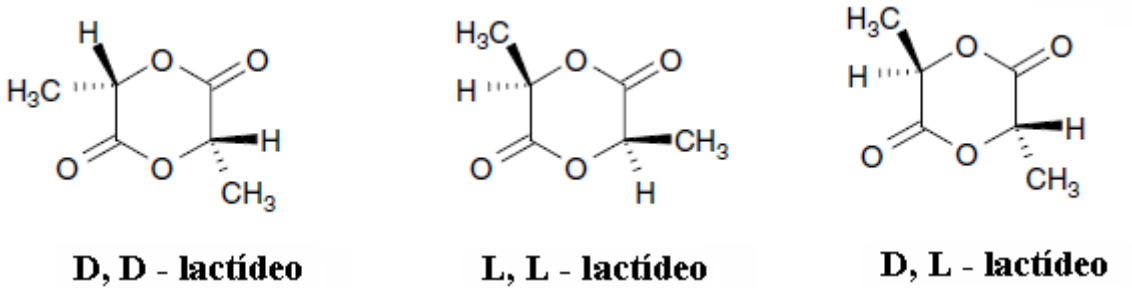

Figura 4.6: Diferentes isômeros de lactídeo. (Fonte: GUPTA & KUMAR, 2007)

A preparação dos polímeros baseados em ácido láctico pela ROP pode ser realizada em polimerização em solução, em massa ou em suspensão. O mecanismo envolvido em ROP pode ser reação iônica ou inserção por coordenação dependendo do sistema do catalisador usado. Diversos tipos de catalisadores foram testados ao longo do tempo: compostos metálicos de estanho (II), alumínio, zinco, potássio e outros (BHAW-LUXIMON *et al*., 2001; D'ANGELO *et al*., 2001; HELWIG *et al*., 2001; PRICE, LENZ & ANSELL, 2002).

Entre eles, 2-etil-hexanoato de estanho, $Sn(Oct)_2$, é o mais utilizado, pois ele é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) para fins alimentícios e médicos em inúmeros países. Assim, o $Sn(Oct)_2$ é facilmente encontrado comercialmente para síntese do poli (ácido láctico) para usos em área médica. Além disso, esse catalisador apresenta solubilidade em solventes orgânicos e em monômeros de ésteres cíclicos, facilitando a reação. O sistema reativo do *l*,*l*-lactídeo com o $Sn(Oct)_2$ gera produtos de alta massa molar com baixa taxa de racemização, consequentemente, melhorando as propriedades mecânicas dos polilactídeos (KRICHELDORF, KREISER-SAUNDERS & BOETTCHER, 1995; DONG *et al*., 2001; BHATTARAI *et al*., 2003; KANG & LEROUX, 2004; REN *et al*., 2005; AGRAWAL *et al*., 2006; WANG *et al*., 2007; McINNES *et al*., 2009).

4.2 PEG - Poli(glicol etilênico)

O polímero poli(glicol etilênico), mais popularmente conhecido como poli(etileno glicol), PEG, é um poliéter neutro de estrutura linear ou ramificada, solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (Figura 4.7).

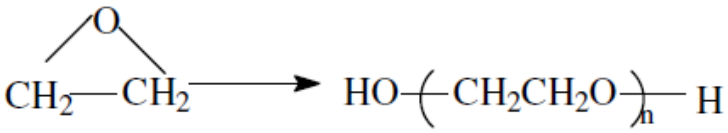

Figura 4.7: Esquema de reação de síntese do poli(glicol etilênico). (Fonte: CHENG *et al.*, 2006)

PEG possui uma variedade de propriedades aplicáveis na área biomédica e biotécnica (TOBIO *et al.*, 2000; HUH, CHO & PARK, 2003; DENG *et al.*, 2005). Isso porque o PEG é raramente efetivo para excluir outros polímeros quando estão presentes num ambiente aquoso. Essa propriedade mostra-se na sua conjugação com proteínas e na formação de sistemas bifásicos com outros polímeros. A Figura 4.8 apresenta a aplicação desta conjugação em copolímero dibloco PEG/PLA desenvolvido por OTSUKA e colaboradores (2000) ilustrando a importância do PEG que forma um sítio de imobilização para moléculas funcionais.

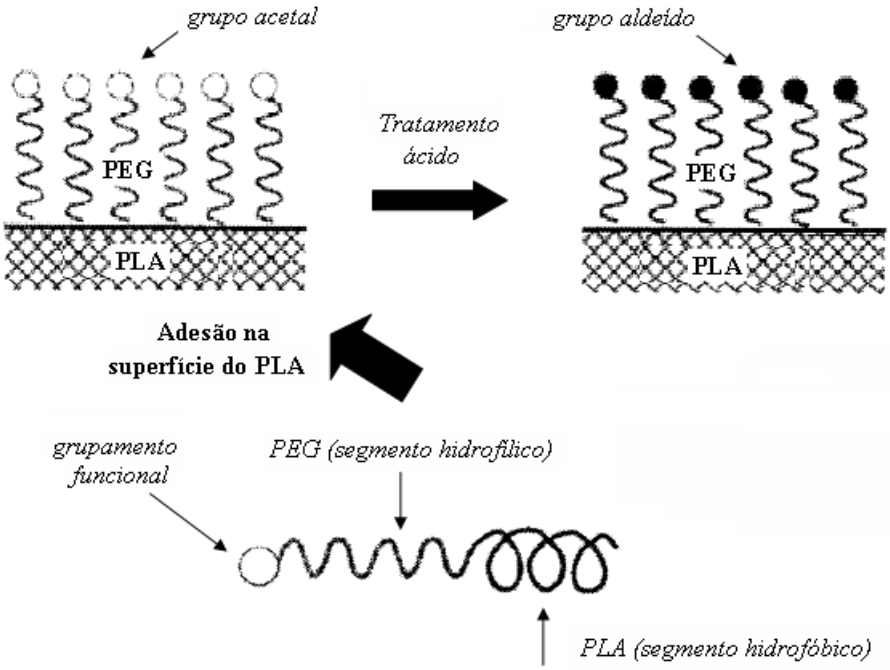

Figura 4.8: Representação esquemática da aplicação do PEG em copolímero dibloco PLA/PEG. (Fonte: OTSUKA *et al.*, 2000)

Além disso, o polímero é atóxico e não é prejudicial às atividades protéicas e celulares, embora interaja com membranas celulares. O PEG também está sujeito às modificações químicas e associações com outras moléculas, esse último afeta muito pouco sua propriedade química original, porem controla sua solubilidade e aumenta o seu tamanho de cadeia, dependendo da quantidade da cadeia adicional.

PEG também é chamado de poli(óxido de etileno), de um modo geral, o poli(glicol etilênico) se refere aos de massa molar abaixo de 20.000, poli(óxido de etileno) se refere a polímeros de massa molar mais elevada. O PEG é geralmente por uma iniciação aniônica com pouca transferência de cadeia e terminação. Com o aumento da massa molar da cadeia, aumenta a cristalinidade da estrutura e, consequentemente, a viscosidade torna-se mais elevada, por isso, os PEGs que apresentam massa molar abaixo de 1000 $g.mol^{-1}$ são líquidos viscosos e incolores, os que apresentam massa molar acima desse valor são brancos e quebradiços. O ponto de fusão do sólido é proporcional a sua massa molar e varia na faixa de 30ºC a 60ºC. Os PEGs utilizados em aplicações médicas e biotécnicas são os de massa molar desde 200 até 20.000 $g.mol^{-1}$. Geralmente, quanto menor for a massa molar do PEG, maior é sua solubilidade. A solubilidade do PEG em solventes orgânicos polares é boa, mas é pouco solúvel em hidrocarbonetos e outros solventes com pouca polaridade (GREF *et al*., 2000).

PEGs são largamente utilizados em sistemas para liberação controlada de drogas (LI *et al*., 2001) e em produtos cosméticos de cuidados pessoais, e aqueles com massa molar abaixo de 4000 u.m.a. podem ser eliminados do organismo, sendo que 98% do seu total ingerido pode ser excretado do corpo humano através da urina. Por último, a solução de PEG forma um ambiente hospedável para a sobrevivência de células, demonstrando sua biocompatibilidade e por isso, PEG é amplamente utilizado em cobertura de tecidos e também na preservação de órgãos, sendo, por isso, considerado um biomaterial na área de médicina hospitalar. Em resumo, as razões para a escolha do PEG como co-iniciador em copolímeros incluem sua baixa toxicidade, solubilidade em água, alta flexibilidade da cadeia, propriedade mucoadesiva e principalmente, a capacidade de promover estabilização estérea na superfície do copolímero quando em solução aquosa (KIM *et al*., 2004; DENG *et al*., 2005; CHEN *et al*., 2006; JACKSON *et al*., 2007; ZHU *et al*., 2007; PARK *et al*., 2007).

4.3 Síntese do tribloco PLLA-PEG-PLLA

A rota de inserção por coordenação, utilizando como catalisador o $Sn(Oct)_2$, é a rota mais importante para a obtenção de copolímeros derivados do *l*,*l*-lactídeo pois gera o menor número de produto racêmico, logo é a mais utilizada industrialmente.

No mecanismo de inserção por coordenação acredita-se que duas etapas são envolvidas. Em uma primeira etapa, Figura 4.9, o catalisador $Sn(Oct)_2$ (acido forte de Lewis) reage com compostos doadores de hidrogênio, coiniciador, gerando o alco-óxido de estanho, considerado o verdadeiro iniciador da reação (KOWALSKI, DUDA & PENCZEK, 2000).

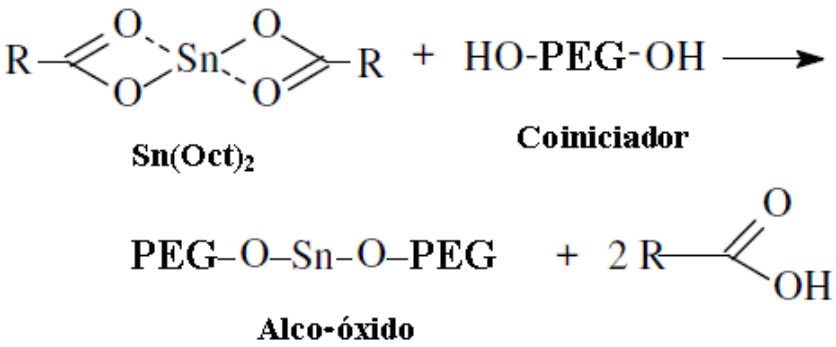

Figura 4.9: Formação do alco-óxido a partir do catalisador. (Fonte: KOWALSKI, DUDA & PENCZEK, 2000)

A copolimerização ocorre em uma câmara purgada em atmosfera inerte a fim de que catalisador, monômero, co-iniciador e o meio reacional serem mantidos secos evitando qualquer umidade no meio, pois traços de água poderão provocar reações laterais como:

1) competição com o coiniciador impedindo a formação do copolímero desejado (traços de água levam a formação do homopolímero com baixa massa molar);
2) decomposição do catalisador a ácido, inativando-o. Durante a reação, em altas temperaturas, o ácido formado, em presença de umidade, pode catalisar a hidrolise do bloco poli(*l*,*l*-lactídeo) em formação.

Em uma segunda etapa, Figura 4.10, o monômero cíclico se insere entre a ligação –Sn-OPEG, promovendo o crescimento da cadeia (etapa de propagação). Onde ocorre o rompimento da ligação alquil-oxigênio não há o alto risco de racemização, pois a etapa subseqüente (propagação), Figura 4.11, será a substituição em um carbono quiral nesta rota, a associação do monômero e catalisador é seguido pelo rompimento da ligação acil-oxigênio com baixo risco de racemização (KOWALSKI, DUDA & PENCZEK, 2000; RYNER *et al.*, 2001; STOREY & SHERMAN, 2002; JÉROME & LECOMTE, 2008).

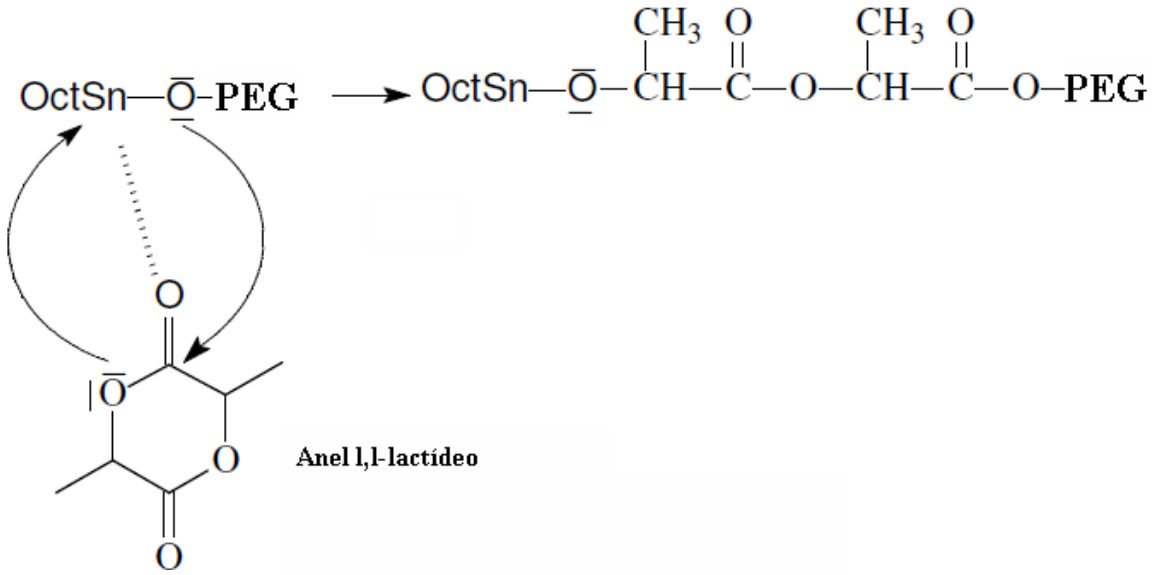

Figura 4.10: Etapa da abertura do anel l,l-lactídeo e propagação da cadeia. (Fonte: KOWALSKI, DUDA & PENCZEK, 2000)

O aumento da concentração do coiniciador resulta em polímeros com massas molares reduzidas. KOWALSKI, DUDA & PENCZEK (2000) atribuíram este comportamento ao duplo papel desempenhado pelo coiniciador (PEG), Figura 4.11, na formação do verdadeiro iniciador e como agente de transferência. Na ausência de reação de transferência o M_n do polímero cresce linearmente com a conversão do monômero. Transferências reduzem a massa molar e aumentam a polidispersidade do copolímero final apresentado na Figura 4.12, copolímero tribloco anfifílico de PLLA e PEG.

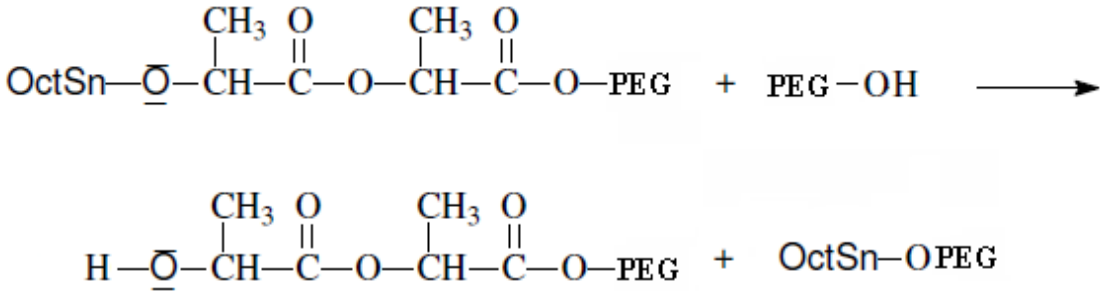

Figura 4.11: Coiniciador como possível agente de transferência. (Fonte: KOWALSKI, DUDA & PENCZEK, 2000)

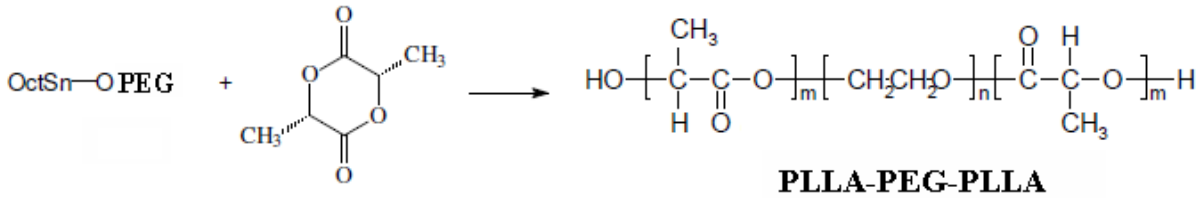

Figura 4.12: Copolímero Tribloco PLLA-PEG-PLLA. (Fonte: KOWALSKI, DUDA & PENCZEK, 2000)

4.4 Tetraciclina

A tetraciclina, Figura 4.13, pertence ao grupo de antibióticos usados no tratamento das infecções bacterianas e é caracterizada pelo esqueleto do octaidronaftaceno, sistema formado de quatro anéis cíclicos condensados. A tetraciclina é transportada de forma ativa para dentro da célula bacteriana, onde se concentram cerca de 50 vezes e é específica às bactérias porque as células de mamífero são incapazes de transportar a tetraciclina para o seu interior.

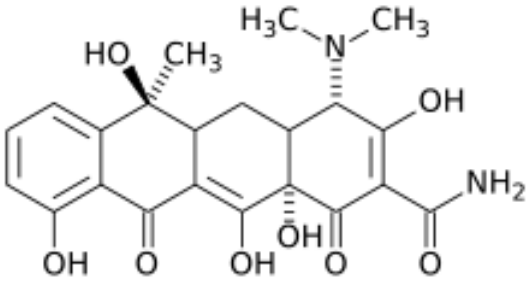

Figura 4.13: Estrutura química da tetraciclina. (Fonte: BROOKS, BUTEL & MORSE, 2009)

A tetraciclina inibe a síntese protéica nas bactérias por bloquearem a ligação do aminoacil-RNAt ao site A da subunidade 30S ribossomal, além disso, a tetraciclina é bacteriostática porque a ligação da mesma aos ribossomas é fraca e reversível. Tal antibiótico é eficaz no tratamento de infecções por *Mycoplasma pneumoniae*, cólera, Rickettsias, Brucelose, uretrite por *Chlamydias*, gonorréias, infecção do trato urinário e acne, além se ser utilizada no tratamento da doença de Lyme, causada pela *Borrelia burgdorferi* e não deve ser usada em combinação com antibióticos que atuem sob células em crescimento ativo (ex. penicilinas). Os mecanismos de resistência à tetraciclina são: o aumento do fluxo do antibiótico da célula bacteriana, a proteção ribossomal e a modificação química da tetraciclina (BROOKS, BUTEL & MORSE, 2009).

4.5 Microencapsulamento

A técnica de microencapsulamento teve sua origem no modelo celular. Neste modelo, a membrana celular externa atua como um microrreservatório que envolve e protege o citoplasma e demais componentes celulares de agressividades do meio. Além disso, a membrana celular seleciona os nutrientes para interior das células, controla a condução nervosa, o transporte de energia e outras funções de sobrevivência da célula. (KAWASHINA, 2001; YUAN *et al*., 2003).

Estruturas biológicas, como micelas, vesículas e bicamadas (Figura 4.14), são formadas a partir da autoassociação de estruturas primárias anfifílicas, particularmente a partir de lipídeos. A autoassociação (*Self-Assembly*) é a organização autônoma dos componentes do sistema em estruturas ou padrões sem a intervenção humana. Este fenômeno ocorre em qualquer escala: desde a escala molecular à escala planetária. O processo é reversível e espontâneo (DEAMER, 1998).

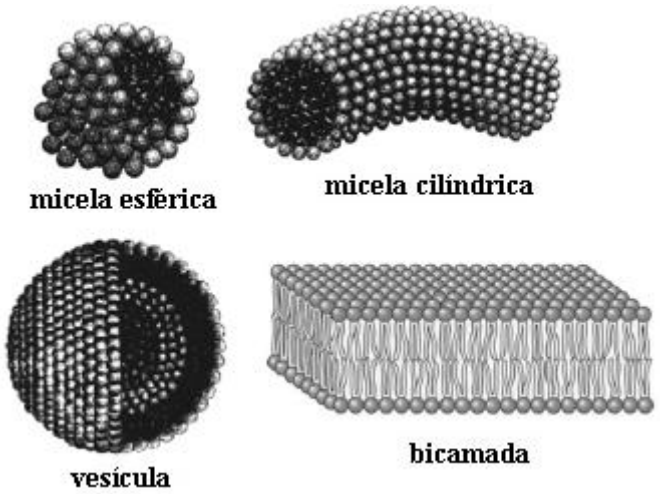

Figura 4.14: Estruturas biológicas formadas a partir da autoassociação. (Fonte: DEAMER, 1998)

A autoassociação molecular pode ser de duas possibilidades: a intramolecular (*exemplo: estruturas secundária e terciária de uma proteína*) e intermolecular (*exemplo: estrutura quaternária da proteína, micelas*). As estruturas organizadas já formadas por associação podem ainda formar novas estruturas ou padrões, dando origem à autoassociação micro e macroscópica. A vida só é possível graças à autoassociação molecular, ilustrada na Figura 4.15.

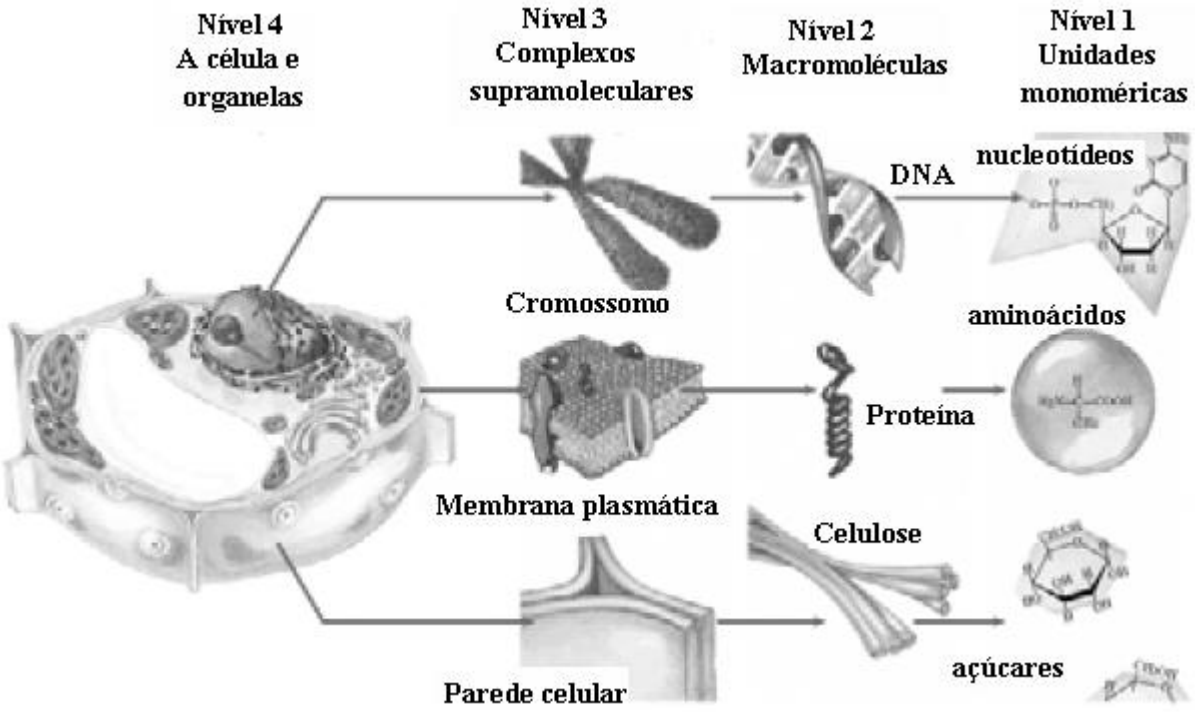

Figura 4.15: Ilustração da conseqüência da autoassociação: a origem da vida. (Fonte: DEAMER, 1998)

Os motivos que fazem com que as moléculas se autoassociem de forma espontânea são: a atração promovida por forças intermoleculares, a minimização da energia interfacial, as características anfifílicas da estrutura molecular e o efeito hidrofóbico. (DEAMER, 1998).

A estrutura resultante da agregação das moléculas anfifílicas (micelas, vesículas, bicamadas) dependerá de fatores relacionados à geometria da molécula surfatante (balanço entre os grupos hidrofílico e lipofílico), ao meio onde essas moléculas se encontram, pH, temperatura, concentração da solução biológica e concentração de eletrólitos em solução, variações nestas condições podem levar a transformações interestruturais (DEAMER, 1998; SOLARO, 2002; NGYUEN *et al*., 2008).

Copolímeros anfifílicos tribloco do tipo A-B-A, com um bloco central hidrofílico (B) e duplamente ligado a cadeias hidrocarbônicas (A), em meio aquoso biológico, se autoassociam em estruturas diferenciadas ‘biocamadas’, formando assim as áreas de corona e núcleo do sistema final (Figura 4.16), em que a liberação do fármaco somente ocorre na célula-alvo, as estratégias de encapsulação: funcionalização da corona e reconhecimento molecular (Figura 4.17) (DEAMER, 1998; KAWAGUCHI, 2000).

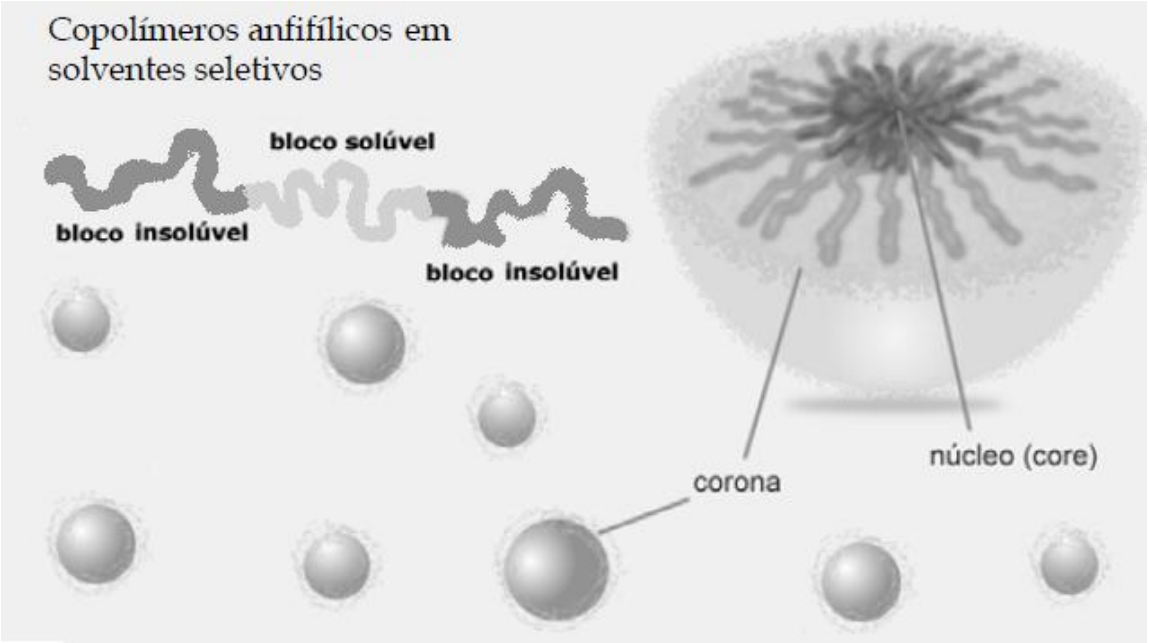

Figura 4.16: Ilustração da formação da corona e núcleo na autoassociação dos copolímeros triblocos de formato A-B-A. (Fonte: DEAMER, 1998)

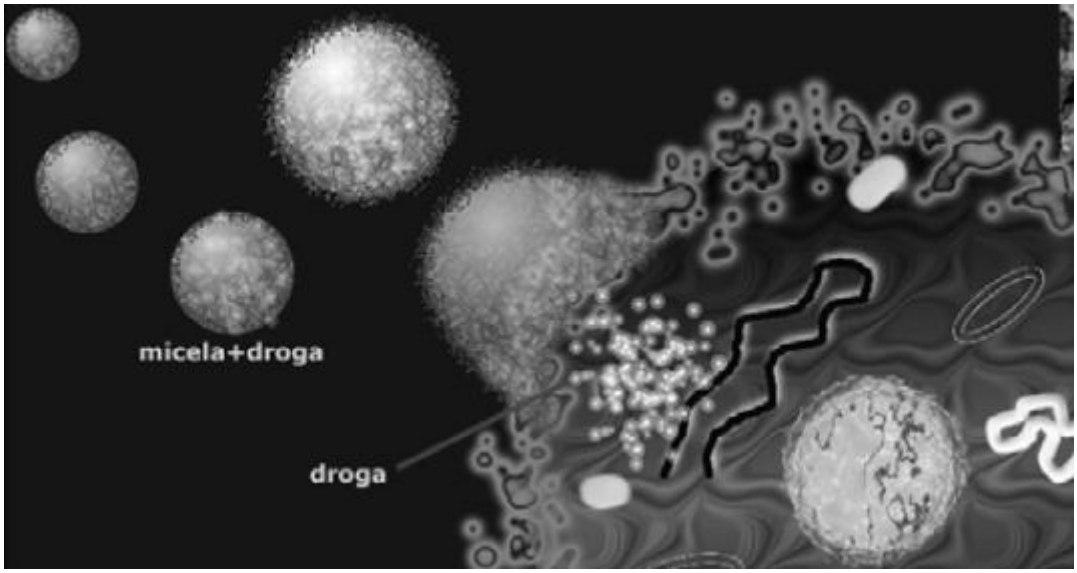

Figura 4.17: Estratégia de encapsulação: liberação do fármaco na célula-alvo. (Fonte: DEAMER, 1998)

Tipicamente, a terapia com droga requer dosagens periódicas do agente terapêutico modelado de maneira a assegurar uma concentração adequada no plasma sanguíneo. Entretanto, alguns fármacos possuem uma faixa terapêutica muito estreita, requerendo assim, que sejam entregues diretamente em alvo especifico do organismo ou, em pequenas dosagens periódicas por longos tempos de administração. Em tais casos, um método contínuo de liberação é necessário para manutenção do nível terapêutico ótimo da droga no plasma sanguíneo e para otimização do seu efeito terapêutico.

O efeito terapêutico compreende em: administração fácil e segura (sem reações inflamatórias locais), necessidade de menor numero de dosagens periódicas, direcionamento da droga a alvos específicos e a liberação controlada de droga mantendo-se a concentração dentro do limite terapêutico ótimo por longo período (SOPPIMATH *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2006; YIN & YATES, 2009).

A Figura 4.18 compara a forma tradicional de dosagem: a droga dispersa em expediente solúvel, e a dosagem por sistemas de liberação controlada e as drogas encapsuladas em microrreservatórios poliméricos. Nos dispositivos tradicionais de dosagem a concentração de drogas, no sistema sanguíneo alterna entre baixas e altas concentrações, sendo o nível terapêutico ótimo brevemente alcançado. Dispositivos de última geração controlam a concentração da droga no nível terapêutico ótimo de forma quase continua. Vale ressaltar que a Figura 4.18 apresenta uma polêmica, pois a curva pontilhada referente a 'dose única' ultrapassa, em um determinado tempo, a concentração limite do fármaco no organismo, atingindo, assim, o nível tóxico (nível indesejável) da droga no organismo humano (HENCH & POLAK, 2002; BAJPAI *et al.*, 2008).

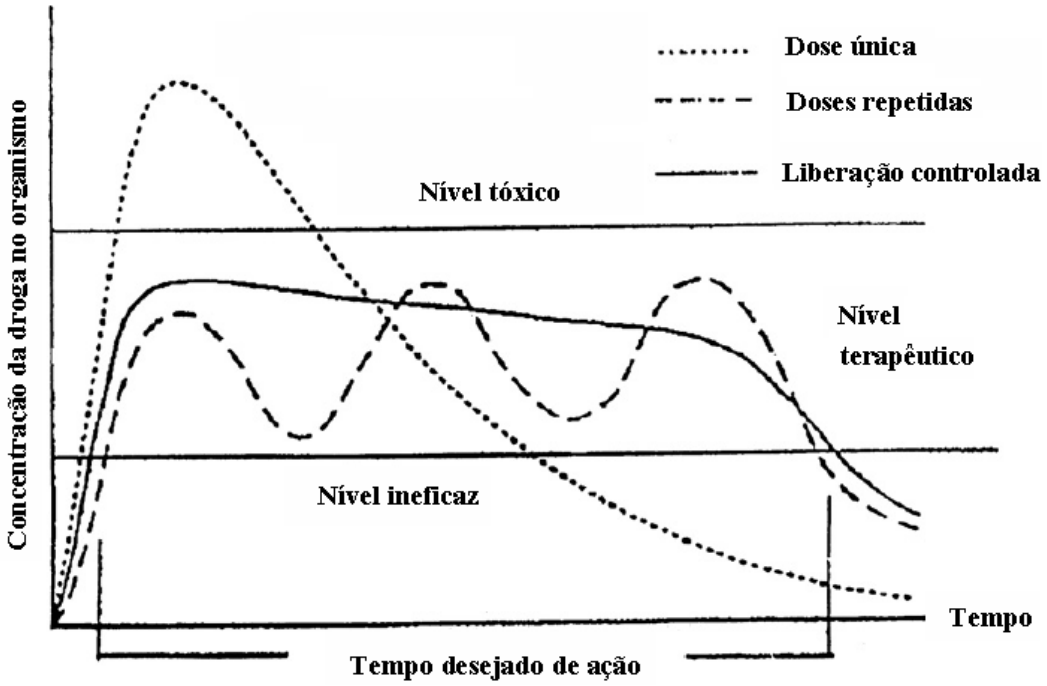

Figura 4.18: Ilustração esquemática da ilustração de liberação de droga. (Fonte: BAJPAI *et al.*, 2008)

Existem algumas características comuns, que são requeridas pela maioria das rotas, como a possibilidade de formar dispositivos (micro ou nano), a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a facilidade de eliminação após a entrega do fármaco. O tamanho

reduzido é uma característica fundamental para o dispositivo e entrega. O dispositivo deve ser biocompatível, isto é, deve despertar resposta adversa (inflamatória, alérgica e imunológica) mínima dos tecidos biológicos (KIM, CHO & YUK, 2001; PALMIERI *et al*., 2002).

A via oral é a rota de administração mais fácil, barata e segura e conveniente. Os principais obstáculos à obtenção do ótimo nível terapêutico da droga, quando da administração oral são a instabilidade dos DDS, no fluido gastrintestinal o baixo transporte através da mucosa intestinal e a rápida eliminação destes após alcançar o sistema circulatório.

Porém a incorporação dos fármacos em dispositivos poliméricos com propriedade mucoadesiva, cadeias de PEG, penetram através da interface partícula/mucosa devido ao efeito mucoadesivo. O caráter hidrofílico da superfície do DDS é uma ferramenta utilizada para redução da velocidade de eliminação total e consequentemente aumentar o tempo de permanência dos DDS's no sistema sanguíneo (SCHAFFAZICK *et al*., 2003; LIU, BURGER & CHU, 2003; SUDHAKAR *et al*., 2006; TANG & SINGH, 2008).

A técnica de microencapsulamento pela evaporação solvente é aplicada extensamente em indústrias farmacêuticas para obter a liberação controlada do fármaco. As microesferas obtidas do copolímero com droga encapsulada podem degradar e liberar a mesma lentamente com um perfil específico da liberação.

Esta liberação controlada da droga tem benefícios clínicos proeminentes: diminuição da frequencia de dose, mais conveniência e aceitação para pacientes, e droga mais direcionada às posições específicas com resultado uma eficiência mais elevada. A escolha do método que causará uma encapsulagem eficiente da droga depende da hidrofilicidade ou da hidrofobicidade da droga (FREITAS, MERKLE & GANDER, 2005; LI, ROUAUD & PONCELET, 2008).

Para drogas insolúveis ou pouco solúveis em água, o método óleo-em-água (*oil-in-water*, o/w) é usado freqüentemente. Este método é o mais simples e os outros métodos derivam-se deste. Consiste em quatro etapas principais (Figura 4.19):

(1) dissolução da droga hidrofóbica em um orgânico solvente que contem o polímero;

(2) emulsificação desta fase orgânica, chamada fase dispersada, em uma fase aquosa chamada fase contínua;

(3) extração do solvente da fase dispersa por evaporação do solvente, as gotas de transformação da fase dispersada em partículas sólidas contínuas;

(4) recuperação e secagem das microesfera para eliminar o solvente residual.

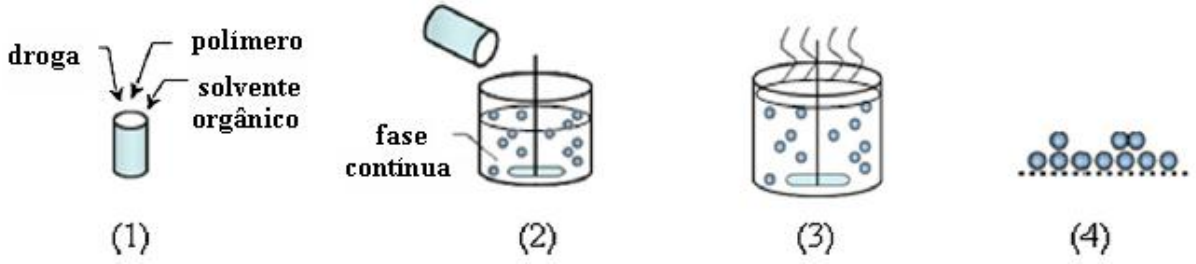

Figura 4.19: Passos básicos do microencapsulamento por evaporação do solvente. (Fonte: LI, ROUAUD & PONCELET, 2008).

O método acima mencionado não é apropriado para a encapsulagem de drogas hidrofílicas. Há duas razões principais: (1) a droga hidrofílica não pode ser dissolvida no solvente orgânico; (2) a droga difundirá na fase contínua durante a emulsão, conduzindo a uma grande perda dessa. Outros quatro métodos alternativos propõem e tornam consequentemente possível o encapsulamento de drogas hidrofílicas, são eles:

1. O método de dupla emulsão (*water-in-oil-in-water*, w/o/w) (utilizado na presente qualificação): a solução aquosa da droga hidrofílica é emulsificada em uma fase orgânica (copolímero + solvente orgânico), esta emulsão é dispersa então em uma segunda solução aquosa (solução de um surfatante) que dá forma a uma segunda emulsão (dupla emulsão, w/o/w);

2. O método do cosolvente óleo/água (*oil-water*, o/w): quando a droga não é solúvel no solvente orgânico principal, um cosolvente chamado de segundo solvente é necessário para dissolver a droga;

3. O método de dispersão óleo/água (o/w): a droga é dispersa na forma de pó na solução de polímero e de solvente orgânico;

4. O método de evaporação de solvente não aquoso (*oil-oil*, o/o): a fase aquosa é substituída pelo óleo (tal como óleo mineral).

Na fase dispersa existem os polímeros/copolímeros e o solvente. Na fase contínua existe o surfatante. Os copolímeros de ácidos lácticos e glicólicos são os mais utilizados de um modo geral para desenvolver os sistemas de liberação da droga, pois são os mais seguros e aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*). São degradáveis pela hidrólise de seus componentes, que são produtos metabólicos usuais.

Para a técnica do microencapsulamento por evaporação do solvente, um solvente apropriado deve encontrar os seguintes critérios: (1) dissolver o polímero escolhido; (2) ser insolúvel na fase contínua; (3) ter uma volatilidade elevada e um baixo ponto de ebulição; (4) ter baixa toxicidade (FREITAS, MERKLE & GANDER, 2005; LI, ROUAUD &

PONCELET, 2008). O diclorometano é o solvente mais comum para encapsulamento pela técnica de evaporação devido a elevada volatilidade, baixo ponto de ebulição e alta insolubilidade em água e foi utilizado no presente estudo.

Na fase contínua, o surfatante (tensoativo) apropriado deve fornecer a microesfera um tamanho regular e uma distribuição de tamanho pequena, garantindo uma liberação estável da droga. Antes de escolher o tipo de surfatante e de sua concentração, é importante conhecer a polaridade das duas fases imiscíveis, do tamanho desejado dos microencapsulados e a demanda da esfericidade dos mesmos (FREITAS, MERKLE & GANDER, 2005; LI, ROUAUD & PONCELET, 2008).

Os surfatantes para as emulsões são anfifílicos. Isso significa que uma porção da molécula tem mais afinidade aos solutos polares tais como a água (parte hidrofílica) e a outra parte têm mais afinidade aos solutos apolares tais como os hidrocarbonetos (parte hidrofóbica). Há quatro tipos diferentes de surfatantes na natureza: aniônico, catiônico, anfótero e não-iônico (FREITAS, MERKLE & GANDER, 2005; LI, ROUAUD & PONCELET, 2008). O surfatante não-iônico poli(ácido vinílico) (PVA) é o mais usado pois fornece microesferas menores e o mesmo foi utilizado no presente estudo.

4.6 Métodos de Caracterização

Nenhuma técnica é absoluta. Diversas técnicas são necessárias para confirmar a composição, estrutura e as propriedades de um material em estudo. Nesta tese, as técnicas a seguir foram utilizadas para não somente caracterizar os copolímeros e suas propriedades, mas também caracterizar os microencapsulados desenvolvidos e a tetraciclina.

4.6.1 Análise Microbiológica

A análise microbiológica para se verificar quais e quantos micro-organismos estão presentes é fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o material foi preparado, os riscos que o mesmo pode oferecer à saúde do consumidor. Essa análise é indispensável também para se verificar se os padrões e especificações microbiológicas, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidos adequadamente.

O método de contagem de micro-organismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado para contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras, variando-se o tipo do meio, temperatura e tempo de incubação. Por este método, amostras de materiais são homogeneizadas, diluídas em série, em diluente apropriado, plaqueadas com ou sobre um meio de agar apropriado e incubadas, após o que todas as colônias visíveis são contadas, ou seja, o procedimento se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra irá formar uma colônia separada e visível, quando fixada com meio que lhe permita crescer. A relação correta é feita entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC), que podem ser tanto células individuais como agrupamentos característicos, por mililitro ou grama de amostra.

Essa contagem detecta o número de bactérias aeróbias ou facultativas e mesófilas (35-37ºC), presentes tanto sob a forma vegetativa quanto esporulada. O número de micro-organismos aeróbios mesófilos (contagem em placa) encontrado no material (no caso, em copolímeros biodegradáveis) tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade mais comumente utilizados, indicando se a limpeza, desinfecção e o controle de temperatura durante os processos de tratamento industrial, armazenamento e transporte foram realizados de forma adequada. Esta determinação permite também obter informação sobre a alteração incipiente dos materiais e sua provável vida útil.

4.6.2 Análise Térmica

Conceitua-se Análise Térmica como um conjunto de técnicas que permite medir as mudanças de uma propriedade física ou química de uma substância ou material em função da temperatura ou tempo, enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (MOTHÉ & AZEVEDO, 2009).

As áreas de aplicação da análise térmica incluem os seguintes estudos: decomposição térmica; determinação de umidade, de voláteis, de resíduos e de teor de cinzas; oxidação térmica; cinética de reação de cura e cristalização; diagrama de fases; determinação de calor específico; determinação de transição vítrea, de fusão, tempo de armazenamento (*shelf-life*); dentre outros.

A Análise Térmica não só implica na análise química e composicional, mas também é uma boa ferramenta para estudos: (1) processos como catálise e corrosão, (2) propriedades térmicas e mecânicas como expansão térmica ou amolecimento e (3) equilíbrio de fases e transformações.

São cinco as técnicas termoanalíticas mais utilizadas atualmente, porém as três primeiras serão utilizadas na presente tese:

- Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG);
- Análise Térmica Diferencial (DTA);
- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- Análise Mecânica Térmica (TMA);
- Análise Mecânica-Dinâmica (DMA).

4.6.2.1 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)

A termogravimetria ou análise termogravimétrica baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura.

A termogravimetria é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e de outros tantos materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por conseqüência, as propriedades físicas dos materiais. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições não isotérmicas, mostra

o perfil da resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura (MOTHÉ & AZEVEDO, 2009).

A Figura 4.20 apresenta uma curva termogravimétrica de reação de único estágio. Onde a perda de massa é caracterizada por duas temperaturas: a T_i , que é chamada de temperatura inicial de decomposição e T_f , que é a temperatura final. A temperatura inicial de decomposição é a temperatura na qual a variação de massa acumulada atinge a magnitude que a termobalança pode detectar. A temperatura final é a temperatura na qual a variação de massa acumulada atinge seu valor máximo de degradação, correspondendo ao término da reação. A diferença entre essas duas temperaturas ($T_f - T_i$) é chamada de intervalo da reação. Quanto menor for a temperatura inicial, menos estável é o material à decomposição térmica.

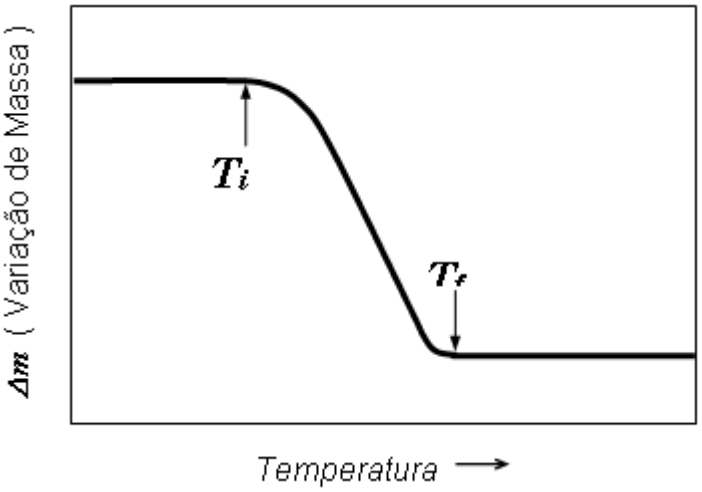

Figura 4.20: Curva termogravimétrica característica de uma reação em um único estágio. (Fonte: MOTHÉ & AZEVEDO, 2009)

Para uma melhor avaliação e visualização das curvas de TG, foram desenvolvidos instrumentos capazes de registrarem, automaticamente, a derivada das curvas de TG (DTG), curvas essas que auxiliam a visualizar e esclarecer os passos das curvas TG. A Figura 4.21 mostra que, na mesma faixa de temperatura, pelas curvas de TG parece existir somente um único estágio de decomposição, mas ao observar a curva de DTG percebe-se que em muitos casos isso não é verdade. O item (a) é uma reação de um único estágio que ocorre numa faixa pequena de temperatura. O (b) consiste de duas reações que parcialmente se sobrepõem, (c) consiste de duas reações, a primeira ocorre vagarosamente, seguida de uma segunda reação rápida e (d) são reações secundárias que ocorrem durante ou após a reação principal. Tais resultados e estudos só puderam ser observados e estudados com a análise da DTG.

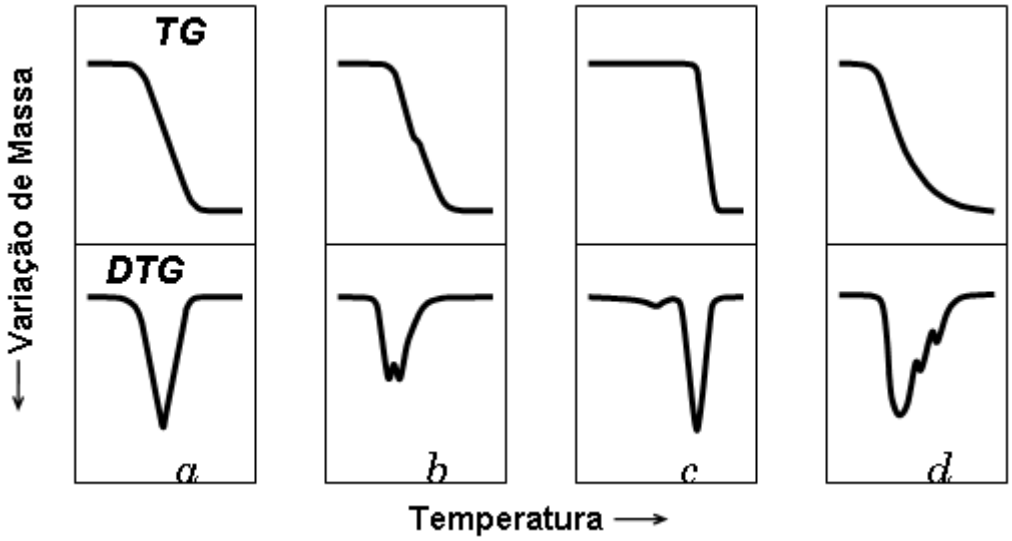

Figura 4.21: Comparação de curvas de TG e DTG para reações sobrepostas. (Fonte: MOTHÉ & AZEVEDO, 2009)

As vantagens do uso de DTG são:

- Curvas de DTG são exatamente à derivada das curvas de TG, por esta razão, a área sob as curvas fornece a variação de massa precisa. Logo, pela DTG pode-se obter análise quantitativa;
- Curvas de TG: variações seguidas uma após outra ou muito próximas não são distinguíveis, notam-se estágios coincidentes. Curvas de DTG separam em duas partes tais variações;
- Curvas podem ser obtidas em conjunto com as medidas de TG e DTA;
- As curvas de DTA e DTG são comparáveis, mas os resultados do método anterior indicam que aquelas variações de estado não são acompanhadas por perda de massa. As curvas pelo último método são mais reprodutíveis;
- Medidas de DTG indicam exatamente as temperaturas do início, máxima taxa e o final da variação.

4.6.2.2 Análise Térmica Diferencial (DTA)

Análise Térmica Diferencial (DTA) é uma técnica térmica em que se mede a diferença de temperatura entre a amostra e uma substância inerte (referência), quando ambas são submetidas a um programa controlado de temperatura, aquecimento ou resfriamento.

Uma curva típica de DTA é ilustrada na Figura 4.22. Quatro tipos de transições são ilustrados. (a) transição de segunda ordem detectada com mudança horizontal na linha de base; (b) pico endotérmico causado pela fusão ou transição da fusão; (c) um pico endotérmico devido à reações de decomposição ou fusão; (d) pico exotérmico causado por mudança da fase cristalina. O número, forma e posição dos vários picos endotérmicos e exotérmicos, em função da temperatura, identifica qualitativamente uma determinada substância. Como a área do pico é proporcional à mudança de calor envolvido, a técnica é útil para determinações semiquantitativas ou, alguns casos, quantitativas do calor de reação (MOTHÉ & AZEVEDO, 2009).

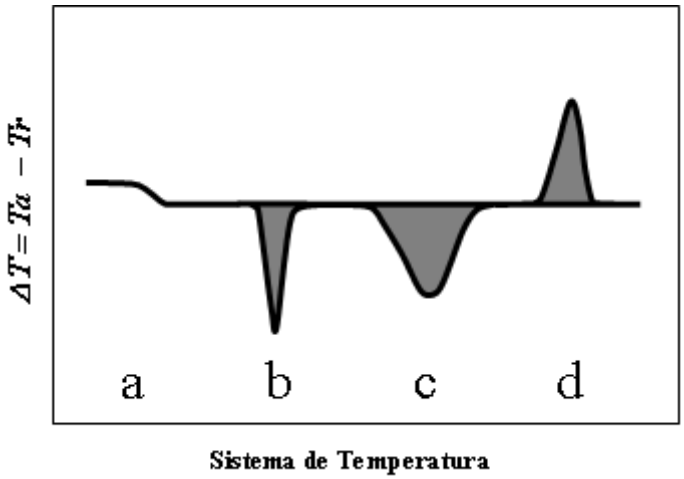

Figura 4.22: Curva típica obtida pela técnica DTA. (Fonte: MOTHÉ & AZEVEDO, 2009).

4.6.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

É uma técnica derivada da DTA. Mede a diferença de energia necessária à substância e a um material de referência, inerte de modo térmico, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura, de maneira que a amostra e referência sejam mantidas em condições isotérmicas, uma em relação à outra, independente do evento térmico que esteja ocorrendo na amostra. DSC pode ser definido como uma técnica que mede as temperaturas e o fluxo de calor associado com as transições dos materiais em função da temperatura e do tempo. Tais medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos (absorção de calor), exotérmicos (evolução de calor) ou mudanças na capacidade calorífica (MOTHÉ & AZEVEDO, 2009).

Uma curva típica de DSC é apresentada na Figura 4.23. Pela figura abaixo, o pico apresentado no sentido vertical crescente indica um aumento de entalpia, correspondendo a um evento endotérmico, enquanto a outra curva de sentido oposto, um pico exotérmico. A mudança da linha de base significa uma mudança de fase, especialmente, a transição vítrea do material (T_g). DSC é uma das técnicas mais empregadas para medir a temperatura de transição vítrea dos diversos materiais, além de fornecer informações sobre a compatibilidade da mistura entre dois ou mais polímeros. A temperatura de transição vítrea de um polímero é a temperatura na qual as cadeias moleculares começam a adquirir energia suficiente para vencer as forças atrativas e mover-se de forma translacional e vibracional (MOTHÉ & AZEVEDO, 2009).

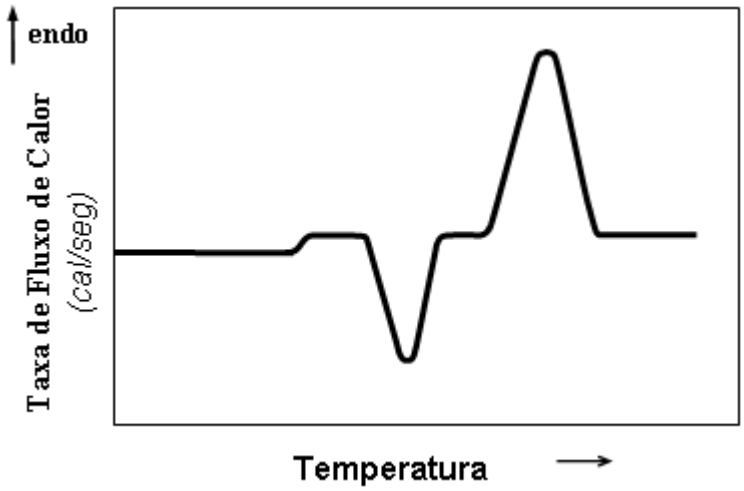

Figura 4.23: Curva típica obtida no DSC. (Fonte: MOTHÉ & AZEVEDO, 2009)

4.6.3 Difração de Raios X (XRD)

Os materiais sólidos podem ser classificados em cristalinos ou amorfos. Os sólidos amorfos não têm uma ordem de longa extensão. Os sólidos cristalinos apresentam uma ordem de longa extensão e são constituídos de arranjos atômicos ou moleculares cuja estrutura se repete numa forma periódica tridimensional (CASTRO, 2006). Raios X são radiações eletromagnética com energias na faixa de 100 eV – 100 keV. Para aplicações em difração, são usados os raios X de comprimento de ondas curtos (*hard x-rays*) na faixa de poucos angstroms a 0.1 angstrom (1 keV - 120 keV) que corresponde à ordem de grandeza dos átomos e moléculas. O motivo de ser usar ondas eletromagnéticas na região dos raios X é devido ao espaçamento entre as camadas de átomos em um cristal possuírem a mesma ordem de grandeza (Å) do comprimento de onda dessa radiação, onde o fenômeno de difração pode ser observado.

Para obter padrões de difração acentuados em cristais, as ondas espalhadas devem interagir entre si de forma construtiva. Esse fenômeno é conhecido como interferência e ocorre quando as ondas espalhadas, por planos sucessivos de átomos em um cristal, estão em fase, ou seja, a diferença de caminho, entre os planos do cristal deve ser igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda, conforme Figura 4.24 (CASTRO, 2006).

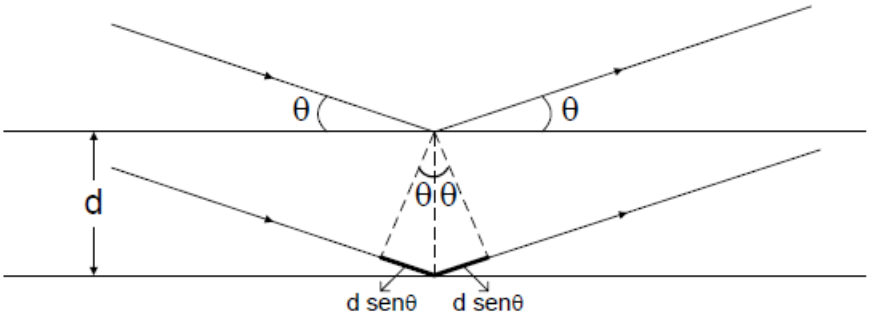

Figura 4.24: Ilustração da Lei de Bragg. (Fonte: CASTRO, 2006)

Essa condição é atendida, quando um conjunto de planos desse cristal satisfaz a equação de Bragg em que os valores de n são limitados pela condição de sen $\theta < 1$, λ é o comprimento de onda da onda difratada e θ é o ângulo de espalhamento.

$$n\,\lambda = 2\,d\,\text{sen}\,\theta \qquad (n = 1, 2, 3, ...)$$

A equação de Bragg é deduzida considerando-se o espaçamento interplanar uniforme. Se os arranjos de átomos planos ou o espaçamento entre os planos paralelos torna-se irregular, os padrões de difração não são bem definidos. É o que ocorre nos líquidos e materiais amorfos

(por exemplo: polímeros). O difratômetro é um instrumento para o estudo de materiais através da maneira que estes difratam raios X de comprimento de onda conhecido. A Figura 4.25 mostra o arranjo básico do instrumento. Para a realização das medidas a amostra é girada de um ângulo θ, enquanto o detector é girado de um ângulo 2θ. Quando a condição de Bragg é satisfeita temos um pico no sinal do detector. Sabendo-se o valor de 2θ e o valor do comprimento de onda do raio X podemos determinar o espaçamento entre os planos cristalinos que difrataram o raio X.

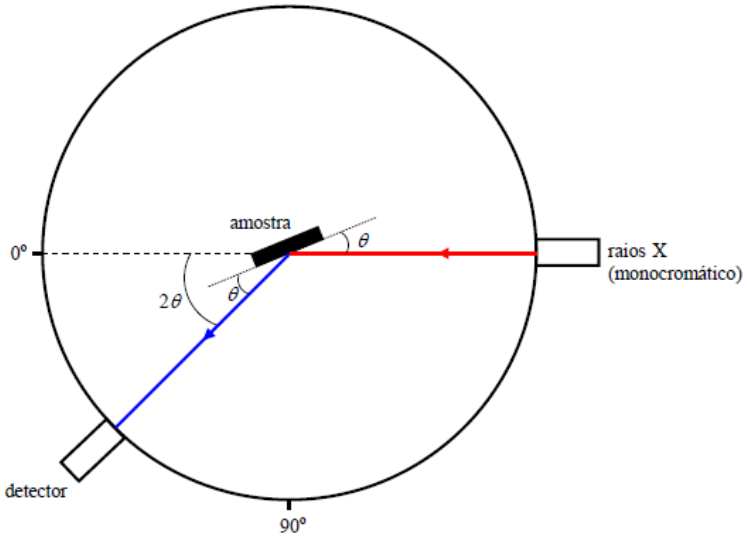

Figura 4.25: Esquema de um difratômetro de raios X. (Fonte: CASTRO, 2006)

Um feixe de raios X monocromático incidindo em um cristal, em ângulos variáveis, produz um gráfico chamado de *difratograma*. As intensidades são colocadas em função do ângulo de espalhamento 2θ (ângulo entre a onda incidente e a onda espalhada). A Figura 4.26 apresenta, como exemplo, a estrutura cristalina do NaCl e seu difratograma (CASTRO, 2006).

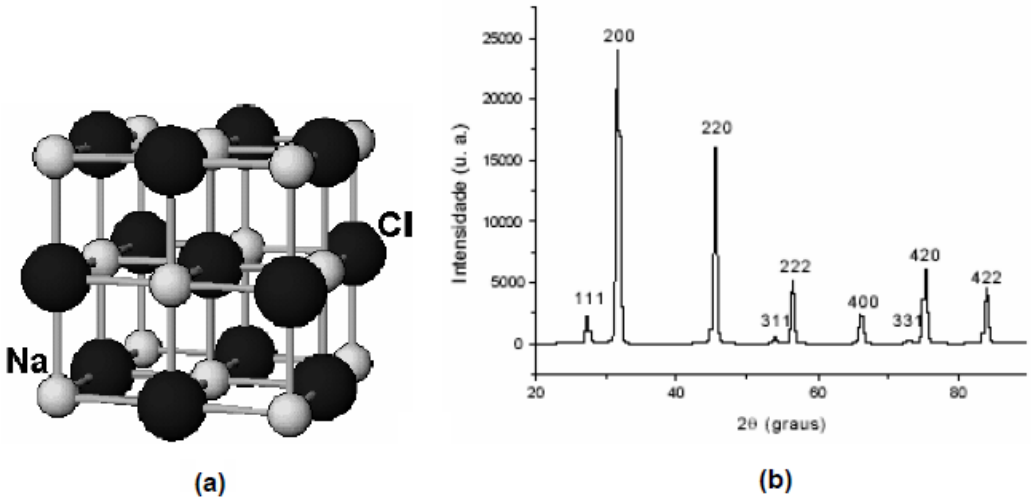

Figura 4.26: Cristal de NaCl (a) e seu difratograma (b). (Fonte: CASTRO, 2006)

4.6.4 Espalhamento de Luz Laser de Baixo Ângulo para Análise de Tamanho de Partícula (LALLS)

O tamanho de partícula é uma variável de grande interesse para muitos processos, com impacto direto na qualidade do produto final. Analisadores da distribuição de tamanhos de partículas são empregados para o controle da produção de pós em todas as situações onde o estado da distribuição é determinante para o processamento ou qualidade do produto.

As partículas são estruturas tridimensionais, em sua maioria, irregulares, polidispersas e com diferentes propriedades físico-químicas. No entanto, os métodos correntemente empregados para determinação do tamanho de uma partícula fornecem como resposta um número, com o qual se pretende representar essa grandeza física (SANTOS *et al.*, 2004).

A esfera é a única forma geométrica passível de ser completamente representada por um único número no espaço tridimensional. Uma dada partícula pode ser representada por diferentes esferas, com base em uma das suas diferentes propriedades, tais como: maior ou menor dimensão, área projetada, área superficial, volume, velocidade de sedimentação, massa, dentre outras. O princípio da esfera equivalente consiste em relacionar alguma dessas propriedades com o diâmetro de uma esfera. A Figura 4.27 ilustra alguns dos diferentes diâmetros médios equivalentes que podem ser gerados a partir de um grão de areia com forma irregular (RAWLE, 2002).

Figura 4.27: Diâmetros médios equivalentes. (Fonte: RAWLE, 2002)

A técnica de espalhamento de luz laser de baixo ângulo (LALLS - *Low Angle Laser Light Scattering*), conhecida genericamente por “espalhamento de luz”, surgiu na metade dos anos 70 e sua instrumentação teve grande desenvolvimento nos últimos 20 anos (RAWLE,

2002). Este método de análise de tamanho de partículas, também conhecido como difração laser, consiste na medição dos ângulos de difração do raio laser, que são relacionados ao diâmetro da partícula.

Atualmente, é a técnica mais utilizada na determinação do diâmetro de partículas devido à possibilidade de medidas em diversos meios: ar, suspensões, emulsões e aerossóis. Possui amplitude de 0,01 a 3500 μm, dependendo do equipamento, sendo a faixa de aplicação recomendada de 0,1 a 3000 μm (ISO13320, 1999). Permite a reprodutibilidade dos resultados pela integração de várias médias individuais e possibilita a fácil verificação da calibração por meio de materiais padrão.

Como desvantagens, esta técnica recente requer equipamentos de difração laser de custo relativamente alto e possui dificuldade de aplicação para materiais com dimensões superiores a 2 mm, devido aos ângulos de espalhamento serem muito pequenos.

No método de difração laser, as partículas grossas espalham o raio a menores ângulos e vice-versa. É empregado o laser (fonte de luz de comprimento de onda fixo, comumente λ=0,63 μm) e detectores para espalhamento da luz, que emitem mensagens para um computador que calcula e fornece os resultados. As Figuras 4.28 e 4.29 ilustram o processo de difração laser e os componentes do instrumento Mastersizer 2000 (utilizado na presente tese), respectivamente.

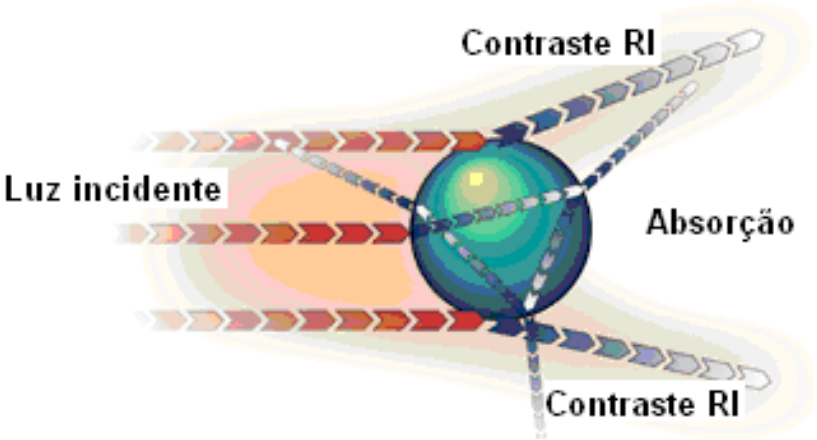

Figura 4.28: Processo de difração a laser. (Fonte: http://www.malvern.co.uk/ms2000)

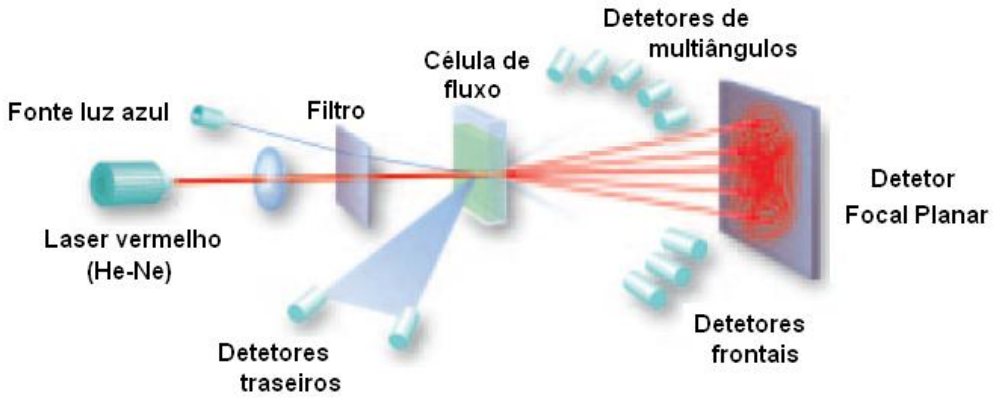

Figura 4.29: Ilustração da técnica espalhamento de luz no instrumento Mastersize 2000. (Fonte: http://www.malvern.co.uk/ms2000)

Ao atingir uma quantidade de partículas, a luz incidente sofre uma interação segundo quatro diferentes fenômenos (difração, refração, reflexão e absorção) formando um invólucro tridimensional de luz. O formato e o tamanho deste invólucro são afetados pelo índice de refração relativo da partícula no meio dispersante, pelo comprimento de onda da luz e pelo tamanho e formato da partícula. Detectores estrategicamente posicionados medem a intensidade e o ângulo da luz espalhada (Figura 4.29). O sinal dos detectores é então convertido para a distribuição de tamanho de partícula através de algoritmos matemáticos.

O conceito fundamental desta técnica é a teoria de espalhamento Mie que apresenta uma solução matemática para o espalhamento de luz incidente sobre partículas esféricas (POHL, 1998) e pode ser aplicada para partículas com diferentes formatos e razões de aspecto. Para a sua aplicação, porém, é necessário um conhecimento prévio dos índices de refração do material que está sendo analisado e do meio em que ele se encontra.

A teoria de Mie descreve a medida de tamanho de partícula por esferas homogêneas de tamanho arbitrário. Para partículas não esféricas, a teoria de Mie considera o diâmetro esférico equivalente por volume-peso. É necessário que se saiba o índice de refração da partícula. Essa teoria não tem limitação quanto ao tamanho de partícula a ser medido. Assim sendo, atualmente, essa teoria é a mais rigorosa, gerando resultados bem próximos à realidade (POHL, 1998).

4.6.5 Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A espectrometria é o estudo das interações da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética pode ser dividida em diferentes regiões que correspondem a diferentes técnicas espectroscópicas. A região entre 4000 e 400 cm^{-1} corresponde à região considerada infravermelho médio onde bandas vibracionais e rotacionais são observadas. A espectrometria na região do infravermelho tem sido amplamente usada em química orgânica e analítica por muitos anos (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002).

O principio de funcionamento do equipamento de IR é a partir de feixes de ondas eletromagnéticas incidentes sobre a amostra, que absorve energia em determinados comprimentos de onda. Nas moléculas, os átomos ou grupos atômicos estão em contínuo movimento, uns em relação aos outros. Quando elas são sujeitas a radiação com energia semelhante à correspondente a essas vibrações (radiação IR), as moléculas podem alterar os seus estados de vibração, absorvendo a radiação correspondente à diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado detectado pelo espectrômetro. Assim, através de comparação dos valores de energia da radiação IR é possível identificar as moléculas ou tipos de moléculas presentes nas amostras (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002).

Com a evolução do espectrômetro de IR utilizando o método de tratamento matemático, a transformada de Fourier – FT, a espectroscopia na região do IR tornou-se uma ferramenta valiosa para estudos de sistemas biológicos (LIAO *et al*., 2006). O método da transformada de Fourier é rápido e sensível e acoplando-se acessórios como o ATR (refletância total atenuada) é possível estudar as camadas superficiais da amostra, permitindo uma análise não destrutiva da superfície. Este acessório simplifica as análises de FTIR de pastas, géis, semi-sólidos, pós e filmes. A superfície horizontal da amostra permite coletar facilmente o espectro infravermelho (SOUZA *et al*., 2008).

A Tabela 4.1 apresenta os diversos grupos funcionais que podem ser observados em função da frequencia com a técnica espectrometria na região do infravermelho (IR).

Tabela 4.1: Posição das bandas características dos grupos funcionais na técnica IR. (Fonte: SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002)

Grupo	Classe de compostos	Freqüência (cm^{-1})	Intensidade
C-H	Alcano	2965-2850 (axial)	Forte
	- CH3	1450 (angular)	Médio
		1380 (angular)	Médio
	-CH2	1465	Médio
	Alqueno	3095-3010 (axial)	Médio
		700-1000 (angular)	Forte
	Alquino	~3300	Forte
	Aldeído	2900-2820	Fraco
		2775-2700	Fraco
C-C	Alcano	700-1200	Fraco
	Alqueno	1680-1620	Larga
	Alquino	2260-2100	Larga
C=O	Cetona	1715	Forte
	Aldeído	1725	Forte
	Ácido carboxílico	1710	Forte
	Éster	1735	Forte
	Amida	1650	Forte
	Anidrido	1820 e 1760	Forte
C-O	Álcool, ester, ácido,éter	1300-1000	Forte
O-H	Álcool		
	Monômero	3650-3590	Largo e agudo
	Em ligação hidrogênio	3400-3200	Forte e agudo
	Acido carboxílico		
	Em ligação hidrogênio	3300-2500	Largo
N-H	Amina e amida secundárias	~3500 (axial)	Médio
	Amina e amida secundárias	3500 (axial)	Médio
C≡N	Nitrila	2260-2240	Médio
C-X	Fluoreto	1400-1000	Forte
	Cloreto	800-600	Forte
	Brometo	600-500	Forte
	Iodeto	~500	Forte

A técnica FTIR-ATR combina o poder da espectrometria IR com a óptica de reflexão total atenuada. Na técnica do ATR, um raio de luz infravermelha penetra num cristal (denominado elemento de reflexão interna - IRE) que deve ser transparente à irradiação infravermelha, apresentar índice de refração elevado e em determinado ângulo de incidência da radiação. A amostra deve estar e perfeito contato físico com a superfície deste cristal que pode ser de diferentes materiais (germânio - Ge, seleneto de zinco - ZnSe, silício - Si, iodeto de tálio-brometo de tálio - KRS-5, safira e outros). A reflexão interna do raio de luz dentro deste material cria ondas evanescentes. Em cada reflexão, a onda continua além da superfície

do cristal, indo para o interior da amostra, passando por reflexões múltiplas antes de sair do cristal e ser detectado (LIAO *et al*., 2006; SOUZA *et al*., 2008). O principio da técnica de ATR é ilustrado na Figura 4.30.

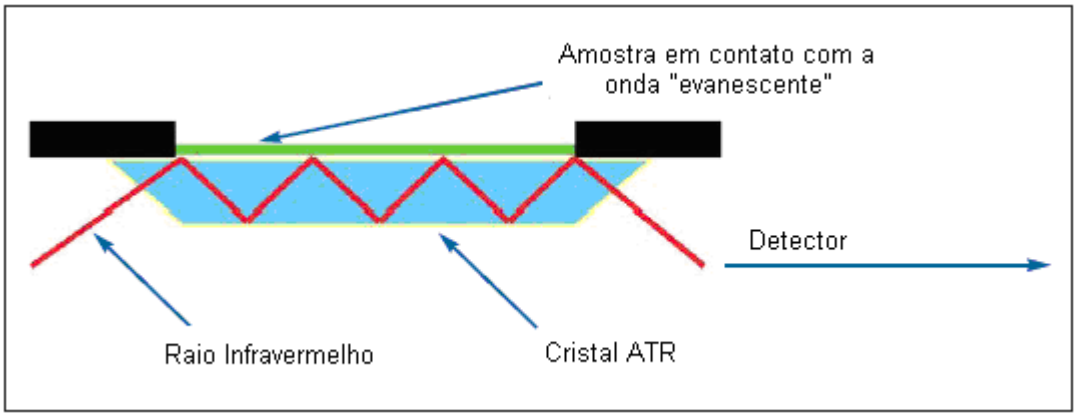

Figura 4.30: Diagrama esquemático do caminho da radiação infravermelha no acessório ATR. (Fonte: www.perkinelmer.com)

ATR é o método mais utilizado para explorar a estrutura química dos polímeros, a preparação previa das amostras não é necessária. O acessório é prático de ser utilizado e os espectros apresentam ricas informações químicas das ligações. Outras vantagens do método são apresentadas abaixo:

- Rápida aquisição de dados (até 10 espectros por segundo). Dados podem ser obtidos quase que continuamente e os resultados podem ser apresentados em um tempo real;
- Potencial para análise de multicomponentes de espectros complexos;
- Capacidade de obtenção de dados de sistemas fisiológicos intactos em ambientes aquosos através da subtração do “background”;
- Sensibilidade à superfície;
- Simplicidade do procedimento de medida;
- Observação de conformação macromolecular através das características espectrais;
- Não requer preparação destrutiva da amostra e permite o estudo de sistemas moleculares sem rompê-los.

4.6.6 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

A interação entre átomos e radiação eletromagnética é caracterizada pela absorção e emissão de fótons pelos átomos, de tal forma que os quanta dos fótons sejam iguais a diferença de energia dos níveis energéticos atômicos. Sabendo-se que a energia de um fóton é proporcional à freqüência, as diferentes formas de espectrometria são distinguidas com base nas frequências envolvidas. A espectrometria de NMR usa radiofrequências que estão na variação de 4 a 900 MHz. Em NMR a absorção e emissão da radiação eletromagnética pode ser observada quando o núcleo é submetido a um intenso campo magnético uniforme (SILVERSTEIN, BASSLER & MORRIL, 1994).

A base desta técnica foi proposta por W. Pauli em 1924, sugerindo que certos núcleos atômicos deveriam ter as propriedades de spin e momento magnético e que, consequentemente, a exposição a um campo magnético deveria levar a um deslocamento de seus níveis de energia. Foi, no entanto, em 1946 que Bloch e Purcell demonstraram que os núcleos absorvem radiação eletromagnética em um campo intenso, como conseqüência do desdobramento de níveis de energia induzido pelo campo magnético (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002).

Núcleos magnéticos de diferentes espécies possuem diferentes frequências de ressonância. NMR, inicialmente, tinha por objetivo determinar momentos magnéticos nucleares e somente se desenvolveu para uma das mais versáteis formas de espectrometria depois da descoberta que núcleos na mesma molécula absorvem energia em diferentes frequências de ressonância. A frequência de ressonância depende do ambiente químico do núcleo da molécula. A este fenômeno designou-se Deslocamento Químico, do inglês *Chemical Shift*.

O deslocamento químico surge porque o campo realmente experimentado por um núcleo ($\vec{B}$) em um átomo ou molécula difere ligeiramente (0,01G a 0,1G) do campo magnético externo ($\vec{B}_0$), o campo que seria sentido pelo núcleo sem a presença de seus elétrons. Os elétrons nos átomos são os responsáveis pela ocorrência de desvios químicos em RMN. Por causa da presença de elétrons rodeando os núcleos uma amostra colocada em um campo magnético fica magnetizada e, portanto, modificará o campo, ilustrado na Figura 4.31. Esta magnetização resulta da polarização dos momentos magnéticos dos elétrons quando a molécula possui elétrons com spins desemparelhados (substancia paramagnética). No caso de substancia paramagnética o campo interior da amostra é maior do que o aplicado. Se não há spins desemparelhados (substancia diamagnética) a amostra fica magnetizada por causa das

correntes de elétrons induzidas nas moléculas da amostra pelo campo externo aplicado. Neste outro caso o campo no interior da amostra é menor do que o campo externo (SILVA, 2008).

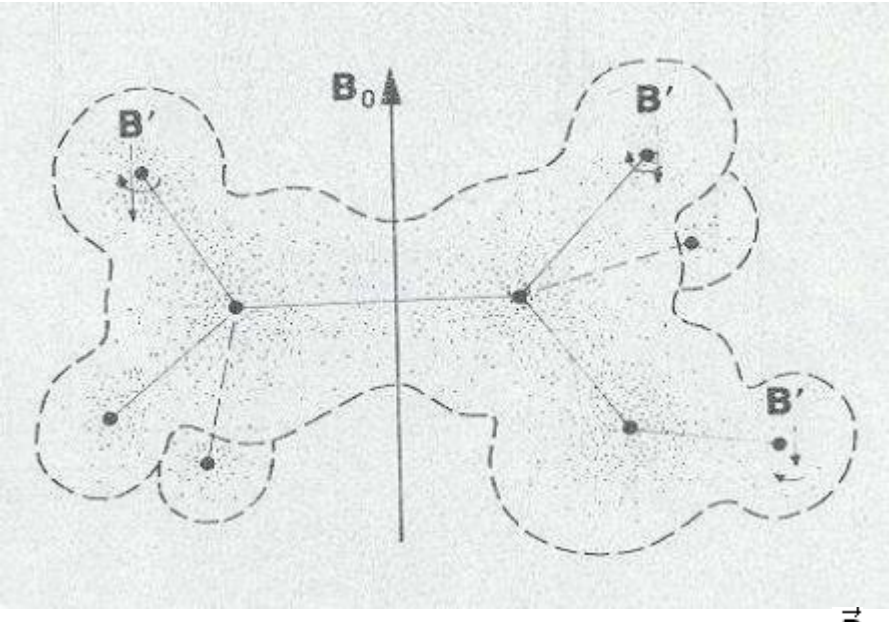

Figura 4.31: Origem do Deslocamento Químico: o movimento dos elétrons gera um campo $\vec{B}'$ que se opõe ao campo externo $\vec{B}_0$. (Fonte: SILVA, 2008)

Percebe-se que os deslocamentos químicos dependem da intensidade de $\vec{B}_0$. Para uma melhor análise, os deslocamentos químicos são expressos em função das frequências do composto sobre investigação e um composto de referencia. O sinal de referência é obtido adicionando uma pequena quantidade do composto de referência à amostra. Um bom composto como padrão de referência deve ser quimicamente inerte, não reagir e não se associar com as moléculas da substância analisada; solúvel em um elevado número de amostras e originar um único sinal, estreito, intenso e afastado da região de frequências em que as amostras apresentam picos. Um composto de referência amplamente utilizado para NMR de ^{1}H e ^{13}C é o tetrametilsilano (TMS), por definição seu deslocamento (δ) é zero.

Com o avanço dos estudos e dos aparelhos de medida observou-se nos espectros, além do deslocamento químico há uma outra fonte de informação fornecida pelos espectros NMR devido às interações magnéticas entre os núcleos. Estas interações provocam o desdobramento das linhas de ressonância em diversas linhas menores. Este fenômeno se origina do fato de que um núcleo com momento magnético interage com outro através do espaço ou através das ligações químicas. Ao primeiro denomina-se acoplamento dipolar e ao segundo acoplamento escalar.

Moléculas em líquidos rotacionam rapidamente com frequentes mudanças nos eixos e velocidades de rotação como um resultado das colisões com outras moléculas. Consequentemente as interações dipolares diretas (através do espaço) possui uma média total nula e não há acoplamento dipolar líquido. Apesar de não produzir desdobramentos nos espectros de NMR de líquidos, o acoplamento dipolar é de vital importância para o entendimento de NMR do estado sólido e possui um papel crucial nos processos de relaxação (SILVA, 2008).

Como exemplo, considera o acoplamento escalar entre dois núcleos de spin ½ numa molécula AX, tal como o fluoreto de hidrogênio HF (a distância na ordem alfabética correspondente a distância nas frequências de ressonância). O momento magnético do núcleo A causa uma fraca polarização magnética dos seus elétrons orbitais que estão envolvidos nas ligações. Esta polarização é transmitida para o núcleo X acoplado devido à superposição dos orbitais (Figura 4.32). O núcleo X tendo a polarização de seus elétrons provocada pela polarização dos elétrons do núcleo A. Por consequência, dependendo do estado de spin de A (alinhado ou desalinhado com o campo), o campo realmente sentido por X pode aumentar ou diminuir, assumindo dois valores e fazendo com que o sinal de NMR de X seja dividido em um dubleto. O mesmo ocorre para o núcleo A. Como os dois estados de spin de X são quase igualmente prováveis, as linhas do dupleto possuem a mesma intensidade.

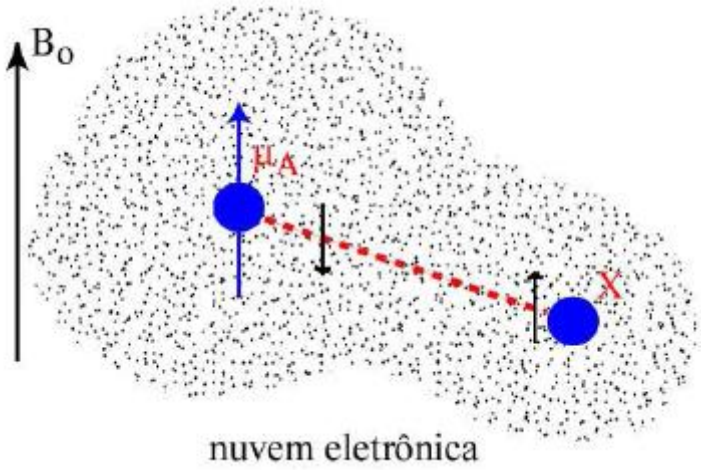

Figura 4.32: Representação esquemática da interação *spin-spin* através das ligações químicas. (Fonte: SILVA, 2008).

4.6.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

O desenvolvimento da microscopia eletrônica teve como principal desafio conseguir ultrapassar a barreira de resolução pela luz visível. O primeiro protótipo de microscópio eletrônico foi construído em 1931. No final dos anos 80 o lançamento no mercado dos microscópios ambientais tornou a técnica mais versátil. As técnicas de microscopia eletrônica (microscopia eletrônica de transmissão, de varredura e de transmissão com varredura) são hoje as principais ferramentas disponíveis para o estudo da estrutura fina e da morfologia de materiais. Uma das principais versões é a microscopia eletrônica de varredura (SEM).

Diferentemente da microscopia óptica (OM), que usa luz para formação de imagem, o microscópio eletrônico utiliza elétrons. A principal vantagem de se utilizar um microscópio eletrônico em relação a um óptico é a resolução, definida como a menor distancia entre dois pontos da amostra que podem ser visualizados como dois pontos distintos na imagem. Microscópios ópticos garantem a visualização de detalhes em escala micrométrica, enquanto que os microscópios eletrônicos de varredura em escala nanométrica.

O microscópio eletrônico de varredura é, sem duvida, o microscópio eletrônico mais versátil, devido às suas características. É geralmente utilizado para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com dimensões relativamente grandes. As imagens têm alta profundidade de foco. São imagens tridimensionais sendo mais fáceis de interpretar que as imagens de projeção de microscopia de transmissão. O SEM também produz imagens de alta resolução, garantindo alta ampliação de detalhes próximos sem perda de nitidez.

A Figura 4.33 apresenta um diagrama esquemático dos componentes de um microscópio eletrônico de varredura. A coluna do microscópio consiste de uma fonte de elétrons, lentes eletromagnéticas e bobinas de varredura que operam sob vácuo. Um tipo de filamento de tungstênio é a fonte de elétrons. Para reduzir o diâmetro do feixe de elétrons, o focalizando sobre a superfície da amostra, as lentes eletromagnéticas e os diafragmas são usados. As bobinas de varredura têm a função de defletir o feixe, controlando, assim, a varredura do mesmo sobre a superfície da amostra (CANEVAROLO JR., 2003).

A irradiação da amostra com elétrons provoca a emissão de elétrons secundários, retroespalhados e de raios X. Tais microscópios possuem detectores específicos para cada emissão, sendo que os detectores de raios X são usados para análise química. A formação da imagem é ocasionada pela detecção dos elétrons secundários. Produz-se um sinal elétrico a cada ponto varrido na superfície da amostra, tal sinal é varrido através da tela de um tubo de raios catódicos (CRT), enquanto que o brilho deste sinal é modulado por um amplificador de

corrente do detector. Com o sincronismo entre a varredura do sinal intensificado no CRT e a varredura de elétrons sobre a amostra há a preservação da correspondência espacial entre a amostra e imagem. Com isso, a determinação da ampliação da imagem é simples, ou seja, a ampliação é obtida pela razão entre o comprimento da varredura do sinal gerado na CRT e o comprimento da varredura do feixe sobre a amostra (CANEVAROLO JR., 2003).

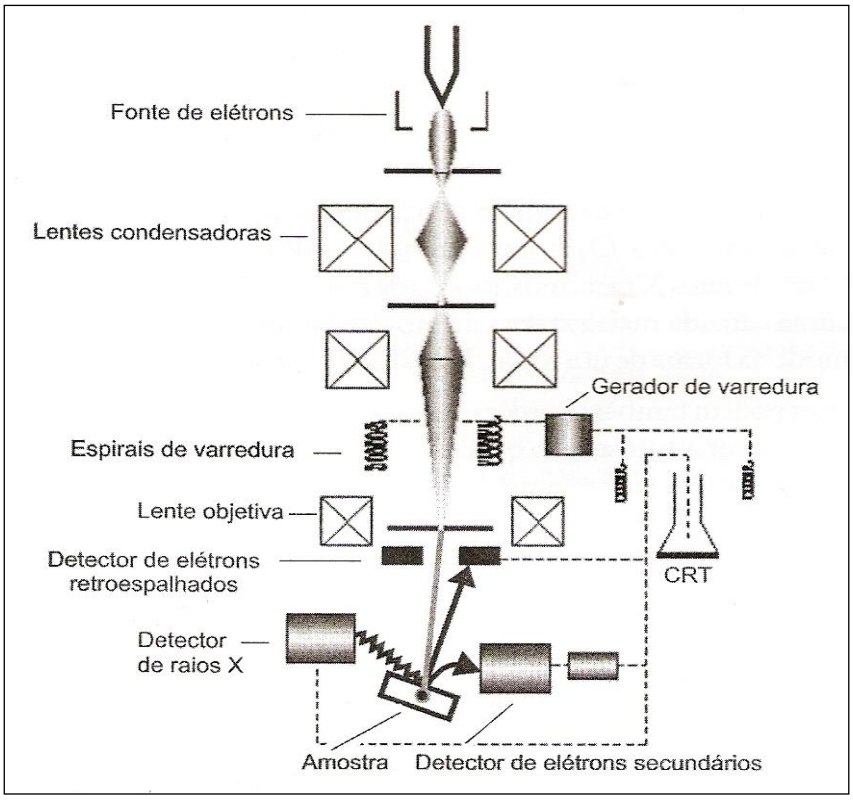

Figura 4.33: Diagrama esquemático dos componentes relevantes de um microscópio eletrônico de varredura. (Fonte: CANEVAROLO JR., 2003)

O aspecto mais atrativo da microscopia de varredura é a facilidade de preparação da amostra. A montagem da amostra é feita sobre suportes metálicos, utilizando adesivos condutivos (fitas de carbono). O revestimento da amostra por um filme condutor tem como objetivo evitar o acúmulo de carga negativa. A camada de metal deve ser suficientemente contínua e fina a fim de não mascarar a topografia da superfície. A técnica utilizada para o recobrimento das amostras poliméricas estudadas (que não são condutoras) foi a metalização por “sputtering”. A liga de ouro-paládio foi o metal de recobrimento escolhido para imagens de topografia gerada por elétrons secundários, produzindo assim alto rendimento do sinal gerado. Uma solução alternativa para evitar o acúmulo de carga negativa sobre a superfície da amostra é a operação do microscópio em baixa voltagem, também utilizado nas amostras estudadas, voltagem de 15 kV.

4.6.8 Microscopia Óptica (OM)

A função do microscópio é produzir uma imagem ampliada do objeto, contendo a informação estrutural pretendida, podendo ser percebida pelo sistema olho-cérebro, uma vez que a observação direta de um objeto pelo mesmo está limitada a uma resolução cerca de 70 μm. Para a percepção correta da estrutura de um objeto é também essencial que esta produza variações de intensidade luminosa ou de cor na imagem, que são únicas características da luz que a visão humana é sensível.

Resolução, ampliação e contraste são as características principais a considerar quando se seleciona a microscopia para observar a morfologia de um objeto. A resolução máxima do microscópio óptico é cerca de 0,1 μm e está limitada pela natureza da luz (CANEVAROLO JR., 2003). O microscópio óptico pode funcionar em transmissão ou em reflexão. O primeiro modo é usado com amostras transparentes e o segundo em amostras opacas. A constituição de um microscópio óptico em ambos os modos é essencialmente idêntica.

A Figura 4.34 apresenta os principais constituintes de um microscópio óptico. A fonte luminosa é geralmente uma lâmpada de tungstênio e produz o feixe de luz que vai interagir com a amostra. O diafragma de campo, colocado antes do condensador, permite variar a dimensão da zona iluminada da amostra. O condensador tem como função concentrar a luz, com intensidade uniforme, na zona iluminada da amostra. O diafragma de abertura do condensador permite variar o ângulo de abertura do cone luminoso que incide na amostra, o ajuste desse ângulo afeta a resolução final do microscópio.

O sistema de lentes designado por objetiva recolhe a luz proveniente da atmosfera e forma a imagem primária. Esta imagem é real, invertida e ampliada da zona em observação. A objetiva é o principal responsável pela resolução e pela maior parte da ampliação da imagem. A ocular, de modo idêntico ao de uma lupa, recolhe os raios divergentes que formaram a imagem primária e produz uma imagem final, virtual que é percebida pelo sistema olho-cérebro como se estivesse situada a 25 cm da ocular. A ampliação final da imagem é dada pelo produto da ampliação da objetiva pelo da ocular. No microscópio de reflexão a luz é dirigida para a amostra através da objetiva que, neste sistema atua, também, como condensador.

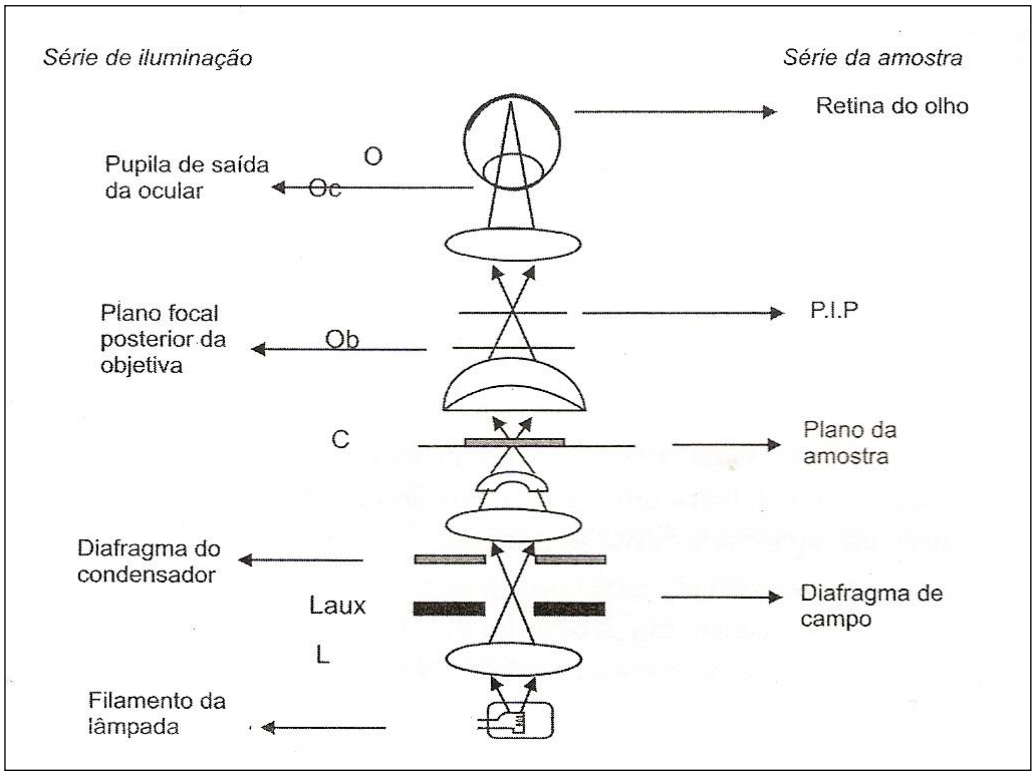

Figura 4.34: Constituintes principais do microscópio óptico. Legenda: L- lâmpada, Laux – lente auxiliar do sistema de iluminação, C – condensador, Ob – objetiva, Oc – ocular e O – olho. (Fonte: CANEVAROLO JR., 2003).

Conforme Figura 4.34, no microscópio óptico existem duas séries de planos conjugados: a série da amostra e a série da lâmpada. Uma imagem que se forme num plano de uma das séries repetir-se-á nos planos seguintes da mesma série, mas não da outra. A série da amostra inclui o diafragma de campo, o plano da amostra, o plano da imagem primária (PIP) e a retina do olho. Na outra série está o filamento da lâmpada, o plano focal frontal do condensador, o plano focal posterior da lente e pupila de saída da ocular.

Para obter os melhores resultados na observação com o microscópio, é essencial que a zona da amostra em observação seja iluminada com uma intensidade uniforme e que o cone de luz que nela incide proveniente do condensador tenha uma abertura adequada à lente (o procedimento contém os seguintes passos: 1- ajuste do diafragma de campo, 2- ajuste do diafragma do condensador e 3- ajuste do sistema binocular).

CAPÍTULO 5

MATERIAIS E MÉTODOS

Na realização da parte experimental deste trabalho, foram utilizados os seguintes reagentes e solventes no preparo dos copolímeros e microencapsulados de tetraciclina nos mesmos, bem como os instrumentos utilizados para síntese e caracterização.

5.1- Reagentes

- 2-etil-hexanoato de estanho – $[CH_3(CH_2)_3CH(C_2H_5)CO_2]_2Sn$ – Procedência: Aldrich, nº 28171-2, advertências no rótulo: material irritante;
- *l,l*-lactídeo – (3S)-cis-3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona – Procedência: Aldrich, nº 4511-45-6, ponto de fusão: 116-119ºC, grau de pureza: 98%, advertências no rótulo: material irritante, devendo ser conservado e/ou manipulado sob atmosfera de nitrogênio, material rapidamente hidrolisável e devendo ser mantido sob refrigeração;
- Poli(glicol etilênico) - Procedência: Oxiteno do Brasil, lote nº 050317C20347, validade 17/03/2007, massa molar 4000g/mol (forma sólida), índice de hidroxila de 28 mg KOH/g;
- Tetraciclina – $C_{22}H_{25}N_2O_8$ - Procedência: Merck, Art. 8189, M = 480,90g/mol (*);

5.2- Solventes

- Acetona - Procedência: Ecibra Reagentes Analíticos, lote nº 16823 de Março de 2006, validade de 3 anos, grau P.A.;
- Clorofórmio - Procedência: CAAL Reagentes Analíticos, lote nº 3439 de 02/2006, validade de 3 anos, grau P.A.;
- Diclorometano - Procedência: Quimex QX 330.1000, lote 24684, grau P.A.;
- Hexano - Procedência: CAAL Reagentes Analíticos, lote nº 97817 de 12/2006, validade de 3 anos, grau P.A.;
- Solução elaborada de 1% p/v de poli(ácido vinílico) (PVA) (Procedência: Sigma-Aldrich, 80% hidrolisado e Mw = 10000).

5.3- Equipamentos

Além dos equipamentos e vidrarias comuns aos laboratórios, foram usados os instrumentos citados abaixo para o preparo e a caracterização dos copolímeros biodegradáveis e das microesferas obtidas do microencapsulamento desses copolímeros com a tetraciclina:

- Agitador magnético: marca JK IKA WERKE, modelo RH-KT/C (3)

(*) Cabe resaltar que a escolha da tetraciclina foi baseada na disponibilidade deste fármaco no laboratório IQ/UFMG.

- Analisadores Termogravimétricos Simultâneos TG-DTA: marca TA INSTRUMENTS, modelo SDT 2960 (2) e marca METTLER TOLEDO, modelo 851E (5)
- Balança analítica: marca MARTE, modelo AL500 (1)
- Balança digital: marca DENVER INSTRUMENTS, modelo PI-2250 (3)
- Calorímetro Exploratório Diferencial: marca TA INSTRUMENTS, modelo DSC2010 (2)
- Centrífuga: marca EPPENDORF, modelo CENTRIFUGE 5702 (3)
- Espectrofotômetro de Infravermelho: marca PERKIN ELMER, modelo Spectrum One FTIR (Método de Refletância Total Atenuada - ATR) (2)
- Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear (^{1}H e ^{13}C): marca BLUKER, modelo AC200 (1)
- Estufa a vácuo: marca TEACNAL, modelo TE-395/TE-058 (3)
- Difratômetro de Raios X: marca RIGAKU, modelo MINIFLEX (4)
- Dispersor: marca JK IKA WERKE, modelo da haste ULTRA-TURRAX T8 (3)
- "Glove Box" - Câmara de acrílico fechada em atmosfera de nitrogênio (1)
- Liofilizador: marca THERMO ELECTRON CORPORATION, modelo SAVANT MODULYOD (Freezer Dryer) (3)
- Medidor de Partículas: marca MALVERN INSTRUMENTS, modelo MASTERSIZER(3)
- Microscópio Eletrônico de Varredura: marca JEOL TECHNICS LTDA, modelo JSM-561OV (4)
- Microscópio Óptico (Estéreo): marca OLYMPUS, modelo SZH 10 com câmera digital da marca NIKON, modelo COOL PIX 5400 (4)
- Pipetas automáticas: marca HTL, modelo LABMATE+ de capacidade de até 1 ml (3)
- Termômetro/higrômetro: marca INSTRUTHERM, modelo HT-210 (1)
- Ultrasom: marca SONICS, modelo VIBRACELL (3)

A autora expressa seus agradecimentos as seguintes instituições que permitiram a preparação e caracterização das amostras:

(1) Departamento da Engenharia de Materiais - USP

(2) Departamento de Processos Orgânicos - Escola de Química - UFRJ

(3) Instituto de Química - UFMG

(4) Instituto de Macromoléculas - UFRJ

(5) Departamento de Geociências - UFRRJ

5.4- Métodos de Preparo

5.4.1- Preparação dos Copolímeros de PLLA-PEG-PLLA

O polímero de poli(glicol etilênico) foi previamente seco em estufa à vácuo sob temperatura de 40°C, 0,099 atm por 24 horas. O monômero *l*,*l*-lactídeo e o catalisador 2-etil-hexanoato de estanho foram recebidos secos e em embalagem selada não sendo necessário prévia purificação ou secagem. Demais produtos químicos foram usados sem prévia purificação ou secagem.

Os copolímeros biodegradáveis foram sintetizados pela técnica de polimerização em massa devido à facilidade do processo e à contaminação mínima do produto final. As composições projetadas para os três tipos de copolímeros sintetizados em massa a partir do segmento PEG-4000 desta tese encontram-se descritas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Composição de copolímeros baseados em PLLA e PEG.

Copolímero	Razão Molar LA/EO [(1)]	DP_{PLLA} [(2)]	Catalisador $SnOct_2$:OH[(3)]
1	2	91	1
2	1	45,5	0,05
3	2	91	0,05

[(1)] LA/EO ($C_3H_4O_2/C_2H_4O$) - razão entre o monômero e o óxido de etileno (na forma de PEG).
[(2)] DP_{PLLA} - grau de polimerização esperado para o bloco PLLA de cada copolímero
[(3)] $SnOct_2$:OH - relação molar entre catalisador por hidroxila de PEG.

Tais composições foram baseadas nos estudos de Drumond & Wang (2005) a fim de sintetizar copolímeros anfifílicos fisicamente estáveis para uso posterior como sistemas de liberação de fármacos, portanto não existindo a necessidade em elaborar um planejamento experimental para esta tese.

Na câmara *glove box*, Figura 5.1, purgada com nitrogênio, foram realizadas as pesagens dos reagentes. Para o copolímero 1, massas pré-estabelecidas de poli(glicol etilênico) PEG 4000 e catalisador 2-etil hexanoato de estanho (Tabela 5.1) foram introduzidos em tubo seco, selado com parafilme para evitar qualquer contato com a umidade do ar. Posteriormente, o tubo foi levado para um banho de silicone pré-aquecido a 120ºC a fim de obter uma ativação mais homogênea. Após 20 minutos de ativação, o tubo foi retirado do banho, transferido para dentro da câmara seca e introduzido a quantidade do reagente restante, monômero lactídeo (LA). O tubo foi selado novamente em atmosfera seca e levado a um outro banho de silicone a 135ºC. Esta reação teve o período de 144 horas (6 dias). O copolímero obtido foi purificado por três sucessivas dissoluções em clorofórmio e precipitação em hexano. Após a purificação, o mesmo foi seco ao ar livre por 24 horas e a vácuo por 72 horas (DRUMOND, MOTHÉ & WANG, 2004, 2007).

Figura 5.1: Câmara “Glove-box” utilizada para a preparação dos copolímeros.

A rota desses procedimentos é simplificada no seguinte diagrama de blocos como mostra a Figura 5.2.

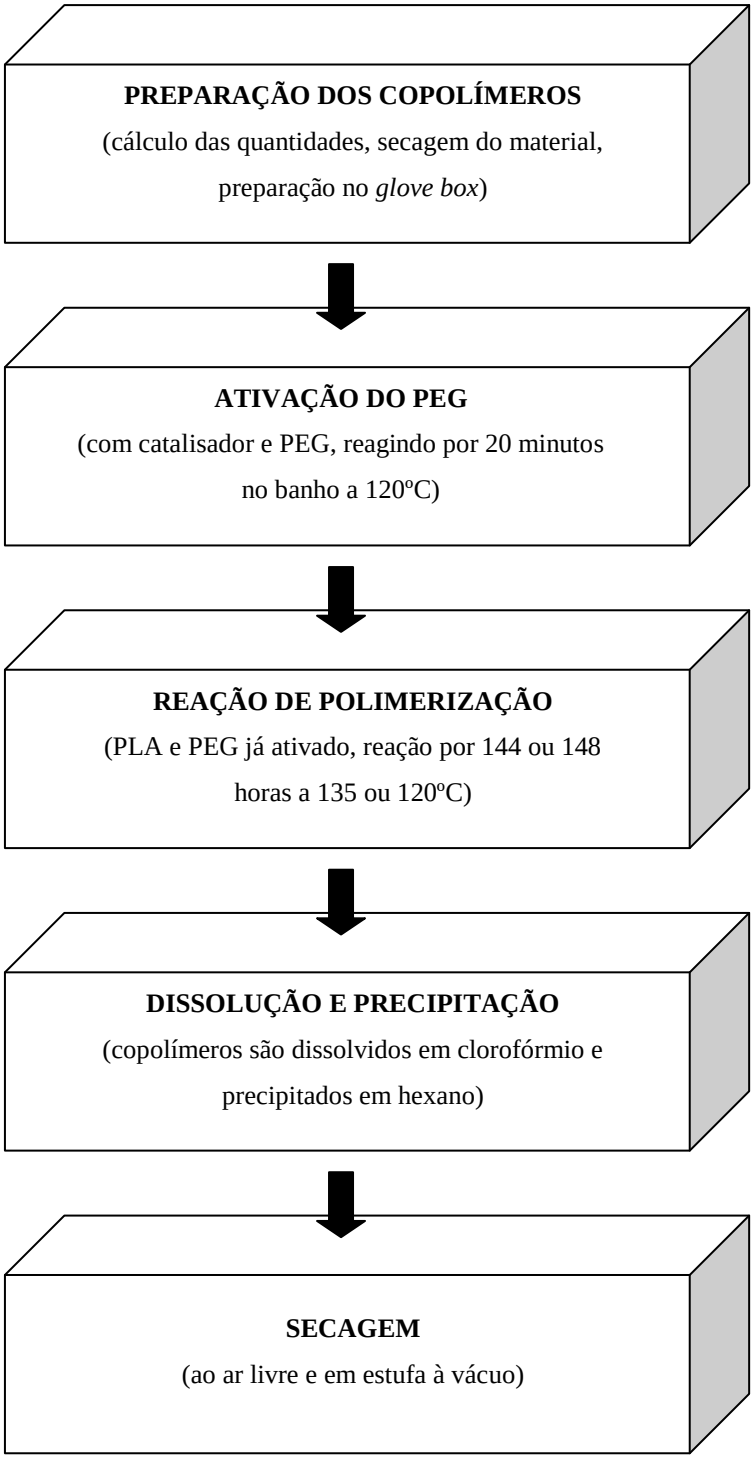

Figura 5.2: Diagrama de blocos do procedimento de copolimerização.

O copolímero 2 seguiu a mesma rota de síntese do copolímero 1, diferenciando-se deste nas massas pré-estabelecidas dos polímeros e catalisador, na temperatura e no tempo de polimerização. Ou seja, a reação teve o período de 148 horas e a 120ºC. As etapas de purificação e secagem foram as mesmas do copolímero 1.

O copolímero 3 seguiu a mesma rota de síntese do copolímero 2, diferenciando-se somente deste na proporção de LA/EO, conforme Tabela 5.1. As etapas de ativação do PEG, polimerização, purificação e secagem foram as mesmas do copolímero 2. Os três copolímeros obtidos apresentaram aspectos similares: cor branca e sob a forma de pó, conforme mostra a Figura 5.3.

Figura 5.3: Fotografia dos três copolímeros obtidos.

5.4.2- Preparação do Microencapsulamento pelo método de dupla emulsão por evaporação do solvente

Inicialmente, vidrarias, espátulas e eppendorfs foram lavados com água e detergente e rinsados, posteriormente, com acetona e água destilada abundantemente e mantidos na estufa por aproximadamente de 30 minutos.

Após secagem, foram pesados aproximadamente 20mg de tetraciclina no eppendorf e 150mg do copolímero PLLA-PEG-PLLA preparado em tubo de vidro. No eppendorf contendo tetraciclina foi adicionado 250μl de água destilada (solução A) e no tubo de vidro contendo o copolímero preparado de PLLA-PEG-PLLA foi adicionado 1,5ml de diclorometano (solução B).

A solução A foi adicionada na solução B, observando-se duas fases: oleosa e aquosa. Tal mistura foi mantida em ultra-som por 60 segundos a amplitude de 25% e pulso 4.0. No

dispersor foi mantido um becker contendo 50 ml da solução surfatante de PVA a 1% (M_w= 10000).

Após o tempo de exposição no ultra-som e com o auxílio de pipeta tipo Pasteur, a mistura foi adicionada na solução de PVA e mantida no dispersor a uma velocidade de 15500 rpm em temperatura ambiente por 60 segundos. Em seguida, a emulsão foi mantida sob agitação mecânica com intuito de eliminar o solvente diclorometano por evaporação. As condições operacionais foram: período de 3 horas, temperatura de 25ºC e velocidade de 800 rpm.

Após agitação, a dupla emulsão (w/o/w) foi separada em quatro tubos e os mesmos foram submetidos a três etapas de centrifugação de 4 minutos a uma velocidade de 2000 rpm a fim de retirar ao máximo todo o solvente usado. Entre as centrifugações foi utilizada a água destilada para suspensão do precipitado. Após centrifugação, o precipitado total foi submetido ao nitrogênio líquido e liofilizado por um período mínimo de 12 horas a uma temperatura de -50ºC a 214 mbar a fim de secar todo o precipitado formado.

As relações de diclorometano/copolímero e de água/tetraciclina, a escolha do surfatante PVA e os parâmetros envolvidos no procedimento acima descrito de microencapsulamento por dupla emulsão foram estabelecidos por estudos similares de Bezemer e colaboradores (2000); Li e colaboradores, 2000; Choi e colaboradores (2001), Freitas, Merkle & Gander, 2000; Li, Rouaud & Poncelet, 2008 e Yang, Park & Na (2009).

As etapas descritas anteriormente foram realizadas para os três copolímeros desenvolvidos de PLLA-PEG-PLLA. Foram realizadas duplicatas de cada copolímero preparado, portanto 6 microesferas preparadas em que a tetraciclina foi microencapsulada. As 6 microesferas preparadas foram caracterizadas pelas técnicas descritas na seção 4.6.

Além disso, uma sétima microesfera foi preparada alterando-se a relação da fase aquosa e a fase oleosa, ou seja, a solução A foi obtida por aproximadamente 20mg de tetraciclina com 1 ml de água e a solução B foi obtida com aproximadamente 150mg do primeiro tipo de copolímero preparado e 1ml de diclorometano. As etapas posteriores se mantiveram as mesmas. O precipitado final também foi caracterizado pelas técnicas descritas na seção 4.6. A rota do procedimento de microencapsulamento por dupla emulsão é simplificada no diagrama de blocos, Figura 5.4.

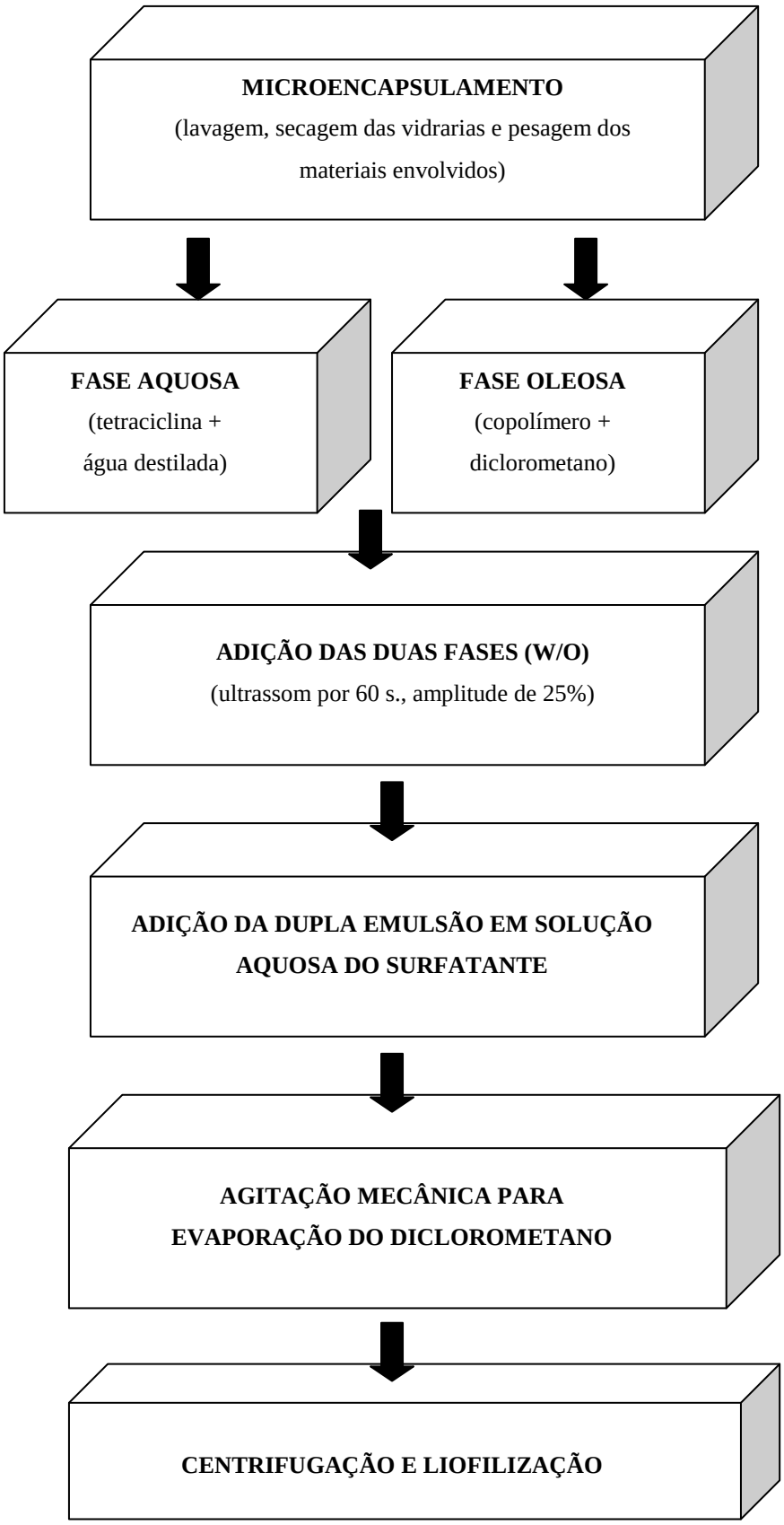

Figura 5.4: Diagrama de blocos do procedimento de microencapsulamento.

5.5- Métodos de Caracterização

5.5.1- Análise Microbiológica

Avaliação microbiológica dos copolímeros sintetizados foi realizada baseada na metodologia proposta pela American Public Health Association (APHA) que consiste da preparação de uma série de diluições decimais para cada copolímero e plaqueamento em profundidade (1ml), em *Plate Count Agar*, sempre em duplicata. Os resultados das análises microbiológicas foram expressos como Contagem Total de Mesófilos Aeróbios <10 UFC/g (unidades formadoras de colônias).

5.5.2- Análise Térmica

5.5.2.1- Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A caracterização dos copolímeros, da tetraciclina e dos microencapsulados pela técnica TG/DTG e DTA foram realizadas em um analisador simultâneo TG-DTA da marca *TA Instruments*, modelo *SDT 2960*. As análises de TG/DTG e DTA foram realizadas na razão de aquecimento de 10ºC/min de 25-800ºC sob atmosfera de nitrogênio (gás inerte) na vazão de 120 mL/min.

Para efeito de confirmação dos eventos de decomposição da tetraciclina foi utilizado um analisador simultâneo TG-DTA da marca *Mettler-Toledo*, modelo *851E* na mesma atmosfera e razão de aquecimento do analisador anterior, porém na faixa de temperatura de 25-700ºC.

5.5.2.2- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A caracterização dos copolímeros, da tetraciclina e dos microencapsulados pela técnica DSC foi realizado em um calorímetro de varredura diferencial da marca *TA Instruments*, modelo *DSC 2010*. As análises de DSC foram realizadas na razão de aquecimento de 10ºC/min de 25-200ºC sob atmosfera de nitrogênio na vazão de 80 mL/min.

5.5.3- Difração de Raios X (XRD)

As análises de difratometria de raios X para dois copolímeros e de um microencapsulado no difratômetro da marca *Rigaku*, modelo *Miniflex*, operando a 30 kV, 15 mA sob radiação Cu K_α, filtro de Ni, ângulos de difração (2θ) variando de 2º a 60º e taxa de varredura de 3º/min.

5.5.4- Espalhamento de Luz Laser de Baixo Ângulo para Análise de Tamanho de Partícula (LALLS)

Todos os microencapsulados desenvolvidos foram analisados no medidor de partículas da marca *Malvern Instruments* modelo *Mastersizer 2000*. O perfil de distribuição do tamanho de partícula das amostras foi obtido conforme as seguintes condições de operação: temperatura ambiente de 20ºC, velocidade de bombeamento de 2000 rpm e ultrasom de 20% de amplitude.

5.5.5- Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A caracterização dos copolímeros, da tetraciclina e dos microencapsulados pela técnica FTIR-ATR foi realizado no espectrômetro da marca *Perkin Elmer*, modelo *Spectrum One* com as seguintes condições operacionais: 128 varreduras, resolução de 4 cm^{-1}, faixa de operação de 400 a 4000 cm^{-1}, velocidade de varredura de 0,20 cm/s e temperatura de 20 ºC.

5.5.6- Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

A caracterização da tetraciclina e dos microencapsulados pela técnica NMR foi realizado no espectrômetro da marca *Bluker*, modelo *AC200* a 200 MHz, temperatura ambiente e solvente clorofórmio deuterado para os copolímeros e água deuterada para caracterização da tetraciclina pura.

5.5.7- Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As análises de SEM dos copolímeros e microencapsulados foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura da marca *JEOL Technics*, modelo *JSM-561*. As micrografias foram obtidas nas condições operacionais de 15 kV, 4-6 A, distancia de 10mm e metalização de liga de ouro-paládio.

5.5.8- Microscopia Óptica (OM)

As análises de OM dos copolímeros, tetraciclina e microencapsulados foram realizadas em um microscópio óptico (estéreo) da marca *OLYMPUS*, modelo *SZH 10* com câmera digital da marca *NIKON*, modelo *COOL PIX 5400*. As fotografias foram obtidas com lentes objetivas de codificação 1 e 2, *zoom* (ampliação) de 50 vezes.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O capítulo abordará os resultados de caracterização dos copolímeros de PLLA-PEG-PLLA pelas técnicas: Análise Térmica (TG/DTG, DTA e DSC), Difração de Raios X, Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com TF pelo método de ATR e a morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura e Óptica. Também será apresentada a caracterização, não só pelas técnicas anteriormente apresentadas, mas também por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (Hidrogênio e Carbono) das microesferas obtidas pelo microencapsulamento do fármaco tetraciclina nesses copolímeros.

6.1- Caracterização dos Copolímeros

6.1.1 Análise Microbiológica

Foi realizada uma série de diluições decimais para cada copolímero e posterior plaqueamento em profundidade de 1ml, em Plate Count Agar, em duplicata, portanto seis amostras foram elaboradas baseadas no procedimento analítico da American Public *Health Association* (APHA) (MORTON, 2001).

Como resultado, após o período de observação das placas, não foi verificado crescimento de colônias, para todos os copolímeros. Portanto, o resultado foi expresso pelo limite de detecção do método, isto é, o resultado foi expresso como a Contagem Total de Mesófilos Aeróbios menor que 10 UFC/g (unidades formadoras de colônias) para os copolímeros. Conforme seção 4.6.1, tal avaliação microbiológica indica que as condições de higiene foram satisfatórias e os riscos microbiológicos que os copolímeros podem oferecer à saúde do consumidor são mínimos.

6.1.2- Análise Térmica

6.1.2.1- Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)

As curvas de TG, Figura 6.1, mostram que os copolímeros estão compreendidos de dois tipos de segmentos com estabilidades térmicas muito distintas que podem ser atribuídas aos segmentos de PLLA e de PEG. Mothé, Drumond & Wang (2006) apresentaram resultado de Termogravimetria para o PEG (M_w = 4000) com um único estágio de decomposição a T_i = 370ºC. Estudos de Wang e colaboradores (2008) em sistemas de blendas poliméricas contendo PDLLA e PEG observaram que as mesmas apresentaram estabilidade térmica menor em relação aos seus respectivos homopolímeros.

Todos os copolímeros possuem dois estágios de decomposição. O primeiro estágio de decomposição (transição principal) pode estar relacionado ao segmento não agregado de PLLA observado por Penco e colaboradores (2000). E o segundo estágio, em temperatura maior, pode estar relacionado à cisão térmica do segmento de PEG (MOTHÉ, DRUMOND & WANG, 2006; MOTHÉ *et al*., 2009).

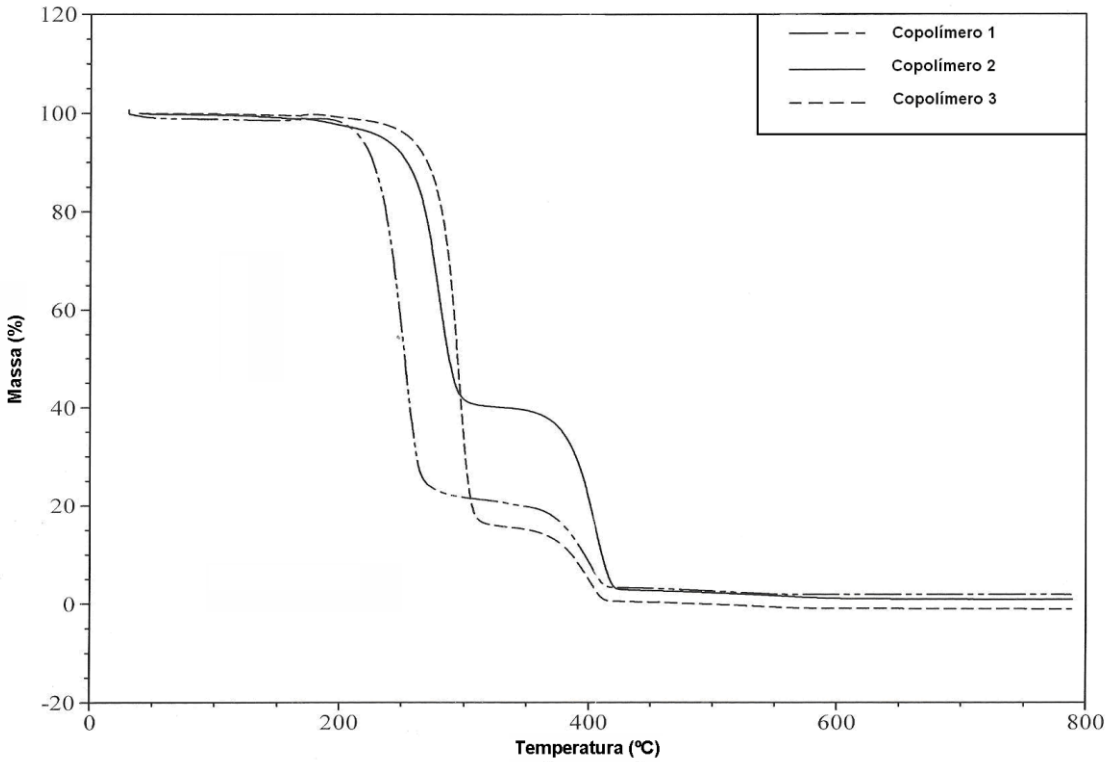

Figura 6.1: Sobreposição das curvas de TG dos três copolímeros.

Conforme Figura 6.1, o copolímero 1 apresentou o primeiro estágio a T_i = 200 ºC e T_f = 290 ºC com aproximadamente 77% de perda de massa e o segundo estágio iniciando a temperatura de T_i = 345 ºC e T_f = 410 ºC com 20% de perda de massa e um resíduo de 3% é

observado. O copolímero 2 apresentou o primeiro estágio de decomposição a T_i = 190 ºC e T_f = 310 ºC com 60% de perda de massa e o segundo estágio a T_i = 345 ºC e T_f = 415 ºC com aproximadamente 38% de perda de massa e um resíduo de quase 2 % foi observado. O copolímero 3 apresentou o primeiro estágio de decomposição a T_i = 215 ºC e T_f = 320 ºC com 84 % de perda de massa e o segundo evento a uma temperatura de quase T_i = 355 ºC e T_f = 415 ºC com aproximadamente 16 % de perda de massa e não apresentando nenhum resíduo significativo. O copolímero 3 apresentou estabilidade térmica um pouco maior em relação aos outros copolímeros.

Além disso, a análise de TG revelou uma menor estabilidade térmica para o copolímero 1, que foi sintetizado com um excesso de catalisador, porque a razão molar de LA/EO/Sn(Oct)$_2$ era de 2/1/1. Embora os copolímeros foram purificados três vezes por dissolução e precipitação, é possível que o copolímero 1 ainda tivesse quantidade residual elevada de catalisador, que poderia ter influenciado a degradação do segmento não agregado de PLLA, diminuindo a temperatura do pico da degradação em 40-50ºC. A estabilização térmica dos polilactídeos foi relatada previamente por Martino, Ruseckaite & Jiménez (2006) indicando efeitos plastizantes durante o processamento dos mesmos.

As curvas de DTG, Figura 6.2, confirmam os dois estágios de decomposição para os copolímeros. Conforme figura, o pico de DTG, que corresponde a velocidade máxima de decomposição, para os copolímeros 1, 2 e 3 são, respectivamente, 250 ºC, 290 ºC e 300 ºC.

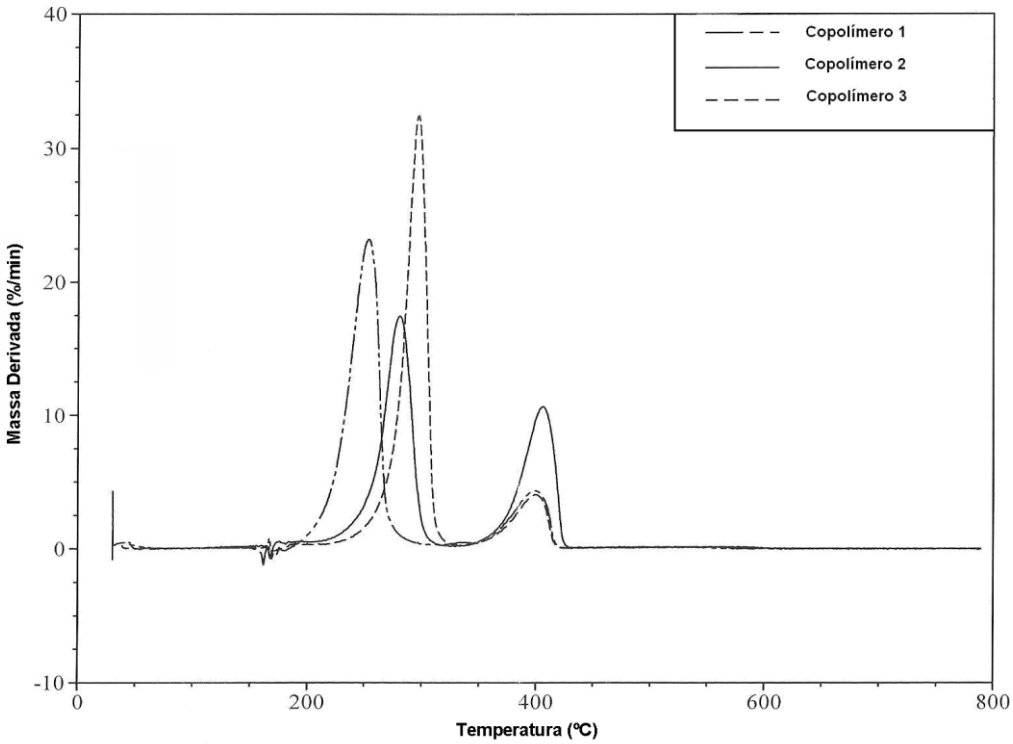

Figura 6.2: Sobreposição das curvas de DTG dos três copolímeros.

6.1.2.2- Análise Térmica Diferencial (DTA)

Os resultados de DTA (Figura 6.3) confirmaram os resultados de TG. O segmento PEG possuiu maior estabilidade térmica em relação ao segmento PLLA, porque a temperatura do evento de degradação observada por DTA foi em torno de 400ºC, enquanto que o segmento de PLLA apresentou pico da degradação em torno de 250ºC, 290ºC e 300ºC, para os copolímeros 1, 2 e 3, respectivamente (corroborando com os resultados de DTG).

Adicionalmente, todas as amostras apresentaram um evento endotérmico em torno de 165ºC para os copolímeros 1 e 2 e 171ºC para o copolímero 3 que pode ser atribuído a uma transição de fusão. O ciclo de despolimerização de PLLA está caracterizado por um consumo de calor enquanto a cisão do segmento PEG, Figura 6.3, começa como um evento ligeiramente endotérmico, porém se torna ligeiramente exotérmico devido a distribuição heterogênea das ligações do material. (LI & McCARTHY, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003).

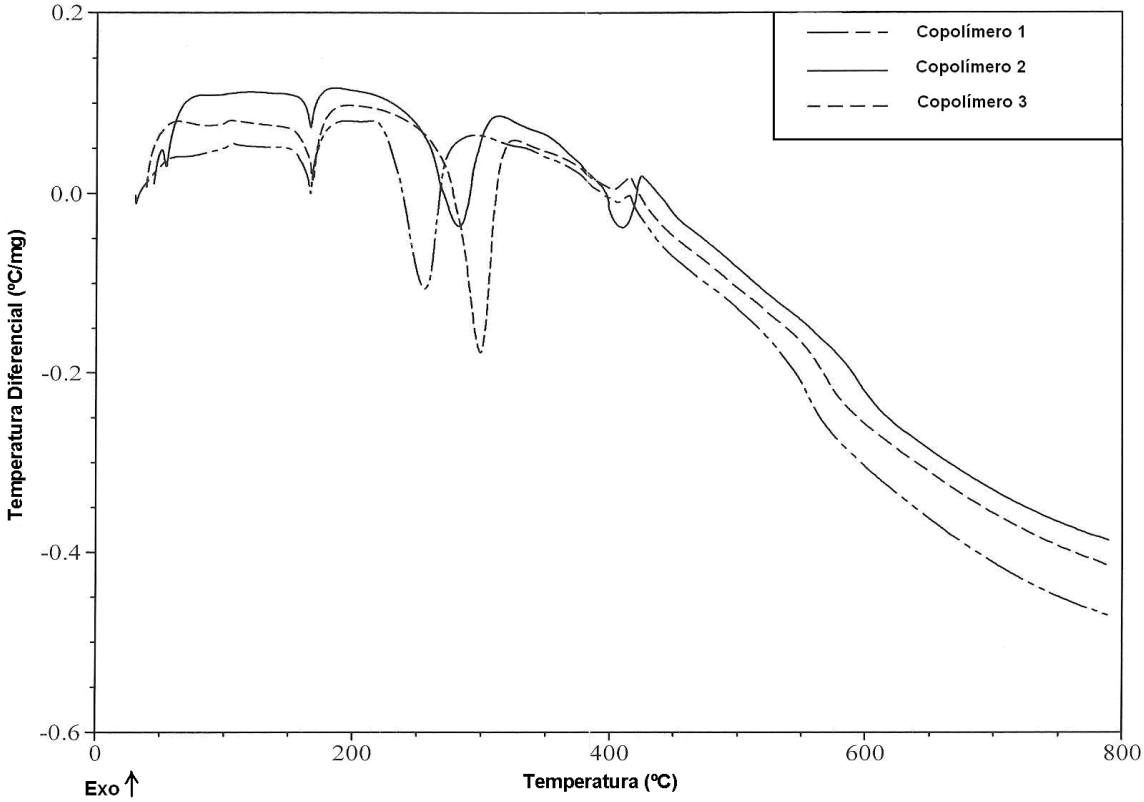

Figura 6.3: Sobreposição de curvas de DTA dos três copolímeros.

6.1.2.3- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC, Figuras 6.4 a 6.6, permitiram a confirmação da fusão cristalina dos segmentos de PLLA (T_m).

A Figura 6.4 apresenta a curva de DSC do copolímero 1 (relação LA/EO de 2/1). O mesmo apresentou a alteração da linha de base, indicando a temperatura de transição vítrea (T_g) em torno de 45ºC e um pequeno evento exotérmico em torno de 90ºC, indicando a temperatura de cristalização (T_c). Dois picos endotérmicos de fusão (T_m) foram observados em torno de 144ºC e 152ºC, respectivamente, indicando fusão dos cristalitos mais estáveis formados por segmentos de PLLA.

Riga e colaboradores (2006) estudaram o comportamento térmico de PLLA usando a técnica MTDSC (DSC com Temperatura Modulada) e observaram valores de 48ºC e 90,8ºC para T_g e T_c, respectivamente, a 5ºC/min em atmosfera inerte. Kubies e colaboradores (2000) também observaram a presença de cristalização (em torno de 100ºC) e evento endotérmico em torno de 170ºC para copolímeros de PLLA/PEO na proporção de 2/1. Venkatraman e colaboradores (2005) observaram evento endotérmico de fusão para o segmento PLLA puro a 177,5ºC e para o copolímero PLA-PEG-PLA (na mesma proporção de 2/1), uma temperatura de fusão de 153,8ºC (T_m).

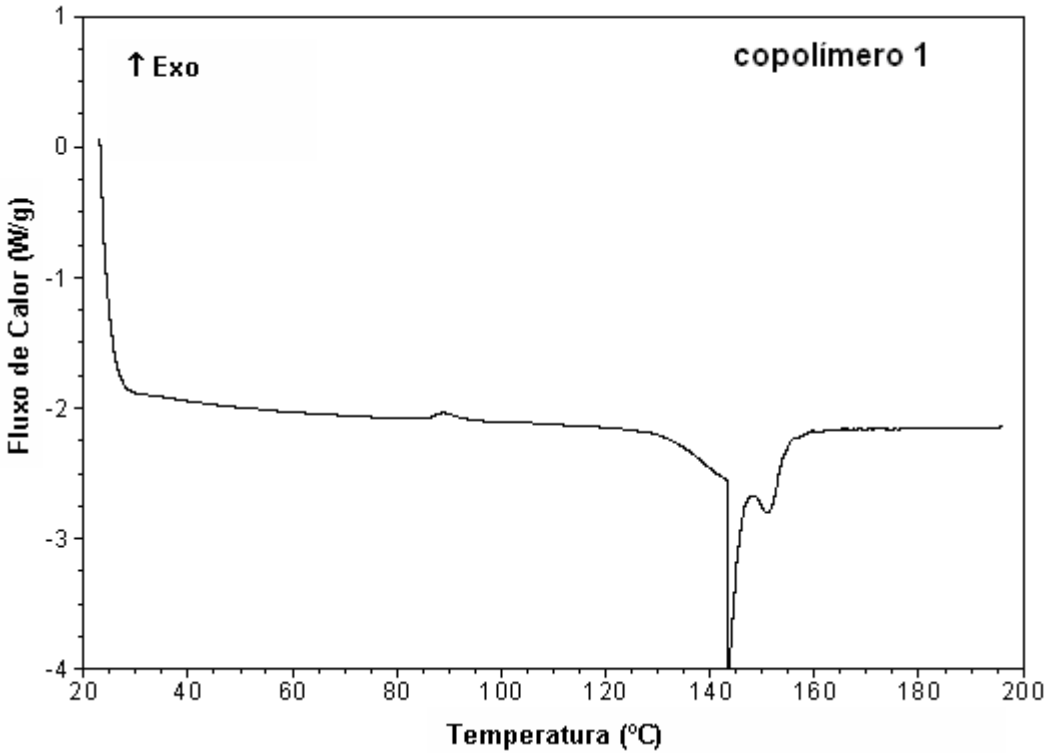

Figura 6.4: Curva de DSC para o copolímero 1.

A Figura 6.5 apresenta a curva de DSC do copolímero 2 (relação LA/EO de 1/1). O mesmo apresentou temperatura de transição vítrea em torno de 45 ºC, evento endotérmico de fusão (T_m) a 148 ºC e não foi observado evento exotérmico de cristalização (T_c). O não aparecimento de cristalização pode ser atribuído ao distúrbio da estrutura cristalina do PEG devido às interações com a fração de PLLA (BADAMI, 2004).

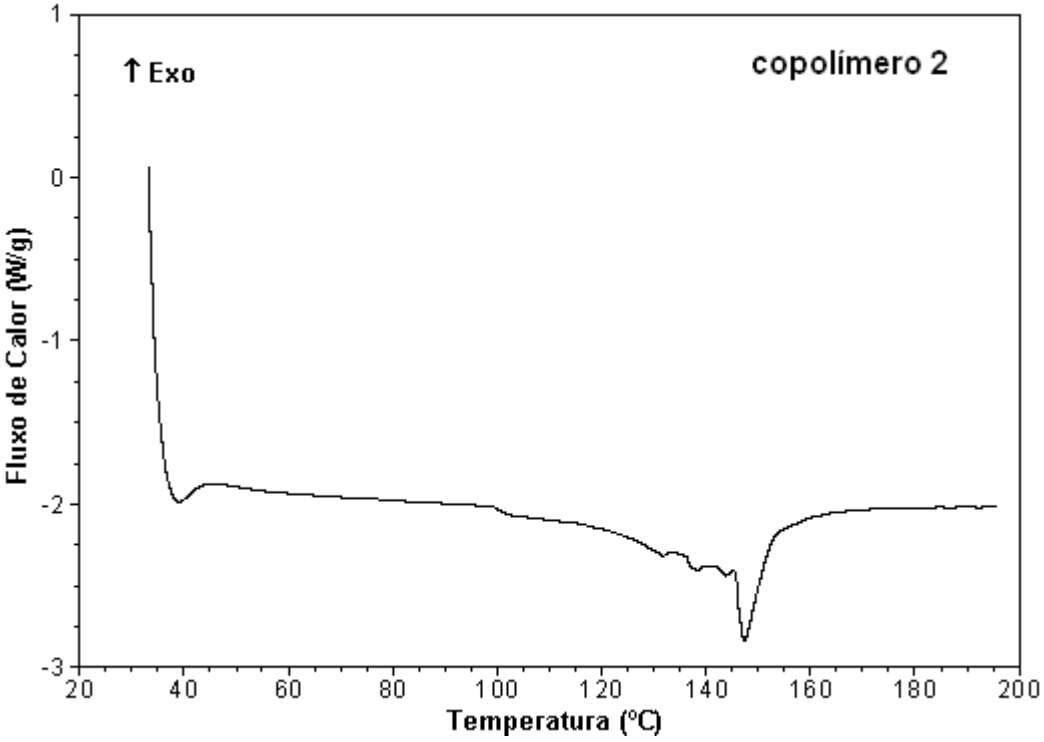

Figura 6.5: Curva de DSC para o copolímero 2.

A Figura 6.6 mostra a curva de DSC para o copolímero 3 (relação LA/EO de 2/1). Esse material apresentou somente um pico endotérmico de fusão em torno de 153 ºC, indicando que os segmentos do PEG podem estar dissolvidos. Também foram observados a presença da alteração da linha de base em torno de 45 ºC (T_g) e um pequeno evento de cristalização em torno de 90 ºC (T_c) , semelhantemente ao copolímero 1 (Figura 6.7).

Conforme citado anteriormente por alguns pesquisadores e Gong e colaboradores (2009) observaram que as temperaturas de transição dos eventos endotérmicos e exotérmicos para os copolímeros de PLLA são temperaturas menores em relação às temperaturas de transição para seu homopolímero devido à imperfeita cristalinidade da estrutura do copolímero final.

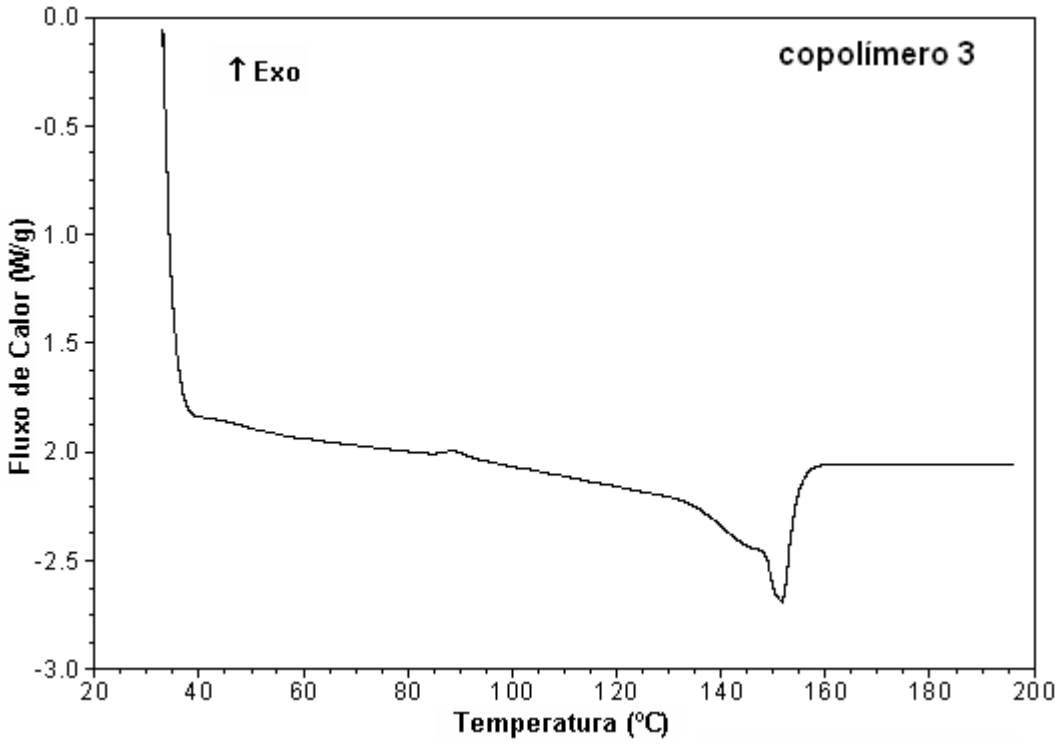

Figura 6.6: Curva de DSC para o copolímero 3.

6.1.3 Difração de Raios X (XRD)

As Figuras 6.7 e 6.8 apresentam os difratogramas obtidos para os copolímeros 1 e 3, respectivamente.

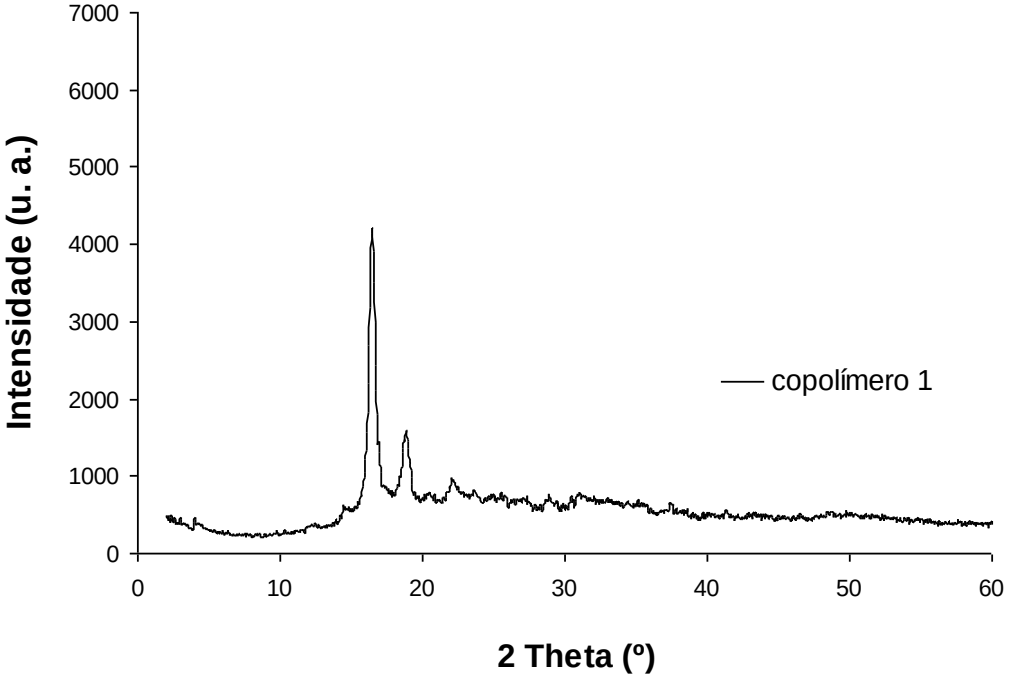

Figura 6.7: Difratograma do copolímero 1.

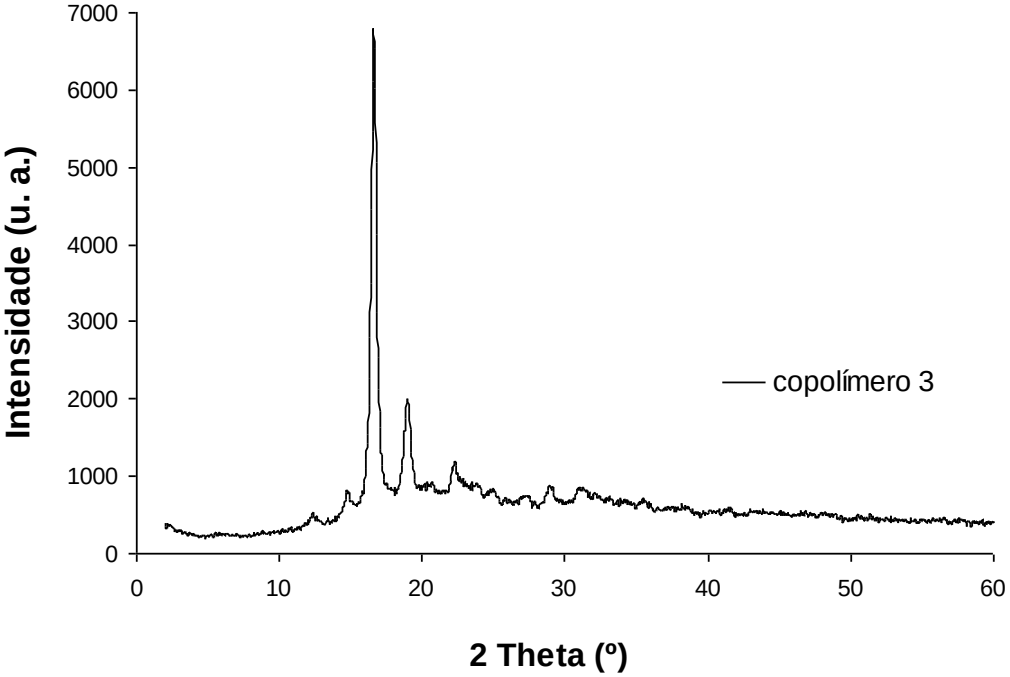

Figura 6.8: Difratograma do copolímero 3.

Ambos os copolímeros possuem características cristalinas que nos difratogramas se apresentam sob a forma de picos e foram tomados como referência os dois picos de maior intensidade.

Os valores de 2θ (2 Theta) para cada pico de cada copolímero são muito próximos: para o primeiro pico de maior intensidade foi 16,5º (intensidade de 4214 u. a.) para o copolímero 1 e 16,6º (intensidade de 6758 u. a.) para o copolímero 3. O segundo pico de maior intensidade os valores de 2θ (2 Theta) foram 18,85º (intensidade de 1603 u. a.) para o copolímero 1 e 18,9º (intensidade de 2000 u. a.) para o copolímero 3.

Tais valores indicam a presença dos picos de PLLA (fusão cristalina) que foram também observados na pesquisa de Inai, Kotaki & Ramakrishna (2005) que foram os valores de 17º e 19º para os picos de nanofibras de PLLA. A presença dos picos nos difratogramas corrobora com os resultados encontrados na calorimetria exploratória diferencial.

6.1.4- Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método Refletância Atenuada Total (FTIR-ATR)

As Figuras 6.9 a 6.11 apresentam as análises de FTIR-ATR dos copolímeros sintetizados.

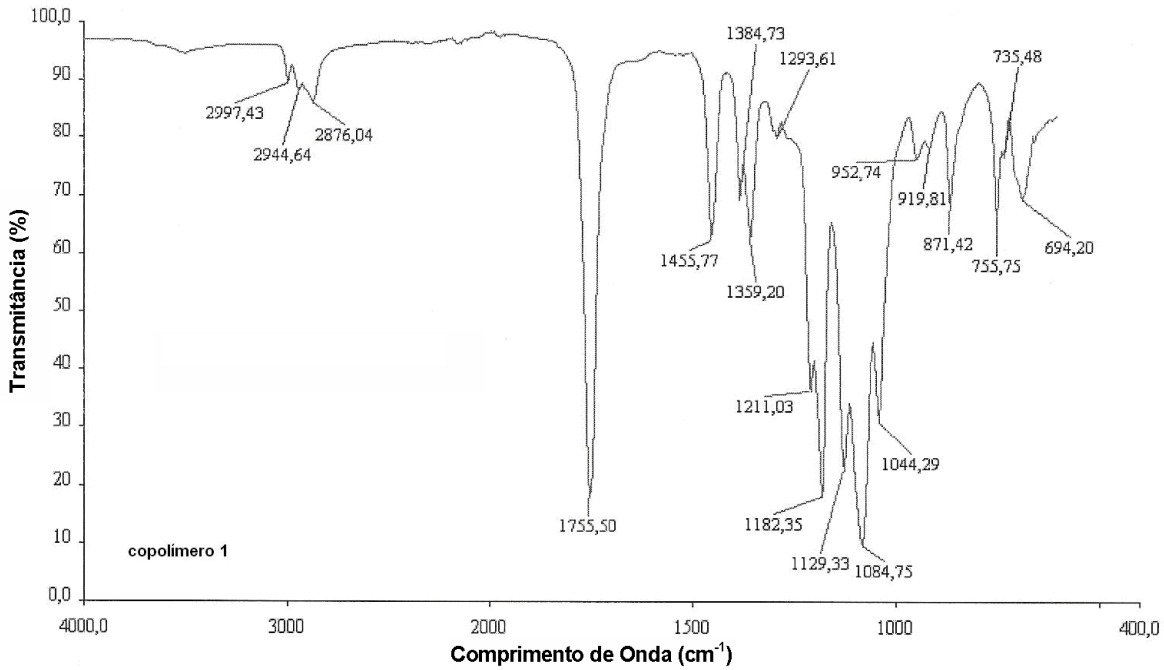

Figura 6.9: Espectro de FTIR-ATR do copolímero 1.

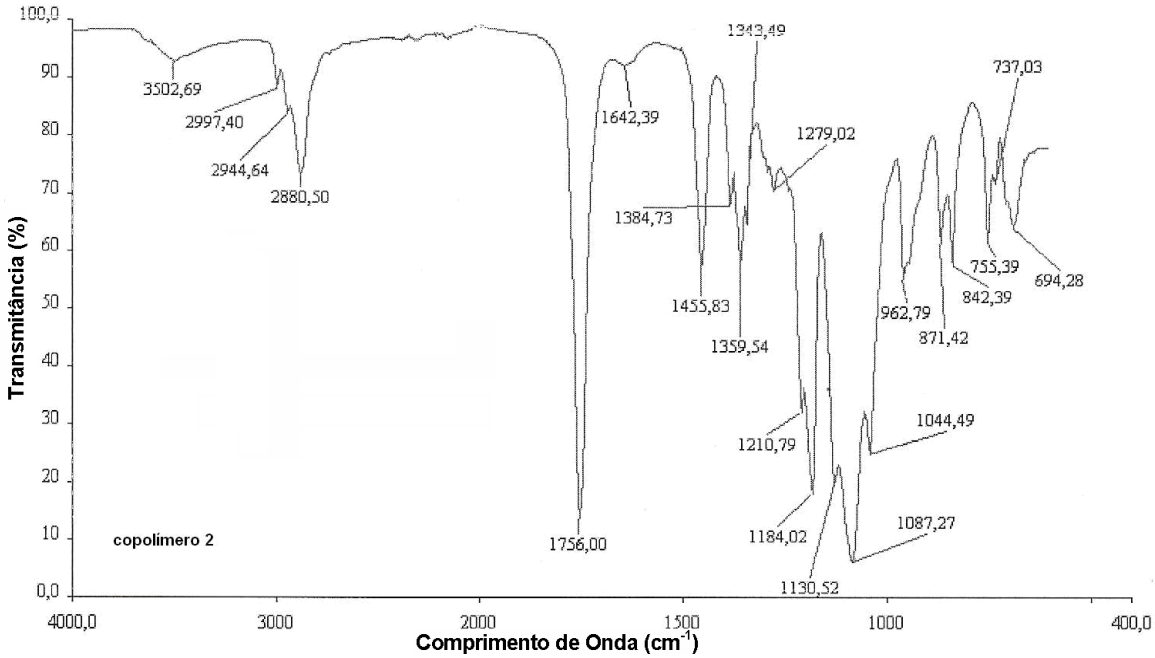

Figura 6.10: Espectro de FTIR-ATR do copolímero 2.

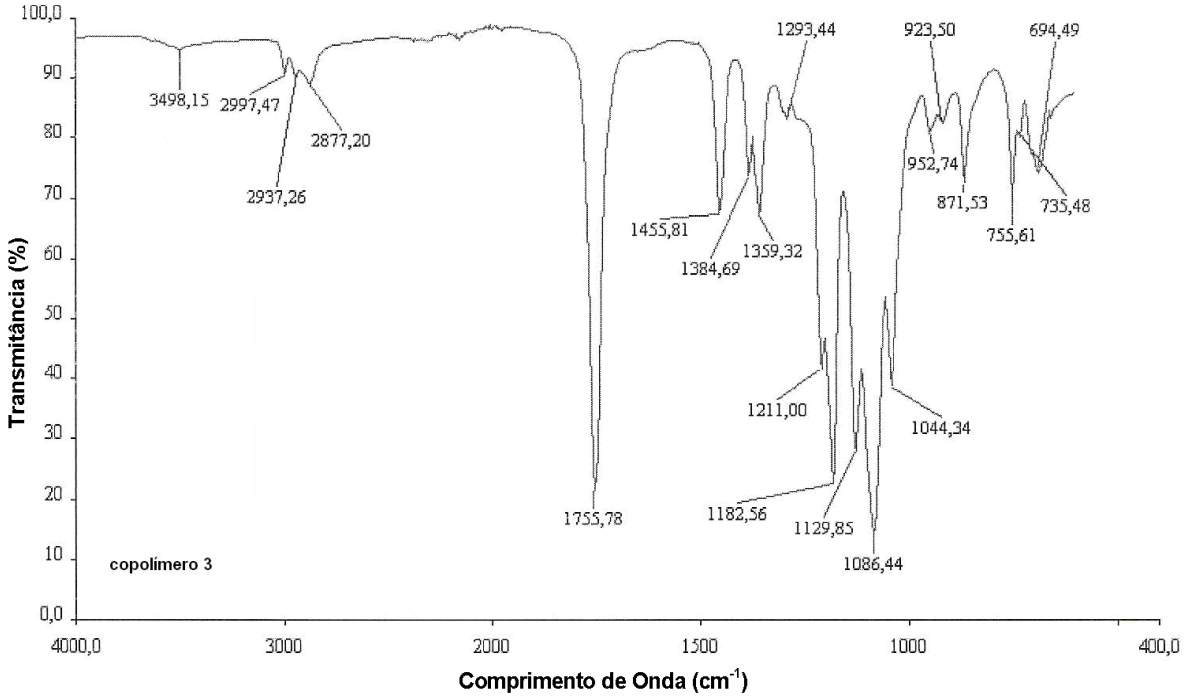

Figura 6.11: Espectro de FTIR-ATR do copolímero 3.

Com exceção para o copolímero 2, Figura 6.10, a banda em torno de 3500 cm^{-1}, responsável pelo grupamento O-H, praticamente desapareceu, indicando que os grupamentos finais de hidroxil do segmento PEG foram consumidos ao serem sintetizados com o segmento PLLA.

Beletsi e colaboradores (1999) e Cheng e colaboradores (2006) ao sintetizar o segmento PEG em segmentos de PLGA e de PHB (poli-3-hidroxibutirato), respectivamente, também verificaram o desaparecimento da banda em torno de 3500 cm^{-1}.

Os picos de absorção em torno de 2940 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} correspondem ao estiramento da ligação C-H, indicando que o coiniciador PEG foi modificado. O pico de absorção em torno de 1756 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupamento carbonila, C=O, sendo característico ao segmento PLLA. As bandas de absorção em torno de 1183 cm^{-1} e de 1086 cm^{-1} pertencem, respectivamente, ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-O-C.

A presença das absorções características de cada homopolímero em todos os três espectros de FTIR-ATR indicou a presença dos segmentos PEG e PLLA, sugerindo ligação covalente entre eles (DRUMOND, MOTHÉ & WANG, 2004; MOTHÉ *et al.*, 2009).

6.1.5- Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As Figuras 6.12 e 6.13 apresentam as micrografias do copolímero 1 (relação LA/EO de 2/1 e excesso de catalisador) com ampliação de 500 e 1000 vezes, respectivamente.

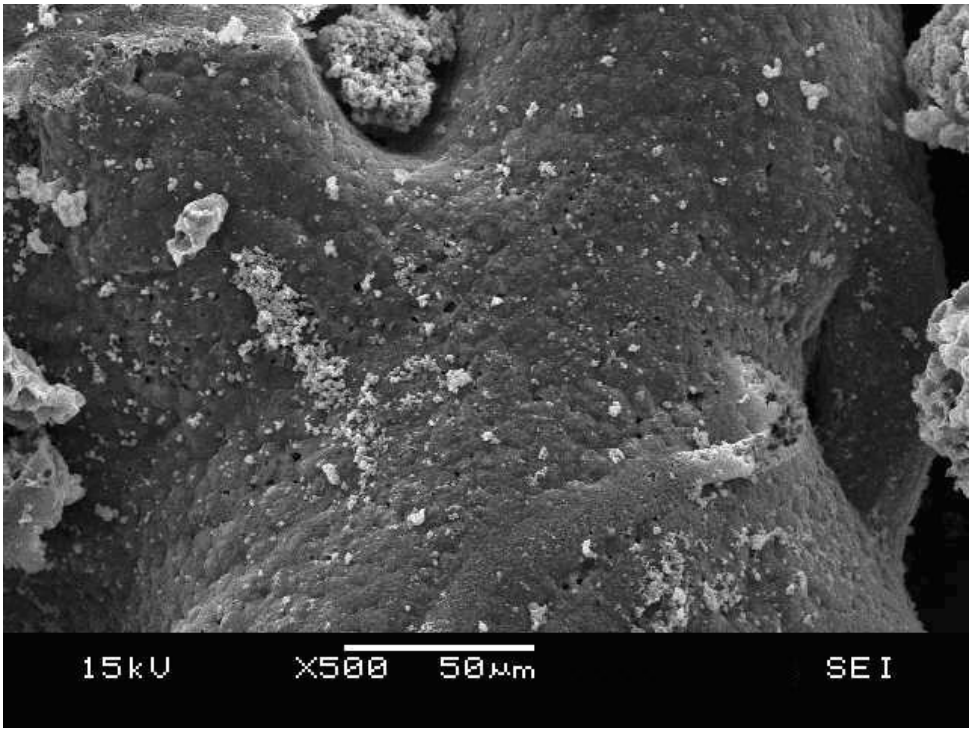

Figura 6.12: Micrografia do copolímero 1 (ampliação de 500 vezes).

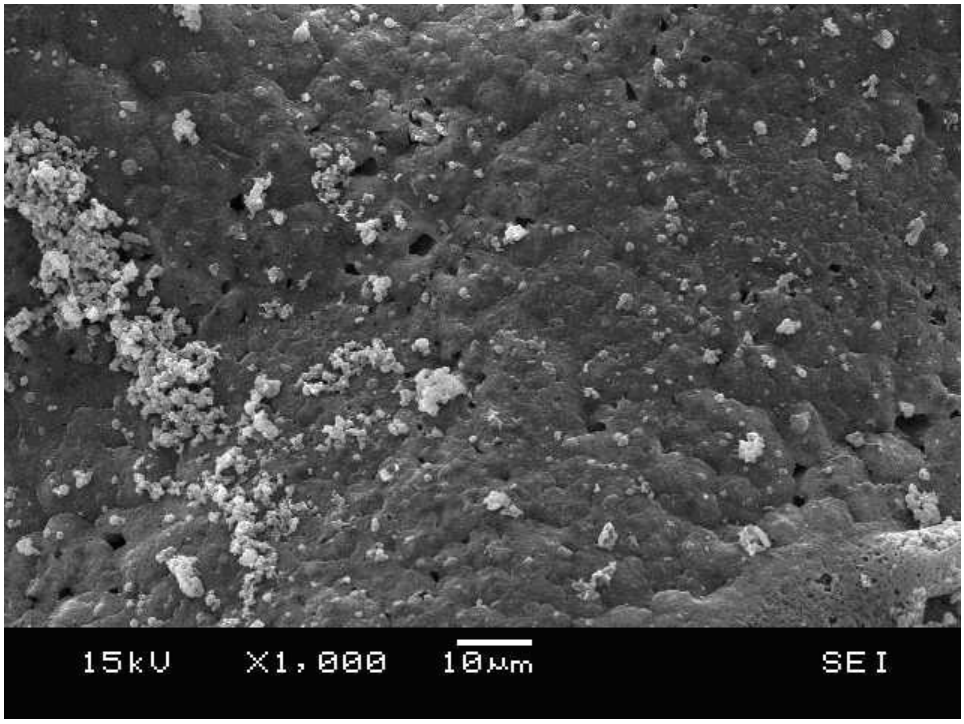

Figura 6.13: Micrografia do copolímero 1 (ampliação de 1000 vezes).

As Figuras 6.14 e 6.15 apresentam as micrografias do copolímero 2 (relação LA/EO de 1/1) com ampliação de 500 e 1000 vezes, respectivamente.

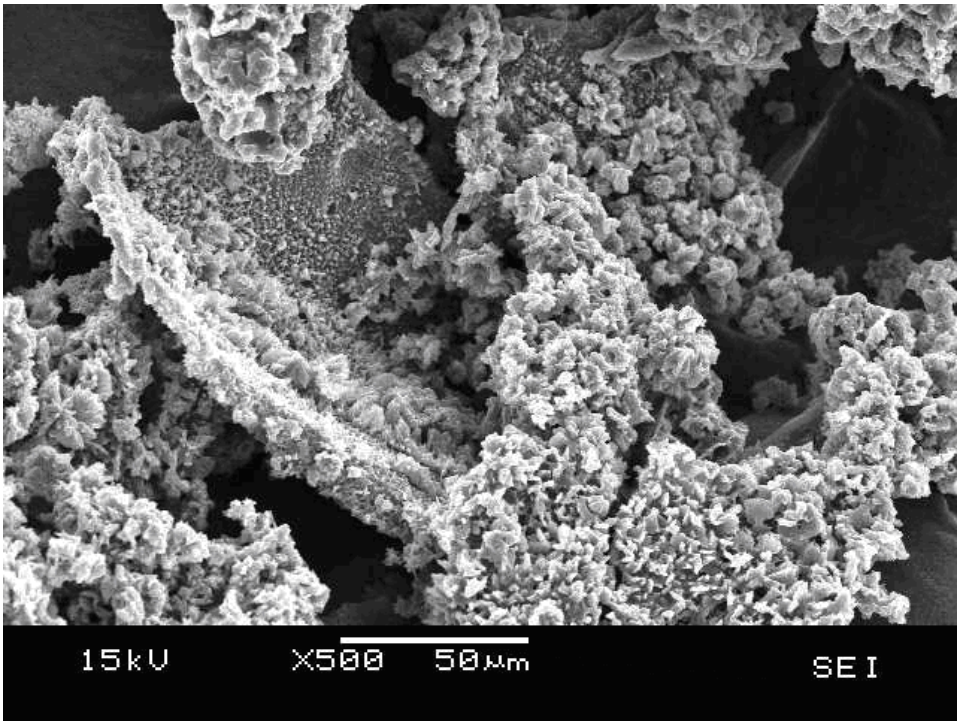

Figura 6.14: Micrografia do copolímero 2 (ampliação de 500 vezes).

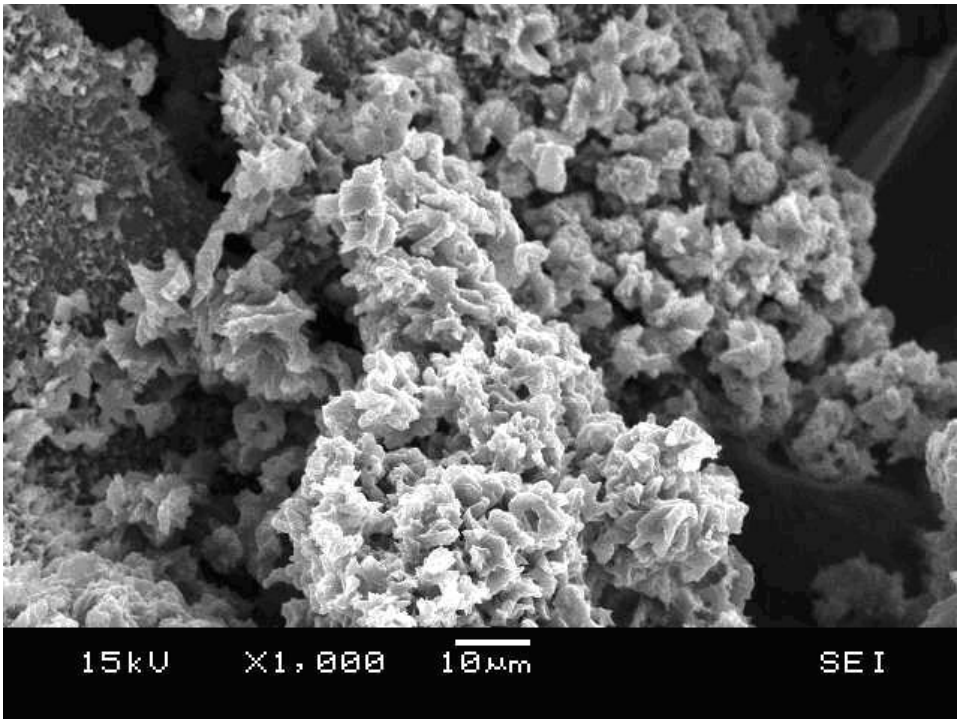

Figura 6.15: Micrografia do copolímero 2 (ampliação de 1000 vezes).

As Figuras 6.16 e 6.17 apresentam as micrografias do copolímero 3 (relação LA/EO de 2/1) com ampliação de 500 e 1000 vezes, respectivamente.

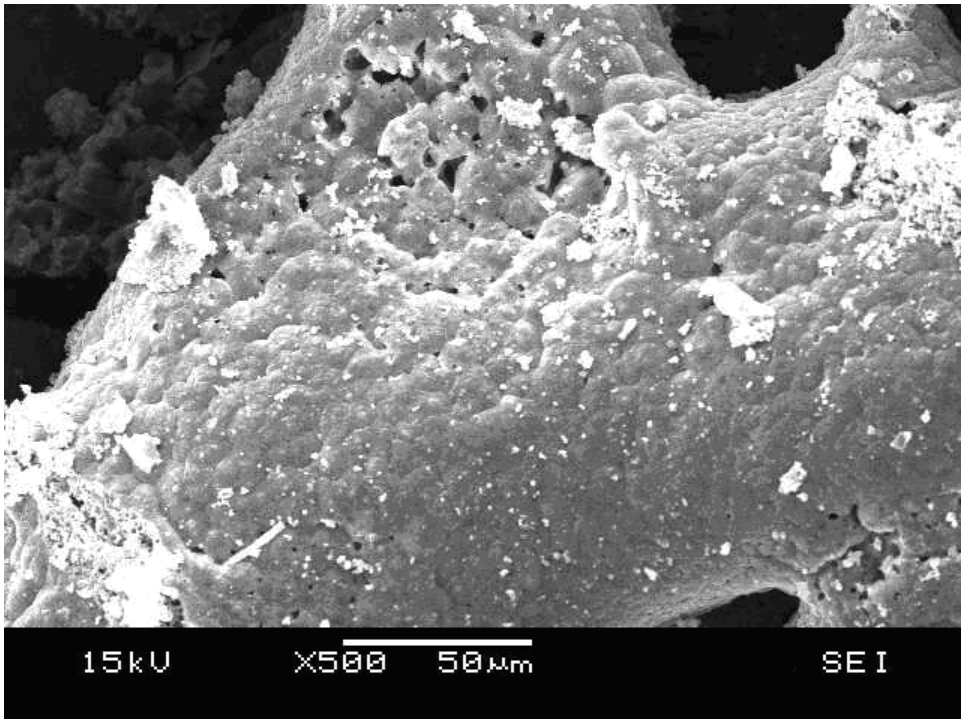

Figura 6.16: Micrografia do copolímero 3 (ampliação de 500 vezes).

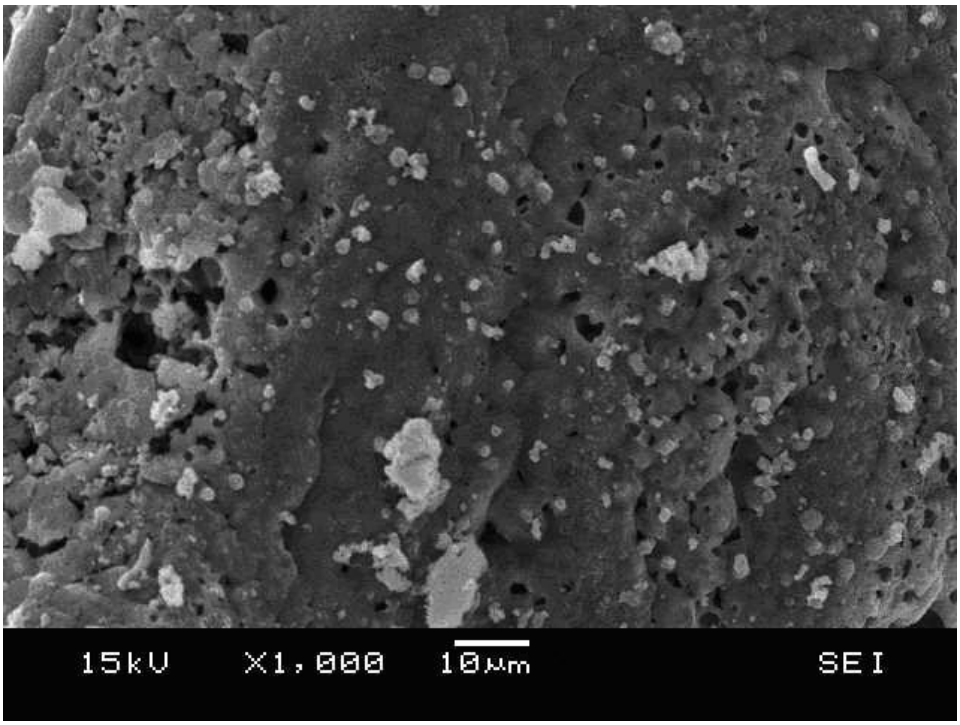

Figura 6.17: Micrografia do copolímero 3 (ampliação de 1000 vezes).

A partir das micrografias foi observado que existem mudanças morfológicas devido à existência de tamanhos diferentes do segmento PLLA, pois a estrutura morfológica entres os copolímeros 1 e 3 foi mais homogênea entre si, com a presença de pequenos poros e morfologia globular (a observação dos glóbulos principalmente nas micrografias com ampliação de 1000 vezes) A presença de morfologia globular também foi observado em micrografias de blendas de PLGA/PLLA desenvolvidas por Rezende & Duek (2003).

A morfologia do copolímero 2 é diferente, apresentando maior heterogeneidade e presença de aglomerados, possivelmente devido a maior quantidade do segmento PEG em sua composição que nos outros copolímeros desenvolvidos.

6.1.6 Microscopia Óptica (OM)

As Figuras 6.18 a 6.20 apresentam as fotografias ópticas, ampliação de 50 vezes, dos três copolímeros desenvolvidos, respectivamente.

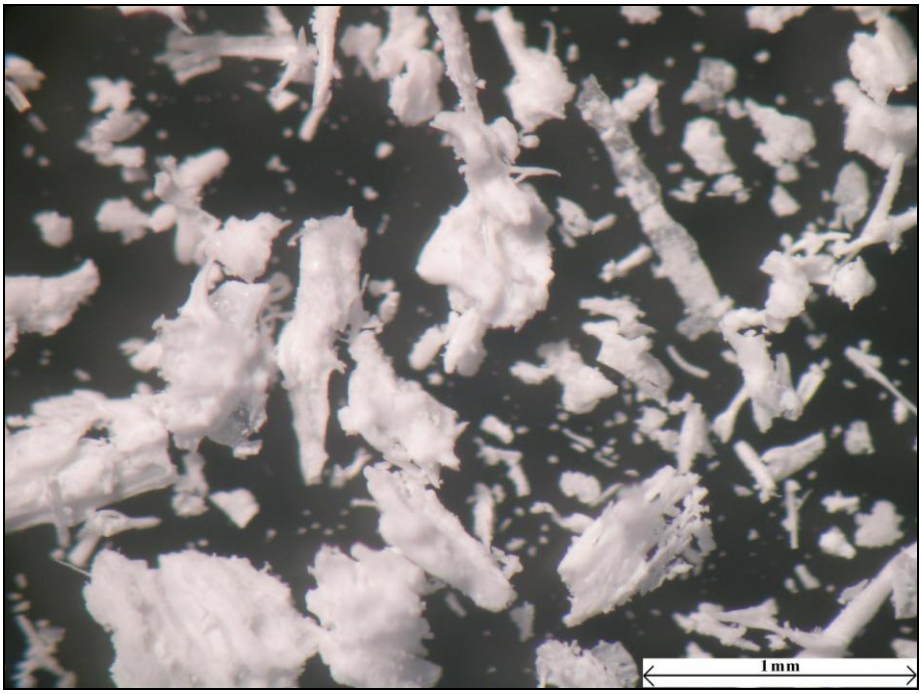

Figura 6.18: Fotografia óptica do copolímero 1.

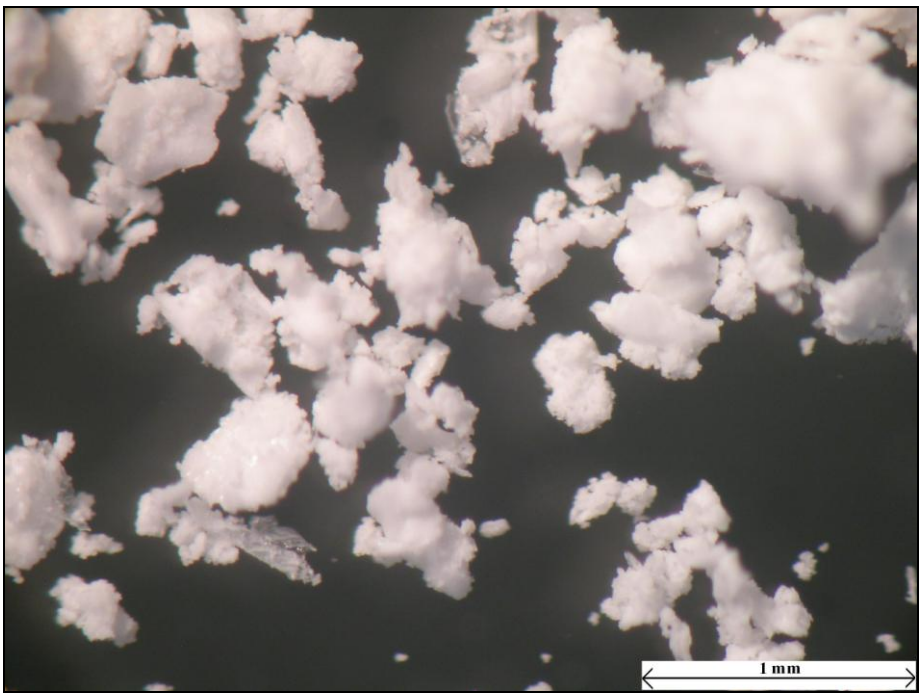

Figura 6.19: Fotografia óptica do copolímero 2.

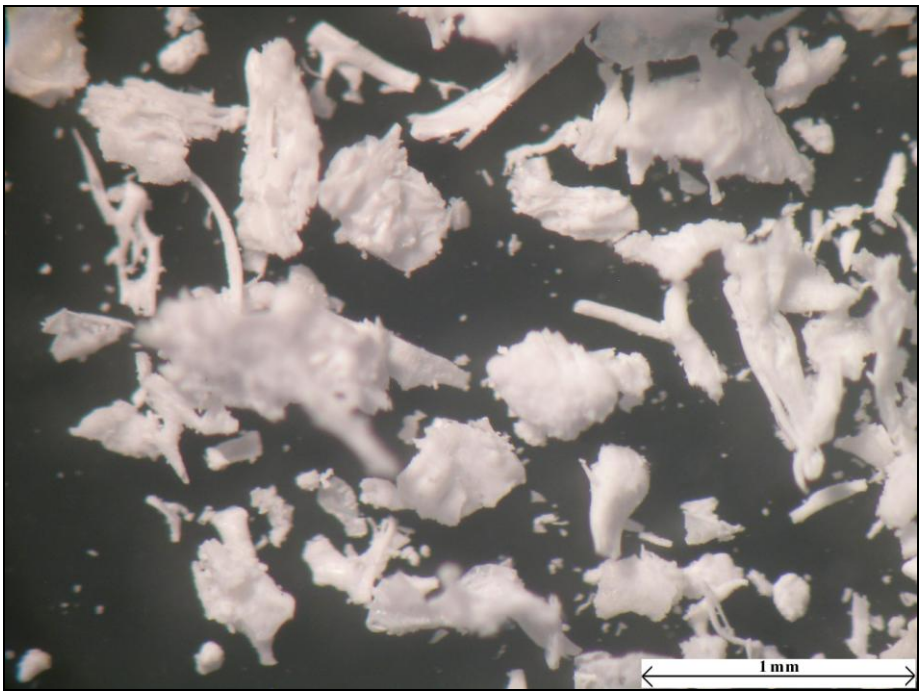

Figura 6.20: Fotografia óptica do copolímero 3.

A estrutura física dos copolímeros indica o tipo de polimerização empregado: o de polimerização por massa. O aspecto quebradiço é devido provavelmente às etapas sucessivas de dissolução em clorofórmio e precipitação em hexano em que os copolímeros foram submetidos no processo de purificação. Ratificando, assim, as observações citadas na microscopia eletrônica de varredura.

Observa-se maior semelhança física entre os copolímeros 1 e 3, enquanto o copolímero 2 apresenta uma forma mais aglomerada, reforçando a influência dos blocos PLLA no aspecto físico do copolímero final.

6.2- Caracterização dos Microencapsulados

6.2.1- Análise de Tamanho de Partícula (método LALLS)

O tamanho do microencapsulado é uma característica importante por várias razões dentre elas por facilitar o acesso da droga a capilares e por reduzir o risco de trombose (HEALD *et al*., 2001; ZHOU *et al*., 2003; MI *et al*., 2003; LUO *et al*., 2006; NIU *et al*., 2009). As Figuras 6.21 a 6.27 mostram o perfil de distribuição do tamanho de partícula para cada microencapsulado desenvolvido.

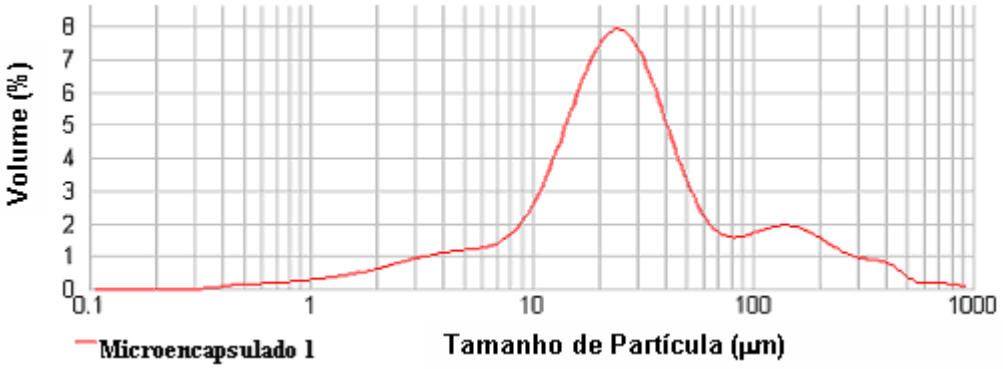

Figura 6.21: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 1.

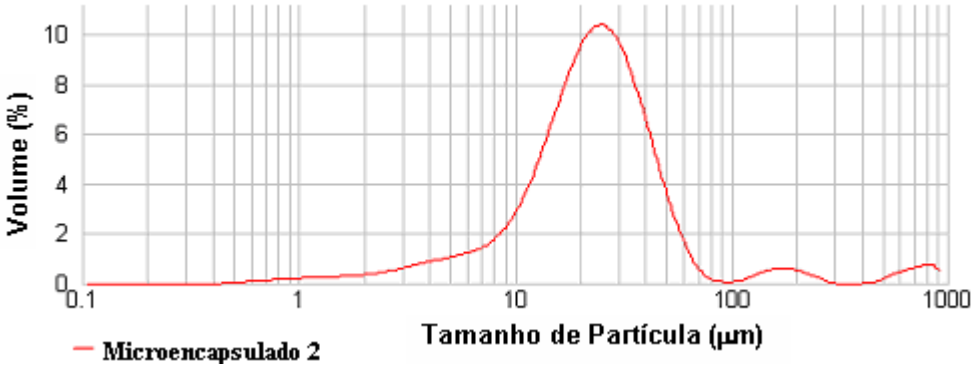

Figura 6.22: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 2.

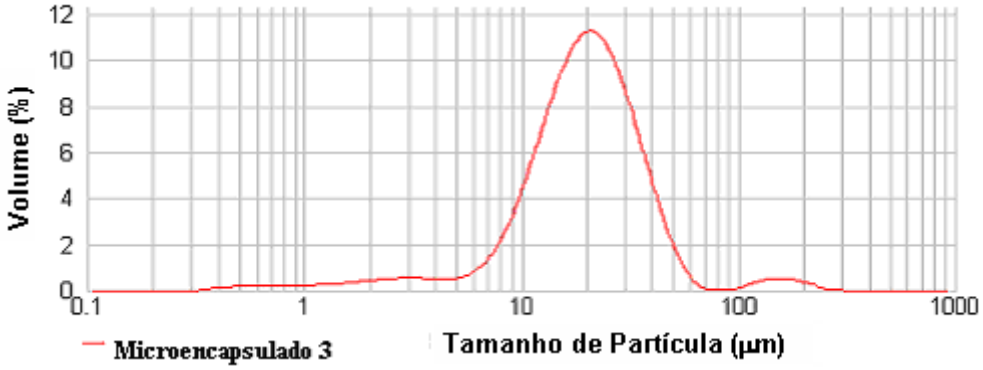

Figura 6.23: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 3.

Os microencapsulados 4, 5 e 6 (repetição dos microencapsulados 1, 2 e 3, respectivamente) apresentaram um perfil de distribuição mais uniforme, pois o percentual de volume para a faixa de dimensão entre 100 a 200 μm foi menor ao comparar com o perfil dos microencapsulados 1, 2 e 3, respectivamente. Fato este indica que os processos de purificação e separação diferenciaram o perfil de distribuição.

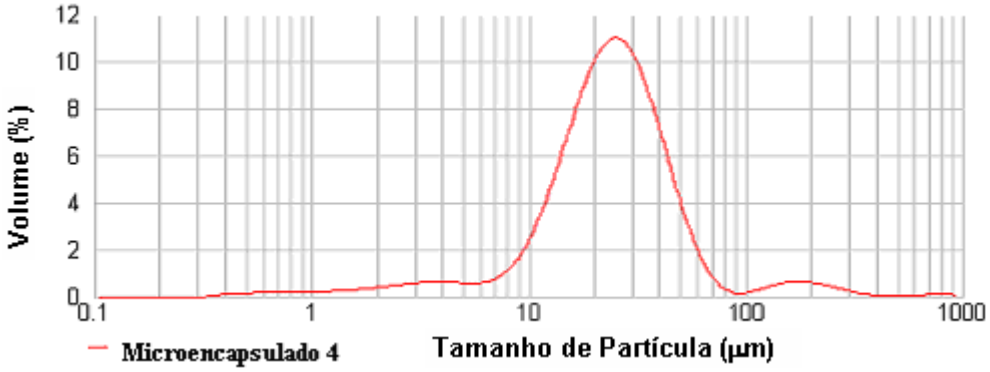

Figura 6.24: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 4.

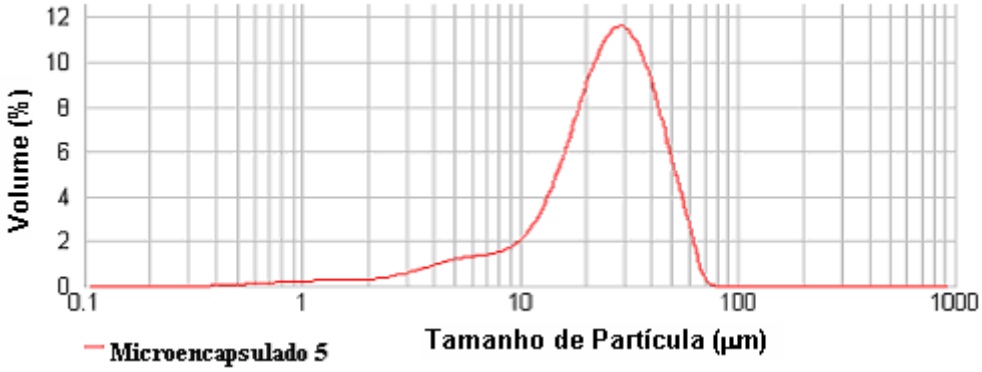

Figura 6.25: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 5.

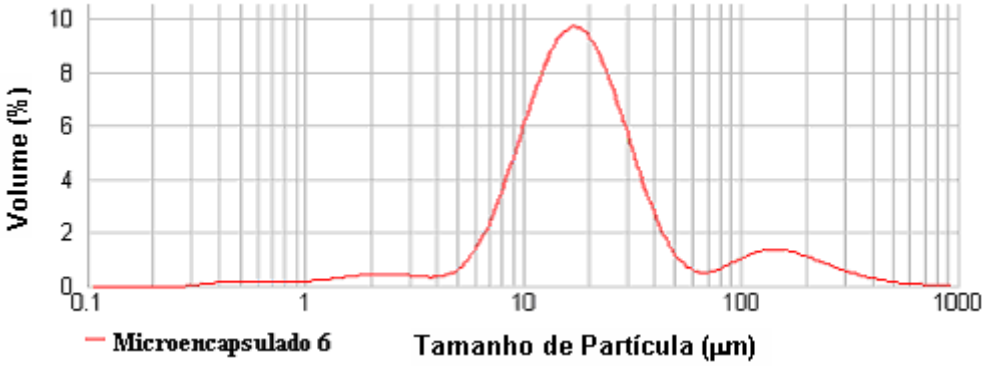

Figura 6.26: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 6.

O microencapsulado 7, Figura 6.27, apresentou um diâmetro maior que os demais microencapsulados (principalmente em relação aos microencapsulados 1 e 4, pois são do mesmo copolímero original) devido o mesmo possuir uma fase aquosa maior na formulação, observação esta também percebida nos estudos de Yang, Chung & Ng (2001).

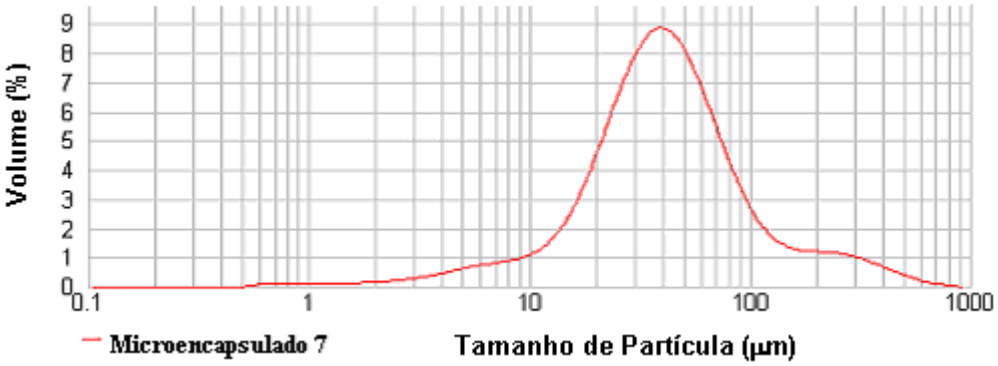

Figura 6.27: Perfil de distribuição do tamanho de partícula para o microencapsulado 7.

O perfil de distribuição dos microencapsulados foi localizado na faixa de 10-60µm (NA *et al*., 2006) e apresentou um percentual maior concentrado na faixa menor que 40µm (PARK & KIM, 2004), exceto para o microencapsulado 7 que apresentou um percentual maior concentrado na faixa de 30-50µm (BEZEMER *et al*., 2000; TOMME *et al*., 2008). Os valores obtidos dos tamanhos médios (ordem de µm) para os microencapsulados desenvolvidos foram similares aos observados por Liu e colaboradores (2000), Choi e colaboradores (2002) e Capan e colaboradores (2003).

A Tabela 6.1 apresenta o diâmetro médio (e o desvio padrão) e volume (%) calculado pelos gráficos do perfil de distribuição de tamanho de partícula de cada um dos microencapsulados (Figuras 6.21 a 6.27).

Tabela 6.1: Valores de diâmetro médio e desvio padrão dos microencapsulados.(*)

Microencapsulados	Diâmetro médio ± Desvio padrão (µm)	Volume (%)
1	25,6 ± 1,2	8,0
2	23,3 ± 1,1	10,2
3	19,8 ± 1,0	11,0
4	24,2 ± 1,1	11,0
5	25,5 ± 0,9	11,5
6	18,2 ± 1,0	9,5
7	40,5 ± 1,2	9,0

(*) Os valores foram calculados pelo método de análise multimodal do software *Mastersizer 2000*.

6.2.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

As Figuras 6.28 e 6.29 apresentam as micrografias do microencapsulado 1 derivado do copolímero 1 (formulação de razão molar LA/EO/Sn(Oct)$_2$ de 2/1/1) com ampliação de 500 e 1500 vezes, respectivamente. As Figuras 6.30 e 6.31 apresentam as micrografias do microencapsulado 4 (também derivado do copolímero 1) com ampliação de 500 e 1500 vezes, respectivamente.

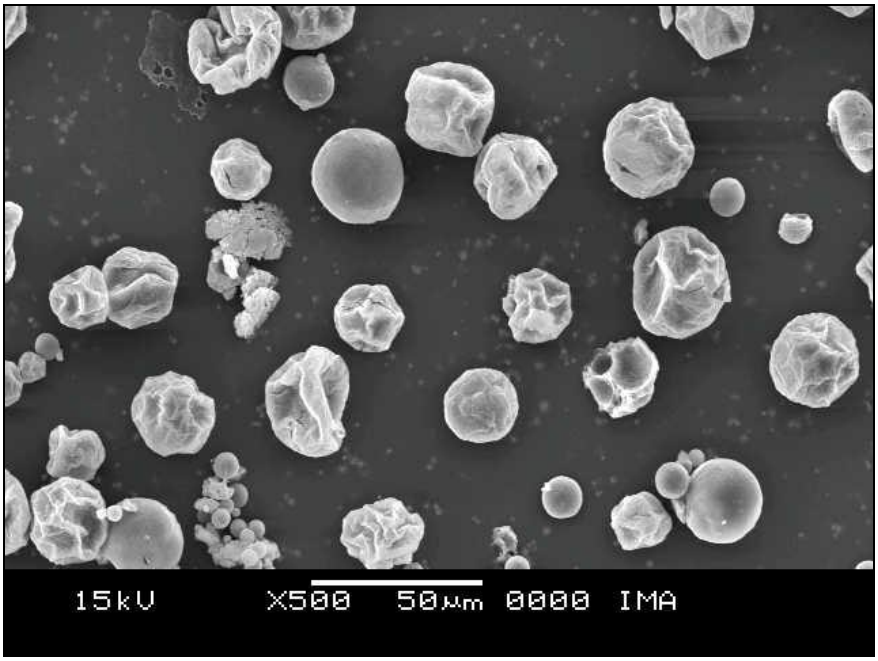

Figura 6.28: Micrografia do microencapsulado 1 (ampliação de 500 vezes).

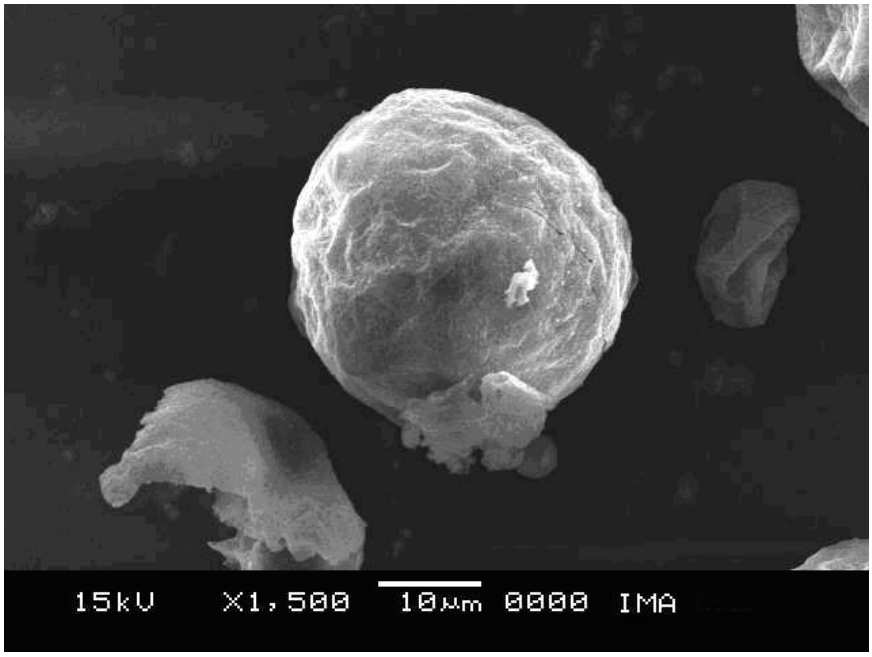

Figura 6.29: Micrografia do microencapsulado 1 (ampliação de 1500 vezes).

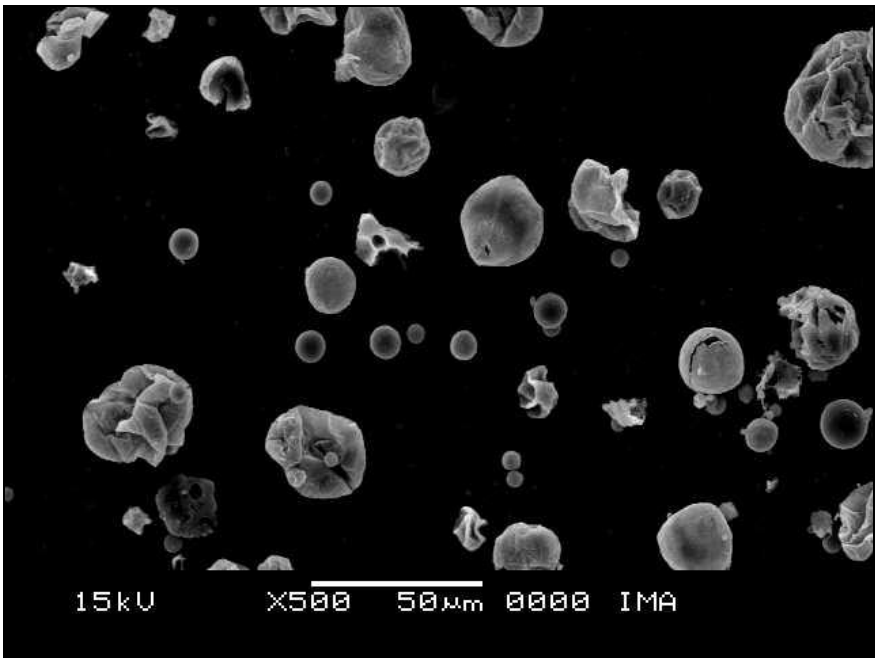

Figura 6.30: Micrografia do microencapsulado 4 (ampliação de 500 vezes).

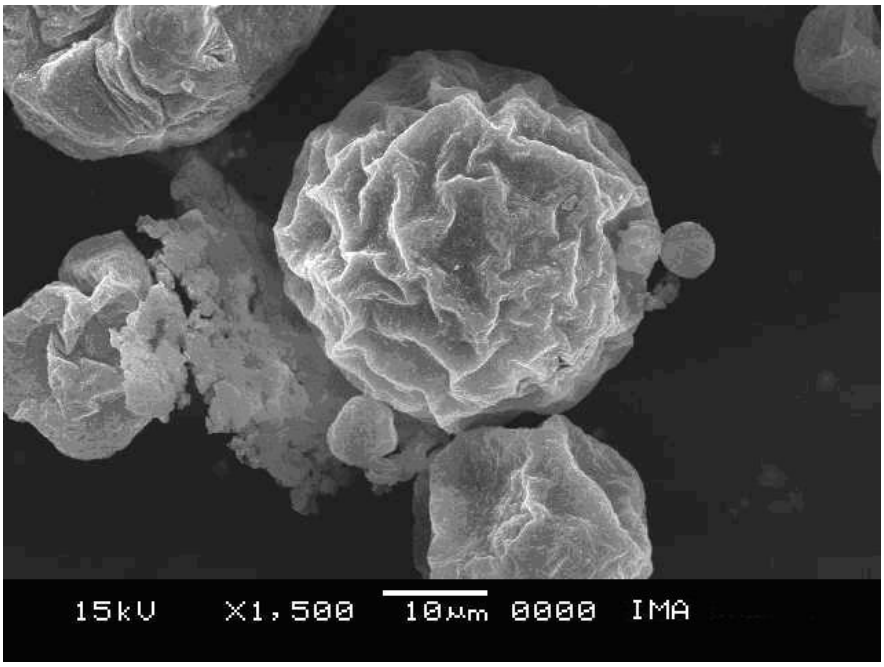

Figura 6.31: Micrografia do microencapsulado 4 (ampliação de 1500 vezes).

Os microencapsulados 1 e 4 apresentaram tamanhos variados de esferas lisas e rugosas, podendo ser atribuído à presença dos domínios hidrofóbicos (PLLA) e hidrofílicos (PEG) e sua disposição em relação aos processos de secagem. Tais observações também foram obtidas por pesquisadores em diferentes sistemas copoliméricos e fármacos encapsulados ou não, como: Jeon e colaboradores, 2000 (PLGA/Norfloxacin); Vila e colaboradores, 2005 (PLA/PEG/proteína TT); Blanco e colaboradores, 2006 (PLGA); Lee &

Yoo, 2007 (PCL/Pluronic); Berchane e colaboradores, 2007 (PLG) e Mao e colaboradores, 2007 (PLGA/ dextrana FD40).

A Figura 6.32 mostra a morfologia do microencapsulado 7 e foi observado estrutura mais regular, diâmetros maiores (corroborando com os valores apresentados na Tabela 6.1 da seção 6.2.1) e superfície menos rugosa que os anteriores formulados em fase aquosa menor (JEYANTHI *et al*., 1997; McGEE *et al*., 1997; YANG, CHUNG & NG,2001).

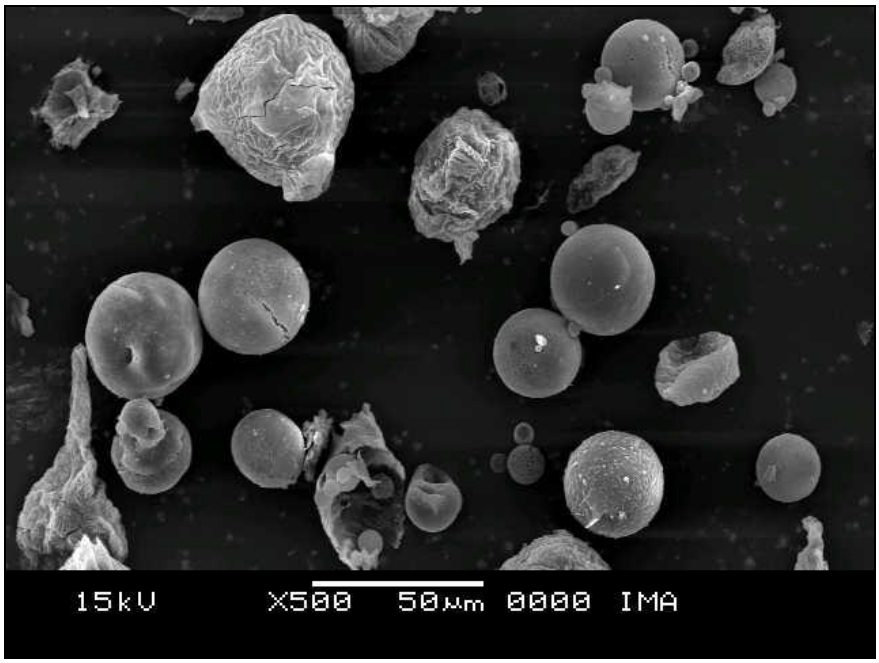

Figura 6.32: Micrografia do microencapsulado 7 (ampliação 500 vezes).

As Figuras 6.33 e 6.34 mostram as micrografias do microencapsulado 2 com ampliação de 500 e 1500 vezes. As Figuras 6.35 e 6.36 apresentam as micrografias do microencapsulado 5 com ampliação de 500 e 1500 vezes. Ambos microencapsulados derivados do copolímero 2, formulação de razão molar LA/EO/Sn$(Oct)_2$ de 1/1/0,05.

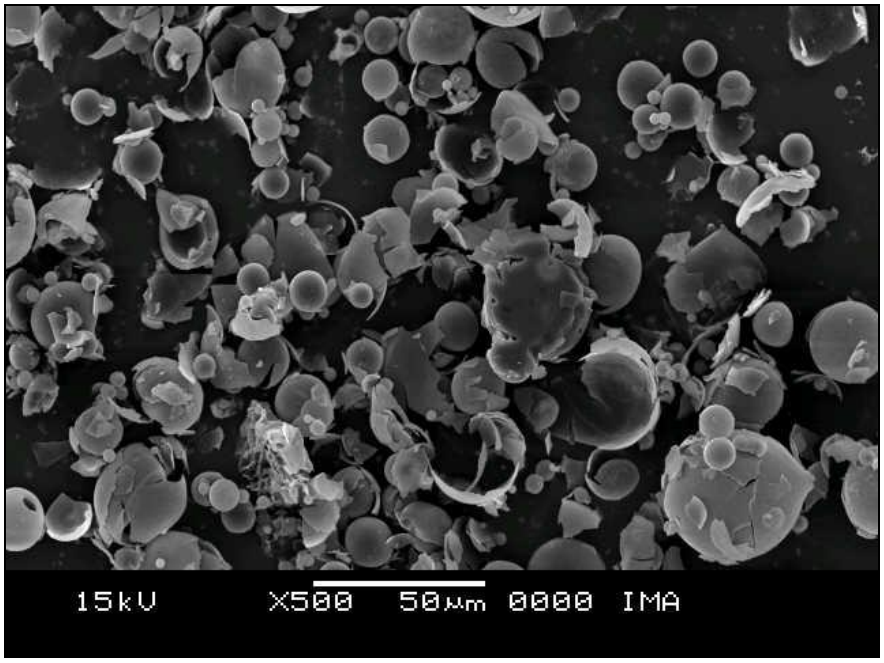

Figura 6.33: Micrografia do microencapsulado 2 (ampliação de 500 vezes).

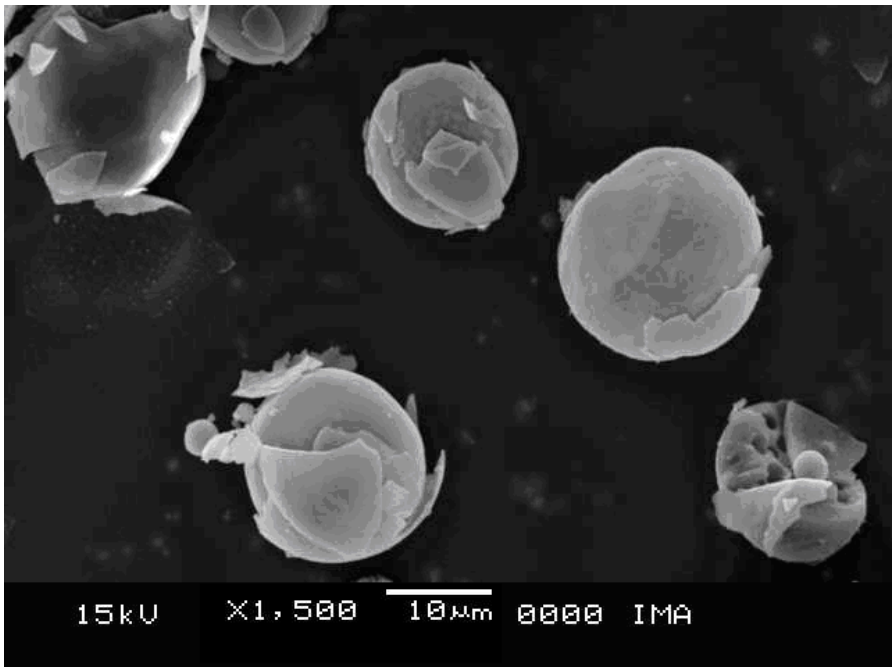

Figura 6.34: Micrografia do microencapsulado 2 (ampliação de 1500 vezes).

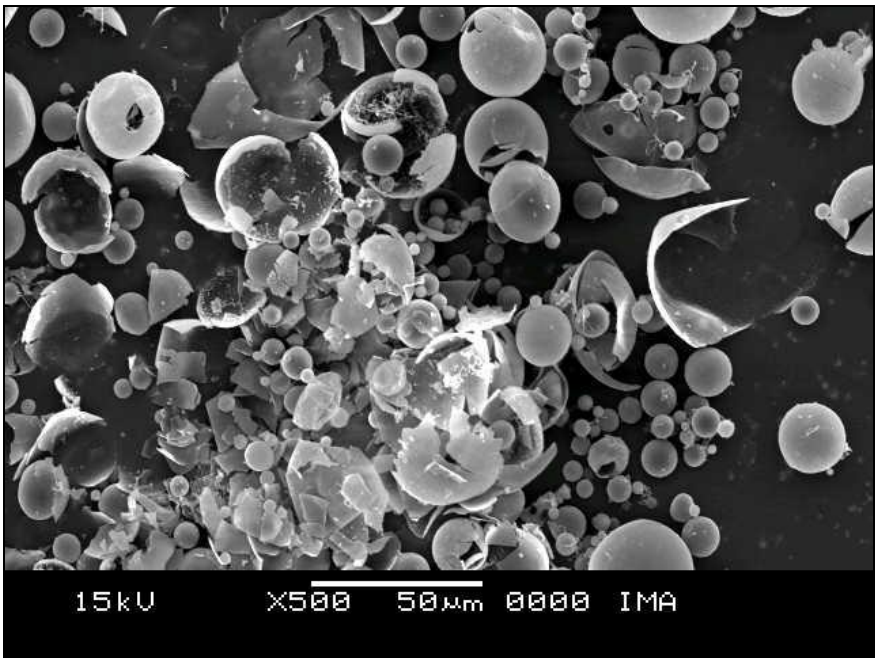

Figura 6.35: Micrografia do microencapsulado 5 (ampliação de 500 vezes).

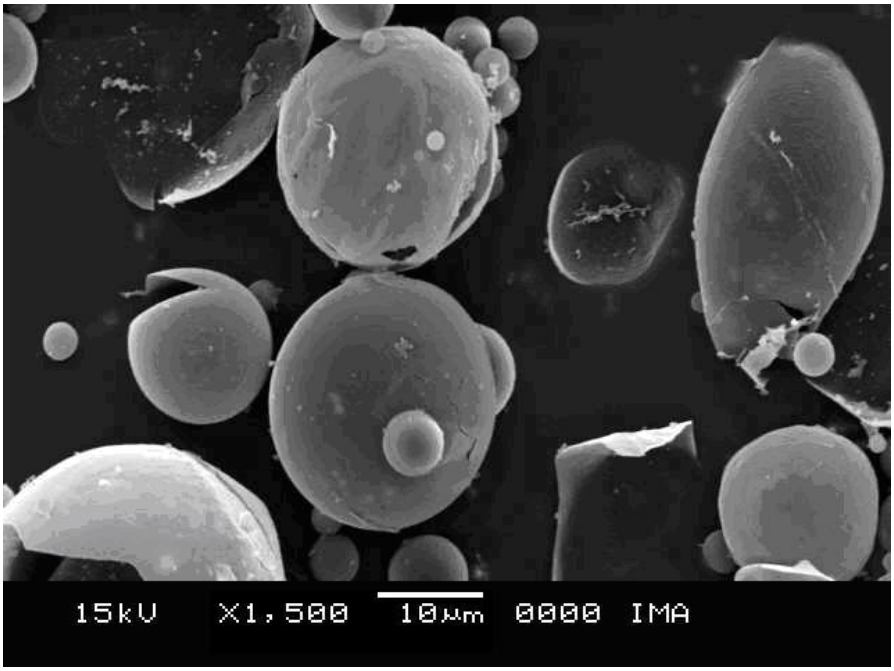

Figura 6.36: Micrografia do microencapsulado 5 (ampliação de 1500 vezes).

As micrografias dos microencapsulados 2 e 5 mostram que há colapso da estrutura do hidrogel com interior oco e estrutura superficial porosa (similares observações estudadas em microesferas de PLGA por PUAPERMPOONSIRI, SPENCER & WALLACE, 2009), podendo ser atribuída à relação molar igual para os segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos de PLLA e PEG, respectivamente.

As Figuras 6.37 e 6.38 apresentam as micrografias do microencapsulado 3 com ampliação de 500 e 1500 vezes, respectivamente. As Figuras 6.39 e 6.40 mostram as micrografias do microencapsulado 6 com ampliação de 500 e 1500 vezes, respectivamente. Ambos microencapsulados são derivados do copolímero 3, formulação de razão molar LA/EO/Sn(Oct)$_2$ de 2/1/0,05).

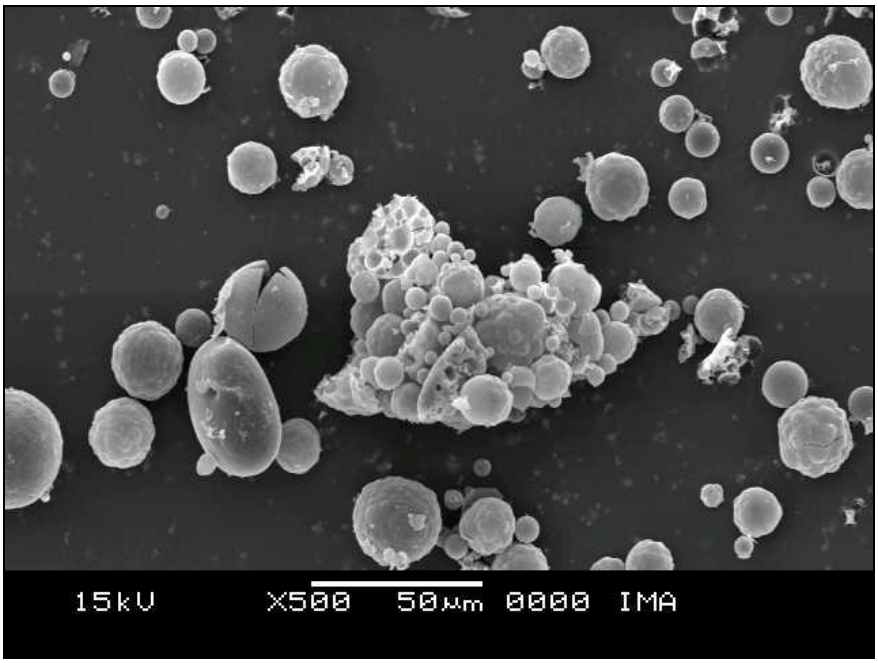

Figura 6.37: Micrografia do microencapsulado 3 (ampliação de 500 vezes).

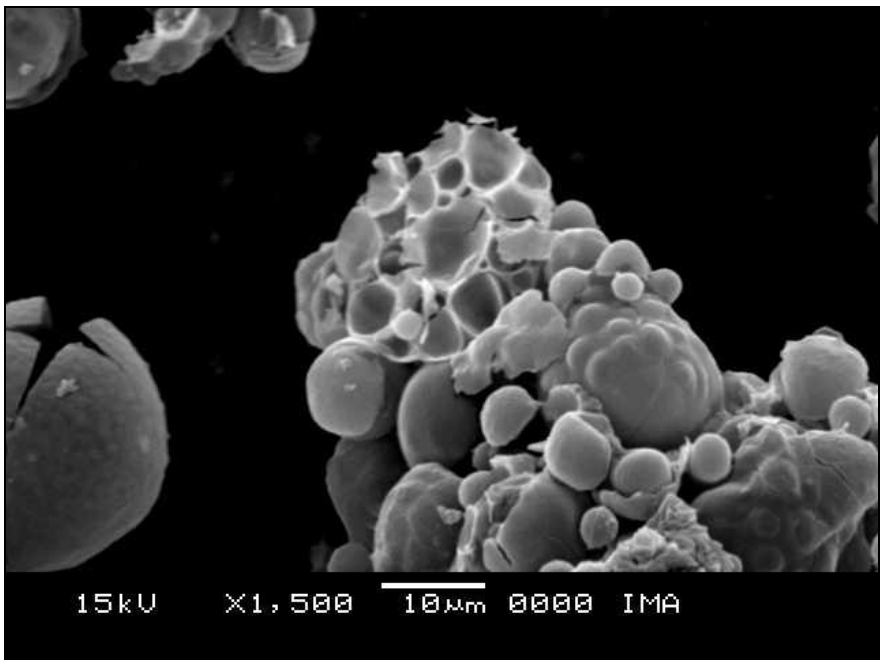

Figura 6.38: Micrografia do microencapsulado 3 (ampliação de 1500 vezes).

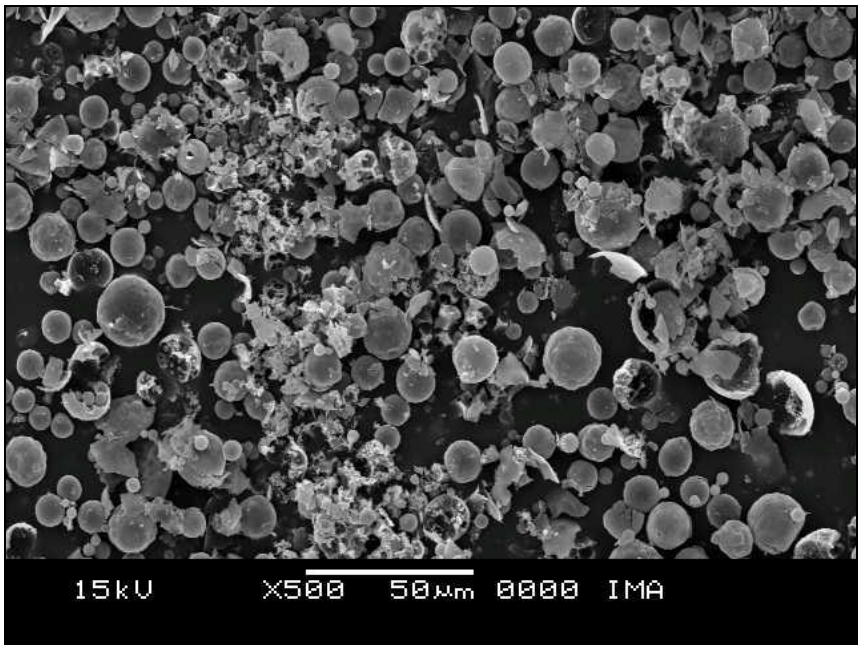

Figura 6.39: Micrografia do microencapsulado 6 (ampliação de 500 vezes).

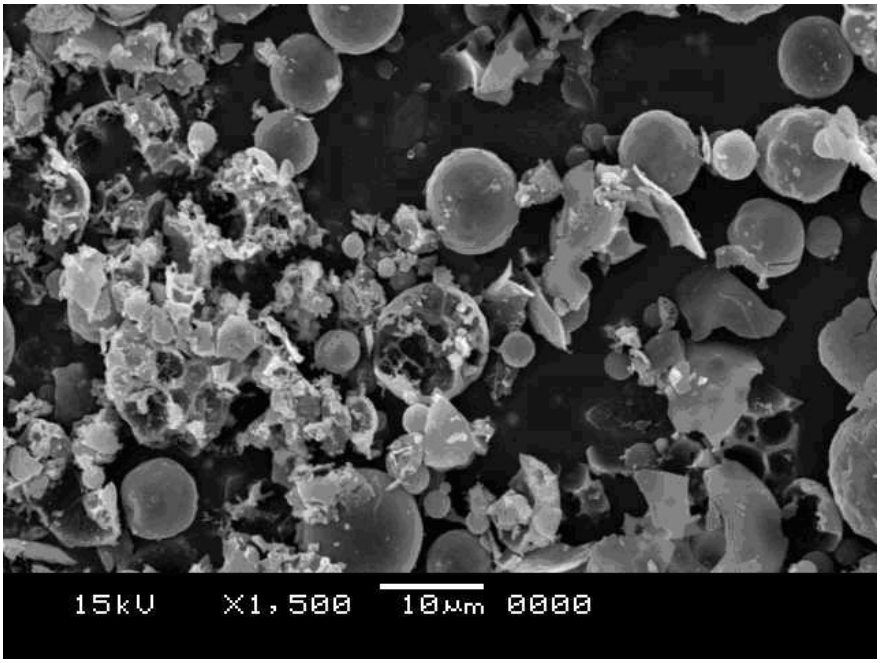

Figura 6.40: Micrografia do microencapsulado 6 (ampliação de 1500 vezes).

As Figuras 6.39 e 6.40 apresentaram uma morfologia de formato esférico e com superfície mais lisa, porém com a formação de agregados, similares observações também foram citados nos estudos com microesferas de PLA/PEG/eritromicina (PARK & KIM, 2004), de PLA/heparina (YILDIZ *et al*., 2005) e PLGA/psoralen (GOMES *et al*., 2008).

Em relação às micrografias apresentadas, notou-se que as variações de morfologia dos microencapsulados estavam intimamente relacionadas às variações de razão molar de seus copolímeros originais.

Experimentalmente, durante a análise no microscópio eletrônico, algumas amostras apresentaram colapso. Por isso, todos os microencapsulados foram submetidos à análise no microscópio óptico a fim de verificar se a voltagem utilizada no microscópio eletrônico, por exemplo, foi alta (usada foi de 15 kV) para propiciar a ruptura dos microencapsulados.

6.2.3- Microscopia Óptica (OM)

A Figura 6.41 mostra a fotografia óptica da tetraciclina, o material apresenta coloração amarelada e na forma de agregados.

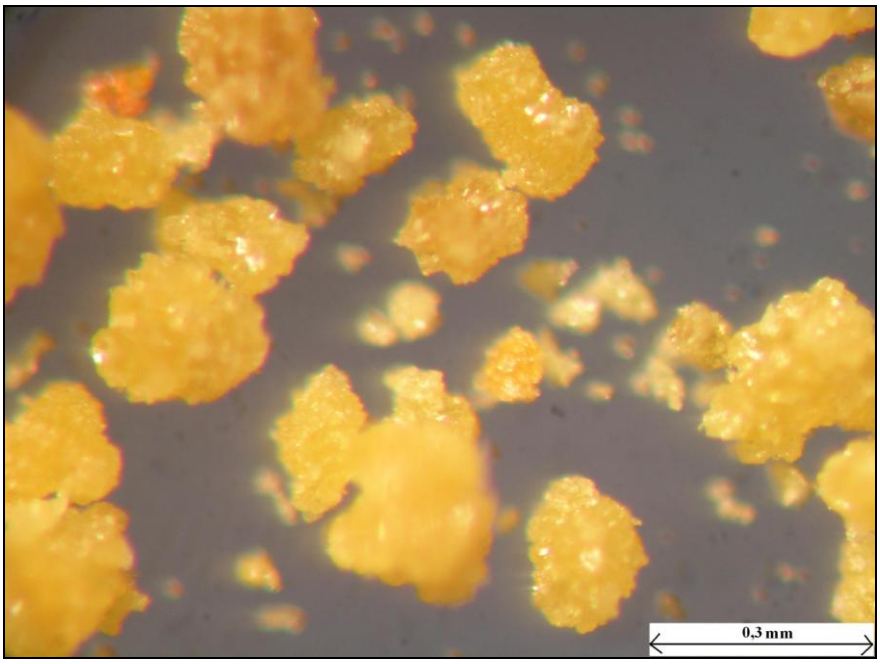

Figura 6.41: Fotografia óptica da tetraciclina.

As Figuras 6.42 a 6.44 apresentam as fotografias ópticas dos microencapsulados 1, 4 e 7 desenvolvidos a partir do copolímero 1. Não se observa a presença de colapso (ruptura) dos microencapsulados e o último desenvolvido apresenta formas esferoidais maiores, corroborando com os dados apresentados na tabela 6.1, em que maior fase aquosa na formulação das microesferas, maior tornam-se os diâmetros das mesmas.

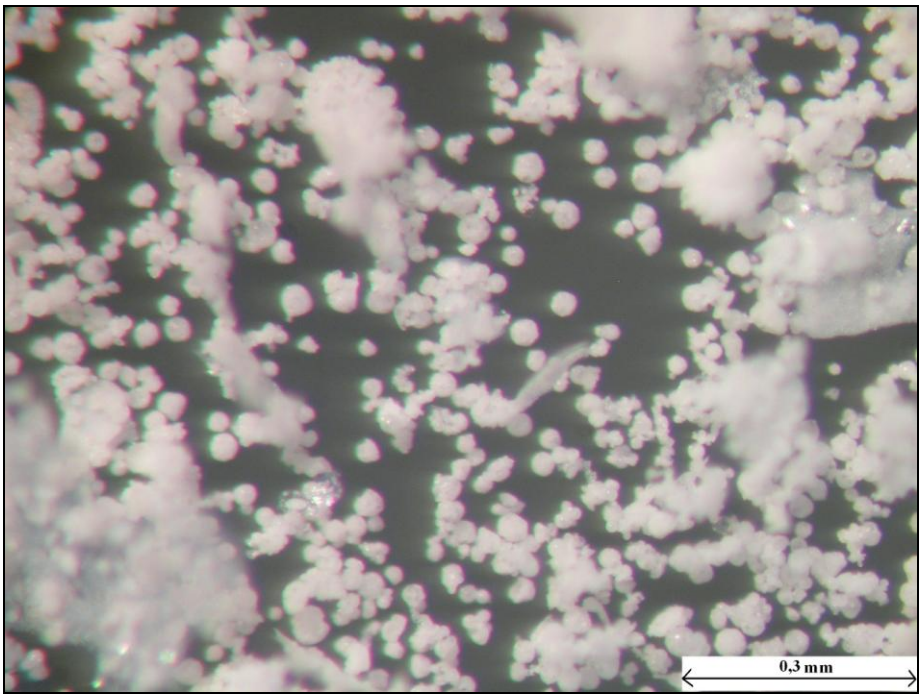

Figura 6.42: Fotografia óptica do microencapsulado 1.

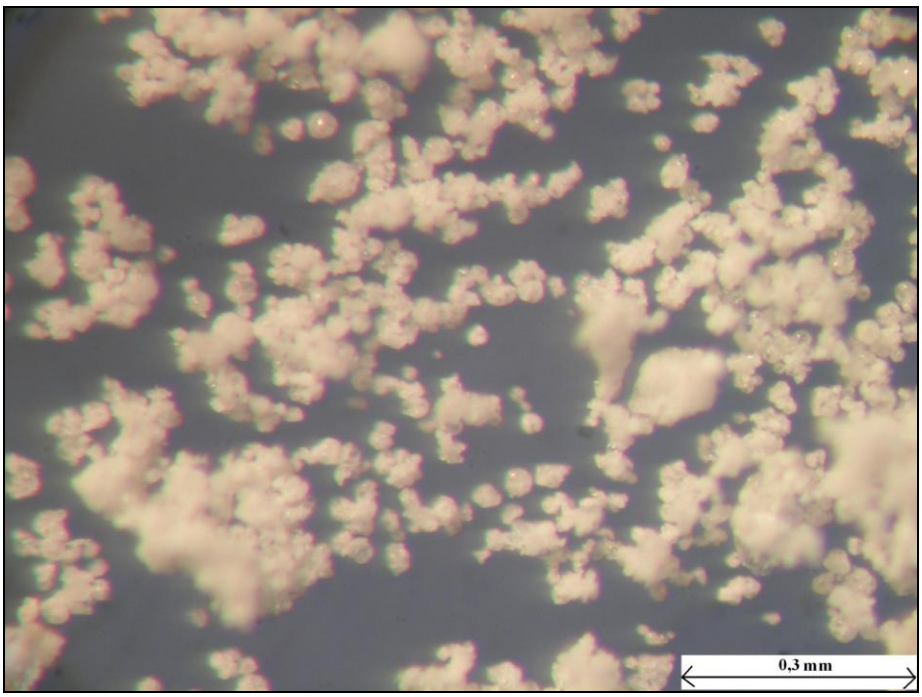

Figura 6.43: Fotografia óptica do microencapsulado 4.

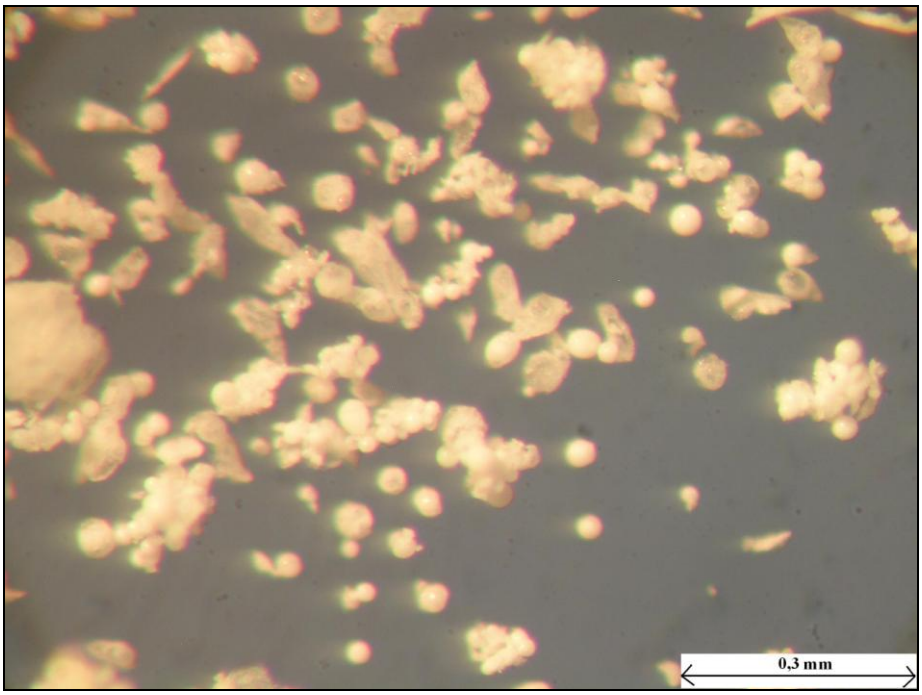

Figura 6.44: Fotografia óptica do microencapsulado 7.

Nas fotografias ópticas apresentadas geralmente existem duas formas de microesferas em relação a disposição/localização do encapsulado, ora está concentrado na cada interna do copolímero, ora concentrado na camada externa do mesmo, (obtendo esferas de aspecto ora com superfície transparente ora superfície maciça).

Tal característica também foi observado por Mallardé e colaboradores (2003) ao estudar fotografias ópticas de microesferas compostas de PLGA/PEG e a droga tevelerix (2003) e por Matsumoto e colaboradores (2005) ao estudar microfotografias ópticas de microesferas compostas de PLA/PLGA e a droga cisplatina encapsulada no referido copolímero.

As Figuras 6.45 e 6.46 apresentam as fotografias ópticas dos microencapsulados 2 e 5 desenvolvidos a partir do copolímero 2. Também não aparece o fenômeno de colapso dos microencapsulados, indicando que a voltagem utilizada no microscópio eletrônico (15 kV) foi alta para a análise morfológica dos microencapsulados preparados a partir de l,l-lactídeo e glicol etilênico.

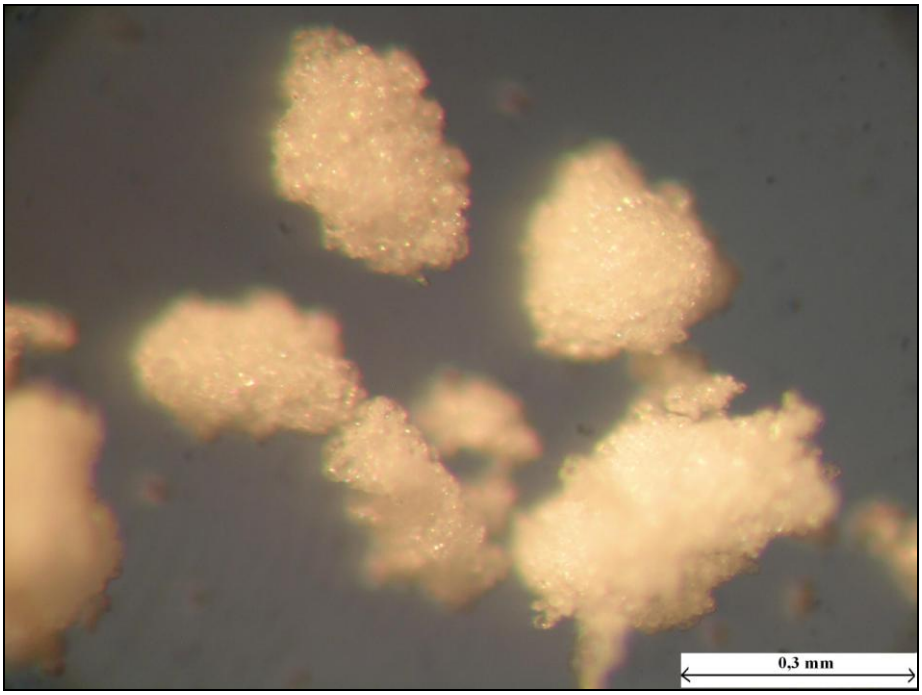

Figura 6.45: Fotografia óptica do microencapsulado 2.

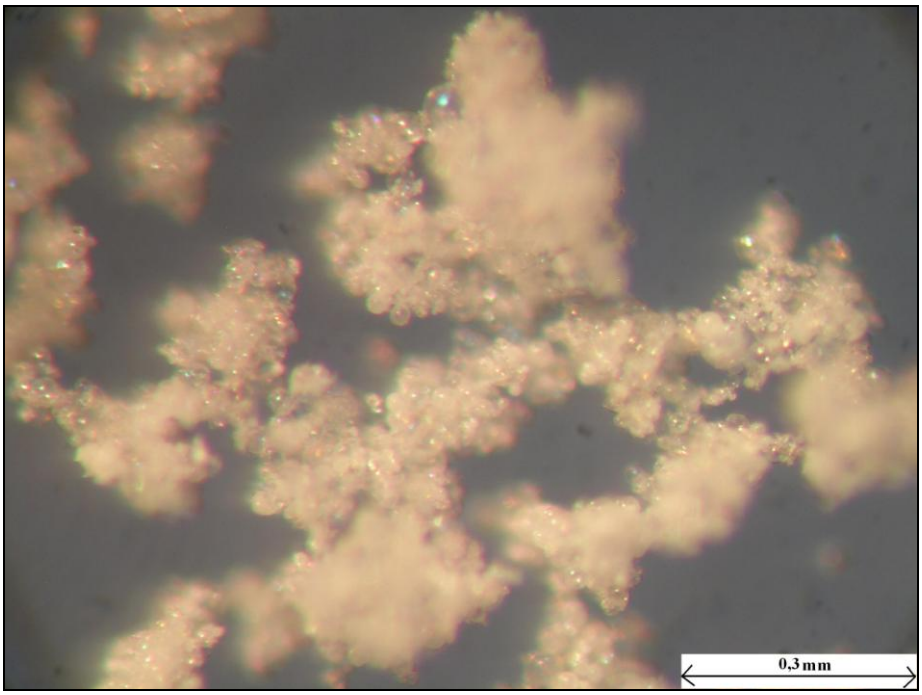

Figura 6.46: Fotografia óptica do microencapsulado 5.

As Figuras 6.47 e 6.48 apresentam as fotografias ópticas dos microencapsulados 3 e 6 desenvolvidos a partir do copolímero 3. Nota-se a não presença de estrutura quebradiça (colapso dos microencapsulados) e que a microesfera 6 apresentou tamanhos menores.

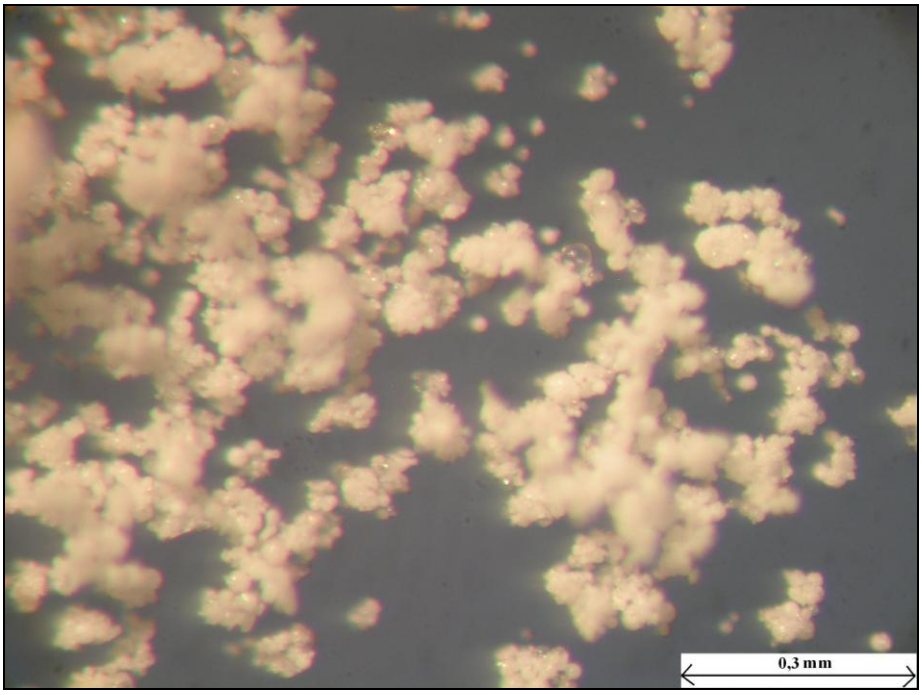

Figura 6.47: Fotografia óptica do microencapsulado 3.

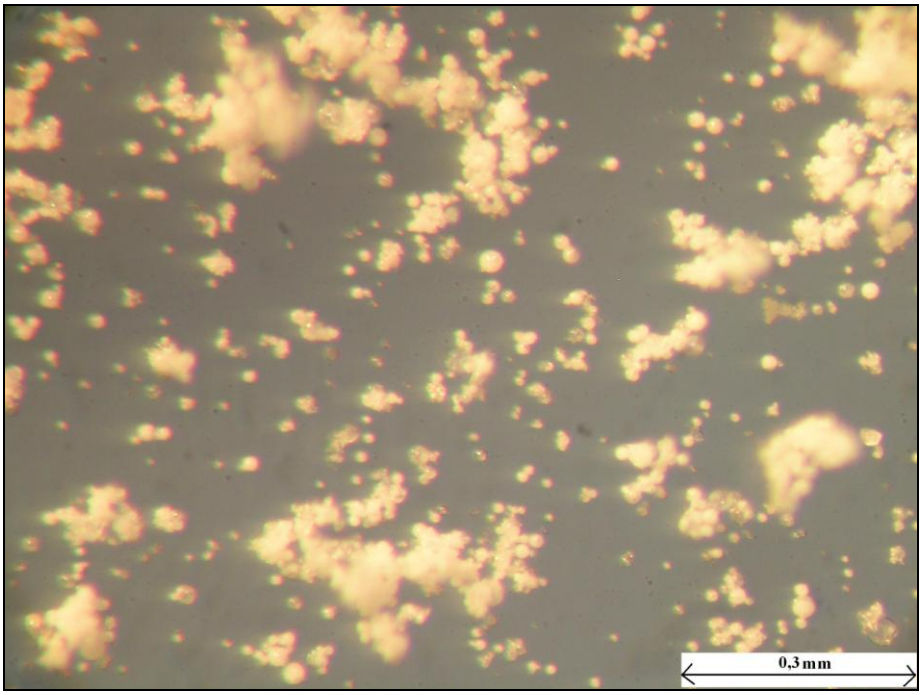

Figura 6.48: Fotografia óptica do microencapsulado 6.

6.2.4- Análise Térmica

6.2.4.1- Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

A Figura 6.49 apresenta as curvas de TG/DTG e DTA da tetraciclina. A curva de TG apresentou dois estágios de decomposição significativos: o primeiro com T_i = 200 ºC e T_f = 225 ºC com perda de massa de 25% e o segundo com T_i = 250 ºC e T_f = 500 ºC, perda de massa de 30% e o resíduo final de 45%. A curva DTG mostra que três estágios de decomposição com velocidade máxima de decomposição na temperatura de 225 ºC. Compostos orgânicos nitrogenados policíclicos submetem-se frequentemente à decomposição com formação de carvão orgânico sob atmosfera inerte a alta temperatura (SHARMA *et al.*, 2003). A curva de DTA revelou evento de decomposição entre 200 ºC a 240 ºC, que é superposta por evento exotérmico devido à desidratação e à decomposição, como relatado em outra parte pelos pesquisadores Moreno-Cerezo e colaboradores (2001).

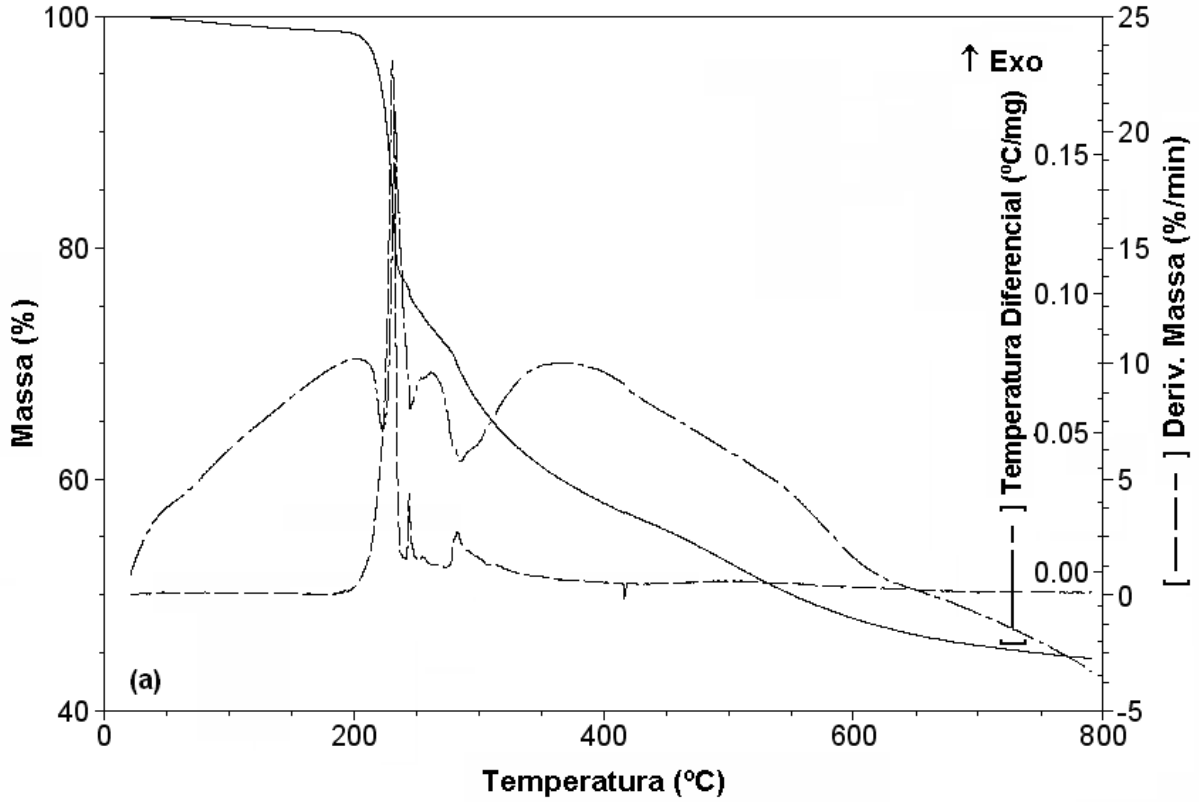

Figura 6.49: Curvas de TG/DTG e DTA da tetraciclina.

As Figuras 6.50 e 6.51 apresentam as curvas de TG e DTA da tetraciclina em outro analisador termogravimétrico da marca *Mettler-Toledo*, modelo 851*E*.

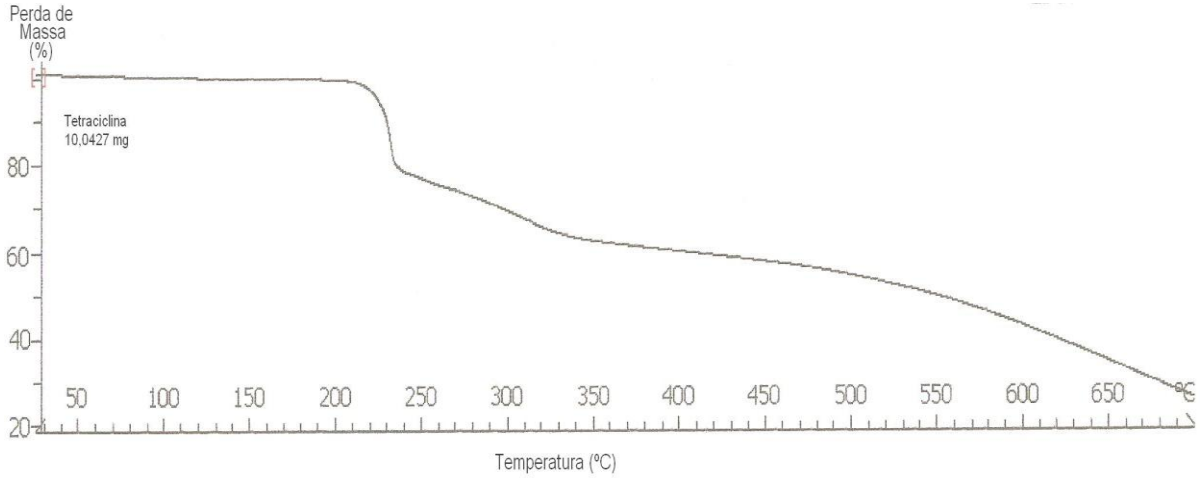

Figura 6.50: Curva de TG da tetraciclina.

A curva de TG, Figura 6.50, apresentou três estágios de decomposição significativos: o primeiro com T_i = 205 ºC e T_f = 235 ºC com perda de massa de 20%, o segundo com T_i = 240 ºC e T_f = 340 ºC, perda de massa de 10% e o terceiro estagio de decomposição de T_i = 360 ºC e T_f = 700 ºC, perda de massa de 42%. O resíduo final da tetraciclina foi de aproximadamente de 27% em 700ºC, resíduo menor comparado com a Figura 6.49.

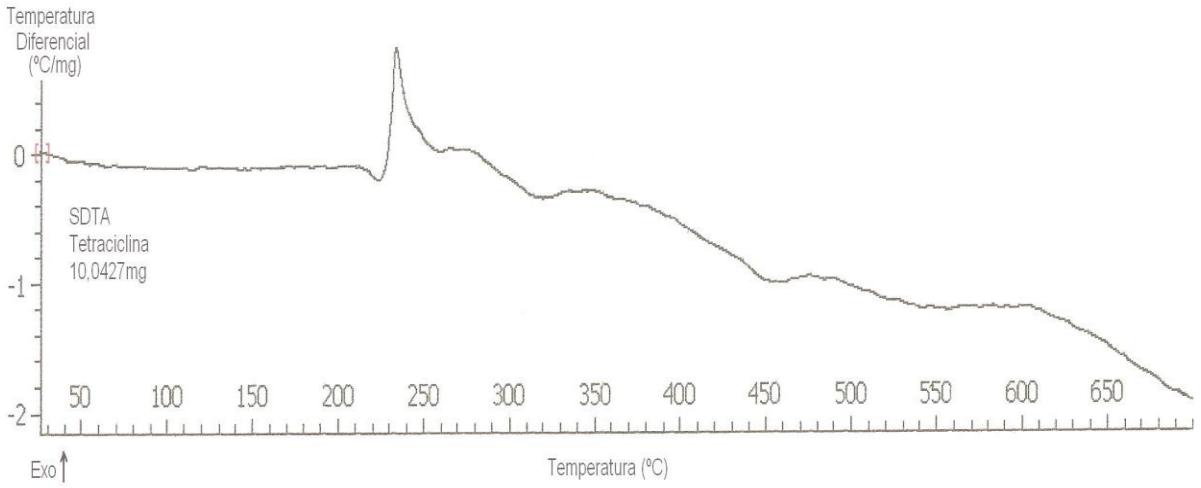

Figura 6.51: Curva de DTA da tetraciclina.

A curva de DTA, Figura 6.51, apresentou um único e expressivo evento exotérmico em 240ºC, possivelmente relacionado a evento de oxidação da tetraciclina após o início de sua decomposição em 205ºC. Posterior a 260ºC, observou-se a não uniformidade da curva de DTA ocasionado por sucessivos eventos de decomposição até a temperatura final de 700ºC.

As Figuras 6.52 a 6.58 apresentam as curvas de TG/DTG e DTA dos microencapsulados 1 a 7, respectivamente.

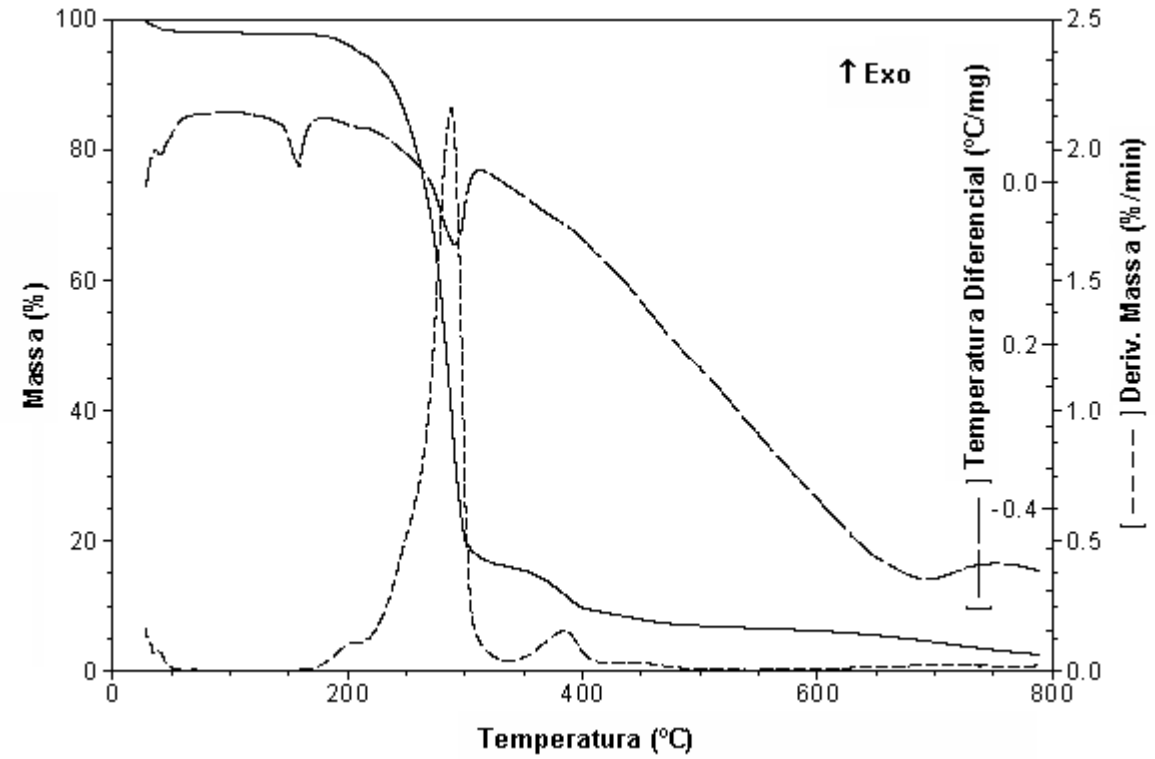

Figura 6.52: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 1.

Em relação à avaliação térmica do microencapsulado 1, Figura 6.52, sua curva TG apresentou dois estágios de decomposição, o primeiro a T_i = 190 ºC e T_f = 310 ºC com perda de massa de 83%. O segundo estágio iniciou a T_i = 320 ºC e T_f = 450 ºC com perda de massa de 13% e 4% de resíduo, aproximadamente em 800 ºC. A curva DTG confirmou os dois estágios de degradação com velocidade máxima de decomposição na temperatura de 295 ºC. A curva DTA mostrou dois eventos endotérmicos nas temperaturas de 155 ºC e 295 ºC, sugerindo como evento de fusão para a temperatura de 155 ºC (T_m) e evento de decomposição na temperatura de 295 ºC, confirmado nas curvas de TG e DTG.

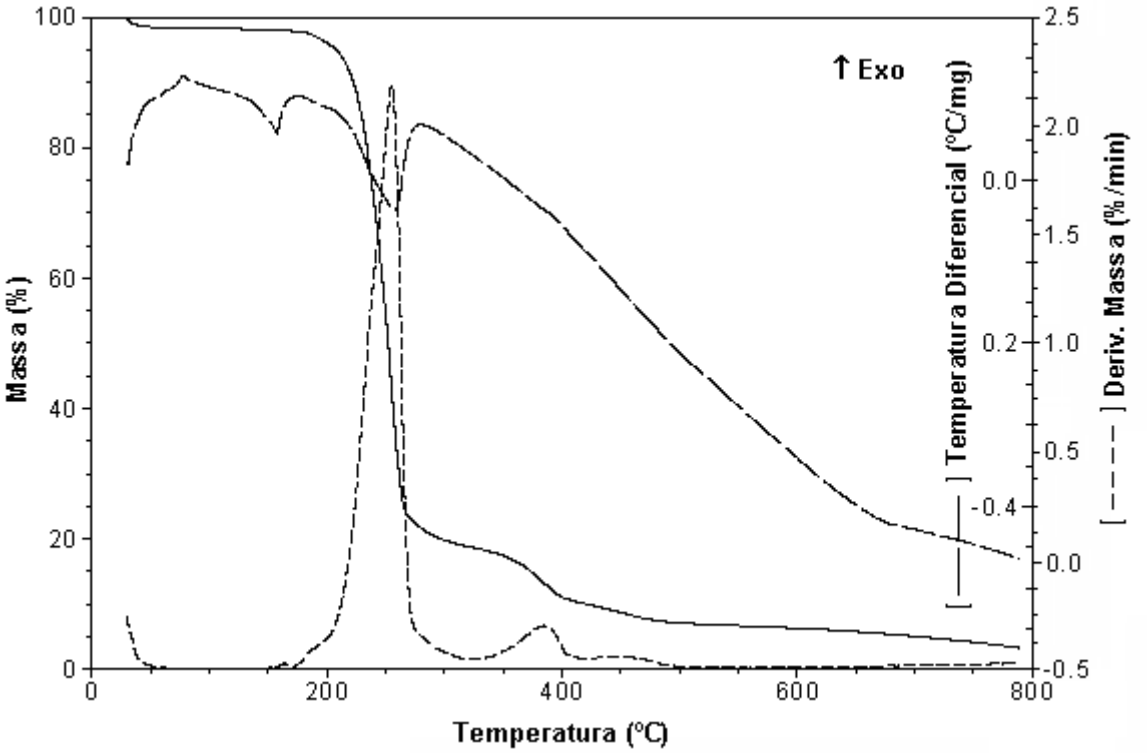

Figura 6.53: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 2.

Em relação à avaliação térmica do microencapsulado 2, Figura 6.53, sua curva TG apresentou dois estágios de decomposição, o primeiro a T_i = 180 ºC e T_f = 310 ºC com perda de massa de 80%. O segundo estágio iniciou a T_i = 325 ºC e T_f = 410 ºC com perda de massa de 10% e 5% de resíduo aproximadamente em 800ºC. A curva DTG confirmou os dois estágios de degradação com velocidade máxima de decomposição na temperatura de 255 ºC. A curva DTA mostrou dois eventos endotérmicos: o primeiro na temperatura de 160 ºC sugerindo evento de fusão (T_m) e o segundo evento na temperatura de 255 ºC supondo o evento de decomposição.

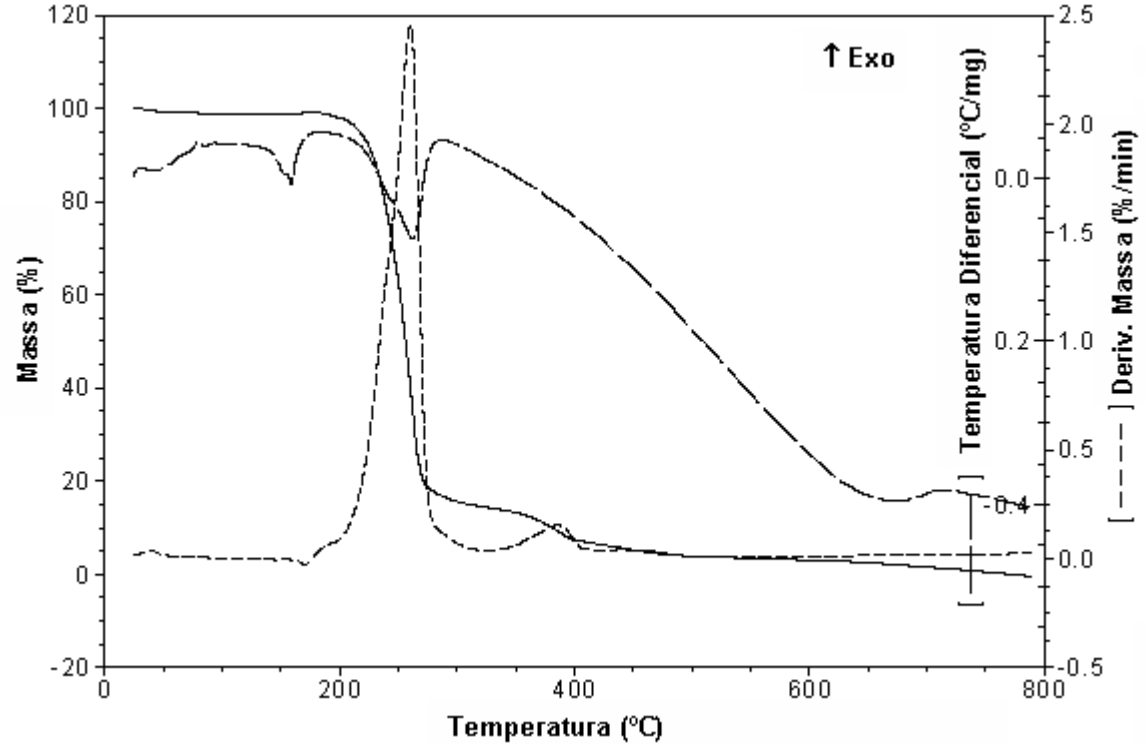

Figura 6.54: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 3.

Semelhantemente, a Figura 6.54 apresenta a avaliação térmica do microencapsulado 3. Sua curva de TG apresentou dois estágios de decomposição, o primeiro a T_i = 190 ºC e T_f = 300 ºC com perda de massa de 85%. O segundo estágio iniciou a T_i = 320ºC e T_f = 430ºC com perda de massa de 13% e 2% de resíduo em 800 ºC. A curva DTG confirmou os dois estágios de degradação com velocidade máxima de decomposição na temperatura de 260ºC. A curva DTA mostrou dois eventos endotérmicos nas temperaturas de 160ºC (sugerindo evento de fusão, T_m) e 260ºC (sugerindo o evento de decomposição confirmado nas curvas de TG e DTG).

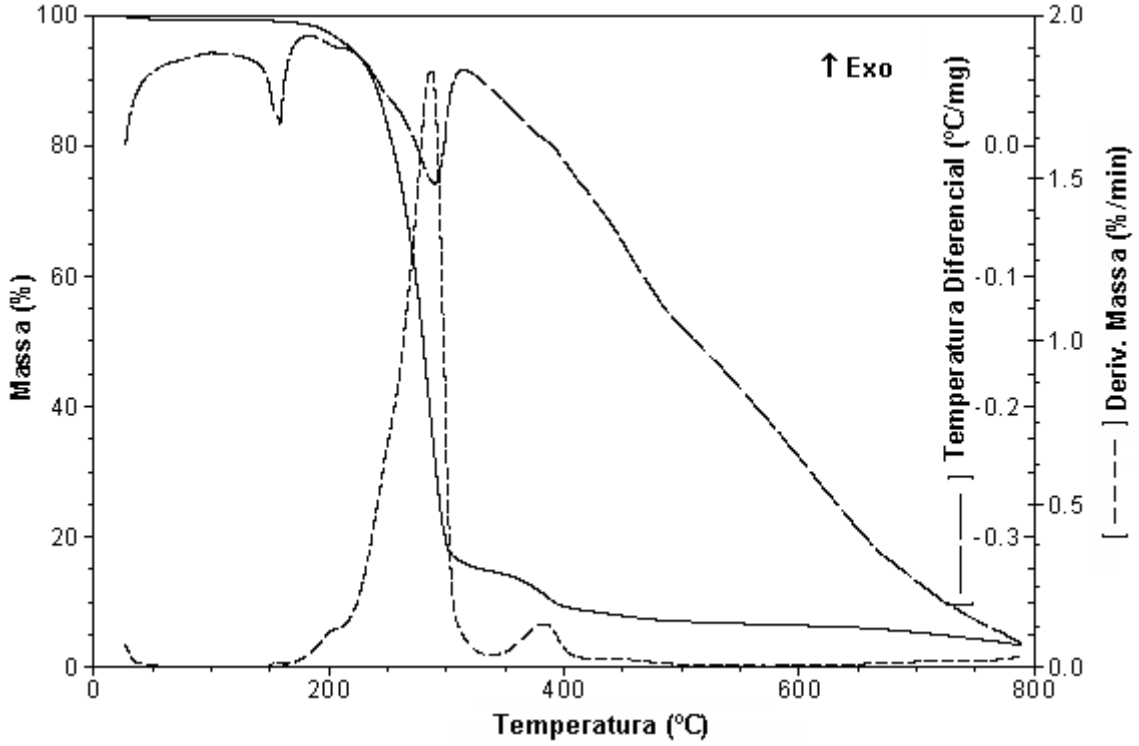

Figura 6.55: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 4.

Em relação à avaliação térmica do microencapsulado 4, Figura 6.55, sua curva TG apresentou dois estágios de decomposição, o primeiro a T_i = 180ºC e T_f = 320ºC com perda de massa de 82%. O segundo estágio iniciou a T_i = 350 ºC e T_f = 405 ºC com perda de massa de 10% e 4% de resíduo em 800 ºC. A curva DTG confirmou os dois estágios de degradação com velocidade máxima de decomposição na temperatura de 295 ºC. A curva DTA mostrou dois eventos endotérmicos nas temperaturas de 160ºC e 295ºC, sugerindo a classificação de evento de fusão e de decomposição, respectivamente.

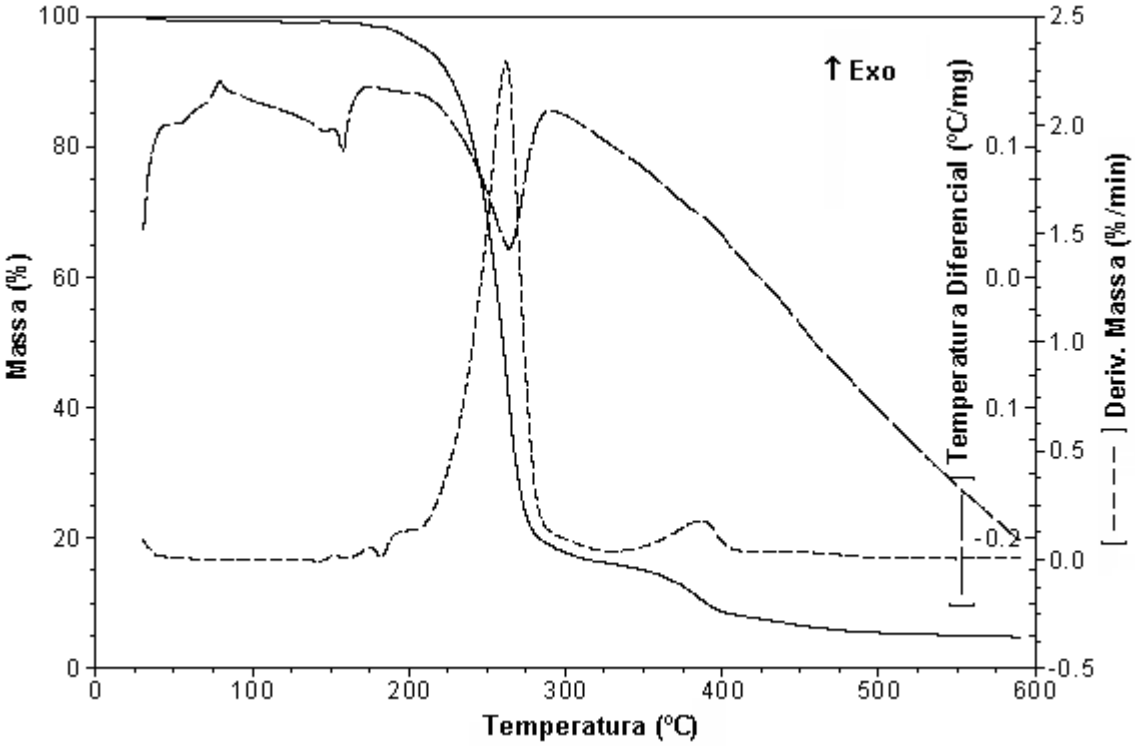

Figura 6.56: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 5.

Semelhantemente, a Figura 6.56 apresenta a avaliação térmica do microencapsulado 5. Sua curva de TG apresentou dois estágios de decomposição, o primeiro a T_i = 190 ºC e T_f = 300 ºC com perda de massa de 84%. O segundo estágio iniciou a T_i = 350 ºC e T_f = 425 ºC com perda de massa de 11% e 5% de resíduo em 600 ºC. A curva DTG confirmou os dois estágios de degradação com velocidade máxima de decomposição na temperatura de 265 ºC. A curva DTA mostrou eventos endotérmicos nas temperaturas de 150ºC e 265ºC, sugerindo serem eventos de fusão e de decomposição, respectivamente.

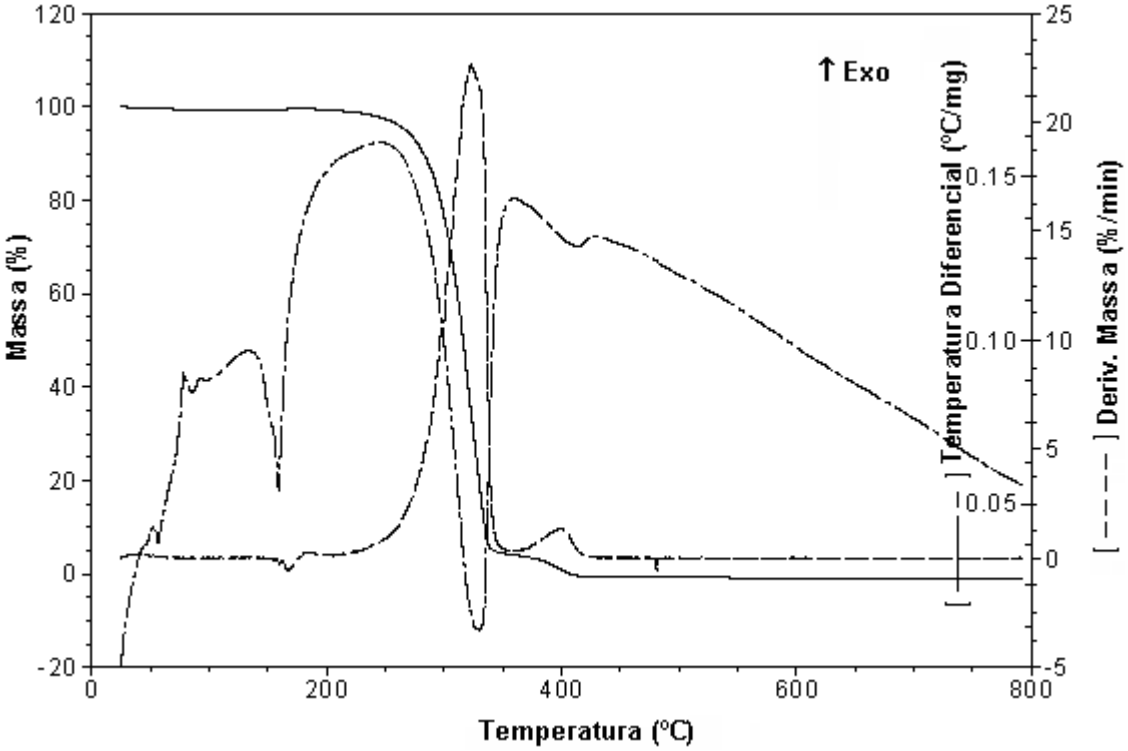

Figura 6.57: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 6.

Semelhantemente, a Figura 6.57 apresenta a avaliação térmica do microencapsulado 6. Sua curva de TG apresentou dois estágios de decomposição, o primeiro a T_i = 200 ºC e T_f = 345 ºC com perda de massa de 95%. O segundo estágio iniciou a T_i = 350 ºC e T_f = 405 ºC com perda de massa de 5% e nenhum resíduo foi observado em 800 ºC. A curva DTG confirmou os dois estágios de degradação com velocidade máxima de decomposição na temperatura de 330 ºC. A curva DTA mostrou dois eventos endotérmicos nas temperaturas de 160 ºC e 330 ºC, sugerindo serem eventos de fusão e de decomposição, respectivamente.

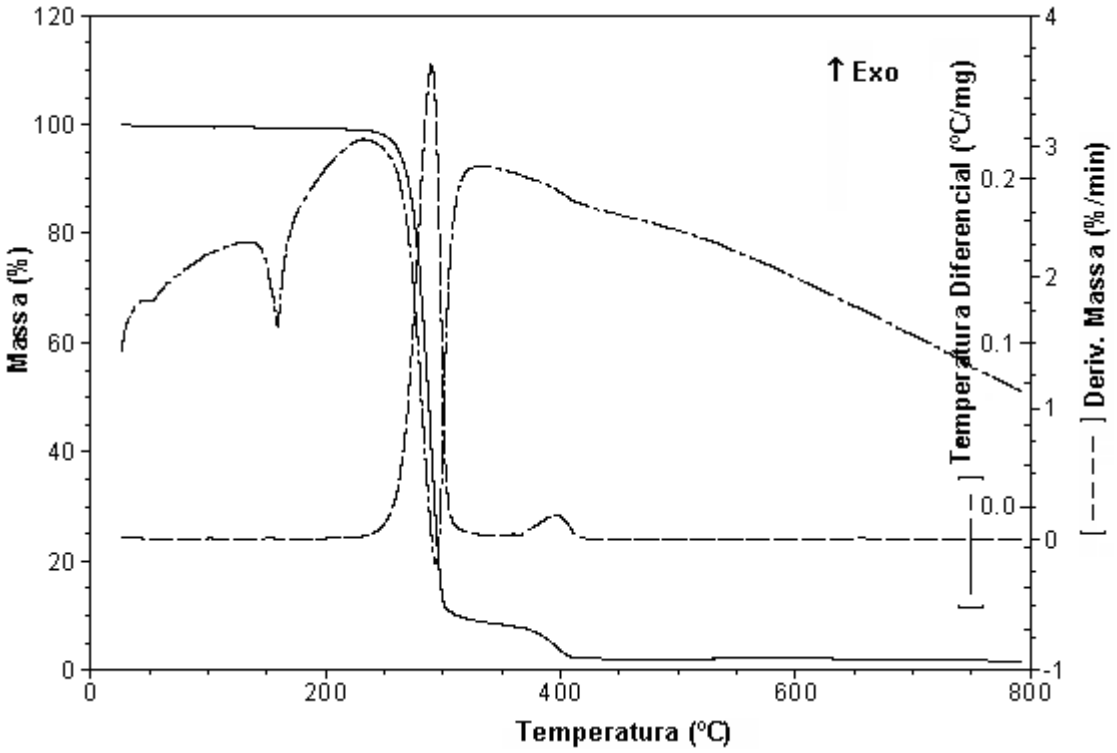

Figura 6.58: Curvas de TG/DTG e DTA do microencapsulado 7.

A Figura 6.58 apresenta a avaliação térmica do microencapsulado 7. Sua curva de TG apresentou também dois estágios de decomposição, o primeiro a T_i = 240 ºC e T_f = 310ºC com perda de massa de 91%. O segundo estágio iniciou a T_i = 350 ºC e T_f = 405 ºC com perda de massa de 8% e 1% de resíduo em 800 ºC. A curva DTG confirmou os dois estágios de degradação com velocidade máxima de decomposição na temperatura de 300 ºC. A curva DTA mostrou eventos endotérmicos nas temperaturas de 160 ºC e 300 ºC, sugerindo a classificação como eventos de fusão e de decomposição, respectivamente.

As curvas de TG/DTG e DTA das microesferas, independente da formulação, mostram que o microencapsulamento pode ser compreendido por dois estágios de decomposição com comportamento térmico similar aos copolímeros de origem. O primeiro estágio é caracterizado pela despolimerização do ciclo PLLA e o segundo, a cisão térmica do segmento PEG, enfatizados nos picos endotérmicos observados nas curvas de DTA.

As perdas mássicas e as temperaturas de degradação menores estão relacionadas à composição e às interações dos segmentos PLLA e PEG na matriz copolimérica (DRUMOND, MOTHÉ & WANG, 2006), devido à contribuição entrópica para a energia livre da mistura (ELLIS, 1995). As Tabelas 6.2 e 6.3 apresentam os dados termogravimétricos das curvas de TG/DTG e DTA, respectivamente das amostras desenvolvidas.

Tabela 6.2: Dados termogravimétricos obtidos nas curvas TG/DTG referentes à tetraciclina, copolímeros e microencapsulados.

Materiais	1º evento de decomposição			2º evento de decomposição			Pico de DTG(*)
	T_i (ºC)	T_f (ºC)	Perda de massa (%)	T_i (ºC)	T_f (ºC)	Perda de massa (%)	(ºC)
Tetraciclina	200	225	25	250	500	30	225
Copolímero 1	200	290	77	345	410	20	250
Microencapsulado 1	190	310	83	320	450	13	295
Microencapsulado 4	180	320	82	350	405	10	295
Microencapsulado 7	240	310	91	350	405	8	300
Copolímero 2	190	310	60	345	415	38	290
Microencapsulado 2	180	310	80	325	410	10	255
Microencapsulado 5	190	300	84	350	425	11	265
Copolímero 3	215	320	84	355	415	16	300
Microencapsulado 3	190	300	85	320	430	13	260
Microencapsulado 6	200	345	95	350	405	5	330

(*) Temperatura em que a velocidade de decomposição é máxima (obtida na curva de DTG).

Tabela 6.3: Dados térmicos obtidos na curva DTA referentes à tetraciclina, copolímeros e microencapsulados.

Materiais (*)	Evento de Fusão	Evento de Decomposição
	T_m (ºC)	T_d (ºC)
Copolímero 1	165	250
Microencapsulado 1	155	295
Microencapsulado 4	160	295
Microencapsulado 7	160	300
Copolímero 2	165	290
Microencapsulado 2	160	255
Microencapsulado 5	150	265
Copolímero 3	171	300
Microencapsulado 3	160	260
Microencapsulado 6	160	330

(*) Na tetraciclina os eventos endotérmicos estão compreendidos na faixa de 200ºC a 240 ºC.

Diante das curvas TG/DTG e DTA notou-se que houve encapsulamento da tetraciclina no sistema copolimérico, pois as temperaturas iniciais de decomposição e as temperaturas referentes aos eventos endotérmicos foram diferentes em relação ao sistema copolimérico original. Uma contribuição relevante da encapsulagem da droga parece ser a preservação até a fusão, assim nenhuma transição exotérmica era perceptível nessa temperatura para as microesferas, inclusive no ciclo inteiro de aquecimento (até 800ºC).

6.2.4.2- Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curva de DSC da tetraciclina, Figura 6.59, mostra que não houve indícios, até a faixa de temperatura avaliada (200ºC), de nenhum evento endotérmico ou exotérmico para a amostra.

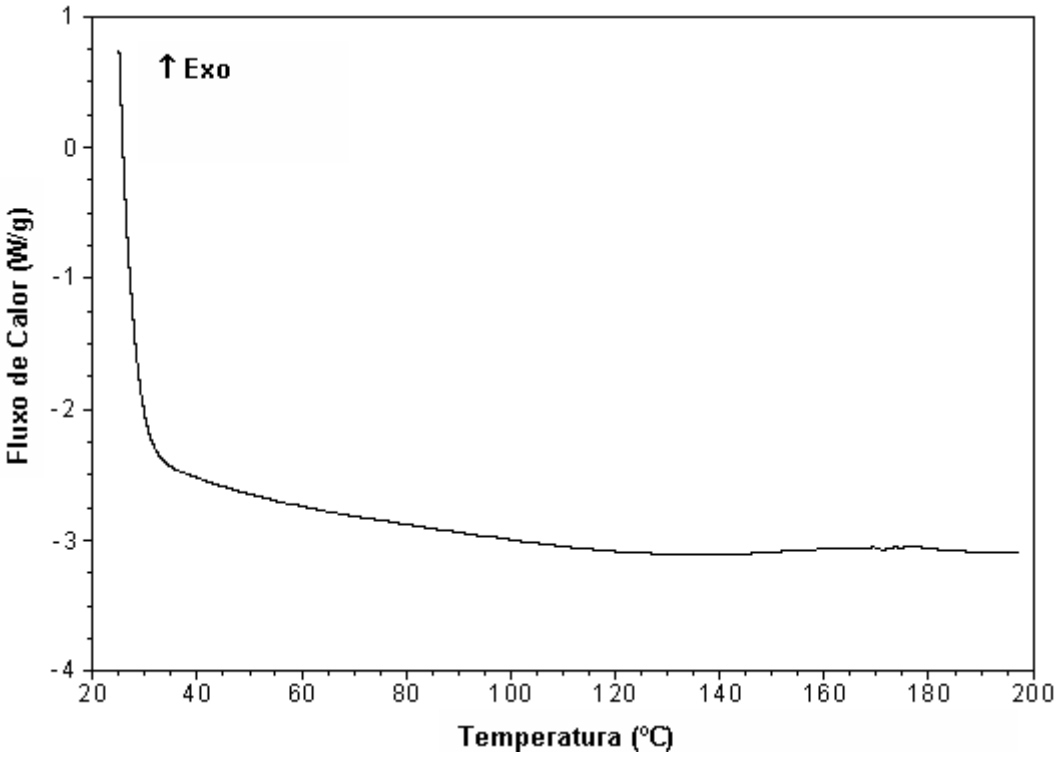

Figura 6.59: Curva de DSC da tetraciclina.

A Figura 6.60 apresenta as curvas de DSC para os microencapsulados formulados a partir do copolímero 1. As três amostras apresentaram um único pico endotérmico de fusão a 160ºC, permitindo a confirmação da fusão cristalina (T_m) dos segmentos de PLLA. Esta temperatura de fusão é maior do que a temperatura de fusão do copolímero original (este possuiu dois eventos endotérmicos a 143ºC e 150ºC, conforme Figura 6.4).

A temperatura de transição vítrea (T_g) para o copolímero 1 foi em torno de 45ºC (Figura 6.4), enquanto que para os microencapsulados, tal transição ocorreu em temperatura similar, em torno de 45 e 50ºC, para os microencapsulados 1 e 4, e em torno de 60ºC para a microencapsulado 7 (Figura 6.60). O aumento da temperatura de transição vítrea do sistema pode ter sido influenciado pelo aumento da fase aquosa da formulação do último microencapsulado. Não foi observado nenhum pico exotérmico na Figura 6.51 (T_c - cristalização do PLLA), como no copolímero de origem (Figura 6.4).

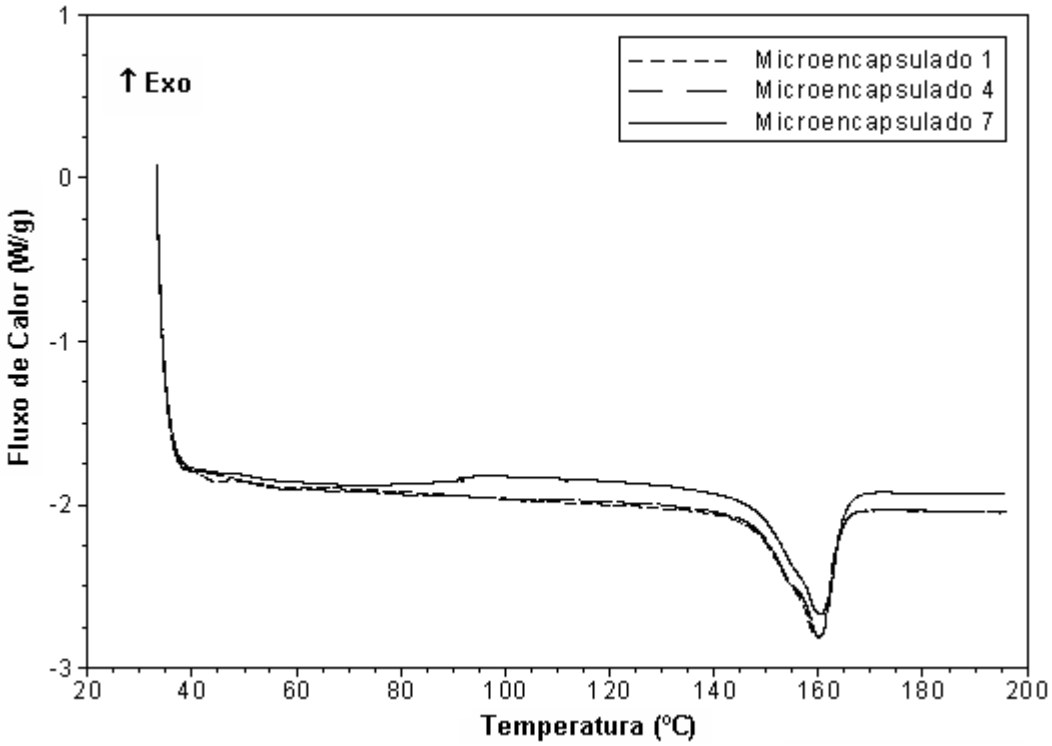

Figura 6.60: Sobreposição das curvas de DSC dos microencapsulados 1, 4 e 7 (a partir do copolímero 1).

A Figura 6.61 apresenta o comportamento térmico dos microencapsulados 2 e 5 que foram formulados a partir do copolímero 2 (Figura 6.5). As curvas de DSC mostraram a transição vítrea (T_g) dos microencapsulados em torno de 50 ºC, a presença de evento exotérmico em torno de 75 ºC (indicando a possível cristalização do segmento PLLA) e o evento endotérmico a 160 ºC, este ultimo podendo ser atribuído a fusão cristalina (T_m) dos segmentos de PLLA.

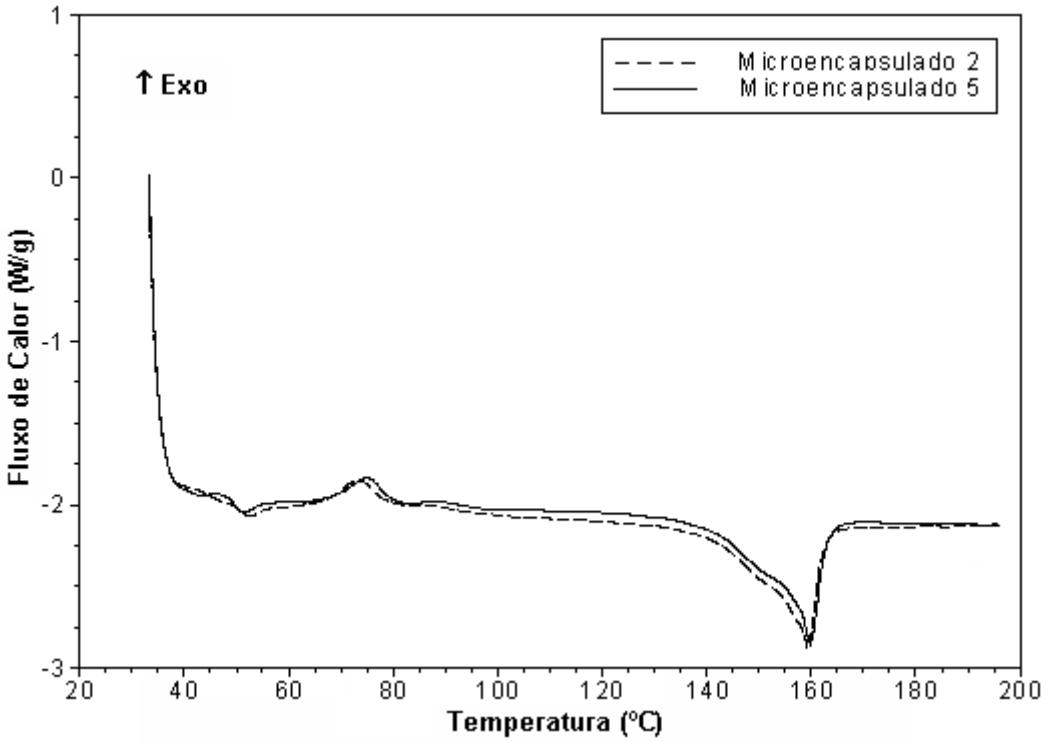

Figura 6.61: Sobreposição das curvas de DSC dos microencapsulados 2 e 5 (a partir do copolímero 2).

A Figura 6.62 apresenta as curvas de DSC para os microencapsulados 3 e 6 obtidos a partir do copolímero 3 (Figura 6.6). As curvas de DSC mostraram a transição vítrea (T_g) dos microencapsulados em torno de 45ºC, a presença de evento exotérmico em torno de 70ºC, similar ao comportamento dos microencapsulados 2 e 5, indicando a possível cristalização do segmento PLLA e a possível fusão cristalina dos segmentos de PLLA observada na temperatura de 160ºC.

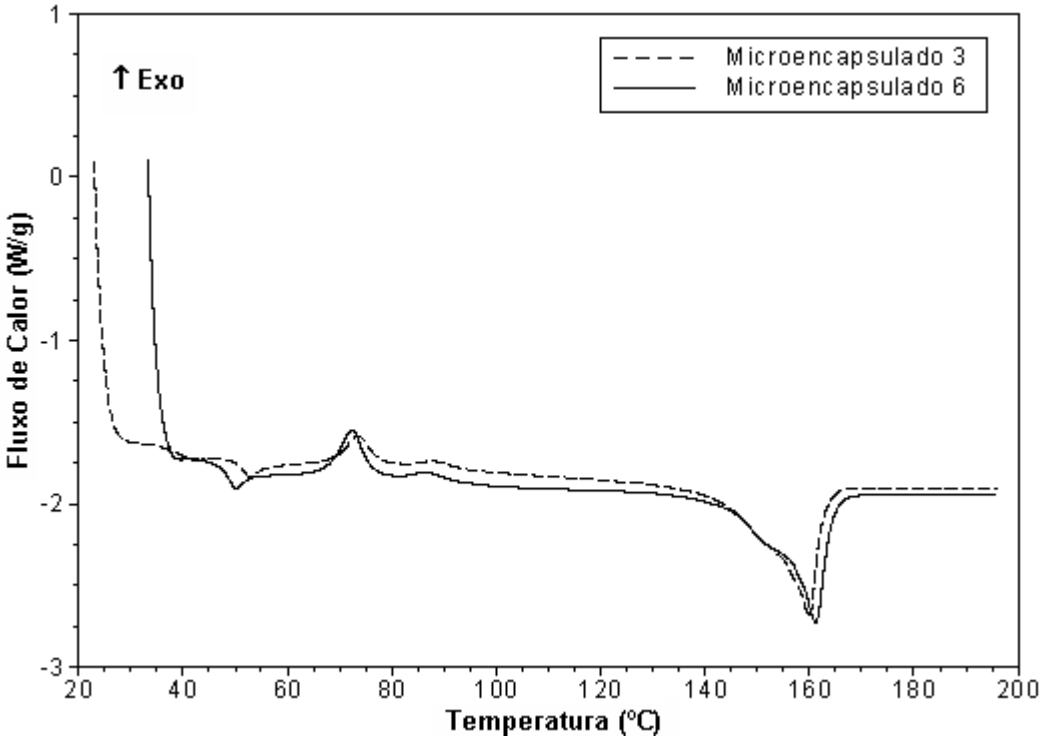

Figura 6.62: Sobreposição das curvas de DSC dos microencapsulados 3 e 6 (a partir do copolímero 3).

Conforme Figuras 6.59 a 6.62, sugere-se que houve microencapsulamento da tetraciclina no sistema copolimérico, pois o perfil das curvas de DSC dos mesmos foi diferente em relação aos seus copolímeros originais, aparecendo possíveis eventos de cristalização.

A Tabela 6.4 apresenta a temperatura de transição vítrea (T_g) e as temperaturas relacionadas aos eventos endotérmicos (T_m) e exotérmicos (T_c) dos materiais sintetizados na presente tese.

Tabela 6.4: Temperaturas de transição vítrea, de cristalização e de fusão observadas nas curvas de DSC dos materiais sintetizados.

Materiais	T_g (ºC)	T_c (ºC)	T_m (ºC)
Tetraciclina	---	---	----
Copolímero 1	45	90	144 e 152
Microencapsulado 1	50	---	160
Microencapsulado 4	50	---	160
Microencapsulado 7	60	---	160
Copolímero 2	45	---	148
Microencapsulado 2	50	75	160
Microencapsulado 5	50	75	160
Copolímero 3	45	90	153
Microencapsulado 3	45	70	160
Microencapsulado 6	45	70	160

6.2.5- Difração de Raios X (XRD)

A Figura 6.63 apresenta o difratograma do microencapsulado 3.

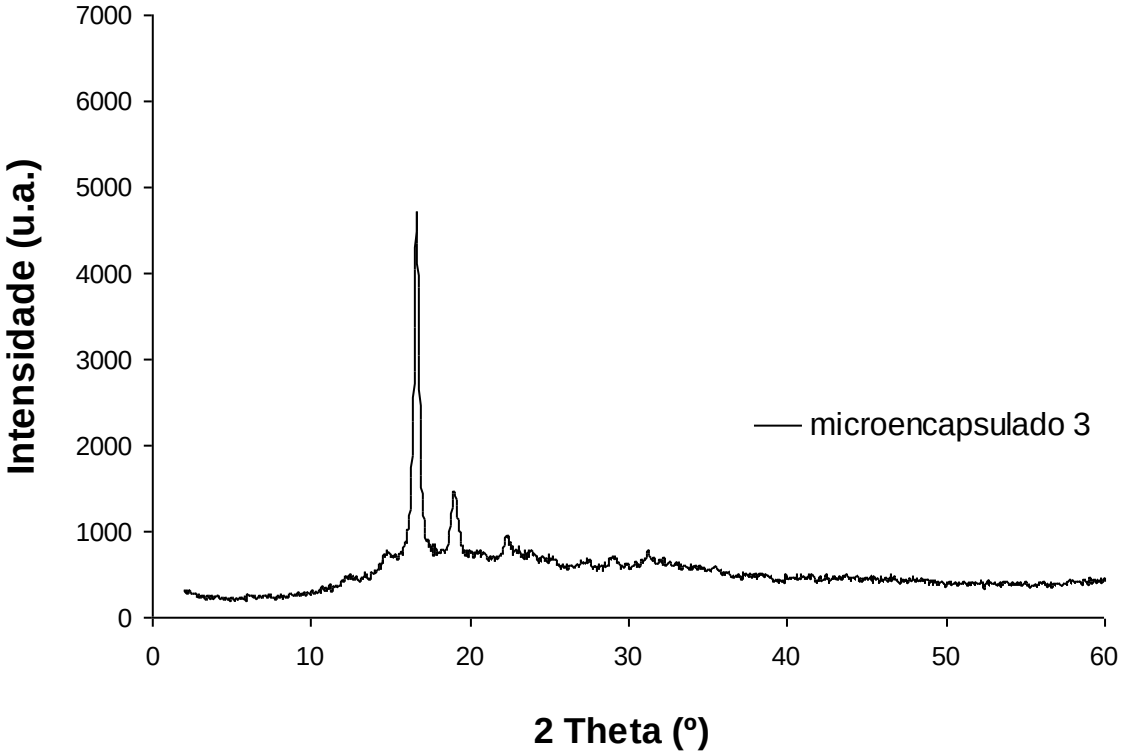

Figura 6.63: Difratograma do microencapsulado 3.

O microencapsulado apresenta praticamente o mesmo perfil do copolímero original, portanto, possui característica cristalina que no difratograma se apresenta sob a forma de picos e que também foram tomados como referência os dois picos de maior intensidade.

Os dois valores de 2θ (2 Theta) que correspondem aos dois picos de maior intensidade são 16,65º (intensidade de 4729 u. a.) e 19º (intensidade de 1468 u. a.), respectivamente. Tais valores de 2θ (2 Theta) são muito próximos ao seu copolímero, porém com valores de intensidade bem inferior aos apresentados pelo copolímero 3, indicando uma diminuição da fase cristalina do microencapsulado final.

A presença dos picos nos difratogramas corrobora com os resultados encontrados na calorimetria exploratória diferencial.

6.2.6 Espectrometria de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier pelo método Refletância Atenuada Total (FTIR-ATR)

A Figura 6.64 apresenta os picos de absorção característicos da tetraciclina, os estiramentos da ligação C-H (bandas: 2744 cm^{-1} e 2987 cm^{-1}), da ligação N-H (banda em 3297 cm^{-1}) e da ligação O-H (banda em 3354 cm^{-1}) que estão unidas ao esqueleto octadronaftaceno da mesma (Figura 4.13).

As bandas em torno de 1700 cm^{-1} (1612 e 1579 $cm^{-}1$) referem-se estiramento C=O, enquanto que a banda em torno de 1450 cm^{-1} indica a deformação angular O-H. As bandas que corresponde à faixa de 1200 a 600 cm^{-1} referem-se à região de impressão digital para a tetraciclina, pois apresenta os estiramentos C-N e C-O, juntamente com a presença dos aromáticos que estão presentes na estrutura da mesma.

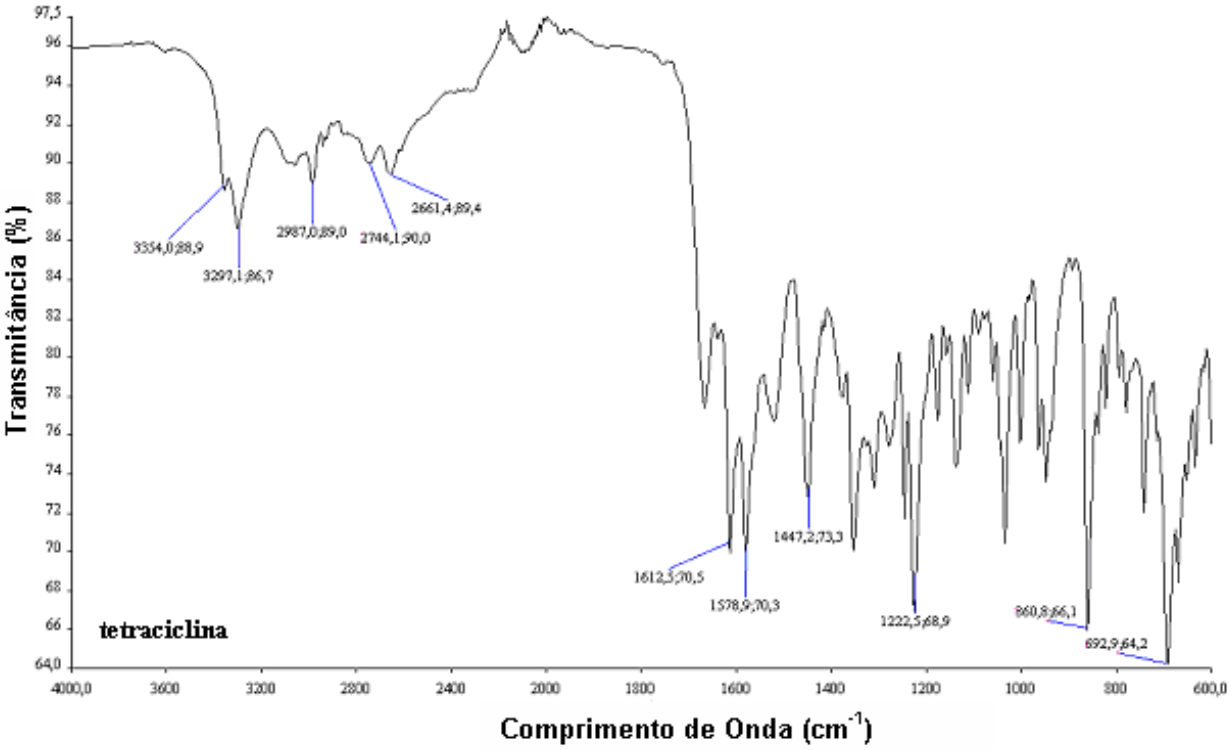

Figura 6.64: Espectro de FTIR-ATR da tetraciclina.

As Figuras 6.65 a 6.71 apresentam os espectros dos microencapsulados. Os picos de absorção em torno de 3440 cm^{-1} (microencapsulado 2) e 3490 cm^{-1} (microencapsulado 3) possuem a presença da contribuição do estiramento O-H proveniente do grupamento final do PEG. Porém não houve a presença de tais picos nas suas respectivas repetições (microencapsulados 5 e 6, Figuras 6.69 e 6.70), indicando que o processo de formulação dos

microencapsulados foi uma variável importante que deve ser levada em conta para evitar a presença de impurezas na caracterização final do material.

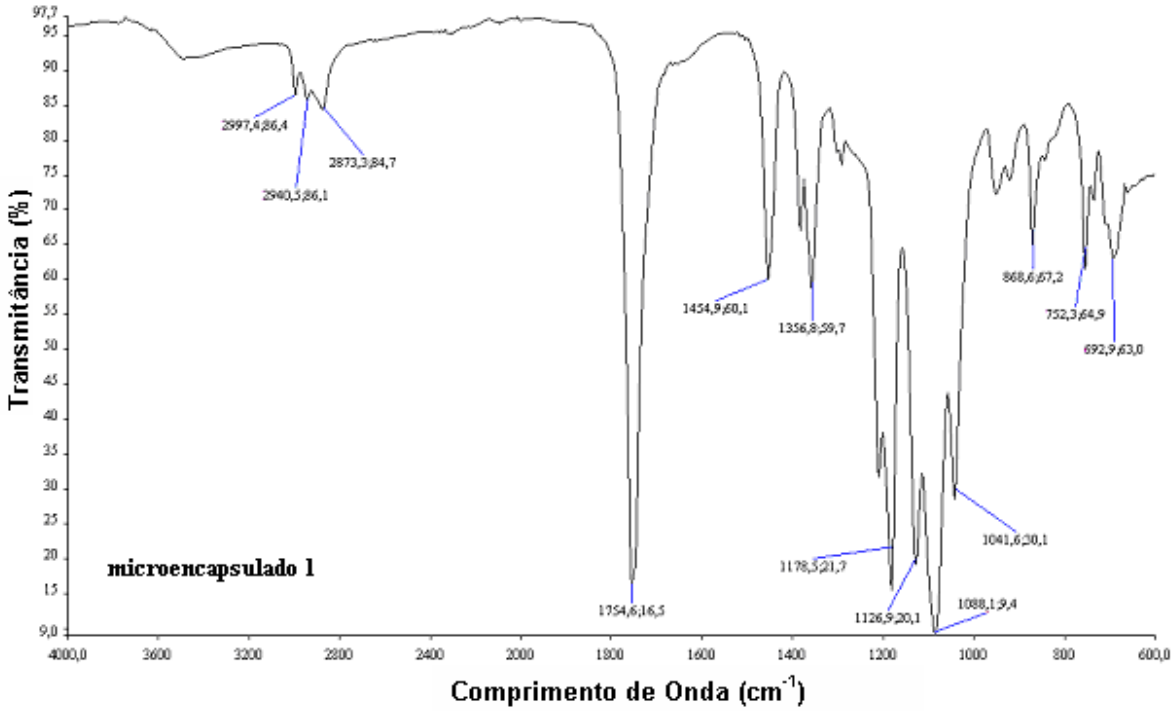

Figura 6.65: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 1.

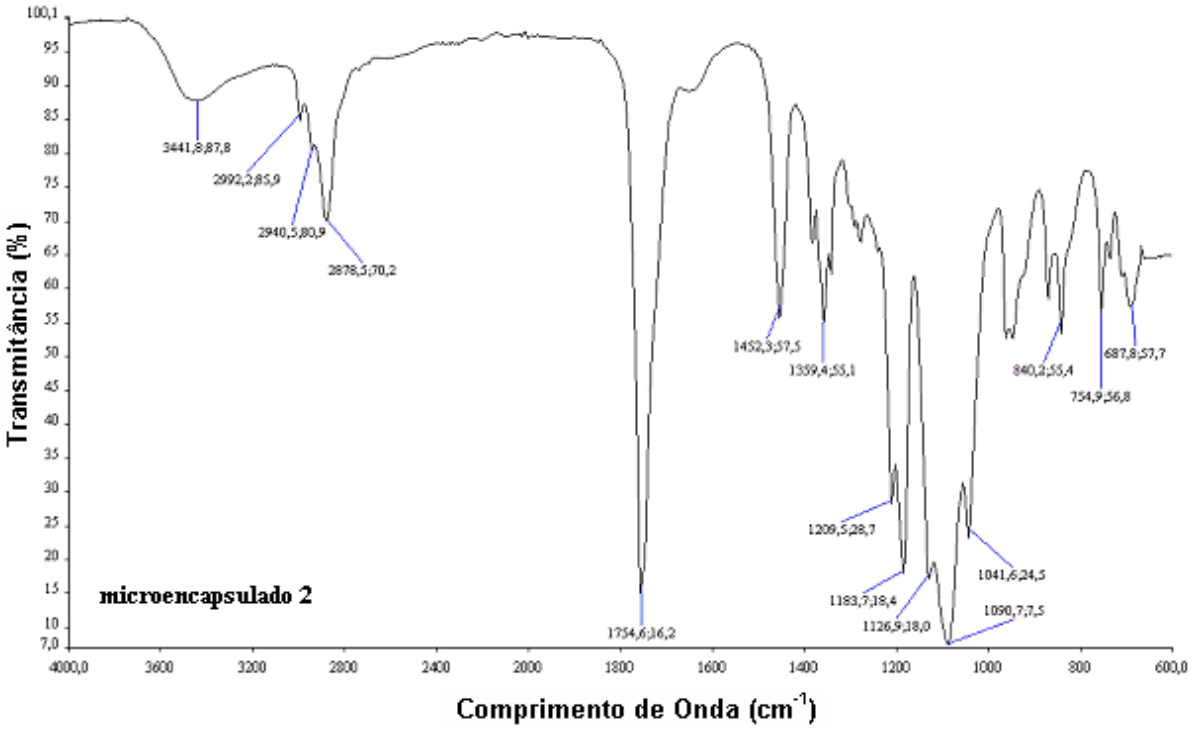

Figura 6.66: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 2.

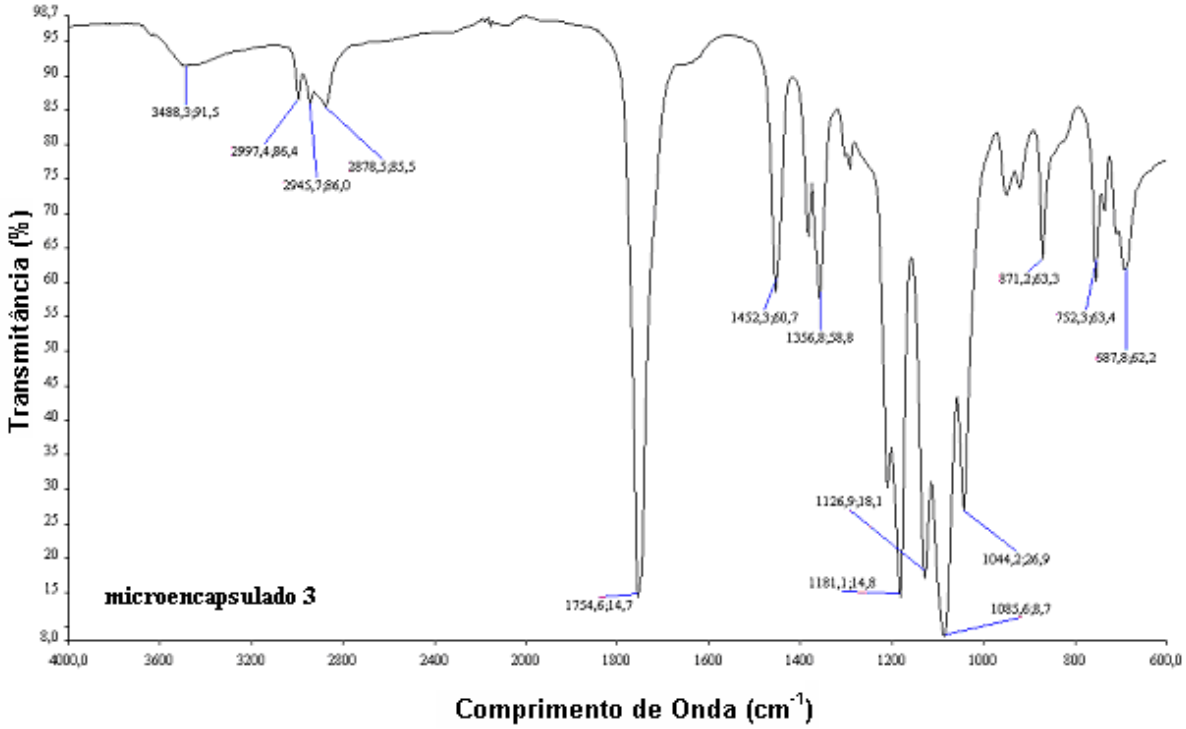

Figura 6.67: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 3.

Os picos de absorção nas faixas de 2997 cm^{-1}, 2940 cm-1 e 2880 cm^{-1} (que foram observados nos espectros de seus respectivos copolímeros e não foi observado no espectro da tetraciclina) são atribuídos ao estiramento C-H, indicando que o coiniciador PEG homopolímero foi modificado. Interessante que as repetições dos microencapsulados 1, 2 e 3 (que são os microencapsulados 4, 5 e 6) não apresentaram o pico de absorção em torno de 2880 cm^{-1}.

O pico de absorção em torno de 1755 cm^{-1}, atribuído ao estiramento C=O, foi característico ao bloco PLLA e foi observado em todos os microencapsulados. Os picos referentes aos valores em torno de 1455 cm^{-1} e 1360 cm^{-1} indicaram a deformação angular C-H e O-H também presentes nos espectros dos copolímeros correspondentes e nas repetições das formulações, porém não foram observados no espectro da tetraciclina (microencapsulados 4, 5 e 6).

Os picos observados em torno de 1180 cm^{-1} e de 1086-1090 cm^{-1} referem-se aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo C-O-C, respectivamente e também foram observados nos espectros dos copolímeros e não no espectro da tetraciclina.

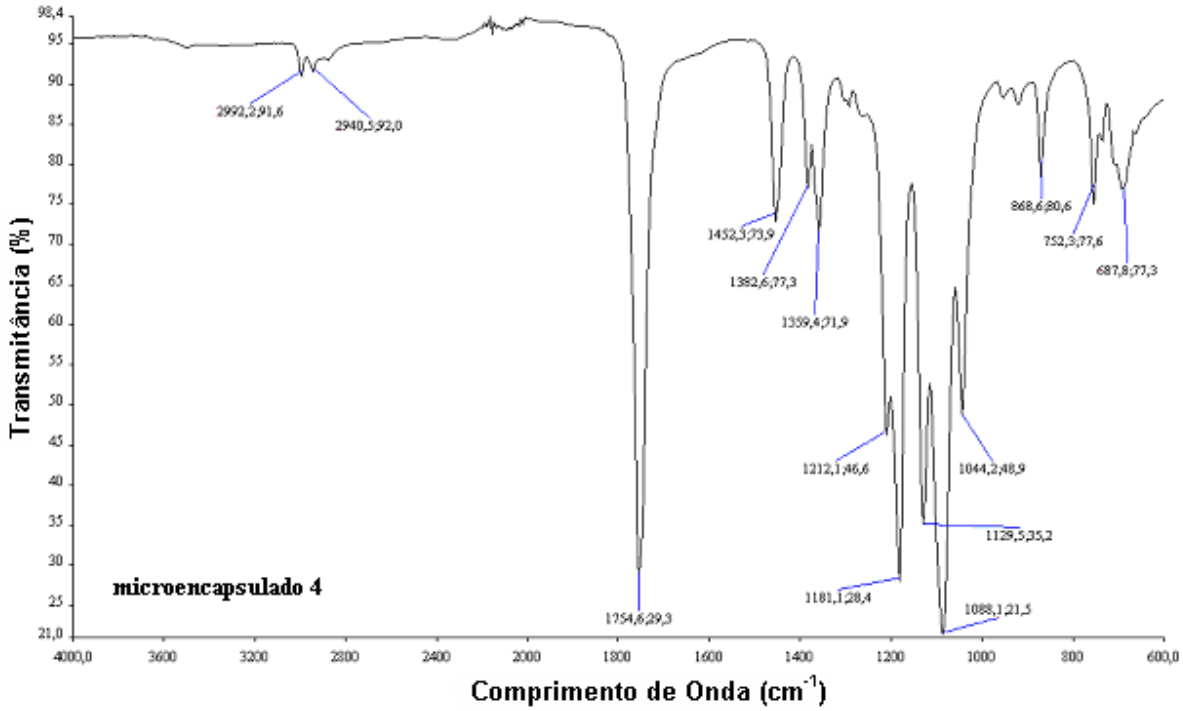

Figura 6.68: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 4.

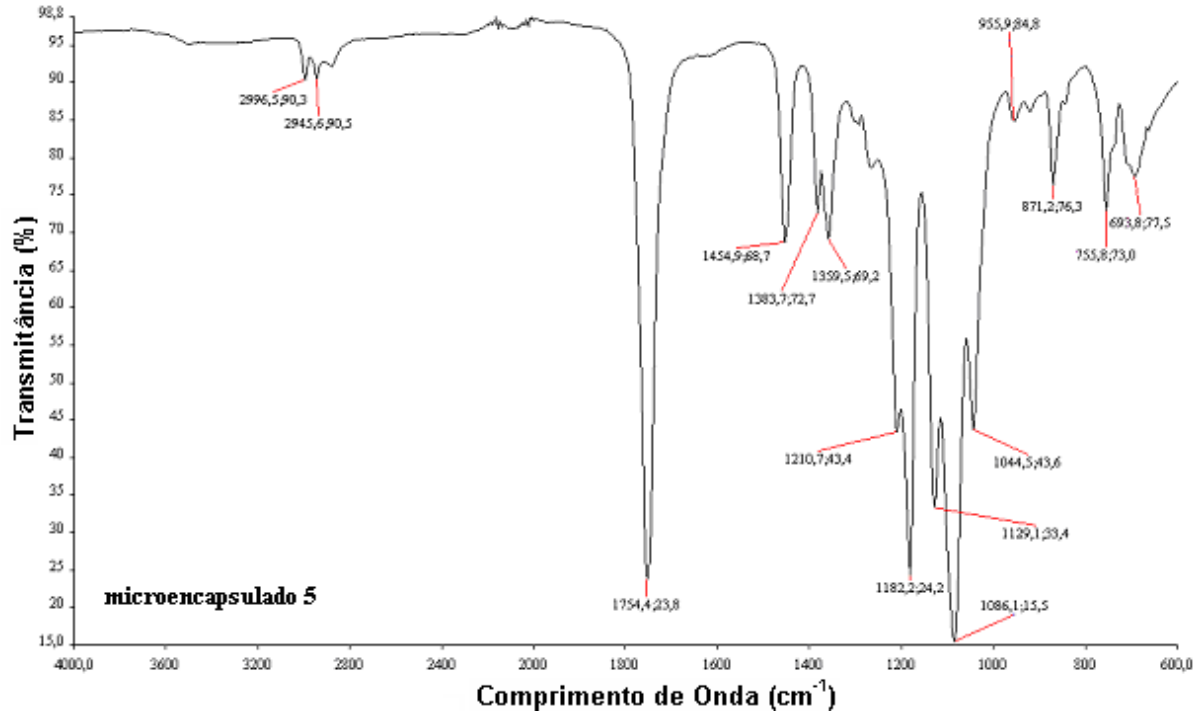

Figura 6.69: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 5.

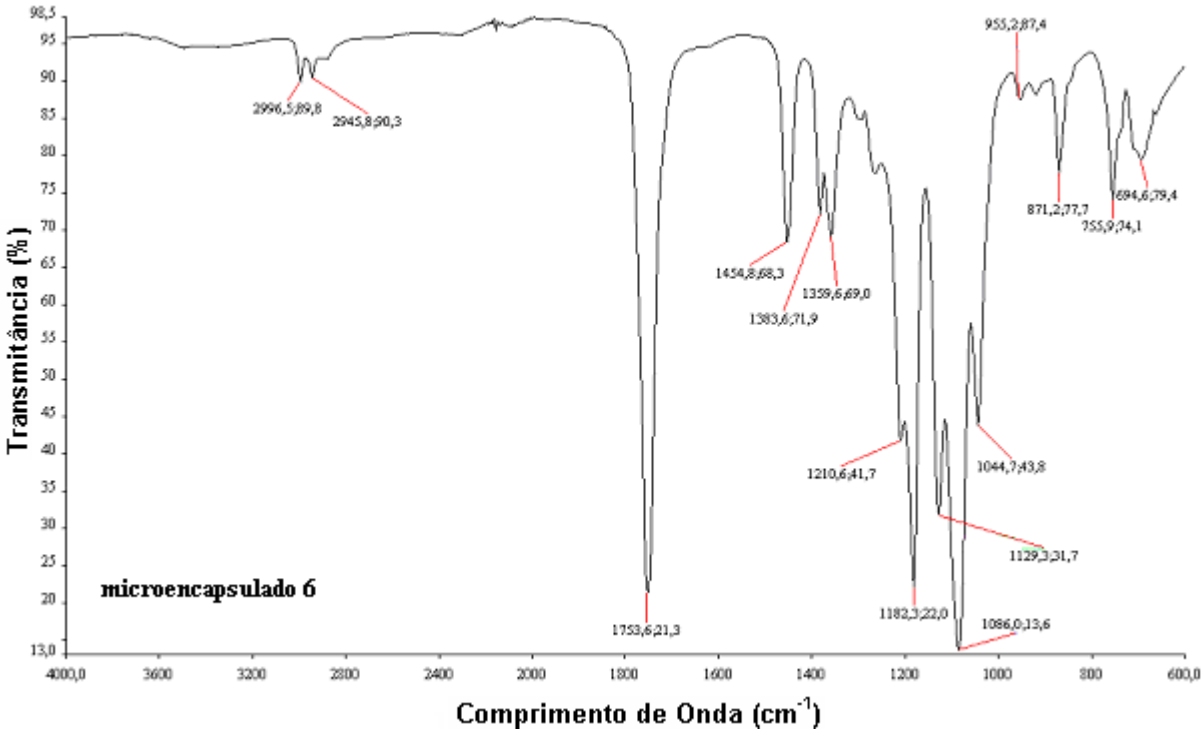

Figura 6.70: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 6.

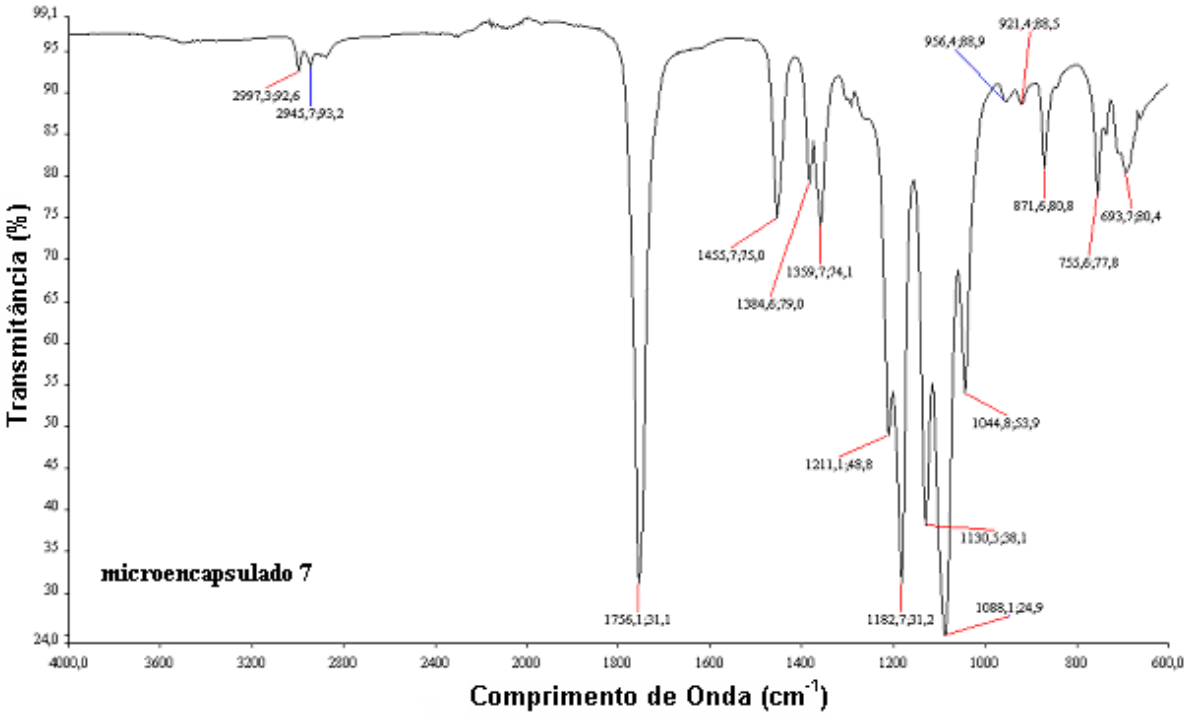

Figura 6.71: Espectro de FTIR-ATR do microencapsulado 7.

A presença das absorções características em cada microencapsulado indicou a presença dos blocos PEG e PLLA, sugerindo que a ligação covalente entre eles se manteve, mesmo após as etapas físicas de formulação dos microencapsulados com a tetraciclina. Os espectros dos microencapsulados indicam que a tetraciclina pode não estar na superfície dos copolímeros e sim encapsulada nos mesmos, pois não ocorreu nenhuma interação química

entre os mesmos. Para confirmação de tal fato, foi adicionado clorofórmio no microencapsulado 3, observou-se duas fases: solúvel e insolúvel, sendo esta última provavelmente a tetraciclina encapsulada. Os espectros das fases solúvel e insolúvel estão apresentados nas Figuras 6.72 e 6.73, respectivamente. Observa-se que a fase solúvel possui picos de absorção semelhantes do copolímero (Figuras 6.11 e 6.67); enquanto a fase insolúvel, da tetraciclina (Figura 6.64).

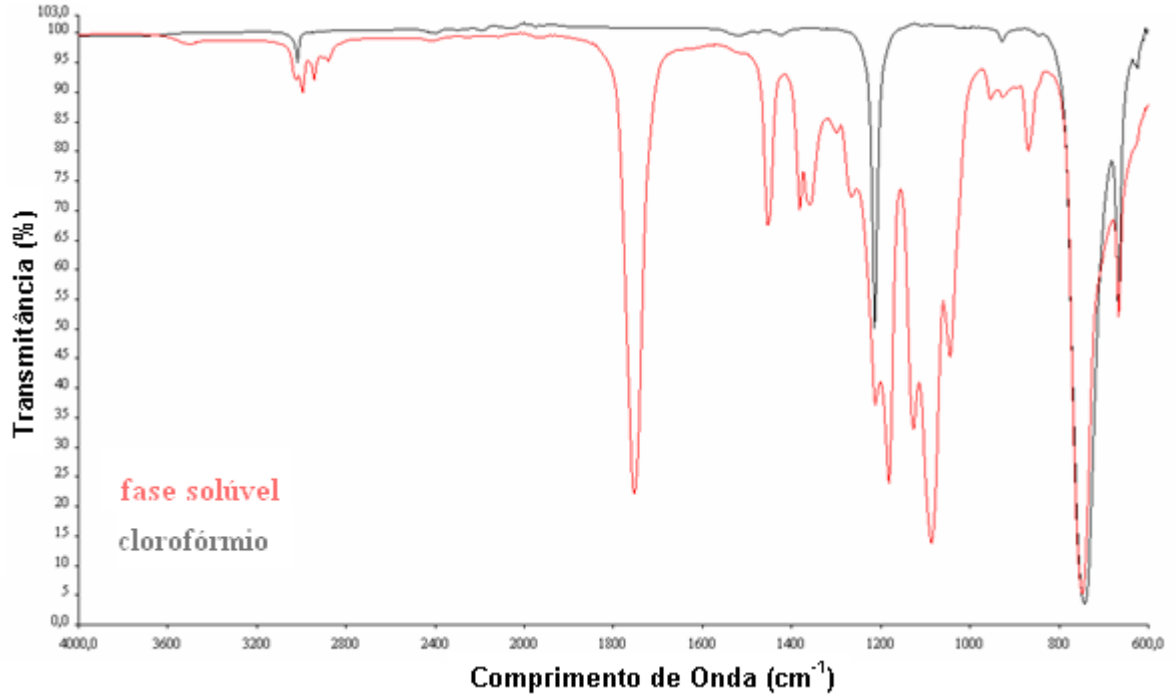

Figura 6.72: Espectro de FTIR-ATR da fase solúvel e do clorofórmio.

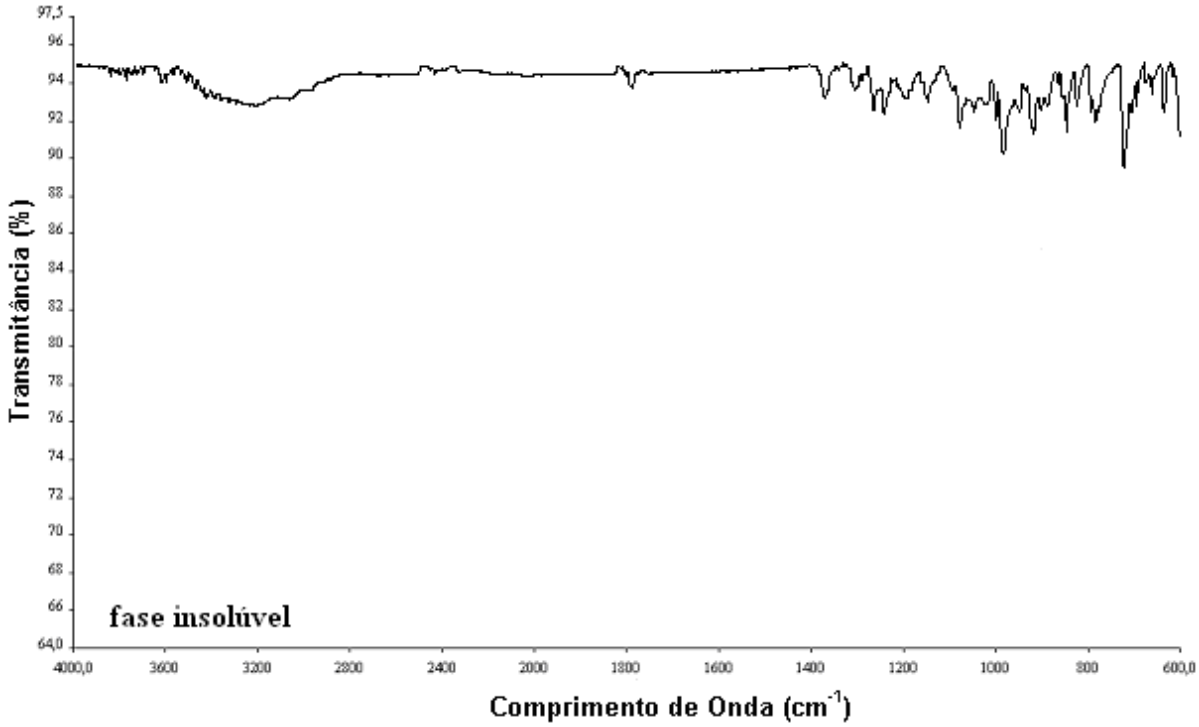

Figura 6.73: Espectro de FTIR-ATR da fase insolúvel.

6.2.7- Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

6.2.7.1- Núcleo de Hidrogênio (^{1}H-NMR)

A Figura 6.74 apresenta o espectro de ressonância do núcleo de hidrogênio para a tetraciclina em água deuterada. Observaram-se os seguintes deslocamentos (δ) em ppm: em torno de 7,54 a 6,91 ppm referentes aos hidrogênios do anel benzênico; em torno de 4,80 a 4,09 ppm referentes aos grupos OH ligados aos anéis cíclicos condensados da estrutura do fármaco; os sinais de 3,13 a 3,06, 2,89 a 2,82 e 2,30 a 2,24 ppm referentes aos grupamentos CH_3 ligados ao Nitrogênio da estrutura cíclica; os sinais de 1,92 a 1,79 ppm referem-se ao grupamento CH_3 ligado ao Carbono do segundo anel cíclico condensado e o sinal em torno de 1,59 ppm refere-se ao grupamento NH_2.

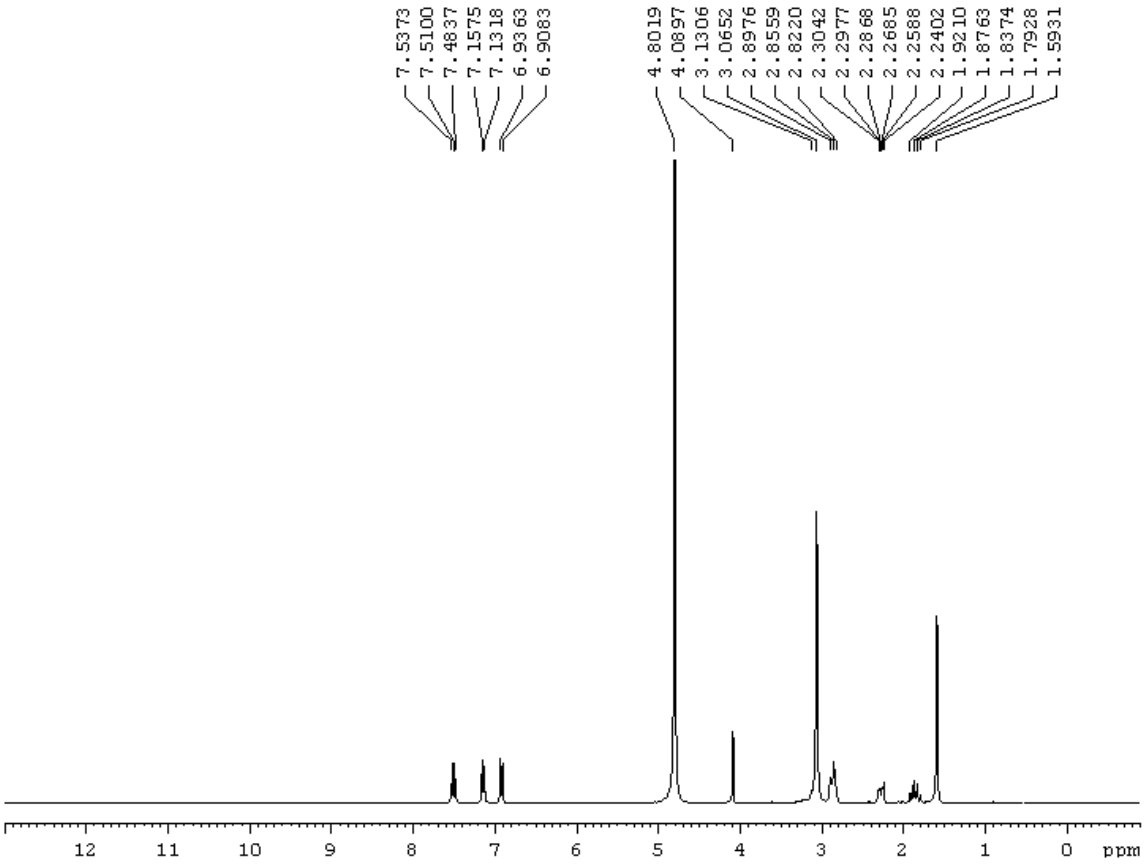

Figura 6.74: Espectro de ^{1}H-NMR da tetraciclina em água deuterada.

As Figuras 6.75 e 6.76 apresentam os espectros de ressonância do núcleo de hidrogênio para os microencapsulados 4 e 6 (originados dos copolímeros 1 e 3, respectivamente) em clorofórmio deuterado.

Nota-se que tais espectros são similares aos espectros típicos de copolímeros do formato ABA reportados por He e colaboradores (2007), indicando que não ocorreu nenhuma interação química entre copolímero e a tetraciclina.

Os deslocamentos químicos (δ) em ppm para o microencapsulado 4 foram: 5,30 a 5,14 ppm e 1,60 a 1,48 ppm referentes aos grupamentos CH e CH_3 do segmento PLLA, respectivamente; 3,64 ppm referente ao grupamento CH_2 do segmento PEG. Tais valores de deslocamento químico em ppm para os grupamentos CH, CH_3 e CH_2 foram observados em trabalhos de Drumond, Wang & Mothé (2004) ao avaliar espectros de NMR de homopolímeros e copolímeros de PLLA-PEG-PLLA, de Chen e colaboradores (2006) ao verificar valor de deslocamento químico de 3,72 ppm para o PEG em copolímeros de PHB-PEG-PHB. Os deslocamentos químicos para o microencapsulado 6, Figura 6.76, foram similares aos da Figura 6.75.

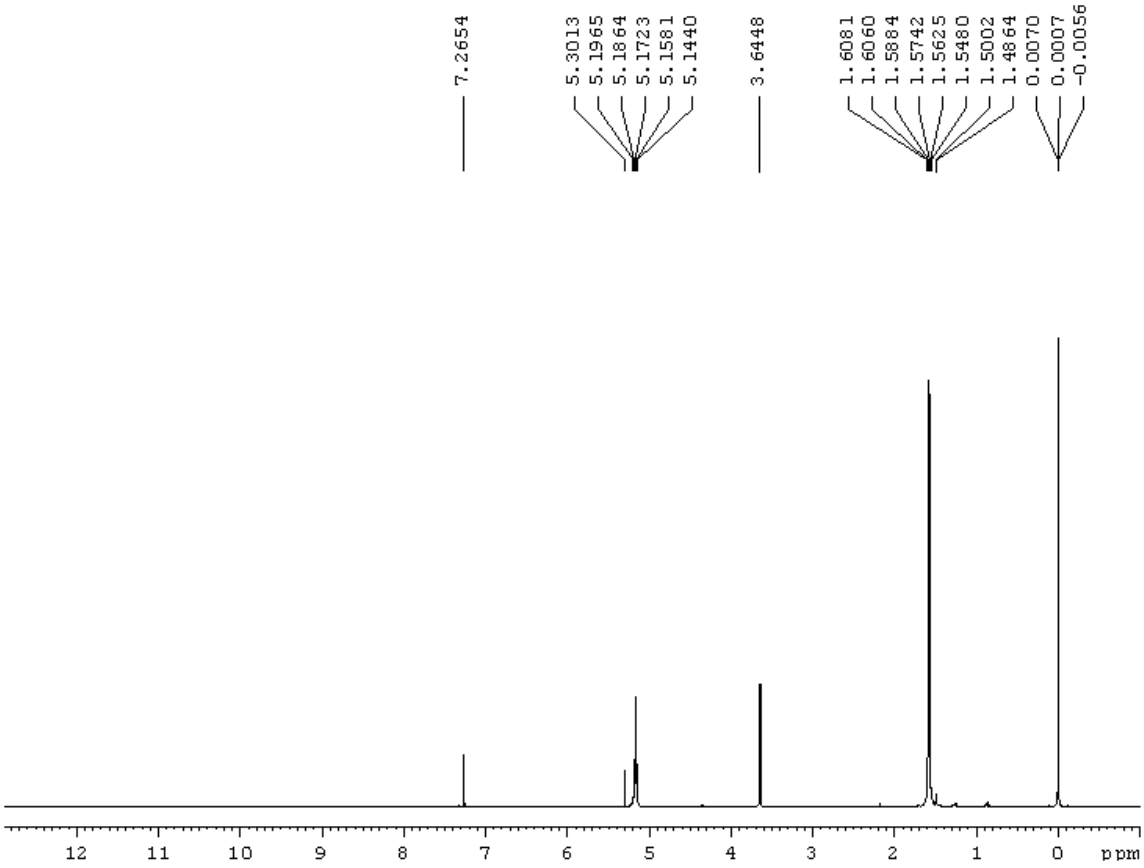

Figura 6.75: Espectro de ^{1}H-NMR do microencapsulado 4 em clorofórmio deuterado.

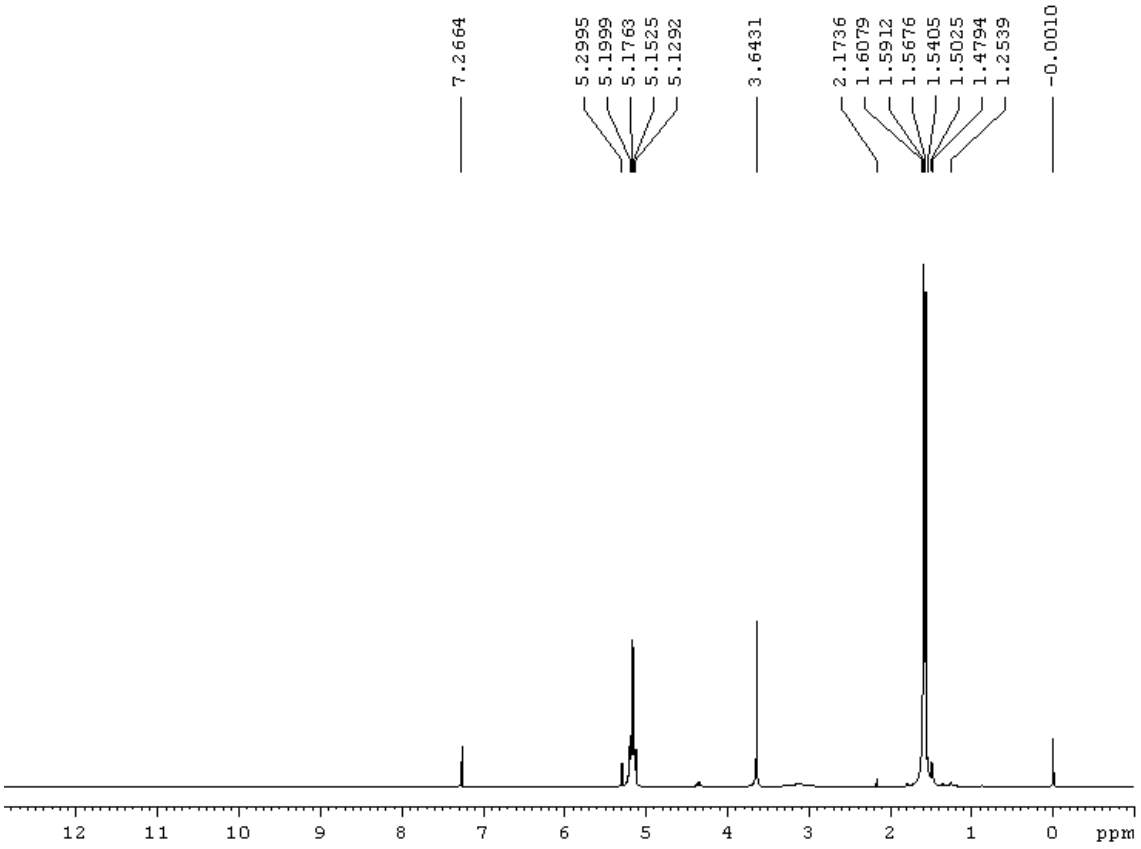

Figura 6.76: Espectro de ^{1}H-NMR do microencapsulado 6 em clorofórmio deuterado.

6.2.7.2- Núcleo de Carbono 13 (^{13}C-NMR)

A Figura 6.77 apresenta o espectro de ressonância do núcleo carbono 13 para a tetraciclina em água deuterada e os deslocamentos químicos (δ) em ppm observados foram: os sinais de 193,33 a 186,42 ppm referentes aos grupamentos CO ligados aos anéis cíclicos condensados da estrutura química do fármaco e os sinais de 172,31 a 172,21 ao grupamento CO ligado ao grupamento NH_2; os estiramentos de 161,02 a 114,17 referem-se as ligações C=C pertencentes ao esqueleto octaidronaftaceno da estrutura química da tetraciclina; os sinais de 73,49 a 69,49 ppm referem-se a ligação C-N da estrutura do fármaco e os deslocamentos de 41,44 a 21,25 ppm referem-se as estruturas CH_3.

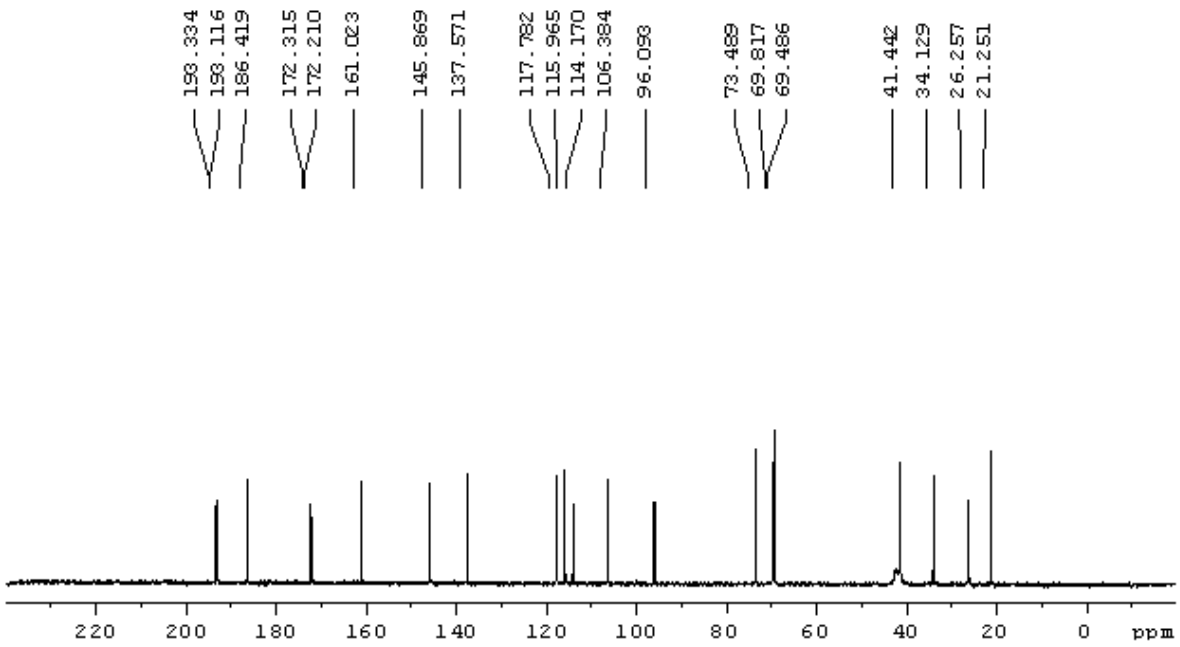

Figura 6.77: Espectro de ^{13}C-NMR da tetraciclina em água deuterada.

As Figuras 6.78 e 6.79 apresentam os espectros de ressonância do núcleo de carbono 13 para os microencapsulados 4 e 6 (originados dos copolímeros 1 e 3, respectivamente). Nota-se que tais espectros são similares aos espectros típicos de copolímeros PLLA e PEG encontrados na literatura, indicando que não ocorre nenhuma interação química entre copolímero e a tetraciclina (BREITENBACH *et al.*, 2000; MOTTA & DUEK, 2006; CHEN *et al*., 2006).

Os deslocamentos químicos (δ) em ppm para o microencapsulado 4 mostram três sinais que caracterizam o PLLA: 16,64 ppm referente ao grupamento CH_3, outro sinal a 77,02 a 77,28 ppm referente ao grupo CH e por fim um sinal a 169,62 referente ao grupamento C=O. O sinal a 76,77 se refere ao solvente $CDCl_3$. Os deslocamentos que caracterizam o segmento PEG são de 70,56 a 69,02 ppm em que os grupamentos finais OH do PEG foram consumidos na reação de síntese dos copolímeros. Valores similares para o microencapsulado 6 são observados na Figura 7.79.

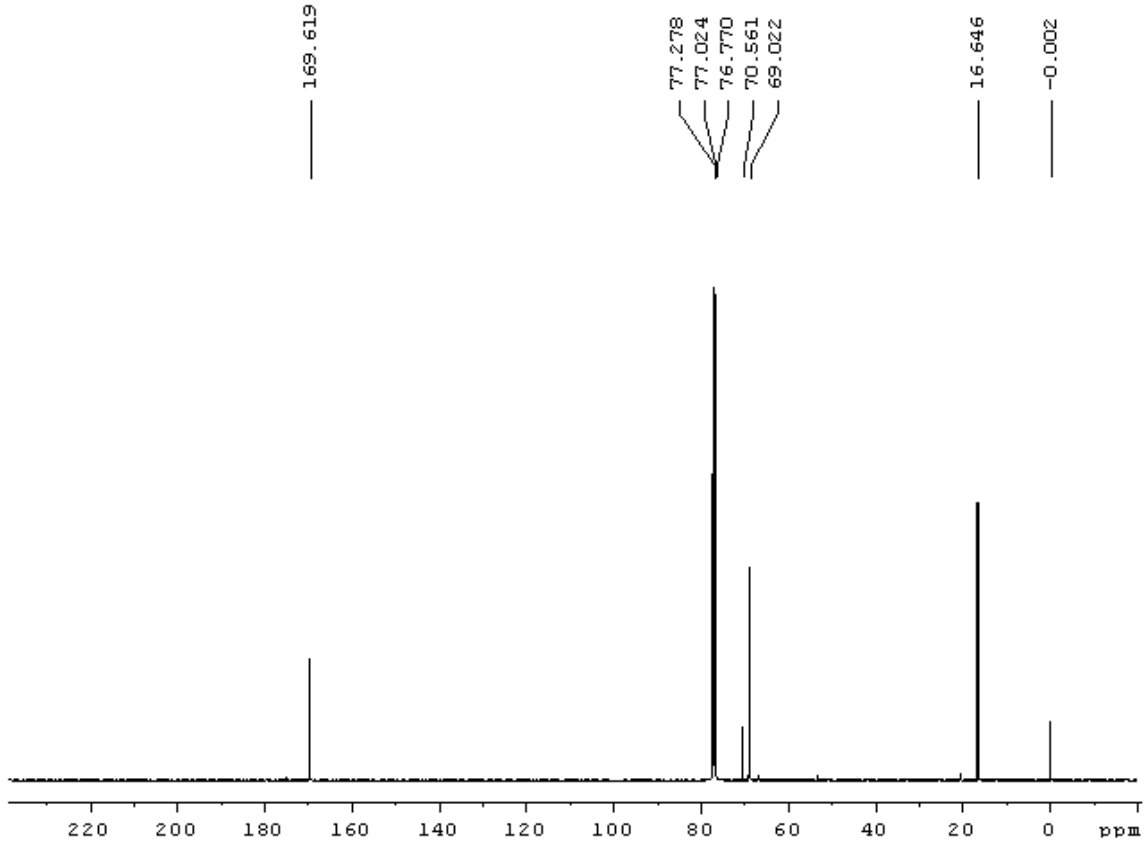

Figura 6.78: Espectro de ^{13}C-NMR do microencapsulado 4 em clorofórmio deuterado.

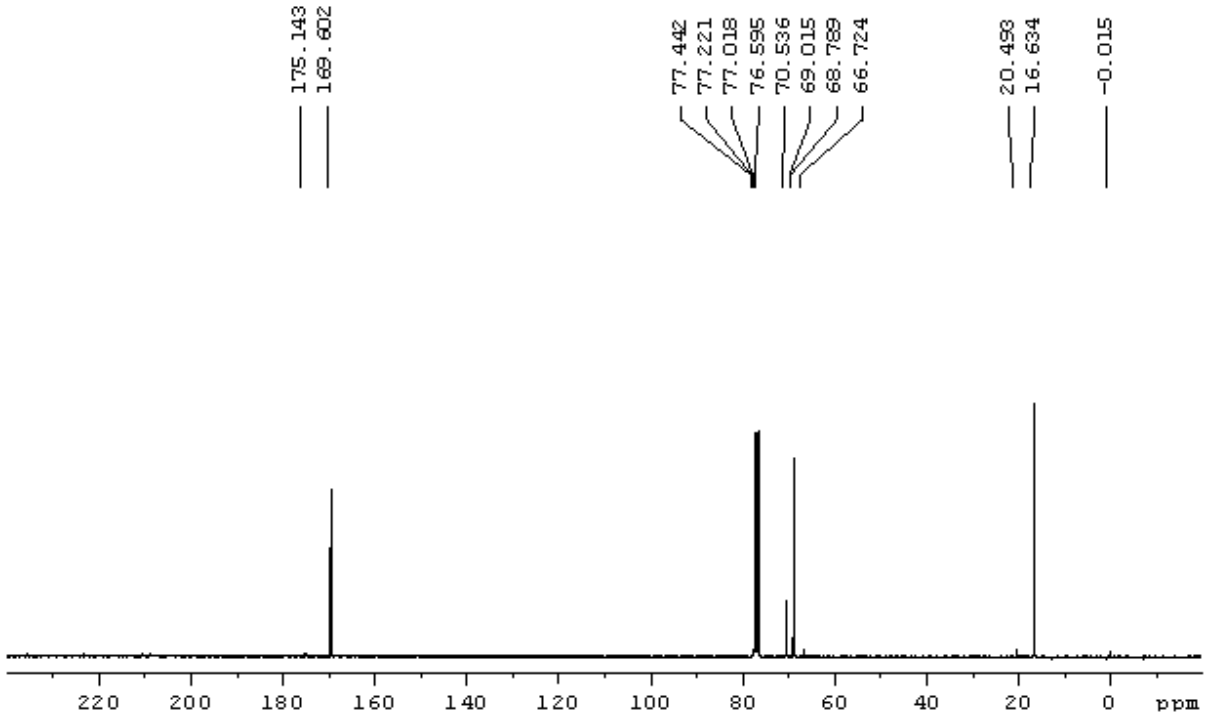

Figura 6.79: Espectro de ^{13}C-NMR do microencapsulado 6 em clorofórmio deuterado.

O estudo de NMR de copolímeros no formato de triblocos e em microencapsulados torna-se útil na possível confirmação de interação química ou não entre os segmentos formadores dos copolímeros e em sistemas microencapsulados. (HRKACH *et al*., 1997; WALDERHAUG & SÖDERMAN, 2009).

Nos materiais desenvolvidos (microencapsulados 4 e 6) não foi possível verificar o microencapsulado da tetraciclina nos copolímeros devido à reduzida solubilidade da tetraciclina no clorofórmio. Ao preparar as amostras para as análises de NMR duas fases foram observadas: o copolímero solúvel em clorofórmio deuterado e a tetraciclina insolúvel no referido solvente.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

- ✓ Copolímeros de PLLA-PEG-PLLA foram obtidos a partir do sistema reacional PEG (coiniciador), 2-etil-hexanoato de estanho (catalisador) e lactídeo (monômero). O microencapsulamento da tetraciclina nos copolímeros sintetizados foi realizado pelo método de dupla emulsão por evaporação do solvente diclorometano. Todos os materiais desenvolvidos apresentaram-se na forma sólida (em pó), sendo adequados para a preparação de micelas em meio aquoso, portanto viáveis para o uso como DDS;

- ✓ Não foi evidenciado crescimento de colônias nos copolímeros sintetizados, contagem total de mesófilos aeróbios < 10 UFC/g, indicando que os copolímeros não causam riscos microbiológicos à saúde do consumidor;

- ✓ SEM mostrou que existiram mudanças morfológicas devido à existência de tamanhos diferentes do segmento PLLA, pois a estrutura morfológica entres os copolímeros 1 e 3 foi mais homogênea entre si, com a presença de pequenos poros e morfologia globular, enquanto que a morfologia do copolímero 2 é diferente, apresentando maior heterogeneidade e presença de aglomerados, possivelmente devido a maior quantidade do segmento PEG em sua composição que nos outros copolímeros desenvolvidos. SEM e OM confirmaram a formação de partículas esferoidais e de tamanho na faixa micrométrica das micelas obtidas, forma e tamanho estes de interesse para uso como DDS;

- ✓ A técnica LALLS verificou que o perfil de distribuição dos microencapsulados ficou localizado na faixa de 10-60μm com um percentual maior concentrado na faixa menor que 40μm, exceto para o microencapsulado 7 com percentual concentrado na faixa de 30-50μm (tal microencapsulado foi formulado com maior concentração de fase aquosa na dupla emulsão).

- ✓ A TG/DTG mostrou que os copolímeros possuem dois estágios de decomposição distintos e com temperaturas iniciais de decomposição menores que seus homopolímeros (PLLA e PEG). O copolímero 3 apresentou estabilidade térmica maior em relação aos outros copolímeros, pois sua temperatura inicial de decomposição foi de 215ºC, comparado com 200ºC e 190ºC para os copolímeros 1 e 2, respectivamente.

Os microencapsulados mantiveram o perfil de decomposição térmica similar aos copolímeros de origem. O primeiro estágio é caracterizado pela despolimerização do ciclo PLLA e o segundo, a cisão térmica do segmento PEG, enfatizados nos picos endotérmicos observados nas curvas de DTA. As perdas mássicas e as temperaturas de degradação menores estão relacionadas à composição e às interações dos segmentos PLLA e PEG na matriz copolimérica, devido à contribuição entrópica para a energia livre da mistura, mesmo com perfil térmico de decomposição diferente para o fármaco analisado (tetraciclina) com resíduo final em torno de 27% de massa a 700ºC;

- ✓ DSC indicou a presença de eventos exotérmicos de cristalização nos copolímeros 1 e 3 (T_c em torno de 90ºC para ambos) e de eventos endotérmicos de fusão com valores de T_m de 144/152ºC, 148ºC e 153ºC para os copolímeros 1, 2 e 3, respectivamente. As curvas de DSC dos microencapsulados apresentaram um perfil térmico diferente em relação aos seus copolímeros originais, pois os microencapsulados originados do copolímero 1 não apresentaram evento exotérmico de cristalização, enquanto os microencapsulados originados do copolímero 2 apresentaram evento de cristalização com T_c em torno de 75ºC e os microencapsulados originados do copolímero 3 manteve a presença de evento de cristalização, porém em temperatura menor em relação ao seu copolímero de origem com T_c em torno de 70ºC.

- ✓ A técnica de XRD confirmou a existência de propriedades cristalinas para os copolímeros 1 e 3 com valores de 2θ (dos picos de maior intensidade) de 16,5º e 18,85º para o copolímero 1 e de 16,6º e 18,9º para o copolímero 3. O microencapsulado 3 apresentou perfil similar do difratograma de seu copolímero de origem, com valores de 2θ (dos picos de maior intensidade) de 16,65º e 19º.

- ✓ FTIR-ATR indicou que a ligação entre os segmentos de PLLA e PEG tem grande possibilidade de ser covalente, pois: a banda de 3500 cm^{-1} (grupamento O-H) praticamente desapareceu (exceto para o copolímero 2); os picos de 2940 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} (estiramento C-H) indicam que o segmento PEG foi modificado; pico de absorção de 1756 cm^{-1} (estiramento C=O) é característico ao segmento PLLA e as bandas de absorção de 1183 cm^{-1} e de 1086 cm^{-1} pertencem, respectivamente, ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-O-C. Nos microencapsulados foi

evidenciado a presença das absorções características citadas anteriormente, indicando que a ligação covalente entre os blocos PEG e PLLA se manteve, mesmo após as etapas físicas de formulação dos microencapsulados com a tetraciclina. Os espectros dos microencapsulados indicam que a tetraciclina pode não estar na superfície dos copolímeros e sim encapsulada nos mesmos, pois não ocorreu nenhuma interação química entre os mesmos.

- ✓ Os deslocamentos químicos (δ) em ppm observados por ^{1}H-NMR e ^{13}C-NMR nos espectros dos microencapsulados 4 e 6 (originados dos copolímeros 1 e 3, respectivamente) são similares aos espectros típicos de copolímeros PLLA e PEG encontrados na literatura e diferentes dos espectros da tetraciclina. Não foi possível observar o microencapsulamento da tetraciclina nos copolímeros devido a reduzida solubilidade da mesma no clorofórmio deuterado.

- ✓ Os microencapsulados desenvolvidos são sugeridos a serem utilizados como sistema de proteção para o fármaco tetraciclina, surgindo, assim, um interessante DDS.

CAPÍTULO 8

SUGESTÕES

- ✓ Determinar a eficiência percentual de encapsulação da tetraciclina nos sistemas microencapsulados desenvolvidos;

- ✓ Estudar o perfil de liberação do fármaco em diferentes pH's (por exemplo: pH 1,2 e 6,8) proposto pela método da Farmacopéia Americana, correlacionando o mecanismo envolvido na liberação deste fármaco a diferentes modelos matemáticos aplicados (exemplos: ordem zero, primeira ordem e Higuchi);

- ✓ Utilização de outros fármacos (hidrofóbicos e hidrofílicos), polissacarídeos ou outros materiais de interesse científico e tecnológico nos copolímeros sintetizados.

REFERÊNCIAS

AAEMER, K. A.; SARDINA, H. A.; TEW, G. N.; BHATIA, S. R. Rheological studies of PLLA-PEO-PLLA triblock copolymer hydrogels. **Biomaterials**, v. 25, n. 6, p. 1087-1093, 2004.

AGRAWAL, S. K.; SANABRIA-DELONG, N.; COBURN, J. M.; TEW, G. N.; BHATIA, S. R. Novel drug release profiles from micellar solutions of PLA-PEO-PLA triblock copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 112, p. 64-71, 2006.

ALLENDER, C. J.; RICHARDSON, C.; WOODHOUSE, B.; HEARD, C. M.; BRAIN, K. R. Pharmaceutical applications for moleculary imprinted polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 195, p. 39-43, 2000.

BADAMI, A. S. **Bioresorbable Electrospun Tissue Scaffolds of Poly(ethylene glycol-*b*-lactide) Copolymers for Bone Tissue Engineering**. Tese de Mestrado, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, 2004.

BAE, Y. H.; HUH, K. M.; KIM, Y.; PARK, K-H. Biodegradable amphiphilic multiblock copolymersand their implications for biomedical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 64, p. 3-13, 2000.

BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, 2008.

BELETSI, A.; LEONTIADIS, L.; KLEPETSANIS, P.; ITHAKISSIOS, D. S.; AVGOUSTAKIS, K. Effect of preparative variables on the properties of poly(*d,l*-lactide-*co*-glycolide)-methoxypoly(ethyleneglycol) copolymers related to their application in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, p. 187-197, 1999.

BERCHANE, N. S.; CARSON, K. H.; RICE-FICHT, A. C.; ANDREWS, M. J. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: experiment and theory. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, p. 118-126, 2006.

BEZEMER, J. M. RADERSMA, R.; GRIJPMA, D. W.; DIJKSTRA, P. J.; BLITTERSWIJK, C. A. V.; FEIJEN, J. Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers 2. Modulation of release ratio. **Journal of Controlled Release**, v. 67, p. 249-260, 2000.

BHAW-LUXIMON, A.; JHURRY, D.; SPASSKY, N.; PENSEC, S.; BELLENEY, J. Anionic polymerization of *d,l*-lactide initoiated by lithium diisopropylamide**. Polymer**, v. 42, p. 9651-9656, 2001.

BHATTARAI, N.; BHATTARAI, S. R.; KHIL, M. S.; LEE, D. R.; KIM, H. Y. Aqueous solution properties amphiphilic triblock copolymer poly(p-dioxanon-co-l-lactide)-block-poly(ethylene glycol). **European Polymer Journal**, v. 39, p. 1603–1608, 2003.

BLANCO, M. D.; SASTRE, R. L.; TEIJÓN, C.; OLMO, R.; TEIJÓN, J. M. Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(*d,l*-lactide) and poly(*d,l*-lactide-*co*-glycolide) polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 326, p. 139-147, 2006.

BREITENBACH, A.; LI, Y. X.; KISSEL, T. Branched biodegradable polyesters for parenteral drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 64, p. 167–178, 2000.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 24ª edição, São Paulo, Artmed Editora, 2009, 554 p.

CANEVAROLO JR., S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. Artliber Editora Ltda. 448 p., São Paulo, 2003.

CAPAN, Y.; JIANG, G.; GIOVAGNOLI, S.; NA, K-H.; DELUCCA, P. P. Preparation and characterization of poly(*d,l*-lactide-*co*-glycolide) microspheres for controlled release of human growth hormone. **AAPS PharmScieTech**., v. 4, n. 2, article 28, Abr. 2003. Disponível em <http://www.pharmscitech.org>. Acesso em: 20 jan. 2009.

CASTRO, C. R. F. **Tomografia por Difração de Raios X em Tecidos Biológicos utilizando Radiação Síncronton.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Nuclear. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

CHEN, C.; YU, C. H.; CHENG, Y. C.; YU, P. H. F.; CHEUNG, M. K. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on amphiphilic poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol)-poly((3-hydroxybutyrate) triblock copolymer. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 2211-2220, 2006.

_____. Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymer based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers . **Biomaterials**, v. 27, p. 4804-4814, 2006.

CHOI, S-W.; KWON, H-Y.; KIM, W-S.; KIM, J-H. Thermodynamic parameters on poly(*d,l*-lactide-*co*-glycolide) particle size in emulsification–diffusion process**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 201, p. 283-289, 2002.

CHOI, Y.; KIM, S. Y.; KIM, S. H.; LEE, K-S.; KIM, C.; BYUN, Y. Long-term delivery of all-trans-retinoic acid using biodegradable PLLA:PEG-PLLA blended microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, p. 67-81, 2001.

D'ANGELO, S.; GALLETTI, P.; MAGLIO, G.; MALINCONICO, M.; MORELLI, P.; PALUMBO, R.; VIGNOLA, M. C. Segmented poly(ether-ester-amide)s based on poly(*l,l*-lactide) macromers. **Polymer**, v. 42, p. 3383-3392, 2001.

DEAMER, D. W. Membrane compartments in prebiotic evolution. In A. Brack (ed.) **The Molecular Origins of Life**. Cambridge University Press, Cambridge UK, p. 189-205, 1998.

DENG, C.; RONG, G.; TIAN, H.; TANG, Z.; CHEN, X.; JING, X. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*l*-lactide)-*b*-poly(*l*-glutamic acid) triblock copolymer. **Polymer**, v. 46, p. 653–659, 2005.

DENG, C.; CHEN, X.; YU, H.; SUN, J.; TIANCHENG, L.; JING, X. A biodegradable triblock copolymer poly(ethylene glycol)-*b*-poly(l-lactide)-*b*-poly(l-lysine): synthesis, self-assembly, and RGD peptide modification. **Polymer**, v. 48, p. 139-149, 2006.

DONG, C-M.; QIU, K-Y.; GU, Z-W.; FENG, X-D. Synthesis of star-shaped poly(*d,l*-lactic acid-alt-glycolic acid) with multifunctional initiator and $SnOct_2$ catalyst. **Polymer**, v. 42, p. 6891-6896, 2001.

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

_____. Quantitative analysis of biodegradable amphiphilic poly(*l*,lactide)-block-poly(ethyleneglycol)-block-poly(*l*-lactide) by using TG, FTIR and NMR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 85, n. 1, p. 173-177, 2006.

_____. Synthesis of polylactide-*b*-poly(ethylene glycol) copolymers. **Anais do 7º Congresso Brasileiro de Polímeros**, p. 676-677, 2006.

DRUMOND, W. S.; WANG, S. H. Amphiphilic polymeric nanoparticles. **Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, 2005. Disponível em <http://www.poli.usp.br/Organizacao/Departamentos/shownamedoc.asp?codpes=3023241>. Acesso em: 20 out. 2008.

EDLUND, U.; ALBERTSSON, A. C. Polyesters based on diacid monomers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 585-609, 2003.

ELLIS, T.S. Miscibility of Blends of Aliphatic Main-Chain Polyesters. **Macromolecules**, v. 28, p. 1882-1886, 1995.

FERNANDEZ-CARBALLIDO, A.; PASTORIZA, P.; BARCIA, E.; MONTEJO, C.; NEGRO, S. PLGA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: Characterization and cell viability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 50-57, 2008.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1-2, p. 1-18, 2004.

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

FRISBEE, S. E.; COLLIN, M. D.; McGINITY, J. W. Properties of aqueous pseudolatex dispersions of biodegradable polymers. **Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 441-470, 2ª edição, 2000.

GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N.; LUNARCI, L. O.; PITOL, D. L.; MACHADO, A. E. H. Identification of psolaren loaded PLGA microspheres in rat skin by light microscopy. **Micron**, v. 39, p. 40-44, 2008.

GONG, F.; CHENG, X.; WANG, S.; WANG, Y.; GAO, Y.; CHENG, S. Biodegradable Comb-dendritic Tri-block Copolymers Consisting of Poly(ethylene glycol) and Poly(L-lactide): Synthesis, Characterizations, and Regulation of Surface Morphology and Cell

Responses. **Polymer**, 2009. Disponível em <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em: 06 maio 2009.

GOVENDER, T.; RLEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 95-110, 2000.

GREF, R.; LÜCK, M.; QUELLEC, P.; MARCHAND, M.; DELLACHERIE, E.; HARNISCH, S.; BLUNK, T.; MÜLLER, R. H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 18, p. 301–313, 2000.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Materials**, v. 48, p. 263-277, 2000.

GUPTA, A. P.; KUMAR, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 10, p. 4053-4074, 2006.

HAN, S. K.; NA, K.; BAE, Y. H. Sulfonamide based pH-sensitive polymeric micelles: physicochemical characteristics and pH-dependent aggregation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 214, p. 49-59, 2003.

HASIRCI, V.; LEWANDROWSKI, K.; GRESSER, J. D.; WISE, D. L.; TRANTOLO, D. J. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo aplication. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 135-150, 2001.

HE, G.; MA, L. L.; PAN, J.; VENKATRAMAN, S. ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: A comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, p. 48–55, 2006.

HEALD, C. R.; STOLNIK, S.; DE MATTEIS, C.; GARNETT, M.C.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S.; LEEMAKERS, F. A. M. Self-consistent field modelling of poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) particles. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 179, p. 79-91, 2001.

HELWIG, E.; SANDNER, B.; GOPP, U.; VOGT, F.; WARTEWIG, S.; HENNING, S. Ring-opening polymerization of lactones in the presence of hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 22, p. 2695-2702, 2001.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, p. 1014-1024, 2002.

HIEMSTRA, C.; ZHONG, Z. Y.; JIANG, X.; HENNINK, W. E.; DIJKSTRA, P. J.; FEIJEN, J. PEG–PLLA and PEG–PDLA multiblock copolymers: Synthesis and in situ hydrogel formation by stereocomplexation. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 2, p. e17-e19, 2006.

HIEMSTRA, C.; ZHONG, Z. Y.; VAN TOMME, S. R.; HENNINK, W. E.; DIJKSTRA, P. J.; FEIJEN, J. Protein release from injectable stereocomplexed hydrogels based on PEG–

PDLA and PEG–PLLA star block copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 2, p. e19-e21, 2006.

HIEMSTRA, C.; ZHONG, Z. Y.; VAN TOMME, S. R.; VAN STEENBERGEN, M. J.; JACOBS, J. J. L.; OTTER, W. D.; HENNINK, W. E.; FEIJEN, J. In vitro and in vivo protein delivery from in situ forming poly(ethylene glycol)–poly(lactide) hydrogels. **Journal of Controlled Release**, v. 119, p. 320–327, 2006.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 3-12, 2002.

HONG, Z.; REIS, R. L.; MANO, J. F. Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly(l-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1297-1306, 2008.

HRKACH, J. S.; PERACCHIA, M. T.; BOMB, A.; LOTAN, N.; LANGER, R. Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by ^{1}H NMR spectroscopy. **Biomaterials**, v. 18, p. 27-30, 1996.

HUANG, Y-Y.; CHUNG, T-W.; TZENG, T-W. Drug release from PLA/PEG microparticulates. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p. 9-15, 1997.

_____. A method using biodegradable polylactides/polyethylene glycol for drug release with reduced initial burst. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, p. 93-100, 1999.

HUH, K. M.; CHO, Y. W.; PARK, K. PLGA-PEG Block Copolymers for Drug Formulations. **Drug Delivery Technology**, v. 3, p. 42-49, 2003.

INAI, R.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Structure and Properties of Electrospum PLLA Single Nanofibers. **Nanotechnology**, v. 16, p. 208-213, 2005.

ISO13320, Particle **Size Analysis – Laser Diffraction Methods** Part 1: General Principles, ISO Standards Authority, 1999.

JACKSON, J. K.; HUNG, T.; LETCHFORD, K.; BURT, H. M. The characterization of paclitaxel-loaded microspheres manufactured from blends of poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) and low molecular weight diblock copolymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, p. 6-17, 2006.

JACOBSEN, S.; FRITZ, H. G.; DEGÉE, Ph.; DUBOIS, Ph.; JÉROME, R. Single-step reactive extrusion of PLLA in a corotating twin-screw extruder promoted by 2-ethylhexanoic acid tin (II) salt and thiphenylphosphine. **Polymer**, v. 41, p. 3395-3403, 2000.

_____. New developments on the ring opening polymerisation of polylactide. **Industrial Crops and products**, v. 11, p. 265-275, 2000.

JARRET, P.; LALOR, C. B.; CHAN, L.; REDMON, M. P.; HICKEY, A. J. Micelle formation and reaction kinetics of a bioabsorbable polyethylene glycol-oligolactide ABA block copolymer hydrogel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 17, p. 11-21, 2000.

JEON, H-J.; JEONG, Y-H.; JANG, M-K.; PARK, T-H. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(*d,l*-lactide-*co*-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 207, p. 99–108, 2000.

JEONG, B.; BAE, Y. H.; KIM, S. W. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG–PLGA–PEG triblock copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 63, p. 155–163, 2000.

JEONG, B.; KIM, S. W.; BAE, Y. H. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 37–51, 2002.

JÉRÔME, C.; LECOMTE, P. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1056–1076, 2008.

JEYANTHI, R.; METHA, B. C.; THANOO, P. P.; DeLUCA, P. P. Effect of processing parameters on the properties of peptide-cointaing PLGA microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, p. 103-174, 1996.

KANG, N.; LEROUX, J-C. Triblock and star-block copolymers of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide or N-vinyl-2-pyrrolidone and *d,l*-lactide: synthesis and self-assembling properties in water. **Polymer**, v. 45, p. 8967–8980, 2004.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 113-131, 2001.

KAWAGUCHI, H. Functional polymer microspheres. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1171-1210, 2000.

KAWASHIMA, Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 1-2, 2001.

KISSEL, T.; LI, Y.; UNGER, F. ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B- blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 99-134, 2002.

KIM, E. J.; CHO, S. H.; YUK, S. H. Polymeric microspheres composed of pH/temperature-sensitive polymer complex. **Biomaterials**, v. 22, n. 18, p. 2495–2499, 2001.

KIM, H. D.; BAE, E. H.; KWON, I. C.; PAL, R. R.; NAM, J. D.; LEE, D. S. Effect of PEG–PLLA diblock copolymer on macroporous PLLA scaffolds bythermally induced phase separation. **Biomaterials**, v. 25, p. 2319–2329, 2004.

KIM, H. K.; PARK, T. G. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(*l*-lactic acid) and amorphous poly(*d,l*-lactic-*co*-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 1, p. 115-215, 2004.

KIM, H. K.; CHUNG, H. J.; PARK, T. G. Biodegradable polymeric microspheres with “open/closed” pores for sustained release of human growth hormone. **Journal of Controlled Release**, v. 112, n. 2, p. 167-174, 2006.

KIM, S.; KIM, J-H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 420-430, 2009.

KOWLSKI, A.; DUDA, A.; PENCZEK, S. Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with Tin(II) octoate: polymerization of l,l-dilactide. **Macromolecules**, v. 33, p. 7359-7370, 2000.

KRICHELDORF, H. R.; KREISER-SAUNDERS, I.; BOETTCHER, C. Polylactones: 31. Sn (II)octoate-initiated polymerization of *l*-lactide: a mechanistic study. Polymer, v. 36, p. 1253-1259, 1995.

KRICHELDORF, H. R. Syntheses and application of polylactides. **Chemosphere**, v. 43, p. 49-54, 2001.

KUBIES, D.; RYPÁCEK, F.; KOVÁROVÁ, J.; LEDNICKÝ, F. Microdomain structure in polylactide-block-poly(ethylene oxide) copolymer films. **Biomaterials**, v. 21, n. 5, p. 529-536, 2000.

KUMAR, A.; SRIVASTAVA, A.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 10, p. 1205-1237, 2006.

KUMAR, N.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DOMB, A. J. Biodegradable block copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 23-44, 2001.

LEE, J. I.; YOO, H. S. Biodegradable microspheres containing poly(ε-caprolactone)-Pluronic block copolymers for temperature-responsive release of proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 61, n.1, p. 81-87, 2008.

LEE, J-W.; JEONG, E. D.; CHO, E. J.; GARDELLA JR., J. A.; HICKS JR., W.; HARD, R.; BRIGHT, F. V. Surface-phase preparation of PEO-containing biodegradable PLLA blends and block copolymers. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 5, p. 2360-2364, 2008.

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.

LI, S.; McCARTHY, S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (*d,l*-lactide). **Biomaterials**, v. 20, n. 1, p. 35-44, 1999.

LI, Y-P.; PEI, Y-Y.; ZHOU, Z-H.; ZHANG, X-Y.; GU, Z-H.; DING, J.; ZHOU, J-J.; GAO, X-J. PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor-a carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 287–296, 2001.

_____. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 203–211, 2001.

LI, X.; ZHANG, Y.; YAN, R.; JIA, W.; YUAN, M.; DENG, X.; HUANG, Z. Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly-*d,l*-lactide–poly(ethylene glycol) microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p. 41–52, 2000.

LIAO, W.; WEI, F.; LIU, D.; QIAN, M. X.; YUAN, G.; ZHAO, X. S. FTIR-ATR detection of proteins and small molecules through DNA conjugation. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 114, n. 1, p. 445-450, 2006.

LIGGINS, R. T.; BURT, H. M. Polyether–polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 191-202, 2002.

LIM, L-T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid). **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 820–852, 2008.

LIN, W-J.; JUANG, L-W.; LIN, C-C. Stability and release performance of a series of pegylated copolymers micelles. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 668-613, 2003.

LIU, L.; LI, C.; LI, X.; YUAN, Z.; AN, Y.; HE, B. Biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol)/polylactide triblock copolymer micelles as anticancer drug carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 80, p. 1976-1982, 2001.

LIU, T.; BURGER, C.; CHU, B. Nanofabrication in polymer matrices. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 5-26, 2003.

LUCKE, A.; TEβMAR, J.; SCHNELL, E.; SCHMEER, G.; GÖPFERICH, A. Biodegradable poly(*d,l*-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their useas biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 2361-2370, 2000.

LUO, X.; QIU, D.; HE, B.; WANG, L.; LUO, J. Biodegradable heparin-loaded microspheres: carrier molecular composition and microsphere structure. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 5, p. 373-381, 2006.

MALLARDÉ, D.; BOUTIGNON, F.; MOINE, F.; BARRÉ, E.; DAVID, S.; TOUCHET, H.; FERRUTI, P.; DEGHENGHI, R. PLGA–PEG microspheres of teverelix: influence of polymer type on microsphere characteristics and on teverelix in vitro release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 261, n. 1-2, p. 69-80, 2003.

MAO, S.; XU, J.; CAI, C.; GERMERSHAUS, O.; SCHAPER, A.; KISSEL, T. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, p. 137-148, 2006.

MARTINO, V.P.; RUSECKAITE, R. A.; JIMÉNEZ, A. Thermal and mechanical characterization of plasticized poly(l-lactide-co-d,l-lactide) films for food packaging. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 86, p. 707-712, 2006.

MATSUMOTO, A.; NAKADA, Y.; SAKURAI, K.; NAKAMURA, T.; TAKAHASHI, Y. Preparation of nanoparticles consisted of poly(*l*-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(*l*-lactide) and their evaluation in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, p. 93-101, 1999.

MATSUMOTO, A.; MATSUKAWA, Y.; SUZUKI, T.; YOSHINO, H. Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(dl-lactide-co-glycolide) and poly(dl-lactide). **Journal of Controlled Release**, v. 106, n. 1-2, p.172-180, 2005.

McGEE, J. P.; SINGH, M.; LI, X. M.; QIU, D. T. The encapsulation of a model protein in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles of various sizes: an evaluation of process reproducibility. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, p. 197-210, 1996.

McINNES, S. J. P.; THISSEN, H.; CHOUDHURY, N. R.; VOELCKER, N. H. New biodegradable materials produced by ring opening polymerisation of poly(*l*-lactide) on porous silicon substrates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 332, n. 2, p. 336-344, 2009.

METTERS, A. T.; ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N. Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-*b*-PLA hydrogel. **Polymer**, v. 41, n. 11, p. 3993-4004, 2000.

MI, F-L.; SHYU, S-S.; LIN, Y-M.; WU, Y-B.; PENG, C-K.; TSAI, Y-H. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug system: a new delivery system for protein. **Biomaterials**, v. 24, p. 5023-5036, 2003.

MOLINA, I.; LI, S.; MARTINEZ, M. B.; VERT, M. Protein release from physically crosslinked hydrogels of the PLA/PEO/PLA triblock copolymer-type. **Biomaterials**, v. 22, p. 363-369, 2001.

MORENO-CEREZO, J.M.; CÓRDOBA-DÍAZ, M.; CÓRDOBA-DÍAZ D.; CÓRDOBA-BORREGO, M. A stability study of tetracycline and tetracycline cyclodextrins in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 417-426, 2001.

MORTON, D. R. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th edition, Washington: American Public Health Association, p. 63-67, 2001.

MOTHÉ, C. G.; DRUMOND, W. S.; WANG, S. H. Phase behavior of biodegradable amphiphilic poly(*l,l*-lactide)-*b*-poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*l,l*-lactide). **Thermochimica Acta**, v. 445, p. 61-66, 2006.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. 2ª edição, São Paulo, Artliber Editora, 2009, 324 p.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D.; DRUMOND, W. S.; WANG, S. H. Thermal properties of amphiphilic biodegradable triblock copolymer of l,l-lactide and ethylene glycol. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, doi: 10.1007/s10973-009-0589-z.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. Síntese, caracterização e degradação in vitro do poli(*l*-ácido láctido). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

MURAKAMI, H.; KOBAYASHI, M.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles. **Powder Technology**, v. 107, p. 137–143, 2000.

NA, K.; LEE, K. H.; LEE, D. H.; BAE, Y. H. Biodegradable thermo-sensitive nanoparticles from poly(*l*-lactic acid)/poly(ethylene glycol) alternating multi-block copolymer for potential anti-cancer drug carrier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 115-122, 2006.

NAKADA, Y.; TUDOMI, R.; SAKIRAI, K.; TAKAHASHI, Y. Evaluation of long-circulating nanoparticles using biodegradable ABA triblock copolymers containing of poly(*l*-lactic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 109–117, 1998.

NGUYEN, C. A.; ALLÉMANN, E.; SCHWACH, G.; DOELKER, E.; GURNY, R. Synthesis of a novel fluorescent poly(*d,l*-lactide) end-capped with 1-pyrenebutanol used for the preparation of nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 217–222, 2003.

NGUYEN, C. A.; MARSAUD, V.; BOUCLIER, C.; TOP, S.; VESSIERES, A.; PIGEON, P.; GREF, R.; LEGRAND, Ph.; JAOUEN, G.; RENOIR, J-M. Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 347, p. 128–135, 2008.

NIU, X.; FENG, Q.; WANG, M.; GUO, X.; ZHENG, Q. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. **Journal of Controlled Release**, v. 134, p. 111–117, 2009.

OTSUKA, H.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. Surface characterization of functionalized polylactide through the coating with heterobifunctional poly(ethylene glycol)/polylactide block copolymers. Biomacromolecules, v. 1, p. 39-48, 2000.

_____. Self-assembly of poly(ethylene glycol)-based block copolymers for medical applications. **Current Opinión in Colloids**, v. 6, p. 3-10, 2001.

PALMIERI, G. F.; BONACUCINA, G.; MARTINO, P. D.; MARTELLI, S. Microencapsulation of semisolid ketoprofen/polymer microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 175–178, 2002.

PARK, J. S.; WO, D. G.; SUN, B. K.; CHUNG, H-M.; IM, S. J.; CHOI, Y. M.; PARK, K.; HUH, K. M.; PARK, K-H. In vitro and in vivo test of PEG/PCL-based hydrogel scaffold for cell delivery application. **Journal of Controlled Release**, v. 124, n. 1-2, p. 51–59, 2006.

PARK, S-J.; KIM, S-H. Preparation and characterization of biodegradable poly(l-lactide)poly(ethylene glycol) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 271, p. 336-341, 2004.

PENCO, M.; BIGNOTTI, F.; SARTORE, S.; D'ANTONE, S.; D'AMORE, A. Multiblock copolymers based on segments of poly(d,l-lactide-glycolic acid) and poly(ethylene glycol) or poly(ε-caprolactone): a comparison of their thermal properties and degradation behaviour. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 78, p. 1721-1728, 2000.

POHL, M.C. Light Scattering, **ASM Handbook,** v.l, p. 250-255, 1998.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 447-451, 2001.

PRICE, G. J.; LENZ, E. J.; ANSELL, C. W. G. The effect of high-intensity ultrasound on the ring-opening polymerisation of cyclic lactones. **European Polymer Journal**, v. 38, p.1753-1760, 2002.

PUAPERMPOONSIRI, U.; SPENCER, J.; van der WALLE, C. F. A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 26–33, 2009.

RAWLE, A. The importance of particle size to the coating industry Part I: Particle size measurement. **Advances in Colour Science and Technology**, v. 5 (1), p. 1-12, 2002.

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.

REN, J.; HONG, H-Y.; REN, T-B.; TENG, X-R. Preparation and characterization of magnetic PLA-PEG composite particles. **Materials Letters**, v. 29, p. 2655-2658, 2005.

REZENDE, C. A.; DUEK, E. A. Blendas de poli(ácido lático-*co*-ácido glicólico)/poli(ácido lático): degradação in vitro. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 36-44, 2003.

RIESS, G. Micellization of block copolymers. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 1107-1170, 2003.

RIGA, A. T.; TURNER, J. F.; O'CONNOR, A.; MOTHÉ, C. G.; ALEXANDER, K. S. Thermal analysis of model bio-polymers: poly-*l*-lactic acid and shedded snake skins. **American Pharmaceutical Reviews**, v. 40, p. 80-87, 2006.

RUAN, G.; FENG, S-S. Preparation and characterization of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol)–poly(lactic acid) (PLA–PEG–PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel. **Biomaterials**, v. 24, p. 5037–5044, 2003.

RYNER, M.; STRIDSBERG, K.; ALBERTSSON, A. C.; SCHENCK, H. V. Mechanism of ring-opening polymerization of 1,5-dioxepan-2-one and l-lactide with stannous 2-ethylhexanoate: a theoretical study. **Macromolecules**, v. 34, p. 3877-3881, 2001.

SANTOS, H.R.; PRADO, G.S.; VIDAL, C.M.S.; MONRUZZI, R.B.; CAMPOS, J.R. Aplicabilidade das técnicas de determinação de tamanho de partículas em sistemas de tratamento de água e esgoto sanitário. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9 (4), 2004.

SHARMA, R.K.; CHAN W.G.; SEEMAN, J.I.; HAJALIGOL, M.R. Formation of low molecular weight heterocycles and polycyclic aromatic compounds (PACs) in the pyrolysis of α-amino acids. **Journal of Analitical Applied Pyrolysis**, v. 66, p. 97-121, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SILVA, A. N. **Quantificação de Lipoproteínas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação Espectrofotmétrica de Compostos Orgânicos. 5ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1994, 387 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª edição, Porto Alegre, Editora Bookman, 2002, 836 p.

SOLARO, R. Nanostructured Polymeric Systems in Targeted Release of Proteic Drugs and in Tissue Engineering. **EU Forum on Nanosized Technology**. China, p. 225-244, 2002.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polimeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUZA, F. B.; OLIVEIRA, M. F.; LULA, I. S.; SANSIVIERO, M. T. C.; CÓRTES, M. E.; SINISTERRA, R. D. Study of inclusion compound in solution involving tetracycline and β-cyclodextrin by FTIR-ATR. **Vibrational Spectroscopy**, v. 46, n. 1, p. 57-62, 2008.

SÖDERGÅRD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid polymers and their correlaction with composition. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 1123-1163, 2002.

STOREY, R. F.; SHERMAN, J. W. Kinetics and mechanism of the stannous octoate-catalyzed bulk polymerization of ε-caprolactone. **Macromolecules**, v. 35, p. 1504-1512, 2002.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 15-40, 2006.

TANG, Y.; SINGH, J. Controlled delivery of aspirin: Effect of aspirin on polymer degradation and *in vitro* release from PLGA based phase sensitive systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1-2, p. 119-125, 2008.

TOBIO, M.; SÁNCHEZ, A.; VILA, A.; SORIANO, I.; EVORA, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 18, p. 315-323, 2000.

TOMME, S. R. V.; NOSTRUM, C. F. V.; DIJKSTRA, M.; SMEDT, S. C. D.; HENNINK, W. E. Effect of particle size and charge on the network properties of microsphere-based hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 522–530, 2008.

TORCHILIN, V. P. Structure and design of polymeric surfactant- based on drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 137-172, 2001.

TUFANO, D. **Guia Prático da Nova Ortografia**: Saiba o que mudou na ortografia brasileira. 1ª edição, São Paulo, Editora Melhoramentos Ltda, 2008, 32 p. Disponível em < http://www.livrariamelhoramentos.com.br/Guia_Reforma_Ortografica_Melhoramentos.pdf> Acesso em: 15 mar. 2010.

VENKATRAMAN, S. S.; JIE, P.; MIN, F.; FREDDY, B. Y. C.; LEONG-HUAT, G. Micelle-like nanoparticles of PLA–PEG–PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, p. 219–232, 2005.

VILA, A.; SÁNCHEZ, A.; TOBÍO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, p. 15-24, 2002.

VILA, A.; SANCHEZ, A.; ÉVORA, C.; SORIANO, I.; McCALLION, O.; ALONSO, M. J. PLLA-PEG particles as nasal protein carriers: the influence of the particle size. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 292, p. 43-52, 2005.

WALDERHAUG, H.; SÖDERMAN, O. NMR studies of block copolymer micelles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 171-177, 2009.

WANG, S.; MA, P.; WANG, R.; WANG, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Mechanical, thermal and degradation properties of poly(*d,l*-lactide)/poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate)/poly(ethylene glycol) blend. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 7, p. 1364-1369, 2008.

WANG, M.; CHEN, W.; ZHANG, H.; LI, X.; ZHANG, Y.; YAO, K.; YAO, F. Synthesis and characterization of PLLA–PLCA–PEG multiblock copolymers and their applications in modifying PLLA porous scaffolds. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 11, p. 4683-4694, 2006.

XU, X.; CHEN, X.; WANG, Z.; JING, X. Ultrafine PEG–PLA fibers loaded with both paclitaxel and doxorubicin hydrochloride and their in vitro cytotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 1, p. 18-25, 2009.

YAMAMOTO, Y.; YASUGI, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)–poly(*d,l*-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 359–371, 2002.

YANG, H. J.; PARK, I. S.; NA, K. Biocompatible microspheres based on acetylated polysaccharide prepared from water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double-emulsion method for

delivery of type II diabetic drug (exenatide). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 340, n. 1-3, p. 115-120, 2009.

YANG, L.; ALEXANDRIDIS, P. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 132-143, 2000.

YANG, Y-Y.; CHUNG, T-S.; NG, N. P. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. **Biomaterials**, v. 22, n. 3, p. 213-241, 2001.

YILDIZ, A.; OKYAR, A.; BAKTIR, G.; ARAMAN, A.; ÖZSOY, Y. Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on poly(lactic acid). **II Farmaco**, v. 60, p. 919–924, 2005.

YIN, W.; YATES, M. Z. Encapsulation and Sustained Release from Biodegradable Microcapsules made by Emulsification/Freeze Drying and Spray/Freeze Drying. **Journal of Colloid and Interface Science**, accepted manuscript, Ab. 2009.

YUAN, J.; LI, Y.; LI, X.; CHENG, S.; JIANG, L.; FENG, L.; FAN, Z. The 'crew-cut' aggregates of polystyrene-b-poly(ethylene glycol)-b-polystyrene triblock copolymers in aqueous media. **European Polymer Journal**, v. 39, p. 767-776, 2003.

ZHANG, H.; ROBERTS, C. J.; SHAKESHEFF, K. M.; DAVIES, M. C.; TENDLER, S. J. B. Micro and macrothermal analysis of a bioactive surface-engineered polymer formed by physical entrapment of poly(ethylene glycol) into poly(lactic acid). **Macromolecules**, v. 36, p. 1215-1221, 2003.

ZHOU, S.; LIAO, X.; LI, X.; DENG, X.; LI, H. Poly-*d,l*-lactide–*co*-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 86, p. 195–205, 2003.

ZHU, W.; XIE, W.; TONG, X.; SHEN, Z. Amphiphilic biodegradable poly(CL-*b*-PEG-*b*-CL) triblock copolymers prepared by novel rare earth complex: synthesis and crystallization properties. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 3522-3530, 2006.