

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. COPOLÍMEROS EM BLOCO

Polímeros são substâncias de alta massa molecular constituídas de unidades repetitivas (substâncias com moléculas de cadeia curta contendo relativamente poucos monômeros são chamadas oligômeros). Uma macromolécula não é necessariamente um polímero, como é o caso de alguns macrociclos e do carbono (grafite, diamante, fulereno). A palavra polímero é de origem grega, onde *poli* = muitos e *meros* = partes. Eles devem suas propriedades peculiares ao seu tamanho, sua forma tridimensional e, algumas vezes, à sua assimetria. Eles são encontrados largamente na natureza, incluem uma série de funções orgânicas e desempenham importante papel biológico (carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos) e industrial (como a celulose das plantas, principal constituinte do papel, e o poliisopreno, da borracha natural). No entanto, visando propriedades que se apliquem aos interesses de vários ramos da indústria (petrolífero, farmacêutico, têxtil, de construção etc.), polímeros também têm sido sintetizados em escala laboratorial e industrial. Alguns polímeros sintéticos do nosso cotidiano são: polietileno, polipropileno, poliéster, TEFLON® (politetrafluoretileno), EVA (copolímero de etileno e acetato de vinila, Figura 1a) e PEG (polietileno glicol, Figura 1b). A reatividade química dos polímeros depende da química de suas unidades monoméricas, mas suas propriedades dependem em grande parte da maneira como os monômeros são reunidos; é esse fato que leva à versatilidade dos polímeros sintéticos (Stevens, 1999).

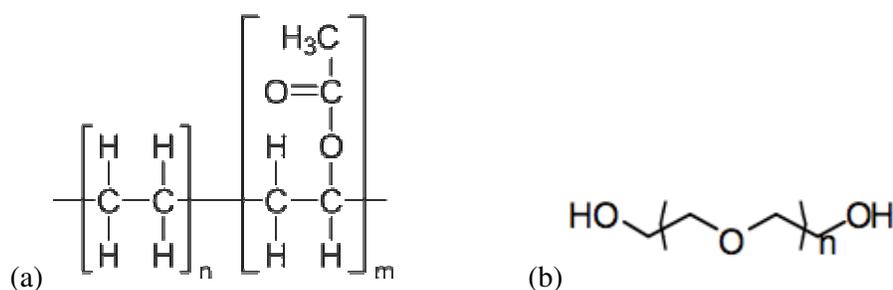


Figura 1. Estrutura química do (a) EVA e do (b) PEG.

Polímeros que contêm apenas uma unidade monomérica são chamados de homopolímeros (por exemplo, o PEG), enquanto os que contêm duas ou mais unidades monoméricas diferentes são conhecidos como copolímeros. De acordo com a disposição de

seus monômeros, os copolímeros podem ser divididos em quatro classes: em bloco, alternado, estatístico, e enxertado (Yokoyama, 1992). Os copolímeros em bloco são formados por uma sequência de monômeros A ligados covalentemente a uma sequência de monômeros B, como é o caso do EVA (formado por um bloco de polietileno e um bloco de poliacetato de vinila). Os copolímeros em bloco podem ser classificados em grupos, de acordo com a disposição de seus blocos, como mostra a Figura 2:

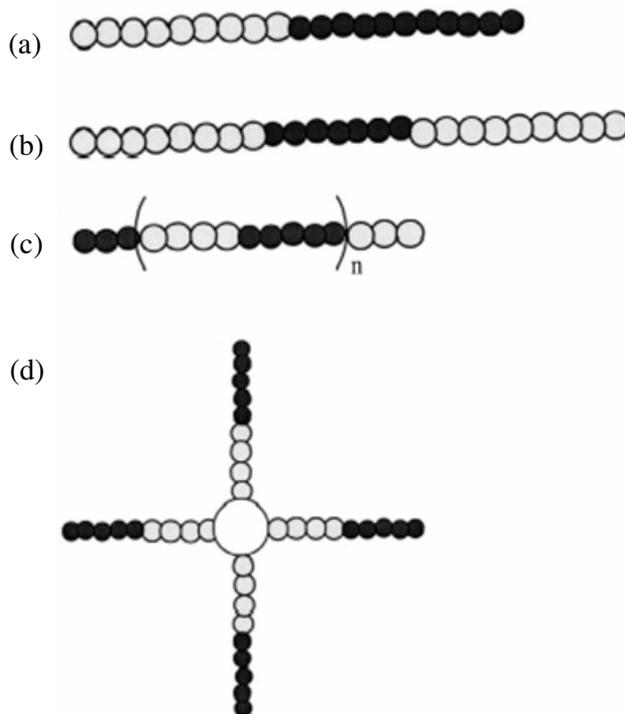


Figura 2. Diferentes tipos de copolímeros em bloco: a) dibloco, b) tribloco, c) multibloco e d) estrela (Kumar, Ravikumar e Domb, 2001).

O mais simples copolímero em bloco é o tipo  $A_mB_n$ , onde o homopolímero  $A_m$  encontra-se ligado ao homopolímero  $B_n$  sendo chamado de copolímero dibloco (Figura 2a). O segundo tipo de copolímero, chamado de tribloco, é constituído do homopolímero  $B_n$  com ambas as terminações ligadas a homopolímeros  $A_m$  (Figura 2b). No terceiro tipo, os segmentos  $A_m$  e  $B_n$  ligados são repetidos muitas vezes e é chamado de multibloco (Figura 2c). O quarto tipo de copolímero em bloco é chamado de estrela, onde a unidade  $A_m$  com muitos braços funcionalizados copolimeriza em bloco com os blocos  $B_n$  e apresenta-se na forma de estrela. O número de braços no copolímero em bloco estrela depende do número de grupos funcionais no bloco A (Figura 2d) (Kumar, Ravikumar e Domb, 2001).

## 1.2. SÍNTESE DOS COPOLÍMEROS

Os copolímeros em bloco são sintetizados por reação de polimerização de adição, que podem ser do tipo radicalar, aniônica, catiônica. Dentre elas a polimerização de adição aniônica é a mais utilizada na síntese de copolímeros (Matyjaszewski e Müller, 2006). As principais etapas dessa reação são:

- Iniciação
- Propagação
- Terminação

A Figura 3 ilustra as etapas de iniciação e propagação de um dibloco contendo polióxido de estireno. Esse tipo de reação é classificada como polimerização viva: uma polimerização de cadeia onde a transferência de cadeias e a terminação da cadeia são ausentes (Living polymerization, 2009). A velocidade de terminação da cadeia é nula, e a velocidade de iniciação é bem maior que a de propagação. Reações desse tipo têm a vantagem de conferir um índice de polidispersividade bem próximo a 1 (os comprimentos das cadeias formadas são bem próximos entre si), predefinir a massa do polímero a ser formado a partir da massa de monômeros e iniciador colocados na reação, além do controle sobre os grupos terminais. Esse tipo de reação foi primeiro demonstrado por Michael Szwarc em 1956 (Matyjaszewski e Müller, 2006; Szwarc, 1956).

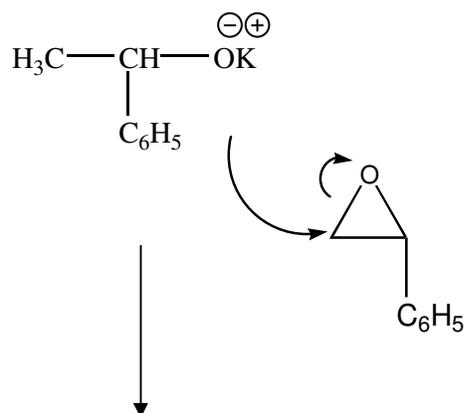
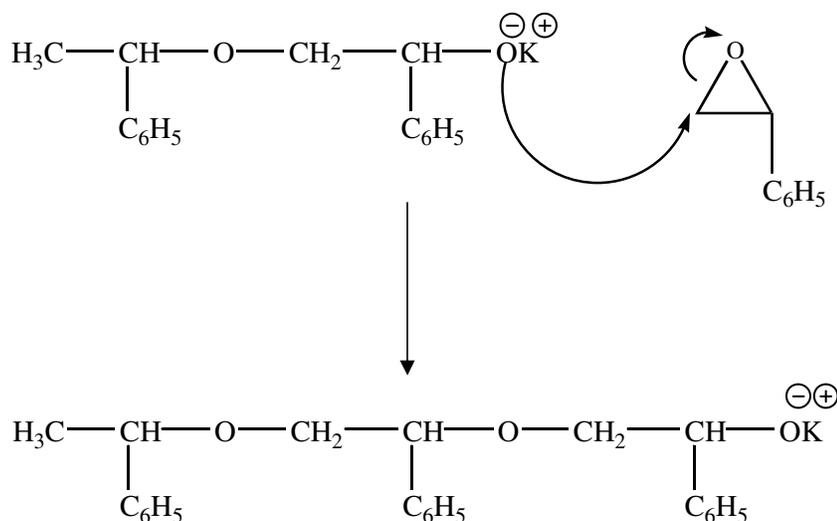
**Iniciação****Propagação**

Figura 3. Mecanismo de polimerização do precursor polióxido de estireno usando iniciador monofuncional ativado por hidróxido de potássio para originar um copolímero com arquitetura do tipo dibloco.

Quando os monômeros da reação são cíclicos, a reação também é classificada como reação de polimerização aniônica por abertura de anel. Esse é o caso da síntese de copolímeros de óxido de alqueno do tipo  $E_mS_n$ ,  $E_mCL_n$ ,  $E_mP_nE_m$ ,  $E_mS_nE_m$ , que podem ser produzidos pela adição sequencial dos seu monômeros óxido de etileno – E, óxido de propileno – P, óxido de estireno – S, e  $\epsilon$ - caprolactona – CL (Figura 4).

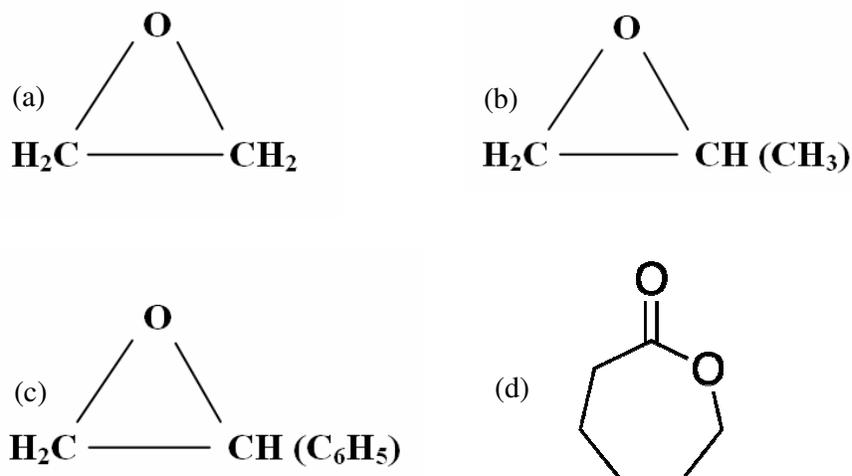


Figura 4. Estrutura dos monômeros (a) óxido de etileno, (b) óxido de propileno, (c) óxido de estireno e (d)  $\epsilon$ -caprolactona.

A reação de síntese desses copolímeros com bloco hidrofílico de poli(óxido etileno) também pode ser feita partindo-se do óxido de etileno já polimerizado, o monometóxi polietileno glicol (mPEG).

Os copolímeros desse estudo foram preparados usando copolimerização de sequência aniônica, a qual promove melhor estabilidade do crescimento da cadeia aniônica final.

Na polimerização aniônica dos copolímeros do tipo dibloco e tribloco o tamanho do copolímero depende da quantidade de monômero iniciador. O monômero é primeiramente convertido em seu polímero, via um iniciador mono ou difuncional sob condições reacionais controladas. A cadeia polimérica apresenta um ou ambos grupos terminais ativados. A reatividade da cadeia final será então ativada com iniciador para junção e polimerização do segundo monômero, produzindo assim um copolímero di- ou tribloco composto por unidades discretas de blocos. Além disso, a ausência de terminações laterais reacionais permite sínteses únicas de copolímeros com estruturas predeterminadas e distribuição de massa molar limitada. O óxido de etileno e o óxido de estireno (epóxidos) são exemplos de dois monômeros que podem sofrer polimerização de sequencia aniônica para formar poliéteres.

Epóxidos são compostos éteres cíclicos com anéis de três membros (Solomons, 2009). Óxido de etileno (Figura 4a) é o exemplo mais simples de epóxido. Neste, o ataque nucleofílico seletivo em um dos átomos de carbono promove uma série de monômeros disponíveis para síntese de copolímeros em bloco. O ataque nucleofílico na molécula inicial resulta numa quebra heterolítica, gerando um alcóxido. Esse novo ânion também age como

excelente nucleófilo, reagindo com outra molécula de epóxido, propiciando o crescimento da cadeia polimérica. Essa é uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (SN2) como relatou Santacesaria e col. (1990). Epóxidos substituídos, tal como óxido de estireno (Fig 4b), são atacados predominantemente no carbono primário menos substituído, face aos impedimentos estéricos.

O uso de nucleófilos sem catálise promove uma cadeia de difícil propagação e razão reacional baixa, com pouca extensão da cadeia, caso ocorra. A presença de íons alcóxidos deve ser mantida durante todo o curso da reação para produção de cadeias mais longas e, portanto, de massa molares maiores. Isso é atingido por adição de base forte ao sistema.

Quando a polimerização do precursor está completa, o polímero “suporte” estará pronto para adição do segundo monômero para completa síntese do copolímero em bloco. Para alcançar blocos discretos com limitada distribuição de massa molar, o segundo monômero é adicionado somente quando a concentração do primeiro estiver reduzida a zero, isto é, quando todo o monômero for convertido a polímero. A natureza das cadeias do polímero precursor implica a não necessidade de iniciador quando o segundo monômero é adicionado.

A força para quebra de anéis na polimerização de monômeros cíclicos chega a tensionar a estrutura do anel. A tensão imposta ao anel é devido ao ângulo de deformação entre as ligações e a pequena tensão no anel aumenta a sua estabilidade. Monômeros cíclicos, tal como o 1,2-epóxido, têm uma alta tensão no anel, o que os torna menos estáveis e promove um processo de quebra termodinamicamente favorável. Para grandes moléculas cíclicas, por exemplo, a  $\epsilon$ -caprolactona, a tensão no anel é baixa; a repulsão entre os átomos vizinhos e a repulsão estérica entre heteroátomos e grupos funcionais axiais favorecem o processo de polimerização.

Após a síntese, o copolímero em bloco precisa ser caracterizado, visando conhecer sua massa molar real, assim como sua distribuição e a seqüência real dos blocos no copolímero formado.

Uma extensa faixa de copolímeros di- e tribloco de óxido de etileno / óxido de estireno tem sido sintetizada utilizando a técnica de ampolas a alto vácuo (Attwood, Zhou e Booth, 2007). Os copolímeros são caracterizados usando (RMN  $^{13}\text{C}$ ) para confirmação da estrutura do copolímero e obtenção da massa molar numérica média.

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é usada para obtenção da distribuição por tamanho das massas molares dos blocos individuais e do copolímero como um todo.

### 1.3. MICELIZAÇÃO

Há muitos copolímeros em bloco que apresentam caráter anfifílico, ou seja, possuem um bloco de maior caráter apolar (hidrofóbico) e outro bloco de maior caráter polar (hidrofílico). Tais substâncias, em solução aquosa (ou em um solvente seletivo para apenas uma das porções), tendem a se concentrar nas interfaces do sistema por adsorção, pois minimizam as interações desfavoráveis e/ou maximizam as interações favoráveis, visando reduzir a energia livre do sistema onde se encontram. Por esse motivo elas são chamadas de surfactantes (*surface active agents*, que significa *agentes de superfície ativa*) (Myers, 1992). Uma das conseqüências desse fenômeno de interfaces é a redução da tensão superficial da água, o que aumenta o seu poder de “molhabilidade”. Esse é o princípio do uso do detergente de cozinha, cujo princípio ativo é um sal de ácido sulfônico.

À medida que a concentração do surfactante aumenta em uma solução, as interfaces do sistema começam a se saturar, e a estabilização do sistema pode continuar por outros mecanismos, como a cristalização, precipitação, ou a formação de vesículas e/ou micelas do surfactante (Myers, 1992). De uma forma simples, a formação desses agregados moleculares ou micelas (Figura 5) estáveis em solução aquosa é impulsionada pela hidrofobicidade das porções apolares de suas moléculas, e pela hidrofiliicidade das porções polares. Dessa maneira, em solução aquosa, essas moléculas se agregam de formas variadas (esféricas, cilíndricas, lamelares e em disco; Myers, 1992) com sua porção hidrofóbica constituindo a parte interna (núcleo) e a porção hidrofílica, a parte externa (corona).

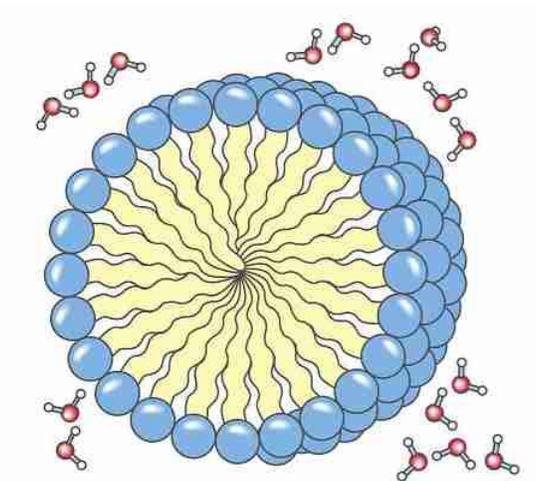


Figura 5. Estrutura simplificada de uma micela esférica em meio aquoso (Micelas y Liposomas, 2009).

Há dois modelos clássicos que explicam o processo de micelização: o modelo de ação das massas, onde as micelas e suas espécies formadoras estão em uma espécie de equilíbrio químico, e o modelo de separação de fases, onde as micelas são consideradas uma nova fase formada no sistema a partir de uma dada concentração, a concentração micelar crítica (CMC). A análise dos dois modelos produz praticamente os mesmos resultados gerais em termos energéticos de formação de micelas, sendo a escolha do modelo uma questão de preferências e circunstâncias. Há evidências de que a atividade em solução da molécula livre do surfactante cresce após a CMC, o que apóia o modelo de ação das massas; contudo, este detalhe é de pouca relevância para a maioria dos estudos.

No modelo de ação das massas, considera-se que existe um equilíbrio entre as moléculas livres do surfactante e as suas micelas. No caso de surfactantes não iônicos, o equilíbrio pode ser escrito assim:



$$K_m = [S_n]_{eq} / [S]_{eq}^n \quad (2)$$

onde  $n$  é chamado de número de agregação da micela,  $K_m$  é a constante de equilíbrio, as expressões em colchetes são as concentrações molares das espécies, e o subíndice *eq* denota o equilíbrio.

Neste modelo, a concentração a partir da qual o surfactante preferencialmente se agrega em micelas ao invés de ficar livre em solução é chamada de concentração micelar crítica (CMC), onde o número de moléculas agregadas é aproximadamente igual ao número de moléculas livres em solução. A energia livre padrão para a micelização por mol de micelas é dada por:

$$\Delta G_m^\circ = -RT \ln K_m \quad (3)$$

Substituindo em (3) o valor de  $K_m$  dado em (2), pode-se obter a seguinte expressão:

$$\Delta G_m^\circ = RT \ln [S_n]_{eq} + nRT \ln [S]_{eq} \quad (4)$$

E a energia livre padrão por mol de moléculas livres é:

$$\frac{\Delta G_m^\circ}{n} = -\frac{RT}{n} \ln [S_n]_{eq} + RT \ln [S]_{eq} \quad (5)$$

Na CMC tem-se que  $[S_n]_{eq} \leq [S]_{eq} \approx \text{CMC}$ , e considerando um  $n$  suficientemente grande, de uma forma aproximada, a expressão da energia livre padrão de micelização para 1 mol de surfactante pode ser simplificada da seguinte maneira:

$$\frac{\Delta G_m^\circ}{n} = \Delta G^\circ \approx RT \ln \text{CMC} \quad (6)$$

Quanto à variação de entalpia, o processo de micelização, em geral, é exotérmico ( $\Delta H < 0$ ), mas também pode ser endotérmico ( $\Delta H > 0$ ), como é o caso de vários copolímeros em bloco. Se o processo é endotérmico, a CMC do surfactante diminui com o aumento da temperatura, e quando é exotérmico, a CMC cresce com o aumento da temperatura. Quanto à variação de entropia, também contribui para a sua espontaneidade. Quanto à variação de entropia ( $\Delta S$ ), observa-se que ela é sempre positiva e suficiente para compensar qualquer entalpia positiva e tornar o processo espontâneo ( $\Delta G < 0$ ), como mostra a equação a seguir:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

Dessa forma, diz-se que micelização é um processo dirigido pelo aumento de entropia. A causa para a entropia positiva não é inteiramente claro, mas uma contribuição muito provável envolve a configuração das cadeias hidrocarbônicas do núcleo da micela, que provavelmente tem maior liberdade de movimento no interior da micela do que quando em contato com a água (Shaw, 1992). Para a variação de entalpia do processo, têm-se as seguintes expressões em função da relação entre CMC e temperatura (Myers, 1992; Kelarakis e col., 1998):

$$-\Delta H_m^\circ = RT^2 (d \ln \text{CMC} / dT) \quad \text{ou} \quad \Delta H_m^\circ = R [d \ln \text{CMC} / d(1/T)] \quad (8)$$

A equação (8) se aplica ao equilíbrio apresentado em (1) apenas quando  $n$  é independente da temperatura. O estado padrão das espécies (moléculas livres e micelas) é uma solução ideal diluída na concentração de 1 mol/L.

A CMC de um surfactante é um de seus parâmetros mais importantes, uma vez que muitas aplicações dos surfactantes, como a solubilização de compostos hidrofóbicos,

dependem da existência de micelas no sistema. A CMC depende da natureza química do surfactante, do solvente, da temperatura e de aditivos (pH, eletrólitos, substâncias orgânicas). Outro parâmetro importante é a temperatura micelar crítica (TMC) do surfactante, que é a temperatura a partir da qual, numa dada concentração, as moléculas começam a se agregar em micelas. Neste caso, só há sentido em falar em TMC quando o processo é endotérmico.

Para se medir tais parâmetros, várias técnicas são utilizadas (ver Figura 6), dentre elas:

- a) Tensão interfacial.
- b) Espalhamento de luz.
- c) Solubilização de corante.
- d) Condutividade molar.
- e) Pressão osmótica.
- f) Microcalorimetria exploratória diferencial.

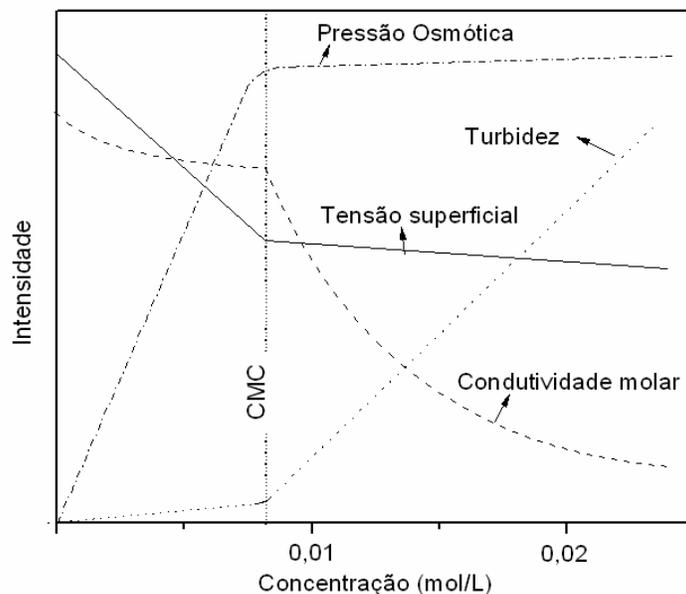


Figura 6. Propriedades físicas de uma solução de docecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante iônico, a 25°C (adaptado de Shaw, 1992).

Dentre os copolímeros com propriedades surfactantes, os que são mais utilizados são os que possuem bloco hidrofílico de polioxietileno (Myers, 1992). Um exemplo são os poliéteres ou polioxialquilenos triblocos  $E_nP_mE_n$  (Figura 7), onde E denota a unidade monomérica óxido de etileno e P a unidade de óxido de propileno, de caráter hidrofóbico. Eles são conhecidos como Poloxamers, Pluronic<sup>®</sup>, Lutrol<sup>®</sup> ou Synperonic<sup>®</sup> e começaram a ser comercializados

em 1951 pela BASF. Estudos quanto à sua micelização começaram a ser publicados em 1965 (Schmolka e Raymond, 1965).

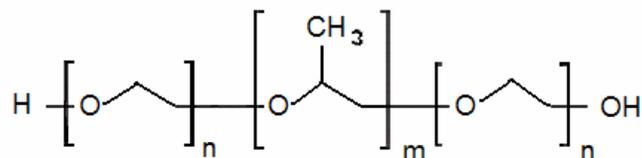


Figura 7. Estrutura geral dos Pluronic<sup>®</sup> ou Lutrol<sup>®</sup>.

Quando se fala em copolímeros em bloco, a arquitetura do copolímero, a natureza química dos blocos e o comprimento dos blocos são parâmetros moleculares que alteram a sua CMC. De um modo geral:

- Quanto à arquitetura, Booth e Attwood (2000) relatam que para diblocos (AB) e triblocos (ABA e BAB) com a mesma composição química global, onde A é o bloco hidrofílico e B o bloco hidrofóbico, a relação entre as suas CMC's é  $AB \ll ABA < BAB$ . A Figura 8 representa as possíveis conformações das micelas de copolímeros diblocos e triblocos.
- Núcleos mais hidrofóbicos conferem uma menor CMC.
- Quando se aumenta o comprimento do núcleo hidrofóbico, diminui-se a CMC.

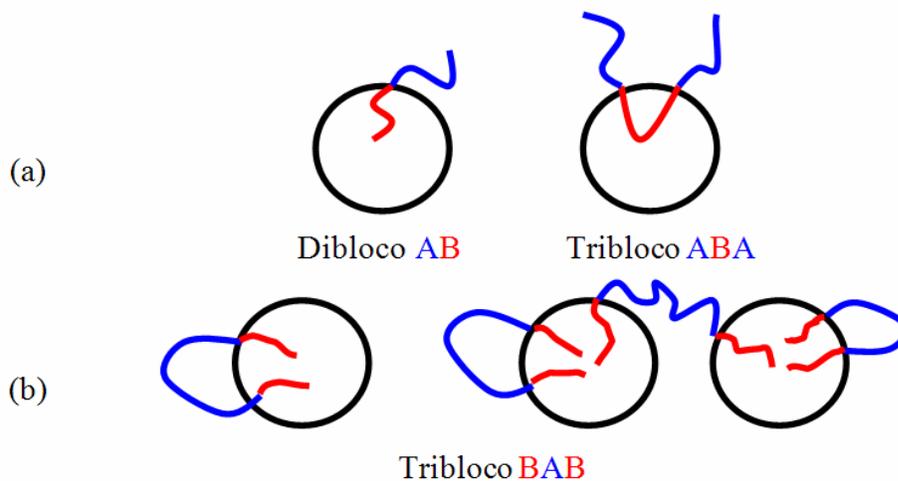


Figura 8. Representação esquemática das possíveis conformações micelares de copolímeros (a) dibloco AB e tribloco ABA e (b) tribloco BAB, onde A é o bloco hidrofílico e B o bloco hidrofóbico (figura extraída de Pinho, 2006; adaptada de Booth e Attwood, 2000).

Vale ressaltar que, além da CMC, outras características importantes da micelização dos copolímeros são:

- O número de agregação da micela, representado por  $n$  nas equações (1), (2), (4), (5) e (6). É o número de moléculas (unímeros) que formam a micela. Ele depende das características moleculares do copolímero, da temperatura e da sua concentração. Em geral, um aumento de temperatura favorece um aumento de  $n$ .
- O raio hidrodinâmico ( $r_h$ ) da micela, que correspondem ao tamanho das micelas. Esses parâmetros são obtidos através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, que mede o movimento Browniano das partículas suspensas em um líquido e o relaciona com o seu tamanho. O raio hidrodinâmico (ou raio de Stokes) é o raio da esfera rígida que promove a mesma difusão de luz das micelas. A equação usada para essas medidas é a equação de Stokes-Einstein. Estes parâmetros, em geral, também crescem com a temperatura.

Um fenômeno interessante acontece com vários copolímeros com bloco hidrofílico de polioxietileno. Eles apresentam o chamado “cloud point” ou “clouding temperature” (“ponto de turvação” ou “temperatura de nuvem”). À medida que a temperatura do sistema aumenta, sua solubilidade em água diminui devido à quebra das ligações de hidrogênio entre o polioxietileno e a água, e ele começa a formar uma segunda fase que confere turbidez ao sistema; a temperatura a partir da qual ele forma essa nova fase é conhecida como “cloud point” e suas propriedades surfactantes podem ser perdidas a partir de então (Myers, 1992).

#### 1.4. GELEIFICAÇÃO E TERMORRESPONSIVIDADE DOS COPOLÍMEROS EM BLOCO

À medida que a concentração desses copolímeros aumenta, suas soluções começam a tornar-se mais viscosas até atingir um estado de gel imóvel. Wanka, Hoffman e Ulbricht (1990) propuseram que a geleificação acontece pelo empacotamento das micelas em mesofases cristalinas cúbicas, hexagonais ou lamelares, dependendo da forma das micelas. Micelas esféricas formam mesofases cúbicas (Figura 9a), micelas cilíndricas formam mesofases hexagonais (Figura 9b) e micelas na forma de disco formam mesofases lamelares (Figura 9c).

Alguns copolímeros de polioxietileno apresentam uma característica especial, a termorresponsividade. À medida que a temperatura aumenta, suas soluções tornam-se mais viscosas podendo atingir o estado de gel imóvel. A menor concentração a partir da qual observa-se esse fenômeno é a concentração crítica de formação de gel. Essa transição fluido-gel (sol-gel) pode ser revertida com abaixamento da temperatura ou, em algumas concentrações, o estado de gel possui uma temperatura máxima, acima da qual ele volta a ser fluido. Esse comportamento termorresponsivo é interessante para aplicações farmacológicas, onde o copolímero é usado como matriz para a administração subcutânea de fármacos por oferecer uma liberação prolongada.

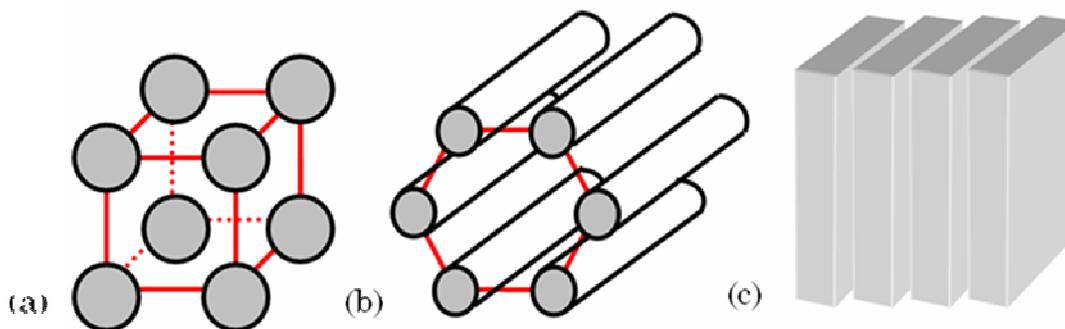


Figura 9. Representação esquemática das estruturas de mesofase: a) cúbica, b) hexagonal e c) lamelar. Adaptado de Pinho (2006).

Para o estudo do comportamento de formação de gel desses polímeros em função da temperatura e da concentração, há duas técnicas bastante utilizadas: o método de inversão de tubo e a reometria (Li e col., 1997, Hamley e col., 1998, Altinok e col., 1999, Chaibundit e col., 2007). Nos dois métodos, soluções dos copolímeros em diferentes concentrações são analisadas quanto à formação de gel numa faixa de temperatura que normalmente varia de 10 a 90 °C. Os dados do estudo são apresentados em um gráfico de concentração *versus* temperatura, conhecido como diagrama de fases. As fases essenciais desse diagrama são a de solução ou fluido (“sol” ou “mobile”) e gel duro ou imóvel (“gel”, “hard gel” ou “immobile”) como é apresentado nos trabalhos de Hamley e col. (1998) e Ricardo e col. (2005) (Figura 10a). No entanto, podem-se mostrar fases mais específicas, caracterizando a turbidez, refração e textura do gel, dependendo do interesse do pesquisador, como fizeram Li e col. (1997) e Chaibundit e col. (2007) (Figura 10b). Para caracterizar o gel quanto à refração, no entanto, deve-se usar um microscópio de luz polarizada, e então o gel pode ser definido como isotrópico ou birrefringente. Wanka, Hoffman e Ulbricht (1994) mostraram que as propriedades isotrópicas de um gel duro de F127 são consistentes com uma estrutura de empacotamento do tipo cúbica.

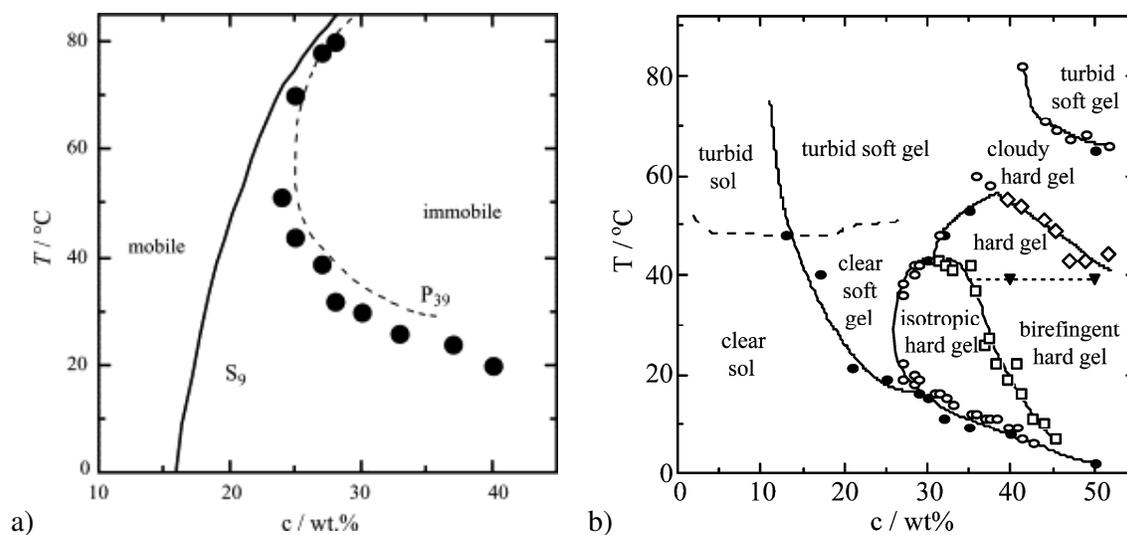


Figura 10. a) Diagrama de fases de três sistemas:  $E_{62}P_{39}E_{62}$  (Pluronic® F87),  $E_{82}S_9E_{82}$  e sua mistura na proporção 1:1 (extraído de Ricardo e col., 2005); b) Diagrama de fases do Pluronic® P123 ( $E_{21}P_{67}E_{21}$ ) (extraído de Chaibundit e col, 2007).

## 1.5. APLICAÇÃO DE COPOLÍMEROS NA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

### 1.5.1. Administração de fármacos

Um desafio contínuo das ciências da saúde e da indústria farmacêutica é aperfeiçoar o desempenho dos fármacos no organismo humano, reduzindo as doses de administração, o nível de toxicidade e os efeitos colaterais, melhorando a sua eficiência. Entre alguns dos parâmetros farmacológicos investigados, estão:

- **Solubilidade:** esse é um fator essencial para a eficácia do fármaco, independentemente de sua rota de administração. Relata-se que quase metade dos fármacos em potencial falha no seu progresso para formulações farmacêuticas devido à sua baixa solubilidade em água (Patravale, Date e Kullami, 2004). Um fator limitante para o desempenho *in vivo* de fármacos pouco solúveis em água é a sua resistência em ser umedecido e dissolvido nos fluidos do trato gastrointestinal. O aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água é, portanto, muito importante para incrementar sua taxa de absorção no organismo (biodisponibilidade).
- **Liberação:** existe um conceito farmacológico chamado de faixa terapêutica, que é a faixa de concentração do fármaco no organismo na qual ele exerce sua atividade com eficiência e sem causar danos ao paciente. Muitas vezes, ao se administrar um medicamento a um paciente, a sua concentração inicial é alta, podendo até ultrapassar a concentração máxima da dose terapêutica, e após um curto tempo fica abaixo da concentração mínima, seguindo um ciclo como mostra a Figura 11. Visando estabilizar a concentração do fármaco dentro dessa faixa terapêutica após sua administração e, assim, diminuir as doses do medicamento e seus efeitos colaterais, tem-se desenvolvido sistemas de encapsulação de fármacos para liberação controlada. Tais sistemas também possuem a vantagem de conferir uma maior estabilidade química ao fármaco, ao protegê-lo de fatores externos tais como o pH gástrico e o calor no ambiente de armazenagem do fármaco.
- **Distribuição biológica:** quando um fármaco entra no organismo, ele é distribuído pela corrente sanguínea e atingem tecidos e órgãos que não são o foco do tratamento, podendo causar vários efeitos colaterais e assim diminuir a eficiência

do fármaco no tratamento. No caso de formulações quimioterápicas fortes, isso se torna ainda mais grave. Por isso, nos últimos anos, tem-se investigado sistemas “inteligentes” que direcionem o fármaco até o alvo específico (por exemplo, tecidos tumorais), onde são liberados.

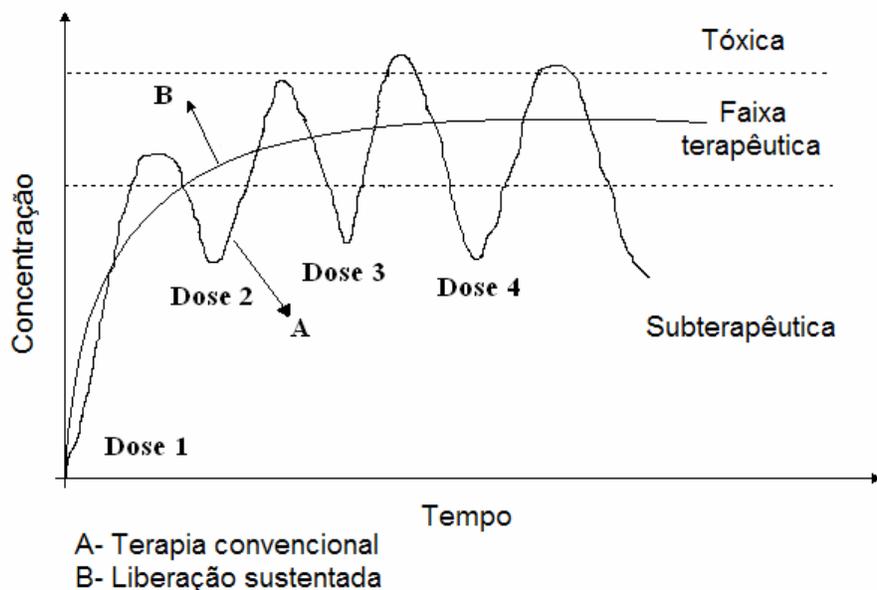


Figura 11. Gráfico da concentração sanguínea do fármaco *versus* tempo de administração: curva A, uma formulação convencional, e curva B, uma formulação ideal de liberação controlada. Adaptado de Peppas (1997).

### 1.5.2. Micelas de copolímeros como carreadores de fármacos

Como resposta a esses desafios, uma variedade de sistemas coloidais de nanopartículas têm sido investigados (lipossomos, dendrímeros, ciclodextrinas, nanoesferas e micelas poliméricas). Dentre eles, micelas poliméricas formadas por copolímeros em bloco têm atraído grande interesse (Aliabadi e Lavasanifar, 2006; Muellen e col., 2009), devido a características gerais tais como:

- Apresentam um diâmetro menor que 100 nm. Os vasos sanguíneos de tumores e locais de inflamação são mais permeáveis, o que permite o acúmulo de micelas carreadas de fármaco no seu interior, e dessa forma elas são investigadas como sistemas passivos que direcionem o fármaco para o sítio de ação, especialmente em quimioterapia (Aliabadi e Lavasanifar, 2006; Savic, Eisenberg e Maysinger, 2006).

- O núcleo hidrofóbico age como hospedeiro de fármacos hidrofóbicos, proteínas, DNA, protegendo-os e controlando sua liberação no organismo.
- Possuem uma versatilidade ímpar na estrutura núcleo-corona, o que permite desenvolver sistemas projetados individualmente com a respeito à fisiologia da doença, às propriedades físico-químicas do fármaco, seu sítio de ação e sua rota de administração.
- Baixa toxicidade (Schmolka, 1972; Kim e col., 2001; Kawaguchi e col., 2009). A maioria dos surfactantes usados como agentes de solubilização em formulações comerciais são, em geral, pouco eficientes e causam efeitos colaterais, como o etoxilato de óleo de rícino (Cremophor® EL, da BASF), usado para a solubilização de fármacos como o Paclitaxel (formulação Taxol®, da BMS), causa uma série de efeitos colaterais (Weiss e col., 1990; Tije e col., 2003). O Tween® 80 (Croda International), usado para a anfotericina B, é hemolítico (Ellis, Crinis, e Webster, 1996; Yu e col., 1998).

Como Attwood, Zhou e Booth (2007) relataram em uma revisão, copolímeros com porção hidrofílica de polioxietileno e porção hidrofóbica de polioxialquilenos ou de poliésteres têm sido de considerável interesse nas últimas décadas com respeito à solubilização e liberação de fármacos pouco solúveis em água. Algumas vantagens específicas desses copolímeros são:

- As propriedades furtivas da corona de polioxietileno, isto é, as micelas formadas por corona de polioxietileno não são capturadas pelos macrófagos do sistema reticular endotelial, aumentando seu tempo na circulação sanguínea (Kataoka e col., 1993; Adams, Lavasanifar e Kwon, 2003).
- Alguns deles, como os triblocos EPE conhecidos como Pluronic®, possuem propriedades de geleificação termorresponsivas interessantes para aplicação *in situ* (Ricardo e col., 2005; Chu e Song, 2009).
- Muitos apresentam baixos valores de CMC, o que confere estabilidade às micelas mesmo após sua diluição no sangue.
- Sua massa molecular suficientemente baixa ( $M.M. \leq 15.000 \text{ g/mol}$ ) permite filtração nos rins e excreção pela urina (Pec, Wout e Johnston, 1992).
- Como surfactantes não iônicos, seu processo de micelização e suas propriedades como solubilizantes de fármacos são pouco influenciadas por alterações no pH e pela adição de eletrólitos (Myers, 1992).

Existem vários métodos de solubilização de fármacos hidrofóbicos nas micelas dos copolímeros. Aliabadi e Lavasanifar (2006) citam em uma revisão sobre micelas poliméricas para administração de fármacos pelo menos sete métodos:

- Diálise
- Emulsão óleo/água
- Evaporação do solvente
- Evaporação do co-solvente
- Liofilização
- Agitação em solução (“Shake Flask”)
- Método fundido (“Melt loading”)

A escolha apropriada do método de solubilização depende das propriedades do fármaco e do polímero.

### 1.5.3 Solubilização de fármacos hidrofóbicos em sistemas micelares

Dependendo da estrutura química do fármaco e do polímero, considera-se que o fármaco pode se localizar na micela de quatro maneiras: no núcleo micelar, na interface núcleo/corona, na corona, e na superfície (Myers, 1992). A corona é uma ambiente mais favorável para a solubilização de fármacos hidrofílicos, enquanto o núcleo é mais favorável para fármacos hidrofóbicos, sendo estes fármacos o principal foco no desenvolvimento de formulações micelares.

A solubilização de fármacos hidrofóbicos em micelas pode ser explicada como uma partição do fármaco entre duas fases: a água e a micela. O coeficiente de partição micela-água pode ser calculado para uma solução de concentração conhecida do polímero pela seguinte equação:

$$P = (S - S_o)/S_o \quad \text{ou} \quad P = S_{cp}/S_o \quad (9)$$

onde  $S$  é a solubilidade do fármaco na solução micelar do copolímero à concentração específica e  $S_o$  é a solubilidade do fármaco em água.

A energia livre padrão de solubilização ( $\Delta G^\circ$ ) do processo pode ser representada pela seguinte equação:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln P \quad (10)$$

onde  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura absoluta e  $P$  é o coeficiente de partição entre a micela e a fase aquosa.

Parâmetros importantes nos estudos de solubilização de fármacos são a capacidade de solubilização do polímero ( $S_{cp}$ ), que é a quantidade de fármaco solubilizada por grama de polímero em uma dada solução, e a capacidade de solubilização do núcleo hidrofóbico ( $S_h$ ), que é a quantidade de fármaco solubilizada por grama de bloco hidrofóbico. Estudos mostram que esses parâmetros não são fixos para um dado polímero, dependendo principalmente da compatibilidade química entre o núcleo e o fármaco. Além disso, a capacidade de solubilização do polímero pode também depender da temperatura, do pH, da concentração da solução do polímero, de aditivos na solução e do método de solubilização do fármaco (Aliabadi e Lavasanifar, 2006; Ribeiro e col., 2009a).

Quando se comparam polímeros diferentes, fatores que alteram a  $S_{cp}$  são: o caráter hidrofóbico do núcleo, o comprimento do bloco hidrofóbico, a arquitetura do copolímero, a razão em massa núcleo/corona, sua concentração e temperatura micelar crítica e a forma das micelas. De uma forma geral, quanto mais hidrofóbico o núcleo das micelas (caráter químico das unidades monoméricas e maior comprimento da cadeia) maior a capacidade de solubilização. Attwood, Zhou e Booth (2007) determinaram as hidrofobicidades relativas de unidades monoméricas de poliéteres e poliésteres em função da CMC de copolímeros dibloco com bloco hidrofílico de polioxietileno:

$$P:L:B:VL:S:CL= 1:4:6:10:12:12 \quad (11)$$

As unidades monoméricas representadas são: óxido de propileno (P), D,L lactídeo (L), óxido de butileno (B),  $\gamma$ - valerolactona (VL), óxido de estireno (S),  $\epsilon$ -caprolactona (CL).

Para copolímeros de composição e arquitetura similares, há um aumento na capacidade de solubilização com um aumento na cadeia hidrofóbica, e quanto à forma, micelas de forma cilíndrica possuem um núcleo solubilizador mais eficiente em comparação com micelas esféricas (Allen e col., 1999; Crothers e col., 2005).

### 1.5.4 Preparação de micro e nanopartículas de PEG-PCL para liberação de fármacos

Micro e nanopartículas poliméricas têm sido extensivamente estudadas como matrizes de liberação controlada de fármacos, para vários meios de administração: tópica, oral, intravenosa, subcutânea, nasal, ocular. No campo farmacêutico, normalmente são consideradas nanopartículas aquelas com diâmetro inferior a 1000 nm, enquanto no campo da ciência de materiais elas têm tamanho entre 1 e 200 nm. Micropartículas são partículas com escala de alguns a centenas de micrômetros (Wei e col., 2009a). Vários polímeros, tanto naturais (quitosana, alginato, pectina) quanto sintéticos (copoliésteres) são usados para esse fim (Asada e col., 2004; Bromberg, 2008; Souza e col., 2009; Cavalcante e col., 2007; Li e col., 2009; Nagarwal e col., 2009).

A policaprolactona (PCL, Figura 12) é um polímero semicristalino, de caráter hidrofóbico, sintetizado principalmente por reação de polimerização aniônica de abertura de anel a partir do monômero épsilon-caprolactona (CL). Ela tem recebido muita atenção como um material ideal para liberação controlada de fármacos e outras aplicações (Mondrinos e col., 2006; Seregin e Coffe, 2006). A labilidade hidrolítica de suas ligações éster torna a PCL biodegradável em condições fisiológicas. No entanto, devido ao seu alto grau de cristalinidade e hidrofobicidade, ela degrada lentamente e tem baixa biocompatibilidade com tecidos, o que restringe suas aplicações clínicas (Wei e col., 2009a). Portanto, sua modificação torna-se interessante.

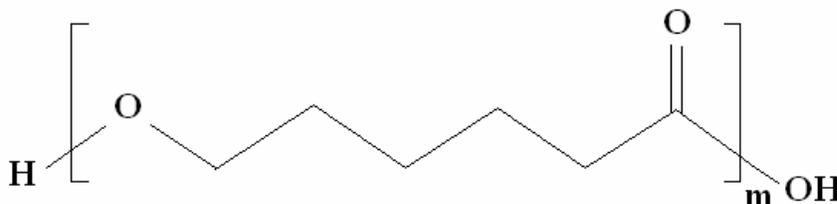


Figura 12. Estrutura química da policaprolactona (PCL).

O PEG é um polímero hidrofílico, atóxico, e que pode ser anexado a uma cadeia de PCL formando copolímeros do tipo  $E_nCL_m$ ,  $E_nCL_mE_n$ ,  $CL_mE_nCL_m$ , melhorando as propriedades da PCL (maior hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, desempenho *in vivo*) para aplicações biomédicas. Copolímeros  $E_nCL_m$  têm achado várias aplicações na forma de micro/nanopartículas ou hidrogéis termorresponsivos (Wei e col., 2009a). Devido à sua natureza anfifílica, vários estudos têm sido realizados com esses copolímeros como

solubilizadores de fármacos hidrofóbicos, e ótimos resultados têm sido alcançados (Attwood, Zhou e Booth, 2007). Por exemplo, Kim e col. (1998) encontraram um aumento da solubilidade do fármaco indometacina (solubilidade em água de 0,094 mg/dL) em relação à água de 3700 vezes numa solução de E<sub>114</sub>CL<sub>27</sub> a 1%. O fármaco elipticina teve sua solubilidade aquosa (0,015 mg/dL) aumentada em 22000 vezes em uma solução a 1% do copolímero E<sub>114</sub>CL<sub>35</sub> (Liu, Xiao e Allen, 2004).

O comportamento de geleificação sob aquecimento (termorresponsivo) não ocorre para as soluções de todos os copolímeros de PEG e PCL. Alguns desses copolímeros, em soluções concentradas, tornam-se menos viscosos quando aquecidos a partir de baixas temperaturas (Gong e col., 2007), como acontece com a maioria dos polímeros (transição da fase de gel duro para móvel sob aquecimento), não apresentando propriedades satisfatórias para administração subcutânea. Para a sua utilização em formulações desse tipo, pode-se então fazer algumas modificações químicas nesses copolímeros ou, mais facilmente, fazer misturas binárias com polímeros que apresentem propriedades geleificantes termorresponsivas, como os Pluronic<sup>®</sup>. Gou e col. (2008) incorporaram nanopartículas de um copolímero de PEG e PCL contendo o fármaco honokiol em uma solução de Pluronic<sup>®</sup> F127 e verificaram, por estudos *in vitro* e *in vivo*, que tal formulação apresentou um ótimo potencial para aplicação como sistema de liberação controlada local de fármacos hidrofóbicos como o honokiol.

## 1.6. JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Copolímeros com bloco hidrofóbico de polioxiestireno (Figura 13) possuem um elevado potencial de solubilização para fármacos hidrofóbicos e aromáticos (como a griseofulvina, usada como fármaco-modelo) devido à hidrofobicidade de seus anéis aromáticos. Vários trabalhos com copolímeros em bloco do tipo  $E_nS_m$ ,  $E_nS_mE_n$ ,  $S_nE_m$ ,  $S_mE_nS_m$  têm sido reportados visando o seu uso em formulações farmacêuticas (Crothers e col., 2002; Ricardo, e col, 2004, Barbosa e col., 2007, Elsabahy e col., 2007, Ribeiro e col., 2009b). Dentre esses copolímeros, os diblocos e triblocos do tipo  $E_nS_m$  e  $E_nS_mE_n$  têm se mostrado mais eficientes, pois possuem baixos valores de CMC e TMC.

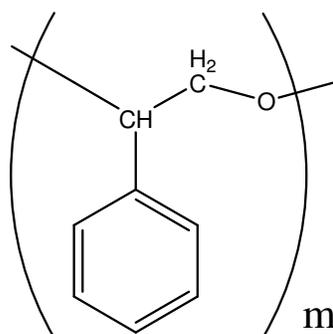


Figura 13. Estrutura do bloco de polioxiestireno ( $S_m$ ).

Copolímeros anfífilos com bloco hidrofóbico de policaprolactona também possuem um elevado potencial de solubilização de fármacos hidrofóbicos: a hidrofobicidade da unidade de caprolactona é semelhante à do óxido de estireno (ver relação de hidrofobicidade em eq. 11). Além disso, alguns copolímeros de PEG e PCL, dependendo da proporção em massa entre seus blocos, possuem uma limitada solubilidade em água o que proporciona a vantagem de preparação de micropartículas para liberação controlada de fármacos hidrofóbicos via oral.

Os copolímeros tribloco  $E_nP_mE_n$  são utilizados em formulações para solubilização de fármacos hidrofóbicos, mas não apresentam valores de capacidade de solubilização tão satisfatórios, devido à baixa hidrofobicidade do bloco de polioxipropileno, o que lhes confere altos valores de CMC e TMC. No entanto, suas propriedades geleificantes termorresponsivas são interessantes para sistemas de administração subcutânea de fármacos, pois à temperatura ambiente, podem-se ter soluções concentradas que são fluidas, mas que, à temperatura do corpo, geleificam rapidamente. Além disso, sua produção já é bem estabelecida em escala industrial, o que torna seu uso economicamente viável.

Dessa forma, este trabalho se propõe a estudar copolímeros em bloco sintetizados em laboratório e suas misturas com o copolímero comercial Lutrol® F127. Esse estudo está dividido em duas partes:

Parte 1: Estudo dos copolímeros  $E_{45}S_{10}E_{45}$ ,  $E_{45}S_8$  e suas misturas com o  $E_{98}P_{67}E_{98}$  (Lutrol® F127) para aplicação na administração de fármacos hidrofóbicos. Dois fármacos foram usados para os testes: a griseofulvina e a quercetina (Figura 14).

Parte 2: Estudo dos copolímeros  $E_{114}CL_{20}$ ,  $E_{114}CL_{50}$ , e suas misturas com o  $E_{98}P_{67}E_{98}$  (Lutrol® F127) para aplicação na administração de fármacos hidrofóbicos. Apenas a quercetina foi usada como fármaco nos testes.

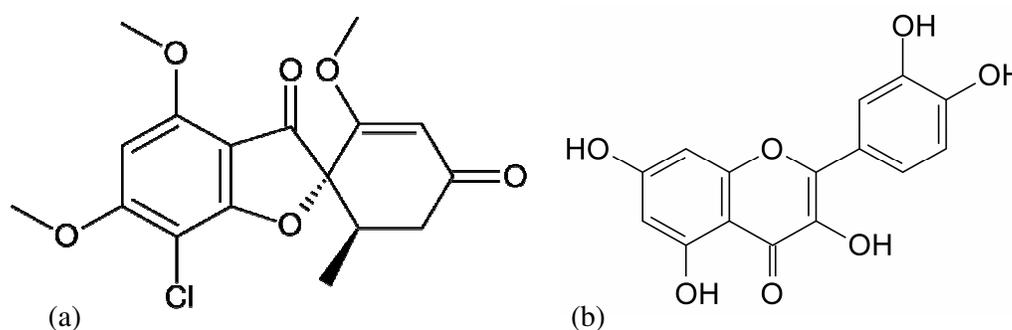


Figura 14. Estrutura química da (a) griseofulvina e da (b) quercetina.

A griseofulvina (Figura 14a) é um fármaco aromático antifúngico de baixa solubilidade em água (3,6 mg/dL a 25°C), usado em vários estudos como fármaco modelo para se comparar a capacidade de solubilização de copolímeros para fármacos hidrofóbicos.

A quercetina (Figura 14b) é um flavonóide obtido a partir da hidrólise da rutina. A rutina pode ser extraída de uma planta abundante no nordeste brasileiro, a Fava D'anta. A quercetina, como qualquer flavonóide, possui ação antioxidante e outras atividades biológicas relacionadas, como vasoconstritora, antiinflamatória e antitumoral. Nos anos de 2007 e 2008 ela esteve entre os 10 principais produtos farmacêuticos exportados pelo Brasil (ABIQUIF, 2009). Ela é um fármaco em fase experimental, com vários estudos clínicos em andamento, como mostra um sítio eletrônico do governo norte-americano (ClinicalTrials.gov, 2009). Resolver o problema de sua baixa solubilidade em água (0,05 mg/dL a 25°C) tem sido alvo de vários trabalhos, seja através de agentes solubilizantes (Ribeiro e col., 2009b; Gao e col., 2009), ou do desenvolvimento de pró-fármacos (Mulholland e col. 2001, Kim e col. 2009). Esses fatores impulsionaram o uso da quercetina nesta pesquisa.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

- Estudar os sistemas dos polímeros E<sub>45</sub>S<sub>8</sub>, E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub>, E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub>, E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub>, e suas misturas com o copolímero E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub> (Pluronic® F127), visando aplicação no carreamento e liberação controlada de fármacos via intravenosa, subcutânea e oral.

### Objetivos Específicos

#### PARTE 1:

- Caracterizar os copolímeros F127, E<sub>45</sub>S<sub>8</sub>, E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> e suas misturas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).
- Determinar a concentração micelar crítica dos copolímeros e suas misturas pelo método de solubilização de corante nas temperaturas ambiente e corpórea, avaliando a influência da temperatura na micelização dos sistemas poliméricos.
- Identificar as concentrações e temperaturas críticas gel para os copolímeros E<sub>45</sub>S<sub>8</sub>, E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> e suas misturas com o F127 através da técnica de inversão de tubo.
- Testar as soluções dos copolímeros e suas misturas como solubilizadores dos fármacos hidrofóbicos griseofulvina e quercetina.
- Realizar testes de liberação *in vitro* do fármaco griseofulvina solubilizado nos copolímeros.
- Realizar análises de distribuição de tamanho das micelas dos sistemas poliméricos com e sem fármaco.

#### PARTE 2:

- Caracterizar os copolímeros E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub> e E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub> por RMN <sup>13</sup>C, para confirmar sua estrutura, e por cromatografia de permeação em gel (GPC), para analisar sua polidispersividade.
- Determinar a concentração micelar crítica dos copolímeros E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub> e E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub> e suas misturas com o copolímero F127 pelo método de solubilização de corante nas temperaturas ambiente e corpórea, avaliando a influência da temperatura na micelização dos sistemas poliméricos.

- Identificar as concentrações e temperaturas críticas de gel para os copolímeros E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub> e E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub> e suas misturas com o F127 através da técnica de inversão de tubo.
- Preparar micropartículas e soluções micelares dos copolímeros E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub> e E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub> para o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos como a quercetina.
- Caracterizar as micropartículas com fármaco encapsulado por difração de raios-X.
- Realizar análises de distribuição de tamanho das micelas dos sistemas poliméricos com fármaco.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1. PARTE 1: ESTUDO DOS COPOLÍMEROS E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub>, E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> E SUAS MISTURAS COM O E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub> (LUTROL® F127)

##### 3.1.1. Materiais

Os copolímeros E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> (ES) e E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> (ESE) (E = óxido de etileno e S= óxido de estireno) foram sintetizados por polimerização aniônica de óxido de estireno seguida por óxido de etileno e, gentilmente, cedidos pelo Laboratório de Polímeros da Universidade de Manchester (LabPol Manchester). O copolímero E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub>, comercialmente conhecido como Pluronic® ou Lutrol® F127, foi obtido da Uniquema (ICI Surfactants). Água milli-Q e metanol (Synth) foram utilizados como solventes. O fármaco griseofulvina foi obtido da Aldrich e o fármaco quercetina foi cedido pela empresa Flora Brasil – Produtos Naturais LTDA. O corante 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) foi obtido da Biochemika. Todos os materiais foram usados sem purificação adicional. Os fármacos foram pulverizados antes do uso.

As características moleculares dos copolímeros (Tabela 1) foram obtidas pelo Laboratório de Polímeros da Universidade de Manchester em trabalhos anteriores e/ou fornecidas pelo fabricante: massa molar numérica média ( $M_n$ ) por RMN <sup>13</sup>C, o índice de polidispersividade ( $M_w/M_n$ ) por cromatografia de permeação em gel (GPC), fração em massa do bloco de polioxietileno ( $W_E$ ) e fração em massa do bloco hidrofóbico ( $W_h$ ).

Tabela 1. Características moleculares dos copolímeros ES, ESE e F127.

| Copolímero   | $M_n$ (g.mol <sup>-1</sup> ) | $W_E$ | $W_h$ | $M_w/M_n$ | Referência               |
|--|------------------------------|-------|-------|-----------|--------------------------|
| E <sub>45</sub> S <sub>8</sub>                         | 2940                         | 0,673 | 0,327 | 1,06      | Crothers e col. (2005)   |
| E <sub>45</sub> S <sub>10</sub> E <sub>45</sub>        | 5160                         | 0,767 | 0,233 | 1,03      | LabPol Manchester        |
| E <sub>98</sub> P <sub>67</sub> E <sub>98</sub> (F127) | 12510                        | 0,689 | 0,311 | 1,20      | Chaibundit e col. (2007) |

### 3.1.2. Misturas binárias dos copolímeros

As misturas foram preparadas a partir da pesagem dos copolímeros e posterior dissolução com água para as concentrações desejadas em cada experimento. As proporções foram: a) F127 e E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> (30/70, 50/50 e 70/30) e b) F127 e E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> (30/70, 50/50 e 70/30). As misturas de F127 e E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> (30/70, 50/50 e 70/30) foram denominadas, respectivamente, de F/ES 30, F/ES 50 e F/ES 70. As misturas de F127 e E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> (30/70, 50/50 e 70/30) foram denominadas de F/ESE 30, F/ESE 50 e F/ESE 70, respectivamente. O número 30, por exemplo, denota o percentual de F127 na mistura.

### 3.1.3. Caracterização por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os copolímeros E<sub>45</sub>S<sub>8</sub>, E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> e F127 foram preparados em pastilha de KBr (brometo de potássio para espectroscopia) e analisados em equipamento FT-IR 8300 (Shimadzu) com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 10 varreduras na faixa de 3000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

### 3.1.4. Inversão de tubo

Os diagramas de fases foram obtidos pelo método de inversão de tubo. As soluções/géis dos copolímeros (em concentrações variando de 5 a 50% m/m) foram preparadas pesando-se os polímeros e a água (massa total ≈ 0,5 g) em pequenos tubos de vidro com diâmetro interno de 10 mm. Para a homogeneização das soluções, os sistemas ficaram sob aquecimento (2-4 h) e posterior refrigeração (mínimo de 3 dias). A possível modificação na fluidez das soluções foi observada invertendo-se o tubo enquanto lentamente aquecidas (10–90 °C) num banho de água termostatizado, caracterizando o sistema como fluido (móvel) ou gel duro (imóvel). A verificação da formação de gel foi feita em intervalos de 1 °C (± 0,2 °C), permitindo-se a estabilização dos géis em cada temperatura analisada por 1 min. As medidas foram realizadas pelo menos em triplicata.

### 3.1.5. Concentração micelar crítica (CMC)

A determinação da concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros e suas misturas foi realizada usando um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500. O corante 1,6-

difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) da Biochemika foi utilizado como recebido. Soluções estoque dos copolímeros foram preparadas por dissolução em água milli-Q e agitação de no mínimo 14 h antes das diluições necessárias (0,01 mg/L – 1 g/L). O DPH foi dissolvido em metanol (0,4 mM) e adicionado à solução do copolímero na razão de 1:100 (30 µL DPH: 3 mL solução). Dessa forma foram obtidas soluções dos copolímeros com 1% (v/v) de metanol e 0,004 mM de DPH. O comprimento de excitação usado foi de 350 nm, e a emissão medida em 428 nm foi usada para a construção dos gráficos. As medidas de emissão de fluorescência foram feitas entre 3 e 24 h após a adição de DPH. Os estudos foram realizados a 25 e 37 ± 0,2 °C, permitindo-se um mínimo de 40 min de estabilização na temperatura analisada.

O método da solubilização do DPH foi utilizado para determinar o início da micelização no estudo de copoliéteres triblocos realizado por Alexandridis, Holzwarth e Hatton (1994) e anteriormente, no estudo de surfactantes iônicos, por Chattopadhyay e London (1984).

### 3.1.6. Solubilização dos fármacos

As moléculas dos fármacos normalmente têm forte absorvância na região de UV. Os comprimentos de onda para as bandas de absorção da griseofulvina e quercetina em metanol são 292 nm e 375 nm, respectivamente.

As curvas de calibração dos fármacos foram preparadas a partir dos dados de concentração (mg/L) *versus* absorvância (A). Espectrofotômetro U-2000 da Hitachi foi utilizado no experimento.

O método de incorporação do fármaco nas micelas foi o da dissolução direta (também chamado de “shake flask”) e está esquematizado no fluxograma da Figura 15. Foram preparadas soluções aquosas a 1% m/v dos copolímeros e de suas misturas. A uma alíquota de 10 mL de solução, foi adicionada uma porção do fármaco (m≈10 mg) a ser testado. Cada fármaco foi testado separadamente. As misturas foram lentamente agitadas a 25 °C (± 0,1 °C), por 4 dias, num banho termostaticado QUIMIS. Retirou-se uma alíquota de 3 mL do sobrenadante, que logo em seguida foi filtrado em membrana Millipore de porosidade 0,45 µm, para remoção de qualquer porção de fármaco não solubilizado. Alíquotas das amostras filtradas foram diluídas com metanol e a concentração de fármaco foi monitorada por espectrofotometria UV-VIS nos comprimentos de onda adequados para cada fármaco, usando-se metanol puro para estabelecer a linha de base. Os frascos contendo as misturas

restantes (7 mL) ficaram por mais 4 dias sob agitação no banho a 37 °C ( $\pm 0,1$  °C), e o mesmo procedimento foi realizado. A solubilidade dos fármacos apenas em água foi calculada com o mesmo procedimento descrito acima. As absorvâncias das soluções aquosas dos copolímeros e de suas misturas nos comprimentos de onda dos fármacos também foram medidas para correção dos valores de absorvância obtidos para os fármacos. Todas as medidas foram feitas pelo menos em quintuplicata.

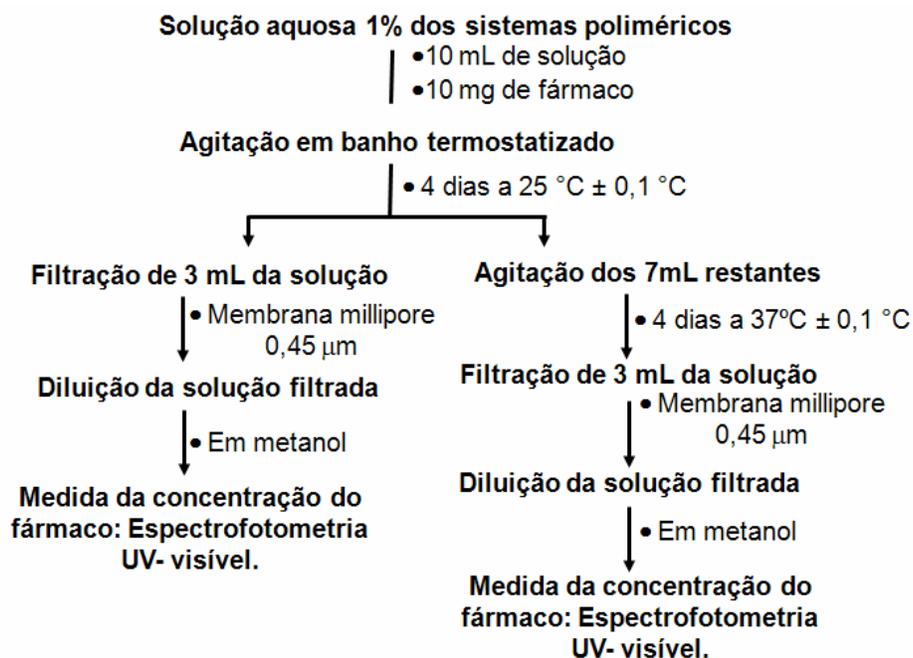


Figura 15. Fluxograma do método de solubilização (dissolução direta) da griseofulvina e da quercetina nos sistemas poliméricos aquosos de F127, ES e ESE.

### 3.1.7. Liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* da griseofulvina dos sistemas encapsulados (ES, ESE e F127) foi realizado através da técnica de difusão. Utilizou-se uma membrana de diálise (tubo de diálise) de celulose benzoilada, com 9 mm de largura, e massa molecular de corte (MWCO) de 2000 g/mol, da Sigma-Aldrich.

O material utilizado na liberação foi preparado da seguinte forma: a griseofulvina foi solubilizada nas soluções a 1% dos copolímeros a 37 °C, como descrito anteriormente, e após filtração e quantificação da griseofulvina solubilizada, a solução foi liofilizada. Cerca de 150-200 mg do material liofilizado foi dissolvido em 1 mL de tampão fosfato pH 7,4 ( $\pm 0,1$ ),

inserido na membrana de diálise e imerso em 75 mL de tampão fosfato a 37 °C ( $\pm 0,2$  °C). Em intervalos de tempo determinados, alíquotas de 3 mL do meio de liberação eram retiradas e o volume era reconstituído com 3 mL da solução tamponada. As soluções foram diluídas em metanol (2x) e a quantidade de griseofulvina liberada foi determinada por espectrofotometria UV/Vis no comprimento de onda de 292 nm.

### **3.1.8. Medida de tamanho das micelas**

O diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho das micelas com e sem fármacos foram determinados a 25 °C utilizando o equipamento Nano Zetasizer da Malvern, modelo ZEN 3500. Os resultados das medidas foram obtidos a partir de 20 scans com 10 segundos de intervalo. Pelo menos 3 medidas foram feitas para cada amostra, e os resultados foram expressos como uma média aritmética dos dados obtidos. O índice de polidispersividade, que mede a variação ou distribuição no tamanho das micelas, também foi analisado para as amostras estudadas.

## **3.2. PARTE 2: ESTUDO DOS COPOLÍMEROS E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub>, E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub>, E SUAS MISTURAS COM O E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub> (LUTROL® F127)**

### **3.2.1. Materiais**

Os copolímeros E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub> (CL<sub>20</sub>), E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub> (CL<sub>50</sub>) (E = óxido de etileno e CL=  $\epsilon$ -caprolactona) foram sintetizados a partir do metóxi polietileno glicol 5000 (mPEG 5000 ou E<sub>114</sub>, polietileno glicol com massa molecular numérica média de 5000 g/mol) e da  $\epsilon$ -caprolactona por polimerização aniônica sem catalisador (ver método de Cerrai e col., 1989) e, gentilmente, cedidos pelo Laboratório de Polímeros da Universidade de Manchester. O copolímero E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub>, comercialmente conhecido como Pluronic® ou Lutrol® F127, foi obtido da Uniquema (ICI Surfactants). Água milli-Q e metanol (Synth) foram utilizados como solventes. A quercetina foi cedida pela empresa Flora Brasil – Produtos Naturais LTDA. O corante 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) foi obtido da Biochemika. Todos os materiais foram usados sem purificação adicional. A quercetina foi macerada antes do uso.

### **3.2.2. Misturas binárias**

As misturas foram preparadas a partir da pesagem dos copolímeros e posterior dissolução com água para as concentrações desejadas em cada experimento. As proporções foram F127/CL<sub>20</sub> 90/10 e F127/CL<sub>50</sub> 90/10.

### **3.2.3. Caracterização por ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) e cromatografia de permeação em gel (GPC)**

A análise de RMN <sup>13</sup>C foi feita para confirmar a estrutura esperada dos copolímeros e para verificar a presença de homopolímero e monômeros. A análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) foi feita para verificar a polidispersividade dos copolímeros sintetizados e para confirmar a massa molar numérica média dos copolímeros. As análises foram feitas na Universidade de Manchester e os aparelhos utilizados foram um Bruker Spectroscopin (600 MHz) utilizando CDCl<sub>3</sub> como solvente e um GPC (Gilson) com coluna PL 2MB500A, calibrado com padrões de polioxietileno e THF (tetraidrofurano) como solvente.

### 3.2.4. Inversão de tubo

Mesmo procedimento descrito na seção 3.1.4.

### 3.2.5. Concentração micelar crítica (CMC)

Mesmo procedimento descrito na seção 3.1.5.

### 3.2.6. Preparação de micro/nanopartículas de E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub> e E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub> com quercetina

#### Método 1 (filme):

Cada copolímero, CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> (100 mg), e quercetina (10 mg) ficaram sob agitação em acetona (cerca de 20 mL) por pelo menos 30 min para sua dissolução. Essa mistura foi então rotoevaporada por cerca de 10-15 min a 40-60 °C, para a remoção da acetona, formando-se então um filme do copolímero com o fármaco. Esse filme foi suspenso em 10 mL de água milli-q e ficou sob agitação à temperatura ambiente (27 °C) por pelo menos 16 h. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 20000 g (13000 rpm) por 30 min em uma centrífuga Sorvall<sup>®</sup>, modelo RC5CPlus (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC), com controle de temperatura entre 22 e 27 °C.

O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore (0,45 µm) para obtenção da suspensão das nanopartículas (micelas) do copolímero com a quercetina. Para quantificar a porção de quercetina solubilizada nessa suspensão, uma alíquota de 0,5 mL da amostra foi diluída com 4,5 mL de metanol para medida da absorbância dessa solução em um espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 375 nm.

O precipitado da centrifugação (micropartículas) foi resuspenso em água e liofilizado para posterior caracterização. O mesmo procedimento também foi realizado apenas com os copolímeros, sem a quercetina. Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata.

#### Método 2 (filme com sonicação):

Este método é semelhante ao anterior. Após a suspensão do filme de copolímero + fármaco, a amostra foi submetida a ondas de ultrassom em um Sonifier<sup>®</sup> modelo W-450D (Branson) de alta frequência (equipamento de sonda ultra-sônica), na amplitude de 50% por

17 segundos (2s de teste mais 15s) em banho de gelo, mantendo a temperatura abaixo de 30 °C.

Esse equipamento de ultrassom de alta frequência é utilizado em aplicações químicas e biológicas para quebrar estruturas celulares, homogeneizar amostras, emulsificar materiais, dispersar ou misturar compostos imiscíveis ou para processar reações (Sonifier<sup>®</sup> Products, 2009).

Após essa etapa, a amostra ficou sob agitação por pelo menos 16 h, e o processo continuou como descrito no método 1. Os experimentos também foram realizados pelo menos em triplicata.

### **3.2.7. Caracterização das micropartículas por difração de raios-X**

As análises por difração de raios-X das micropartículas foram realizadas em um difratômetro Rigaku, modelo DMAXB, com ângulo  $2\theta$  de 5-45° e uma velocidade de 0,5°/min.

### **3.2.8. Medida de tamanho das micelas**

O diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho das nanopartículas (micelas) com quercetina foram determinados a 25 °C utilizando o equipamento Nano Zetasizer da Malvern modelo ZEN 3500. As medidas foram feitas para as nanopartículas obtidas logo após a filtração do sobrenadante e para as nanopartículas obtidas após redispersão desse material liofilizado em água milli-q. O índice de polidispersividade, que mede a variação ou distribuição no tamanho das cadeias poliméricas, também foi analisado para as amostras estudadas.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. PARTE 1: ESTUDO DOS COPOLÍMEROS E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub>, E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> E SUAS MISTURAS COM O E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub> (LUTROL® F127)

#### 4.1.1. Caracterização por FTIR

Os espectros de infravermelho dos copolímeros puros e das misturas 50/50 com griseofulvina encapsulada foram obtidos apenas para confirmar os principais grupos funcionais dos copolímeros e para verificar se houve interação química entre eles. Todas as amostras dos polímeros apresentaram espectros, praticamente, com as mesmas bandas de absorção, e nenhuma nova banda apareceu nos espectros das misturas. Por isso, apenas alguns espectros estão presentes (Figura 16). A Tabela 2 mostra as principais bandas com suas atribuições (Pavia, Lampman e Kriz, 2001).

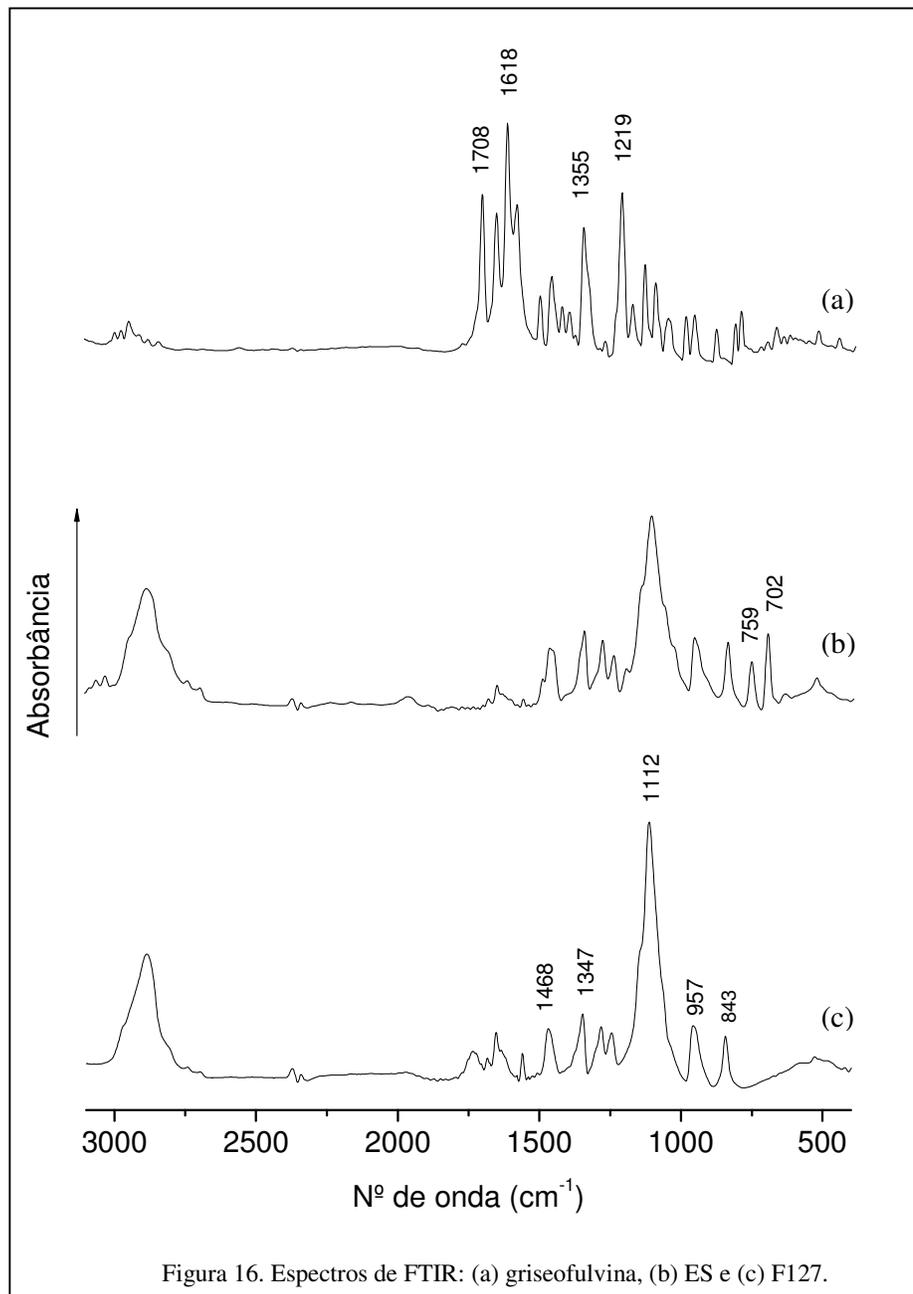
As diferenças observadas entre os espectros (Figura 16) foram na intensidade relativa de algumas bandas e a presença de picos de absorção média em 702 e 759 cm<sup>-1</sup> (atribuídas à deformação fora do plano de CH aromático em anel monossustituído) apenas para as amostras contendo os copolímeros de polioxiestireno. Nenhuma banda de absorção específica da griseofulvina pôde ser identificada nas misturas, uma vez que seu conteúdo nas amostras encapsuladas é de aproximadamente 1%. A Tabela 3 mostra as principais bandas do fármaco griseofulvina (Pavia, Lampman e Kriz, 2001).

Tabela 2. Atribuições das frequências das principais bandas dos copolímeros F127, ES e ESE (Pavia, Lampman e Kriz, 2001).

| Nº de onda (cm <sup>-1</sup> ) | Atribuições  |
|--------------------------------|--|
| 2885                           | $\nu_s$ (CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> )                 |
| 1653                           | $\delta$ (O-C)   |
| 1468                           | $\delta_s$ (CH <sub>2</sub> ) e $\nu$ (C-C) <sub>arom.</sub> |
| 1347                           | $\delta$ (CH <sub>2</sub> ), $\nu$ (C-C)                     |
| 1282                           | $\delta$ (CH <sub>2</sub> )                                  |
| 1243                           | $\delta$ (CH <sub>2</sub> ), $\nu$ (C-O)                     |
| 1112                           | $\nu$ (C-O-C)  |
| 959                            | $\delta$ (CH <sub>2</sub> -O), $\nu$ (C-O-C)                 |
| 843                            | $\delta$ (CH <sub>2</sub> -O), $\nu$ (C-O)                   |
| 759 e 702                      | $\delta$ (C-H) <sub>arom.</sub> monosubst.                   |

Tabela 3. Atribuições das frequências das principais bandas do fármaco griseofulvina (Pavia, Lampman e Kriz, 2001).

| Nº de onda (cm <sup>-1</sup> ) | Atribuições                        |
|--------------------------------|------------------------------------|
| 2942                           | $\nu$ (CH <sub>3</sub> )           |
| 1708                           | $\nu$ C=O                          |
| 1660                           | $\nu$ C=O                          |
| 1618                           | $\delta$ (C-C) anel aromático      |
| 1587                           | $\delta$ (C-C) anel aromático      |
| 1470                           | $\delta$ (CH <sub>2</sub> )        |
| 1428                           | $\delta_{as}$ (CH <sub>3</sub> )   |
| 1355                           | $\delta_s$ (CH <sub>3</sub> )      |
| 1219                           | $\delta_{as}$ (O-C <sup>≡</sup> C) |
| 1059                           | $\delta_s$ (O-C <sup>≡</sup> C)    |



#### 4.1.2. Inversão de tubo

As Figuras 17 e 18 mostram os diagramas de fases de formação de gel dos copolímeros puros e suas misturas. As propriedades termorresponsivas do F127 são explicadas pela instabilidade de suas micelas em meio aquoso a baixas temperaturas, efeito que é explicado por sua entalpia de micelização positiva (Chaibundit e col., 2007). Observa-se que os copolímeros  $E_{45}S_8$  e  $E_{45}S_{10}E_{45}$  não possuem essas propriedades de geleificação termorresponsivas e de outros polímeros do tipo  $E_nP_mE_n$ ,  $E_nB_m$  e  $E_nB_mE_n$  e  $E_nCL_mE_n$  (Attwood, Zhou e Booth, 2007). Esse comportamento, usual para copolímeros do tipo ES e ESE (Crothers e col., 2002; Yang e col., 2003; Pinho e col., 2007), é consistente com os seus baixos valores de entalpia de micelização e pode ser explicado pela estabilização cinética das micelas por vitrificação do núcleo de polioxiestireno quando a temperatura tende a 0 °C (Rekatas e col., 2001).

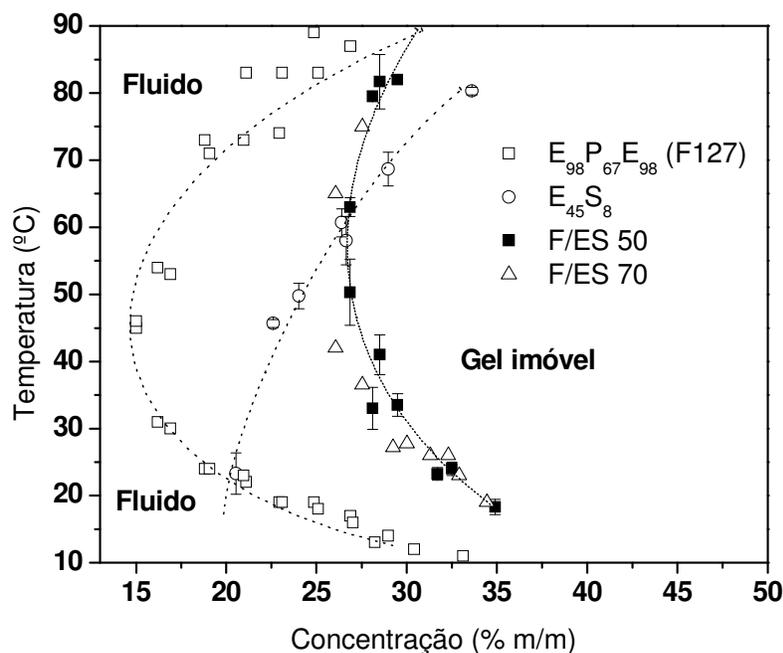


Figura 17. Diagrama de fases dos sistemas (□) F127, (○) ES, (■) F/ES 50 e (△) F/ES 70.

Na faixa de temperatura estudada (10–90 °C), o ES começa a formar gel na concentração de 20,5%, com uma temperatura crítica de 23,3 °C, enquanto que o ESE só

começa a formar gel em uma concentração bem superior, 31,9%, com uma temperatura crítica de 28 °C (Tabela 4). Vale salientar que, neste caso, a temperatura crítica é a temperatura a partir da qual, sob aquecimento, os géis ganham mobilidade. O dibloco forma géis em concentrações (% m/m) menores que o tribloco, pois possui uma massa molar menor e os dois copolímeros possuem blocos hidrofóbicos de tamanhos semelhantes. Comparando-se os dois copolímeros com bloco de S de tamanho próximo, o que parece determinar a concentração crítica de formação de gel é o número de moléculas em solução. É interessante notar que a razão entre as massas molares numéricas médias ( $M_n$ ) do ES e do ESE é semelhante à razão entre as suas concentrações críticas % m/m:

$$M_n(\text{ES})/ M_n(\text{ESE}) = 0,57 \quad c^*\text{ES}/c^*\text{ESE} = 0,64$$

Além disso, pode-se observar que as concentrações críticas do ES e do ESE, expressas em molalidade, são praticamente iguais, com um valor aproximado de 0,09 mol/kg (Tabela 5). Suas curvas de transição também apresentam o mesmo perfil (Figuras 17 e 18).

Tabela 4. Concentração ( $c^*$ ) e temperatura ( $T^*$ ) críticas de formação de gel dos copolímeros F127, ES, ESE e suas misturas.

| Sistema   | $c^*$ (% m/m) | $T^*$ (°C)                   |
|---|---------------|------------------------------|
| E <sub>45</sub> S <sub>8</sub>                  | 20,5          | 23,3 <sup>1</sup> ± 3,1      |
| E <sub>45</sub> S <sub>10</sub> E <sub>45</sub> | 31,9          | 28 <sup>1</sup> ± 1,7        |
| F127  | 15            | 45 (Chaibundit e col., 2007) |
| F/ ES 30  | 33,2          | 16,3                         |
| F/ ES 50  | 26,8          | 41 ± 2,4                     |
| F/ ES 70  | 26,1          | 42 ± 1                       |
| F/ESE 30  | -             | -                            |
| F/ESE 50  | 37,7          | 47,3 ± 7,5                   |
| F/ESE 70  | 30,9          | 28,3 ± 0,6                   |

<sup>1</sup>Esta temperatura crítica é a temperatura máxima do gel, a partir da qual ele torna-se fluido.

(-) O sistema não formou gel em nenhuma temperatura e concentração estudada.

Das misturas de F127 e ES, não foi possível produzir uma curva de transição fluido-gel satisfatória para o sistema F/ES 30: na faixa estudada (15 a 40%), apenas para a concentração de 33,2% obteve-se uma transição estável, com temperatura mínima de formação de gel de

16 °C e nenhuma temperatura limite superior. Nas concentrações inferiores, as misturas eram fluidas em toda a faixa de temperatura estudada e nas concentrações superiores não se formaram misturas homogêneas. As misturas F/ES 50 e F/ES 70, possuem curvas de transição quase sobrepostas; elas conservam as propriedades termorresponsivas do F127, geleificando sob aquecimento. As suas curvas de transição estão deslocadas para a direita em relação ao F127 e têm uma curvatura mais aberta; isso é resultado do equilíbrio entre os dois polímeros com propriedades termogeificantes contrárias. A formação de géis desses sistemas com uma temperatura de transição na faixa entre a temperatura ambiente e a temperatura corpórea (25-37 °C) (Figura 18) tornam essas misturas interessantes para a administração de medicamentos.

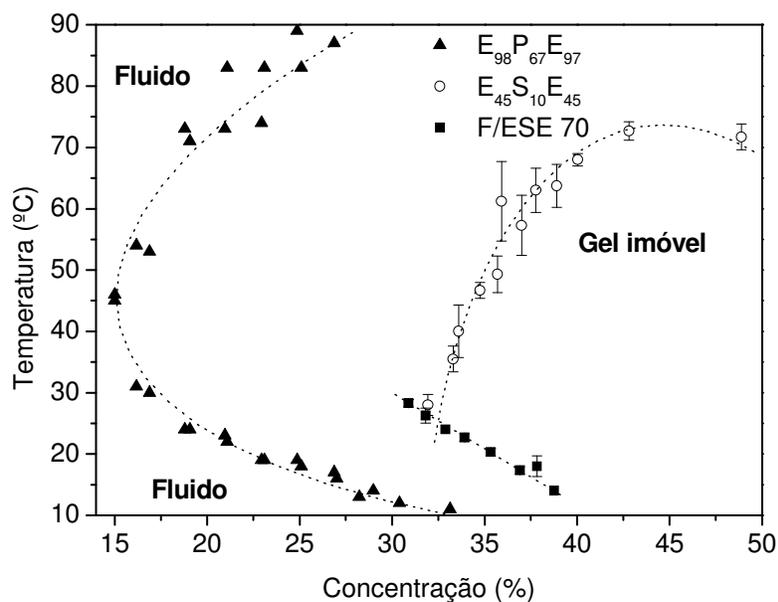


Figura 18. Diagrama de fases dos copolímeros (▲) F127, (○) ESE e (■) F/ESE 70.

Tabela 5. Concentração crítica de formação de gel expressa em % m/m (massa polímero/massa solução) e molalidade (mol polímero/kg água) para os sistemas ES, ESE e F127.

| Polímero | $c^*$ (% m/m) | $m_{\text{polímero}}(\text{g})$ | $m_{\text{água}}(\text{g})$ | $n_{\text{polímero}}(\text{mol})$ | $c^*(\text{mol/kg})$ |
|----------|---------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| ES       | 20,5          | 20,5                            | 79,5                        | 6,97 E-3                          | 0,0876               |
| ESE      | 31,9          | 31,9                            | 68,1                        | 6,18 E-3                          | 0,0908               |
| F127     | 15            | 15                              | 85                          | 1,20 E-3                          | 0,0141               |

O sistema F/ESE 30 não formou gel duro estável em nenhuma das concentrações estudadas (de 15 a 50 %), mas em algumas concentrações ele tornava-se mais viscoso com o aumento da temperatura. O sistema F/ESE 50 conservou as propriedades termorresponsivas do F127, com uma concentração crítica de formação de gel de 37,7 % a partir da temperatura de  $47,3 \text{ °C} \pm 7,5$  (Tabela 4). No entanto, ele não apresentou uma curva de transição fluido-gel estável, uma vez que em concentrações superiores à crítica as temperaturas de formação de gel variavam irregularmente, subindo e descendo, motivo pelo qual não a apresentamos. O sistema F/ESE 70 também conservou as propriedades termogeleificantes do F127, mas não apresentou limite superior de transição gel-fluido em nenhuma concentração na faixa de temperatura estudada (Figura 18).

### 4.1.3. Concentração micelar crítica (CMC)

A partir dos espectros de emissão de fluorescência do DPH nos sistemas poliméricos diluídos (ver ilustração do sistema F/ES 70, Figura 19), fizeram-se gráficos da intensidade de emissão do DPH no comprimento de onda de 428 nm *versus* o logaritmo da concentração (g/L) dos sistemas poliméricos (ver ilustração dos sistemas F127 e ESE a 25 e 37 °C, Figura 20). A CMC dos sistemas poliméricos foi calculada a partir do vértice da curva de intensidade de emissão *versus* log C (Figura 20), onde começa a haver um aumento brusco da intensidade de emissão do DPH, devido à sua solubilização pelas micelas do sistema após a CMC. (Alexandridis, Holzwarth e Hatton, 1994). Estima-se um erro de até  $\pm 25\%$  nas medidas.

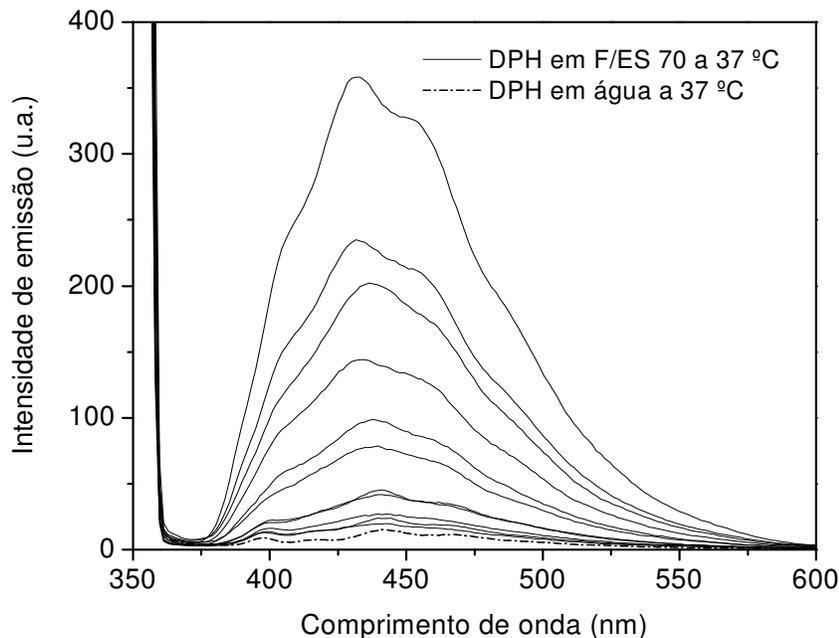


Figura 19. Espectro de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 350$  nm) para o DPH em água e em soluções de F/ES 70 em concentrações de  $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  g/L.

A Tabela 6 mostra os resultados de CMC a 25 °C e a 37 °C dos copolímeros e suas misturas. Os resultados foram expressos em termos de massa de polímero (g/L), uma vez que esta é a forma usual de se avaliar as aplicações de soluções aquosas de polímeros, e em termos de número de mol (mol/L), para se analisar a termodinâmica de micelização dos copolímeros. Não houve uma variação considerável da CMC dos copolímeros e de suas misturas com a temperatura. De um modo geral, a CMC a 37 °C é menor que a 25 °C, em

especial para o F127. Esse comportamento pode ser explicado por estudos anteriores que mostram um processo de micelização mais endotérmico para os triblocos do tipo  $E_nP_mE_n$ , com valores de  $\Delta H^\circ$  de micelização em torno de 200 kJ/mol ou mais (Alexandridis e col., 1994), e uma entalpia de micelização reduzida para os copolímeros do tipo  $E_nS_m$ ,  $E_nS_mE_n$ , variando de 4 a 40 kJ/mol (Crothers e col., 2002; Yang e col., 2003). Casos de micelização atérmica já foram observados para diblocos  $E_nB_m$ , onde B denota a unidade de óxido de butileno (Kelarakis e col., 1998). Esses valores de entalpia padrão de micelização são calculados a partir da relação  $\log(\text{CMC})$  versus  $1/T$ .

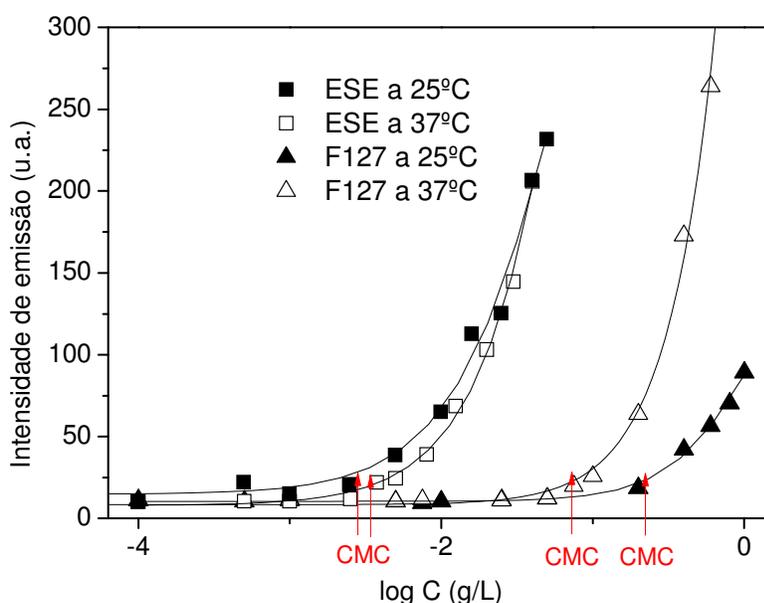


Figura 20. Gráficos de emissão de fluorescência *versus*  $\log C$  (g/L) dos sistemas ESE e F127 a 25 e 37 °C.

Os valores de CMC em mol/L do ES e do ESE são bem menores que os valores do F127. O comprimento do bloco de  $E_m$  não interfere na CMC, mas o caráter hidrofóbico do seu bloco hidrofóbico, sim (Yang. e col., 1995; Kelarakis e col., 1998; Attwood, Zhou e Booth, 2007). Quanto mais hidrofóbico, menor a CMC do polímero, uma vez que a micelização reduz as interações desfavoráveis da cadeia hidrofóbica com a água. Por isso, tem-se que a CMC do  $E_{98}P_{67}E_{98}$  (F127) é maior, mesmo com um bloco hidrofóbico mais longo que os do ES e do ESE, pois a hidrofobicidade relativa entre uma unidade de P e uma unidade de S é de 1:12. O ESE tem um bloco de polioxiestireno maior que o do ES, por isso a CMC do ESE é um pouco menor que a do ES. As CMC's (g/L) das misturas são intermediárias às dos polímeros puros, e são da mesma ordem de grandeza, com exceção da mistura F/ES 50. Ainda

assim, com baixos valores de CMC, essas misturas continuam sendo promissoras para aplicações farmacológicas devido à potencial estabilidade de suas micelas após a diluição sanguínea.

Tabela 6. CMC's dos copolímeros ES, ESE, F127 e suas misturas a 25 e 37 °C.

| Sistemas   | CMC (g/L) |        | CMC (mmol/L) |         |
|--|-----------|--------|--------------|---------|
|  | 25 °C     | 37 °C  | 25 °C        | 37 °C   |
| E <sub>45</sub> S <sub>8</sub>                         | 0,0030    | 0,0020 | 0,0010       | 0,00068 |
| F/ES 30  | 0,0047    | 0,0031 | 0,0012       | 0,00081 |
| F/ES 50  | 0,022     | 0,019  | 0,0046       | 0,0040  |
| F/ES 70  | 0,0074    | 0,0074 | 0,0012       | 0,0012  |
| E <sub>45</sub> S <sub>10</sub> E <sub>45</sub>        | 0,0023    | 0,0030 | 0,00044      | 0,00050 |
| F/ESE 30   | 0,010     | 0,0054 | 0,0016       | 0,00086 |
| F/ESE 50   | 0,0098    | 0,0098 | 0,0013       | 0,0013  |
| F/ESE 70   | 0,012     | 0,0081 | 0,0014       | 0,00092 |
| E <sub>98</sub> P <sub>67</sub> E <sub>98</sub> (F127) | 0,23      | 0,079  | 0,011        | 0,0039  |

De acordo com a equação (6), apresentada na introdução sobre micelização, observa-se que apresentando valores de CMC menores que 1 mol/L, os copolímeros têm valores de  $\Delta G_m^\circ$  negativos, comprovando que embora sua micelização seja um processo endotérmico, ela é um processo espontâneo nas condições padrões, devido ao aumento de entropia.

#### 4.1.4. Solubilização dos fármacos

As curvas de calibração em metanol para a griseofulvina e a quercetina (Figura 21) assim como suas equações (12 e 13) estão apresentadas a seguir:

$$\text{Griseofulvina } (\lambda = 292 \text{ nm}): \quad \text{Abs} = 0,06359C + 0,00114 \quad (12)$$

$$\text{Quercetina } (\lambda = 375 \text{ nm}): \quad \text{Abs} = 0,07213C - 0,00822 \quad (13)$$

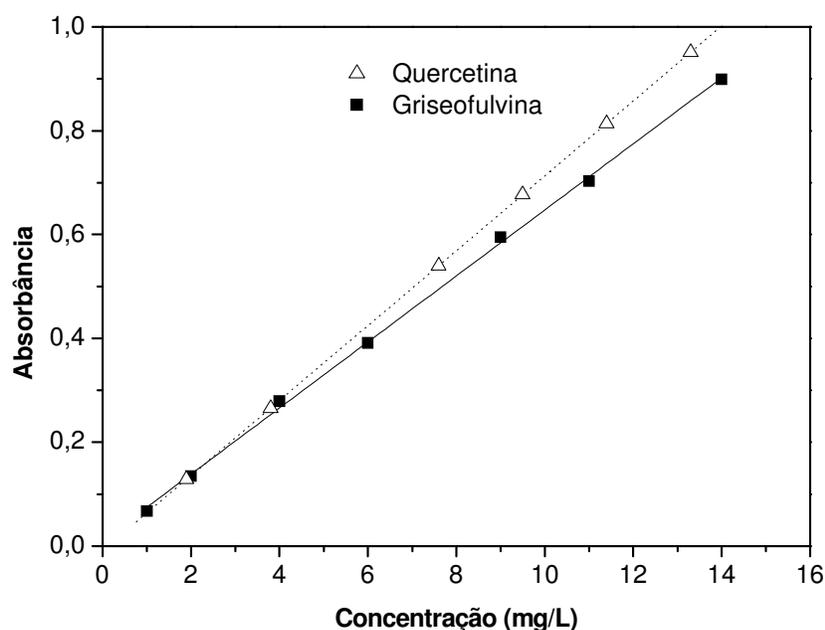


Figura 21. Curvas de calibração da ( $\Delta$ ) quercetina ( $\lambda=375$  nm) e da ( $\blacksquare$ ) griseofulvina ( $\lambda=292$  nm) em metanol.

Os resultados de solubilidade da quercetina em água foram bem baixos: 0,05 mg/dL a 25 °C e 0,10 mg/dL a 37 °C, semelhantes ao obtido por Saija e col. (2003) (0,0514mg/dL à temperatura ambiente) e por Vinadé (1997) (0,072mg/dL). Os resultados de solubilidade da griseofulvina foram de 3,6 mg/dL (25 °C) e 3,7 mg/dL (37 °C). A griseofulvina foi usada como um fármaco-modelo para comparação de resultados de solubilização obtidos para outros copolímeros.

As Tabelas 7-10 mostram os resultados de solubilização expressos pelos parâmetros  $S_{cp}$  (capacidade de solubilização) e  $S_h$  (capacidade de solubilização do bloco hidrofóbico).

A  $S_{cp}$  é calculada a partir da solubilidade total do fármaco na solução do copolímero ( $S$ ) menos a solubilidade do fármaco em água ( $S_o$ ) dividido pela massa do copolímero ( $m_{cop}$ ).

$$S_{cp} = S - S_o / m_{cop} \quad (14)$$

Visando verificar a contribuição da corona de polióxido de etileno na solubilização promovida pelo copolímero, Chaibundit e col. (2002) estudaram a solubilidade da griseofulvina numa solução de polietileno glicol a 5% m/m ( $M_n = 6000 \text{ g mol}^{-1}$ ) e verificaram que ela apresentou-se pouco diferente das medidas de solubilidade desse fármaco em água. Portanto, a solubilização na corona formada pelos blocos E não é uma consideração relevante. Assim, apenas a porção hidrofóbica é levada em consideração e a capacidade de solubilização em mg/g de bloco hidrofóbico ( $S_h$ ) é analisada. A solubilidade é calculada a partir dos valores de  $S_{cp}$ , com  $S_h = S_{cp}/W_h$ , onde  $W_h$  é a fração em massa do bloco hidrofóbico (isto é,  $W_h = 1 - W_E$ , com valores de  $W_h$  calculados para as misturas, usando os valores separados dos copolímeros em função de sua proporção). A quantidade de  $S_h$  fornece uma medida direta da eficiência da solubilização em núcleos micelares, sendo independente da composição do copolímero.

Os valores de  $S_h$  obtidos para os dois fármacos a 25 °C foram bem maiores para o ES e o ESE do que para o F127, devido à aromaticidade do polióxido de estireno (Tabelas 7 e 8). Os valores encontrados para as misturas se aproximam das médias ponderadas dos seus valores separados, indicando que o processo de micelização das misturas foi semelhante ao dos polímeros puros.

Tabela 7. Parâmetros de solubilização dos copolímeros F127, E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> e suas misturas a 25 °C.  $S_0 = 3,6 \text{ mg/dL}$  para a griseofulvina e  $S_0 = 0,05 \text{ mg/dL}$  para a quercetina.

| Sistemas    | Griseofulvina |                 |       | Quercetina  |                 |       |
|-------------|---------------|-----------------|-------|-------------|-----------------|-------|
|             | $S$ (mg/dL)   | $S_{cp}$ (mg/g) | $S_h$ | $S$ (mg/dL) | $S_{cp}$ (mg/g) | $S_h$ |
| ES          | 12,91 ± 1,93  | 9,31            | 28,47 | 3,28 ± 0,11 | 3,23            | 9,88  |
| F/ ES 30/70 | 11,43 ± 1,42  | 7,84            | 24,27 | -           | -               | -     |
| F/ ES 50/50 | 9,93 ± 1,12   | 6,32            | 19,69 | -           | -               | -     |
| F/ ES 70/30 | 9,42 ± 0,96   | 5,82            | 18,24 | 1,89 ± 0,18 | 1,84            | 5,82  |
| F127        | 6,56 ± 1,18   | 2,96            | 9,28  | 0,86 ± 0,11 | 0,81            | 2,60  |

(-) Resultados não obtidos.

Tabela 8. Parâmetros de solubilização dos copolímeros F127, E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> e suas misturas a 25 °C. S<sub>0</sub>= 3,6 mg/dL para a griseofulvina e S<sub>0</sub>= 0,05 mg/dL para a quercetina.

| Sistemas     | Griseofulvina |                        |                | Quercetina  |                        |                |
|--------------|---------------|------------------------|----------------|-------------|------------------------|----------------|
|              | S (mg/dL)     | S <sub>cp</sub> (mg/g) | S <sub>h</sub> | S (mg/dL)   | S <sub>cp</sub> (mg/g) | S <sub>h</sub> |
| ESE          | 11,97 ± 0,45  | 8,37                   | 35,92          | 3,10 ± 0,07 | 3,05                   | 13,09          |
| F/ ESE 30/70 | 10,44 ± 0,83  | 6,84                   | 26,72          | -           | -                      | -              |
| F/ ESE 50/50 | 10,10 ± 0,56  | 6,50                   | 23,90          | -           | -                      | -              |
| F/ ESE 70/30 | 9,32 ± 0,59   | 5,72                   | 19,86          | 1,74 ± 0,17 | 1,69                   | 5,87           |
| F127         | 6,56 ± 1,18   | 2,96                   | 9,28           | 0,86 ± 0,11 | 0,81                   | 2,60           |

(-) Resultados não obtidos.

A 37 °C (Tabelas 9 e 10), os valores de  $S$  e  $S_h$  da griseofulvina podem ser considerados similares em relação aos medidos a 25 °C, considerando os desvios padrões de  $S$ . Quanto à quercetina, verificou-se que o aumento de temperatura elevou consideravelmente os valores de  $S$  e  $S_h$ , em especial para o F127, cujo processo de micelização é mais sensível à temperatura, como foi discutido na seção anterior. Esse último resultado é apoiado pela diminuição de sua CMC a 37 °C (Tabela 6). Ainda assim, a 37 °C, o núcleo de polioxiestireno do ES e do ESE continuou mais eficiente que o núcleo de polioxipropileno do F127.

A capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ) da griseofulvina a 25 °C relatada para o F127 por Attwood, Zhou e Booth (2007), 3,2 mg/g, foi semelhante à deste trabalho. Os valores de  $S_h$  do E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> (22 mg/g) e do E<sub>45</sub>S<sub>10</sub> (29 mg/g) a 25 °C, relatados para a griseofulvina por Crothers e col. (2005), e o valor de  $S_h$  encontrado neste trabalho para o E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> (ES, Tabela 7) são menores que para o tribloco E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> (Tabela 8). A mesma tendência foi encontrada para a griseofulvina a 37 °C e para a quercetina nas duas temperaturas. Isso sugere que a conformação de micelas de triblocos torna o núcleo hidrofóbico mais eficiente para a solubilização de fármacos em comparação às micelas de diblocos (ver Figura 8a).

Tabela 9. Parâmetros de solubilização dos copolímeros F127, E<sub>45</sub>S<sub>8</sub> e suas misturas a 37 °C. S<sub>0</sub> = 3,7 mg/dL para a griseofulvina e S<sub>0</sub> = 0,10 mg/dL para a quercetina.

| Sistemas    | Griseofulvina |                        |                | Quercetina  |                        |                |
|-------------|---------------|------------------------|----------------|-------------|------------------------|----------------|
|             | S (mg/dL)     | S <sub>cp</sub> (mg/g) | S <sub>h</sub> | S (mg/dL)   | S <sub>cp</sub> (mg/g) | S <sub>h</sub> |
| ES          | 13,95 ± 0,61  | 10,27                  | 31,41          | 6,14 ± 0,43 | 6,04                   | 18,47          |
| F/ ES 30/70 | 10,82 ± 0,77  | 7,12                   | 22,11          | -           | -                      | -              |
| F/ ES 50/50 | 8,96 ± 0,81   | 5,26                   | 16,49          | -           | -                      | -              |
| F/ ES 70/30 | 7,88 ± 0,67   | 4,18                   | 13,23          | 5,20 ± 0,75 | 5,10                   | 16,14          |
| F127        | 5,81 ± 0,31   | 2,11                   | 6,78           | 3,77 ± 0,09 | 3,67                   | 11,8           |

(-) Resultados não obtidos.

Tabela 10. Parâmetros de solubilização dos copolímeros F127, E<sub>45</sub>S<sub>10</sub>E<sub>45</sub> e suas misturas a 37 °C. S<sub>0</sub> = 3,7 mg/dL para a griseofulvina e S<sub>0</sub> = 0,10 mg/dL para a quercetina.

| Sistemas     | Griseofulvina |                        |                | Quercetina  |                        |                |
|--------------|---------------|------------------------|----------------|-------------|------------------------|----------------|
|              | S (mg/dL)     | S <sub>cp</sub> (mg/g) | S <sub>h</sub> | S (mg/dL)   | S <sub>cp</sub> (mg/g) | S <sub>h</sub> |
| ESE          | 13,49 ± 0,76  | 9,79                   | 42,01          | 5,05 ± 0,21 | 4,95                   | 21,24          |
| F/ ESE 30/70 | 7,80 ± 0,11   | 4,10                   | 16,02          | -           | -                      | -              |
| F/ ESE 50/50 | 7,45 ± 0,71   | 3,75                   | 13,79          | -           | -                      | -              |
| F/ ESE 70/30 | 7,11 ± 0,39   | 3,54                   | 12,30          | 4,26 ± 0,11 | 4,16                   | 14,44          |
| F127         | 5,81 ± 0,31   | 2,11                   | 6,78           | 3,77 ± 0,09 | 3,67                   | 11,8           |

(-) Resultados não obtidos.

A Tabela 11 mostra em quantas vezes a solubilidade em água da griseofulvina e da quercetina aumentou nas soluções aquosas a 1% dos copolímeros a 25 e a 37 °C. Esses valores de  $S/S_0$  expressam os resultados de solubilização para aplicação direta das formulações aquosas dos copolímeros a 1% (m/v).

Os resultados para a quercetina são bem expressivos nas duas temperaturas: as soluções dos copolímeros ES e ESE são as mais eficientes devido à maior capacidade de solubilização do bloco de polioxiestireno em relação ao bloco de polioxipropileno, e o aumento de sua solubilidade aquosa chega a superar o de pró-fármacos da quercetina estudados por Kim e col. (2009) (estudo feito em soluções de tampão fosfato pH 7,4). As misturas com o F127 apresentaram valores intermediários aos dos copolímeros puros, mas ainda assim são satisfatórios. O aumento da solubilidade da griseofulvina não é tão expressivo, mas os

resultados são superiores ou equivalentes aos obtidos para copolímeros do mesmo tipo em trabalhos anteriores (Ribeiro e col., 2009b).

Tabela 11. Aumento ( $S/S_0$ ) das solubilidades da griseofulvina e da quercetina nas soluções a 1% dos sistemas poliméricos. Foram considerados apenas os desvios padrões das absorbâncias para os cálculos.

| Sistemas     | Griseofulvina |             | Quercetina |            |
|--------------|---------------|-------------|------------|------------|
|              | 25 °C         | 37 °C       | 25 °C      | 37 °C      |
| F127         | 1,82 ± 0,33   | 1,57 ± 0,08 | 17,2 ± 2,2 | 37,7 ± 0,9 |
| ES           | 3,59 ± 0,54   | 3,77 ± 0,17 | 65,6 ± 2,2 | 61,4 ± 4,3 |
| F/ ES 30/70  | 3,18 ± 0,40   | 2,93 ± 0,21 | -          | -          |
| F/ ES 50/50  | 2,76 ± 0,31   | 2,42 ± 0,22 | -          | -          |
| F/ ES 70/30  | 2,62 ± 0,27   | 2,13 ± 0,18 | 37,8 ± 3,6 | 52,0 ± 7,5 |
| ESE          | 3,32 ± 0,12   | 3,65 ± 0,21 | 62,0 ± 1,4 | 50,5 ± 2,1 |
| F/ ESE 30/70 | 2,90 ± 0,23   | 2,11 ± 0,03 | -          | -          |
| F/ ESE 50/50 | 2,81 ± 0,16   | 2,01 ± 0,19 | -          | -          |
| F/ ESE 70/30 | 2,59 ± 0,18   | 1,92 ± 0,11 | 34,8 ± 2,7 | 42,6 ± 1,1 |

(-) Resultados não obtidos.

#### 4.1.5. Liberação *in vitro*

A liberação de fármacos hidrofóbicos de nanopartículas estruturadas na forma de núcleo-corona é muito dependente das propriedades hidrofóbicas do núcleo (Allen, Maysinger e Eisenberg, 1999). Os perfis de liberação da griseofulvina dos sistemas micelares estão apresentados na Figura 22. Observa-se que o sistema F127 foi o que apresentou maior taxa de liberação da griseofulvina, estabilizando-se após 5 dias em cerca de 51%. Os sistemas ESE e ES apresentaram perfis de liberação bem semelhantes: após 5 dias de liberação, o percentual de griseofulvina liberada foi de aproximadamente 34% para os dois; a liberação estabilizou-se a partir desse tempo para o sistema ESE, mas para o sistema ES a taxa de griseofulvina liberada não se estabilizou até o fim do experimento (7 dias).

Três mecanismos têm sido considerados como padrões de liberação em encapsulados de nanopartículas baseados em micelas: (i) difusão, (ii) degradação do copolímero e (iii) estabilidade da micela (Allen e col., 2000). Nesse experimento, é coerente pensar que o mecanismo de liberação predominante foi o de difusão, uma vez que a concentração do polímero no interior do compartimento de diálise não variou durante o experimento, pois a massa molecular de corte da membrana (MWCO=2000 g/mol) é menor que a massa dos copolímeros (ver Tabela 1).

No caso de copolímeros com baixa taxa de degradação, a taxa de liberação é fortemente influenciada por fatores como: a força de interação entre o fármaco e o bloco formador do núcleo (principal fator), a fase de agregação do núcleo micelar, a quantidade de fármaco encapsulado, a massa molecular do fármaco, o comprimento do bloco formador do núcleo e a localização do fármaco dentro da micela (Allen e col., 2000). Dessa forma podemos explicar porque a taxa de liberação foi maior para o F127 do que para o ES e ESE, uma vez que a interação fármaco/núcleo micelar é mais forte nos copolímeros com núcleo de polioxiestireno em relação ao núcleo de polioxipropileno.

Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos de capacidade de solubilização por grama de bloco hidrofóbico ( $S_h$ ) para os copolímeros (ver Tabelas 9 e 10): o F127 tem a menor  $S_h$  (interação mais fraca do núcleo micelar com a griseofulvina) enquanto o ES e o ESE possuem  $S_h$  maior (interação mais forte do núcleo micelar com a griseofulvina). É interessante notar que a taxa de liberação da griseofulvina no sistema ES ainda tende a aumentar, o que está de acordo com o fato de sua  $S_h = 31,41$  ser menor do que a do ESE ( $S_h =$

42,01), sustentando o fato de que a conformação de micelas de triblocos é mais favorável para a administração de fármacos hidrofóbicos.

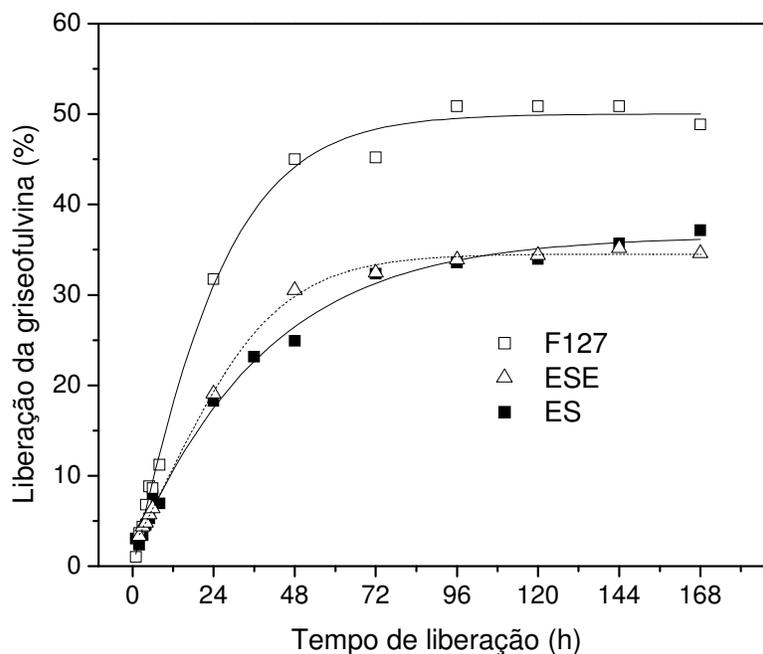


Figura 22. Perfil de liberação da griseofulvina em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C: (□) griseofulvina encapsulada em F127, (Δ) encapsulada em ESE (■) encapsulada em ES.

O sistema que possui maior quantidade de fármaco encapsulado possui menor taxa de liberação conforme observado por Soo e col. (2005) num estudo de liberação do estradiol em micelas de um copolímero em bloco de PCL-PEG e por Kim e col. (1998) em estudo com o fármaco indometacina em um copolímero dibloco do mesmo tipo. É interessante notar que os testes com o fármaco não encapsulado exibem uma liberação inicial bastante rápida e uma taxa de liberação de quase 100% (Kim e col., 1998), mostrando a eficiência de sistemas micelares em controlar a liberação de fármacos hidrofóbicos. A estabilidade das micelas após a diluição sanguínea (baixa CMC) acarreta maior tempo de circulação do fármaco no sangue (Letchford e Burt, 2007), acrescido da minimização dos efeitos colaterais causados pelo fármaco em sua forma livre.

#### 4.1.6. Medida de tamanho das micelas

Os gráficos de distribuição de tamanho por volume das nanopartículas (micelas) dos sistemas poliméricos a 0,1% em água estão apresentados na Figura 23. Pode-se observar que as distribuições são todas unimodais, com apenas um pico. Dessa forma, os valores de diâmetro hidrodinâmico médio de pico ( $D_h$ ) e do índice de polidispersividade de tamanho (PDI) são apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Nessas amostras, o mesmo perfil de distribuição e o mesmo diâmetro médio ( $D_h$ ) foram observados para as concentrações de 0,1% e 1% (m/V), por isso apenas os gráficos dos sistemas a 0,1% estão apresentados. Todos esses sistemas estão em concentrações acima de sua CMC a 25 °C, então suas micelas apresentam um tamanho médio menor que 200 nm, que é uma grande vantagem para seu uso em aplicações farmacológicas intravenosas ou subcutâneas. Análises de soluções micelares de F127 feitas em um equipamento ZetaSizer, modelo ZEN3600 da Malvern (semelhante ao usado neste trabalho), apresentaram  $D_h$  por volta de 8 nm a 25 °C (Yang e col., 2009), em coerência com os resultados aqui obtidos.

A distribuição unimodal das micelas em ambas as concentrações nos sistemas F/ES 70 e F/ESE 70 (Tabelas 12 e 13) sugere que os copolímeros se comicelizaram, ou seja, formaram micelas com unímeros dos dois copolímeros, como já foi observado para outras misturas de copolímeros. As misturas F/ES 70 e F/ESE 70 (nas quais o copolímero F127 representa 70% da massa de polímero) apresentaram distribuição unimodal, com  $D_h$  igual aos dos copolímeros puros de polioxiestireno (ES e ESE). Isso é explicado pelo fenômeno de comicelização, ou seja, as micelas do sistema são formadas por cadeias dos dois copolímeros. Esse fenômeno também foi observado por Ricardo e col. (2006), em misturas dos copolímeros  $E_{135}B_{20}E_{135}$  e  $E_{82}S_9E_{82}$ , que mostraram distribuição de tamanho unimodal com tamanho de partícula similar ao das micelas isoladas do copolímero  $E_{82}S_9E_{82}$ ; nesse caso a comicelização foi explicada pela semelhança entre as hidrofobicidades dos blocos formadores dos núcleos micelares, ainda que o comprimento dos blocos hidrofóbicos seja diferente (20 unidades de B, óxido de estireno, *versus* 9 unidades de S, óxido de estireno).

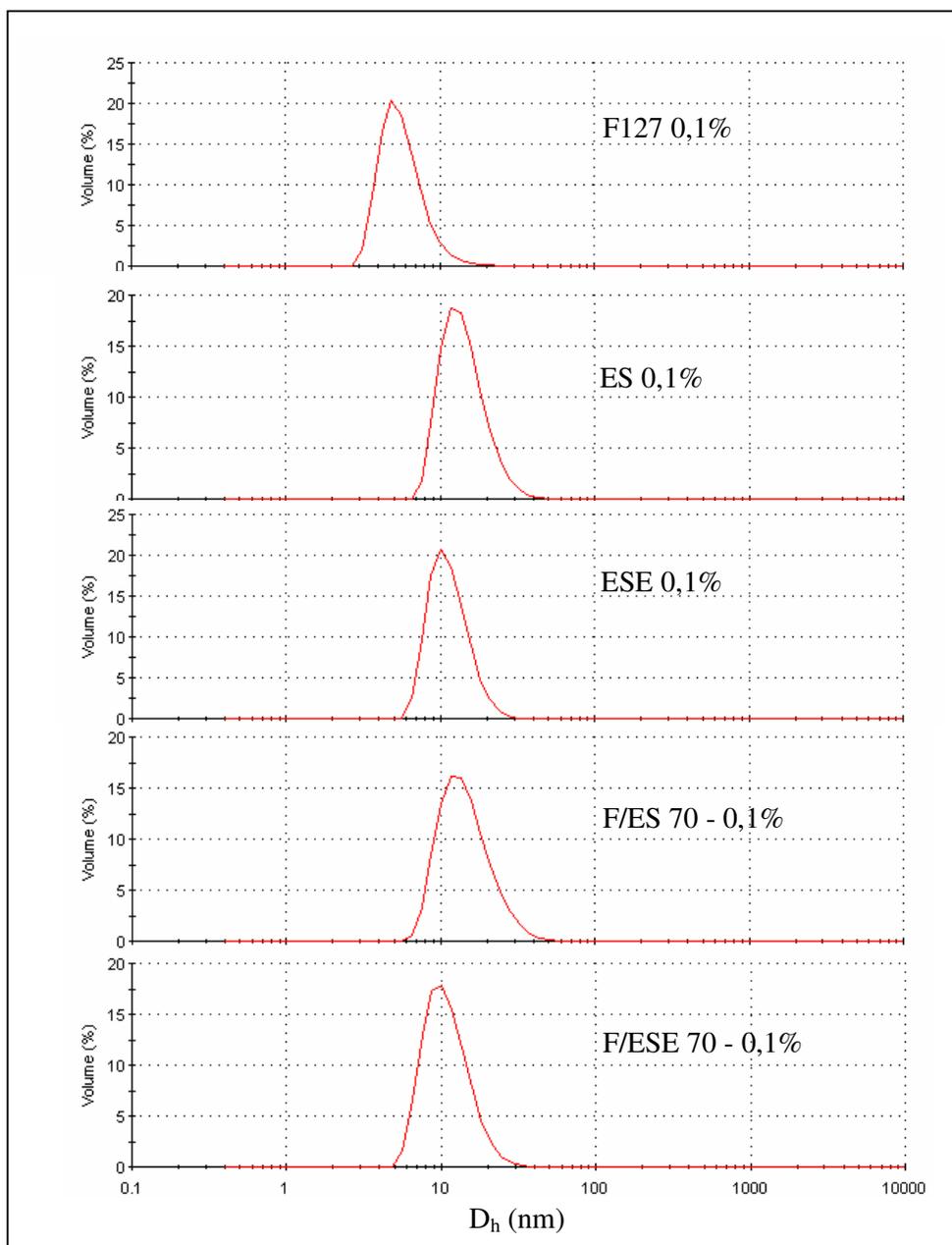


Figura 23. Curvas de distribuição de tamanho por volume para as micelas dos sistemas a 0,1% do F127, ES, ESE, F/ES 70 e F/ESE 70.

Tabela 12. Diâmetro hidrodinâmico médio de pico ( $D_h$ ) e índice de polidispersividade (PdI) dos sistemas poliméricos a 0,1% e a 1%.

| Sistemas | 0,1% (m/v)      |                   | 1% (m/v)        |                   |
|----------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|          | $D_h$ pico (nm) | PdI               | $D_h$ pico (nm) | PdI               |
| F127     | $5,8 \pm 0,1$   | $0,817 \pm 0,034$ | $5,5 \pm 0,2$   | $0,679 \pm 0,027$ |
| ES       | $14,5 \pm 0,1$  | $0,154 \pm 0,011$ | $13,9 \pm 0,2$  | $0,039 \pm 0,003$ |
| ESE      | $11,7 \pm 0,2$  | $0,418 \pm 0,038$ | $11,0 \pm 0,3$  | $0,113 \pm ,0008$ |
| F/ES 70  | $14,7 \pm 0,4$  | $0,228 \pm 0,008$ | $15,4 \pm 0,3$  | $0,127 \pm 0,009$ |
| F/ESE 70 | $11,4 \pm 0,3$  | $0,421 \pm 0,065$ | $11,6 \pm 0,1$  | $0,260 \pm 0,018$ |

É interessante observar, na Tabela 13, que a presença de griseofulvina nos sistemas a 1% (m/v) dos polímeros não alterou o tamanho médio de suas micelas. É comum o tamanho das micelas ficarem maior ao carrear um fármaco, mas há relatos de micelas de F127 cujo tamanho e distribuição praticamente não foi afetado pela presença do fármaco (Wei e col., 2009b). Isso pode ser explicado também pelo baixo percentual em massa de fármaco nas micelas desses copolímeros (menor ou igual a 1%).

Tabela 13. Diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_h$ ) de pico e índice de polidispersividade (PdI) dos sistemas poliméricos a 1% com e sem griseofulvina.

| Sistemas | Sem griseofulvina |                   | Com griseofulvina |                   |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|          | $D_h$ pico (nm)   | PdI               | $D_h$ pico (nm)   | PdI               |
| F127     | $5,5 \pm 0,2$     | $0,679 \pm 0,027$ | -                 | -                 |
| ES       | $13,9 \pm 0,2$    | $0,039 \pm 0,003$ | $13,9 \pm 0,2$    | $0,103 \pm 0,009$ |
| ESE      | $11,0 \pm 0,3$    | $0,113 \pm ,0008$ | $10,7 \pm 0,2$    | $0,122 \pm 0,006$ |
| F/ES 70  | $15,4 \pm 0,3$    | $0,127 \pm 0,009$ | $15,1 \pm 0,2$    | $0,201 \pm 0,008$ |
| F/ESE 70 | $11,6 \pm 0,1$    | $0,260 \pm 0,018$ | $12,3 \pm 0,2$    | $0,410 \pm 0,025$ |

(-) Dados não obtidos.

## 4.2. PARTE 2: ESTUDO DOS COPOLÍMEROS E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub>, E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub>, E SUAS MISTURAS COM O E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub> (LUTROL® F127)

### 4.2.1. Caracterização por RMN <sup>13</sup>C e GPC

A técnica de RMN <sup>13</sup>C é a mais importante técnica de caracterização estrutural de copolímeros em bloco. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) diferentes ocorrem para os carbonos do interior da cadeia e para os carbonos terminais. A partir desta informação, a massa molar ( $M_n$ ), a composição e o grau de pureza do copolímero podem ser obtidos. A Tabela 14 mostra os dados de massa molar média ( $M_n$ ), fração em massa do bloco de polióxido de etileno ( $W_E$ ) e fração em massa do bloco hidrofóbico ( $W_h$ ), obtidos por RMN <sup>13</sup>C, e o índice de polidispersividade ( $M_w/M_n$ ), obtido por GPC.

Tabela 14. Características moleculares dos copolímeros CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>.

| Copolímero                        | $M_n$ g.mol <sup>-1</sup> | $W_E$ | $W_h$ | $M_w/M_n$ por GPC |
|-----------------------------------|---------------------------|-------|-------|-------------------|
| E <sub>114</sub> CL <sub>20</sub> | 7296                      | 0,680 | 0,320 | 1,36              |
| E <sub>114</sub> CL <sub>50</sub> | 10716                     | 0,460 | 0,540 | 1,41              |

Os espectros obtidos para o monometóxi polietileno glicol (mPEG 5000 ou E<sub>114</sub>), precursor da síntese, e os seus copolímeros com  $\epsilon$ -caprolactona E<sub>114</sub>CL<sub>20</sub> (CL<sub>20</sub>) e E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub>, (CL<sub>50</sub>) estão nas Figuras 24, 25 e 26. A mesma expansão foi usada em todos os espectros.

As atribuições dos picos dos copolímeros foram feitas de acordo com Martini e col. (1994). As Tabelas 15 e 16 mostram as atribuições dos picos associados aos deslocamentos químicos do mPEG, CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>. As especificações de cada carbono com números e letras estão presentes nas Figuras 24, 25 e 26.

Tabela 15. Atribuição dos carbonos CH<sub>2</sub> associados aos deslocamentos químicos do mPEG 5000 (Martini e col. 2004; Pavia, Lampman e Kriz, 2001).

| Atribuição do CH <sub>2</sub> | Deslocamento químico / $\delta$ (ppm) |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| D                             | 58,9                                  |
| C                             | 71,8                                  |
| E                             | 70,4                                  |
| B                             | 72,3                                  |
| A                             | 61,6                                  |

Tabela 16. Atribuição dos carbonos CH<sub>2</sub> associados aos deslocamentos químicos dos copolímeros E<sub>n</sub>CL<sub>m</sub>, onde n = 114 e m = 20 ou 50 (Martini e col., 1994).

| Atribuição do CH <sub>2</sub> | Deslocamento químico / $\delta$ (ppm) |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| a*                            | 58,9                                  |
| b*                            | 71,7                                  |
| C                             | 70,4                                  |
| D                             | 69,0                                  |
| E                             | 63,3                                  |
| 2                             | 34,0                                  |
| 3                             | 25,3                                  |
| 4                             | 24,4                                  |
| 5                             | 28,1                                  |
| 6                             | 64,0                                  |
| 5*                            | 32,1                                  |
| 6*                            | 62,3                                  |

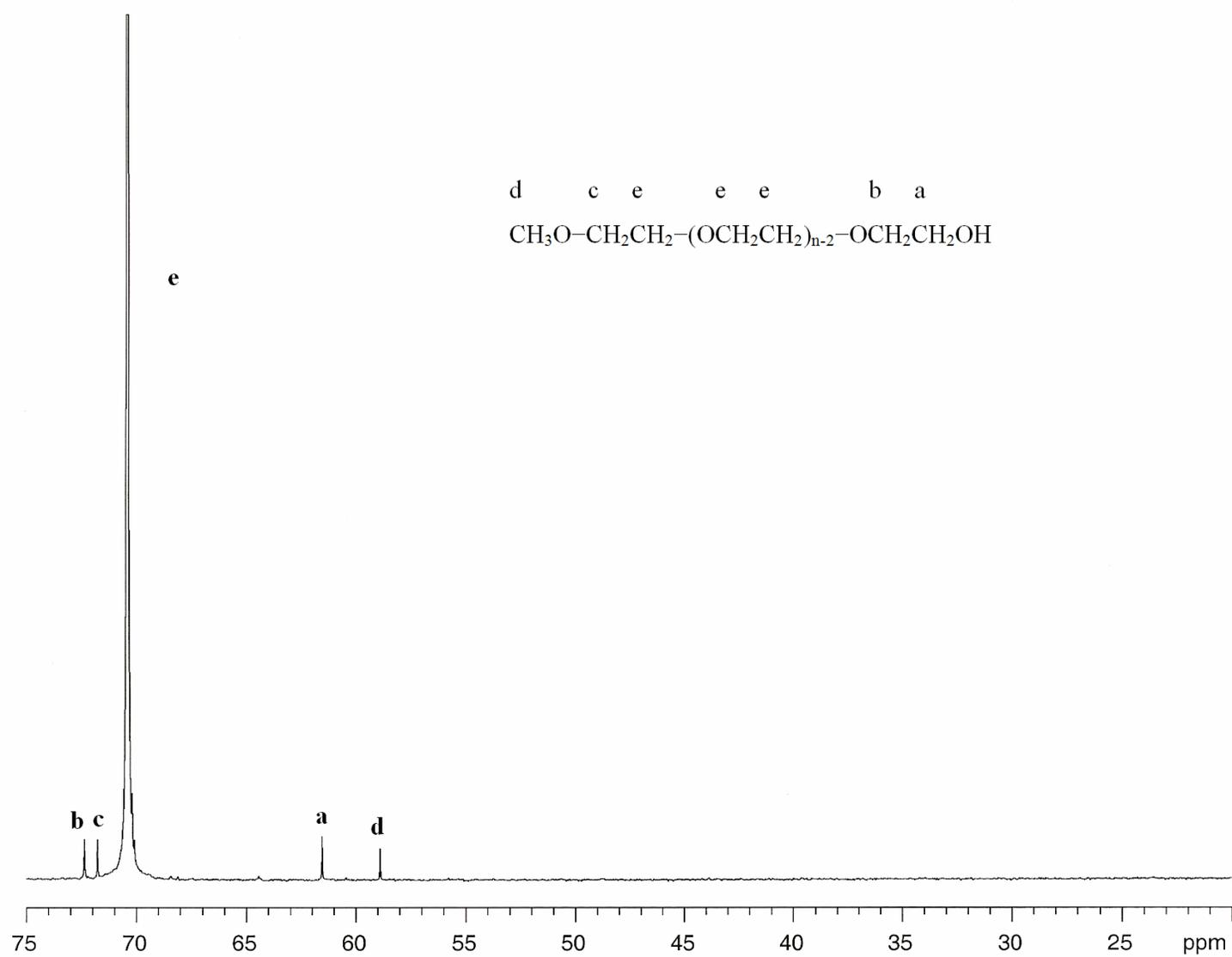


Figura 24. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o homopolímero mPEG 5000.

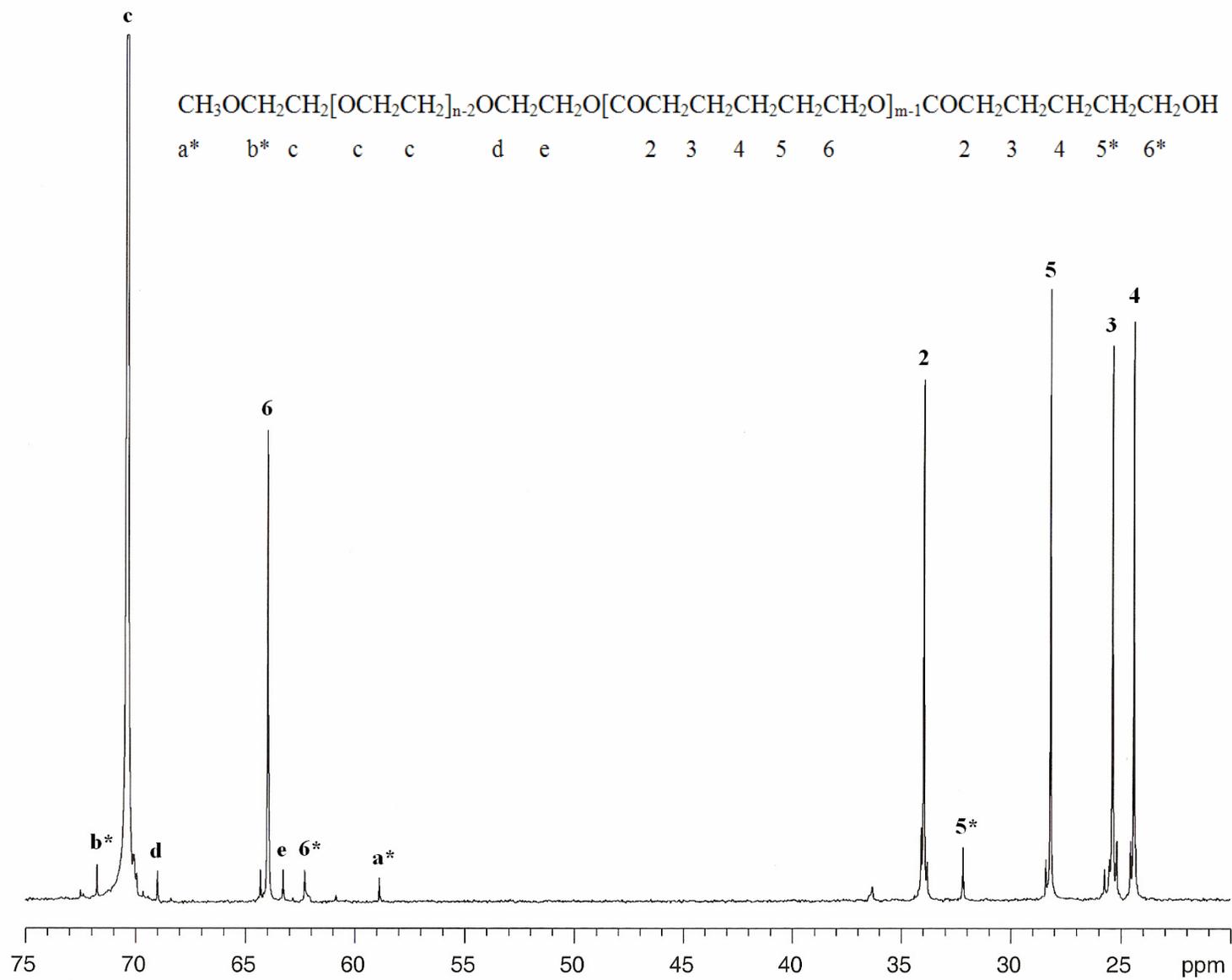


Figura 25. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o copolímero  $\text{E}_{114}\text{CL}_{20}$ , onde  $n=114$  e  $m=20$ .

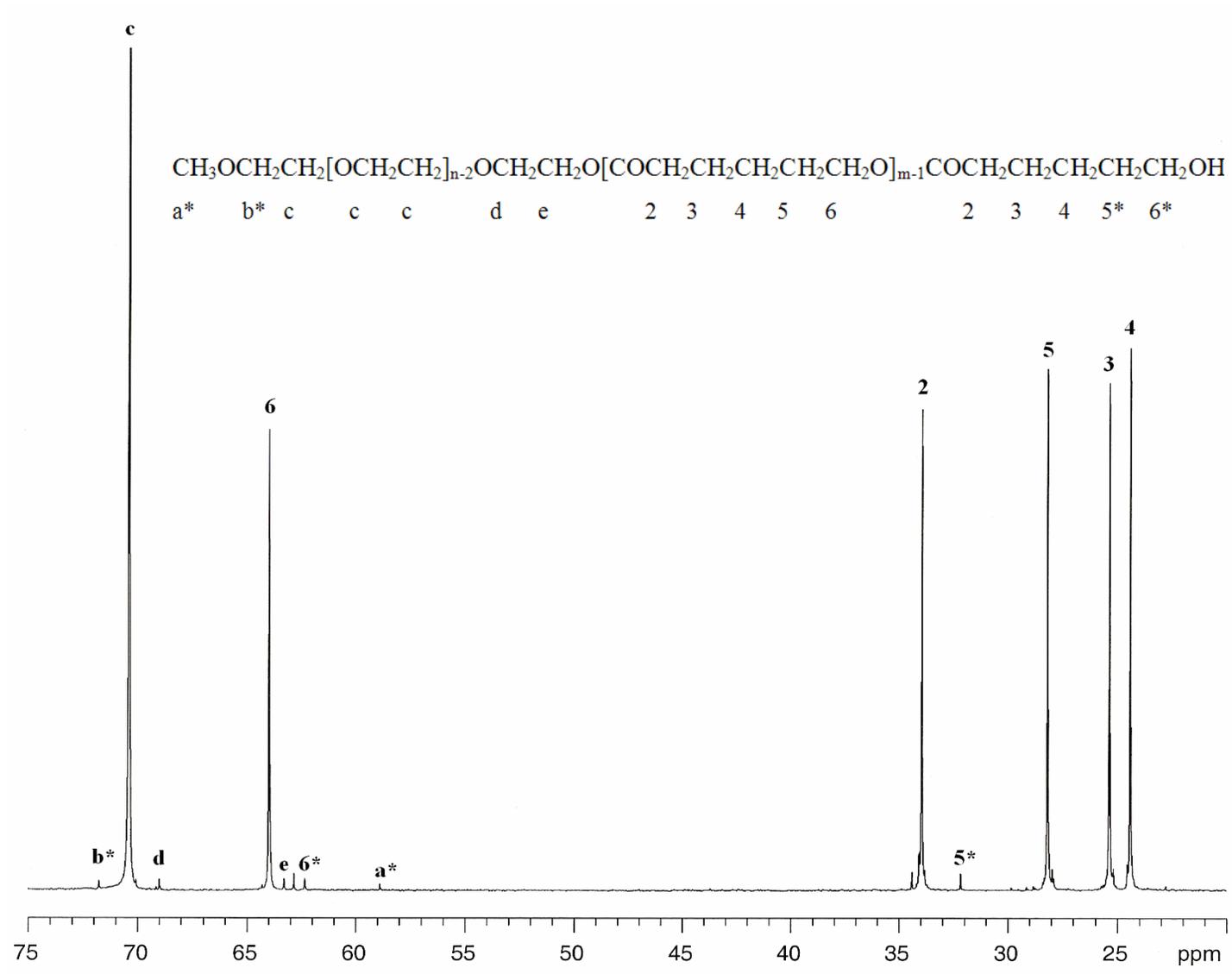


Figura 26. Espectro de RMN <sup>13</sup>C para o copolímero E<sub>114</sub>CL<sub>50</sub>, onde n=114 e m=50.

#### 4.2.2. Concentração micelar crítica

Os resultados de CMC (g/L e mmol/L) a 25 e 37 °C para os copolímeros CL<sub>20</sub>, CL<sub>50</sub> e suas misturas F127/CL<sub>20</sub> 90/10 (F/CL<sub>20</sub>) e F127/CL<sub>50</sub> 90/10 (F/CL<sub>50</sub>) estão na Tabela 17. Para ilustrar como os resultados foram obtidos, a Figura 27 apresenta os gráficos de intensidade de emissão de fluorescência do DPH (428 nm) *versus* o log C (g/L) do copolímero CL<sub>50</sub> a 25 °C e 37 °C. Estima-se um erro de até ± 25% nos valores de CMC obtidos a partir do gráfico (erro aceitável para a técnica).

Tabela 17. CMC's dos copolímeros puros CL<sub>20</sub>, CL<sub>50</sub>, F127 e suas misturas (F/CL<sub>20</sub> e F/CL<sub>50</sub>).

| Sistema            | CMC (g/L) |       | CMC (mmol/L) |        |
|--------------------|-----------|-------|--------------|--------|
|                    | 25 °C     | 37 °C | 25 °C        | 37 °C  |
| CL <sub>20</sub>   | 0,032     | 0,089 | 0,0043       | 0,0012 |
| CL <sub>50</sub>   | 0,014     | 0,014 | 0,0013       | 0,013  |
| F/CL <sub>20</sub> | 0,13      | 0,074 | 0,011        | 0,0060 |
| F/CL <sub>50</sub> | 0,089     | 0,087 | 0,0072       | 0,0072 |
| F127               | 0,23      | 0,079 | 0,011        | 0,0039 |

Comparando os copolímeros CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>, observa-se que a 25 °C a CMC (mmol/L) do CL<sub>20</sub> é menor que a do CL<sub>50</sub>, mas a 37 °C elas são semelhantes. Mesmo que o copolímero CL<sub>50</sub> tenha um bloco hidrofóbico maior que o CL<sub>20</sub>, o que poderia causar um maior efeito hidrofóbico e, conseqüentemente, uma menor CMC, observa-se que há um limite para o aumento desse efeito hidrofóbico. Attwood e col. (2007) (mini-revisão sobre as hidrofobicidades relativas dos núcleos de poliéteres e poliésteres de copolímeros em bloco para solubilização de fármacos) verificaram que a CMC de copolímeros do tipo E<sub>n</sub>CL<sub>m</sub>, com n ajustado para 100, diminui consideravelmente com o aumento de m (nº de unidades hidrofóbicas), mas a partir de m≈16, o coeficiente angular dessa relação log CMC (mol/L) *versus* m torna-se bem suave (ver Figura 28).

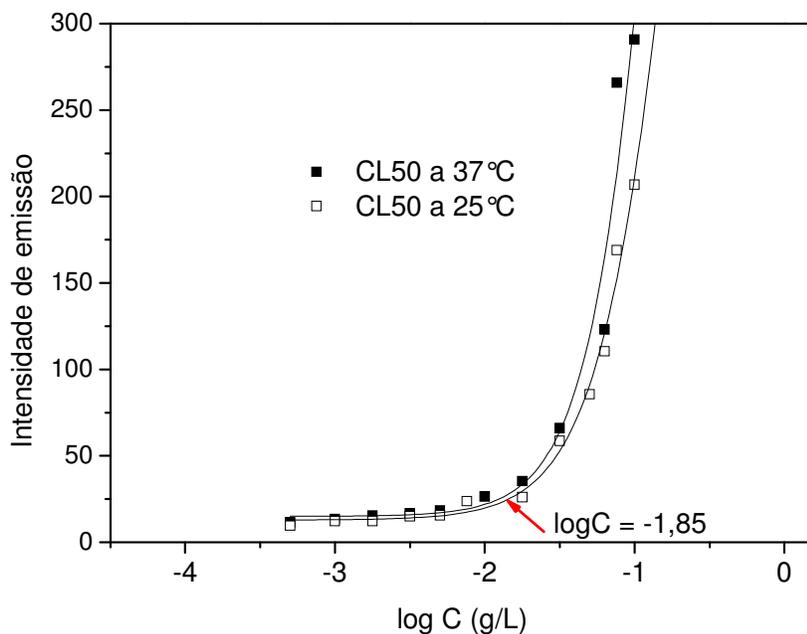


Figura 27. Gráficos de intensidade de emissão do DPH (428 nm) *versus* log C (g/L) no sistema CL<sub>50</sub> a (□) 25 °C e a (■) 37 °C.

Esse comportamento de menor variação de CMC é justificado pela formação de micelas unimoleculares: o bloco hidrofóbico colapsa para uma conformação compacta, enquanto o bloco hidrofílico fica numa conformação enrolada, como tem sido discutido por vários autores (Brown e col., 1989; Chu, 1995; Cooke e Williams, 2003). Uma consequência do colapso do bloco hidrofóbico é o seu reduzido contato com a água e, por isso, um efeito hidrofóbico reduzido, como discutido em detalhe por Kellarakis e col., 2001. Verificou-se também que os copolímeros CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> são difíceis de dissolverem em água, como Attwood e col. (2007) também observaram para diblocos com longas cadeias de CL<sub>m</sub> (m>16).

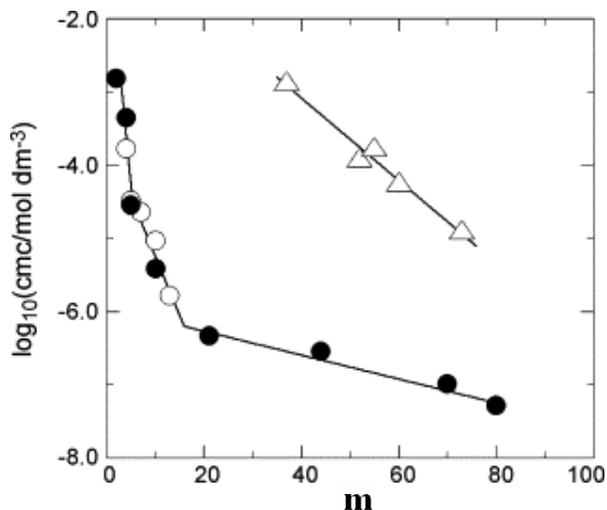


Figura 28. Dependência da CMC no comprimento do bloco hidrofóbico (m) para (●) E<sub>n</sub>CL<sub>m</sub>, (○) E<sub>n</sub>S<sub>m</sub> e (△) E<sub>n</sub>P<sub>m</sub>. Valores de CMC estão ajustados para um comprimento de bloco comum de E<sub>100</sub>. Extraído de Attwood e col. (2007).

Quanto à temperatura, houve uma pequena diminuição da CMC no CL<sub>20</sub> de 25 para 37 °C, revelando uma entalpia de micelização positiva, mas para o CL<sub>50</sub> ela manteve-se constante. Esse comportamento do CL<sub>50</sub> pode ser explicado pela sua longa cadeia hidrofóbica. Yamamoto e col. (2002) relataram valores de CMC para o E<sub>139</sub>L<sub>75</sub> em solução aquosa na faixa de temperatura de 25-55 °C, e os valores foram constantes até 40 °C, ou seja, uma entalpia de micelização nula, e tais valores cresceram com a temperatura acima de 40 °C. A mudança de comportamento foi correlacionada à perda de mobilidade do bloco de lactídeo no núcleo. Para explicar a insensibilidade da CMC à temperatura na primeira faixa, Yamamoto e col. (2002) deduziram uma mudança na solubilidade dos unímeros, cuja explicação mais provável é a formação de micelas unimoleculares. A insensibilidade da CMC à temperatura tem sido observada para vários copolímeros dibloco: por exemplo, E<sub>106</sub>B<sub>18</sub> (Kelarakis e col., 1998), S<sub>13</sub>E<sub>60</sub>, (Kelarakis e col., 2001), E<sub>45</sub>S<sub>10</sub> (Crothers e col., 2002), e é atribuída à formação de micelas unimoleculares.

Quanto às misturas F/CL<sub>20</sub> e F/CL<sub>50</sub>, onde 90% da massa polimérica correspondem ao F127, a 25 °C a presença de CL<sub>20</sub> praticamente não interferiu na CMC do F127 (de 0,14 para 0,13 g/L, enquanto o CL<sub>50</sub> exerceu uma certa influência (de 0,14 para 0,0089 g/L) (Tabela 17). A 37 °C, as misturas com CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> apresentaram CMC um pouco maior que a do F127; considerando os erros percentuais das medidas, pode-se considerar que a CMC das misturas é semelhante à do F127.

### 4.2.3. Inversão de tubo

A Figura 29 mostra o diagrama de fases dos copolímeros CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>. Pode-se observar que os copolímeros CL<sub>20</sub>, CL<sub>50</sub> não apresentam propriedades termorresponsivas de geleificação sob aquecimento. O trabalho de Gong e col. (2007) mostra vários copolímeros de PEG e PCL com essas mesmas características. A concentração crítica de formação de gel do CL<sub>20</sub> é de 20%, e do CL<sub>50</sub> é de 17%. Há uma grande diferença no perfil desses diagramas. A curva do CL<sub>20</sub> é bem mais suave, apresentando uma grande faixa de concentrações (de 20 a 40 %) onde ocorre a transição duro-fluido, enquanto que o CL<sub>50</sub>, devido à sua grande cadeia hidrofóbica, forma géis que apresentam uma transição duro-fluido numa pequena faixa de temperatura: há um grande salto na temperatura de transição duro-fluido (gel-sol) da concentração de 20% para 21% (de 46 para 70 °C).

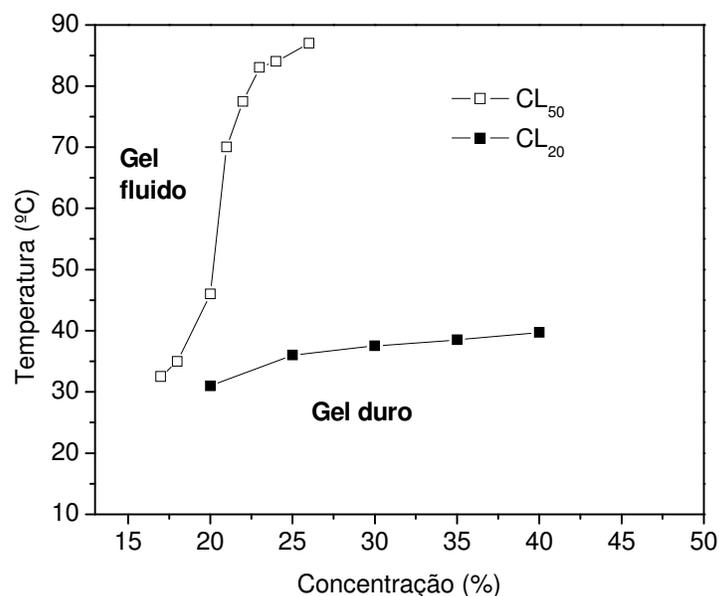


Figura 29. Diagrama de fases dos copolímeros (□) CL<sub>20</sub> e (■) CL<sub>50</sub>.

A Figura 30 mostra o diagrama de fases das misturas F/CL<sub>20</sub> e F/CL<sub>50</sub>. Pode-se observar que a adição dos copolímeros CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> na proporção de 10% conservou as propriedades termorresponsivas do F127. As duas misturas apresentaram concentrações onde a transição fluido-duro (sol-gel) ocorre na faixa de temperatura entre 25 e 37 °C, potencializando sua aplicação em administração subcutânea de fármacos. No entanto,

enquanto essas misturas estão na fase fluida (a baixas temperaturas), há uma sedimentação dos copolímeros de CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> (principalmente do CL<sub>50</sub>), sendo necessária uma homogeneização da mistura antes de sua aplicação subcutânea (37 °C).

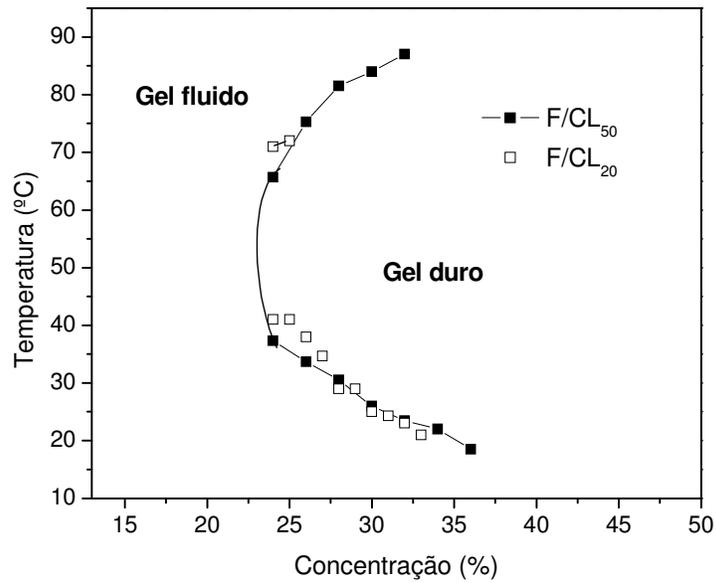


Figura 30. Diagrama de fases das misturas (□) F/CL<sub>20</sub> e (■) F/CL<sub>50</sub>.

#### 4.2.4. Caracterização das micropartículas por difração de raios-X

A Figura 31 mostra os difratogramas (na mesma escala) da quercetina e das micropartículas preparadas pelos métodos 1 (filme) e 2 (filme e sonicação). A difração de raios-X foi utilizada neste trabalho para verificar a eficiência da encapsulação da quercetina nos copolímeros. Vários trabalhos mostram a utilização dessa técnica para verificar a eficiência de encapsulação de fármacos em micro- e nanopartículas: o desaparecimento dos picos de difração do fármaco cristalino nas micropartículas indica total eficiência de encapsulação devido à dispersão formada com a matriz polimérica (Asada e col., 2004, Cavalcante e col., 2007).

Todas as amostras são consideradas cristalinas devido à presença de picos bem definidos (Figura 31). As amostras de CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> sem quercetina apresentam praticamente os mesmos picos, sendo três os que mais se destacam: 22,3°, 25,0° e 27,2° para as amostras de CL<sub>20</sub>; 22,3°, 24,9° e 27,7° para as amostras de CL<sub>50</sub>. O método de preparo não modificou os seus padrões cristalinos.

As micropartículas de CL<sub>50</sub> contendo quercetina preservaram os picos referentes aos polímeros (Figura 31), e apresentaram alguns picos extras (12,3°, 14,4°, 18,3° e 32,0°), referentes à quercetina, demonstrando que sua encapsulação nas micropartículas não foi total. Comparando-se os difratogramas da Figura 31(e) e (g), os picos de difração da quercetina estão claramente bem mais intensos em relação aos picos de CL<sub>50</sub> na amostra preparada pelo método 2, revelando uma maior cristalinidade da quercetina nessa amostra. Assim, o método 1 (filme) foi mais eficiente na encapsulação da quercetina do que o método 2 (filme e sonicação).

Das micropartículas de CL<sub>20</sub> contendo quercetina, apenas o difratograma da amostra preparada pelo método 1 está apresentado. Essa amostra (Figura 31b) não apresenta nenhum pico de difração extra quando comparada ao seu branco (Figura 31a), mostrando que a eficiência de encapsulação da quercetina é total nas micropartículas de CL<sub>20</sub> preparadas pelo método 1.

O difratograma da quercetina utilizada neste trabalho (ver Figura 31d) apresenta diversos picos; dentre eles, os principais são: 12,3°, 15,6°, 16,4°, 20,8°, 30,9° e 33,0°. Desses picos, apenas o de 12,3° aparece nas micropartículas contendo quercetina. Esses resultados são devido ao polimorfismo da quercetina, cujos padrões cristalinos mudaram durante o processo de preparo das micropartículas. Polimorfismo é a propriedade que um material

sólido tem de se apresentar em mais de uma estrutura cristalina. Vários fármacos apresentam polimorfismo, e as diferenças em suas estruturas podem gerar pequenas mudanças, como novos picos, ombros ou deslocamentos na difração de raios-X (Davidovich e col., 2004).

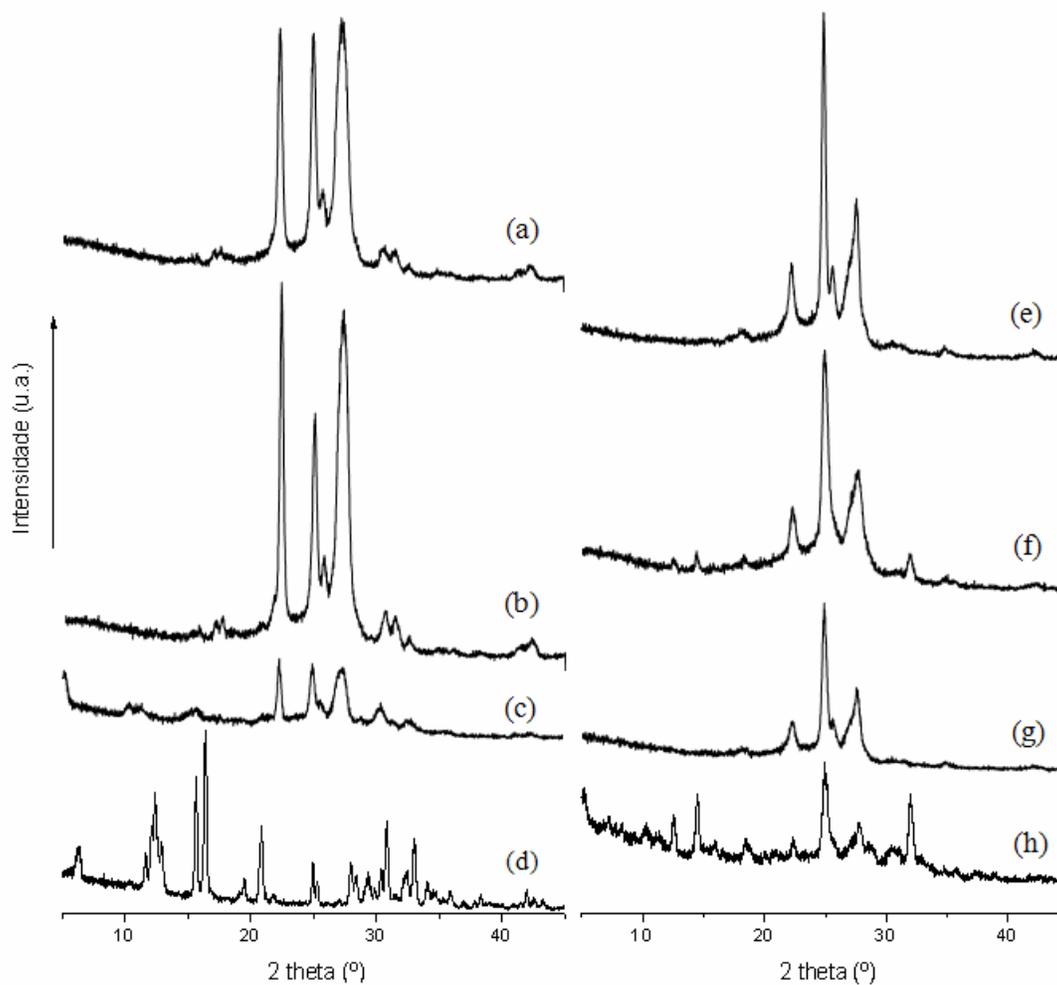


Figura 31. Difratoogramas das micropartículas dos copolímeros de caprolactona com e sem quercetina (Q): (a) CL<sub>20</sub> (método 1), (b) CL<sub>20</sub> + Q (método 1), (c) CL<sub>20</sub> (método 2), (d) quercetina, (e) CL<sub>50</sub> (método 1), (f) CL<sub>50</sub> + Q (método 1), (g) CL<sub>50</sub> (método 2) e (h) CL<sub>50</sub> + Q (método 2).

#### 4.2.5. Solubilização nos sistemas micelares

Os valores de solubilidade da quercetina ( $S$ ) e aumento de solubilidade em água ( $S/S_0$ ) nas soluções micelares de  $CL_{20}$  e  $CL_{50}$ , preparadas pelos métodos “filme” e “filme com sonicação” estão apresentados na Tabela 18. A temperatura considerada é de 25 °C, na qual a solubilidade da quercetina é de apenas 0,05 mg/dL.

O aumento na solubilidade da quercetina ( $S/S_0$ ) é bastante expressivo para o  $CL_{20}$  (111,3), e bem maior que para o  $CL_{50}$ . Ainda que o  $CL_{50}$  tenha uma cadeia mais hidrofóbica (por ter 30 unidades de CL a mais que o  $CL_{20}$ ), que deveria lhe conferir uma maior capacidade de solubilização, sua grande cadeia hidrofóbica torna-o visivelmente bem menos solúvel em água do que o  $CL_{20}$ ; dessa forma, nas soluções micelares de  $CL_{50}$  (obtidas após filtração pelos dois métodos), há bem menos micelas e, conseqüentemente, menos fármaco solubilizado do que nas soluções micelares de  $CL_{20}$ .

É interessante notar que o sistema  $CL_{20}$  foi bem mais eficiente na solubilização da quercetina em comparação com os sistemas estudados na Parte 1 desse trabalho, cujo melhor resultado de  $S/S_0$  foi de 65,6 vezes (para a solução a 1% do ES; ver Tabela 6). Attwood e col. (2007) observaram que micelas com núcleos mais volumosos são mais eficientes na solubilização de um fármaco quando este é igualmente compatível com os núcleos. O comprimento do bloco hidrofóbico é um fator determinante no volume do núcleo da micela. Dessa forma, núcleos de CL comparados com núcleos de S de mesma hidrofobicidade (uma unidade de CL tem a mesma hidrofobicidade de uma unidade de S; ver equação 11) devem ser mais eficientes na encapsulação de fármacos (Attwood, Zhou e Booth, 2007), pois uma unidade de CL possui 7 átomos na cadeia principal, enquanto uma unidade de S possui apenas 3 átomos.

Tabela 18. Valores de solubilidade da quercetina ( $S$ ) e aumento de solubilidade em água ( $S/S_0$ ) nas soluções micelares de  $CL_{20}$  e  $CL_{50}$ , pelos métodos “filme” e “filme com sonicação”.

| Sistema   | Método: filme |              | Método: filme com sonicação |              |
|-----------|---------------|--------------|-----------------------------|--------------|
|           | $S$ (mg/dL)   | $S/S_0$      | $S$ (mg/dL)                 | $S/S_0$      |
| $CL_{20}$ | 5,57 ± 0,46   | 111,3 ± 9,28 | 4,69 ± 0,32                 | 93,72 ± 6,37 |
| $CL_{50}$ | 1,17 ± 0,39   | 23,56 ± 7,78 | 1,17 ± 0,12                 | 23,35 ± 2,35 |

Quanto ao método usado, o efeito da sonicação na solubilização da quercetina nos sistemas coloidais dos copolímeros foi nulo para o CL<sub>50</sub>, enquanto foi desfavorável para a solubilização da quercetina no sistema CL<sub>20</sub> (Tabela 18). Uma possível razão para explicar essa observação é que as ondas de ultrassom, através das cavitações produzidas em água, desestabilizaram algumas micelas de CL<sub>20</sub> que carreavam quercetina, promovendo sua liberação e acúmulo no meio aquoso; depois disso, tornou-se difícil o retorno das moléculas de quercetina ao interior das micelas; no sistema micelar de CL<sub>50</sub>, o maior tamanho da cadeia hidrofóbica dificultou a saída de quercetina de suas micelas, não alterando os resultados de sua solubilização. Vários estudos mostram que o ultrassom, através das bolhas de cavitação, induz a liberação de fármacos de nanopartículas, entre elas micelas de copolímeros (Husseini e col., 2000). Husseini e Pit (2008) mostram em sua revisão que o uso do ultrassom pode ser muito útil em tratamento médico para induzir a liberação de fármacos *in situ* a partir de sistemas micelares, além de tornar as membranas celulares mais permeáveis.

#### 4.2.6. Medida de tamanho das micelas

Estão apresentados os resultados dos sistemas micelares com quercetina preparados pelo método filme (Figura 32).

A solução de CL<sub>20</sub> com quercetina apresentou distribuição de volume unimodal, com diâmetro médio de partícula ( $D_h$ ) de 25,8 nm e PDI de 0,473. As nanopartículas de CL<sub>50</sub> apresentaram uma distribuição bimodal, com diâmetros médios dos picos ( $D_h$ ) de 26,6 nm, representando 65,2% do volume total de partículas, e de 118 nm, representando 34,8% do volume total. O diâmetro por volta de 25 nm pode ser atribuído a micelas unimoleculares dos copolímeros, enquanto o diâmetro de 118 nm pode ser atribuído a uma outra conformação de micela.

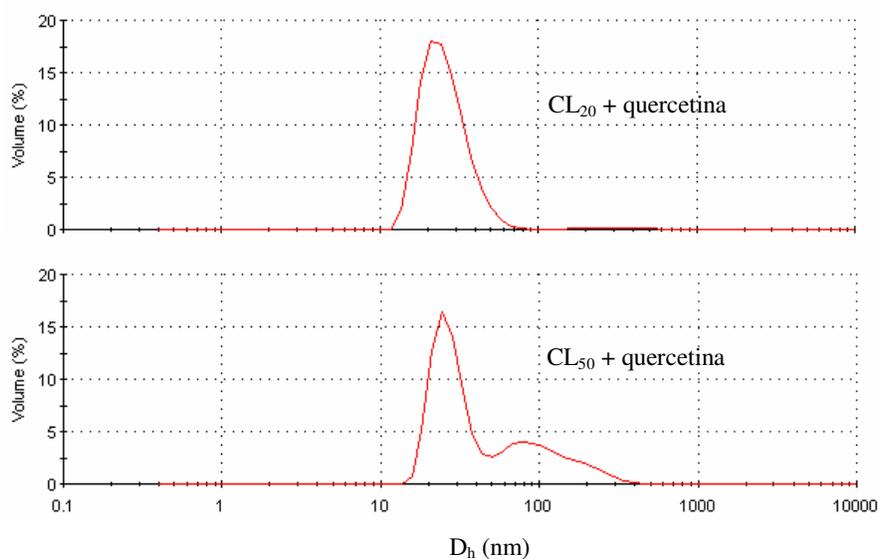


Figura 32. Distribuição de tamanho de partícula,  $D_h$  (nm), por volume para os sistemas micelares CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub> contendo quercetina.

Essas amostras foram liofilizadas e redispersas no mesmo volume de água. Após sua resuspensão, as amostras estavam turvas, com partículas insolúveis, e os gráficos de distribuição de tamanho de partícula das amostras filtradas (membrana Millipore 0,45  $\mu$ m) apresentavam tamanhos muito variáveis, maiores do que antes da liofilização, mostrando que o processo de liofilização não é vantajoso para o armazenamento dessas nanopartículas de CL<sub>20</sub> e CL<sub>50</sub>.

## 5. CONCLUSÕES

### Lista de resultados:

As misturas F/ES 50, F/ES 70 e F/ES conservaram as propriedades termorresponsivas do F127 e apresentaram concentrações cuja transição fluido-gel ocorreu na faixa de temperatura de 25-37 °C, o que lhes confere potencial para serem aplicadas na administração subcutânea de fármacos.

Os copolímeros F127, ES e ESE são bons candidatos a solubilizantes em formulações de quercetina pelo considerável aumento da sua solubilidade em água; o ES e ESE se destacam pelos menores valores de CMC e maiores valores de capacidade de solubilização. O maior valor de  $S_h$  no ESE do que no ES sugere que micelas de triblocos proporcionam um melhor ambiente de solubilização do que as micelas de diblocos.

Os experimentos de liberação *in vitro* indicaram que os copolímeros ES e ESE, além de possuírem maiores valores de  $S_{cp}$  que o F127 e menores valores de CMC, também controlam melhor a liberação da griseofulvina do que o F127, aumentando seu potencial para uso em formulações aquosas de fármacos hidrofóbicos.

O copolímero CL<sub>20</sub> apresentou baixos valores de CMC e próximos ao do CL<sub>50</sub>. O aumento da solubilidade aquosa da quercetina foi bem maior nos sistemas coloidais de CL<sub>20</sub> do que no CL<sub>50</sub>. A distribuição de tamanho de partícula (unimodal e em escala nanométrica) nos sistemas coloidais de CL<sub>20</sub>, se comparada à distribuição de tamanho de partícula dos sistemas coloidais de CL<sub>50</sub>, torna-o promissor para o uso em formulações aquosas de quercetina e outros fármacos hidrofóbicos. O encapsulamento da quercetina na proporção de 10% para o copolímero foi total para as micropartículas de CL<sub>20</sub>.

### Conclusões finais:

As misturas F/ES 50, F/ES 70 e F/ESE 70 mostram-se promissoras para o uso em administração intravenosa e subcutânea de fármacos hidrofóbicos por apresentarem propriedades geleificantes termorresponsivas, baixos valores de CMC, distribuição de tamanho de partícula unimodal e em escala nanométrica, e bons valores de  $S_{cp}$ .

O CL<sub>20</sub> apresenta potencial para administração de fármacos hidrofóbicos por via intravenosa (formulações aquosas), oral (micropartículas) e subcutânea (se adicionado a géis de F127), como foi demonstrado pela eficiência dos testes com a quercetina.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. L., Lavasanifar, A., Kwon, G.S., *J. Pharm. Sci.*, **2003**, 92, 1343.
- Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica - ABIQUIF: Estatísticas 2008. Disponível em <[http://www.abiquif.org.br/mercado\\_estatisticas.html](http://www.abiquif.org.br/mercado_estatisticas.html)>. Acesso em: 26 ago. 2009.
- Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., Hatton, T. A., *Macromolecules*, **1994**, 27, 2414.
- Aliabadi, H. A., Lavasanifar, A., *Expert Opin. Drug. Deliv.*, **2006**, 3, 139.
- Allen, C., Maysinger, D., Eisenberg, A., *Coll. Surf. B: Biointerf.*, **1999**, 16, 3.
- Allen, C., Han, J., Yu, Y., Maysinger, D., Eisenberg, A., *J. Contr. Rel.*, **2000**, 63, 275.
- Altinok, H., Nixon, S. K., Gorry, P. A., Attwood, D., Booth, C., Kelarakis, A., Havredaki V., *Colloid Surface B*, **1999**, 16, 73.
- Asada, M., Takahashi, H., Okamoto, H., Tanino, H., Danjo, K., *Int., J. Pharm.*, **2004**, 270, 167.
- Attwood, D., Zhou, Z., Booth, C., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2007**, 4, 533.
- Attwood, D., Booth, C., Yeates, S. G., Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S., *Int. J. Pharm.*, **2007**, 345, 35.
- Booth, C., Attwood, D., *Macrom. Rapid Commun.*, **2000**, 21, 501.
- Barbosa, S., Cheema, M. A., Taboada, P., Mosquera, V., *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 10920.
- Bromberg, L., *J. Control. Rel.*, **2008**, 128, 99.
- Brown, R.A., Masters, A. J., Price, C., Yuan, X. F., In: Booth, C. e Price, C., *Comprehensive Polymer Science, Polymer Properties*, vol. 2, Pergamon Press, Oxford, **1989**, 155.
- Cavalcante, I.M., Costa, F. M. L. L., Gonzaga, M. L. C., Ribeiro, M. E. N. P., Fonseca, S. G.C., Vieira, I. G. P., Ricardo, N. M. P. S., in Anais do 9º Congresso Brasileiro de Polímeros, Campina Grande, **2007**.

- Cerrai, P., Tricoli, M., Andruzzi, F., Paci, M., Paci, M, *Polymer*, **1989**, 30, 338.
- Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S., Crothers, M., Booth, C., *Langmuir*, **2002**, 18, 4277.
- Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S., Costa, F. M. L. L., Yeates, S. G. e Booth, C., *Langmuir*, **2007**, 23, 9229.
- Chattopadhyay, A., London, E., *Anal. Biochem.*, **1984**, 139, 408.
- Chu, B., *Langmuir*, **1995**, 11, 414.
- Chu, C. C., Song, H., *World Intellectual Property Organization*, WO2009073541 (A2), 11 jun. 2009.
- ClinicalTrials.gov: Found 9 studies for the search of: quercetin. Disponível em <<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=quercetin>>. Acesso em: 26 ago. 2009.
- Cooke, I. R., Williams, D. R. M., *Macromolecules*, **2003**, 36, 2149.
- Crothers, M., Attwood, D., Collet, J. H., Yang, Z., Booth, C., Taboada, P., Mosquera, V., Ricardo, N. M. P. S., Martini, L. G. A., *Langmuir*, **2002**, 18, 8685.
- Crothers, M., Zhou, Z., Ricardo, N.M.P.S, Yang, Z., Taboada, P., Chaibundit, C., Attwood, D., Booth, C. *Int. J. Pharm.*, **2005**, 293, 91.
- Davidovich, M., Gougoutas, J. Z., Scaringe, R. P., Vitez, I., Yin, S., *Am. Pharm. Rev.*, **2004**, 7, 10.
- Ellis, A. G., Crinis, N. A., Webster, L. K., *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **1996**, 38, 81.
- Elsabahy, M., Perron, M.-E., Bertrand, N., Yu, G.-E., Leroux, J.-C., *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 2250.
- Gao, Y., Wang, Y., Ma, Y., Yu, A., Cai, F., Shao, W., Zhai, G. *Colloid Surface B*, **2009**, 71, 306.
- Gong, C.Y., Qian, Z.Y., Liu, C.B., Huang, M.J., Gu, Y.C., Wen, Y.J., Kan, B., Wang, K., Dai, M., Li, X.Y., Gou, M.L., Tu, M.J., Wei, Y.Q., *Smart Mater. Struct.*, **2007**, 16, 927.

- Gou, M.L., Li, X.Y., Dai, M., Gong, C.Y., Wang, X.H., Xie, Y., Deng, H.X., Chen, L.J., Zhao, X., Qian, Z.Y., Wei, Y.Q., *Int., J. Pharm.*, **2008**, 359, 228.
- Hamley, I. W., Pople, J. A., Ameri, M., Attwood, D., Booth, C., *Colloid Surface A*, **1998**, 145, 185.
- Husseini, G.A., Myrup, G. D., Pitt, W. G., Chistensen, D. A., Rapoport, N. Y., *J. Control. Release*, **2000**, 69, 43.
- Husseini, G. A., Pitt, W. G., *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2008**, 60, 1137.
- Kataoka, K., Kwon, G.S., Yokoyama M., Okano T., Sakurai, Y. *J. Control. Rel.*, **1993**, 24, 119.
- Kawaguchi, T., Honda, T., Nishihara, M., Yamamoto, T., Yokoyama, M., *J. Control. Rel.*, **2009**, 136, 240.
- Kelarakis, A., Havedraki, V., Yu, G.-E., Derici, L., Booth, C., *Macromolecules*, **1998**, 31, 944.
- Kelarakis, A., Havredaki, V., Rekas, C. J., Booth, C., *Phys, Chem. Chem. Phys.*, **2001**, 3 5550.
- Kim, S.Y., Shin, I. L. G, Lee, Y.M., Cho, C.S., Sung, Y.K., *J. Control. Rel.*, **1998**, 51, 13.
- Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W., Seo, M. H., *J. Control. Rel.*, **2001**, 72, 191.
- Kim, M.K., Park, K-S., Yeo, W-S., Choo, H., Chong, Y., *Bioorgan. Med. Chem.*, **2009**, 17, 1164.
- Kumar, N., Ravikumar, M. N. J., Domb, A. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 53, 23.
- Letchford, K., Burt, H., *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, **2007**, 65, 259.
- Li, H., Yu, G.-E., Price, C., Booth, C. Hecht, E., Hoffmann, H., *Macromolecules*, **1997**, 30, 1347.

Li, Z., Chen, P., Xu, X., Ye, X., Wang, J. W., *Mater. Sci. Eng. C*, **2009**, 29, 2250.

Liu, J, Xiao, Y, Allen, C., *J. Pharm. Sci.*, **2004**, 93, 132.

Living polymerization. Disponível em <[www.iupac.org/goldbook/L03597.pdf](http://www.iupac.org/goldbook/L03597.pdf)>. Acesso em: 26 nov. 2009.

Martini, L., Attwood, D., Collett, J. H., Nicholas, C. V., Tanodekaew, S., Deng N.J., Heatley, F., Booth, C., *J. Chem. Soc. Faraday. Trans.*, **1994**, 90, 1961.

Matyjaszewski, K., Müller, A. H. E., *Prog. Polym. Sci.*, **2006**, 31, 1039.

Micelas y Liposomas. Disponível em <<http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Lipidos/micelas.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

Mondrinos, M. J., Dembzyński, R., Lu, L., Byrapogu, V. K.C., Wootton, D. M., Lelkes, P. I., Zhou, J. *Biomaterials*, **2006**, 27, 4399.

Myers, D., *Surfactant Science and Technology*, 2. ed. New York: VCH Publishers, **1992**.

Mulholland, P. J., Ferry, D. R., Anderson, D., Hussain, S. A., Young, A. M., Cook, J. E., Hodgkin, E., Seymour, L. W., Kerr, D., *J. Ann. Oncol.*, **2001**, 12, 245.

Mueller, K., Alemdaroglu, F. E., Herrmann, A., Alemdaroglu, N. C., Langguth, P., *European Patent Office*, EP2025348 (A1), 18 fev. 2009.

Nagarwal, R. C., Kant, S., Singh, P. N., Maiti, P., Pandit, J. K., *J. Control. Rel.*, **2009**, 136, 2.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., *Introduction to Spectroscopy*, 3<sup>a</sup> ed., Brooks/Cole, Thomson Learning Inc., Washington, USA, **2001**, 13-101.

Patravale, V. B., Date, A. A. e Kullami, R. M., *J. Pharm. Parmacol.*, **2004**, 56, 827.

Pec, E. A., Wout, Z. G., Johnston, T. P., *J. Pharm. Sci.*, **1992**, 81, 626.

Peppas, L.B., *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, nov. **1997**, 34.

Pinho, M. E. N., Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2006**.

Pinho, M. E. N., Costa, F. M. L. L., Filho, F. B. S., Ricardo, N. M. P. S., Yeates, S. G., Attwood, D. e Booth, C., *Int. J. Pharm.*, **2007**, 328, 95.

Rekatas, C. J., Mai, S-H, Crothers, M., Quinn, M., Collet, J. H., Attwood, D., Heatley, F., Martini, L., Booth, C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, 3, 4769.

Ribeiro, M. E. N. P., Cavalcante, I. M., Ricardo, N. M. P. S., Mai, S-H, Attwood, D., Yeates, S. G., Booth, C. *Int. J. Pharm.*, **2009a**, 369, 196.

Ribeiro, M. E. N. P., Vieira, I. G. P., Cavalcante, I. M., Ricardo, N. M. P. S., Attwood, D., Yeates, S. G., Booth, C. *Int. J. Pharm.*, **2009b**, 378, 211.

Ricardo, N. M. P. S., Honorato, S. B., Yang, Z., Castelleto, V., Hamley, I. W., Yuan, X-F., Attwood, D., Booth, C., *Langmuir*, **2004**, 20, 4272.

Ricardo, N. M. P. S., Pinho, M. E. N., Yang, Z., Attwood, D., Booth, C., *Int. J. Pharm.* **2005**, 300, 22.

Ricardo, N. M. P. S., Chaibundit, C, Yang, Z., Attwood, D., Booth, C., *Langmuir*, **2006**, 22, 1301.

Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M. L., Tita, B., Messina, C., Bonina, F. P., Rocco, C., Nicolosi, G., Castell, F., *Eur. J. Pharm Biopharm.*, **2003**, 56, 167.

Santacesaria, E., Sevio, M., Lisi, L., Gelosa, D., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1990**, 29, 719.

Savic, R., Eisenberg, A., Maysinger D., *J. Drug Target*, **2006**, 14, 343.

Schmolka I. R., Raymond A.J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1965**, 44, 559.

Schmolka, I. R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1972**, 6, 571.

Seregin, V. V., Coffey, J. L., *Biomaterials*, **2006**, 27, 4745.

Shaw, D. J., *Introduction to colloid and surface chemistry*, 4. Ed. Oxford: Butterworth-Heinemann LTD, **1992**, 84.

- Solomons, T.W.G, *Química orgânica*, 9.ed. LTC, Rio de Janeiro, **2009**, v.1, 675 p.
- Sonifier® Products. Disponível em <<http://www.sonifier.com>>. Acesso em: 01 nov. 2009
- Soo, P., L., Lovric, J., Davidson, P., Maysinger, D., Eisenberg, A., *Molecular Pharm.*, **2005**, 2, 519.
- Souza, J. R. R, Carvalho, J. I. X., Trevisan, M. T. S., de Paula, R. C. M., Ricardo, N. M. P. S., Feitosa, J. P. A., *Food Hydrocolloid*, **2009**, 23, 2278.
- Stevens, M. P., *Polymer chemistry: an introduction*, 3. ed., New York: Oxford University Press, **1999**.
- Szwarc, M., *Nature*, **1956**, 176, 1168.
- Tije, A J., Verwij, J., Loos, W. J., Sparreboom, A., *Clin. Pharmacokinet.*, **2003**, 42, 665.
- Vinadé, E. R. C., *Caderno de Farmácia*, **1997**, 13, 67.
- Wanka, G., Hoffman, H., Ulbricht, W. *Colloid Polym. Sci.* **1990**, 268, 101.
- Wanka, G., Hoffman, H., Ulbricht, W. *Macromolecules*, **1994**, 27, 4145.
- Wei, X. W., Gong, C. Y., Gou, M. L., Fu, S. Z., Guo, Q.F., Shi, S., Luo, F., Guo, G., Qiu, L. Y., Qian, Z.Y., *Int. J. Pharm.*, **2009a**, 381, 1.
- Wei, Z., Hao, J., Yuan, S., Li, Y., Juan, W., Sha., X, Fang, X., **2009b**, *Int. J. Pharm.*, 376, 176.
- Weiss, R., Donehower, R., Wiernik, P., Ohnuma, T., Gralla, R., Trump, D., Baker Jr., J., Van Echo, D., Von Hoff, D., Leyland-Jones, B., *J. Clin. Oncol.*, **1990**, 1263.
- Yamamoto, Y., Yasugi, K., Harada, A., Nagasaki, Y., Kataoka, K, *J. Control. Rel*, **2002**, 82, 359.
- Yang, Z., Crothers, M., Ricardo, N. M. P. S., Chaibundit, C., Taboada, P., Mosquera, V., Kelarakis, A., Havredaki, V., Martini, L., Valder, C., Collet, J. H., Attwood, D., Heatley, F., Booth, C., *Langmuir*, **2003**, 19, 943.

Yang, Y, Wang, J.C., Zhang, X., Lu, W. L., Zhang, Q., *J. Control. Rel.*, **2009**, 135,175.

Yu, B. G., Okano, T., Kataoka, K., Kwon, G., *J. Control. Rel.*, **1998**, 53, 131.

Yokoyama, M., *Crit. Rev. Drug Carr. Sys.*, **1992**, 9 213.