

João Manuel Antunes Costa

IMOBILIZAÇÃO DE FÁRMACOS EM MICROPARTÍCULAS DE POLIÉSTERES BIODEGRADÁVEIS

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química,
Apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Manuel Antunes Costa

IMOBILIZAÇÃO DE FÁRMACOS EM MICROPARTÍCULAS DE POLIÉSTERES BIODEGRADÁVEIS

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, sob orientação do Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha e da Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Supervisores:

Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha

Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil

Coimbra

2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Aquele água era muito mais do que um alimento. Nascera da caminhada sob as estrelas, do canto da roldana, do esforço dos meus braços.”

Antoine De Saint-Exupéry, in “O Príncipezinho”

AGRADECIMENTOS

Devo a realização do presente trabalho ao apoio, orientação, acompanhamento e incentivo de diversas pessoas que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes ao longo do meu percurso académico, com particular destaque para esta fase final.

Agradeço ao Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha e à Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil, na qualidade de orientadores do presente trabalho.

Um muito obrigado à Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo por todo o apoio, supervisão e conhecimento partilhado.

À Doutora Patrícia Coimbra, pelo acompanhamento ao longo de todo o procedimento experimental, pelos conselhos, pelo incentivo e por todas as ideias trocadas no decorrer do trabalho. Sem a sua ajuda incondicional este trabalho não seria possível.

Não poderia deixar de agradecer à Engenheira Maria José Capelas de Moura, cujo trabalho sustentou parte deste; pela troca de opiniões, instruções dadas e pela permuta de informação em partes cruciais.

Para os meus amigos, que durante o meu percurso académico sempre me acompanharam, mesmo perante todas as minhas peculiaridades; que contribuíram para a minha edificação enquanto pessoa, que estiveram presentes em todos os momentos e que certamente ficarão para a vida, um muito obrigado. Além destes, agradeço aos amigos de sempre e cuja amizade prevaleceu mesmo perante a minha ausência durante o meu percurso académico. De uma forma especial, deixo algo mais que um agradecimento à Inês Cunha e Ana Cunha porque desde o primeiro momento constituíram os alicerces que sempre me sustentaram e sustentarão.

De uma forma geral, um obrigado a todos aqueles com quem me cruzei e que algo deixaram para mais tarde recordar.

À minha família pelos valores transmitidos, pelo exemplo de vida e por todo o apoio ao longo desta caminhada. Aos meus irmãos e à minha afilhada, espero ter-lhes transmitido os melhores conhecimentos para enfrentarem o futuro.

Por último, um agradecimento muito especial aos meus pais, força motriz que motivou, de forma direta e indireta, toda a minha evolução a nível físico, pessoal e cognitivo. Obrigado pelo apoio incondicional, pela compreensão, pelo esforço, pela paciência, carinho e obrigado também pelas coisas que na altura achei menos boas mas que hoje valorizo particularmente.

A todos aqueles que de certa de certa forma se revêm nas palavras acima redigidas, um grande bem-haja

RESUMO

Este trabalho tem como principal objetivo a preparação de sistemas de libertação controlada (SLCs) de fármacos baseados em micropartículas produzidas a partir de poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis, tendo-se utilizado como modelos de fármaco a dexametasona e a cisplatina. Pretende-se que estes sistemas se revelem efetivos na entrega e libertação prolongada de fármacos.

Adicionalmente, no caso da cisplatina, um antineoplásico frequentemente utilizado em quimioterapia, pretende-se que a libertação se cinja ao local de ação, por forma a minimizar os efeitos secundários associados à terapêutica com este fármaco. Para tal, incorporaram-se as micropartículas carregadas com cisplatina em hidrogéis de quitosano, fisicamente reticulados e co-reticulados (química e fisicamente), cuja gelificação ocorre *in situ*, em condições fisiológicas. Esta estratégia está a ser explorada num trabalho de doutoramento realizado em paralelo.

O encapsulamento de dexametasona, um corticosteróide utilizado como anti-inflamatório e imunossupressor, foi efetuado em micropartículas de poli- ϵ -caprolactona (PCL), Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidróxivalerato) (PHBV), poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), preparadas com recurso ao método de extração/evaporação do solvente (EES) numa emulsão óleo em água (O/W).

Com o objetivo de avaliar a morfologia das micropartículas, procedeu-se à análise das mesmas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), a qual permitiu verificar que o método aplicado é adequado para obter micropartículas esféricas.

A avaliação da distribuição de tamanhos das partículas revelou que as micropartículas obtidas a partir de PCL, PHBV, PLA e PLGA, para encapsulamento de dexametasona, apresentam tamanhos médios entre 9 e 25 μm , adequados para sua aplicação em SLCs.

Considerando os valores da eficiência de encapsulamento (EE) obtida para os vários polímeros em estudo, os resultados apontam para eficiências que variam entre os 40% e os 60%. Contudo, as imagens de SEM revelaram a existência de cristais de fármaco dispersos nas amostras e à superfície de algumas micropartículas (PCL e PLGA), o que, de algum modo, pode pôr em causa a fiabilidade destes valores.

Os resultados da análise térmica permitiram concluir que o método de preparação das micropartículas apenas teve efeito sobre a estrutura do PLA. Quanto ao estado do fármaco nas micropartículas, apenas foi detetável fármaco na forma cristalina nas amostras de PLA e PLGA, ainda que os resultados sugiram alteração na estrutura cristalina do fármaco.

No que respeita aos perfis de libertação do fármaco, as micropartículas produzidas a partir de PCL e PLGA revelaram ser eficazes em garantir uma libertação de fármaco por um período mais alargado, cerca de 7 dias, tendo-se verificado a libertação da maioria do fármaco encapsulado findo este período. No caso do PLA e PHBV, a libertação ocorreu de forma abrupta, caracterizando-se por uma libertação do fármaco que atinge um patamar após algumas horas de libertação.

O estudo do encapsulamento de cisplatina foi levado a cabo de forma semelhante ao efetuado para a dexametasona, no entanto, utilizou-se apenas PLA para a produção das micropartículas. A análise dos resultados obtidos por SEM permitiram constatar que se obtiveram micropartículas morfológicamente distintas, quando comparadas com as obtidas para encapsulamento de dexametasona, produzidas a partir do mesmo polímero. Neste caso, a superfície das micropartículas apresentava poros facilmente identificáveis nas imagens de SEM, bem como uma estrutura interna oca, semelhante a uma cápsula.

A eficiência de encapsulamento obtida para as micropartículas de PLA com cisplatina revelou-se relativamente baixa, 27,12%, cerca de metade dos valores alcançados para a dexametasona. Além disso, os resultados obtidos para os ensaios de libertação demonstraram que apenas se conseguiu libertar cerca de 6% do fármaco encapsulado nas micropartículas.

Por fim, incorporaram-se as micropartículas de PLA carregadas com cisplatina em hidrogéis de quitosano formados *in situ*, com vista à sua administração por via parenteral. Os hidrogéis de quitosano foram preparados usando um método de reticulação físico, com recurso a fosfato dissódico de glicerol e um método de co-reticulação, isto é, combinando a reticulação física com um reticulante químico (genipin). Os ensaios de libertação levados a cabo com os hidrogéis de quitosano revelaram que, quando comparados com os perfis correspondentes às micropartículas na forma livre, se verifica uma diminuição na quantidade de cisplatina libertada, a qual é função do tipo de reticulação e da concentração de genipin. Estes resultados sugerem que estas variáveis podem ser usadas para ajustar o perfil de libertação às condições pretendidas.

Palavras-chave: Micropartículas; Extração e Evaporação do Solvente; Sistemas de Libertação Controlada; Poliésteres Biodegradáveis; Quitosano; Hidrogéis, Genipin; Fosfato Dissódico de Glicerol.

ABSTRACT

The aim of the present study is the preparation of drug delivery systems (DDSs) based in microparticles prepared from biodegradable and biocompatible polyesters using dexamethasone and cisplatin as drug models. It is intended that these systems prove effective delivery and sustained release of drugs.

Additionally, in the case of cisplatin, an antineoplastic frequently used in chemotherapy, a restricted delivery in the site of action is proposed in order to minimize the side effects associated to the treatment with this drug. To achieve this, microparticles loaded with cisplatin have been incorporated in chitosan hydrogels, physically cross-linked and co-cross-linked (chemically and physically), which gelation occurs *in situ*, under physiological conditions. This strategy is being explored in a doctoral dissertation conducted in parallel.

The encapsulation of dexamethasone, a corticosteroid used as anti-inflammatory and immunosuppressor, was carried out in microparticles prepared from poly- ϵ -caprolactone (PCL), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), using oil-in-water emulsion solvent evaporation method.

In order to evaluate the microparticles morphology, they were analyzed using scanning electron microscopy (SEM), which allows to verify that the applied method is suitable to obtain spherical microparticles.

The evaluation of the microparticles size distribution reveals that the microparticles obtained from PCL, PHBV, PLA and PLGA for the encapsulation of dexamethasone presented mean sizes between 9 and 25 μm , thus suitable for DDSs.

Considering the values for the encapsulation efficiency (EE), obtained for the studied polymers, the results pointed out efficiencies between 40% and 60%. However, the SEM images revealed the presence of drug crystals dispersed in the samples and in the surface of some microparticles (PCL and PLGA), which could compromise the reliability of this values.

The thermal analysis results suggest that the microparticles preparation method only have effect in the PLA structure. Considering the drug state in the microparticles, drug was only detected in the crystalline form in the PLA and PLGA, although the results suggest changes in the crystalline structure of the drug.

Regarding the drug release profiles, microparticles prepared from PCL and PLGA revealed to be effective to ensure a drug release over a longer period, about 7 days. After this period, almost all the encapsulated drug was released. In the case of PLA and PHBV, the release

occurred sharply and is characterized by a releasing profile that reaches a plateau after few hours.

The study of the cisplatin encapsulation was carried out similarly to the one adopted for dexamethasone. However, only PLA was used to prepare the microparticles. The SEM results showed morphologically distinct microparticles, when compared to those obtained for the encapsulation of dexamethasone, produced from the same polymer. In this case, the microparticles surface showed pores easily identified in the SEM images, as well as a hollow internal structure similar to a capsule.

The encapsulation efficiency obtained for the PLA microparticles with cisplatin was too low, 27,12%, about half than the value obtained to dexamethasone. Besides that, the results to the release profile show that only 6% of the encapsulated drug in the microparticles was released.

Finally, PLA microparticles with cisplatin were incorporated in *in situ* forming chitosan hydrogels, with the aim of parenteral administration. The chitosan hydrogels were prepared using a physical cross-linking method, with glycerol-phosphate disodium, and a co-cross-linking method, combining the physical cross-linking with a chemical cross-linker (genipin). When compared with the microparticles release profile in the free form, the release studies with the chitosan hydrogels revealed a decrease in the amount of released cisplatin, which is function of the cross-linking type and genipin concentration. These results suggest that this variables could be used to adjust the release profile to the intended conditions.

Keywords: Microparticles; Solvent Evaporation; Drug Delivery System; Biodegradable Polyesters; Chitosan; Hydrogels; Genipin; Glycerol-Phosphate Disodium.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	xxi
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Motivação	1
1.2 Objetivos.....	2
1.3 Organização do Trabalho.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Sistemas de Libertação Controlada.....	5
2.2 Sistemas de Libertação Controlada de Base Polimérica.....	6
2.3 Poliésteres Utilizados na Preparação de Micropartículas	11
2.3.1 PLA e PLGA	12
2.3.2 PCL	15
2.3.3 PHBV	17
2.4 Micropartículas para Encapsulamento de Fármacos	18
2.5 Hidrogéis de Quitosano	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Estratégia Experimental.....	25
3.2 Fármacos.....	28
3.2.1 Dexametasona	28
3.2.2 Cisplatina	29
3.3 Reagentes	31
3.4 Preparação de Micropartículas.....	31

3.4.1	Micropartículas Carregadas com Dexametasona	32
3.4.2	Micropartículas Carregadas com Cisplatina.....	32
3.5	Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE).....	33
3.5.1	Micropartículas Carregadas com Dexametasona	34
3.5.2	Micropartículas Carregadas com Cisplatina.....	35
3.6	Caracterização das Micropartículas.....	35
3.6.1	Microscopia Eletrónica de Varrimento – SEM	35
3.6.2	Determinação da Distribuição de Tamanhos.....	36
3.6.3	Análise Térmica – Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC).....	36
3.7	Estudos de Libertação (<i>in vitro</i>)	38
3.7.1	Libertação de Dexametasona.....	38
3.7.2	Libertação de Cisplatina	38
3.8	Preparação de Hidrogéis de Quitosano	39
3.8.1	Libertação de Cisplatina a Partir dos Hidrogéis de Quitosano.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1	Micropartículas para Encapsulamento de Dexametasona.....	43
4.1.1	Análise Morfológica - SEM	43
4.1.2	Distribuição de Tamanhos das Micropartículas	47
4.1.3	Análise Térmica - DSC.....	50
4.1.4	Eficiência de Encapsulamento.....	56
4.1.5	Ensaio de Libertação	57
4.2	Micropartículas para Encapsulamento de Cisplatina	59
4.2.1	Análise Morfológica - SEM	59
4.2.2	Distribuição de Tamanhos das Micropartículas	61
4.2.3	Análise Térmica – DSC	63
4.2.4	Eficiência de Encapsulamento.....	65
4.2.5	Ensaio de Libertação	66
4.3	Efeito dos Hidrogéis de Quitosano na Libertação de Cisplatina.....	67

5	CONCLUSÃO	71
6	PERSPETIVAS FUTURAS.....	75
	BIBLIOGRAFIA	77
	ANEXO I.....	89
	ANEXO II.....	91
	ANEXO III	93
	ANEXO IV	98
	ANEXO V	99
	ANEXO VI.....	100
	ANEXO VII.....	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Polímeros utilizados na preparação de sistemas de liberação controlada (Angelova e Hunkeler, 1999; Uhrich <i>et al.</i> , 1999; Pillai e Panchagnula, 2001; Vilar <i>et al.</i> , 2012; Behera, 2013; Gu e Burgess, 2014).	8
Tabela 2.2 - Variáveis que influenciam a taxa de degradação dos materiais poliméricos (adaptado de Pillai e Panchagnula, 2001; Shaik <i>et al.</i> , 2012).....	11
Tabela 2.3 - Características dos poliésteres utilizados na preparação das micropartículas (Chasin e Langer, 1990; Ikada e Tsuji, 2000; Khanna e Srivastava, 2005; Auras <i>et al.</i> , 2010).	12
Tabela 3.1 - Lista de reagentes utilizados.....	31
Tabela 4.1 - Resultados obtidos para os parâmetros estatísticos das distribuições de tamanhos de partículas.	47
Tabela 4.2 - Eficiência de encapsulamento das micropartículas para encapsulamento de dexametasona.	57
Tabela 4.3 - Parâmetros da distribuição de tamanhos das micropartículas de PLA para encapsulamento de cisplatina.	62
Tabela 4.4 - Resultados de DSC para o polímero puro e processado sob a forma de micropartículas com cisplatina (PLA-CDDP) e dexametasona (PLA-DEX).	65
Tabela 4.5 - Eficiência de encapsulamento obtida para as micropartículas de PLA para encapsulamento de cisplatina.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura do PLA	12
Figura 2.2 - Estrutura do PLGA	12
Figura 2.3 - Estrutura da PCL in (Zhang <i>et al.</i> , 2014).....	15
Figura 2.4 - Estrutura do PHBV in (Zhang <i>et al.</i> , 2014).....	17
Figura 2.5 - Representação esquemática do método de extração/evaporação do solvente (EES), adaptado de (Li e Poncelet, 2008).....	19
Figura 2.6 - Estrutura do quitosano in (Oliveira <i>et al.</i> , 2014).	21
Figura 3.1 - Fluxograma das etapas do procedimento experimental.....	26
Figura 3.2 - Estrutura química da dexametasona.	28
Figura 3.3 - Estrutura química da cisplatina.....	30
Figura 4.1 - Micropartículas com dexametasona, produzidas a partir de PCL, PHBV, PLA e PLGA.	44
Figura 4.2 - Cristais de fármaco (formas cúbicas e prismáticas), presentes nas amostras das micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.	45
Figura 4.3 - Pormenor da superfície das micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.	46
Figura 4.4 - Distribuição de tamanhos das micropartículas para encapsulamento de dexametasona.	49
Figura 4.5 - Termogramas obtidos para a dexametasona original (DEX original) e processada (DEX processada).	51
Figura 4.6 - Termogramas obtidos para PCL não processada (PCL) e com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PCL-DEX) e filme (filme-PCL-DEX).	52
Figura 4.7 - Termogramas obtidos para o PHBV não processado (PHBV) e com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PHBV-DEX) e filme (Filme-PHBV-DEX).	53

Figura 4.8 - Termogramas obtidos para o PLA não processado (PLA) e com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PLA-DEX) e filme (Filme-PLA-DEX).....	54
Figura 4.9 - Termogramas obtidos para o PLGA não processado (PLGA) e com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PLGA-DEX) e filme (Filme-PLGA-DEX).	55
Figura 4.10 - Perfis de libertação de dexametasona a partir das micropartículas de PCL (◆), PHBV (Δ), PLA (■) e PLGA (●).	58
Figura 4.11 - Micropartículas de PLA com cisplatina (PLA-CDDP) e com dexametasona (PLA-DEX).	60
Figura 4.12 - Micropartículas de PLA carregadas com cisplatina: a) Pormenor dos poros, b) Pormenor do interior.....	60
Figura 4.13 - Distribuição de tamanhos das micropartículas de PLA com cisplatina (PLA-CDDP) e com dexametasona (PLA-DEX).	63
Figura 4.14 - Termogramas obtidos para as micropartículas de PLA com cisplatina (PLA-CDDP), PLA não processado e PLA com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PLGA-DEX) e filme (Filme-PLGA-DEX).....	64
Figura 4.15 - Perfil de libertação da cisplatina a partir das micropartículas de PLA.	67
Figura 4.16 – Perfil de libertação de cisplatina a partir de PLA-CDDP (■), PLA-CDDP/C/GP (Δ), PLA-CDDP/C/GP/GE5(◆) e PLA-CDDP/C/GP/GE20(●).	69

LISTA DE ACRÓNIMOS

- CDDP – *cis*-diaminodicloroplatina (cisplatina)
- CME – Concentração Mínima Efetiva
- CMT – Concentração Máxima Tolerada
- DMF – Dimetilformamida
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (calorimetria diferencial de varrimento)
- EE – Eficiência de Encapsulamento
- EES – Extração/Evaporação do Solvente
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FFD – Forma Final de Dosagem
- GE – Genipin
- GP – *Glycerol Phosphate disodium* (fosfato dissódico de glicerol)
- GPA – Grau de Pureza Analítico
- HV – Hidroxivalerato
- MMD – *Metastable Molecular Dispersion* (dispersão molecular metaestável)
- MT – Margem Terapêutica
- O/W – Emulsão óleo em água
- PBS – *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato-salino)
- PCL – Poli- ϵ -Caprolactona
- PCL - DEX – Dexametasona encapsulada em micropartículas de PCL
- PGA – Poli(ácido glicólico)
- PHA – Poli(3-hidroxiálcanoatos)
- PHB – Polihidroxibutirato
- PHBV – Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
- PHBV-DEX – Dexametasona encapsulada em micropartículas de PHBV
- PLA – Poli(ácido láctico)
- PLA-CDDP – cisplatina encapsulada em micropartículas de PLA
- PLA-CDDP/C/GP – micropartículas de PLA-CDDP incorporadas em hidrogéis de quitosano reticulados com fosfato dissódico de glicerol
- PLA-CDDP/C/GP/GE20 – micropartículas de PLA-CDDP incorporadas em hidrogéis de quitosano co-reticulados com fosfato dissódico de glicerol e com 0,20% de genipin
- PLA-CDDP/C/GP/GE5 – micropartículas de PLA-CDDP incorporadas em hidrogéis de quitosano co-reticulados com fosfato dissódico de glicerol e com 0,05% de genipin

PLA-DEX – Dexametasona encapsulada em micropartículas de PLA

PLGA – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLGA-DEX – Dexametasona encapsulada em micropartículas de PLGA

PVA – Álcool polivinílico

QEFE – Quantidade Experimental de Fármaco Encapsulado

QTFE – Quantidade Teórica de fármaco Encapsulado

SEM – *Scanning Electron Microscopy* (microscopia eletrônica de varrimento)

SLC – Sistema de Liberação Controlada

SS – *Solid Solution* (solução sólida)

T_g – Temperatura de transição vítrea

T_m – Temperatura de fusão

T_c – Temperatura de cristalização

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta Introdução pretende apresentar sinteticamente os aspetos que motivaram o presente trabalho, os objetivos que se pretendem atingir e a forma como este documento está organizado, referindo de forma resumida os assuntos abordados em cada capítulo.

1.1 Motivação

O interesse por parte da comunidade científica no que respeita ao desenvolvimento de sistemas de libertação controlada (SLCs) de fármacos tem crescido intensamente ao longo dos últimos anos. Desde a primeira referência a SLCs, por Folkman e Long, em estudo publicado em 1964 (Folkman e Long, 1964), vários têm sido os trabalhos desenvolvidos nesta área, com o objetivo de desenvolver sistemas transportadores passíveis de alocar o fármaco, protegendo-o e permitindo garantir uma libertação controlada diretamente no local de ação.

As formas comuns de dosagem, isto é, comprimidos, formas líquidas ingeríveis, parenterais, entre outras, têm a desvantagem de serem alvo da ação destrutiva por parte do organismo, o que reduz drasticamente a quantidade de princípio ativo que efetivamente atinge o local onde se pretende o efeito terapêutico. Por outro lado, a difusão do fármaco para os tecidos entre o local de administração e o local de ação poderá causar no paciente efeitos secundários relevantes. Por último, a necessidade de repetidas administrações de fármaco, por forma a garantir que a sua concentração se encontre dentro do intervalo correspondente ao nível terapêutico, pode ser diminuída, ou em última instância eliminada, através do desenvolvimento de SLCs. Estes sistemas, para além de possibilitarem uma libertação controlada do fármaco, permitem, através de técnicas de encapsulamento, proteger o organismo da ação do fármaco e o próprio fármaco da possível degradação em determinadas condições fisiológicas (Vogelson, 2001; Makadia e Siegel, 2011, Jayasuriya e Darr, 2013).

O desenvolvimento de um SLC é dependente de um vasto conjunto de fatores que influenciam o seu desempenho. Estes fatores podem estar relacionados com as características do fármaco que se pretende libertar, com o local de ação do fármaco; que consequentemente tem de ser alcançado pelo sistema transportador e, em última instância, pelas características do material polimérico que constitui a matriz na qual se pretende incorporar o fármaco e que atuará como sistema transportador.

Os SLCs são, na sua maioria, constituídos por uma estrutura polimérica biocompatível que, após incorporação do fármaco, atua, como se disse, como sistema transportador,

1. INTRODUÇÃO GERAL

garantindo um perfil de libertação que é função das características da estrutura polimérica utilizada. O facto dos materiais poliméricos possuírem uma larga gama de propriedades, função dos monómeros e das ligações envolvidas, e de poderem ser modelados em função dos requisitos específicos de cada aplicação, faz com que estes materiais constituam uma opção preferencial para a preparação de SLCs. Por outro lado, os avanços tecnológicos registados no desenvolvimento de novos polímeros têm permitido “desenhar” materiais cada vez mais específicos e com características rigorosamente controladas, o que os torna particularmente apelativos para este tipo de aplicação (Angelova e Hunkeler, 1999).

É de notar que das duas partes que integram o SLC, polímero e fármaco, a atividade farmacológica cinge-se naturalmente ao fármaco, sendo a parte polimérica, finda a função para a qual foi desenvolvida, idealmente sujeita a degradação e posterior eliminação por mecanismos fisiológicos normais. Alguns poliésteres biodegradáveis, como é o caso do PLA e do PLGA, são particularmente apelativos e encontram-se amplamente investigados para utilização em SLCs e biomateriais.

Um outro aspeto importante na utilização de materiais poliméricos em SLCs consiste na facilidade em desenvolver sistemas particulados, designadamente microesferas ou microcápsulas, de dimensões adequadas para administração por via injetável (Kreuter, 1996, Dhanaraju *et al.*, 2003, Hu *et al.*, 2006, Jia *et al.*, 2008, Levy-Nissenbaum *et al.*, 2012, Anderson e Shive, 2012, Bragagni *et al.*, 2013).

1.2 Objetivos

No presente trabalho pretende-se desenvolver diferentes sistemas de micropartículas poliméricas para encapsulamento de fármacos, que permitam a sua posterior libertação no local de ação. Como se referiu anteriormente, a proteção do fármaco dentro de um sistema transportador permite reduzir o efeito do organismo sobre o fármaco bem como colmatar as desvantagens associadas à perda de fármaco por difusão para os tecidos adjacentes ao longo do percurso pelo organismo. Além do mais, a ação do fármaco é restringida ao local onde esta efetivamente se pretende, reduzindo os efeitos secundários resultantes da acumulação de fármaco em outras zonas.

Assim, pretende-se com este trabalho preparar micropartículas a partir de poliésteres biodegradáveis, nomeadamente, poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), Poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidróxivalerato) (PHBV) e poli- ϵ -caprolactona, (PCL), com base no método de extração/evaporação do solvente (EES), nas quais se irão incorporar dois tipos de fármacos: cisplatina, um antineoplásico e dexametasona, um

corticosteróide. A preferência por estes polímeros prende-se com a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e aplicabilidade em áreas de libertação controlada de fármacos e de engenharia de tecidos. No que respeita à escolha dos fármacos, é de notar que estes são utilizados de forma conjugada, ou seja, o efeito antiemético¹ da dexametasona é muitas vezes utilizado para atenuar os efeitos secundários associados à terapia com cisplatina (Rudd e Naylor, 1997, Tanihata *et al.*, 2004; Rigacci *et al.*, 2012).

Uma vez preparadas as micropartículas, estas serão alvo de caracterização, designadamente em termos da sua morfologia (SEM e dispersão laser) e estrutura (através de análise térmica). Finalmente, pretende-se obter os perfis de libertação *in vitro* dos fármacos, com o intuito de avaliar o desempenho destas estruturas enquanto SLCs.

Complementarmente, incorporar-se-ão as micropartículas carregadas com cisplatina, num hidrogel de quitosano para aplicação por via injetável, que está a ser produzida no âmbito de um outro trabalho (Moura, 2014). A ideia subjacente será comparar a libertação de cisplatina encapsulada nas micropartículas, com o perfil de libertação após incorporação destas no hidrogel.

1.3 Organização do Trabalho

O presente trabalho encontra-se organizado em cinco capítulos principais, subdivididos em subcapítulos que particularizam os vários aspetos abordados em cada um.

No presente capítulo, **Capítulo 1**, foram apresentadas as razões que motivaram o desenvolvimento do trabalho bem como os objetivos que se pretendem atingir. No **Capítulo 2**, intitulado *Revisão Bibliográfica*, é feito um enquadramento geral do tema, com a apresentação dos conceitos subjacentes, bem como dos fundamentos das técnicas utilizadas no procedimento experimental e uma análise mais detalhada dos vários polímeros utilizados. O capítulo apresenta ainda uma revisão bibliográfica dos principais trabalhos publicados nesta área, particularmente no que respeita aos estudos levados a cabo, relacionados com síntese de micropartículas poliméricas para encapsulamento de fármacos.

No **Capítulo 3**, *Materiais e Métodos*, são apresentados os fármacos em estudo bem como a descrição dos materiais e métodos utilizados para a preparação das micropartículas. Descrevem-se ainda as técnicas utilizadas para a caracterização das micropartículas e o procedimento intrínseco aos ensaios de libertação.

¹ Designação atribuída aos medicamentos utilizados no tratamento de sintomas de enjoos, náuseas e vômitos.

1. INTRODUÇÃO GERAL

No **Capítulo 4** são apresentados e discutidos os resultados obtidos, nomeadamente as características das micropartículas e os perfis de libertação, bem como as conclusões parcelares de cada conjunto de resultados.

Por fim, o **Capítulo 5** resume as principais conclusões e no **Capítulo 7** é feita uma abordagem a algumas sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros nesta área.

Todos os capítulos são introduzidos com uma breve contextualização dos assuntos a abordar em cada um deles.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tal como apresentado no capítulo anterior, este trabalho tem por base o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada (SLCs), na forma de micropartículas poliméricas, nas quais se pretende encapsular fármacos. No presente capítulo apresenta-se uma breve resenha bibliográfica focada nos principais aspetos relacionados com as diferentes fases do trabalho.

Desta feita, começa-se por uma abordagem aos SLCs, mormente os de base polimérica, detalhando as características dos polímeros que vão ser utilizados; de seguida refere-se o método de extração/evaporação do solvente (EES), que serviu de base à preparação das micropartículas em estudo; e, finalmente, motivado pelo facto de se pretender a incorporação das micropartículas num hidrogel de quitosano, é dado ênfase a este tipo de material, com especial destaque para os tipos de hidrogel utilizados neste trabalho.

2.1 Sistemas de Libertação Controlada

O desenvolvimento de um SLC é dependente de um amplo conjunto de fatores que influenciam o seu desempenho, dos quais se destacam as características do fármaco que se pretende libertar, o local de ação do fármaco, que conseqüentemente tem de ser alcançado pelo sistema transportador e, em última instância, as características do material polimérico que constitui a matriz na qual se pretende incorporar o fármaco.

Os SLCs são, na sua maioria, constituídos por uma estrutura polimérica biocompatível que, após incorporação do fármaco, atua como sistema transportador deste até ao local de ação, garantindo um perfil de libertação que é função das características da estrutura polimérica utilizada. A administração de fármacos com recurso a um sistema deste tipo apresenta pelo menos uma das seguintes vantagens (Chien e Lin, 2007):

- Controlo da taxa de libertação bem como da dose terapêutica;
- Manutenção da concentração de fármaco dentro da gama correspondente à margem terapêutica;
- Maximização da relação dose-eficácia;
- Redução dos efeitos secundários;
- Diminuição do número de administrações;
- Aumento da confiança por parte do paciente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A utilização de um sistema transportador permite controlar a farmacocinética em causa e assim manipular a forma como o fármaco é absorvido, distribuído, metabolizado e eliminado (ADME) (Vilar *et al.*, 2012). Por outro lado, previne a interação entre o fármaco e outras moléculas que poderão causar a alteração da sua estrutura (Vilar *et al.*, 2012) e ainda contorna problemas associados à solubilidade de certos fármacos, bem como alterações provocadas pelas condições do meio, como por exemplo pH (Martinho, 2011). Dada a elevada especificidade das moléculas com atividade biológica, estas alterações podem ter efeito sobre a estrutura dos princípios ativos e consequentemente causar a perda da ação terapêutica.

O desenvolvimento de um SLC é um processo complexo onde o tipo de material selecionado deve ter em conta o efeito sobre o organismo, o local de ação, via de administração, perfil de libertação e, em última instância, a variabilidade associada à incorporação do fármaco na estrutura (Makadia e Siegel, 2011). Este último aspeto é particularmente importante na medida em que poderá ditar a ineficiência de um material para um dado fármaco, apesar deste se revelar aplicável para outro.

Inequivocamente, o estudo destas variáveis requer um trabalho interdisciplinar de várias áreas científicas como a medicina, a bioquímica, a farmácia, a engenharia química, materiais, entre outras.

O principal objetivo de um SLC é manter a concentração de fármaco no intervalo compreendido entre a concentração mínima efetiva (CME) e a concentração máxima tolerada (CMT), designado por margem terapêutica (MT); eliminando o perfil “tipo serra” associado à administração de fármacos por doses. A seleção do SLC é incontestavelmente afetada pelo perfil de libertação pretendido, uma vez que, quer a MT quer o período pretendido para a ação vão influenciar a seleção do material mais adequado (Lee *et al.*, 2010; Shaik *et al.*, 2012; Vilar *et al.*, 2012).

2.2 Sistemas de Libertação Controlada de Base Polimérica

Atualmente existe um leque alargado de sistemas transportadores, bem como de materiais utilizados na sua preparação, com particular destaque para os materiais poliméricos, biocompatíveis e biodegradáveis, que serão alvo de estudo deste trabalho.

Da miríade de polímeros disponíveis para utilização como biomateriais, ressalta uma característica comum a alguns deles que é o facto de serem biocompatíveis, isto é, a sua aplicação *in vivo* não surte qualquer tipo de reação adversa por parte do organismo.

Tendo em conta os materiais que cumprem este requisito, podemos dividir os polímeros utilizados em SLCs em polímeros naturais e polímeros sintéticos. Os polímeros naturais são,

na sua maioria, biodegradáveis, enquanto que os polímeros sintéticos, podem ser ou não biodegradáveis. O facto de permitirem uma alargada gama de propriedades, fruto da imensa variedade de composições, faz com que os polímeros sintéticos continuem a ser uma ótima solução para colmatar o fraco controlo, reprodutibilidade das propriedades e dificuldade de purificação dos polímeros naturais. Em alguns casos é possível combinar polímeros naturais com polímeros sintéticos, obtendo um material cujo desempenho é superior ao de cada um deles isoladamente (Angelova e Hunkeler, 1999).

Na **Tabela 2.1** é apresentada uma lista dos principais polímeros usados em SLCs, bem como alguns exemplos de trabalhos onde foram utilizados. É no entanto de referir que frequentemente são utilizados copolímeros com o objetivo de obter um melhor desempenho. Um exemplo clássico em SLCs é a utilização do copolímero de ácido láctico e ácido glicólico, designado por poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), cujas propriedades são dependentes da razão entre os monómeros apresentados (Gu e Burgess, 2014).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.1 - Polímeros utilizados na preparação de sistemas de liberação controlada (Angelova e Hunkeler, 1999; Uhrich *et al.*, 1999; Pillai e Panchagnula, 2001; Vilar *et al.*, 2012; Behera, 2013; Gu e Burgess, 2014).

Polímeros naturais e seus derivados	Referências
<u>Proteicos</u> : colagénio, albumina, gelatina, fibrina, elastina.	Elzoghby <i>et al.</i> , 2012
<u>Polissacarídeos</u> : Agarose, alginato, carragenina, ácido hialurónico, dextrano, quitosano, ciclodextrinas.	Luo e Wang, 2014 Yoon <i>et al.</i> , 2013
<u>Derivados de celulose</u> : carboximetilcelulose; etil celulose; acetato de celulose; proprianato de acetato de celulose; hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).	Tan <i>et al.</i> , 2013 Almeida et al, 2014 Kolakovic <i>et al.</i> , 2012 Ng e Jumaat, 2014
Polímeros sintéticos	
<u>Biodegradáveis</u>	Cheng <i>et al.</i> , 2007
<u>Poliésteres</u> : poli(ácido láctico) (PLA); poli(ácido glicólico) (PGA); polihidroxibutirato (PHB); poli-ε-caprolactona (PCL); polidixanona (PDS).	Chen e Yong, 2012 Rai <i>et al.</i> , 2005
<u>Polianidridos</u> : poliácido sebácico; poliácido adípico; poliácido teraftálico.	Levy-Nissenbaum <i>et al.</i> , 2012
<u>Poliâmidas</u> : poliimino carbonatos; poliaminoácidos.	Gonzalo <i>et al.</i> , 2013
<u>Fosforados</u> : polifosfatos; polifosfanatos; polifosfazenos; polifosfoésteres.	Lakshmi <i>et al.</i> , 2003
<u>Poliortoésteres</u> : POEI; POEII, POEIII; POEIV.	Gupta e Lupina, 2004
<u>Outros</u> : poli(cianoacrilatos); poliuretanas; polidihidropiranos; poliacetais.	Palamoor Jablonski, 2013 Vancoillie <i>et al.</i> , 2014
<u>Não biodegradáveis</u>	
<u>Silicones</u> : polidimetilsiloxano (PDMS); sílica coloidal.	Prokopowicz <i>et al.</i> , 2014 Okor, 1990
<u>Acrilatos</u> : poli(metacrilato); poli(metracrilato de metilo) (PMMA); poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA).	Rao <i>et al.</i> , 1994 Zheltonozhskaya <i>et al.</i> , 2013
<u>Acrilamidas</u> : poliacrilamida (PAAm); poli(N-isopropilacrilamida) (PNIAAm).	Fu e Soboyejo, 2011
<u>Poliéteres</u> : polietilenoglicol (PEG); polipropilenoglicol.	Najafabadi <i>et al.</i> , 2014
<u>Outros</u> : polivinilpirrolidona (PVP); acetato de etilenovinil (EVA); poloxameros; poloxaminas.	Oliveira <i>et al.</i> , 2014

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As características dos polímeros utilizados na estrutura, bem como os produtos resultantes da sua biodegradação, constituem um importante parâmetro que determina a aplicabilidade do material enquanto SLC. É preciso assegurar que tanto os polímeros que compõem um SLC, como os produtos que resultam da sua biodegradação são biocompatíveis, não tóxicos e passíveis de serem eliminados por mecanismos fisiológicos normais (Makadia e Siegel, 2011). Isto para além de serem adequados para o transporte do fármaco até local de ação e de assegurarem uma adequada libertação.

A seleção do polímero para uma determinada aplicação deve ter em conta não só a interação entre o polímero e o fármaco a transportar, mas também o efeito do material sobre o organismo, nomeadamente no que concerne à interação entre este e os tecidos (Gu e Burgess, 2014}). Tendo em conta este aspeto, é imprescindível o conhecimento das propriedades dos materiais utilizados em SLCs, bem como dos mecanismos que medeiam a interação entre o material e o organismo, por forma a conseguir um desempenho melhorado em termos de função química, interfacial, mecânica e biológica. Desta forma é possível otimizar o sistema no que respeita à função para a qual este foi desenvolvido, minimizando a resposta adversa por parte do organismo.

Tanto as propriedades de superfície como as da massa (*bulk*) influenciam o desempenho do material. No que respeita às primeiras destacam-se a hidrofiliicidade/hidrofobicidade, lubrificação, rugosidade e energia de superfície, enquanto que, no que se refere às segundas, o peso molecular, permeabilidade, taxa de degradação, porosidade e interconectividade dos poros desempenham um papel preponderante. (Angelova e Hunkeler, 1999; Pillai e Panchagnula, 2001).

O mecanismo de degradação dos materiais poliméricos constitui um importante parâmetro funcional dos SLCs. A taxa de libertação de fármaco em sistemas poliméricos depende fortemente das características do polímero e do arranjo estrutural da rede polimérica, que naturalmente influenciam o acesso do meio ao fármaco, cuja libertação é influenciada por mecanismos difusionais difíceis de prever.

No caso de polímeros não biodegradáveis, a entrada do meio na estrutura polimérica e consequente dissolução e transporte do fármaco, por processos de transferência de massa devidos ao gradiente de concentrações, constitui o único mecanismo envolvido.

Contudo, no caso de polímeros biodegradáveis, além do transporte do fármaco, a degradação da matriz polimérica, que a longo prazo promove uma libertação mais efetiva do fármaco encapsulado, constitui um parâmetro relevante para o desempenho do SLC. Esta degradação do material *in vivo*, acompanhada da consequente libertação do fármaco, ocorre principalmente devido a hidrólise da matriz polimérica (Lin e Anseth, 2013).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tendo em conta o tipo de degradação, os materiais poliméricos podem ser classificados em erodíveis à superfície ou erodíveis em massa, dependendo da suscetibilidade do agente de degradação para penetrar no material. (Anderson e Shive, 1997; Uhrich *et al.*, 1999; Vogelson, 2001; Kim, 2006; Lin e Anseth, 2013).

Nos polímeros erodíveis à superfície, como por exemplo os polianidridos, a hidrofobicidade das cadeias poliméricas oferece resistência à penetração de água, o que promove a hidrólise à superfície, na interface polímero/meio. Verifica-se uma perda de massa gradual que provoca uma diminuição no tamanho, com conservação da morfologia do sistema.

No que respeita aos polímeros erodíveis em massa, como é o caso da maioria dos poliésteres, ocorre a penetração e hidrólise no interior da matriz. Para estes materiais a libertação é controlada pela difusão, sendo o tamanho e interconectividade dos poros uma característica preponderante que influencia a velocidade de penetração na matriz polimérica. Uma vez que este tipo de degradação é dependente da difusividade do meio na estrutura, modelar a libertação em sistemas deste tipo revela-se uma tarefa por vezes complexa, dificultando a manipulação do perfil de libertação (Chen *et al.*, 2011; Lin e Anseth, 2013).

Burkersroda *et al.*, em 2002, constataram que a predominância de um dos tipos de erosão está diretamente relacionada com a relação entre a velocidade de penetração de água na matriz e a velocidade de degradação das ligações à superfície, isto é, se a velocidade de penetração de água for superior à de degradação superficial, o polímero será erodível em massa, caso contrário será erodível à superfície.

É de notar que apesar da libertação do fármaco ser normalmente resultante da conjugação de ambos os processos de degradação, é desejável que esta seja controlada por processos de degradação à superfície, uma vez que se consegue uma taxa de libertação de ordem zero, manipulável através do controlo da área de superfície e da taxa de degradação do SLC (Uhrich *et al.*, 1999).

Os mecanismos que governam a degradação dos materiais poliméricos não se encontram completamente estabelecidos; no entanto, é possível encontrar alguns trabalhos que têm por base o estabelecimento de modelos matemáticos que pretendem prever a cinética de degradação dos mesmos (Siepmann e Göpferich, 2001; Lemaire *et al.*, 2003; Bertrand *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

Na **Tabela 2.2** são apresentadas as principais variáveis que influenciam a taxa de degradação dos materiais poliméricos.

Tabela 2.2 - Variáveis que influenciam a taxa de degradação dos materiais poliméricos (adaptado de Pillai e Panchagnula, 2001; Shaik *et al.*, 2012)

Estrutura química e composição
Fatores físico-químicos (troca iônica, força iônica e pH)
Fatores físicos (forma, tamanho e lacunas da rede polimérica)
Morfologia (amorfos, semicristalinos, cristalinos e microestrutura)
Mecanismo de degradação (hidrólise química, enzimática ou microbiana)
Distribuição de pesos moleculares
Condições de processamento e esterilização
Condições de armazenamento
Via de administração e local de ação

Em suma, as características do material constituem um parâmetro preponderante para o controlo da cinética de degradação. A biodegradação pode ser essencialmente enzimática, química ou microbiana e estes fenómenos podem ocorrer simultaneamente num mesmo sistema (Pillai e Panchagnula, 2001). A velocidade de degradação dos materiais poliméricos influencia drasticamente o desempenho do SLC, tanto ao nível da aceitação por parte do organismo, como em termos de taxa de libertação do fármaco incorporado. O domínio destas variáveis é possível mediante uma seleção cuidada dos tipos de monómeros e ligações que edificam a matriz do sistema.

De seguida particularizam-se as principais características e aplicações dos polímeros utilizados na preparação de micropartículas no âmbito deste trabalho, designadamente os poliésteres poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) e Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidróxivalerato) (PHBV).

2.3 Poliésteres Utilizados na Preparação de Micropartículas

Poliésteres biocompatíveis e biodegradáveis têm sido intensamente investigados para aplicações biomédicas devido à sua degradação gradual *in vivo*, sem necessidade de procedimento pesados de remoção após o implante. O desenvolvimento de SLCs baseados neste tipo de polímeros permite o transporte de uma grande variedade de substâncias ativas tais como proteínas, péptidos, antibióticos, agentes anticancerígenos, entre outras (Murthy *et al.*, 2012; Ravi *et al.*, 2014). A **Tabela 2.3** enumera alguns aspetos relevantes dos poliésteres utilizados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2.3 - Características dos poliésteres utilizados na preparação das micropartículas (Chasin e Langer, 1990; Ikada e Tsuji, 2000; Khanna e Srivastava, 2005; Auras *et al.*, 2010).

Polímero	Peso Molecular [KDa]	Cristalinidade	Período de degradação	Observações
PLA	100-300	Semi-cristalino	1-2 anos	
PLGA	40-100	Amorfo	50-150 dias	Biodegradável e
PCL	40-80	Semi-cristalino	4 anos	Biocompatível
PHBV	200-3000	Cristalino	3-5 anos	

2.3.1 PLA e PLGA

O poli(ácido láctico) e o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), respectivamente PLA e PLGA, **Figuras 2.1 e 2.2**, pertencem à categoria dos poli(α -hidroxi ácidos) e foram dos primeiros polímeros sintéticos com aplicação clínica, principalmente motivado pela sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (Matsumoto *et al.*, 1997; Jain *et al.*, 2000; Herrero-Vanrell *et al.*, 2014).

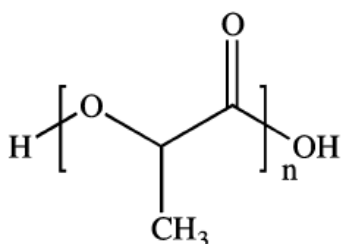


Figura 2.1 - Estrutura do PLA in (Zhang *et al.*, 2014)

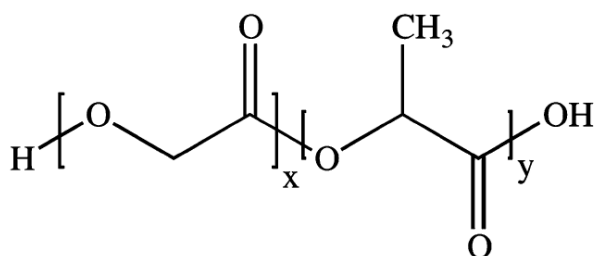


Figura 2.2 - Estrutura do PLGA in (Zhang *et al.*, 2014)

Tanto o PLA como o poli(ácido glicólico) (PGA), comonómeros que constituem o PLGA, são sintetizados quer por reação de policondensação dos monómeros, resultando em polímeros de baixo peso molecular, quer por polimerização de abertura do anel de dímeros cíclicos o que produz polímeros de elevado peso molecular (Ikada e Tsuji, 2000; Kimura e Ogura, 2012). O catalisador e o agente regulador do comprimento de cadeia, utilizado na produção destes polímeros, permitem regular o peso molecular dos mesmos (Ikada e Tsuji, 2000).

A degradação do PLA e do PLGA deve-se essencialmente à hidrólise química, governada pela acessibilidade da água às ligações éster da cadeia principal do polímero (Verte *et al.*, 1994). No entanto, resultados controversos apresentados por alguns autores questionam a possibilidade de ocorrer hidrólise enzimática (Chasin e Langer, 1990; Auras *et al.*, 2010; Makadia e Siegel, 2011; Anderson e Shive, 2012). Os grupos carboxílico e hidroxilo resultantes

da hidrólise geram um microambiente ácido no interior da matriz polimérica que atua como catalisador da reação de degradação do polímero (Chen *et al.*, 2011; Li e Ooi, 2012). Consequentemente este tipo de polímeros são essencialmente erodíveis em massa (Tamada e Langer, 1993; Burkersroda *et al.*, 2002; Bertrand *et al.*, 2007).

No que concerne ao caso particular do PLGA, apesar de seguir a via de degradação anteriormente apresentada, é possível estabelecer a sua taxa de degradação em função da razão entre os comonomeros que compõem o copolímero (Sackett e Narasimhan, 2011). A presença de grupos metil no PLA confere-lhe maior hidrofobicidade o que faz com que este se degrade mais lentamente quando comparado com a taxa de degradação do PGA; assim é possível ajustar a taxa de degradação do PLGA controlando a composição do copolímero (Kimura e Ogura, 2012; Anderson e Shive, 2012).

A aprovação destes polímeros por parte da “Food and Drug Administration” (FDA) (Ataman-Onal *et al.*, 2006; Jain, 2000; Saralidze *et al.*, 2010; Makadia e Siegel, 2011) constituiu a força motriz que despoletou o interesse por parte da comunidade científica no desenvolvimento de SLCs e *scaffolds* baseados em PLA e PLGA. Atualmente estes polímeros são intensivamente estudados como veículos para antibióticos (Prior *et al.*, 2000), proteínas (Lee *et al.*, 2007) e outras macromoléculas como ADN (Mok e Park, 2008), ARN (Lee *et al.*, 2011) e péptidos (Jain, 2000; Blanco-Prieto *et al.*, 2004; Makadia e Siegel, 2011).

A utilização de PLA e de PLGA em aplicações biomédicas data da década de 60 com o desenvolvimento de fibras para aplicação em suturas cirúrgicas. O principal interesse por estes materiais prende-se com as propriedades mecânicas, baixa toxicidade e excelente biocompatibilidade (Jain, 2000; Auras *et al.*, 2010).

O grande impulso para o desenvolvimento de micropartículas de PLA e PLGA, ocorreu na década de 90, estimulado pelo programa da Organização Mundial de Saúde (OMS) (“*The Childrens Vaccine Initiative*”), que incluía, entre outros assuntos, o desenvolvimento de vacinas de libertação controlada (Muraskin, 1996; Sasiak *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2000). Os primeiros estudos realizados tinham por base o desenvolvimento de microesferas de PLA e PLGA, para encapsulamento de antígenos e toxóides, passíveis de serem administradas sob a forma de vacinas de libertação controlada, conseguindo-se desta forma diminuir, ou em última instância eliminar, a necessidade de administrações repetidas (Johansen *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 1999).

Lamalle-Bernard *et al.*, no ano de 2006, realizaram um estudo no qual promoveram a adsorção de dois antígenos específicos, *p24* e *gp120*, utilizados no tratamento do HIV, à superfície de partículas de PLA. Desta forma provaram que micropartículas deste polímero podiam ser utilizadas como sistema transportador de mais do que um antígeno em simultâneo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O estudo sustenta uma investigação anterior, levada a cabo por um dos investigadores (Ataman-Onal *et al.*, 2006), apenas com partículas de PLA carregadas com o antigene p24, na qual modelos animais revelaram que este sistema transportador era altamente eficiente a despoletar a resposta imunológica. A utilização de combinações de antígenos constitui uma abordagem promissora para o desenvolvimento de vacinas.

O tratamento tumoral é outra área na qual a aplicabilidade de micropartículas de PLA e PLGA se tem revelado promissora pela possibilidade de contornar os significativos efeitos secundários, baixa eficácia e reduzida estabilidade deste tipo de fármacos. As abordagens em estudo visam a aplicação de quimioterápicos por via inalável, essencialmente para o tratamento de cancro do pulmão (Kim *et al.*, 2012), por via parenteral (Gryparis *et al.*, 2007; Bragagni *et al.*, 2013) ou por via oral (Lee *et al.*, 2007). As investigações levadas a cabo, muitas vezes sustentadas por modelos animais, provaram que micropartículas baseadas nestes polímeros constituem uma abordagem promissora no tratamento de cancro (Ruan e Feng, 2003; Gryparis *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2008; Blanco-Prieto *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2014).

Na área de engenharia de tecidos, a aplicação de sistemas de partículas passíveis de serem aplicados por via injetável, permite eliminar a necessidade de procedimento cirúrgico (Daugherty *et al.*, 1997; Senuma *et al.*, 2000; Umeki *et al.*, 2010). Apesar de tanto o PLA como o PLGA apresentarem algumas desvantagens que se prendem com a baixa resistência mecânica e possível inflamação causada pelos seus produtos de degradação ácidos, a adição de outras matérias como por exemplo hidroxiapatite, utilizada em regeneração óssea, provou ser eficaz a colmatar estas desvantagens (Shi *et al.*, 2011; Li e Ooi, 2012). A utilização destes polímeros em aplicações ortopédicas tem sido alvo de intensa investigação (Lanao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2012; Nath *et al.*, 2013; Hoekstra *et al.*, 2013).

Os vários exemplos apresentados permitem inferir acerca da panóplia de aplicações das micropartículas de PLA e PLGA, o que se traduz num denso conjunto de trabalhos publicados nas áreas farmacêutica e de engenharia de tecidos.

2.3.2 PCL

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL), **Figura 2.3**, pertence à categoria dos poli(ω -hidroxialcanoatos) e, ainda que com menos intensidade que os poliésteres apresentados anteriormente, tem sido investigada como biomaterial devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e permeabilidade a um número significativo de fármacos (Ikada e Tsuji, 2000; Sinha *et al.*, 2004; Martinho, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

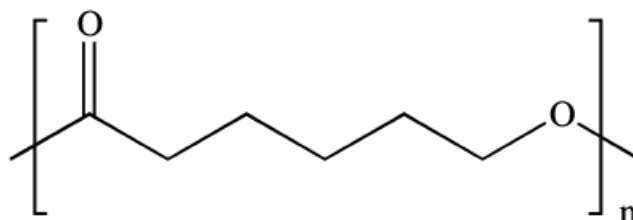


Figura 2.3 - Estrutura da PCL in (Zhang *et al.*, 2014)

À semelhança dos anteriores poliésteres, a PCL é sintetizada por reações de polimerização de abertura de anel, a partir do monómero ϵ -caprolactona (Auras *et al.*, 2010).

A PCL sofre degradação enzimática, no entanto, esta não se verifica em condições fisiológicas, pelo que, quando aplicada em SLCs, a sua degradação é mediada pela hidrólise das ligações éster que constituem a cadeia polimérica (Ikada e Tsuji, 2000; El-Rehim, 2005; Lee *et al.*, 2007;). Ao contrário do PLA e do PLGA, a degradação da PCL não gera subprodutos ácidos. Assim, a sua aplicação em SLCs revela-se mais vantajosa uma vez que não despoleta qualquer tipo de reação do tecido no local do implante (Dhanaraju *et al.*, 2003).

Devido à sua cristalinidade e hidrofobicidade, a PCL apresenta uma taxa de degradação bastante lenta, quando comparada com outros poliésteres (**Tabela 2.3**) (Sackett e Narasimhan, 2011). Esta característica aliada à elevada permeabilidade da PCL a um número significativo de fármacos (Dhanaraju *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2004; Castilla-Cortazar *et al.*, 2012), tem fomentado a sua utilização em implantes de longa duração (Auras *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014).

Uma característica particular da PCL que tem motivado o desenvolvimento de várias pesquisas, prende-se com a sua elevada compatibilidade com vários polímeros, o que permite utilizá-la em reações de copolimerização e na produção de ligas poliméricas (Sinha *et al.*, 2004; Murthy *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014;). Ligas obtidas da conjugação de PCL com PLA são provavelmente das mais investigadas (Chen *et al.*, 2003; Todo *et al.*, 2007; Lebourg *et al.*, 2008; Chavalitpanya e Phattanarudee, 2013; Patricio e Bártolo, 2013; Patricio *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2014). Estas ligas são desenvolvidas com o intuito de obter um material cujas características

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

resultam da conjugação das propriedades mais apelativas de cada um dos polímeros utilizados na sua constituição, conseguindo-se desta forma manipular propriedades mecânicas, hidrofobicidade, taxa de degradação, entre outras (Auras *et al.*, 2010; Woodruff e Hutmacher, 2010; Takayama *et al.*, 2011).

A utilização de PCL na área de biomateriais, incluindo em SLCs (Woodruff e Hutmacher, 2010) e em engenharia de tecidos (Patricio *et al.*, 2013a) é motivada pelo facto deste material se encontrar regulamentado pela FDA para aplicações médicas (Woodruff e Hutmacher, 2010; Castilla-Cortazar *et al.*, 2012).

A reduzida taxa de degradação da PCL motivou a sua aplicação no desenvolvimento de dispositivos de libertação de contraceptivo, nos quais se requer um período de libertação superior a um ano (Gan, 1997). A grande vantagem face aos implantes convencionais desenvolvidos para este fim, prende-se com a absorção e eliminação do dispositivo sem necessidade de procedimento cirúrgico para a sua remoção (Sun *et al.*, 2006). Um exemplo de um dispositivo deste tipo, produzido a partir de PCL, encontra-se em comercialização sob a designação de Capronor® (Darney *et al.*, 1989, Chasin e Langer, 1990). Dasaratha *et al.*, 2003, investigaram uma alternativa ao dispositivo anteriormente apresentado, baseado em micropartículas de PCL.

Enquanto veículos para o transporte de fármacos, micro e nanopartículas de PCL têm sido alvo de interesse por parte da comunidade científica (Sinha *et al.*, 2004). Os inconvenientes associados à terapêutica convencional da diabetes, exigem formas inovadoras de administrar insulina nos pacientes que dependem desta hormona para regular os níveis de açúcar no sangue. A administração de insulina com recurso a partículas produzidas a partir de PCL e seus copolímeros constituem uma hipótese promissora, quer por diminuírem a frequência de administração, quer por possibilitarem vias de administração alternativas (Damgé *et al.*, 2007).

Em engenharia de tecidos, a porosidade e propriedades de superfície dos *scaffolds*, constituem duas características importantes destes dispositivos, na medida em que medeiam a adesão e proliferação celular que possibilita a regeneração do tecido. A elevada compatibilidade da PCL com outros polímeros tem sido investigada com o intuito de criar *scaffolds* com estruturas porosas bem definidas e propriedades de superfície controladas. Estas características aliadas à possibilidade de incorporação de fatores de crescimento na estrutura têm sido investigada. (Lebourg *et al.*, 2008; Woodruff e Huntmacher, 2010; Bao *et al.*, 2012; Patricio *et al.*, 2013a; Patricio e Bártolo, 2013).

2.3.3 PHBV

O poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), **Figura 2.4**, é um poliéster pertencente à classe dos poli(3-hidroxialcanoatos) (PHA), produzido por uma grande variedade de microrganismos recorrendo a processos biotecnológicos (Sendil *et al.*, 1999; Ikada e Tsuji, 2000; Du *et al.*, 2001; Gunaratne e Shanks, 2005; Pich *et al.*, 2006).

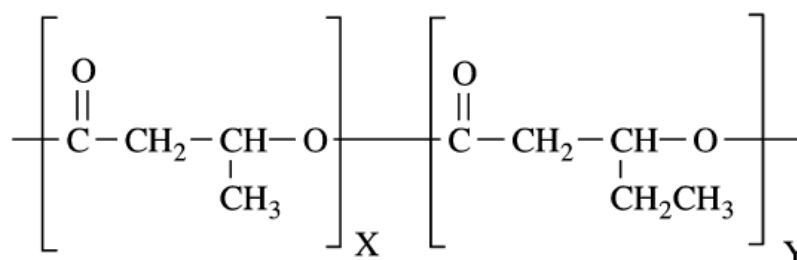


Figura 2.4 - Estrutura do PHBV in (Zhang *et al.*, 2014)

A biodegradabilidade, biocompatibilidade e toxicidade nula do PHBV, representam propriedades que potenciam a sua utilização como biomaterial (Williams e Martin, 1996; Vilos *et al.*, 2013).

A hidrólise do PHBV processa-se, à semelhança dos demais poliésteres, através da degradação das ligações éster que compõem o polímero. Ensaio *in vivo* demonstraram que a taxa de hidrólise em meio fisiológico é superior à obtida *in vitro* em condições semelhantes, devido à presença de enzimas segregadas pelo sistema imunitário, responsáveis por catalisar o processo (Sultana e Khan, 2012).

A percentagem molar de hidroxivalerato (HV), na estrutura do PHBV, permite colmatar algumas desvantagens associadas ao homopolímero poli(3-hidroxibutirato) (PHB). Contudo, o facto da temperatura de fusão do PHB ser próxima da sua temperatura de degradação, limita a sua aplicação industrial. Esta desvantagem é minorada pela presença do comonómero HV na estrutura do PHBV, permitindo aumentar a gama térmica de processabilidade deste polímero (Koller *et al.*, 2013; Cretois *et al.*, 2014). Quando comparado com o PHB, o PHBV apresenta uma dureza inferior, uma maior elasticidade e um menor grau de cristalinidade, propriedades relacionadas com o conteúdo em HV. Além destas, também a taxa de biodegradação é menor, embora a relação com o conteúdo em HV não se encontre completamente compreendida (Du *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2005; Bonartsev *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014a).

A capacidade de absorção de água do PHBV é consideravelmente limitada, desta feita, o polímero é essencialmente erodível à superfície, contrariamente ao que se verifica para o PLA e PLGA (Pouton e Akhtarb, 1996). Esta característica aliada ao facto deste ser produzido por

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

biocatálise, eliminando a desvantagem associada à possível presença de catalisador e monómeros no produto final, definem a sua aplicabilidade na área farmacêutica (Pouton e Akhtarb, 1996).

O PHB é um polímero com elevado grau de cristalinidade, no entanto, este pode ser controlado através da concentração de HV na cadeia polimérica do copolímero PHBV (Wang *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2007; Koller *et al.*, 2013). A alteração do grau de cristalinidade do polímero permite controlar a taxa de degradação, distribuição do fármaco na matriz e eficiência de encapsulamento, o que consequentemente possibilita o controlo da cinética de libertação (Pouton e Akhtarb, 1996). Esta característica tem sido explorada no desenvolvimento de SLCs e *scaffolds*.

Micro e nanopartículas baseadas em PHBV para o encapsulamento de fármacos, entre os quais se destacam antibióticos (Sendil *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014a) e quimioterápicos (Vilos *et al.*, 2013, Masood *et al.*, 2013), têm sido alvo de investigação. Os resultados destes estudos indicam que, em virtude da reduzida taxa de degradação do PHBV, a libertação, quando considerada a curto prazo, é exclusivamente mediada por processos difusionais (Sendil *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014a).

Na área de engenharia de tecidos a piezoelectricidade característica do PHBV tem prendido a atenção dos investigadores focados no desenvolvimento de *scaffolds* para reparação de defeitos ósseos, motivado pelo facto do próprio osso possuir propriedades piezoelétricas (Frias, 2010; Sultana e Khan, 2012; Sendil *et al.*, 1999; Pouton e Akhtarb, 1996; Ke *et al.*, 2009). Os estímulos gerados pelos materiais piezoelétricos têm um efeito positivo sobre a adesão e proliferação dos osteoblastos que constituem o tecido ósseo (Mouraret *et al.*, 2014). Esta característica aliada à elevada durabilidade dos implantes de PHBV, permite a sua utilização em *scaffolds* cuja estrutura se mantém intacta por um período de tempo que possibilita a reposição do material por tecido ósseo neoformado.

As anteriormente discutidas vantagens associadas à utilização de PHBV, conjugadas com o facto de se tratar de um polímero natural obtido por processos biotecnológicos, fazem com que se revele uma alternativa promissora aos polímeros sintéticos.

2.4 Micropartículas para Encapsulamento de Fármacos

Microesferas de base polimérica têm sido intensamente investigadas para um número significativo de aplicações, entre as quais se desatacam os SLCs de fármacos. (Sastre *et al.*, 2007; Rokhade *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Herrero-Vanrell *et al.*, 2014)

Quando comparadas com sistemas matriciais de maiores dimensões, a principal vantagem da sua utilização prende-se com a possibilidade destas serem facilmente administradas por via parenteral, o que elimina a desvantagem associada à necessidade de procedimentos invasivos (Freiberg e Zhu, 2004). Esta característica aliada ao facto de permitirem encapsular um leque alargado de fármacos, incluindo fármacos de pequenas moléculas, proteínas e ácidos nucleicos (Kim e Pack, 2006), e de poderem ser produzidas a partir de polímeros biodegradáveis (Anderson e Shive, 2012), tornam a sua utilização na área de biomateriais particularmente apelativa.

Dos vários métodos disponíveis para a preparação de micropartículas, o método extração/evaporação do solvente (EES), é claramente dos mais utilizados (Matsumoto *et al.*, 1997; Tiwari *et al.*, 2011). Este método é baseado na formação de uma emulsão, óleo em água (O/W), água em óleo (W/O), óleo em óleo (O/O) ou água-óleo-água (W/O/W) (dupla emulsão), seguida de evaporação ou extração do solvente e recuperação das partículas sob a forma sólida. De particular interesse para o presente trabalho, destacam-se as características do método de EES numa emulsão O/W, esquematizado na **Figura 2.5**. O polímero é dissolvido num solvente orgânico volátil (diclorometano, metanol, clorofórmio, benzeno, entre outros) ao qual é adicionado o fármaco a encapsular. Esta solução é adicionada, gota a gota, a um volume significativamente superior de uma solução aquosa de estabilizante (p.e. álcool polivinílico - PVA), sob agitação vigorosa. A emulsão formada é posteriormente deixada sob agitação até evaporação total do solvente orgânico, o que resulta numa suspensão de partículas sólidas em meio aquoso que devem ser separadas e submetidas a secagem com o objetivo de se obterem micropartículas secas (Freiberg e Zhu, 2004; Makadia e Siegel, 2011; Li e Ooi, 2012; Kemala *et al.*, 2012).

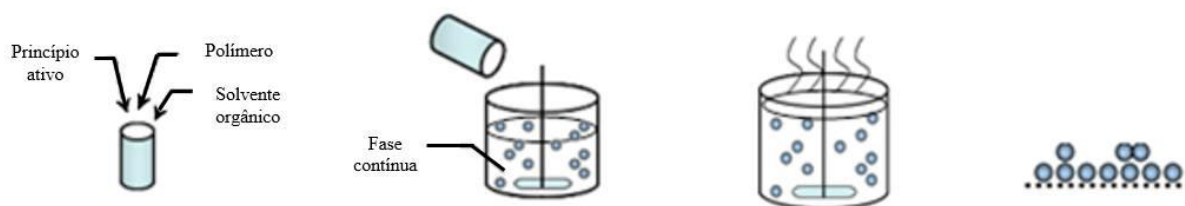


Figura 2.5 - Representação esquemática do método de extração/evaporação do solvente (EES), adaptado de (Li e Poncelet, 2008)

As características finais das micropartículas dependem fortemente das condições de síntese, principalmente no que respeita ao tamanho, morfologia e encapsulamento do fármaco (Li e Poncelet, 2008).

A distribuição de tamanhos e o tamanho das micropartículas é uma característica importante neste tipo de sistemas, dado que influencia a sua cinética de libertação bem como a

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

sua taxa de degradação. O tamanho das micropartículas é afetado pela viscosidade da fase dispersa (orgânica), taxa de agitação durante a emulsão e temperatura. Quando a fase orgânica apresenta uma viscosidade elevada, a quebra do sistema em pequenas gotículas durante o processo de emulsão é dificultada, formando-se preferencialmente estruturas de maiores dimensões (Yang *et al.*, 2000). A viscosidade da fase orgânica pode ser manipulada por variações de temperatura ou fazendo variar a concentração de polímero. A velocidade de agitação durante a emulsão é outro fator que afeta o tamanho das micropartículas, verificando-se que quanto maior é a velocidade de agitação, menores são as partículas formadas, devido à tensão de corte gerada pelo deslocamento de fluido e consequente quebra da fase orgânica (Andr *et al.*, 2001; Kemala *et al.*, 2012).

Um aspecto menos evidente e que afeta não só tamanho das micropartículas mas também a porosidade do material prende-se com a taxa de evaporação do solvente. A rápida evaporação do solvente arrasta material polimérico para a superfície das micropartículas, dando origem a partículas de maiores dimensões e com uma estrutura porosa resultante do deslocamento do solvente à medida que a solidificação do material vai ocorrendo (Yang *et al.*, 2000). Em certos casos, verifica-se a formação de esferas com cavidades internas, formando o polímero uma cápsula externa compacta (Yeo e Park, 2004).

Outro aspecto importante ligado à utilização de micropartículas em SLCs prende-se com a eficiência de encapsulamento (EE) e com a cinética de libertação do fármaco. A alteração de qualquer fator cuja repercussão seja o aumento do diâmetro das micropartículas provoca uma diminuição na taxa de libertação (Bezemer *et al.*, 2000; Andr *et al.*, 2001).

Além de afetar o tamanho das micropartículas, a viscosidade da fase orgânica condiciona também a eficiência de encapsulamento das mesmas. Uma fase orgânica mais viscosa oferece resistência à difusão do fármaco para a fase aquosa, o que normalmente acontece durante a preparação da emulsão, resultando em eficiências de encapsulamento mais elevadas, quando comparadas com aquelas que se obtêm com fases orgânicas menos viscosas (Herrmann e Bodmeier, 1998).

O peso molecular do polímero constitui outro fator preponderante. Polímeros de peso molecular superior permitem obter sistemas de partículas com maior eficiência de encapsulamento quando aplicado o método de EES numa emulsão O/W (Andr *et al.*, 2001; Herrmann e Bodmeier, 1998).

Em suma, existe um número significativo de parâmetros e condições de operação que afetam diversas características das micropartículas obtidas pelo método de EES numa emulsão O/W, como por exemplo, o tipo de solvente, razão entre o volume da fase contínua e da fase dispersa, concentração de polímero, tipo de estabilizante, tempo e velocidade de agitação, entre

outras. É de notar que a contribuição do fármaco pode ter um efeito significativo sobre estes parâmetros, dificultando significativamente o controlo e otimização destas variáveis (Herrmann e Bodmeier, 1998).

2.5 Hidrogéis de Quitosano

O quitosano, cuja estrutura é apresentada na **Figura 2.6**, é um polímero natural, pertencente à classe dos polissacarídeos, produzido comercialmente a partir da desacetilação alcalina da quitina (Auras *et al.*, 2010, Kimura e Ogura, 2012; Raymond *et al.*, 2009) por um processo no qual o grupo acetamida da quitina é convertido no grupo amida do quitosano (Agnihotri *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2006). A quitina, um polissacarídeo biocompatível (Ruel-Gariepy *et al.*, 2000; Agnihotri *et al.*, 2004), é o principal constituinte do exoesqueleto de crustáceos e da parede celular de alguns fungos (Sinha *et al.*, 2004a) e, como tal, a sua disponibilidade é relativamente elevada (Ruel-Gariepy *et al.*, 2000; Agnihotri *et al.*, 2004).

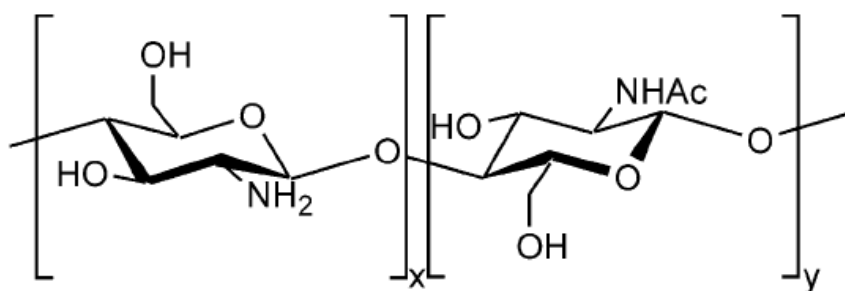


Figura 2.6 - Estrutura do quitosano in (Oliveira *et al.*, 2014).

A variabilidade associada aos diferentes tipos de quitosano prende-se com a diferença no peso molecular, que varia entre 3,8 e 200 kDa, e com o grau de desacetilação (66% -95%) (Agnihotri *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2004a), propriedades estas que afetam a solubilidade, mucoadesividade e biodegradabilidade do polímero (Park *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2012).

A estrutura do quitosano resulta da repetição alternada de N-acetil-D-glucosaminas e D-glucosaminas unidas por ligações 1-4-β-glicosídicas (Lin-Gibson *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2012). A distribuição dos grupos, amina e acetil livres, na estrutura do polímero são responsáveis pela sua fraca solubilidade em água. No entanto, em soluções aquosas ácidas, a sua solubilidade é considerável, o que permite eliminar as desvantagens associadas à utilização de solventes orgânicos (Agnihotri *et al.*, 2004).

O facto do quitosano ser um polímero catiónico (Agnihotri *et al.*, 2004; Damge *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2009; Kimura e Ogura, 2012), motivado pela presença de grupos amina carregados positivamente, permite-lhe interagir com a superfície do tecido

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

epitelial, conferindo-lhe elevada mucoadesividade. Esta propriedade é tanto maior quanto maior for o grau de desacetilação do polímero e tem sido investigada na área médica e farmacêutica, principalmente para aplicações oftálmicas (Agnihotri *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2004a; Rodrigues *et al.*, 2012).

Além da mucoadesividade, a interação entre o quitosano e o tecido epitelial provoca o relaxamento reversível das junções celulares que asseguram a estrutura do tecido, o que resulta num aumento da permeabilidade para fármacos de grande e pequena molécula (Agnihotri *et al.*, 2004). Modificações da superfície de materiais com recurso a quitosano têm sido levadas a cabo com o intuito de aumentar a biodisponibilidade de alguns fármacos (Sinha *et al.*, 2004a; Rodrigues *et al.*, 2012).

A degradação do quitosano *in vivo* ocorre por ação de várias enzimas, com particular destaque para a lisozima, sendo a taxa de degradação inversamente proporcional ao grau de desacetilação do polímero. Esta característica é a responsável pela biodegradabilidade do quitosano (Agnihotri *et al.*, 2004).

A acrescentar às propriedades anteriormente discutidas, o quitosano é biocompatível, não tóxico, esterilizável (Agnihotri *et al.*, 2004; Freiberg e Zhu, 2004; Jia *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Muzzarelli, 2009; Raymond *et al.*, 2009) e apresenta atividade antimicrobiana e imunoestimulante (Agnihotri *et al.*, 2004; Muzzarelli, 2009), o que tem fomentado a sua aplicação em SLCs sob a forma de cápsulas, micropartículas, nanopartículas, filmes, fibras, géis, revestimentos para lipossomas, entre outros (Agnihotri *et al.*, 2004; Muzzarelli, 2009; Raymond *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2012).

À semelhança de outros polímeros naturais, tais como, gelatina, alginato e celulose, o quitosano pode ser processado sob a forma de hidrogéis (Oun *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2014). Os hidrogéis resultam da organização de polímeros naturais, sintéticos ou híbridos, em redes poliméricas tridimensionais mantidas por interações covalentes, não covalentes (físicas) ou por combinação de ambas (Buwalda *et al.*, 2014). A estrutura tridimensional é conseguida mediante a adição de agentes reticulantes que medeiam as interações que se estabelecem entre o polímero e que garantem a formação e manutenção da estrutura do hidrogel (Ruel-Gariepy *et al.*, 2000; Muzzarelli, 2009). Glutaraldeído, etilenoglicol, diisocianatos e genipin constituem alguns exemplos de reticulantes utilizados (Sinha *et al.*, 2004a; Muzzarelli, 2009).

Quando em contacto com a água, motivado pela elevada hidrofiliabilidade da rede matricial, estas estruturas absorvem quantidades significativas de água, sem que isso comprometa a sua integridade estrutural (Buwalda *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2014). A absorção de água confere-lhes maciez e elasticidade, o que potencia a sua investigação em engenharia de

tecidos, por exemplo, para substituição de cartilagem, pele e outros tecidos moles (Muzzarelli, 2009; Raymond *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2014; Samanta e Ray, 2014).

A utilização de quitosano sob a forma de hidrogel é particularmente apelativa devido às vantagens associadas a este polímero, contudo, a utilização de agentes reticulantes potencialmente tóxicos limita a sua aplicação (Buwalda *et al.*, 2014). Alternativamente, a reticulação química de quitosano com genipin, um polissacarídeo natural utilizado no presente trabalho, permite diminuir a citotoxicidade associada aos hidrogéis produzidos com recurso a agentes reticulantes sintéticos (Muzzarelli, 2009).

Recentemente têm sido desenvolvidos hidrogéis de quitosano termosensíveis, usando como reticulante o fosfato dissódico de glicerol. Este agente reticulante iónico, além de atuar como reticulante físico, atua como agente regulador do pH da solução de quitosano (Moura *et al.*, 2013), permitindo obter soluções de quitosano que apresentam uma transição sol-gel termosensível em condições fisiológicas (Jia *et al.*, 2006). De facto, à temperatura de 37 °C, motivado pela excecionalmente reduzida solubilidade do fosfato de glicerol a elevada temperatura, desencadeia-se o processo de geleificação da solução de quitosano que culmina num hidrogel passível de ser formado *in situ*. A taxa de geleificação depende do grau de desacetilação do quitosano, o que permite manipular o tempo necessário para que a formação do gel ocorra (Ruel-Gariepy *et al.*, 2000).

A principal vantagem da utilização de quitosano na forma de hidrogel prende-se com a sua utilização como veículo para o transporte de substâncias ativas até ao local de ação. Na forma de gel há uma maior disponibilidade dos grupos amina carregados positivamente, o que motiva a abertura das junções epiteliais anteriormente referidas. Assim a distribuição do fármaco no local de ação é melhorada, pelo que a utilização deste tipo de sistemas se revela uma mais-valia para o desenvolvimento de SLCs (Rodrigues *et al.*, 2012).

Recentemente, Moura *et al.*, em 2013, estudaram os efeitos da co-reticulação de hidrogéis de quitosano, isto é, utilizaram simultaneamente os dois mecanismos de reticulação: físico e químico, usando fosfato de glicerol e genipin, respetivamente, com o intuito de avaliar as repercussões dos mesmos na libertação de um fármaco modelo, a cisplatina. Os hidrogéis co-reticulados revelaram uma maior percentagem de libertação (60-70%) do que os apenas reticulados fisicamente (20%). Ainda que estes resultados sejam aparentemente contraditórios (maiores graus de reticulação deveriam originar maior aprisionamento de fármaco, logo menor libertação), os autores justificam este facto com a possibilidade das ligações covalentes, estabelecidas entre o genipin e o quitosano, diminuírem a interação que se estabelece entre o fármaco e o polímero. Desta forma, aquando dos ensaios de libertação, o fármaco tem maior facilidade em libertar-se da estrutura do hidrogel. O principal problema detetado é que tanto

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

num caso de hidrogéis fisicamente reticulados como nos co-reticulados, a libertação do fármaco é demasiado rápida.

No presente trabalho, e conforme referido, pretende-se incorporar micropartículas de PLA carregadas com cisplatina com o propósito de retardar os perfis de libertação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo inicia-se com a apresentação da estratégia adotada para a concretização dos objetivos enunciados, seguindo-se a apresentação dos fármacos e dos materiais utilizados. Por último, é feita uma descrição das metodologias utilizadas na preparação das microesferas e das técnicas selecionadas para a sua caracterização.

3.1 Estratégia Experimental

Conforme referido, pretende-se com este trabalho desenvolver sistemas de libertação controlada (SLCs) de base polimérica, com o objetivo de encapsular dois fármacos modelo, dexametasona e cisplatina. Para o encapsulamento dos fármacos serão produzidas micropartículas poliméricas com base no método de extração/evaporação do solvente (EES) numa emulsão óleo/água (O/W) e, posteriormente, proceder-se-á à caracterização das micropartículas, à análise da eficiência de encapsulamento e ao estudo da libertação dos fármacos.

Por último, inserido num projeto de doutoramento a decorrer em paralelo (Moura, 2014), as micropartículas carregadas com cisplatina serão incorporadas em hidrogéis de quitosano, cuja gelificação ocorre em condições fisiológicas de temperatura e pH. Os perfis de libertação obtidos para as micropartículas dispersas nos hidrogéis serão comparados com o perfil obtido apenas para as micropartículas.

A **Figura 3.1** esquematiza as várias etapas do trabalho experimental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

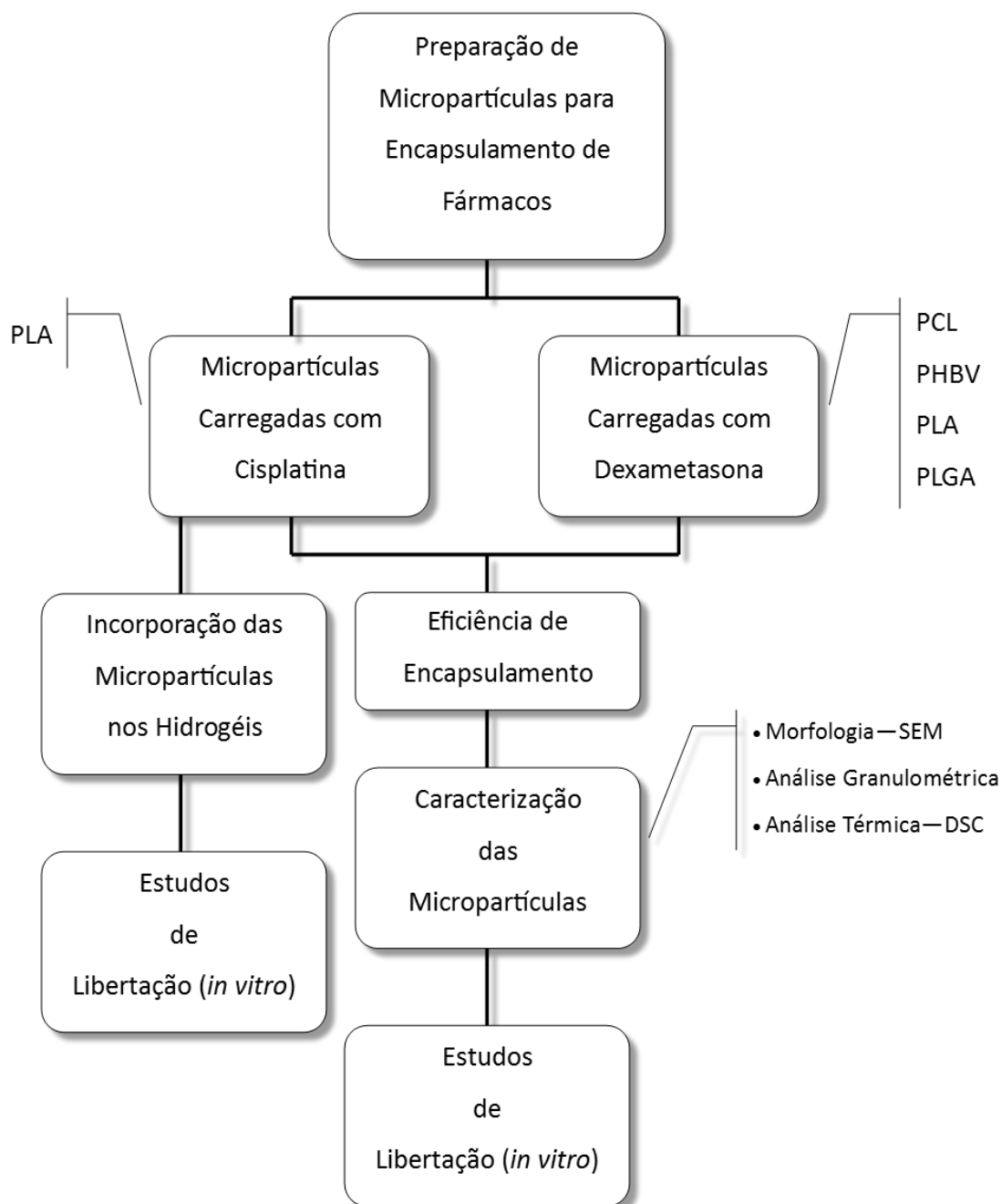


Figura 3.1 - Fluxograma das etapas do procedimento experimental.

Numa primeira etapa, preparar-se-ão micropartículas de PLA, recorrendo ao método de EES numa emulsão O/W, utilizando clorofórmio como solvente da fase orgânica e álcool polivinílico (PVA) como estabilizante da fase aquosa. Este método é recorrentemente utilizado para o encapsulamento de compostos ativos em nano e micropartículas poliméricas (Mundargi *et al.*, 2008; Lassalle e Ferreira, 2007; McGinity e O'Donnell, 1997). Esta etapa permitirá avaliar a viabilidade do método para a obtenção de micropartículas esféricas, bem como fixar o volume de solvente (clorofórmio) na fase orgânica e as velocidades de agitação durante as etapas de emulsão e evaporação do solvente. É de notar que as condições aplicadas foram

sustentadas por trabalho anterior, realizado por Coimbra *et al.*, em 2008, com o objetivo de estudara a preparação de micropartículas com base no método de EES numa emulsão O/W, levado a cabo com o intuito de avaliar as repercussões da concentração de polímero (PHBV) e de estabilizante (PVA) nas características das micropartículas.

Com base nos resultados obtidos, selecionaram-se as condições de preparação das micropartículas a partir dos vários polímeros em estudo.

Para o encapsulamento da dexametasona serão produzidas micropartículas de base polimérica, utilizando para tal quatro poliésteres biodegradáveis, PCL, PHBV, PLA e PLGA, sendo utilizada a seguinte notação para designar as micropartículas com fármaco encapsulado: PCL-DEX, PHBV-DEX, PLA-DEX e PLGA-DEX.

No caso da cisplatina apenas foram preparadas micropartículas de PLA, sendo utilizada a notação de PLA-CDDP, para designar as micropartículas carregadas com este fármaco.

Após a preparação das micropartículas com fármaco incorporado, avaliar-se-ão as respetivas eficiências de encapsulamento (EE). Os valores desta eficiência (dada pela razão entre a quantidade experimental e teórica de fármaco encapsulado) permitirão aferir em relação à quantidade de fármaco que efetivamente se conseguiu incorporar. De facto, este parâmetro traduz não só a eficácia de um determinado método para o encapsulamento de um composto bioativo, como o valor da quantidade experimental de fármaco encapsulado, relevante para a quantificação de fármaco libertado no decorrer dos ensaios de libertação.

As micropartículas obtidas serão primeiramente caracterizadas, recorrendo à microscopia eletrónica de varrimento (SEM), de modo a avaliar não só a morfologia das micropartículas, mas também com o intuito de tirar ilações em relação às características da sua superfície. A avaliação dos tamanhos e distribuição de tamanhos das partículas sintetizadas será feita recorrendo a uma técnica de dispersão laser. De salientar que o tamanho das micropartículas constitui um parâmetro importante no desenvolvimento de SLCs, uma vez que condiciona a taxa de degradação, área de superfície, quantidade de fármaco encapsulado nas partículas, taxa de libertação do fármaco e, em última instância, poderá limitar a sua aplicação por via parenteral.

Com o objetivo de analisar os efeitos do processamento na estrutura cristalina dos vários poliésteres utilizados e no modo como o fármaco se distribui nas micropartículas, submeter-se-ão as amostras de cada um dos polímeros puros, na forma de filmes obtidos por “*solvent casting*” e as micropartículas em estudo a calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

As micropartículas produzidas serão analisadas tendo em conta o seu potencial enquanto SLC e, para tal, levar-se-ão a cabo estudos de libertação *in vitro*, com o objetivo de avaliar a cinética de libertação dos fármacos em estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Por último, tal como anteriormente referido, as micropartículas carregadas com cisplatina serão dispersas em hidrogéis de quitosano fisicamente reticulados, com fosfato dissódico de glicerol (GP), e co-reticulados, com GP e diferentes concentrações de genipin (GE), cuja gelificação é desencadeada à temperatura de aproximadamente 37°C. À semelhança do procedimento intrínseco aos ensaios de libertação a partir das micropartículas, após promover a transição para o estado gel das soluções de quitosano, será avaliada a cinética de libertação a partir dos diferentes hidrogéis em estudo.

3.2 Fármacos

3.2.1 Dexametasona

A dexametasona (C₂₂H₂₉FO₅), cuja estrutura química se apresenta na **Figura 3.2**, é um fármaco pertencente à classe dos corticosteróides utilizado principalmente como anti-inflamatório e imunossupressor, atuando por diminuição da produção de enzimas responsáveis pela resposta inflamatória (Galeska *et al.*, 2005; Dawes *et al.*, 2012). É possível encontrar na literatura referências à sua utilização como antiemético (Tanihata *et al.*, 2004; Rigacci *et al.*, 2012;) e agente antineoplásico (Petrella *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2010), normalmente em associação com outros medicamentos.

A dexametasona apresenta-se sob a forma de um pó branco, cristalino, com peso molecular aproximadamente igual 392 g/mol e ponto de fusão entre 262°C e 264°C. (Wells, n.d.). É bastante solúvel em solventes orgânicos, tais como acetona, etanol e clorofórmio e pouco solúvel em água, onde apresenta uma solubilidade (25°C) de 10 mg/100 mL (Bolton *et al.*, 2008). A via parenteral, oral (comprimidos ou formas líquidas), solução ou suspensão para administração oftálmica (Bolton *et al.*, 2008) constituem as formas finais de dosagem (FFD) sob as quais este fármaco se encontra comercialmente disponível.

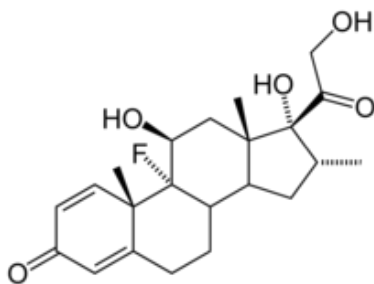


Figura 3.2 - Estrutura química da dexametasona.

A absorção máxima da dexametasona regista-se para um comprimento de onda de 242 nm (Devi *et al.*, 2013), o que permite o recurso a espectrofotometria UV/VIS para quantificação deste fármaco nos ensaios de libertação.

A atividade imunossupressora deste fármaco pode levar, especialmente quando elevadas doses são administradas, ao aparecimento de infeções devido à diminuição da capacidade de resposta do sistema imunitário.

No tratamento de doenças inflamatórias crónicas, que requerem a administração recorrente de elevadas doses de anti-inflamatórios, a utilização de SLCs poder-se-á revelar uma alternativa com repercussões significativas na melhoria de qualidade de vida dos pacientes (Coimbra *et al.*, 2012).

3.2.2 Cisplatina

A cisplatina ou *cis*-diaminodicloroplatina (II) (CDDP), $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$, **Figura 3.3**, é um dos fármacos mais recorrentes em tratamentos por quimioterapia e o primeiro complexo de platina, um metal pesado, a ser utilizado no tratamento tumoral (Desoize e Madoulet, 2002). Apesar do seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente estabelecido, estudos indicam que, uma vez no interior da célula, o fármaco estabelece ligação com o ADN formando aductos² (Wang *et al.*, 1999; Jordan e Carmo-Fonseca, 2000; Desoize e Madoulet, 2002; Cepeda *et al.*, 2007). A citotoxicidade da cisplatina está relacionada com a estabelecimento desta ligação e consequente introdução de defeitos na cadeia de ADN, resultando numa resposta por parte dos mecanismos de autocorreção das células que ativam a morte celular programada – apoptose (Fuertes *et al.*, 2003; Florea e Büsselberg, 2011). Estudos recentes reforçam esta hipótese, associando a ligação entre a cisplatina e o ADN, à produção do supressor tumoral p53, responsável por desencadear a apoptose celular (Jiang *et al.*, 2004; Cepeda *et al.*, 2007; Tsuruya *et al.*, 2008).

Tumores como o do testículo, ovários, bexiga, cabeça e pescoço, esófago, pulmão, mama, colo do útero, estômago, próstata, assim com linfoma Hodgkin e não-Hodgkin, neuroblastoma, sarcomas, mieloma múltiplo, melanoma e mesotelioma constituem alguns dos exemplos nos quais a cisplatina é utilizada em tratamentos de quimioterapia (Florea e Büsselberg, 2011).

A cisplatina apenas está disponível na forma injetável, sendo na maior parte das vezes administrada por via intravenosa (Cepeda *et al.*, 2007).

² Designação atribuída ao complexo resultante da ligação entre um composto químico (cisplatina) e uma molécula biológica (DNA).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No que concerne às características físico-químicas do fármaco, este apresenta-se sob a forma de um pó cristalino amarelo a alaranjado, com um peso molecular de aproximadamente 300 g/mol e uma temperatura de fusão de 270°C, sendo que se degrada a esta temperatura (NTP, 2011)

A cisplatina é bastante solúvel em dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO), solúvel em água, onde apresenta uma solubilidade (25°C) de 250 mg/100 mL (NTP, 2011) e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos comuns.

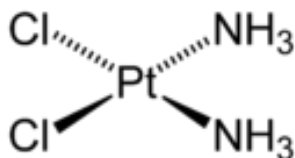


Figura 3.3 - Estrutura química da cisplatina.

Quando administrada por via intravenosa, a cisplatina liga-se às proteínas do plasma sanguíneo e dispersa-se rapidamente para os tecidos (Cepeda *et al.*, 2007). Além de diminuir a quantidade de fármaco que efetivamente atinge o alvo, esta dispersão é responsável por grande parte dos efeitos secundários associados a este fármaco, limitando a sua utilização no que respeita à frequência de administração e dosagem (Oun *et al.*, 2014). Dos vários efeitos secundários associados ao fármaco destacam-se náuseas, vômitos, decréscimo de células sanguíneas e de produção de plaquetas por parte da medula, assim como outros efeitos mais específicos como nefrotoxicidade, neurotoxicidade e perda auditiva (Florea e Büsselberg, 2011).

Estando estes efeitos secundários, na sua grande maioria, associados à utilização de fármacos à base de platina, extensivamente utilizados no tratamento tumoral, o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada parece ser uma boa alternativa à pesquisa de novos fármacos ou à alteração da farmacocinética dos já existentes (Oun *et al.*, 2014). Investigação no sentido de diminuir os efeitos da cisplatina, com recurso à libertação controlada a partir de matrizes poliméricas, tem sido levada a cabo nos últimos anos, sendo inúmeras as referências bibliográficas disponíveis (Fujiyama *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2002; Gonzalo *et al.*, 2013; Jayasuriya e Darr, 2013; Oun *et al.*, 2014).

3.3 Reagentes

Os reagentes utilizados no procedimento experimental, pesos moleculares, distribuidor e *Chemical Abstracts Service (CAS) number*, encontram-se apresentados na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1 - Lista de reagentes utilizados

<i>Reagente</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>Distribuidor</i>	<i>CAS</i>	<i>Informação Adicional</i>
<i>PVA</i>	9-10 KDa	Sigma-Aldrich®	9002-89-5	80% hidrolisado
<i>Clorofórmio</i>	119,38 g/mol	Fisher®	67-66-3	GPA*
<i>Acetonitrilo</i>	41,05 g/mol	Fisher®	67-66-3	GPA*
<i>Dimetilformamida</i>	73,09 g/mol	Fisher®	62-12-2	GPA*
<i>Fosfato Dissódico de Glicerol</i>	218,05 g/mol	Sigma-Aldrich®	55073-41-1	GPA*
<i>Genipin</i>	226,23 g/mol	Challenge Bioproducts Co.	6902-77-8	GPA*
<i>PLA</i>	120 KDa	Ingeo™ 2002D (NatureWorks®)	33135-50-1	-
<i>PLGA</i>	66-107 KDa	Sigma-Aldrich®	26780-50-7	L:G (75:25)
<i>PHBV</i>	Indeterminado	-	80181-31-3	19,8% HV
<i>PCL</i>	50 KDa	Capa™6500 (Perstorp UK)	24980-41-4	-
<i>Quitosano</i>	200 KDa	Sigma-Aldrich®	9012-76-4	Grau de desacetilação 87%
<i>Dexametasona</i>	392,45 g/mol	Alfa Aesar®	50-02-2	Pureza ≥ 98%
<i>Cisplatina</i>	300,05 g/mol	Sigma-Aldrich®	15663-27-1	Pureza ≥ 99,9%
<i>Tampão fosfato-salino</i>	-	Sigma-Aldrich®	-	pH 7,4

*GPA – Grau de Pureza Analítico

3.4 Preparação de Micropartículas

Como referido anteriormente, recorreu-se ao método de extração/evaporação do solvente (EES), numa emulsão óleo/água, para produzir as micropartículas e imobilizar os fármacos utilizados como modelo, dexametasona ou cisplatina, tal como se detalha de seguida. É de notar que, neste método, a imobilização do fármaco e síntese das micropartículas é efetuada em simultâneo, uma vez que, tanto o fármaco como o polímero são dissolvidos num solvente orgânico que posteriormente é adicionado a uma fase aquosa. A estabilização do sistema é conseguida devido à presença de PVA na fase aquosa e à vigorosa agitação, com o recurso a um homogeneizador, que garante a formação de gotículas de fase orgânica dispersa na fase aquosa. Durante a formação das micropartículas, consequência da progressiva evaporação do clorofórmio presente na fase orgânica, espera-se que o fármaco permaneça nesta fase, ficando aprisionado na estrutura polimérica que constitui as micropartículas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Micropartículas Carregadas com Dexametasona

Prepararam-se amostras de cada polímero dissolvendo 500 mg do mesmo em 10 mL de clorofórmio (5%, m/v). Após dissolução total do polímero, adicionaram-se 50 mg de dexametasona à solução de polímero, a qual foi deixada sob agitação, durante a noite, com o objetivo de efetivar a dissolução do fármaco.

Num homogeneizador (Kinematica, Polytron PT6000), adicionou-se, gota a gota, a mistura anterior, a 100 mL de uma solução aquosa de PVA (2,5%, m/v). A mistura foi efetuada com o equipamento regulado para 5000 rpm e mantida, após adição da totalidade da fase orgânica, durante 5 minutos. Finda esta etapa e com o objetivo de se conseguir uma completa evaporação do solvente, a mistura foi deixada na *hotte*, sob agitação mecânica (1200 rpm), a 30°C, por aproximadamente 4 horas.

Obteve-se então uma suspensão de partículas em meio aquoso, as quais foram recolhidas por centrifugação e lavadas com água destilada. A centrifugação foi levada a cabo numa centrifugadora da marca Hettich, modelo Rotofix 32A, a uma velocidade de 4000 rpm, durante 5 minutos. Com o objetivo de remover possíveis resíduos de PVA presentes nas amostras, foram efetuadas três lavagens, com água destilada, seguidas de centrifugação. O sobrenadante foi posteriormente removido, tendo as partículas sido deixadas a secar numa estufa a 50°C. Depois de secas, as partículas foram recolhidas e armazenadas em *eppendorfs* para posterior utilização nos ensaios de libertação e caracterização das partículas.

3.4.2 Micropartículas Carregadas com Cisplatina

Na produção das micropartículas para encapsular a cisplatina, utilizou-se apenas PLA (PLA-CDDP). Dada a baixa solubilidade da cisplatina em clorofórmio, foi necessário proceder à dissolução do fármaco em dimetilformamida (DMF) e, posteriormente, adicionou-se a solução de fármaco à solução de polímero em clorofórmio.

À semelhança do procedimento levado a cabo na síntese das micropartículas para encapsulamento de dexametasona, dissolveram-se 500 mg de PLA em 7,5 mL de clorofórmio e 25 mg de cisplatina em 2,5 mL de DMF, por forma obter uma solução com uma concentração de 1% (m/v). É de notar que apesar de se terem utilizado dois solventes, clorofórmio e DMF, o volume final (10 mL) é igual ao volume de fase orgânica utilizada na preparação de micropartículas para encapsulamento de dexametasona. Após junção das duas fases orgânicas, a mistura resultante foi adicionada, gota a gota, a 100 mL de uma solução aquosa de PVA (2,5%, m/v). A adição da fase orgânica à fase aquosa foi levada a cabo num homogeneizador

(Kinematica, Polytron PT6000), regulado para uma velocidade de 5000 rpm e mantida, após adição total da fase orgânica, durante 5 minutos.

A evaporação do solvente, recuperação, lavagem das partículas e secagem foram realizadas seguindo o procedimento descrito na secção anterior (**secção 3.4.1**).

Com o objetivo de assegurar uma massa de partículas suficiente para efetuar os ensaios de libertação a partir das micropartículas, bem como a sua caracterização e os ensaios de libertação a partir dos hidrogéis, efetuaram-se três ensaios segundo a metodologia até aqui apresentada. As micropartículas produzidas foram posteriormente misturadas por forma a diminuir a variabilidade associada a cada ensaio.

3.5 Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE)

Com o objetivo de aferir a Eficiência de Encapsulamento (EE) intrínseca a cada tipo de amostra produzida, procedeu-se ao cálculo da quantidade teórica e experimental de fármaco encapsulado, tal como apresentado nas **Equações 1 e 2** (Li e Ooi, 2012).

A quantidade teórica de fármaco encapsulado (QTFE) nas micropartículas foi calculada tendo em conta as massas de fármaco e polímero, utilizadas para a preparação das micropartículas, tal como descrito pela **Equação 1**, no pressuposto que nenhuma perda ocorre durante o processo de produção das micropartículas, isto é, presumindo que a estrutura polimérica aprisiona o fármaco na totalidade.

$$QTFE (\%) = \frac{\text{Massa de Fármaco}}{\text{Massa de Fármaco} + \text{Massa de Polímero}} \times 100 \quad (1)$$

Para determinar a quantidade de fármaco que efetivamente se conseguiu encapsular, dada pelo valor da Quantidade Experimental de Fármaco Encapsulado (QEFE), é necessário determinar experimentalmente o fármaco que efetivamente se conseguiu incorporar nas micropartículas. Para tal recorreu-se à **Equação 2**.

$$QEFE (\%) = \frac{\text{Massa de Fármaco Quantificada}}{\text{Massa de Partículas Carregadas}} \times 100 \quad (2)$$

A partir da razão entre estas duas quantidades, é possível calcular a eficiência de encapsulamento (EE, %), tal como se encontra expresso na **Equação 3**.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade Experimental de Fármaco Encapsulado}}{\text{Quantidade Teórica de Fármaco Encapsulado}} \times 100 \quad (3)$$

Para cada ensaio efetuaram-se três réplicas com o objetivo de avaliar a variabilidade dos resultados, mediante o cálculo dos desvios padrões para cada amostra. Para efeitos de cálculo, considerou-se o valor médio para cada amostra.

A determinação experimental da quantidade de fármaco presente nas partículas variou consoante o fármaco em causa, como se descreve de seguida.

3.5.1 Micropartículas Carregadas com Dexametasona

A quantidade de dexametasona encapsulada nas micropartículas foi determinada com recurso a espectrofotometria UV/VIS. Para tal foi necessário dissolver o polímero com o objetivo de promover a libertação do fármaco encapsulado, o qual se pretende quantificar. Assim, dissolveram-se cerca de 10 mg de cada amostra de micropartículas com fármaco encapsulado em 7 mL de acetonitrilo, de forma a promover a libertação do fármaco. Posteriormente adicionaram-se 3 mL de água destilada a cada amostra, as quais se submeteram a agitação vigorosa seguida de centrifugação, numa centrifugadora da marca Hettich, modelo Rotofix 32A. A forte agitação garante a extração do fármaco para a fase aquosa e a centrifugação permite separar a fase orgânica (acetonitrilo e polímero precipitado) da fase aquosa, possibilitando a remoção da segunda para posterior quantificação do fármaco dissolvido. No caso da PCL e do PHBV, a fase aquosa apresentava elevada turbidez, o que levou a equacionar a presença de polímero não precipitado. Assim, foi necessário proceder à filtração da mesma com recurso a filtros de seringa de 0,2 µm. A adição de água e extração do fármaco foi efetuada três vezes, para cada amostra, com o intuito de garantir a sua extração na totalidade.

O sobrenadante foi então diluído com uma mistura acetonitrilo/água (7:3, v/v) por forma a obter uma amostra cinco vezes mais diluída. Uma vez que se espera que a distribuição do fármaco nas micropartículas não seja uniforme, foram efetuadas três réplicas para cada tipo de micropartículas.

Preparadas as amostras de sobrenadante, a absorvância foi medida a 242 nm, pico máximo de absorção da dexametasona, num espectrofotómetro da JASCO, modelo V-550, utilizando para tal cuvetes de quartzo. Para determinar a concentração das amostras construiu-se a curva de calibração recorrendo a soluções padrão de dexametasona, na mistura de solventes, acetonitrilo/água (7:3), com concentrações entre 4 µg/mL e 20 µg/mL.

3.5.2 Micropartículas Carregadas com Cisplatina

Com o intuito de avaliar a quantidade de cisplatina presente nas microesferas, dissolveram-se 10-15 mg de micropartículas em clorofórmio, por forma a promover a dissolução do polímero. Posteriormente, adicionaram-se 5 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e submeteu-se a amostra a agitação vigorosa num vortex, com o intuito de extrair o fármaco para a fase aquosa (PBS). A amostra foi então centrifugada, numa centrifugadora da marca Hettich, modelo Rotofix 32A e o sobrenadante aquoso recolhido num *falcon* de 50 mL. À semelhança do procedimento intrínseco à quantificação da dexametasona, a adição de PBS e extração do fármaco foi repetida mais duas vezes, por forma a garantir a total extração do fármaco, obtendo-se no final um total de 15 mL de sobrenadante do qual foi retirada uma amostra de 500 µL para posterior quantificação da cisplatina presente.

Tendo em conta a variabilidade esperada para diferentes amostras de micropartículas, realizaram-se três réplicas do procedimento anteriormente descrito, sendo utilizado o valor médio, para efeitos de cálculo.

A determinação da concentração de cisplatina nas amostras, através da identificação da platina associada à molécula do fármaco, foi feita com recurso a espectrometria de massa com fonte indutiva de plasma (ICP-MS), recorrendo a um espectrofotómetro X Series ICP-MS com nebulizador Burgener (1 mL/min) e cones de níquel, segundo um método interno baseado na norma ISO 17294 (ISO 17294-1 2004), sendo a calibração efetuada com uma solução padrão 10 ppm (IV-ICPMS-71C). O método apresentado quantifica a platina presente em cada amostra, sendo esta posteriormente convertida em massa de CDDP, com base nos pesos moleculares do fármaco, da platina e na estrutura molecular do fármaco.

3.6 Caracterização das Micropartículas

Tendo em vista a avaliação da morfologia das partículas, distribuição de tamanhos das mesmas, estado do fármaco (cristalino ou amorfo) na matriz polimérica e repercussão do processamento sobre a estrutura dos polímeros utilizados, procedeu-se à caracterização das micropartículas recorrendo para tal às técnicas seguidamente apresentadas.

3.6.1 Microscopia Eletrónica de Varrimento – SEM

A visualização das partículas com recurso a microscopia eletrónica de varrimento (SEM), permite desde logo ter uma ideia da sua forma, tamanho e topografia. Para tal espalharam-se as várias amostras de micropartículas numa fita adesiva de grafite, colocada

3. MATERIAIS E MÉTODOS

sobre o suporte metálico do microscópio eletrônico. Tratando-se de partículas poliméricas, logo não condutoras, foi necessário proceder ao seu revestimento com uma camada de ouro. As observações foram realizadas num microscópio eletrônico de varrimento JSM-5310 (JEOL).

3.6.2 Determinação da Distribuição de Tamanhos

A distribuição de tamanhos das partículas foi analisada com recurso a uma técnica de Dispersão Laser, mais concretamente de dispersão estática (*Static Light Scattering*), na qual estão incluídas as técnicas de difração laser (*Laser Diffraction Spectrometry - LDS*), particularmente indicadas para a medição de partículas cujo tamanho seja superior a 1µm (Allen, 1996).

Estas técnicas consistem basicamente na interação das micropartículas com um feixe de luz monocromático (laser), que será difratado segundo ângulos que dependem do tamanho das mesmas. O conjunto da luz difratada pelas partículas dá origem ao que se designa por “padrão de dispersão” (ou difração) o qual é focado num alvo, constituído por fotodíodos, durante um certo intervalo de tempo. Este padrão de luz difratada pelas partículas é, assim, uma sobreposição do padrão individual de cada uma, constituindo uma distribuição espacial de luz no detetor. Esta distribuição luminosa é posteriormente convertida numa distribuição de tamanhos com base num modelo teórico integrado no *software* do equipamento (Allen, 1996).

Para a realização da análise da distribuição de tamanhos das partículas, dispersaram-se as amostras em meio líquido (água), sendo a análise levada a cabo num equipamento Malvern 2000.

3.6.3 Análise Térmica – Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

Calorimetria diferencial de varrimento (DSC –*Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica de análise térmica segundo a qual uma amostra e uma referência, são aquecidas ou arrefecidas, num ambiente controlado, sendo o fluxo de calor registado com o intuito de avaliar os eventos térmicos característicos do material em análise (fusão, cristalização e transição vítrea) (Gu e Burgess, 2014; Gunaratne e Shanks, 2005; Wang *et al.*, 2000; Vilar *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013)

Os métodos de preparação de micropartículas a partir de polímeros podem ter efeitos sob a organização das cadeias poliméricas, o que resulta na alteração das propriedades termodinâmicas dos materiais (Dubernet, 1995). O recurso a análise DSC permite verificar quais as repercussões do processamento sobre a estrutura do polímero, mediante a análise dos termogramas obtidos para o polímero puro (não processado) e processado. Além do mais, esta

técnica permite investigar a cristalinidade dos polímeros utilizados na preparação das micropartículas (Galeska *et al.*, 2005; Freiberg e Zhu, 2004).

A natureza da dispersão do fármaco nas micropartículas influencia a estabilidade do fármaco durante o envelhecimento e também as suas características de libertação, pelo que a sua identificação é essencial. No desenvolvimento de SLCs, recorre-se frequentemente a análise térmica com o intuito de avaliar o tipo de interação que se estabelece entre o fármaco e o polímero, identificável mediante o confronto entre os eventos térmicos apresentados pelo fármaco e polímero, considerados de forma isolada, e após síntese sob a forma de micropartículas. Desta forma é possível avaliar a miscibilidade e compatibilidade entre o fármaco e o polímero utilizado na síntese do sistema transportador (Silva-Junior *et al.*, 2008; Bragagni *et al.*, 2013; Gu e Burgess, 2014).

Numa primeira análise, serão avaliadas amostras de cada um dos polímeros puros (PCL, PHBV, PLA e PLGA), de filmes obtidos por “*solvent casting*”, após dissolução de cada um dos polímeros e fármaco em clorofórmio, e das micropartículas em estudo. Esta metodologia permite avaliar os efeitos do processamento na estrutura cristalina dos vários polímeros, mediante a comparação entre os eventos térmicos presentes nos termogramas obtidos para cada caso.

No que respeita aos fármacos, apenas se analisará a dexametasona pura e após dissolução em clorofórmio. A dissolução de dexametasona em clorofórmio e posterior recristalização da mesma permite avaliar os efeitos do solvente sobre a estrutura cristalina do fármaco. Em relação ao outro fármaco utilizado, cisplatina, uma vez que a sua temperatura de fusão é superior à temperatura de degradação do PLA (utilizado na preparação das micropartículas para encapsulamento deste fármaco), a análise de DSC efetuada às micropartículas de PLA carregadas com cisplatina não permitiria tirar quaisquer conclusões em relação à distribuição deste fármaco nas micropartículas. Posto isto, a cisplatina pura não foi submetida a análise térmica, uma vez que o pico de fusão característico deste fármaco cristalino não seria identificável no termograma relativo às micropartículas de PLA para encapsulamento de cisplatina.

Para levar a cabo as análises DSC, colocaram-se as amostras, com massas entre 2 e 4 mg, em cadinhos de alumínio adequados para o efeito, que foram hermeticamente selados. Num calorímetro *Q100* da *TA Instruments*, as amostras foram aquecidas a uma taxa constante (*linear temperature-time change*) (Gu e Burgess, 2014) de 10°C/min, desde 0 até 280°C. Os termogramas foram analisados com recurso ao *software TA Universal analysis V4.2E TA*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.7 Estudos de Liberação (*in vitro*)

Por forma a determinar o perfil de liberação do fármaco foram realizados testes *in vitro*, com as micropartículas produzidas, em meio fisiológico simulado, constituído por uma solução tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,4). As amostras foram colocadas em tubos *falcon* de 50 mL e deixadas sob agitação orbital tendo-se efetuado recolhas a vários tempos para posterior quantificação do fármaco libertado, como se refere de seguida.

3.7.1 Liberação de Dexametasona

Para efetuar os ensaios de liberação de dexametasona a partir das micropartículas, colocaram-se 30 mg de cada amostra em *falcons* e posteriormente adicionaram-se 20 mL de PBS às micropartículas. As amostras foram colocadas num *thermo shaker* da Gerhardt, com agitação orbital (100 rpm), a 37°C. O mesmo procedimento foi adotado para os diferentes tipos de micropartículas testadas.

Em tempos definidos efetuou-se a remoção total do meio de liberação, seguida de introdução de meio de liberação fresco (20 mL de PBS). Para a colheita do meio submeteram-se as amostras a centrifugação (Hettich, modelo Rotofix 32A), a uma velocidade de 4000 rpm, durante 3 minutos. O sobrenadante foi então removido na totalidade e parcialmente armazenado para quantificação do fármaco libertado.

A quantidade de dexametasona presente nas amostras foi, conforme referido anteriormente, avaliada através de espectrofotometria UV/VIS, num espectrofotómetro da JASCO, modelo V-550, regulado para um comprimento de onda de 242 nm, correspondente ao comprimento de onda para o qual a absorção da dexametasona é máxima.

A curva de calibração foi preparada medindo a absorvância, para um comprimento de onda de 242 nm, de soluções padrão de dexametasona em PBS, com concentrações entre 4 e 20 µg/mL.

Por questões técnicas, decorridos sete dias de liberação, foi necessário prosseguir com os ensaios utilizando outro espectrofotómetro (JASCO, modelo V-530). A respetiva curva de calibração foi elaborada segundo o procedimento anteriormente descrito.

3.7.2 Liberação de Cisplatina

No que respeita aos ensaios de liberação de cisplatina encapsulada em micropartículas de PLA, seguiu-se uma metodologia idêntica à acima descrita para a dexametasona, com uma exceção: perante a elevada solubilidade da cisplatina em água, foi necessário selecionar uma massa de micropartículas para que, mesmo perante a liberação total do fármaco encapsulado,

não se verificasse a sobressaturação do meio de libertação. Esta abordagem permite levar a cabo os ensaios de libertação sem a necessidade de substituir o meio na totalidade, uma vez que se assegurou que, em nenhuma circunstância, se atingiria o estado de sobressaturação.

A libertação de cisplatina foi levada a cabo colocando 50 mg de micropartículas em 20 mL de PBS, sendo a suspensão colocada num *thermo shaker*, com agitação orbital de 100 rpm, regulado para uma temperatura de 37°C. Estas condições foram mantidas ao longo de todo o período de libertação.

A recolha das amostras do meio, para quantificação da cisplatina libertada, foi efetuada retirando 500 µL de sobrenadante, após submeter as amostras a centrifugação (Hettich, modelo Rotofix 32A), a uma velocidade de 4000 rpm, durante 3 minutos. As amostras foram armazenadas a baixa temperatura para posterior quantificação do fármaco. Um volume equivalente ao de amostra foi então repostado sob a forma de meio de libertação fresco (500 µL de PBS).

A quantificação da platina presente em cada amostra e posterior conversão para quantidade de cisplatina libertada, foi feita com recurso a espetrometria de massa com fonte indutiva de plasma (ICP-MS), tal como descrito na **secção 3.5.2**.

3.8 Preparação de Hidrogéis de Quitosano

Parte das micropartículas de PLA onde foi encapsulada a cisplatina foram incorporadas em hidrogéis de quitosano, com os quais foram realizados ensaios de libertação por um período de 21 dias. Como referido anteriormente, este estudo foi levado a cabo com o objetivo de complementar um outro trabalho, mais abrangente (Moura, 2014) cujo objetivo foi testar vários mecanismos de incorporação de cisplatina em hidrogéis de quitosano, designadamente recorrendo a lipossomas e micropartículas

As micropartículas foram incorporadas em hidrogéis de quitosano com diferentes tipos de reticulação: reticulado fisicamente, utilizando o fosfato dissódico de glicerol (GP) (PLA-CDDP/C/GP) como agente reticulante (iónico) e co-reticulados, isto é, resultantes da conjugação de um mecanismo de reticulação físico (GP), e de reticulação químico, utilizando genipin (GE). Foram preparados dois hidrogéis co-reticulados com uma concentração de 0,05% e 0,20% de genipin, em massa (PLA-CDDP/C/GP/GE5 e PLA-CDDP/C/GP/GE20, respetivamente).

Estes hidrogéis foram preparados a partir de uma solução de quitosano, obtida dissolvendo 2,0 g de polímero numa solução aquosa de ácido acético (0,5%, v/v), a qual se manteve sob agitação magnética, à temperatura ambiente, até dissolução completa do polímero.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Com o intuito de garantir a remoção de qualquer material insolúvel, a solução foi posteriormente filtrada e em seguida o pH foi medido, tendo-se registado o valor de 5,5.

Os hidrogéis de quitosano reticulados fisicamente com GP foram preparados dissolvendo, em água destilada, 5% GP (em massa) adicionando-se posteriormente, gota a gota, esta solução, à solução de polímero anteriormente preparada. Obteve-se no final uma solução de quitosano com concentração 1,5 g em 100 mL com pH 7,4. É de notar que a adição de GP à solução de quitosano permite elevar o pH de 5,5 para o valor de 7,4 (pH fisiológico). Assim, o GP possui a dupla vantagem de neutralizar a solução de quitosano, permitindo a sua utilização em meio fisiológico, bem como de permitir que esta forme um hidrogel, quando aquecida a 37 °C, graças a um conjunto de interações entre o sal e o polímero que levam à formação de uma rede tridimensional (Moura *et al.*, 2007).

Na preparação dos hidrogéis que conjugam os mecanismos de reticulação física e química, adicionou-se o GE (reticulante químico), em pó, a uma solução de polímero previamente neutralizada com GP, preparada tal como descrito anteriormente. A quantidade de GE adicionada a cada hidrogel foi calculada com o objetivo de obter misturas com concentrações de 0,05% e 0,20% (em massa).

Tal como mencionado para o caso da solução de polímero com GP, quando aquecida a 37 °C, esta solução origina um hidrogel físico-quimicamente reticulado, ou seja, co-reticulado.

Em ambos os casos as micropartículas de PLA carregadas com CDDP foram dispersas nas soluções poliméricas numa concentração de 3,8% (em massa).

Para levar a cabo os ensaios de libertação, as suspensões de micropartículas em quitosano foram submetidas a um tempo de maturação de 2 horas sob uma temperatura de 37°C, por forma a obter matrizes gelificadas.

3.8.1 Libertação de Cisplatina a Partir dos Hidrogéis de Quitosano

À semelhança do procedimento levado a cabo para o caso das micropartículas, os hidrogéis, sob a forma de provetes cilíndricos com aproximadamente 1,3 g, foram colocados em 20 mL de PBS (pH 7,4) e mantidos, no decorrer dos ensaios de libertação, a 37°C sob agitação orbital.

Em intervalos de tempo definidos, retiraram-se amostras de 500 µL que foram armazenadas em *ependorfs*, a baixa temperatura, para posterior quantificação do fármaco. A remoção de cada amostra foi sucedida da reposição de igual volume de meio de libertação fresco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A quantificação da platina presente em cada amostra e posterior conversão para quantidade de cisplatina libertada, foi feita com recurso a espetrometria de massa com fonte indutiva de plasma (ICP-MS), tal como descrito na **secção 3.5.2**.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização e nos ensaios de liberação das micropartículas produzidas com vários tipos de polímeros para encapsulamento dos fármacos dexametasona e cisplatina, de acordo com os procedimentos detalhados no **Capítulo 3**. A sequência de resultados será a mesma seguida nesse capítulo. Assim, apresentam-se as micrografias de SEM, que permitem avaliar a morfologia das micropartículas obtidas bem como as suas características de superfície, seguindo-se os resultados de granulometria, os termogramas e as eficiências de encapsulamento. Por último, apresentam-se os perfis de liberação avaliados *in vitro*. Finalmente, e cumprindo um objetivo complementar do trabalho, os perfis de liberação das microsferas com cisplatina, após incorporação em hidrogéis de quitosano, serão comparados com os obtidos a partir das microsferas livres.

Os resultados serão divididos em três secções: os que correspondem às micropartículas onde foi encapsulada a dexametasona, os que se referem às micropartículas com cisplatina e os que incluem os hidrogéis.

4.1 Micropartículas para Encapsulamento de Dexametasona

Tal como descrito no **Capítulo 3**, a dexametasona foi incorporada em micropartículas produzidas a partir de PCL, PHBV, PLA e PLGA, as quais foram posteriormente caracterizadas.

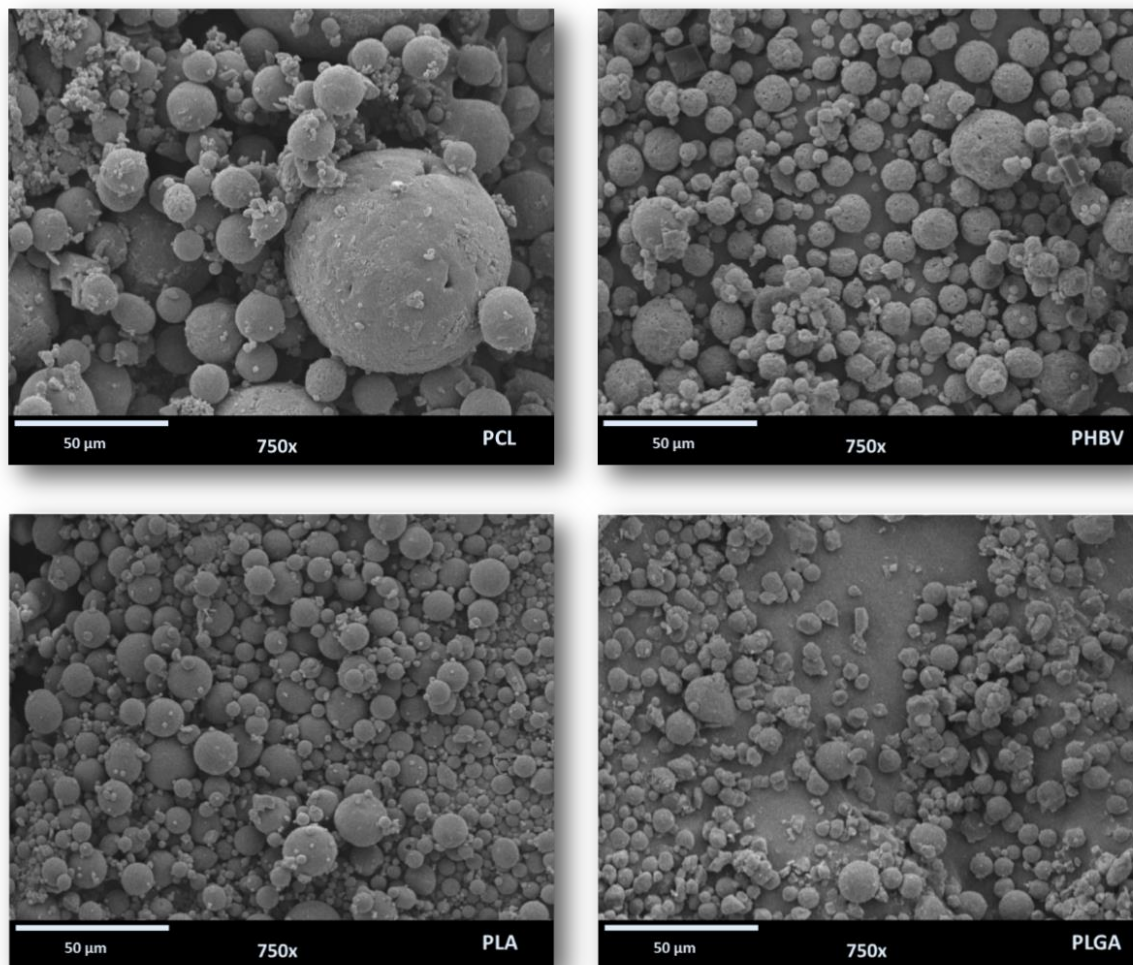
4.1.1 Análise Morfológica - SEM

O recurso a SEM teve por objetivo avaliar a morfologia das micropartículas, bem como a variabilidade associada ao seu tamanho e características da superfície. Tal como ilustra a **Figura 4.1**, e apesar de mantidas as condições de processamento das micropartículas, obtiveram-se partículas com diferentes características consoante o polímero utilizado. Isto verificou-se quer ao nível do tamanho das partículas quer em relação às características de superfície das mesmas. Apesar disso, e tal como se pretendia, a forma das partículas é predominantemente esférica.

No que respeita ao tamanho, e com base na análise da **Figura 4.1**, constata-se que as partículas de PCL parecem ser as que têm um maior tamanho, sendo que as de PLGA aparentam possuir as menores dimensões.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É no entanto de salientar que em todas as amostras se observam pequenas partículas, algumas bastante afastadas da esfericidade, com particular destaque para a amostra de PLGA, que evidencia uma grande dispersão de tamanhos. Após a secagem, verificou-se que as micropartículas de PLGA se encontravam agregadas, sendo necessário proceder à sua separação forçada. Para tal, utilizou-se um almofariz para separar os agregados resultantes após o processo de secagem, o que poderá ter originado o aparecimento de estruturas com uma forma e tamanho visivelmente diferente.



Uma maior ampliação (**Figura 4.2**), permite no entanto observar que todas as amostras apresentavam, misturadas com as micropartículas, estruturas de tamanhos semelhantes a estas,

Figura 4.1 - Micropartículas com dexametasona, produzidas a partir de PCL, PHBV, PLA e PLGA.

mas com uma forma distinta, que aparentam ser cristais de fármaco. Estes haviam já sido detetados em observações preliminares com microscopia ótica (resultados não apresentados). O aparecimento de cristais de fármaco nas amostras deve-se ao facto da dexametasona se encontrar apenas parcialmente solubilizada, aquando da formação das micropartículas. Com

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

feito, apesar da dexametasona ter permanecido 24 horas sob agitação, em clorofórmio, verificou-se, findo este período, que o fármaco se encontrava parcialmente em suspensão. Devido à reduzida solubilidade da dexametasona em água, estes cristais de fármaco não se dissolveram na fase aquosa da emulsão nem durante os processos de lavagem, tendo portanto sido separados em conjunto com as micropartículas.

No que respeita às características da superfície das micropartículas, constata-se que as micropartículas com PLA, PLGA e PCL têm uma superfície lisa enquanto as de PHBV exibem

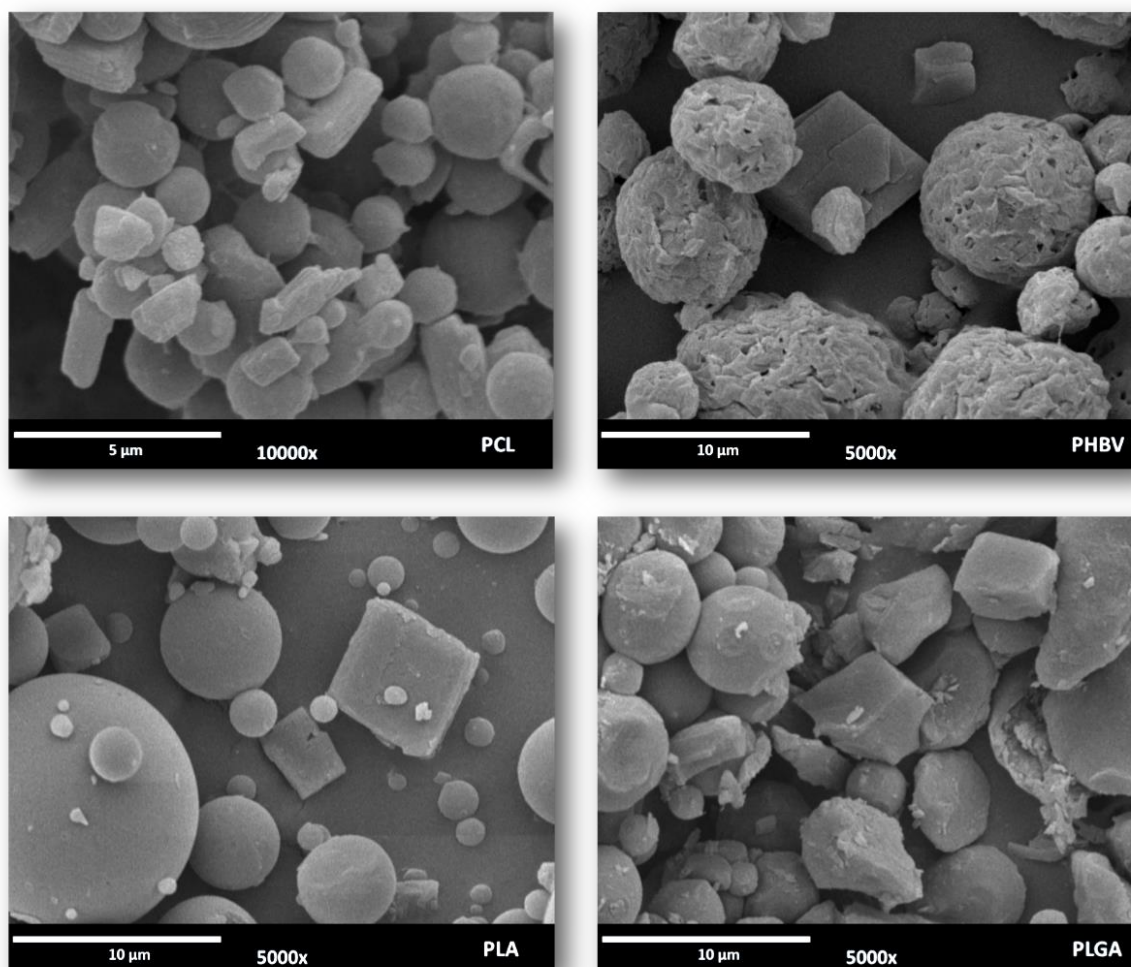


Figura 4.2 - Cristais de fármaco (formas cúbicas e prismáticas), presentes nas amostras das micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.

elevada rugosidade. Segundo (Li e Poncelet, 2008; Duan e Wang, 2010), isto deve-se ao elevado grau de cristalinidade do polímero. Micropartículas produzidas a partir de polímeros mais cristalinos apresentam superfícies mais rugosas, com maior área de superfície, sendo que, à medida que aumenta a percentagem da fase amorfa no polímero, se verifica uma diminuição da rugosidade da superfície das micropartículas. Efetivamente o PHBV é um polímero com elevado grau de cristalinidade, o que justifica que as micropartículas obtidas a partir deste polímero apresentem uma elevada rugosidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma ampliação superior, apresentada na **Figura 4.3**, permite analisar detalhadamente a superfície das micropartículas obtidas a partir dos quatro polímeros em estudo. A significativa rugosidade da superfície das micropartículas de PHBV (**Figura 4.3 - PHBV**) é particularmente visível na imagem apresentada, o que permite confirmar a observação feita aquando da análise da micrografia obtida com menor ampliação.

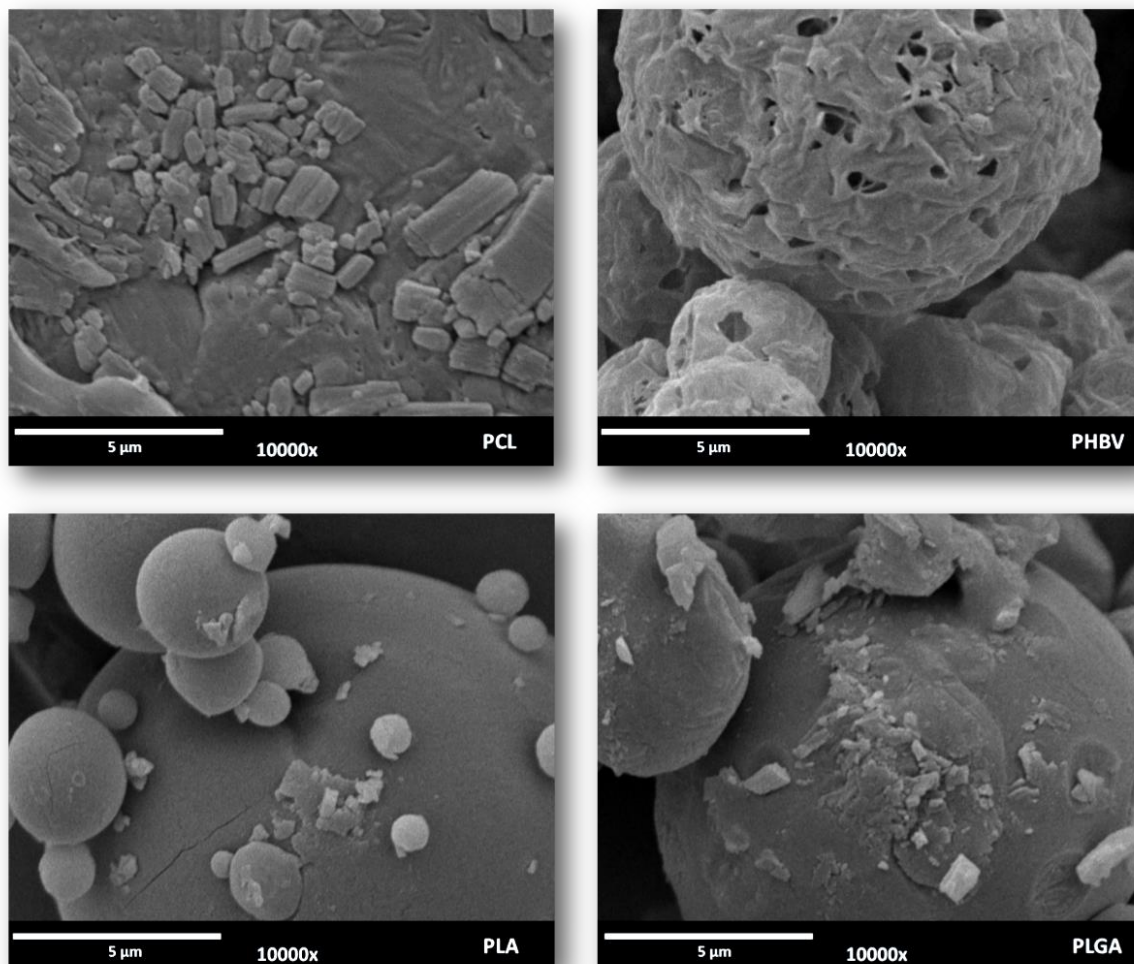


Figura 4.3 - Pormenor da superfície das micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.

Por outro lado, na superfície das micropartículas de PCL e PLGA (**Figura 4.3 – PCL e Figura 4.3-PLGA**), é possível observar pequenos cristais de fármaco que se encontram “incrustados” na superfície polimérica. Pelo contrário, na superfície das micropartículas de PLA e PHBV não se observam estas estruturas. Assim, põe-se em causa que nas amostras de PCL e PLGA se tenha conseguido uma adequada incorporação de fármaco. Este assunto será abordado com maior detalhe aquando da análise dos resultados obtidos para as eficiências de encapsulamento.

4.1.2 Distribuição de Tamanhos das Micropartículas

Como se sabe, o tamanho das partículas bem como a distribuição de tamanhos das várias amostras, influenciam significativamente muitas das propriedades das partículas, designadamente a cinética de libertação do fármaco (Freiberg e Zhu, 2004), sendo portanto da maior relevância proceder à análise da sua granulometria. Estes resultados estão compilados na **Figura 4.4** na forma de curvas de distribuição de tamanhos e na **Tabela 4.1** em termos dos parâmetros estatísticos (mediana (Dv_{50}), percentis (Dv_{10} e Dv_{90}), diâmetro médio ($D[4,3]$) e moda).

Os valores da mediana, apresentados na **Tabela 4.1**, permitem-nos concluir que para o caso das amostras produzidas a partir de PCL e de PLGA se obtiveram partículas de maiores dimensões, dado que estas apresentam valores de Dv_{50} acima de 20 μm , enquanto que, para o caso das micropartículas produzidas a partir de PLA e PHBV, os valores para o mesmo percentil não atingiram os 10 μm . O mesmo é possível verificar ao analisar os valores da moda para cada amostra (**Tabela 4.1**). O diâmetro médio em termos volumétricos ($D[4,3]$), que traduz o tamanho médio das partículas que constituem a amostra, apresenta a mesma tendência. Isto é, as amostras de PLA e PHBV apresentam tamanhos médios próximos de 9 μm , enquanto que as micropartículas produzidas a partir de PCL e PLGA têm dimensões médias próximas de 25 μm .

Os resultados obtidos para o quociente $[(Dv_{90}-Dv_{10})/Dv_{50}]$, que dá uma ideia da largura da distribuição, variam entre 1,5 e 2,5, o que permite constatar que nalguns casos as distribuições são mais alargadas que noutros. Estes resultados são característicos do método de EES. À medida que ocorre a evaporação do solvente, verifica-se uma diminuição do diâmetro das gotículas que constituem a fase dispersa da emulsão, o que introduz instabilidade no sistema. Como consequência, ocorre a coalescência de algumas destas gotículas da fase orgânica que contém o polímero e formam-se partículas com dimensões superiores (Pich *et al.*, 2006).

Tabela 4.1 - Resultados obtidos para os parâmetros estatísticos das distribuições de tamanhos de partículas.

<i>Amostra</i>	<i>Dv10</i> [μm]	<i>Dv50</i> [μm]	<i>Dv90</i> [μm]	$\frac{D_{v90} - D_{v10}}{D_{v50}}$	<i>D[4,3]</i> [μm]	<i>Moda</i> [μm]
PCL	2,43	21,60	55,30	2,45	25,80	27,40
PHBV	2,30	7,93	18,70	2,07	9,86	9,86
PLA	1,76	9,66	16,60	1,54	9,41	11,20
PLGA	4,28	20,80	50,30	2,21	24,50	35,30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a distribuição de tamanhos das partículas sustentam as observações feitas aquando da análise das micrografias de SEM, à exceção dos resultados obtidos para as micropartículas de PLGA. Efetivamente a imagens de SEM obtida para a amostra de PLGA (**Figura 4.1 - PLGA**) sugeria que as partículas produzidas a partir deste polímero apresentavam um tamanho reduzido, semelhante às amostras de PHBV e PLA. No entanto, os resultados de granulometria revelam que as micropartículas de PLGA apresentam dimensões superiores, aproximando-se das dimensões apresentadas pelas micropartículas de PCL.

As explicações que poderão justificar esta aparente contradição nos resultados de SEM e dispersão laser são: como referido anteriormente, o facto das micropartículas de PLGA apresentarem aglomerados apesar da separação mecânica a que foram sujeitas; ou o facto da amostra utilizada na análise SEM poder ter sido retirada da superfície, dado que foi a primeira análise a ser efetuada, e a amostra utilizada na análise da distribuição de tamanhos ter sido retirada do fundo, por ter sido a última (por outras palavras uma inadequada dispersão da amostra).

No que respeita à análise do perfil obtido para a distribuição de tamanhos, constata-se que a curva correspondente às micropartículas de PHBV é a mais próxima de uma distribuição normal (**Figura 4.4 - PHBV**). No caso das micropartículas de PLA e PLGA a distribuição de tamanhos é aproximadamente bimodal, apresentando um pico relativo a partículas de dimensões próximas de 1 μm e um segundo pico mais significativo de partículas de maiores dimensões. É de notar que, dado que não se possuíam as propriedades óticas das partículas, recorreu-se a uma aproximação baseada no modelo de Fraunhofer, cuja aplicabilidade é questionável para partículas de menor dimensão (Annappagada e Adjei, 1996).

A largura das curvas de distribuição das micropartículas estão, obviamente, em concordância com os valores do quociente $[(Dv90-Dv10)/Dv50]$.

No **Anexo I** são apresentadas as tabelas com as percentagens volumétricas de partículas de cada tamanho que deram origem às distribuições de tamanhos apresentadas.

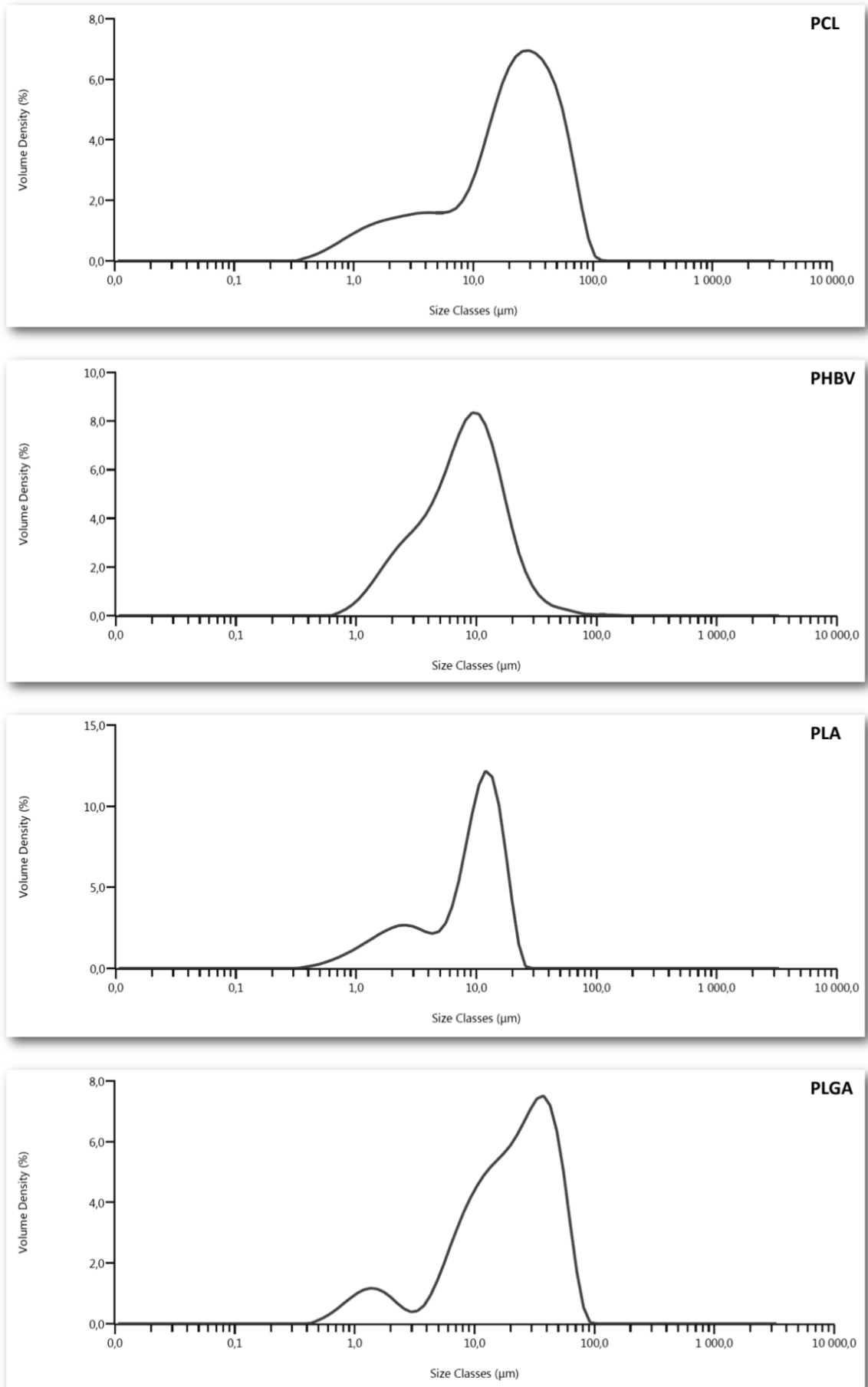


Figura 4.4 - Distribuição de tamanhos das micropartículas para encapsulamento de dexametasona.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.3 Análise Térmica - DSC

Como referido na **secção 3.6.3**, efetuou-se análise térmica com o intuito de avaliar as repercussões do processamento sobre os eventos térmicos característicos do polímero e do fármaco, bem como de tirar ilações sobre o estado do fármaco nas micropartículas. Assim, adquiriram-se os termogramas correspondentes ao polímero não processado, às micropartículas com fármaco e a filmes de polímero com fármaco obtidos por *solvent casting*. Adicionalmente foi também obtido o termograma correspondente à dexametasona.

As análises de DSC permitiram aferir a temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros bem como as temperaturas de fusão dos polímeros e do fármaco (dexametasona). Contrapondo os vários resultados obtidos espera-se poder tirar conclusões relativamente à distribuição do fármaco nas micropartículas bem como em relação à influência do método de preparação das micropartículas sobre as propriedades térmicas dos polímeros.

Como se sabe, a temperatura de transição vítrea (T_g) corresponde à temperatura na qual se dá a transição das regiões amorfas do polímero, do estado vítreo para o estado de borracha. Como tal a sua representação nos termogramas corresponde à transição da fração amorfa do polímero. O facto dos materiais poliméricos apresentarem diferentes percentagens de fase amorfa, podendo esta ser menor que 5% no caso de polímeros com elevado grau de cristalinidade, repercute-se numa fraca representação no termograma, muitas vezes difícil de distinguir de variações intrínsecas ao funcionamento do método (Ford e Mann, 2012).

Na **Figura 4.5** é possível observar os termogramas obtidos para a dexametasona por DSC. Tal como apresentado na **secção 3.6.3**, analisou-se o fármaco puro (DEX original), isto é, sem qualquer alteração relativamente ao proveniente do fornecedor e recristianizado após ter sido dissolvido no solvente utilizado na preparação das micropartículas (clorofórmio) (DEX processada). Desta forma pretende-se avaliar as repercussões do solvente sobre estrutura cristalina do fármaco, mediante a análise das variações no termograma.

O pico endotérmico significativo, caraterístico dos fármacos cristalinos, situado a 266°C, diz respeito à fusão da dexametasona. A análise efetuada para verificar as repercussões das condições de processamento, isto é, após a dissolução da dexametasona em clorofórmio e posterior recristalização, revelam que o ponto de fusão do fármaco apresenta uma diminuição ligeiramente superior a 5°C, diminuindo também a entalpia de fusão associada ao evento. A alteração da morfologia do pico sugere pois que a dissolução do fármaco em clorofórmio tenha tido repercussões sobre a sua estrutura cristalina.

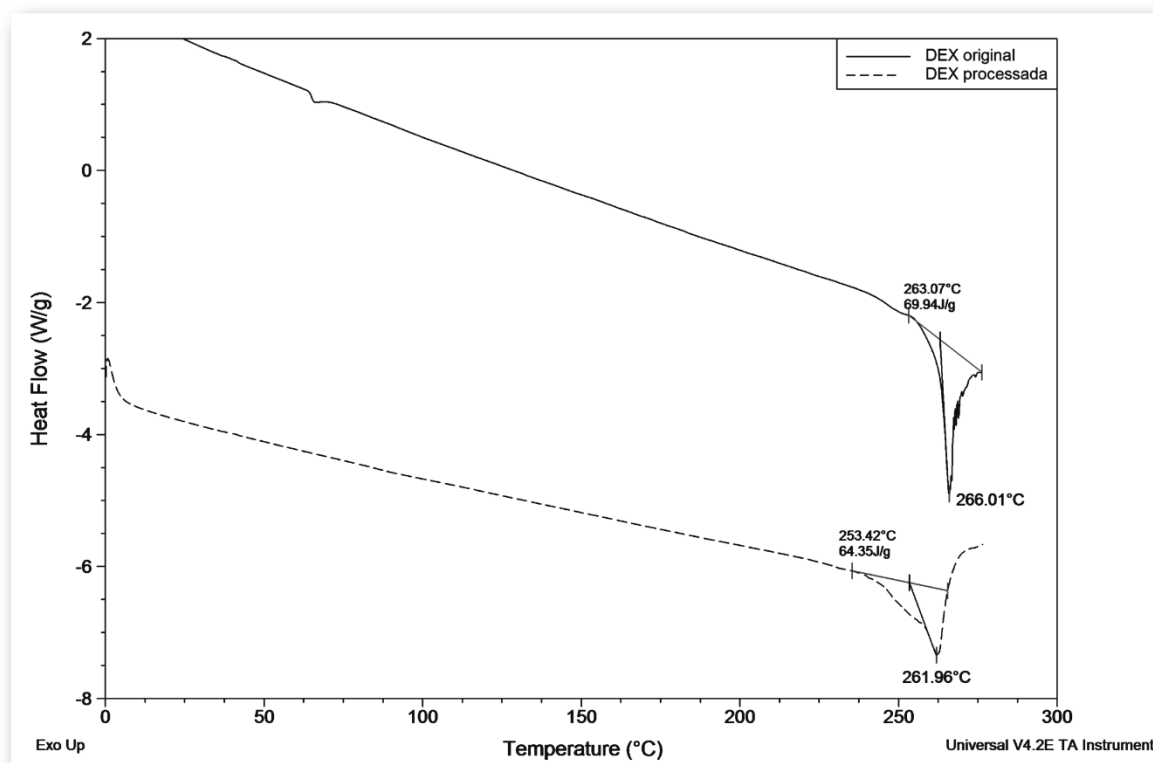


Figura 4.5 - Termogramas obtidos para a dexametasona original (DEX original) e processada (DEX processada).

Nos termogramas obtidos para a PCL (polímero não processado, micropartículas de PCL com fármaco e filme de PCL com fármaco, obtido por *solvent casting*), apresentados na **Figura 4.6**, é possível detetar um evento de fusão próximo de 62°C correspondente à fusão do polímero, tal com reportado por Dhanaraju *et al.*, em trabalho publicado em 2003. Apesar de se verificarem ligeiras diferenças entre as temperaturas de fusão para as três amostras em análise, estas não foram consideradas significativas para justificar qualquer efeito do processamento sobre a estrutura da PCL.

Segundo Dubernet, 1995, a ausência do pico endotérmico característico do fármaco, nas amostras de micropartículas de PCL e no filme de PCL, sugerem que o fármaco se encontra sob a forma de dispersão molecular metaestável (MMD) ou de uma solução sólida (SS) de fármaco no polímero e não na forma cristalina. Dado que as imagens de SEM apresentavam cristais de fármaco nas amostras de PCL, este resultado parece indiciar que a quantidade de fármaco na forma cristalina não será significativa para permitir gerar um sinal detetável no termograma. É de notar que no caso deste polímero, as imagens de SEM revelaram uma menor quantidade de cristais de fármaco e de dimensões mais pequenas, estando a maioria ligado à superfície das micropartículas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

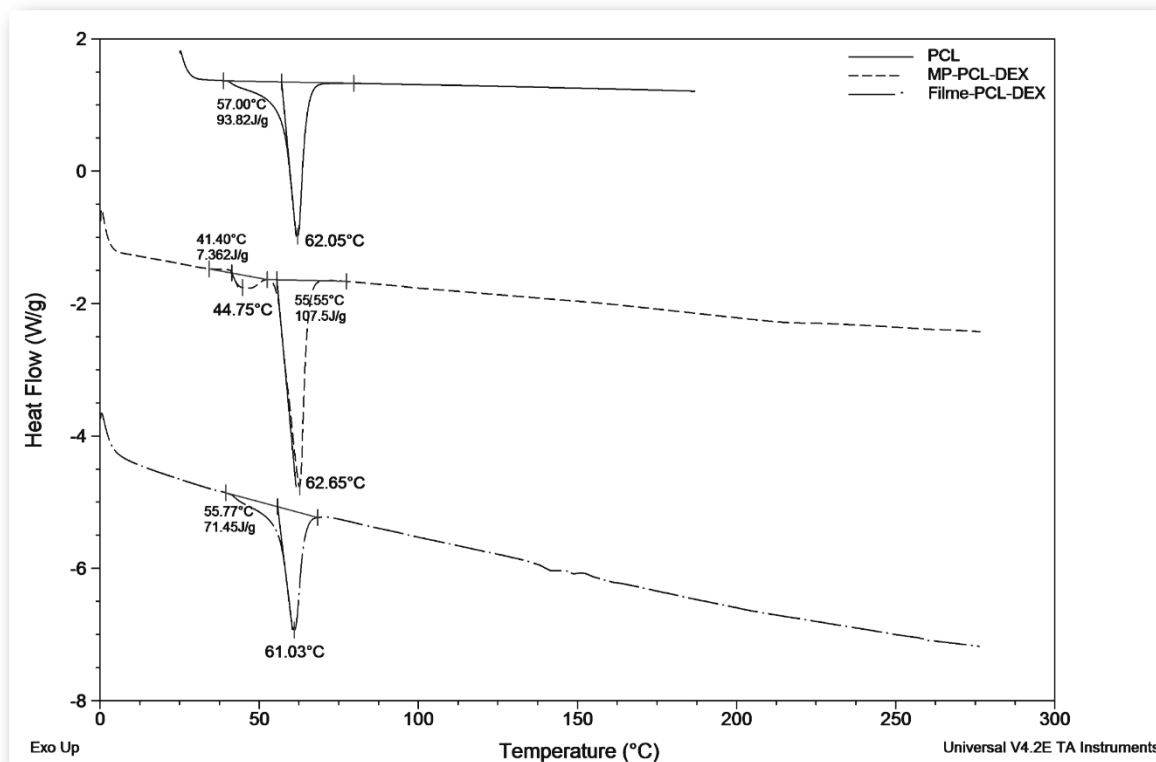


Figura 4.6 - Termogramas obtidos para PCL não processada (PCL) e com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PCL-DEX) e filme (filme-PCL-DEX).

No que respeita à amostra de PHBV, e conforme ilustrado na **Figura 4.7**, a temperatura de fusão foi detetada a 172,47°C, 173,33°C e 173,06°C respetivamente para as amostras de polímero, micropartículas carregadas com dexametasona e filme produzido após a dissolução de fármaco e polímero em clorofórmio. Tendo em conta a proximidade dos valores obtidos, conclui-se que o método utilizado na preparação das micropartículas não teve efeito significativo sobre a temperatura de fusão do PHBV.

Cretois *et al.*, 2014, obtiveram resultados semelhantes, tendo observado uma temperatura de fusão (T_m) para o PHBV de 168°C. É de realçar que, sendo o PHBV um copolímero, os resultados dependerão fortemente da proporção de cada um dos monómeros, bem como da cristalinidade do polímero investigado, pelo que, resultados um pouco diferentes podem ser apresentados por outros autores.

Um pico menos acentuado é detetável a uma temperatura ligeiramente inferior, aparentemente devido à fusão parcial do material, seguida de recristalização e do fenómeno de fusão mais significativo anteriormente descrito. Segundo Gunaratne e Shanks, 2005, este comportamento é uma característica do PHBV e corresponde à fusão de zonas do polímero com diferentes arranjos cristalinos.

Relativamente ao estado do fármaco nas micropartículas, nada pode concluir-se, uma vez que, como pode ser observado no termograma, a degradação do polímero ocorre a uma temperatura próxima de 250°C, isto é, a uma temperatura inferior ao ponto de fusão do fármaco (266°C) e como tal não existem resultados para esta temperatura.

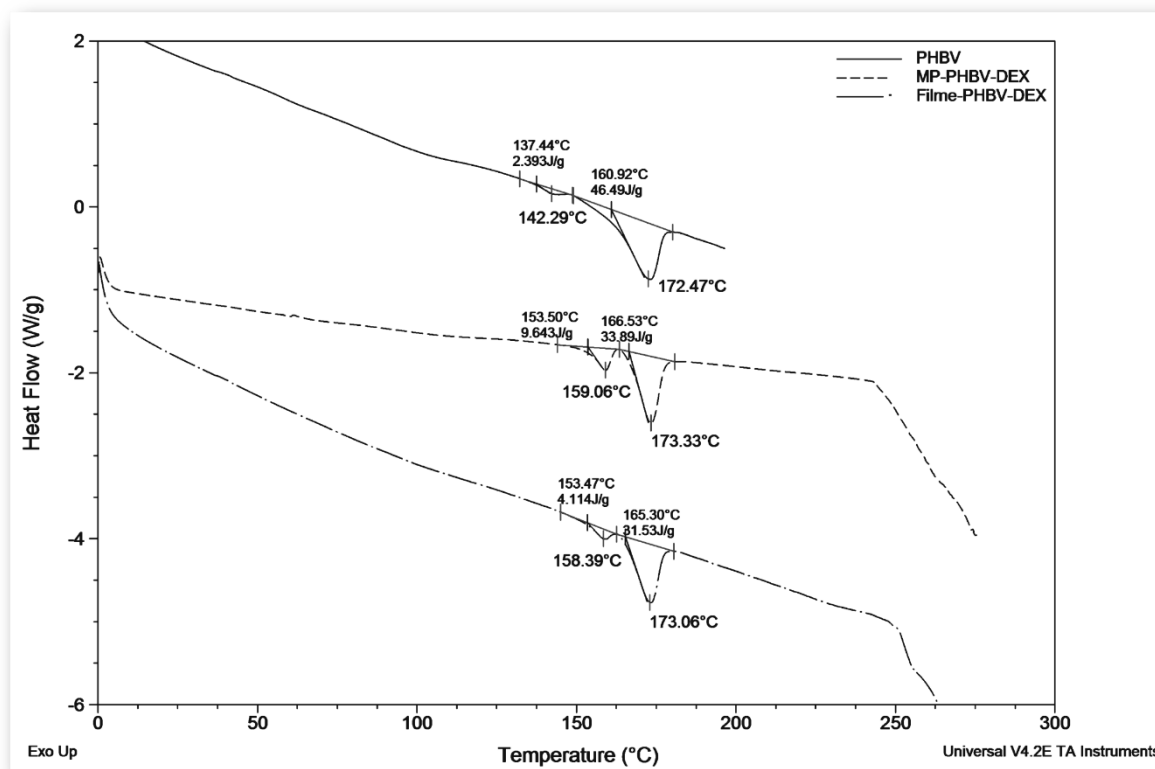


Figura 4.7 - Termogramas obtidos para o PHBV não processado (PHBV) e com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PHBV-DEX) e filme (Filme-PHBV-DEX).

No termograma do PLA não processado (**Figura 4.8 - PLA**) é possível identificar claramente os dois principais eventos térmicos associados a polímeros semi-cristalinos, isto é, a temperatura de transição vítrea (que ocorre a 45,56°C) e a temperatura de fusão, a 149,43°C. Estes eventos encontram-se reportados na literatura (Leo *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013). No termograma das micropartículas produzidas a partir deste polímero (**Figura 4.8-MP-PLA-DEX**), os mesmos eventos são identificáveis, embora neste caso seja possível observar outros fenómenos térmicos adicionais. Neste caso, a T_g ocorre a 65,22°C, cerca de 20°C acima da T_g observada para o polímero não processado. Sobreposto ao fenómeno de transição vítrea observa-se um fenómeno caracterizado por um pico endotérmico, atribuído ao relaxamento das cadeias poliméricas do material, por forma a atingir um estado termodinamicamente mais estável (Bailey *et al.*, 2002). Normalmente, a uma temperatura ligeiramente superior, este fenómeno dá origem a um fenómeno de cristalização antes da fusão, tal como pode ser observado no evento exotérmico registado a 121,67°C, atribuído ao fenómeno de cristalização.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É possível ainda constatar que o evento de fusão ocorre sensivelmente à mesma temperatura do polímero não processado.

Relativamente aos filmes de PLA com dexametasona obtidos por *solvent casting* não é possível identificar claramente um fenómeno de transição vítrea, no entanto constata-se que a fusão ocorre sensivelmente à mesma temperatura que nos outros termogramas. Os resultados obtidos permitem afirmar que, para o PLA, o processamento do polímero em micropartículas e em filmes formados por *solvent casting*, altera as propriedades térmicas do material, nomeadamente a temperatura de transição vítrea.

No que concerne ao estado do fármaco, uma ligeira perturbação a 226,76°C no caso das micropartículas e a 227,52°C no caso do filme de polímero com fármaco, permitem considerar que este se encontra parcialmente no estado cristalino, no entanto, a estrutura cristalina do fármaco parece ter sofrido alterações. Este facto pode ser constatado pela diminuição do ponto de fusão do fármaco e da respetiva entalpia de fusão associada a cada amostra.

Relativamente aos resultados obtidos para o PLGA (**Figura 4.9**), e no que diz respeito

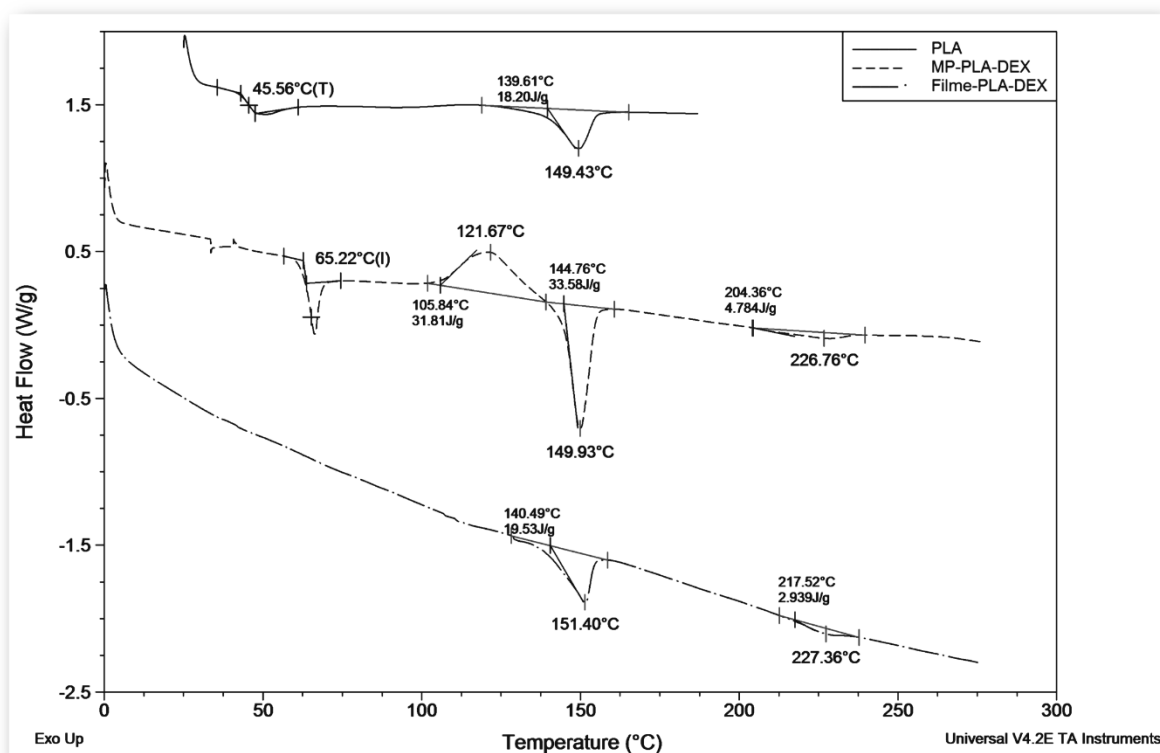


Figura 4.8 - Termogramas obtidos para o PLA não processado (PLA) e com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PLA-DEX) e filme (Filme-PLA-DEX).

ao polímero não processado (PLGA) e micropartículas com dexametasona (MP-PLGA-DEX), obteve-se uma Tg de 54,58°C e 52,15°C, próxima dos resultados obtidos por Gaignaux *et al.*, 2012 e Rouse *et al.*, 2007. Em ambos os casos, sobreposto ao fenómeno de transição vítrea, observa-se o aparecimento de um pico endotérmico associado ao relaxamento das cadeias

poliméricas. O segundo pico registado a 216,64°C, para as micropartículas carregadas, à semelhança do que se concluiu para a análise efetuada ao PLA, dirá respeito a fármaco cristalizado disperso na matriz polimérica, ainda que com alteração na sua estrutura cristalina, reflexo da interação deste com o polímero.

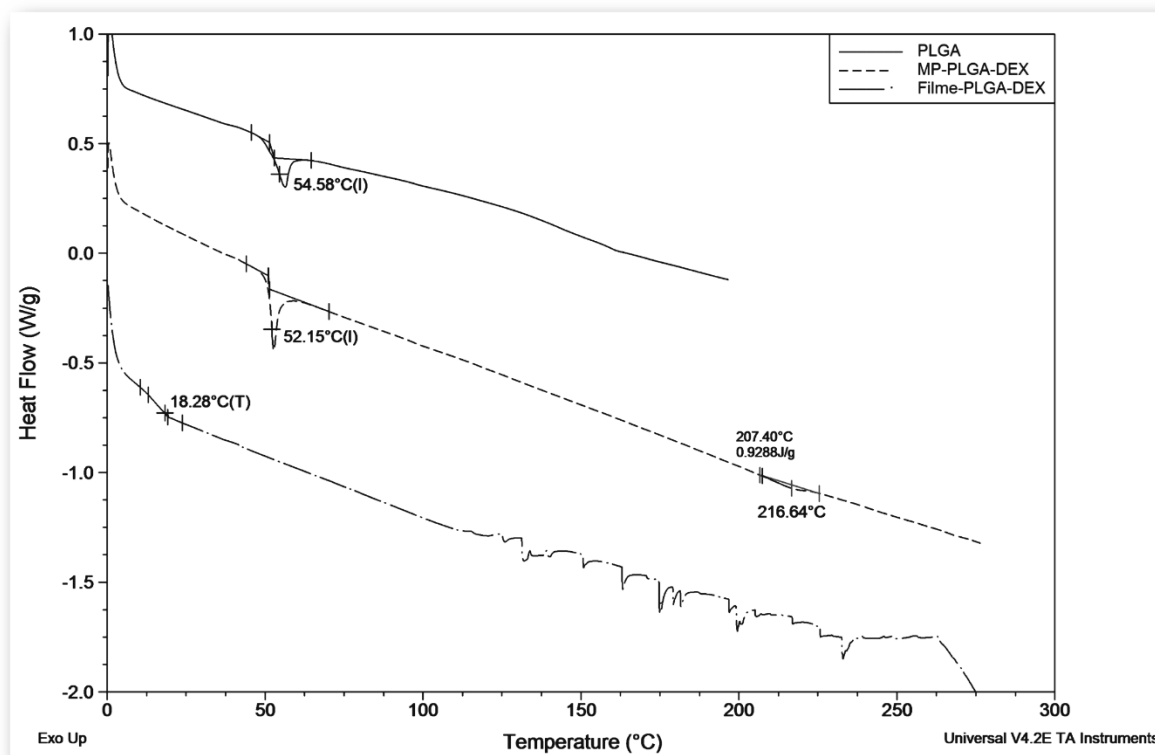


Figura 4.9 - Termogramas obtidos para o PLGA não processado (PLGA) e com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PLGA-DEX) e filme (Filme-PLGA-DEX).

Os resultados obtidos para o filme de PLGA com fármaco apresentam uma série de desvios que, apesar da repetição da análise, não foram eliminados, pelo que a sua relevância foi questionada.

Em suma, as micropartículas de PLA e PLGA foram as únicas onde foi identificável fármaco na forma cristalina, o que pode ser concluído, ainda que de forma especulativa, pelo aparecimento do evento de fusão característico do fármaco cristalino, situado a cerca 226°C para o PLA e a cerca de 216°C para o PLGA.

Ainda que os resultados de DSC não revelem a existência de fármaco na forma cristalina nas amostras de PCL e de PHBV, o que pode ser concluído pela ausência de picos endotérmicos característicos do fármaco (Mo *et al.*, 2012); dos resultados de SEM constatou-se que existiam cristais de fármaco nestas amostras, particularmente na de PHBV. Tal como apresentado para o caso das micropartículas produzidas a partir de PCL, equacionou-se a hipótese da quantidade de fármaco presente na forma cristalina ser de tal forma reduzida que a sua identificação através de DSC não foi possível. Em última instância, após a temperatura de fusão do polímero, os

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

cristais de fármaco poder-se-ão dissolver ou permanecer molecularmente dispersos no material. Este fenómeno pode constituir uma justificação para a ausência do pico endotérmico correspondente ao ponto de fusão do fármaco, dado que este é superior ao ponto de fusão dos polímeros utilizados (Dubernet, 1995).

Tendo em conta os resultados apresentados, verifica-se que o PLA foi o único polímero para o qual se registaram alterações dos eventos térmicos após o processamento sob a forma de micropartículas. Como referido na análise dos termogramas para este polímero, verificou-se uma elevação de cerca de 20°C na T_g do polímero, bem como o aparecimento de um evento de cristalização a uma temperatura de cerca de 121°C. Para as restantes amostras as alterações registadas nos eventos térmicos característicos do polímero não foram significativas, pelo que, a estrutura dos materiais parece não sofrer alterações com o processamento. É de notar que o método utilizado na preparação das micropartículas pode ter efeito sobre a organização das cadeias poliméricas o que se repercute nas propriedades mecânicas do material, na sua estabilidade durante o envelhecimento e na libertação do fármaco a partir das micropartículas (Dubernet, 1995).

4.1.4 Eficiência de Encapsulamento

No que respeita ao cálculo da eficiência de encapsulamento, calculada de acordo com as **Equações 1, 2 e 3** apresentadas na **secção 3.5**, a **Tabela 4.2** apresenta o resumo dos resultados com base na média das várias réplicas feitas para cada tipo de partículas. Os dados detalhados das várias réplicas efetuadas, bem como a respetiva curva de calibração, são apresentados no **Anexo II**.

As micropartículas correspondentes aos quatro polímeros em estudo apresentam uma eficiência de encapsulamento semelhante (**Tabela 4.2**), sendo de destacar os casos das micropartículas de PCL e PLA, com eficiências a rondar os 60% e o caso do PHBV que apresenta uma eficiência mais baixa, próxima de 40%. A reduzida solubilidade da dexametasona na fase aquosa propicia a sua permanência na fase orgânica, onde se encontra o polímero. Desta forma, aquando do processo de formação das micropartículas, o fármaco tem tendência a permanecer na estrutura polimérica que gradualmente se vai formando, conseqüentemente obtêm-se eficiências de encapsulamento mais elevadas.

De salientar que as eficiências de encapsulamento aqui apresentadas incluem os cristais de fármaco dispersos e à superfície das partículas, visíveis nas imagens de SEM, e não apenas o fármaco encapsulado. Assim estes valores podem estar sobrestimados, sendo por isso superiores aos reais. Uma das hipóteses de eliminação desses cristais de fármaco seria proceder

à lavagem das amostras, abordagem que se revela inviável uma vez que tal procedimento provocaria a libertação de fármaco encapsulado e, como tal, uma diminuição significativa na eficiência de encapsulamento.

Tabela 4.2 - Eficiência de encapsulamento das micropartículas para encapsulamento de dexametasona.

<i>Amostra</i>	<i>QTFE (%)</i> <i>(m/m)</i>	<i>QEFE (%)</i> <i>(m/m)</i>	<i>EE (%)</i> <i>(m/m)</i>
<i>PCL</i>	9,09	5,41	59,54
<i>PHBV</i>		3,72	40,88
<i>PLA</i>		5,65	62,10
<i>PLGA</i>		4,88	53,70

QTFE – Quantidade Teórica de Fármaco Encapsulado

QEFE – Quantidade Experimental de Fármaco Encapsulado

EE – Eficiência de Encapsulamento

4.1.5 Ensaios de Libertação

Os ensaios de libertação de dexametasona, *in vitro*, permitiram obter as curvas de libertação que se encontram apresentadas na **Figura 4.10**.

A análise destas curvas permite concluir que, à exceção do fármaco encapsulado nas micropartículas de PLA, onde apenas ocorreu uma libertação de cerca de 70%, para os restantes polímeros conseguiu-se uma libertação total do fármaco. Contudo, verificou-se que os perfis obtidos para o caso das micropartículas de PCL e PHBV apresentam uma libertação de fármaco ligeiramente superior a 100%, certamente consequência de erros inerentes ao método aplicado para quantificação de fármaco encapsulado e/ou libertado. A recolha das amostras para avaliação da eficiência de encapsulamento é feita aleatoriamente e o fármaco poderá não estar uniformemente distribuído. Assim sendo, a recolha da amostra para libertação poderá apresentar uma quantidade de fármaco diferente da calculada para a amostra recolhida para o cálculo da eficiência de encapsulamento. Além do mais, a percentagem de fármaco libertada é calculada com base no resultado cumulativo das várias amostras recolhidas durante um longo período, o que faz com que qualquer erro experimental ou variabilidade associada ao procedimento tenha um efeito crescente nos resultados obtidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

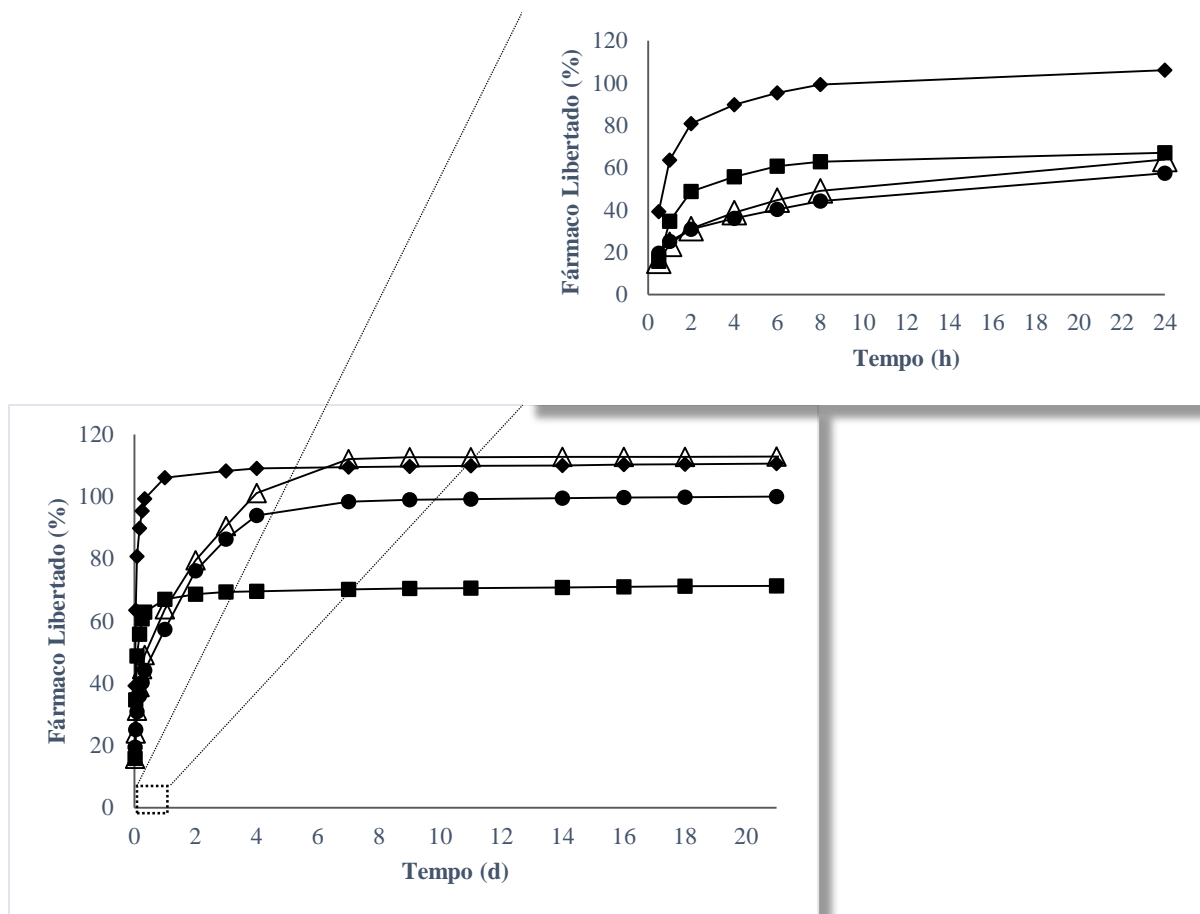


Figura 4.10 - Perfis de libertação de dexametasona a partir das micropartículas de PCL (♦), PHBV (Δ), PLA (■) e PLGA (●).

Nos casos das micropartículas de PHBV e de PLA, verificou-se um significativo *initial burst release*³, sendo que, o fármaco atingiu o máximo de libertação em menos de um dia. No caso do PLA a libertação parece continuar a ocorrer lentamente após o primeiro dia, no entanto, a quantidade de fármaco libertado é muito reduzida.

Tendo em conta o perfil de libertação obtido para as micropartículas de PLA, verifica-se que o *initial burst release* corresponde apenas à libertação de cerca de 60% do fármaco encapsulado. Possivelmente os restantes 40% de fármaco estão de tal forma aprisionados na matriz polimérica que a sua libertação ocorre mais lentamente até se atingir uma libertação de cerca de 70% do fármaco encapsulado, ficando o restante de tal forma aprisionado na matriz que a sua libertação só se verificará aquando da degradação do polímero.

As diferenças de comportamento das amostras de PCL e PLGA, correspondendo a cinética de libertação mais lenta, estão seguramente relacionadas com o tamanho das respetivas partículas, que são aproximadamente o dobro das de PHBV e PLA (**Tabela 4.1**). De facto, quanto maiores forem as partículas menor será a sua área específica logo menor será a

³ *Initial Burst Release*: termo anglo-saxónico utilizado para definir a libertação drástica de uma grande quantidade de fármaco, no início dos ensaios de libertação.

transferência de massa. Contudo, é preciso ter em conta que nas amostras eram visíveis cristais de fármaco dispersos e à superfície das partículas, posto isto, é natural que parte da libertação corresponda a dissolução desses cristais no meio de libertação, no entanto esta contribuição é difícil de quantificar.

Resta acrescentar que, no caso das micropartículas de PCL, a elevada hidrofobicidade do polímero, dificulta a difusão do meio de libertação nas micropartículas e consequente remoção do fármaco para o exterior, favorecendo uma cinética de libertação mais controlada (Dhanaraju *et al.*, 2003).

No **Anexo III** apresentam-se os resultados detalhados para a libertação, incluindo alguns pontos além dos aqui apresentados. Estes pontos foram excluídos por corresponderem a concentrações de tal forma reduzidas que seria questionável considerar o método utilizado suficientemente robusto para a sua quantificação. São ainda apresentadas, no mesmo anexo, as curvas de calibração que permitiram obter a concentração de dexametasona no meio de libertação.

4.2 Micropartículas para Encapsulamento de Cisplatina

No que respeita à cisplatina, é de recordar que este fármaco apenas foi incorporado em micropartículas de PLA. À semelhança da secção anterior (**secção 4.1**), apresentam-se de seguida os resultados obtidos para a caracterização das micropartículas (SEM, distribuição de tamanhos e DSC), para as eficiências de encapsulamento e para os ensaios de libertação de cisplatina a partir das micropartículas.

4.2.1 Análise Morfológica - SEM

A análise de SEM efetuada às micropartículas de PLA com cisplatina demonstra que se obtiveram partículas esféricas, com uma distribuição de tamanhos aparentemente próxima da obtida para as micropartículas do mesmo polímero, para encapsulamento de dexametasona (**Figura 4.11**).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

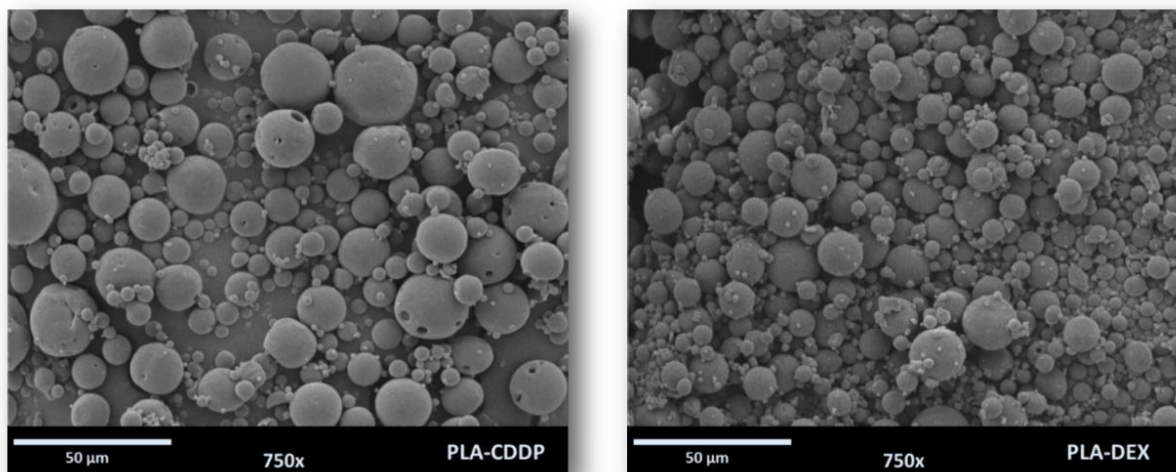


Figura 4.11 - Micropartículas de PLA com cisplatina (PLA-CDDP) e com dexametasona (PLA-DEX).

Este resultado era expectável na medida em que se mantiveram as condições de agitação, volume de fase orgânica e da fase aquosa, assim como as quantidades de PLA e PVA utilizados na preparação das micropartículas.

No entanto, maiores ampliações (**Figura 4.12.a**) revelam que as partículas de PLA com cisplatina apresentam pequenos orifícios na sua superfície. Mais, na **Figura 4.12.b** são até evidentes partículas cujo interior se encontra completamente oco, concluindo-se que no caso da cisplatina se obtiveram microcápsulas enquanto que no caso da dexametasona, se obtiveram partículas morfologicamente semelhantes a microesferas.

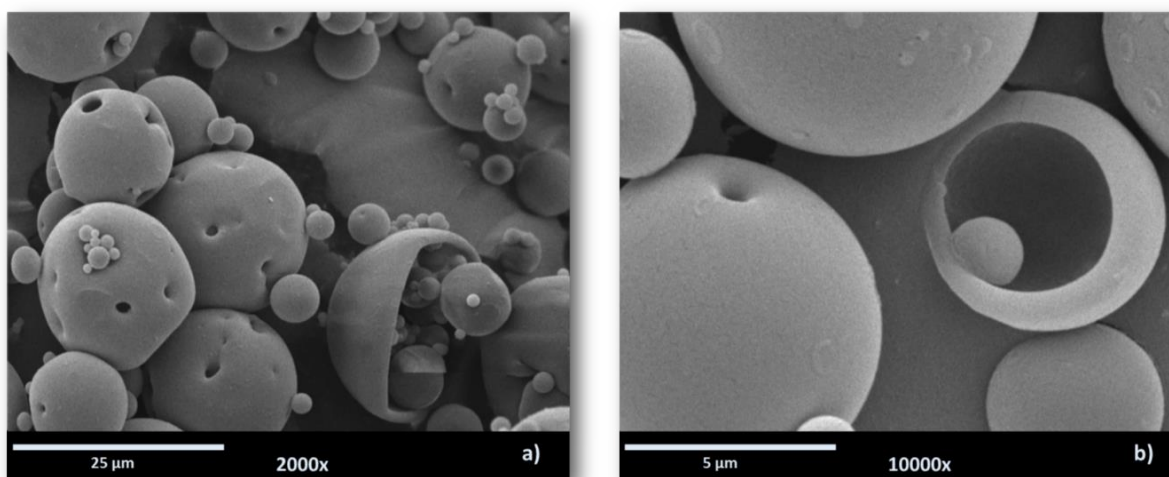


Figura 4.12 - Micropartículas de PLA carregadas com cisplatina: a) Pormenor dos poros e b) Pormenor do interior.

A rápida evaporação do solvente é uma possível justificação para esta diferença (Yeo e Park, 2004). Vários autores constataram que a rápida evaporação do solvente promove a deslocação do material polimérico para a interface com a fase aquosa, o que resulta na formação

de um núcleo isento de material, rodeado por uma cápsula de polímero altamente compacto (Bezemer *et al.*, Tiwari e Verma, 2011; Nath2013).

Com o objetivo de se conseguir a dissolução de cisplatina na fase orgânica, usou-se uma mistura de solventes, DMF e clorofórmio numa razão 3:7, mantendo-se o volume final de fase orgânica (10 mL). Devido à elevada miscibilidade do DMF em água, aquando da adição da fase orgânica à fase aquosa, o DMF que compõe parcialmente a fase orgânica é rapidamente extraído para a fase aquosa. A extração do DMF, além de ser responsável pelo arraste do material polimérico para a interface com a fase aquosa, parece também provocar o aparecimento dos poros anteriormente referidos. Isto poderá constituir uma justificação para o tipo de estrutura obtida e para a diferença considerável relativamente às micropartículas de dexametasona, onde apenas se utilizou clorofórmio como solvente.

No que respeita às características da superfície das micropartículas, diretamente dependentes do tipo de polímero utilizado, obteve-se uma superfície com rugosidade pouco significativa, tal como se verificara para as micropartículas de PLA para encapsulamento de dexametasona (**Figura 4.12.b**). Esta característica encontra-se diretamente relacionada com o reduzido grau de cristalinidade do PLA, tal como discutido anteriormente (**secção 4.1.1**).

Neste caso, e motivado pela significativa solubilidade da cisplatina no solvente utilizado, DMF, não foram observados cristais de fármaco dispersos ou ligados à superfície das micropartículas, sendo de esperar que este esteja devidamente encapsulado nas estruturas desenvolvidas para libertação controlada do fármaco.

4.2.2 Distribuição de Tamanhos das Micropartículas

Na **Tabela 4.3** são apresentados os valores obtidos para os parâmetros estatísticos (mediana (Dv50), percentis (Dv10 e Dv90), diâmetro médio (D[4, 3]) e moda), resultantes da análise granulométrica das micropartículas de PLA para encapsulamento de cisplatina. Para efeitos de comparação, apresentam-se, na mesma tabela, os valores referentes às micropartículas do mesmo polímero para encapsulamento de dexametasona.

Pela análise do valor da mediana e da moda (**Tabela 4.3**), verifica-se que neste caso se obtiveram partículas de tamanho superior, o que pode ser motivado pelo facto de se terem obtido microcápsulas e não microesferas. O diâmetro médio em termos volumétricos (D[4,3]), permite reforçar estes resultados, revelando que a amostra de PLA-CDDP é constituída por partículas com um diâmetro médio de 14,6 μm , logo superiores às micropartículas obtidas a partir do mesmo polímero para encapsulamento de dexametasona (9,4 μm).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tal como referido anteriormente, a análise de SEM permitiu constatar que as micropartículas para incorporação de cisplatina apresentavam uma estrutura interna oca, motivada pela rápida evaporação do solvente acompanhada da deslocação do material polimérico para a interface formada com a fase aquosa. Quando isto se verifica as micropartículas têm tendência a apresentar dimensões superiores, quando comparadas com micropartículas resultantes de um processo de evaporação mais lento (Yeo e Park, 2004).

Ainda que se tenham obtido partículas com um diâmetro superior, o valor da amplitude da distribuição, dada pelo quociente $[(Dv90-Dv10)/Dv50]$ (**Tabela 4.3**), não difere significativamente daquele que se obteve para o caso das micropartículas para encapsulamento de dexametasona, produzidas a partir do mesmo polímero.

Tabela 4.3 - Parâmetros da distribuição de tamanhos das micropartículas de PLA para encapsulamento de cisplatina.

<i>Amostra</i>	<i>Dv10</i> [μm]	<i>Dv50</i> [μm]	<i>Dv90</i> [μm]	$\frac{D_v90 - D_v10}{D_v50}$	<i>D [4,3]</i> [μm]	<i>Moda</i> [μm]
<i>PLA-CDDP</i>	1,90	13,90	28,80	1,94	14,60	18,70
<i>PLA-DEX</i>	1,80	9,70	16,60	1,54	9,40	11,20

Comparando as distribuições de tamanhos obtidas para as micropartículas de PLA com dexametasona e com cisplatina, apresentadas na **Figura 4.13**, verifica-se que estas apresentam o perfil semelhante. A principal diferença reside no facto da distribuição bimodal ser menos significativa para as micropartículas com cisplatina, o que sugere que existe uma diferença menos significativa entre um grupo de partículas de maior tamanho e um outro grupo de partículas de menor tamanho.

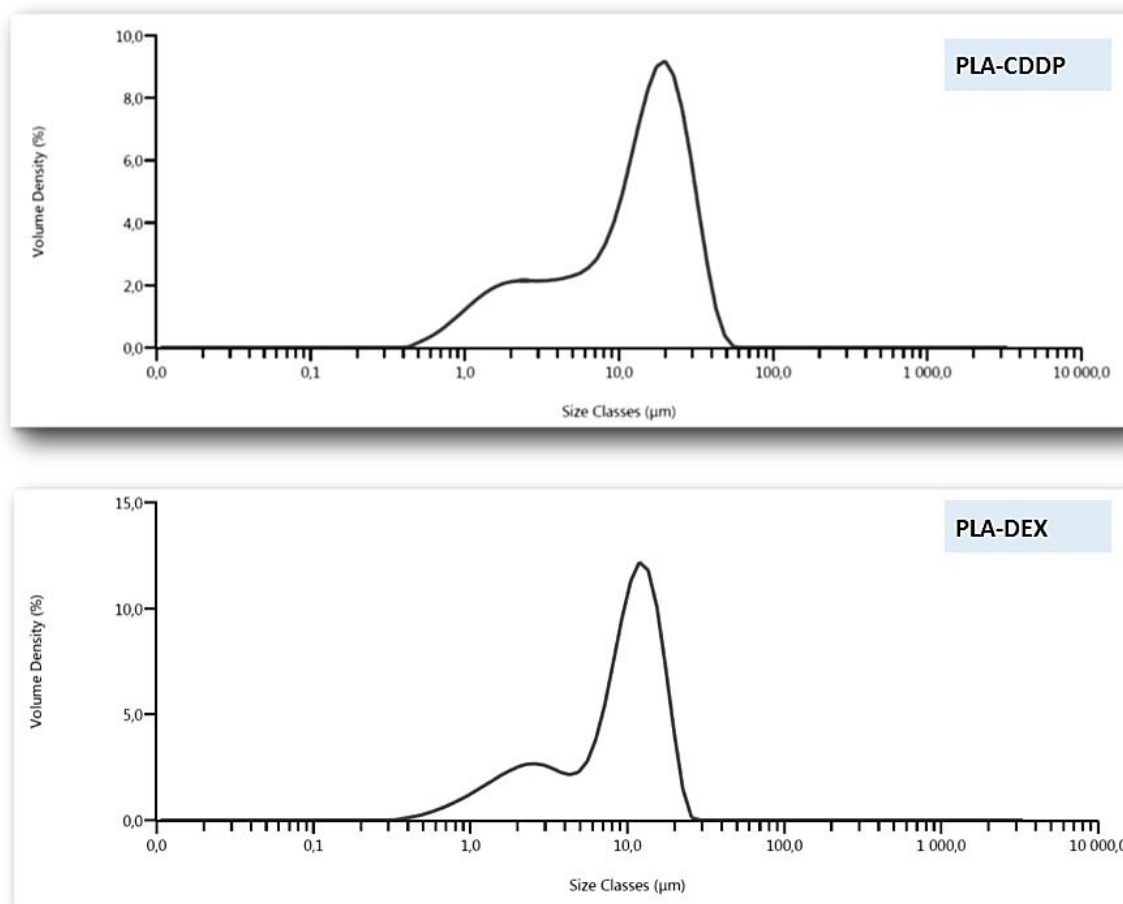


Figura 4.13 - Distribuição de tamanhos das micropartículas de PLA com cisplatina (PLA-CDDP) e com dexametasona (PLA-DEX).

No **Anexo IV** é apresentada a tabela com as percentagens volumétricas de partículas de cada tamanho que deram origem à distribuição de tamanhos para a amostra de PLA-CDDP.

4.2.3 Análise Térmica – DSC

Tal como para as micropartículas onde se encapsulou dexametasona, também as micropartículas de cisplatina foram analisadas por DSC a fim de avaliar as repercussões do processamento sobre os eventos térmicos característicos do polímero. No entanto, motivado pelo facto da temperatura de fusão da cisplatina ser superior à temperatura de degradação do PLA, não foi possível investigar o estado do fármaco nas micropartículas.

Na **Figura 4.14** é apresentado o termograma obtido para as micropartículas de PLA para encapsulamento de cisplatina, bem como, os anteriormente apresentados termogramas para o PLA, micropartículas com dexametasona e filmes de PLA obtidos por *solvent casting*.

O termograma resultante da análise DSC efetuada às micropartículas de PLA carregadas com cisplatina (**Figura 4.14**), é bastante semelhante ao observado para as micropartículas de PLA carregadas com dexametasona. No termograma são visíveis os dois eventos térmicos

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

significativos característicos dos polímeros semi-cristalinos, situados a cerca de 59°C e a 149,18°C, correspondendo, respetivamente, à temperatura de transição vítrea e à temperatura de fusão do material. Também neste caso é detetável um evento endotérmico sobreposto ao fenómeno de transição vítrea e que, à semelhança do que foi discutido para o caso do PLA-DEX, corresponde ao relaxamento das cadeias poliméricas por forma a atingir um estado termodinamicamente mais estável. O evento exotérmico que ocorre a 117,30°C é então atribuído ao fenómeno de recristalização resultante do fenómeno endotérmico anteriormente descrito.

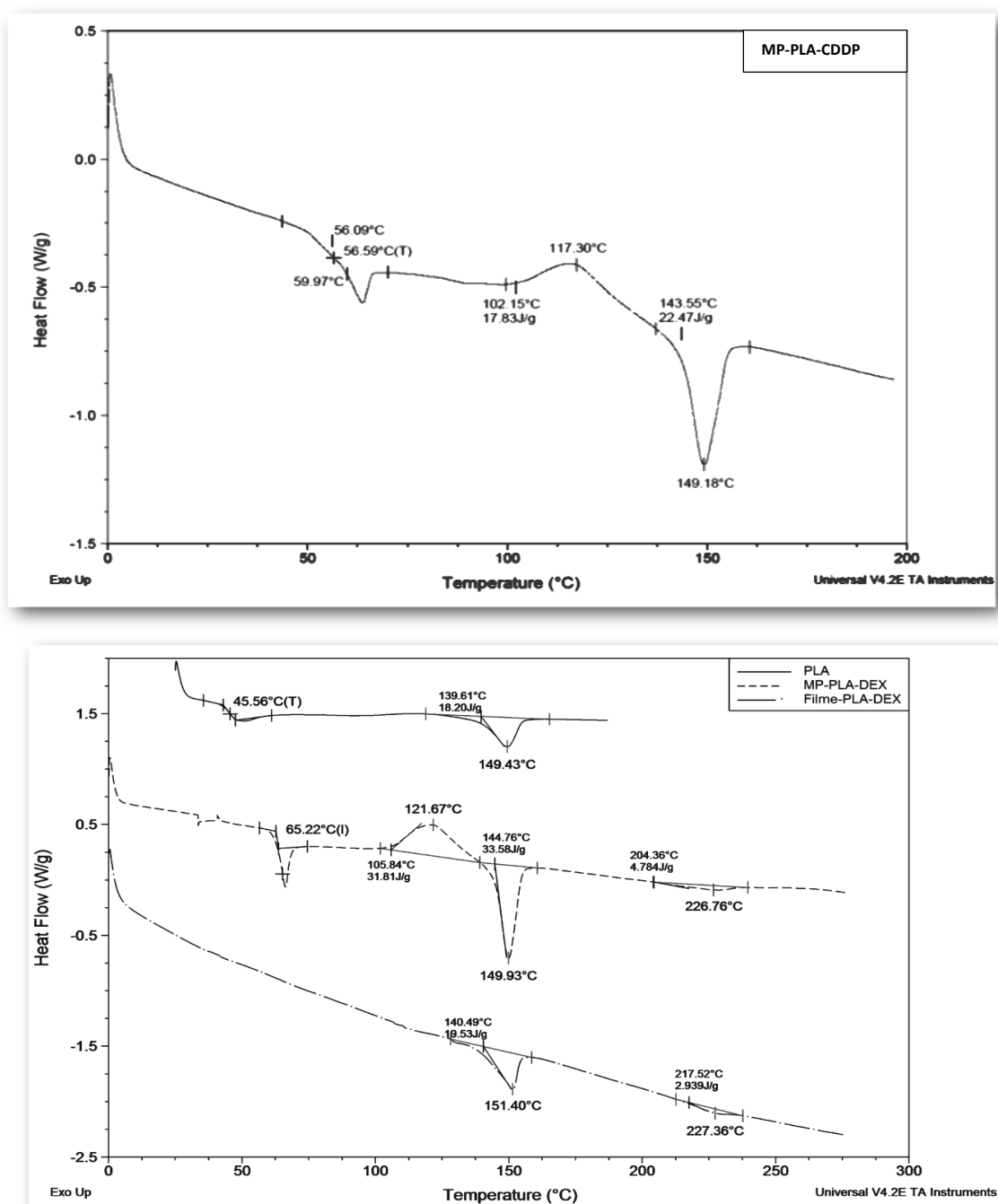


Figura 4.14 - Termogramas obtidos para as micropartículas de PLA com cisplatina (PLA-CDDP), PLA não processado e PLA com dexametasona sob a forma de micropartículas (MP-PLGA-DEX) e filme (Filme-PLGA-DEX).

Pela análise dos resultados compilados na **Tabela 4.4**, é possível concluir que, tal como no caso das micropartículas para encapsulamento de dexametasona, o processamento do polímero sob a forma de micropartículas originou alterações na T_g do polímero, tendo-se verificado uma elevação de cerca de 15°C para as micropartículas de PLA com cisplatina (**Figura 4.14**). Estes resultados sugerem que o processamento do polímero tem efeito sobre as características do PLA.

No que respeita ao evento de fusão, tal como no caso das micropartículas com dexametasona, não se registaram alterações significativas.

Tabela 4.4 - Resultados de DSC para o polímero puro e processado sob a forma de micropartículas com cisplatina (PLA-CDDP) e dexametasona (PLA-DEX).

<i>Amostra</i>	T_g ($^\circ\text{C}$)	T_c ($^\circ\text{C}$)	T_m ($^\circ\text{C}$)
<i>PLA não processado</i>	45,56	-	149,43
<i>PLA-CDDP</i>	59,97	117,30	149,18
<i>PLA-DEX</i>	65,22	121,67	149,93

4.2.4 Eficiência de Encapsulamento

A quantidade teórica de fármaco encapsulado, quantidade experimental de fármaco encapsulado e eficiência de encapsulamento, para o caso das micropartículas de PLA para encapsulamento de cisplatina, encontram-se na **Tabela 4.5**. Os valores apresentados foram calculados com base nas **Equações 1, 2 e 3** apresentadas na **secção 3.5**. Tal como para o caso das micropartículas de dexametasona, foram considerados os valores médios das réplicas efetuadas, sendo os valores detalhados apresentados no **Anexo V**.

Tabela 4.5 - Eficiência de encapsulamento obtida para as micropartículas de PLA para encapsulamento de cisplatina.

<i>Amostra</i>	$QTFE$ (%)	$QEFE$ (%)	EE (%)
<i>PLA-CDDP</i>	4,76	1,29	27,12

$QTFE$ – Quantidade Teórica de Fármaco Encapsulado

$QEFE$ – Quantidade Experimental de Fármaco Encapsulado

EE – Eficiência de Encapsulamento

Motivado pela considerável solubilidade da cisplatina em meio aquoso, durante o processo de preparação das micropartículas, o fármaco terá particular tendência para migrar para a fase aquosa. Além disso, dado que se usou DMF como solvente do fármaco na preparação da fase orgânica e considerando a hipótese de extração do DMF para a fase aquosa, motivado

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

pela elevada miscibilidade deste solvente em água, é natural que o fármaco tenha tendência para ser arrastado pelo solvente. Estes dois aspetos poderão justificar a reduzida quantidade de fármaco encapsulado experimentalmente determinada (1,29%), quando comparada com a quantidade teórica de fármaco encapsulado (4,76%), o que, naturalmente, se repercute no valor de 27,12% obtido para a eficiência de encapsulamento.

4.2.5 Ensaio de Libertação

A curva de libertação obtida para as micropartículas de PLA com cisplatina (**Figura 4.15**) revela que apenas se conseguiu libertar uma pequena percentagem de fármaco, cerca de 6%. Perante a estrutura porosa visível nas micrografias de SEM, seria de esperar que a entrada de água fosse facilitada, permitindo que o fármaco, solúvel em água, se dissolvesse no meio e fosse facilmente removido para o exterior das micropartículas. No entanto o comportamento foi bastante diferente. Segundo Yan e Gemeinhart, 2005, a interação entre os grupos carboxílicos do PLA e a molécula de cisplatina dificulta a libertação do fármaco, constituindo uma possível justificação para a reduzida quantidade de fármaco libertado a partir das micropartículas de PLA desenvolvidas para o encapsulamento de cisplatina.

A libertação do fármaco é caracterizada pela ocorrência de um *initial burst release* ao longo das primeiras 8 horas de libertação, seguido de uma libertação de uma quantidade muito pequena de fármaco que atinge um máximo decorridos nove dias de ensaios de libertação. No **Anexo V** é apresentada a tabela com os respetivos resultados detalhados.

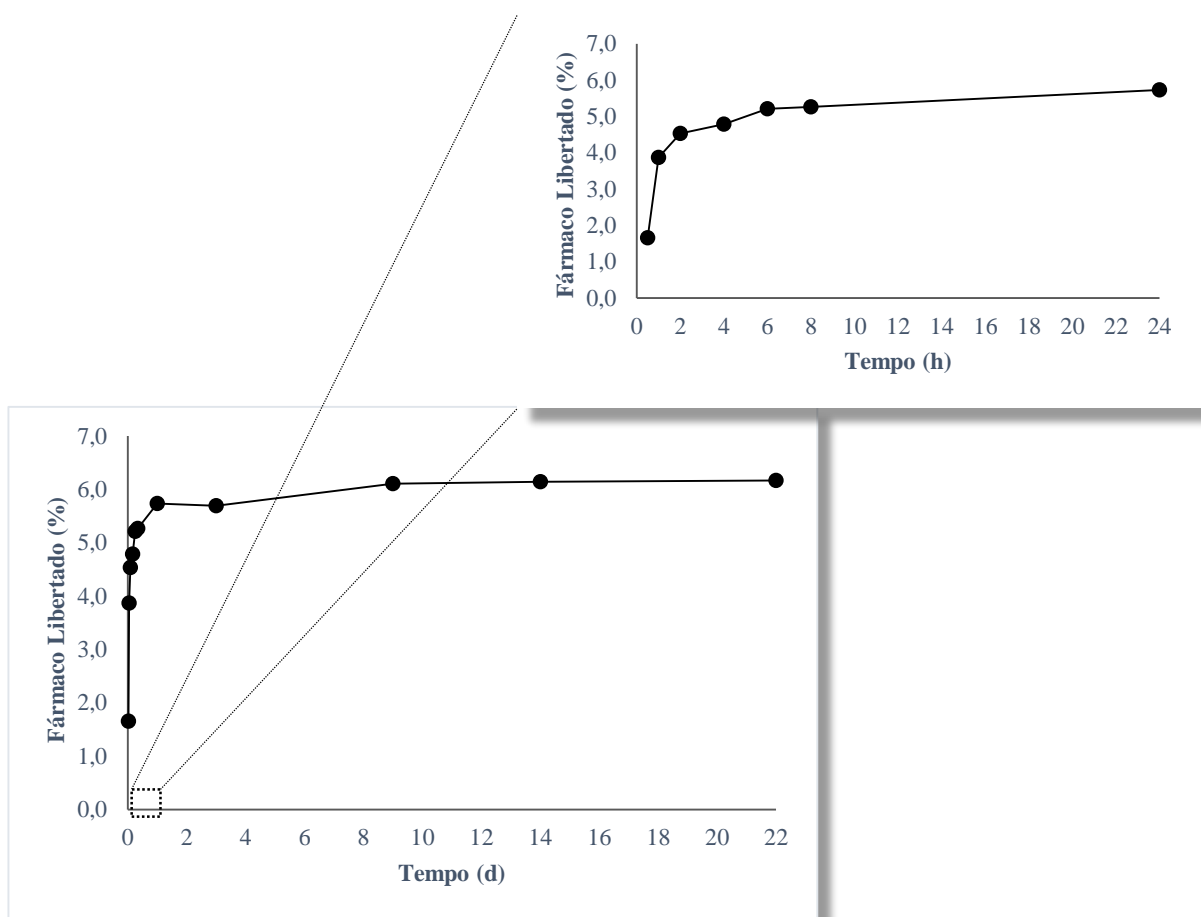


Figura 4.15 - Perfil de libertação da cisplatina a partir das micropartículas de PLA.

Apesar dos resultados de SEM revelarem uma estrutura semelhante a microcápsulas com uma estrutura interna do tipo reservatório, os resultados dos ensaios de libertação sugerem que o fármaco se encontra aprisionado na matriz polimérica e não retido no interior das cápsulas. Caso esta segunda hipótese se verificasse, devido à considerável solubilidade da cisplatina em meio aquoso, seria de esperar que a libertação ocorresse de forma rápida o que na realidade não foi observado.

Os resultados obtidos sustentam a hipótese estabelecida findos os ensaios de libertação. A coloração amarelada das micropartículas, característica da cisplatina, levou a equacionar a hipótese destas ainda conterem uma quantidade significativa de fármaco.

4.3 Efeito dos Hidrogéis de Quitosano na Libertação de Cisplatina

As micropartículas de PLA contendo cisplatina (PLA-CDDP) foram introduzidas em hidrogéis de quitosano com diferentes graus de reticulação com o objetivo de avaliar as a libertação do fármaco nestas condições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Figura 4.16** apresentam-se os perfis de libertação do fármaco após incorporação das micropartículas no hidrogel de quitosano reticulado fisicamente com fosfato dissódico de glicerol (PLA-CDDP/C/GP) e nos hidrogéis de quitosano co-reticulados, física e quimicamente, com 0,05 e 0,20% de reticulante químico (genipin) (PLA-CDDP/C/GP/GE5 e PLA-CDDP/C/GP/GE20, respetivamente), bem como, para efeitos de comparação, o anteriormente apresentado perfil de libertação da cisplatina a partir das micropartículas de PLA (PLA-CDDP).

Tal como seria de esperar, motivado pela resistência adicional associada à matriz gel, a introdução das micropartículas nos hidrogéis de quitosano provoca uma diminuição na quantidade de fármaco libertado.

Comparando os resultados obtidos para os diferentes hidrogéis, reticulado fisicamente e co-reticulados, constata-se que o hidrogel co-reticulado com 0,05% de genipin (PLA-CDDP/C/GP/GE5) é aquele que oferece menor resistência à libertação do fármaco. O aumento do grau de reticulação, por intermédio da adição de um agente de reticulação químico genipin, parece diminuir a resistência do hidrogel para a transferência de massa.

Curiosamente, comparando o perfil obtido para o hidrogel co-reticulado com 0,05% de genipin (PLA-CDDP/C/GP/GE5) com aquele que se obteve para o hidrogel co-reticulado com 0,20% de genipin (PLA-CDDP/C/GP/GE20), verifica-se que a quantidade de fármaco libertado diminui significativamente, sendo o perfil de libertação próximo do obtido para o hidrogel reticulado fisicamente com fosfato de glicerol (PLA-CDDP/C/GP). Estes resultados parecem contraditórios na medida em que o aumento do grau de reticulação, por intermédio da adição de um segundo reticulante (genipin), deveria provocar uma diminuição na quantidade de fármaco libertado a partir dos hidrogéis co-reticulados, quando comparados com o hidrogel fisicamente reticulado. Segundo Moura *et al.* (2013), esta observação deve-se ao facto da co-reticulação diminuir a mobilidade das cadeias de quitosano, devido às ligações covalentes estabelecidas entre o genipin e o quitosano, o que se repercute numa menor interação entre o fármaco e o hidrogel. Desta forma a libertação do fármaco é facilitada o que constitui uma possível explicação para a maior quantidade de fármaco libertado para a amostra de PLA-CDDP/C/GP/GE5.

Em relação à amostra com 0,20% de genipin (PLA-CDDP/C/GP/GE20), seria de esperar que, uma vez que se estabelecem mais ligações covalentes, a interação fármaco/hidrogel fosse reduzida e, como tal, obter-se-ia uma taxa de libertação superior. Contudo, o aumento da concentração de reticulante químico de 0,05% para 0,20% provocou uma diminuição na quantidade de fármaco libertado. O aumento da concentração de genipin para 0,20% parece começar a ter efeitos significativos sobre a capacidade de absorção de água do hidrogel.

Gao *et al.*, em estudos realizados em 2014, analisaram a capacidade de absorção de água de hidrogéis de quitosano, reticulados com diferentes concentrações de genipin, tendo verificado que esta diminuía significativamente com o aumento da concentração deste reticulante. Tendo em conta estes resultados, considerou-se que o aumento da concentração de genipin para 0,20% teve um efeito significativo na capacidade de absorção de água do hidrogel, dificultando a penetração do meio na estrutura, o que conseqüentemente provoca uma diminuição na quantidade de fármaco libertado.

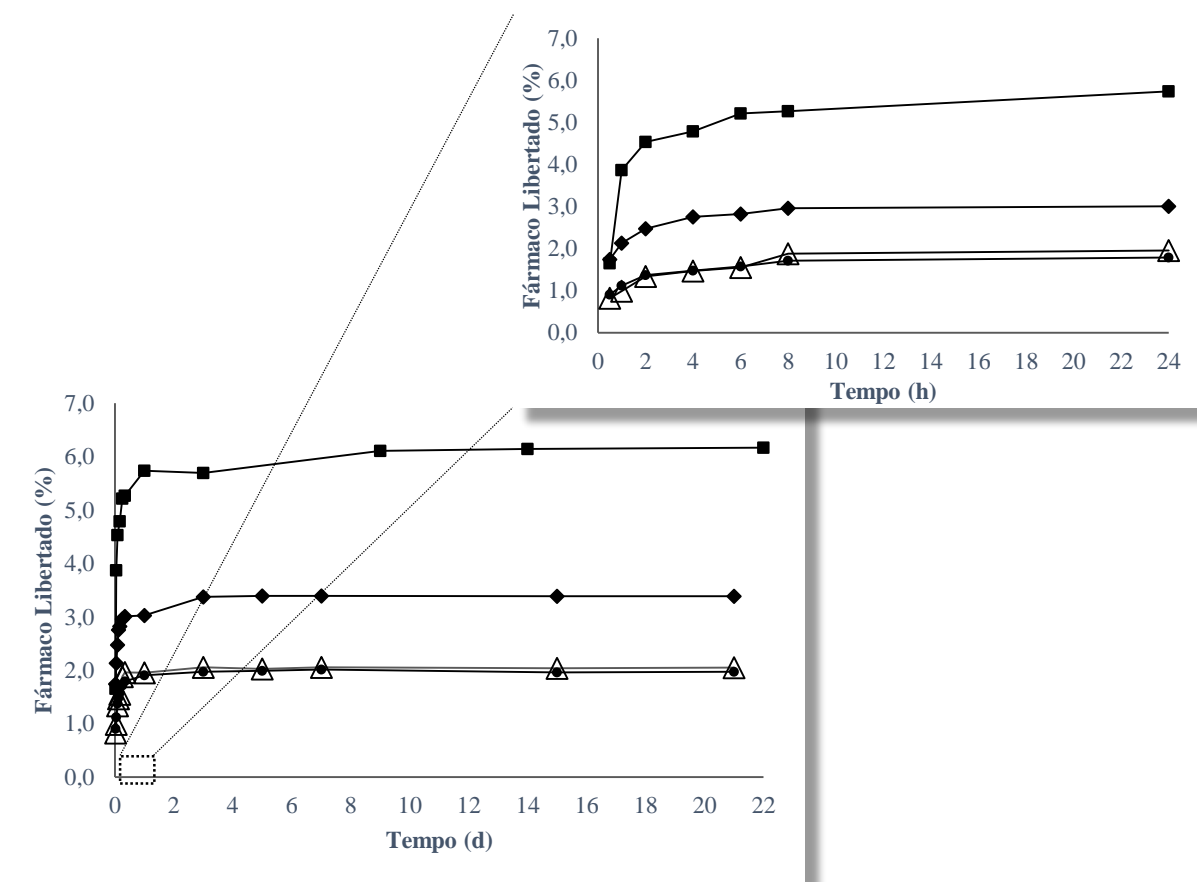


Figura 4.16 – Perfil de libertação de cisplatina a partir de PLA-CDDP (■), PLA-CDDP/C/GP (Δ), PLA-CDDP/C/GP/GE5 (◆) e PLA-CDDP/C/GP/GE20 (●).

Na **Figura 4.16** é ainda apresentado um pormenor do perfil de libertação relativo ao primeiro dia de ensaios, no qual é possível verificar que o *initial burst release* é consideravelmente inferior, quando comparado com as micropartículas isentas de gel. Esta diminuição está associada à resistência à difusão introduzida pela matriz gel, sendo esta particularmente significativa ao longo das primeiras horas de ensaios.

Uma vez que o facto de apresentarem um elevado *initial burst release* é uma desvantagem intrínseca a uma grande variedade de sistemas de libertação controlada de base polimérica, nomeadamente sistemas de micropartículas, os resultados obtidos indicam que a

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

sua incorporação em matrizes gel de quitosano poderá constituir uma alternativa para contornar esta desvantagem.

Os resultados obtidos para a incorporação das micropartículas em matrizes gel de quitosano, sugerem que estes, além de facilitarem a administração e ação do fármaco, podem ser utilizados para modelar a sua taxa de liberação.

No **Anexo VI** são apresentadas as tabelas com os resultados de liberação que permitiram obter os perfis apresentados.

5 CONCLUSÃO

Os ensaios levados a cabo no âmbito deste trabalho tiveram como objetivo principal avaliar as características de micropartículas produzidas a partir de vários tipos de polímeros para encapsulamento de fármacos.

Numa primeira fase, foram produzidas micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA, para encapsulamento de dexametasona, tendo-se determinado os perfis de libertação do fármaco a partir destas estruturas. As micrografias de SEM para estas micropartículas (carregadas com fármaco) permitiram concluir que o método aplicado permite produzir micropartículas com forma predominantemente esférica e com tamanhos que oscilam entre os 10 e os 25 μm . No que respeita às características de superfície, destaca-se o caso do PHBV cuja elevada cristalinidade originou partículas com uma superfície significativamente mais rugosa, ao contrário das demais cuja superfície era essencialmente lisa.

As micrografias permitiram no entanto observar cristais de fármaco dispersos sobre as partículas, o que de algum modo poderá afetar alguns os resultados, mormente os de libertação do fármaco.

No que respeita à granulometria, apesar de mantidas as condições experimentais para todos os ensaios, verificou-se que as micropartículas de PLA e PHBV apresentavam tamanho inferiores, com um diâmetro médio próximo de 9 μm , enquanto que as micropartículas produzidas a partir de PCL e PLGA apresentaram um diâmetro médio próximo de 25 μm , eminentemente monomodais, ou bimodais em que o pico dos finos é pouco relevante. Esta diferença de tamanhos afetou naturalmente os perfis de libertação.

A análise de DSC apenas permitiu identificar fármaco na forma cristalina nas amostras de PLA e PLGA, ainda que as micrografias de SEM revelassem cristais de fármaco em todas as amostras. Concluiu-se no entanto, através de resultados de DSC, que a presença de fármaco na forma livre, nas amostras de PCL e PHBV, parece ser em pequena quantidade e como tal não identificável no termograma.

Quanto às repercussões do método de preparação das micropartículas na estrutura dos polímeros, investigadas mediante a análise dos termogramas obtidos por DSC, verificou-se que o PLA foi o único polímero para o qual se registaram alterações consideráveis. As principais alterações registadas prendem-se com a elevação, em cerca de 20°C, da T_g do polímero e com o aparecimento de um fenómeno de cristalização antes da fusão do material.

5. CONCLUSÃO

Os perfis de libertação revelaram que as micropartículas de PHBV e PLA apresentam um *initial burst release* significativo, correspondendo, no caso do PHBV, à libertação total do fármaco e, no caso do PLA, a uma libertação de apenas 70% do fármaco encapsulado. Estes perfis de libertação muito rápidos podem dever-se não só ao reduzido tamanho das partículas como à presença de cristais de fármaco à superfície das partículas.

Em relação às micropartículas produzidas a partir de PCL e PLGA, obtiveram-se perfis de libertação caracterizados por uma libertação mais gradual durante um período de tempo mais alargado, cerca de 7 dias. As micropartículas produzidas a partir destes polímeros apresentavam um diâmetro médio superior (próximo de 25 μ m), o que poderá ser responsável por este comportamento.

Na outra etapa do trabalho pretendeu produzir-se micropartículas de PLA para o encapsulamento de cisplatina, tendo-se obtido perfis de libertação quer a partir directamente das partículas quer após a sua incorporação num hidrogel de quitosano. No primeiro caso (PLA-CDDP), concluiu-se que a utilização de DMF como solvente para o fármaco teve repercussões sobre a estrutura das micropartículas. A extração deste solvente para a fase aquosa, motivado pela sua elevada afinidade com a água, originou aparecimento de poros e de uma estrutura interna oca nas micropartículas, visível nas micrografas de SEM. Aparentemente, o arraste de material, consequência da rápida extração do DMF para a fase aquosa, terá tido repercussões sobre o tamanho das micropartículas, uma vez que estas apresentam um tamanho superior, quando comparadas com as de PLA-DEX, exibindo ainda poros à sua superfície.

Os resultados obtidos para a eficiência de encapsulamento revelam que este valor é cerca de metade do correspondente à dexametasona, certamente consequência da elevada solubilidade da cisplatina em água, o que resulta numa maior perda de fármaco para a fase aquosa. Não obstante o facto da extração do DMF para a fase aquosa contribuir para uma maior perda de fármaco, o que se repercute numa menor eficiência de encapsulamento. Estes resultados sugerem que para o encapsulamento deste fármaco dever-se-ia ter utilizado um solvente com menor afinidade para a água.

Considerando a menor quantidade de fármaco encapsulado e a possibilidade de interação entre o PLA e a cisplatina, é possível justificar que apenas se tenha conseguido a libertação de uma pequena quantidade de fármaco cerca de 6%. Concluiu-se que devido à interação fármaco/polímero, a libertação do fármaco retido na matriz polimérica seria dificultada. Em última instância, a seleção de um polímero com uma taxa de degradação superior ou a aplicação de uma técnica de encapsulamento que permitisse uma EE mais elevada,

parecem constituir uma boa alternativa para se conseguir melhorar o desempenho enquanto SLC.

Tal como seria de esperar, a incorporação das micropartículas (PLA-CDDP) em hidrogéis de quitosano introduz uma resistência adicional à libertação do fármaco. Efetivamente, comparando a percentagem de libertação final nos vários sistemas, é possível concluir que ocorre uma diminuição deste parâmetro, aparentemente relacionada com o tipo de reticulação e com a concentração de genipin utilizado nos hidrogéis co-reticulados. Estes resultados permitem concluir que é possível modelar a taxa de libertação do fármaco, conjugando estas variáveis. No entanto, mais estudos são necessários para retirar estas conclusões de forma inequívoca.

Outro aspeto interessante que se prende com a incorporação das micropartículas nos hidrogéis está relacionada com o facto de se ter verificado uma diminuição do *initial burst release*, tendo-se verificado que se obtêm perfis mais lentos, caracterizados por uma libertação mais gradual de fármaco.

6 PERSPETIVAS FUTURAS

Face aos resultados obtidos, facilmente se deduz que muitos problemas precisam de ser ultrapassados.

Um dos primeiros a ser detetado prende-se com a necessidade de promover a total solubilização da dexametasona na fase orgânica, nomeadamente com recurso a um co-solvente, de modo a evitar os problemas detetados.

No que diz respeito aos ensaios das micropartículas carregadas com cisplatina, a substituição de DMF por um solvente alternativo parece ser outro tópico para trabalho futuro, dado que este solvente teve efeito sobre a estrutura das micropartículas e sobre a eficiência de encapsulamento obtida. O facto deste solvente apresentar elevada afinidade com a água promoveu a sua extração para a fase aquosa, com conseqüente formação de partículas com o interior oco. Por outro lado, é possível que o fármaco tenha sido removido da fase orgânica juntamente com o solvente.

As baixas percentagens de incorporação de fármaco, deverão ser contornadas através de métodos alternativos, nomeadamente usando um método de extração e evaporação do solvente (EES) com recurso a uma dupla emulsão, como o intuito de diminuir a perda de fármaco para a fase aquosa durante a preparação da emulsão, aumentando assim a eficiência de encapsulamento.

Por outro lado, a preparação de micropartículas a partir de polímeros com uma taxa de degradação superior deverá, em princípio, permitir a libertação total do fármaco. Isto é particularmente relevante no caso da cisplatina.

Por fim, verificou-se também que a incorporação em hidrogéis, de diferentes tipos (reticulados fisicamente ou co-reticulados com varias concentrações de genipin) permitirão obter diferentes perfis de libertação. Estes resultados, muito promissores, precisam ser melhor explorados.

Devido à escassez de tempo, não foi possível avaliar a reprodutibilidade dos ensaios, aspeto que terá de ser avaliado no futuro.

BIBLIOGRAFIA

- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). *Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery*. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 100(1), 5–28.
- Allen, T. (1996). *Particle Size Measurement: Volume 1: Powder sampling and particle size measurement*. (B. Scarlett, Ed.), 5th ed., p. 483. Netherlands, Springer.
- Almeida, I. F., Pereira, T., Silva, N. H. C. S., Gomes, F. P., Silvestre, A. J. D., Freire, C. S. R., ... Costa, P. C. (2014). *Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 86(3), 332–336.
- Annapragada, A., & Adjei, A. (1996). *An analysis of the Fraunhofer Diffraction method for particle size distribution analysis and its application to aerosolized sprays*. *International Journal of Pharmaceutics*, 127, 219–227.
- Anderson, J. M., & Shive, M. S. (1997). *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(1), 5–24.
- Anderson, J. M., & Shive, M. S. (2012). *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 72–82.
- Andr, A., Taverdet, J., & Jay, J. (2001). *Microencapsulation par evaporation de solvant*. *European Polymer Journal*, 37, 955–963.
- Angelova, N., & Hunkeler, D. (1999). *Rationalizing the design of polymeric biomaterials*. *Trends in Biotechnology*, 17(10), 409–421.
- Ataman-Onal, Y., Munier, S., Ganée, A., Terrat, C., Durand, P.-Y., Battail, N., Verrier, B. (2006). *Surfactant-free anionic PLA nanoparticles coated with HIV-1 p24 protein induced enhanced cellular and humoral immune responses in various animal models*. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 112(2), 175–185.
- Auras, R., Lim, L., Selke, S. E. M., & Tsuji, H. (2010). *Poly (lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing and application*. New Jersey: Wiley.
- Bailey, N. a., Sandor, M., Kreitz, M., & Mathiowitz, E. (2002). *Comparison of the enthalpic relaxation of poly(lactide-co-glycolide) 50:50 nanospheres and raw polymer*. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(8), 1868–1872.
- Bao, T.-Q., Franco, R. A., & Lee, B.-T. (2012). *Preparation and characterization of a novel 3D scaffold from poly(ϵ -caprolactone)/biphasic calcium phosphate hybrid composite microspheres adhesion*. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 76–83.
- Behera, B. K. (2013). *Pharmaceutical Applications of Lactides and Glycolides : A Review*. *Journal of Medical and Pharmaceutical Innovation (JMPI) 1*(1), 1–5.
- Bertrand, N., Leclair, G., & Hildgen, P. (2007). *Modeling drug release from bioerodible microspheres using a cellular automaton*. *International Journal of Pharmaceutics*, 343(1-2), 196–207.
- Bezemer, J. M., Radersma, R., Grijpma, D. W., Dijkstra, P. J., van Blitterswijk, C. a, & Feijen, J. (2000). *Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers: 2. Modulation of release rate*. *Journal of Controlled Release*, 67(2-3), 249–260.
- Blanco-Prieto, M. J., Besseghir, K., Zerbe, O., Andris, D., Orsolini, P., Heimgartner, F., Gander, B. (2000). *In vitro and in vivo evaluation of a somatostatin analogue released from PLGA microspheres*. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 67(1), 19–28.
- Bolton E, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH. *PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Chapter 12 IN Annual Reports in Computational Chemistry*, 4, American Chemical Society, Washington, DC, 2008.
- Bonartsev, A., Boskhomdzhiyev, A., Voinova, V., Makhina, T., Myshkina, V., Yakovlev, S., Iordanskii, A. (2012). *Degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and its derivatives : characterization and kinetic behavior*. *Chemistry & Chemical Technology*, 6(4), 385–392.
- Bragagni, M., Beneitez, C., Martín, C., Hernán Pérez de la Ossa, D., Mura, P. A., & Gil-Alegre, M. E. (2013). *Selection of PLA polymers for the development of injectable prilocaine controlled*

- release microparticles: usefulness of thermal analysis*. International Journal of Pharmaceutics, 441(1-2), 468–475.
- Burkersroda, F. von, Schedl, L., & Göpferich, A. (2002). *Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion*. Biomaterials, 23(21), 4221–4231.
- Buwalda, S. J., Boere, K. W. M., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2014). *Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials*. Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society.
- Castilla-Cortázar, I., Más-Estellés, J., Meseguer-Dueñas, J. M., Escobar Ivirico, J. L., Marí, B., & Vidaurre, a. (2012). *Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly(ϵ -caprolactone) network*. Polymer Degradation and Stability, 97(8), 1241–1248.
- Cepeda, V., Fuertes, M. a, Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., & Pérez, J. M. (2007). *Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 7(1), 3–18.
- Chasin, M., & Langer, R. (1990). Polyamides as Drug Delivery System. In M. Chasin & R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (pp. 43–70). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Chavalitpanya, K., & Phattanarudee, S. (2013). *Poly(Lactic Acid)/Polycaprolactone Blends Compatibilized with Block Copolymer*. Energy Procedia, 34, 542–548.
- Chen, C. C., Chueh, J. Y., Tseng, H., Huang, H. M., & Lee, S. Y. (2003). *Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends*. Biomaterials, 24(7), 1167–1173.
- Chen, W., & Tong, Y. W. (2012). *PHBV microspheres as neural tissue engineering scaffold support neuronal cell growth and axon-dendrite polarization*. Acta Biomaterialia, 8(2), 540–548.
- Chen, Y., Zhou, S., & Li, Q. (2011). *Mathematical modeling of degradation for bulk-erosive polymers: applications in tissue engineering scaffolds and drug delivery systems*. Acta Biomaterialia, 7(3), 1140–1149.
- Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F. X., Farokhzad, O. C. (2007). *Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery*. Biomaterials, 28(5), 869–876.
- Chien, Y. W., & Lin, S. (2007). *Drug Delivery : Controlled Release - Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. (1082–1103). Informa Healthcare USA.
- Coimbra, M., Rijcken, C. J. F., Stigter, M., Hennink, W. E., Storm, G., & Schiffelers, R. M. (2012). *Antitumor efficacy of dexamethasone-loaded core-crosslinked polymeric micelles*. Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society, 163(3), 361–367.
- Coimbra, P. a, De Sousa, H. C., & Gil, M. H. (2008). *Preparation and characterization of flurbiprofen-loaded poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres*. Journal of Microencapsulation, 25(3), 170–178.
- Costa, M. S., Duarte, A. R. C., Cardoso, M. M., & Duarte, C. M. M. (2007). *Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 328(1), 72–77.
- Crétois, R., Follain, N., Dargent, E., Soulestin, J., Bourbigot, S., Marais, S., & Lebrun, L. (2014). *Microstructure and barrier properties of PHBV/organoclays bionanocomposites*. Journal of Membrane Science, 467, 56–66.
- Cui, L., Jia, J., Guo, Y., Liu, Y., & Zhu, P. (2014). *Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin*. Carbohydrate Polymers, 99, 31–38.
- Damgé, C., Maincent, P., & Ubrich, N. (2007). *Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats*. Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society, 117(2), 163–170.
- Darney, P. D., Monroe, S. E., Klaisle, C. M., & Alvarado, A. (1989). *Clinical evaluation of the Capronor contraceptive implant: Preliminary report*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 160(5), 1292–1295.
- Daugherty, A. L., Cleland, J. L., Duenas, E. M., & Mrsny, J. (1997). *Pharmacological modulation of the tissue response to implanted polylactic-co-glycolic acid microspheres*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 44(1637), 89–102.
- Dawes, G. J. S., Fratila-Apachitei, L. E., Necula, B. S., Apachitei, I., van Leeuwen, J. P. T. M., Duszczuk, J., & Eijken, M. (2012). *Effects of dexamethasone-loaded PLGA microspheres on human fetal osteoblasts*. Journal of Biomaterials Applications, 27(4), 477–483.
- Desoize, B., & Madoulet, C. (2002). *Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 42(3), 317–325.

- Devi, G. N. R., Prathyusha, V., Shanthakumari, K., & Rahaman, S. A. (2013). *Development and Validation of UV-Spectrophotometric Method for the Estimation of Dexamethasone Sodium Phosphate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form*. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 3(7), 5055–5061.
- Dhanaraju, M. D., Vema, K., Jayakumar, R., & Vamsadhara, C. (2003). *Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones*. International Journal of Pharmaceutics, 268(1-2), 23–29.
- Du, G. C., Chen, J., Yu, J., & Lun, S. (2001). *Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with Ralstonia eutropha*. Biochemical Engineering Journal, 8(2), 103–110.
- Duan, B., & Wang, M. (2010). *Encapsulation and release of biomolecules from Ca-P/PHBV nanocomposite microspheres and three-dimensional scaffolds fabricated by selective laser sintering*. Polymer Degradation and Stability, 95(9), 1655–1664.
- Dubernet, C. (1995). *Thermoanalysis of microspheres*. Thermochimica Acta, 248, 259–269.
- El-Rehim, H. A. A. (2005). *Properties and biotic hydrolysis of radiation crosslinked poly(ϵ -caprolactone)*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 229(2), 293–301.
- Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). *Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems*. Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society, 161(1), 38–49.
- Florea, A.-M., & Büsselberg, D. (2011). *Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects*. Cancers, 3(1), 1351–1371
- Folkman, J., & Long, D. M. (1964). *The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy*. Journal of Surgical Research, 4(3), 139–142.
- Ford, J. L., & Mann, T. E. (2012). *Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection*. Advanced Drug Delivery Reviews, 64(5), 422–430.
- Freiberg, S., Zhu, X. X. (2004). *Polymer microspheres for controlled drug release*. International Journal of Pharmaceutics, 282(1-2), 1–18.
- Fu, G., & Soboyejo, W. O. (2011). *Investigation of swellable poly (N-isopropylacrylamide) based hydrogels for drug delivery*. Materials Science and Engineering: C, 31(5), 1084–1090.
- Fuertes, M. A., Alonso, C., & Pérez, J. M. (2003). *Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance*. Chemical Reviews, 103(3), 645–662.
- Fujiyama, J., Nakase, Y., Osaki, K., Sakakura, C., Yamagishi, H., & Hagiwara, A. (2003). *Cisplatin incorporated in microspheres: development and fundamental studies for its clinical application*. Journal of Controlled Release, 89(3), 397–408.
- Gaignaux, A., Réeff, J., Siepmann, F., Siepmann, J., De Vriese, C., Goole, J., & Amighi, K. (2012). *Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 437(1-2), 20–28.
- Galeska, I., Kim, T.-K., Patil, S. D., Bhardwaj, U., Chattopadhyay, D., Papadimitrakopoulos, F., & Burgess, D. J. (2005). *Controlled release of dexamethasone from PLGA microspheres embedded within polyacid-containing PVA hydrogels*. The AAPS Journal, 7(1), 231–240.
- Gan, Z. (1997). *Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) film in phosphate buffer solution containing lipases*. Polymer Degradation and Stability, 3910(56), 209–213.
- Gao, L., Gan, H., Meng, Z., Gu, R., Wu, Z., Zhang, L. Dou, G. (2014). *Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability*. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 117, 398–405.
- Gonzalo, T., Lollo, G., Garcia-Fuentes, M., Torres, D., Correa, J., Riguera, R., ... Alonso, M. J. (2013). *A new potential nano-oncological therapy based on polyamino acid nanocapsules*. Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society, 169(1-2), 10–16.
- Gryparis, E. C., Hatziapostolou, M., Papadimitriou, E., & Avgoustakis, K. (2007). *Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 67(1), 1–8.
- Gu, B., & Burgess, D. J. (2014). *Polymeric Materials in Drug Delivery*. - Natural and Synthetic Biomedical Polymers (333–349). storrs: Elsevier.

- Gunaratne, L. M. W. K., & Shanks, R. A. (2005). *Multiple melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC*. *European Polymer Journal*, *41*(12), 2980–2988.
- Gupta, A. Sen, & Lopina, S. T. (2004). *Synthesis and characterization of l-tyrosine based novel polyphosphates for potential biomaterial applications*. *Polymer*, *45*(14), 4653–4662.
- Hassani Najafabadi, A., Abdouss, M., & Faghihi, S. (2014). *Synthesis and evaluation of PEG-O-chitosan nanoparticles for delivery of poor water soluble drugs: Ibuprofen*. *Materials Science and Engineering: C*, *41*, 91–99.
- Herrero-Vanrell, R., Bravo-Osuna, I., Andrés-Guerrero, V., Vicario-de-la-Torre, M., & Molina-Martínez, I. T. (2014). *The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies*. *Progress in Retinal and Eye Research*, 1-17.
- Herrmann, J., & Bodmeier, R. (1998). *Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *45*(1), 75–82.
- Hoekstra, J. W. M., Ma, J., Plachokova, A. S., Bronkhorst, E. M., Bohner, M., Pan, J., van den Beucken, J. J. J. P. (2013). *The in vivo performance of CaP/PLGA composites with varied PLGA microsphere sizes and inorganic compositions*. *Acta Biomaterialia*, *9*(7), 7518–7526.
- Hu, X., Zhou, J., Zhang, N., Tan, H., & Gao, C. (2008). *Preparation and properties of an injectable scaffold of poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles/chitosan hydrogel*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *1*(4), 352–359.
- Ikada, Y., & Tsuji, H. (2000). *Biodegradable polyesters for medical and ecological applications*. *Macromolecular Rapid Communications*, *21*(3), 117–132.
- Jain, D. S., Athawale, R. B., Bajaj, A. N., Shrikhande, S. S., Goel, P. N., Nikam, Y., & Gude, R. P. (2013). *Poly lactic acid (PLA) nanoparticles sustain the cytotoxic action of temozolomide in C6 Glioma cells*. *Biomedicine & Aging Pathology*, *3*(4), 201–208.
- Jain, R. A. (2000). *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*. *Biomaterials*, *21*(23), 2475–2490.
- Jayasuriya, a. C., & Darr, A. J. (2013). *Controlled release of cisplatin and cancer cell apoptosis with cisplatin encapsulated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles*. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, *6*(5), 586–592.
- Jia, Z. A. N., Dequan, Z. H. U., & Fenwing, T. A. N. (2006). *Preparation of Thermosensitive Chitosan Formulations Containing Microparticles Used as Injectable Drug Delivery System*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *14*(2), 235–241.
- Jiang, M., Yi, X., Hsu, S., Wang, C., & Dong, Z. (2004). *Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis : dependence on p53 transcriptional activity*. *American Journal of Physiology*, *287*, 1140–1147.
- Johansen, P., Men, Y., Merkle, H. P., & Gander, B. (2000). *Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *50*(1), 129–146.
- Johansen, P., Moon, L., Tamber, H., Merkle, H. P., Gander, B., & Sesardic, D. (1999). *Immunogenicity of single-dose diphtheria vaccines based on PLA/PLGA microspheres in guinea pigs*. *Vaccine*, *18*(3-4), 209–215.
- Jordan, P., & Carmo-Fonseca, M. (2000). *Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity*. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *57*(8-9), 1229–1235.
- Joshi, G., Kumar, A., & Sawant, K. (2014). *Enhanced bioavailability and intestinal uptake of Gemcitabine HCl loaded PLGA nanoparticles after oral delivery*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *60*, 80–89.
- Ke, S., Huang, H., Ren, L., & Wang, Y. (2009). *Nearly constant dielectric loss behavior in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biodegradable polyester*. *Journal of Applied Physics*, *105*(9).
- Kemala, T., Budianto, E., & Soegiyono, B. (2012). *Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(ϵ -caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier*. *Arabian Journal of Chemistry*, *5*(1), 103–108.
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). *Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates*. *Process Biochemistry*, *40*(2), 607–619.

- Kim, I., Byeon, H. J., Kim, T. H., Lee, E. S., Oh, K. T., Shin, B. S., Youn, Y. S. (2012). *Doxorubicin-loaded highly porous large PLGA microparticles as a sustained- release inhalation system for the treatment of metastatic lung cancer*. *Biomaterials*, 33(22), 5574–5583.
- Kim, I., Byeon, H. J., Kim, T. H., Lee, E. S., Oh, K. T., Shin, B. S., Youn, Y. S. (2013). *Doxorubicin-loaded porous PLGA microparticles with surface attached TRAIL for the inhalation treatment of metastatic lung cancer*. *Biomaterials*, 34(27), 6444–6453.
- Kim, K. K., & Pack, D. W. (2006). *Microspheres for Drug Delivery*. *BioMEMS and biomedical Nanotechnology (Volume I)* (19-50). Springer.
- Kimura, H., & Ogura, Y. (2012). *Biodegradable polymers for ocular drug delivery*. *International Journal of Ophthalmology*, 215(3), 143-155.
- Kolakovic, R., Peltonen, L., Laukkanen, A., Hirvonen, J., & Laaksonen, T. (2012). *Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 82(2), 308–315.
- Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2013). *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers and plastics from renewable resources*. *Material Technology*, 47(1), 23–30.
- Lakshmi, S., Katti, D. ., & Laurencin, C. . (2003). *Biodegradable polyphosphazenes for drug delivery applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(4), 467–482.
- Lamalle-Bernard, D., Munier, S., Compagnon, C., Charles, M.-H., Kalyanaraman, V. S., Delair, T., ... Ataman-Onal, Y. (2006). *Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity*. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 115(1), 57–67.
- Lanao, R. P. F., Leeuwenburgh, S. C. G., Wolke, J. G. C., & Jansen, J. a. (2011). *In vitro degradation rate of apatitic calcium phosphate cement with incorporated PLGA microspheres*. *Acta Biomaterialia*, 7(9), 3459–68.
- Lassalle, V., & Ferreira, M. L. (2007). *PLA nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation*. *Macromolecular Bioscience*, 7(6), 767–783.
- Lebourg, M., Antón, J. S., & Ribelles, J. L. G. (2008). *Porous membranes of PLLA–PCL blend for tissue engineering applications*. *European Polymer Journal*, 44(7), 2207–2218.
- Lee, S. H., Mok, H., Lee, Y., & Park, T. G. (2011). *Self-assembled siRNA-PLGA conjugate micelles for gene silencing*. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 152(1), 152–158.
- Lee, S. H., Zhang, Z., & Feng, S.-S. (2007). *Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery*. *Biomaterials*, 28(11), 2041–2050.
- Lee, Y. S., Lowe, J. P., Gilby, E., Perera, S., & Rigby, S. P. (2010). *The initial release of cisplatin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres*. *International Journal of Pharmaceutics*, 383(1-2), 244–254.
- Lemaire, V., Bélair, J., & Hildgen, P. (2003). *Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process*. *International Journal of Pharmaceutics*, 258(1-2), 95–107.
- Leo, E., Forni, F., & Bernabei, M. T. (2000). *Surface drug removal from ibuprofen-loaded PLA microspheres*. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(1), 1–9.
- Levy-Nissenbaum, E., Khan, W., Pawar, R. P., Tabakman, R., Naftali, E., Winkler, I., ... Domb, A. J. (2012). *Pharmacokinetic and efficacy study of cisplatin and paclitaxel formulated in a new injectable poly(sebacic-co-ricinoleic acid) polymer*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 82(1), 85–93.
- Li, D., Guo, G., Fan, R., Liang, J., Deng, X., Luo, F., & Qian, Z. (2013). *PLA/F68/dexamethasone implants prepared by hot-melt extrusion for controlled release of anti-inflammatory drug to implantable medical devices: I. Preparation, characterization and hydrolytic degradation study*. *International Journal of Pharmaceutics*, 441(1-2), 365–372.
- Li, M., Rouaud, O., & Poncet, D. (2008). *Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches*. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1-2), 26–39.

- Li, R., Feng, F., Wang, Y., Yang, X., Yang, X., & Yang, V. C. (2014). *Folic acid-conjugated pH/temperature/redox multi-stimuli responsive polymer microspheres for delivery of anti-cancer drug*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 429, 34-44.
- Li, W., Ding, Y., Rai, R., Roether, J. a., Schubert, D. W., & Boccaccini, A. R. (2014a.). *Preparation and characterization of PHBV microsphere/45S5 bioactive glass composite scaffolds with vancomycin releasing function*. *Materials Science and Engineering: C*, 41, 320–328.
- Li, Y., Lim, S., & Ooi, C. P. (2012). *Fabrication of cisplatin-loaded poly(lactide-co-glycolide) composite microspheres for osteosarcoma treatment*. *Pharmaceutical Research*, 29(3), 756–769.
- Lin, C.-C., & Anseth, K. S. (2013). *Degradation of Materials in the Biological Environment*. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine* (3^o edição), (716–728). Elsevier.
- Lin-Gibson, S., Walls, H. J., Kennedy, S. B., & Welsh, E. R. (2003). *Reaction kinetics and gel properties of blocked diisocyanate crosslinked chitosan hydrogels*. *Carbohydrate Polymers*, 54(2), 193–199.
- Lu, H., Kawazoe, N., Kitajima, T., Myoken, Y., Tomita, M., Umezawa, A., Ito, Y. (2012). *Spatial immobilization of bone morphogenetic protein-4 in a collagen-PLGA hybrid scaffold for enhanced osteoinductivity*. *Biomaterials*, 33(26), 6140–6146.
- Luo, Y., & Wang, Q. (2014). *Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 353–3567.
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. *Polymers*, 3(3), 1377–1397.
- Martinho, N. (2011). *Recent Advances in Drug Delivery Systems*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 02(05), 510–526.
- Masood, F., Chen, P., Yasin, T., Fatima, N., Hasan, F., & Hameed, A. (2013). *Encapsulation of Ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its in vitro application*. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 33(3), 1054–1060.
- Matsumoto, A., Matsukawa, Y., Suzuki, T., Yoshino, H., & Kobayashi, M. (1997). *The polymer-alloys method as a new preparation method of biodegradable microspheres: principle and application to cisplatin-loaded microspheres*. *Journal of Controlled Release*, 48(1), 19–27.
- McGinity, J., & O'Donnell, P. (1997). *Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(1), 25–42.
- Mo, L., Hou, L., Guo, D., Xiao, X., Mao, P., & Yang, X. (2012). *Preparation and characterization of teniposide PLGA nanoparticles and their uptake in human glioblastoma U87MG cells*. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1-2), 815–824.
- Mok, H., & Park, T. G. (2008). *Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(1), 105–111.
- Moreno, D., de Ilarduya, C. T., Bandrés, E., Buñuales, M., Azcona, M., García-Foncillas, J., & Garrido, M. J. (2008). *Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 503–12.
- Moreno, D., Zalba, S., Navarro, I., Tros de Ilarduya, C., & Garrido, M. J. (2010). *Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2), 265–274.
- Moura, M.J. (2014). *Preparação e caracterização de hidrogéis de quitosano para administração por via injetável*. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Moura, M. J., Figueiredo, M. M., & Gil, M. H. (2007). *Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels*. *Biomacromolecules*, 8(12), 3823–3829.
- Moura, M. J., Gil, M. H., & Figueiredo, M. M. (2013). *Delivery of cisplatin from thermosensitive co-cross-linked chitosan hydrogels*. *European Polymer Journal*, 49(9), 2504–2510.
- Mouraret, S., Houschyar, K. S., Hunter, D. J., Smith, A. A., Jew, O. S., Girod, S., & Helms, J. A. (2014). *Cell viability after osteotomy and bone harvesting: comparison of piezoelectric surgery and conventional bur*. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43(8), 966–971.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P., & Aminabhavi, T. M. (2008). *Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide)*

- and its derivatives. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 125(3), 193–209.
- Muraskin, W. (1996). *Origins of the children's vaccine initiative: the intellectual foundations*. *Social Science & Medicine*, 42(12), 1703–1719.
- Murthy, N., Wilson, S., & Sy, J. C. (2012). *Biodegradation of Polymers*. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 547–560). Elsevier.
- Muzzarelli, R. A. A. (2009). *Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids*. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1–9.
- Nakamura, Y., Hamabe, Y., Ikuta, H., Hyon, S.-H., & Kuroda, Y. (2002). *An experimental study of regional chemotherapy using CDDP-loaded microspheres for esophageal cancer*. *Surgery Today*, 32(4), 335–342.
- Nath, S. D., Son, S., Sadiasa, A., Min, Y. K., & Lee, B. T. (2013). *Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration*. *International Journal of Pharmaceutics*, 443(1-2), 87–94.
- Ng, S.-F., & Jumaat, N. (2014). *Carboxymethyl cellulose wafers containing antimicrobials: a modern drug delivery system for wound infections*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 51, 173–179
- NTP (National Toxicology Program). (2001). *Report on Carcinogens*, Twelfth Edition. Research Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 499.
- Okor, R. S. (1990). *Drug release on certain acrylate methacrylate-salicylic acid coacervated systems*. *Journal of Controlled Release*, 12(3), 195–200.
- Oliveira, M. J. A., Estefânia, O. S., Lúcia, M. A. B., Regina, M., Amato, V. S., Lugão, A. B., & Parra, D. F. (2014). *Influence of chitosan/clay in drug delivery of glucantime from PVP membranes*. *Radiation Physics and Chemistry*, 94, 194–198.
- Oun, R., Plumb, J. A., & Wheate, N. J. (2014). *A cisplatin slow-release hydrogel drug delivery system based on a formulation of the macrocycle cucurbit[7]uril, gelatin and polyvinyl alcohol*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 134C, 100 – 105.
- Palamoor, M., & Jablonski, M. M. (2013). *Synthesis, characterization and in vitro studies of celecoxib-loaded poly(ortho ester) nanoparticles targeted for intraocular drug delivery*. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 112, 474–82.
- Park, J. H., Lee, S., Kim, J.-H., Park, K., Kim, K., & Kwon, I. C. (2008). *Polymeric nanomedicine for cancer therapy*. *Progress in Polymer Science*, 33(1), 113–137.
- Patrício, T., & Bártolo, P. (2013). *Thermal Stability of PCL/PLA Blends Produced by Physical Blending Process*. *Procedia Engineering*, 59, 292–297.
- Patrício, T., Domingos, M., Gloria, & Bártolo, P. (2013a.). *Characterisation of PCL and PCL/PLA Scaffolds for Tissue Engineering*. *Procedia CIRP*, 5, 110–114.
- Petrella, A., Ercolino, S. F., Festa, M., Gentilella, A., Tosco, A., Conzen, S. D., & Parente, L. (2006). *Dexamethasone inhibits TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells via Bcl-xL induction*. *European Journal of Cancer*, 42(18), 3287–3293.
- Pich, A., Schiemenz, N., Corten, C., & Adler, H.-J. P. (2006). *Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) particles in O/W emulsion*. *Polymer*, 47(6), 1912–1920.
- Pillai, O., & Panchagnula, R. (2001). *Polymers in drug delivery*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), 447–451.
- Pouton, C. W., & Akhtar, S. (1996). *Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18(95), 133–162.
- Prior, S., Gamazo, C., Irache, J. M., Merkle, H. P., & Gander, B. (2000). *Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating Brucella infections*. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(1), 115–125.
- Prokopowicz, M., Szewczyk, A., & Sawicki, W. (2014). *The bioactivity studies of drug-loaded mesoporous silica-polydimethylsiloxane xerogels using FTIR and SEM/XEDS*. *Journal of Molecular Structure*, 1056-1057, 262–266.
- Rai, B., Teoh, S. H., Hutmacher, D. W., Cao, T., & Ho, K. H. (2005). *Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2*. *Biomaterials*, 26(17), 3739–3748.
- Rao, J. K., Ramesh, D. V., & Rao, K. P. (1994). *Implantable controlled delivery systems for proteins based on collagen — pHEMA hydrogels*. *Biomaterials*, 15(5), 383–389.

- Ravi, S., Peh, K. K., Darwis, Y., Murthy, B. K., Singh, T. R. R., & Mallikarjun, C. (2014). *Development and characterization of polymeric microspheres for controlled release protein loaded drug delivery system*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 70(3), 303–9.
- Raymond C. Rowe, P. S. and E. Q. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients. (R. C. Rowe, P. J. Sheskey, & M. E. Quinn, Eds.) (6th ed.). Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.
- Rigacci, L., Landi, C., Caruso, J. P., Puccini, B., Alterini, R., Carrai, V., Bosi, A. (2012). *Single dose palonosetron and dexamethasone in preventing nausea and vomiting induced by high emetogenic ABVD regimen in Hodgkin Lymphoma patients*. Leukemia Research, 36(2), 182–185.
- Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C. R., & Grenha, A. (2012). *Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery*. Journal of Functional Biomaterials, 3(3), 615–641.
- Rokhade, A. P., Shelke, N. B., Patil, S. A., & Aminabhavi, T. M. (2007). *Novel interpenetrating polymer network microspheres of chitosan and methylcellulose for controlled release of theophylline*. Carbohydrate Polymers, 69(4), 678–687.
- Romero, S., Stanton, G., DeFelice, J., Schreiber, F., Rago, R., & Fishman, M. (2007). *Phase II trial of thalidomide and daily oral dexamethasone for treatment of hormone refractory prostate cancer progressing after chemotherapy*. Urologic Oncology, 25(4), 284–290.
- Rouse, J. J., Mohamed, F., & van der Walle, C. F. (2007). *Physical ageing and thermal analysis of PLGA microspheres encapsulating protein or DNA*. International Journal of Pharmaceutics, 339(1-2), 112–120.
- Ruan, G., & Feng, S.-S. (2003). *Preparation and characterization of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol)–poly(lactic acid) (PLA–PEG–PLA) microspheres for controlled release of paclitaxel*. Biomaterials, 24(27), 5037–5044.
- Rudd, J. A., & Naylor, R. J. (1997). *The actions of ondansetron and dexamethasone to antagonise cisplatin-induced emesis in the ferret*. European Journal of Pharmacology, 322(1), 79–82.
- Ruel-Gariépy, E., Chenite, A., Chaput, C., Guirguis, S., & Leroux, J. (2000). *Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 203(1-2), 89–98.
- Sackett, C. K., & Narasimhan, B. (2011). *Mathematical modeling of polymer erosion: consequences for drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 418(1), 104–114.
- Samanta, H. S., & Ray, S. K. (2014). *Controlled release of tinidazole and theophylline from chitosan based composite hydrogels*. Carbohydrate Polymers, 106, 109–120.
- Saralidze, K., Koole, L. H., & Knetsch, M. L. W. (2010). *Polymeric Microspheres for Medical Applications*. Materials, 3(6), 3537–3564.
- Sasiak, a B., Bolgiano, B., Crane, D. T., Hockley, D. J., Corbel, M. J., & Sesardic, D. (2000). *Comparison of in vitro and in vivo methods to study stability of PLGA microencapsulated tetanus toxoid vaccines*. Vaccine, 19(7-8), 694–705.
- Sastre, R. L., Olmo, R., Teijón, C., Muñíz, E., Teijón, J. M., & Blanco, M. D. (2007). *5-Fluorouracil plasma levels and biodegradation of subcutaneously injected drug-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 338(1-2), 180–190.
- Schwartz, J. R., Sarvaiya, P. J., & Vedeckis, W. V. (2010). *Glucocorticoid receptor knock down reveals a similar apoptotic threshold but differing gene regulation patterns in T-cell and pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Molecular and Cellular Endocrinology, 320(1-2), 76–86.
- Sendil, D., Gürsel, I., Wise, D. L., & Hasirci, V. (1999). *Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles*. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 59(2), 207–217.
- Senuma, Y., Franceschin, S., Hilborn, J. G., Tissières, P., Bisson, I., & Frey, P. (2000). *Bioresorbable microspheres by spinning disk atomization as injectable cell carrier: from preparation to in vitro evaluation*. Biomaterials, 21(11), 1135–1144.
- Shaik, M. R., Korsapati, M., & Panati, D. (2012). *Polymers in Controlled Drug Delivery Systems*. International Journal of Pharma Sciences, 2(4), 112–116.
- Shi, X., Jiang, J., Sun, L., & Gan, Z. (2011). *Hydrolysis and biomineralization of porous PLA microspheres and their influence on cell growth*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 85(1), 73–80.

- Siepmann, J., & Göpferich, A. (2001). *Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(2-3), 229–247.
- Silva-Júnior, A. a., Scarpa, M. V., Pestana, K. C., Mercuri, L. P., de Matos, J. R., & de Oliveira, A. G. (2008). *Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique*. *Thermochimica Acta*, 467(1-2), 91–98.
- Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., & Trehan, (2004). Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(1), 1–23.
- Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., & Dhawan, S. (2004a.). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274(1-2), 1–33.
- Sultana, N., & Khan, T. H. (2012). *In Vitro Degradation of PHBV Scaffolds and nHA/PHBV Composite Scaffolds Containing Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering*. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1–12.
- Sun, H., Mei, L., Song, C., Cui, X., & Wang, P. (2006). *The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant*. *Biomaterials*, 27(9), 1735–1740.
- Takayama, T., Todo, M., & Tsuji, H. (2011). *Effect of annealing on the mechanical properties of PLA/PCL and PLA/PCL/LTI polymer blends*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(3), 255–60.
- Tamada, J. A., & Langer, R. (1993). *Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 552–556.
- Tan, H., Qin, F., Chen, D., Han, S., Lu, W., & Yao, X. (2013). *Study of glycol chitosan-carboxymethyl β-cyclodextrins as anticancer drugs carrier*. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 679–685.
- Tanihata, S., Oda, S., Nakai, S., & Uchiyama, T. (2004). *Antiemetic effect of dexamethasone on cisplatin-induced early and delayed emesis in the pigeon*. *European Journal of Pharmacology*, 484(2-3), 311–321.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. (2012). *Drug delivery systems: An updated review*. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2–11.
- Tiwari, S., & Verma, P. (2011). *Microencapsulation technique by solvent evaporation method (Study of effect of process variables)*. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2(8), 998–1005.
- Todo, M., Park, S.-D., Takayama, T., & Arakawa, K. (2007). *Fracture micromechanisms of bioabsorbable PLLA/PCL polymer blends*. *Engineering Fracture Mechanics*, 74(12), 1872–1883.
- Tsuruya, K., Yotsueda, H., Ikeda, H., Taniguchi, M., Masutani, K., Hayashida, H., Iida, M. (2008). *Involvement of p53-transactivated Puma in cisplatin-induced renal tubular cell death*. *Life Sciences*, 83(15-16), 550–556.
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). *Polymeric systems for controlled drug release*. *Chemical Reviews*, 99(11), 3181–3198.
- Umeki, N., Sato, T., Harada, M., Takeda, J., Saito, S., Iwao, Y., & Itai, S. (2010). *Preparation and evaluation of biodegradable microspheres containing a new potent osteogenic compound and new synthetic polymers for sustained release*. *International Journal of Pharmaceutics*, 392(1-2), 42–50.
- Vancoillie, G., Frank, D., & Hoogenboom, R. (2014). *Thermoresponsive poly(oligo ethylene glycol acrylates)*. *Progress in Polymer Science*, 39(6), 1074–1095.
- Vert, M., Mauduit, J., & Li, S. (1994). *Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity*. *Biomaterials*, 15(15), 1209–1213.
- Vilar, G., Tulla-Puche, J., & Albericio, F. (2012). *Polymers and drug delivery systems*. *Current Drug Delivery*, 9(4), 367–394.
- Vilos, C., Morales, F. A., Solar, P. A., Herrera, N. S., Gonzalez-Nilo, F. D., Aguayo, D. A., Velasquez, L. A. (2013). *Paclitaxel-PHBV nanoparticles and their toxicity to endometrial and primary ovarian cancer cells*. *Biomaterials*, 34(16), 4098–108.
- Vogelson, C. T. (2001, April). *Advances in drug delivery systems*. *Modern Drug Discovery*, 4(4), 49–50.

- Wang, S., Song, C., Chen, G., Guo, T., Liu, J., Zhang, B., & Takeuchi, S. (2005). *Characteristics and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/organophilic montmorillonite (PHBV/OMMT) nanocomposite*. *Polymer Degradation and Stability*, 87(1), 69–76.
- Wang, Y., Wang, X., Wei, K., Zhao, N., Zhang, S., & Chen, J. (2007). *Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres*. *Materials Letters*, 61(4-5), 1071–1076.
- Wells, R. (n.d.). Dexamethasone. Australian Government Analytical Laboratory. Australia
- Williams, S. F., & Martin, D. P. (1996). *Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy*, 91–103.
- Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). *The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century*. *Progress in Polymer Science*, 35(10), 1217–1256.
- Xu, Q., Chin, S. E., Wang, C.-H., & Pack, D. W. (2013). *Mechanism of drug release from double-walled PDLA(PLGA) microspheres*. *Biomaterials*, 34(15), 3902–3911.
- Yadav, A. K., Mishra, P., Mishra, A. K., Mishra, P., Jain, S., & Agrawal, G. P. (2007). *Development and characterization of hyaluronic acid-anchored PLGA nanoparticulate carriers of doxorubicin*. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(4), 246–257.
- Yan, X., & Gemeinhart, R. a. (2005). *Cisplatin delivery from poly(acrylic acid-co-methyl methacrylate) microparticles*. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 106(1-2), 198–208.
- Yang, Y., Chung, T., Bai, X., & Chan, W. (2000). *Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method*. *Chemical Engineering Science*, 55, 2223–2236.
- Yeo, Y., & Park, K. (2004). *Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems*. *Archives of Pharmacal Research*, 27(1), 1–12.
- Yoon, H. Y., Koo, H., Choi, K. Y., Chan Kwon, I., Choi, K., Park, J. H., & Kim, K. (2013). *Photo-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles with improved stability for in vivo tumor-targeted drug delivery*. *Biomaterials*, 34(21), 5273–5280.
- Yu, S. T., Lin, C. C., & Too, J. R. (2005). *PHBV production by Ralstonia eutropha in a continuous stirred tank reactor*. *Process Biochemistry*, 40(8), 2729–2734.
- Zhang, Z., Ortiz, O., Goyal, R., & Kohn, J. (2014). *Biodegradable Polymers*. In *Principles of Tissue Engineering* (4th ed., pp. 441–473). New Jersey: Elsevier.
- Zheltonozhskaya, T., Partsevskaya, S., Fedorchuk, S., Klymchuk, D., Gomza, Y., Permyakova, N., & Kunitskaya, L. (2013). *Micellar nanocontainers based on PAAm-b-PEO-b-PAAm triblock copolymers for poorly soluble drugs*. *European Polymer Journal*, 49(2), 405–418.
- Zhou, H., Lawrence, J. G., & Bhaduri, S. B. (2012). *Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review*. *Acta Biomaterialia*, 8(6), 1999–2016.

ANEXOS

ANEXO I – Percentagens Volumétricas de Partículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA para Encapsulamento de Dexametasona

Tabela I.1 - Percentagens volumétricas de partículas de PCL-DEX.

Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In							
0,0100	0,00	0,0679	0,00	0,460	0,18	3,12	1,30	21,2	5,64	144	0,00	976	0,00
0,0114	0,00	0,0771	0,00	0,523	0,27	3,55	1,33	24,1	5,78	163	0,00	1110	0,00
0,0129	0,00	0,0876	0,00	0,594	0,37	4,03	1,33	27,4	5,81	186	0,00	1260	0,00
0,0147	0,00	0,0995	0,00	0,675	0,47	4,58	1,32	31,1	5,73	211	0,00	1430	0,00
0,0167	0,00	0,113	0,00	0,767	0,59	5,21	1,32	35,3	5,56	240	0,00	1630	0,00
0,0189	0,00	0,128	0,00	0,872	0,70	5,92	1,34	40,1	5,28	272	0,00	1850	0,00
0,0215	0,00	0,146	0,00	0,991	0,81	6,72	1,43	45,6	4,85	310	0,00	2100	0,00
0,0244	0,00	0,166	0,00	1,13	0,90	7,64	1,63	51,8	4,24	352	0,00	2390	0,00
0,0278	0,00	0,188	0,00	1,28	0,98	8,68	1,97	58,9	3,42	400	0,00	2710	0,00
0,0315	0,00	0,214	0,00	1,45	1,05	9,86	2,44	66,9	2,43	454	0,00	3080	0,00
0,0358	0,00	0,243	0,00	1,65	1,11	11,2	3,03	76,0	1,42	516	0,00	3500	
0,0407	0,00	0,276	0,00	1,88	1,15	12,7	3,69	86,4	0,58	586	0,00		
0,0463	0,00	0,314	0,00	2,13	1,19	14,5	4,33	98,1	0,08	666	0,00		
0,0526	0,00	0,357	0,06	2,42	1,23	16,4	4,90	111	0,00	756	0,00		
0,0597	0,00	0,405	0,11	2,75	1,27	18,7	5,34	127	0,00	859	0,00		

Tabela I.2 - Percentagens volumétricas de partículas de PHBV-DEX.

Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In							
0,0100	0,00	0,0679	0,00	0,460	0,00	3,12	3,14	21,2	2,13	144	0,01	976	0,00
0,0114	0,00	0,0771	0,00	0,523	0,00	3,55	3,44	24,1	1,48	163	0,00	1110	0,00
0,0129	0,00	0,0876	0,00	0,594	0,00	4,03	3,84	27,4	1,01	186	0,00	1260	0,00
0,0147	0,00	0,0995	0,00	0,675	0,10	4,58	4,34	31,1	0,69	211	0,00	1430	0,00
0,0167	0,00	0,113	0,00	0,767	0,21	5,21	4,94	35,3	0,48	240	0,00	1630	0,00
0,0189	0,00	0,128	0,00	0,872	0,36	5,92	5,59	40,1	0,33	272	0,00	1850	0,00
0,0215	0,00	0,146	0,00	0,991	0,57	6,72	6,22	45,6	0,26	310	0,00	2100	0,00
0,0244	0,00	0,166	0,00	1,13	0,83	7,64	6,71	51,8	0,21	352	0,00	2390	0,00
0,0278	0,00	0,188	0,00	1,28	1,14	8,68	6,98	58,9	0,15	400	0,00	2710	0,00
0,0315	0,00	0,214	0,00	1,45	1,46	9,86	6,94	66,9	0,09	454	0,00	3080	0,00
0,0358	0,00	0,243	0,00	1,65	1,80	11,2	6,56	76,0	0,04	516	0,00	3500	
0,0407	0,00	0,276	0,00	1,88	2,11	12,7	5,87	86,4	0,03	586	0,00		
0,0463	0,00	0,314	0,00	2,13	2,40	14,5	4,95	98,1	0,03	666	0,00		
0,0526	0,00	0,357	0,00	2,42	2,65	16,4	3,94	111	0,03	756	0,00		
0,0597	0,00	0,405	0,00	2,75	2,89	18,7	2,97	127	0,02	859	0,00		

Tabela I.3 - Percentagens volumétricas de partículas de PLA-DEX.

Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In	Size (µm) % Volume In							
0,0100	0,00	0,0679	0,00	0,460	0,21	3,12	2,04	21,2	1,14	144	0,00	976	0,00
0,0114	0,00	0,0771	0,00	0,523	0,31	3,55	1,87	24,1	0,00	163	0,00	1110	0,00
0,0129	0,00	0,0876	0,00	0,594	0,43	4,03	1,77	27,4	0,00	186	0,00	1260	0,00
0,0147	0,00	0,0995	0,00	0,675	0,57	4,58	1,85	31,1	0,00	211	0,00	1430	0,00
0,0167	0,00	0,113	0,00	0,767	0,73	5,21	2,27	35,3	0,00	240	0,00	1630	0,00
0,0189	0,00	0,128	0,00	0,872	0,91	5,92	3,14	40,1	0,00	272	0,00	1850	0,00
0,0215	0,00	0,146	0,00	0,991	1,11	6,72	4,48	45,6	0,00	310	0,00	2100	0,00
0,0244	0,00	0,166	0,00	1,13	1,32	7,64	6,18	51,8	0,00	352	0,00	2390	0,00
0,0278	0,00	0,188	0,00	1,28	1,53	8,68	7,98	58,9	0,00	400	0,00	2710	0,00
0,0315	0,00	0,214	0,00	1,45	1,74	9,86	9,48	66,9	0,00	454	0,00	3080	0,00
0,0358	0,00	0,243	0,00	1,65	1,93	11,2	10,24	76,0	0,00	516	0,00	3500	
0,0407	0,00	0,276	0,00	1,88	2,09	12,7	9,94	86,4	0,00	586	0,00		
0,0463	0,00	0,314	0,00	2,13	2,20	14,5	8,47	98,1	0,00	666	0,00		
0,0526	0,00	0,357	0,07	2,42	2,23	16,4	6,08	111	0,00	756	0,00		
0,0597	0,00	0,405	0,13	2,75	2,17	18,7	3,38	127	0,00	859	0,00		

ANEXO I (CONTINUAÇÃO) – Percentagens Volumétricas de Partículas

de PCL, PHBV, PLA e PLGA

Tabela I.4 -Percentagens volumétricas de partículas de PLGA-DEX.

Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In
0,0100	0,00	0,0679	0,00	0,460	0,09	3,12	0,33	21,2	5,17	144	0,00	976	0,00
0,0114	0,00	0,0771	0,00	0,523	0,17	3,55	0,48	24,1	5,52	163	0,00	1110	0,00
0,0129	0,00	0,0876	0,00	0,594	0,28	4,03	0,77	27,4	5,90	186	0,00	1260	0,00
0,0147	0,00	0,0995	0,00	0,675	0,42	4,58	1,17	31,1	6,20	211	0,00	1430	0,00
0,0167	0,00	0,113	0,00	0,767	0,56	5,21	1,64	35,3	6,30	240	0,00	1630	0,00
0,0189	0,00	0,128	0,00	0,872	0,71	5,92	2,14	40,1	6,04	272	0,00	1850	0,00
0,0215	0,00	0,146	0,00	0,991	0,84	6,72	2,63	45,6	5,33	310	0,00	2100	0,00
0,0244	0,00	0,166	0,00	1,13	0,94	7,64	3,07	51,8	4,19	352	0,00	2390	0,00
0,0278	0,00	0,188	0,00	1,28	0,98	8,68	3,46	58,9	2,78	400	0,00	2710	0,00
0,0315	0,00	0,214	0,00	1,45	0,96	9,86	3,80	66,9	1,40	454	0,00	3080	0,00
0,0358	0,00	0,243	0,00	1,65	0,87	11,2	4,08	76,0	0,40	516	0,00	3500	0,00
0,0407	0,00	0,276	0,00	1,88	0,73	12,7	4,30	86,4	0,00	586	0,00		
0,0463	0,00	0,314	0,00	2,13	0,56	14,5	4,49	98,1	0,00	666	0,00		
0,0526	0,00	0,357	0,00	2,42	0,40	16,4	4,68	111	0,00	756	0,00		
0,0597	0,00	0,405	0,00	2,75	0,31	18,7	4,89	127	0,00	859	0,00		

ANEXO II – Avaliação da Eficiência de Encapsulamento das Micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA

Tabela II.1 - Absorvância das soluções padrão para a obtenção da curva de calibração de dexametasona em acetonitrilo/água (7:3).

<i>Concentração [µg/mL]</i>	<i>Absorvância</i>
20	0,9897
16	0,8309
12	0,6407
8	0,4166
4	0,2574

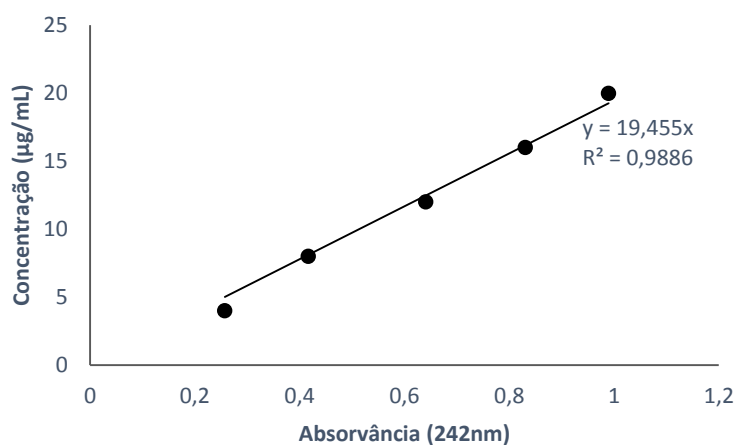


Figura II.1 - Curva de calibração de dexametasona em acetonitrilo/água (7:3).

Tabela II.2 - Avaliação da massa de dexametasona presente nas micropartículas.

<i>Amostra</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Concentração [µg/mL]</i>	<i>Fator de diluição</i>	<i>Volume [mL]</i>	<i>Massa de Fármaco [µg]</i>	<i>Massa de Fármaco [mg]</i>
<i>PCL</i>	1	0,6220	5	10	605,05	0,605
	2	0,6001	11,67	10	583,75	0,584
	3	0,5790	11,26	5	563,22	0,563
<i>PHBV</i>	1	0,4162	8,10	5	404,86	0,405
	2	0,3674	7,15	5	357,39	0,357
	3	0,4056	7,89	5	394,55	0,395
<i>PLA</i>	1	0,6162	11,99	5	599,41	0,599
	2	0,6136	11,94	5	596,88	0,597
	3	0,5961	11,60	5	579,86	0,580
<i>PLGA</i>	1	0,5515	10,73	5	536,47	0,536
	2	0,5647	10,99	5	549,31	0,549
	3	0,5105	9,93	5	496,59	0,497

ANEXO II (CONTINUAÇÃO) – Avaliação da Eficiência de Encapsulamento das Micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA

Tabela II.3 - Resultados obtidos para os valores da QTFE, QEFE e EE.

<i>Amostra</i>	<i>QTFE (%)</i>	<i>QEFE (%)</i>	<i>Média (%)</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>EE (%)</i>	<i>Média (%)</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>PCL</i>	1	5,50			60,45		
	2	5,33	5,34	0,07	58,59	59,54	0,76
	3	5,42			59,57		
<i>PHBV</i>	1	4,03			44,31		
	2	3,38	3,72	0,27	37,16	30,66	2,93
	3	3,74			41,18		
	9,09						
<i>PLA</i>	1	5,74			63,16		
	2	5,53	5,65	0,09	60,79	62,10	0,98
	3	5,67			62,35		
<i>PLGA</i>	1	4,97			55,64		
	2	4,97	4,88	0,12	54,68	53,70	1,36
	3	4,71			51,78		

QTFE – Quantidade Teórica de Fármaco Encapsulado

QEFE – Quantidade Experimental de Fármaco Encapsulado

EE – Eficiência de Encapsulamento

ANEXO III – Quantificação de Dexametasona Libertada a Partir das Micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.

Tabela III.1 - Absorvância das soluções padrão para a obtenção da curva de calibração de dexametasona em PBS (JASCO, modelo V-550).

<i>Concentração [µg/mL]</i>	<i>Absorvância</i>
20	0,7021
16	0,5926
12	0,4545
8	0,3109
4	0,1674

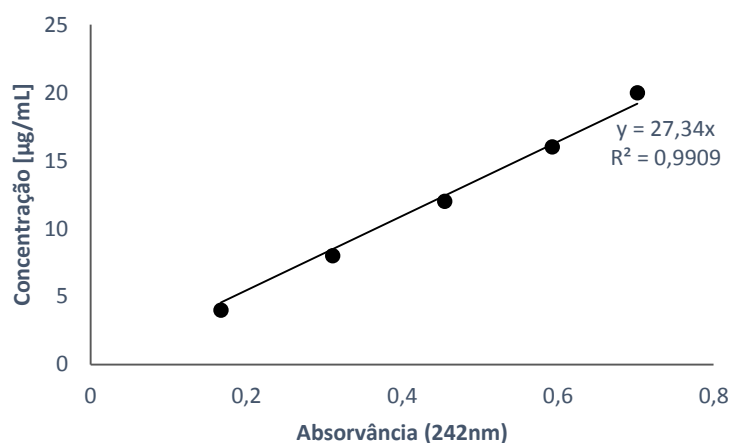


Figura III.1 - Curva de calibração de dexametasona em PBS (JASCO, modelo V-550).

Tabela III.2 - Absorvância das soluções padrão para a obtenção da curva de calibração de dexametasona em PBS (JASCO, modelo V-530).

<i>Concentração [µg/mL]</i>	<i>Absorvância</i>
20	0,7284
16	0,6755
12	0,4393
8	0,3733
4	0,1563

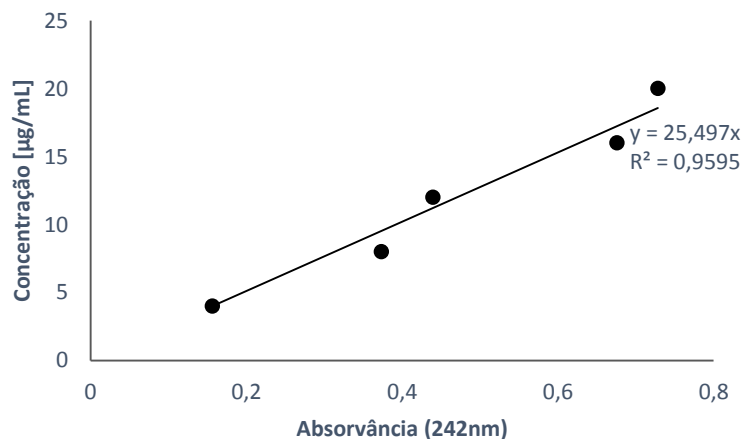


Figura III.2 - Curva de calibração de dexametasona em PBS (JASCO, modelo V-530).

ANEXO III (CONTINUAÇÃO) – Quantificação de Dexametasona Libertada a partir das Micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.

Tabela III.3 - Resultados dos ensaios de libertação de PCL-DEX.

Amostra	Tempo [d]	Absorvância	Concentração [µg/mL]	Factor de Diluição	Vol. [mL]	Massa [µg]	Massa [mg]	Massa acumulada [mg]	% Libertação
1	0,021	0,4770	13,0412	1	20	260,82	0,2608	0,2608	15,75
2	0,042	0,2453	6,7065	1	20	134,13	0,1341	0,3950	23,85
3	0,083	0,2218	6,0640	1	20	121,28	0,1213	0,5162	31,17
4	0,167	0,2315	6,3292	1	20	126,58	0,1266	0,6428	38,81
5	0,250	0,1749	4,7818	1	20	95,64	0,0956	0,7385	44,59
6	0,333	0,1367	3,7374	1	20	74,75	0,0747	0,8132	49,10
7	1	0,4459	12,1909	1	20	243,82	0,2438	1,0570	63,82
8	2	0,4762	13,0193	1	20	260,39	0,2604	1,3174	79,54
9	3	0,3339	9,1288	1	20	182,58	0,1826	1,5000	90,57
10	4	0,3193	8,7297	1	20	174,59	0,1746	1,6746	101,11
11	7	0,3551	9,0540	1	20	181,08	0,1811	1,8557	112,04
12	9	0,0188	0,4793	1	20	9,59	0,0096	1,8652	112,62
13	11	0,0029	0,0739	1	20	1,48	0,0015	1,8667	112,71
14	14	0,0002	0,0051	1	20	0,10	0,0001	1,8668	112,72
15	16	0,0015	0,0382	1	20	0,76	0,0008	1,8676	112,76
16	18	0,0008	0,0204	1	20	0,41	0,0004	1,8680	112,79
17	21	0,0010	0,0255	1	20	0,51	0,0005	1,8685	112,82
18	23	0,0026	0,0663	1	20	1,33	0,0013	1,8698	112,90
19	28	0,0064	0,1632	1	20	3,26	0,0033	1,8731	113,10
20	31	0,0056	0,1428	1	20	2,86	0,0029	1,8760	113,27
21	35	0,0062	0,1581	1	20	3,16	0,0032	1,8791	113,46
22	39	0,0053	0,1351	1	20	2,70	0,0027	1,8818	113,62
23	42	0,0052	0,1326	1	20	2,65	0,0027	1,8845	113,78
24	56	0,0125	0,3187	1	20	6,37	0,0064	1,8908	114,17

ANEXO III (CONTINUAÇÃO) – Quantificação de Dexametasona Libertada a partir das Micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.

Tabela III.4 - Resultados dos ensaios de libertação de PHBV-DEX.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo [d]</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Concentração [µg/mL]</i>	<i>Factor de Diluição</i>	<i>Vol [mL]</i>	<i>Massa [µg]</i>	<i>Massa [mg]</i>	<i>Massa acumulada [mg]</i>	<i>% Libertação</i>
<i>1</i>	0,021	0,8123	22,2083	1	20	444,17	0,4442	0,4442	39,18
<i>2</i>	0,042	0,5049	13,8040	1	20	276,08	0,2761	0,7202	63,54
<i>3</i>	0,083	0,3583	9,7959	1	20	195,92	0,1959	0,9162	80,82
<i>4</i>	0,167	0,1858	5,0798	1	20	101,60	0,1016	1,0178	89,78
<i>5</i>	0,250	0,1158	3,1660	1	20	63,32	0,0633	1,0811	95,37
<i>6</i>	0,333	0,0808	2,2091	1	20	44,18	0,0442	1,1253	99,27
<i>7</i>	1	0,1418	3,8768	1	20	77,54	0,0775	1,2028	106,11
<i>9</i>	3	0,0443	1,2112	1	20	24,22	0,0242	1,2270	108,25
<i>10</i>	4	0,0166	0,4538	1	20	9,08	0,0091	1,2361	109,05
<i>11</i>	7	0,0098	0,2499	1	20	5,00	0,0050	1,2411	109,49
<i>12</i>	9	0,0048	0,1224	1	20	2,45	0,0024	1,2435	109,70
<i>13</i>	11	0,0033	0,0841	1	20	1,68	0,0017	1,2452	109,85
<i>14</i>	14	0,0027	0,0688	1	20	1,38	0,0014	1,2466	109,97
<i>15</i>	16	0,0074	0,1887	1	20	3,77	0,0038	1,2504	110,31
<i>16</i>	18	0,0020	0,0510	1	20	1,02	0,0010	1,2514	110,40
<i>17</i>	21	0,0046	0,1173	1	20	2,35	0,0023	1,2537	110,60
<i>18</i>	23	0,0041	0,1045	1	20	2,09	0,0021	1,2558	110,79
<i>19</i>	28	0,0054	0,1377	1	20	2,75	0,0028	1,2586	111,03
<i>20</i>	31	0,0153	0,3901	1	20	7,80	0,0078	1,2664	111,72
<i>21</i>	35	0,0199	0,5074	1	20	10,15	0,0101	1,2765	112,61
<i>22</i>	39	0,0170	0,4334	1	20	8,67	0,0087	1,2852	113,38
<i>23</i>	42	0,0140	0,3570	1	20	7,14	0,0071	1,2923	114,01
<i>24</i>	56	0,0149	0,3799	1	20	7,60	0,0076	1,2999	114,68

ANEXO III (CONTINUAÇÃO) – Quantificação de Dexametasona Libertada a partir das Micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.

Tabela III.5 - Resultados dos ensaios de liberação de PLA-DEX.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo [d]</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Concentração [µg/mL]</i>	<i>Factor de Diluição</i>	<i>Vol. [mL]</i>	<i>Massa [µg]</i>	<i>Massa [mg]</i>	<i>Massa acumulada [mg]</i>	<i>% Liberação</i>
<i>1</i>	0,021	0,4910	13,4239	1	20	268,48	0,2685	0,2685	15,85
<i>2</i>	0,042	0,5826	15,9283	1	20	318,57	0,3186	0,5870	34,66
<i>3</i>	0,083	0,4382	11,9804	1	20	239,61	0,2396	0,8267	48,81
<i>4</i>	0,167	0,2151	5,8808	1	20	117,62	0,1176	0,9443	55,75
<i>5</i>	0,250	0,1541	4,2131	1	20	84,26	0,0843	1,0285	60,73
<i>6</i>	0,333	0,0662	1,8099	1	20	36,20	0,0362	1,0647	62,87
<i>7</i>	1	0,1275	3,4859	1	20	69,72	0,0697	1,1344	66,98
<i>8</i>	2	0,0512	1,3998	1	20	28,00	0,0280	1,1624	68,64
<i>9</i>	3	0,0212	0,5796	1	20	11,59	0,0116	1,1740	69,32
<i>10</i>	4	0,0072	0,1968	1	20	3,94	0,0039	1,1780	69,55
<i>11</i>	7	0,0200	0,5099	1	20	10,20	0,0102	1,1882	70,16
<i>12</i>	9	0,0098	0,2499	1	20	5,00	0,0050	1,1932	70,45
<i>13</i>	11	0,0047	0,1198	1	20	2,40	0,0024	1,1956	70,59
<i>14</i>	14	0,0059	0,1504	1	20	3,01	0,0030	1,1986	70,77
<i>15</i>	16	0,0069	0,1759	1	20	3,52	0,0035	1,2021	70,98
<i>16</i>	18	0,0069	0,1759	1	20	3,52	0,0035	1,2056	71,18
<i>17</i>	21	0,0044	0,1122	1	20	2,24	0,0022	1,2079	71,32
<i>18</i>	23	0,0056	0,1428	1	20	2,86	0,0029	1,2107	71,49
<i>19</i>	28	0,0093	0,2371	1	20	4,74	0,0047	1,2155	71,77
<i>20</i>	31	0,0187	0,4768	1	20	9,54	0,0095	1,2250	72,33
<i>21</i>	35	0,0091	0,2320	1	20	4,64	0,0046	1,2296	72,60
<i>22</i>	39	0,0089	0,2269	1	20	4,54	0,0045	1,2342	72,87
<i>23</i>	42	0,0092	0,2346	1	20	4,69	0,0047	1,2389	73,15
<i>24</i>	56	0,1730	4,4110	1	20	88,22	0,0882	1,3271	78,36

ANEXO III (CONTINUAÇÃO) – Quantificação de Dexametasona Libertada a partir das Micropartículas de PCL, PHBV, PLA e PLGA.

Tabela III.6 - Resultados dos ensaios de liberação de PLGA-DEX.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo [d]</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Concentração [µg/mL]</i>	<i>Factor de Diluição</i>	<i>Vol. [mL]</i>	<i>Massa [µg]</i>	<i>Massa [mg]</i>	<i>Massa acumulada [mg]</i>	<i>% Liberação</i>
1	0,021	0,5272	14,4136	1	20	288,27	0,2883	0,2883	19,49
2	0,042	0,1524	4,1666	1	20	83,33	0,0833	0,3716	25,12
3	0,083	0,1572	4,2978	1	20	85,96	0,0860	0,4576	30,93
4	0,167	0,1367	3,7374	1	20	74,75	0,0747	0,5323	35,99
5	0,250	0,1155	3,1578	1	20	63,16	0,0632	0,5955	40,26
6	0,333	0,1061	2,9008	1	20	58,02	0,0580	0,6535	44,18
7	1	0,3551	9,7084	1	20	194,17	0,1942	0,8476	57,30
8	2	0,5095	13,9297	1	20	278,59	0,2786	1,1262	76,14
9	3	0,2760	7,5458	1	20	150,92	0,1509	1,2772	86,34
10	4	0,2056	5,6211	1	20	112,42	0,1124	1,3896	93,94
11	7	0,1191	3,2562	1	20	65,12	0,0651	1,4547	98,34
12	9	0,0163	0,4456	1	20	8,91	0,0089	1,4636	98,95
13	11	0,0066	0,1804	1	20	3,61	0,0036	1,4672	99,19
14	14	0,0087	0,2379	1	20	4,76	0,0048	1,4720	99,51
15	16	0,0043	0,1176	1	20	2,35	0,0024	1,4743	99,67
16	18	0,0046	0,1258	1	20	2,52	0,0025	1,4769	99,84
17	21	0,0059	0,1613	1	20	3,23	0,0032	1,4801	100,06
18	23	0,0058	0,1586	1	20	3,17	0,0032	1,4832	100,27
19	28	0,0137	0,3746	1	20	7,49	0,0075	1,4907	100,78
20	31	0,0069	0,1886	1	20	3,77	0,0038	1,4945	101,04
21	35	0,0106	0,2898	1	20	5,80	0,0058	1,5003	101,43
22	39	0,0084	0,2297	1	20	4,59	0,0046	1,5049	101,74
23	42	0,0112	0,3062	1	20	6,12	0,0061	1,5110	102,15
24	56	0,0203	0,5550	1	20	11,10	0,0111	1,5221	102,90

ANEXO IV – Percentagem Volumétrica de Partículas de PLA para Encapsulamento de Cisplatina

Tabela IV.1 - Percentagens volumétricas de partículas de PLA-CDDP.

Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In	Size (µm)	% Volume In
0.0100	0,00	0,0679	0,00	0,460	0,12	3,12	1,78	21,2	7,33	144	0,00	976	0,00
0.0114	0,00	0,0771	0,00	0,523	0,22	3,55	1,80	24,1	6,42	163	0,00	1110	0,00
0.0129	0,00	0,0876	0,00	0,594	0,35	4,03	1,84	27,4	5,10	186	0,00	1260	0,00
0.0147	0,00	0,0995	0,00	0,675	0,50	4,58	1,89	31,1	3,59	211	0,00	1430	0,00
0.0167	0,00	0,113	0,00	0,767	0,69	5,21	1,98	35,3	2,13	240	0,00	1630	0,00
0.0189	0,00	0,128	0,00	0,872	0,89	5,92	2,11	40,1	0,98	272	0,00	1850	0,00
0.0215	0,00	0,146	0,00	0,991	1,09	6,72	2,35	45,6	0,27	310	0,00	2100	0,00
0.0244	0,00	0,166	0,00	1,13	1,29	7,64	2,73	51,8	0,00	352	0,00	2390	0,00
0.0278	0,00	0,188	0,00	1,28	1,47	8,68	3,31	58,9	0,00	400	0,00	2710	0,00
0.0315	0,00	0,214	0,00	1,45	1,61	9,86	4,09	66,9	0,00	454	0,00	3080	0,00
0.0358	0,00	0,243	0,00	1,65	1,71	11,2	5,04	76,0	0,00	516	0,00	3500	
0.0407	0,00	0,276	0,00	1,88	1,76	12,7	6,04	86,4	0,00	586	0,00		
0.0463	0,00	0,314	0,00	2,13	1,78	14,5	6,93	98,1	0,00	666	0,00		
0.0526	0,00	0,357	0,00	2,42	1,78	16,4	7,54	111	0,00	756	0,00		
0.0597	0,00	0,405	0,00	2,75	1,78	18,7	7,71	127	0,00	859	0,00		

ANEXO V – Avaliação da Eficiência de Encapsulamento das Micropartículas de PLA para Encapsulamento de Cisplatina

Tabela V.2 - Avaliação da massa de cisplatina presente nas micropartículas de PLA.

<i>Amostra</i>		<i>C</i> [µg/L]	<i>C</i> [mg/L]	<i>Vol. da amostra</i> [mL]	<i>Vol. de diluição</i> [mL]	<i>Vol. do meio</i> [mL]	<i>m Pt</i> [mg]	<i>m CDDP</i> [mg]
PLA	1+2	258	7,371	0,700	10	30	0,221	0,340
	3	199	5,686	0,350	10	15	0,085	0,131

Tabela V.3 - Resultados obtidos para os valores da QTFE, QEFE e EE.

<i>Amostra</i>		<i>QTFE</i> (%)	<i>QEFE</i> (%)	<i>Média</i> (%)	<i>Desvio Padrão</i>	<i>EE</i> (%)	<i>Média (%)</i>	<i>Desvio Padrão</i>
PLA	1+2		1,33			27,86		
	3	4,76	1,26	1,29	0,04	26,39	27,12	0,74

ANEXO VI – Quantificação de Cisplatina Libertada a partir das Micropartículas de PLA

Tabela VI.1 - Resultados dos ensaios de libertação de PLA-CDDP.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo [d]</i>	<i>Vol da amostra [mL]</i>	<i>Vol de diluição [mL]</i>	<i>Conc. [ppb]</i>	<i>Conc. [ppm]</i>	<i>Massa na amostra [mg]</i>	<i>Massa total [mg]</i>	<i>Massa inicial [mg]</i>	<i>Massa libertada (Pt) [mg]</i>	<i>Massa libertada (CDDP) [mg]</i>	<i>Massa libertada acumulada (CDDP) [mg]</i>	<i>% Libertação</i>
1	0,02	0,35	10	12,2	0,35	0,00035	0,00699	0,00000	0,00699	0,01076	0,01076	1,65
2	0,04	0,35	10	28,0	0,80	0,00080	0,01600	0,00664	0,00936	0,01439	0,02515	3,87
3	0,08	0,35	10	31,5	0,90	0,00090	0,01801	0,01520	0,00281	0,00432	0,02946	4,53
4	0,17	0,35	10	31,8	0,91	0,00091	0,01818	0,01711	0,00108	0,00166	0,03112	4,79
5	0,25	0,35	10	33,4	0,95	0,00095	0,01908	0,01727	0,00181	0,00278	0,03390	5,22
6	0,33	0,35	10	32,1	0,92	0,00046	0,01834	0,01813	0,00022	0,00033	0,03423	5,27
7	1	0,35	10	34,8	0,99	0,00050	0,01987	0,01788	0,00198	0,00305	0,03728	5,74
8	3	0,35	10	33,6	0,96	0,00096	0,01920	0,01937	-0,00017	-0,00026	0,03702	5,70
9	9	0,35	10	34,9	1,00	0,00100	0,01997	0,01824	0,00173	0,00266	0,03968	6,11
10	14	0,35	10	33,5	0,96	0,00096	0,01914	0,01897	0,00017	0,00026	0,03995	6,15
11	22	0,35	10	32,0	0,91	0,00091	0,01829	0,01819	0,00010	0,00015	0,04010	6,17

ANEXO VII – Quantificação de Fármaco (cisplatina) Libertado a partir dos Hidrogéis de Quitosano

Tabela VII.1 - Resultados dos ensaios de libertação de PLA-CDDP/C/GP.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo [d]</i>	<i>Vol.da amostra [mL]</i>	<i>Vol.de diluição [mL]</i>	<i>Conc. [ppb]</i>	<i>Conc. [ppm]</i>	<i>Massa na amostra [mg]</i>	<i>Massa total [mg]</i>	<i>Massa inicial [mg]</i>	<i>Massa libertada (Pt) [mg]</i>	<i>Massa libertada (CDDP) [mg]</i>	<i>Massa libertada acumulada (CDDP) [mg]</i>	<i>% Libertação</i>
1	0,02	0,35	10	5,9	0,17	0,00008	0,00336	0,00000	0,00336	0,00516	0,00516	0,83
2	0,04	0,35	10	6,9	0,20	0,00010	0,00393	0,00327	0,00065	0,00101	0,00617	0,99
3	0,08	0,35	10	9,2	0,26	0,00013	0,00525	0,00383	0,00142	0,00218	0,00835	1,34
4	0,13	0,35	10	9,9	0,28	0,00014	0,00565	0,00512	0,00054	0,00082	0,00918	1,47
5	0,17	0,35	10	10,2	0,29	0,00015	0,00585	0,00551	0,00034	0,00052	0,00970	1,55
6	0,25	0,35	10	12,3	0,35	0,00018	0,00703	0,00570	0,00132	0,00204	0,01173	1,88
7	0,33	0,35	10	12,6	0,36	0,00018	0,00717	0,00685	0,00032	0,00050	0,01223	1,96
8	1	0,35	10	12,2	0,35	0,00035	0,00697	0,00699	-0,00002	-0,00004	0,01219	1,95
9	3	0,35	10	12,3	0,35	0,00035	0,00703	0,00662	0,00041	0,00062	0,01282	2,05
10	5	0,35	10	11,5	0,33	0,00016	0,00657	0,00668	-0,00011	-0,00016	0,01266	2,03
11	7	0,35	10	11,4	0,33	0,00016	0,00651	0,00641	0,00011	0,00016	0,01282	2,05
12	15	0,35	10	11,0	0,31	0,00016	0,00629	0,00635	-0,00007	-0,00010	0,01272	2,04
13	21	0,35	10	10,8	0,31	0,00015	0,00617	0,00613	0,00004	0,00007	0,01278	2,05

ANEXO VII (CONTINUAÇÃO) – Quantificação de Fármaco (cisplatina) Libertado a partir dos Hidrogéis de

Quitosano

Tabela VII.2 - Resultados dos ensaios de libertação de PLA-CDDP/C/GP/GE5.CDDP.DEX.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo [d]</i>	<i>Vol da amostra [mL]</i>	<i>Vol de diluição [mL]</i>	<i>Conc. [ppb]</i>	<i>Conc. [ppm]</i>	<i>Massa na amostra [mg]</i>	<i>Massa total [mg]</i>	<i>Massa inicial [mg]</i>	<i>Massa libertada (Pt) [mg]</i>	<i>Massa libertada (CDDP) [mg]</i>	<i>Massa libertada acumulada (CDDP) [mg]</i>	<i>% Libertação</i>
I	0,02	0,35	10	12,9	0,37	0,00018	0,00735	0,00000	0,00735	0,01131	0,01131	1,75
2	0,04	0,35	10	15,4	0,44	0,00022	0,00880	0,00717	0,00164	0,00252	0,01383	2,13
3	0,08	0,35	10	17,5	0,50	0,00025	0,01001	0,00858	0,00142	0,00219	0,01601	2,47
4	0,13	0,35	10	19,2	0,55	0,00027	0,01095	0,00976	0,00119	0,00184	0,01785	2,76
5	0,17	0,35	10	19,2	0,55	0,00027	0,01095	0,01067	0,00028	0,00042	0,01827	2,82
6	0,25	0,35	10	19,7	0,56	0,00028	0,01126	0,01068	0,00059	0,00090	0,01917	2,96
7	0,33	0,35	10	19,6	0,56	0,00028	0,01119	0,01098	0,00021	0,00032	0,01949	3,01
8	1	0,35	10	19,2	0,55	0,00055	0,01097	0,01091	0,00006	0,00009	0,01959	3,02
9	3	0,35	10	20,8	0,59	0,00059	0,01189	0,01042	0,00146	0,00225	0,02184	3,37
10	5	0,35	10	19,9	0,57	0,00028	0,01137	0,01129	0,00008	0,00012	0,02196	3,39
11	7	0,35	10	19,4	0,55	0,00028	0,01109	0,01109	0,00000	0,00000	0,02196	3,39
12	15	0,35	10	18,9	0,54	0,00027	0,01080	0,01081	-0,00001	-0,00001	0,02195	3,39
13	21	0,35	10	18,4	0,53	0,00026	0,01051	0,01053	-0,00002	-0,00002	0,02192	3,38

ANEXO VII (CONTINUAÇÃO) – Quantificação de Fármaco (cisplatina) Libertado a partir dos Hidrogéis de

Quitosano

Tabela VII.3 - Resultados dos ensaios de libertação de PLA-CDDP/C/GP/GE20.

<i>Amostra</i>	<i>Tempo [d]</i>	<i>Vol da amostra [mL]</i>	<i>Vol de diluição [mL]</i>	<i>Conc. [ppb]</i>	<i>Conc. [ppm]</i>	<i>Massa na amostra [mg]</i>	<i>Massa total [mg]</i>	<i>Massa inicial [mg]</i>	<i>Massa libertada (Pt) [mg]</i>	<i>Massa libertada (CDDP) [mg]</i>	<i>Massa libertada acumulada (CDDP) [mg]</i>	<i>% Libertação</i>
<i>I</i>	0,02	0,35	10	6,8	0,20	0,00010	0,00391	0,00000	0,00391	0,00602	0,00602	0,91
<i>2</i>	0,04	0,35	10	8,3	0,24	0,00012	0,00474	0,00381	0,00092	0,00142	0,00744	1,12
<i>3</i>	0,08	0,35	10	10,0	0,29	0,00014	0,00573	0,00462	0,00111	0,00170	0,00914	1,37
<i>4</i>	0,13	0,35	10	10,5	0,30	0,00015	0,00603	0,00558	0,00044	0,00068	0,00982	1,48
<i>5</i>	0,17	0,35	10	11,0	0,32	0,00016	0,00631	0,00588	0,00043	0,00067	0,01049	1,58
<i>6</i>	0,25	0,35	10	11,8	0,34	0,00017	0,00674	0,00615	0,00059	0,00090	0,01139	1,71
<i>7</i>	0,33	0,35	10	12,1	0,35	0,00017	0,00691	0,00657	0,00034	0,00053	0,01192	1,79
<i>8</i>	1	0,35	10	12,6	0,36	0,00036	0,00722	0,00674	0,00048	0,00073	0,01266	1,90
<i>9</i>	3	0,35	10	12,5	0,36	0,00036	0,00714	0,00686	0,00029	0,00044	0,01309	1,97
<i>10</i>	5	0,35	10	12,0	0,34	0,00017	0,00686	0,00679	0,00007	0,00011	0,01320	1,99
<i>11</i>	7	0,35	10	11,9	0,34	0,00017	0,00680	0,00669	0,00011	0,00018	0,01338	2,01
<i>12</i>	15	0,35	10	11,2	0,32	0,00016	0,00640	0,00663	-0,00023	-0,00035	0,01303	1,96
<i>13</i>	21	0,35	10	11,0	0,31	0,00016	0,00629	0,00624	0,00005	0,00007	0,01310	1,97