

Universidade Federal do Ceará  
Centro de Ciências  
Programa de Pós-Graduação em Química

**MICELAS DE COPOLI(OXIALQUILENO)S: CARACTERIZAÇÃO,  
ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO DE FÁRMACO.**

Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro

Fortaleza  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA ELENIR NOBRE PINHO RIBEIRO

**MICELAS DE COPOLI(OXIALQUILENOS): CARACTERIZAÇÃO,  
ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO DE FÁRMACO.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Química

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria  
Pontes Silva Ricardo

Fortaleza

2010

## AGRADECIMENTOS

A Deus, na pessoa de Jesus Cristo, por me conceder a salvação e me sustentar até hoje, com liberdade para desfrutar da Sua presença e dando todas as condições para concluir este mestrado.

Aos meus pais, Antoniel (*in memoriam*) e Marizete, por me incentivarem desde cedo aos estudos e por ainda me encorajarem pensando na minha prosperidade.

Aos meus irmãos Eneida, Elenisse, João Carlos e Roberto por também acreditarem em mim e no potencial que Deus me deu para viver a vida.

Ao cunhado Pinho, por sempre agir como um pai e sempre me incentivar, acreditando que posso mais.

Ao meu esposo e também eterno namorado Leonardo. Seu apoio desde quando nos conhecemos na faculdade tem sido indispensável em todas as áreas de minha vida.

À minha preciosa família em Cristo que está por todo o mundo, em especial aos meus amigos e irmãos da Igreja Bíblica do Parque Rio Branco e da UFC. Sem vocês eu não conheceria o que significa viver em comunhão com Deus e, provavelmente, não estaria prosseguindo para conhecer a Sua vontade que é boa, perfeita e agradável.

À professora Nágila por investir e confiar em mim, por sua ajuda e compreensão.

À Carol, Samira e Ticiane pela colaboração e apoio no trabalho de pesquisa.

À Leônia pela forte e grande amizade que iniciou-se nos meus primeiros meses no Laboratório de Polímeros.

Aos inúmeros companheiros do Laboratório de Polímeros e às professoras pela confiança e ajuda durante a graduação e a pós-graduação. Em especial, minhas amigas “gastadeiras”: Ana Paula, Aliny, Clara, Karine, Janaína, Lillian e Samira. Se não fossem vocês, com certeza, eu gastaria menos (risos).

Ao Orlando pelos inúmeros “históricos” de favores e à Célia por ser mediadora da paz entre Orlando e eu (risos).

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de doutorado.

“Dizei a Deus: Que tremendos são os  
teus feitos!” Salmos 66: 3a

“Vide e vede as obras de Deus:  
tremendos feitos para com os filhos  
dos homens!” Salmos 66: 5

## RESUMO

A maioria dos candidatos a fármacos falha no seu progresso para formulações devido à sua baixa solubilidade em água. Para resolver este problema, copolímeros em bloco com propriedades surfactantes têm sido bastante investigados. O objetivo deste trabalho foi investigar os copolímeros F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ ),  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas 50/50 a 90/10, com proporção crescente do copolímero mais hidrofóbico ( $E_{43}B_{14}E_{43}$ ), a série de diblocos  $E_mB_n$  para carrear o fármaco modelo griseofulvina através de diferentes métodos de solubilização e estudar a sua liberação, bem como o estudo da solubilização dos fármacos quercetina e mangiferina nos copolímeros  $E_{65}G_5$  e  $E_{65}G_7E_{65}$  visando suas aplicações no carreamento e liberação controlada de fármacos. Utilizou-se a técnica de inversão de tubo para o estudo das propriedades geleificantes dos copolímeros F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas 50/50 a 90/10. Para a determinação da concentração micelar crítica (CMC) utilizou-se o método de solubilização de corante medida por fluorescência. A solubilidade dos fármacos griseofulvina, quercetina e mangiferina nos sistemas micelares foi medida por espectrofotometria UV-Vis e para os sistemas dos copolímeros  $E_{65}G_5$  e  $E_{65}G_7E_{65}$  utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os copolímeros puros e os sistemas contendo os fármacos foram caracterizados por técnicas de espectroscopia no infravermelho (FT-IR), espectroscopia RAMAN (FT-RAMAN), raios-X, tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer), e experimentos de liberação *in vitro* foram realizados para alguns dos sistemas. Os copolímeros F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , suas misturas, os diblocos da série  $E_mB_n$  e os copolímeros  $E_{65}G_5$  e  $E_{65}G_7E_{65}$  são promissores para administração de fármacos hidrofóbicos, pois apresentaram bons valores de capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ). Os copolímeros  $E_{65}G_5$  e  $E_{65}G_7E_{65}$  foram os que mais se destacaram na solubilização da quercetina (HPLC): seu sistema micelar aumentou a solubilidade aquosa da quercetina em 253 vezes a 25°C para ambos os copolímeros e 124 e 142 vezes a 37°C, para o dibloco e tribloco, respectivamente, e suas partículas apresentaram total eficiência de encapsulação da quercetina.

Palavras-chave: copolímeros em bloco, solubilização de fármacos, griseofulvina, quercetina, mangiferina.

## ABSTRACT

Almost half of drug candidates fail to progress to formulation development because of their low aqueous solubility. To solve this problem, block copolymers with surfactant properties have been investigated. The aim of this work was to investigate the copolymers F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ ),  $E_{43}B_{14}E_{43}$  and its mixtures 50/50 to 90/10, the  $E_{43}B_{14}E_{43}$  with composition higher than F87 and a series of diblock  $E_mB_n$  to encapsulate a model drug griseofulvin through different solubilization methods and study their release, and the study of solubilization of quercetin and mangiferin in the copolymers  $E_{65}G_5$  and  $E_{65}G_7E_{65}$  in order to their applications as systems for solubilization and delivery of hydrophobic drugs. We used the tube inversion technique for studying the gelling properties of copolymers F87, and its mixtures with  $E_{43}B_{14}E_{43}$  50/50 to 90/10. To determine the critical micelle concentration (CMC) it was used the dye solubilization technique with fluorescence assay. The solubility of drugs griseofulvin, quercetin and mangiferin in micellar systems was measured by UV-Vis spectrophotometry and for systems of copolymers  $E_{65}G_5$   $E_{65}G_7E_{65}$  and used the high performance liquid chromatography (HPLC). The pure copolymers and the systems containing the drugs were characterized by infrared spectroscopy (FT-IR), Raman spectroscopy (FT-Raman), X-ray diffraction patterns, particle size by dynamic light scattering (Zetasizer) and *in vitro* drug release experiments were made for some systems. Copolymers F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$  and its mixtures, the series of diblock copolymers  $E_mB_n$  and copolymers  $E_{65}G_5$  and  $E_{65}G_7E_{65}$  are promising for administration of hydrophobic drugs, because they showed good values of solubilization ( $S_{cp}$ ).  $E_{65}G_5$  and  $E_{65}G_7E_{65}$  were the copolymers that showed the best quercetin solubilization results (HPLC): its micellar system raised the aqueous solubility of quercetin in 253 times at 25 °C for both copolymers and 124 and 142 times at 37 °C for the diblock and triblock, respectively, and its microparticles showed total encapsulation efficiency of quercetin.

Keywords: block copolymers, drug solubilization, griseofulvin, quercetin, mangiferin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do (a) EVA e do (b) PEG.....	20
Figura 2.	Diferentes tipos de copolímeros em bloco: a) dibloco, b) tribloco, c) multibloco e d) estrela (Kumar, Ravikumar e Domb, 2001).....	21
Figura 3.	Mecanismo de polimerização do precursor polióxido de estireno usando iniciador monofuncional ativado por hidróxido de potássio para originar um copolímero com arquitetura do tipo dibloco.....	23
Figura 4.	Estrutura dos monômeros (a) óxido de etileno, (b) óxido de propileno, (c) óxido de butileno e (d) óxido de (feniloximetileno)etileno.....	24
Figura 5.	Estrutura simplificada de uma micela esférica em meio aquoso (Micelas y Liposomas, 2009).....	27
Figura 6.	Propriedades físicas de uma solução de docecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante iônico, a 25°C (adaptado de Shaw, 1992).....	30
Figura 7.	Estrutura geral dos Pluronic <sup>®</sup> ou Lutrol <sup>®</sup> .....	30
Figura 8.	Representação esquemática das possíveis conformações micelares de copolímeros (a) dibloco AB e tribloco ABA e (b) tribloco BAB, onde A é o bloco hidrofílico e B o bloco hidrofóbico (figura extraída de Pinho, 2006; adaptada de Booth e Attwood, 2000).....	31
Figura 9.	Representação esquemática das estruturas de mesofase: a) cúbica, b) hexagonal e c) lamelar. Adaptado de Pinho (2006).....	33
Figura 10.	a) Diagrama de fases de três sistemas: E <sub>62</sub> P <sub>39</sub> E <sub>62</sub> (Pluronic <sup>®</sup> F87), E <sub>82</sub> S <sub>9</sub> E <sub>82</sub> e sua mistura na proporção 1:1 (extraído de Ricardo e col., 2005); b) Diagrama de fases do Pluronic <sup>®</sup> P123 (E <sub>21</sub> P <sub>67</sub> E <sub>21</sub> ) (extraído de Chaibundit e col, 2007).....	34
Figura 11.	Gráfico da concentração sanguínea do fármaco <i>versus</i> tempo de administração: curva A, uma formulação convencional, e curva B, uma formulação ideal de liberação controlada. Adaptado de Peppas (1997).....	35
Figura 12.	Estrutura do bloco polioxibutileno (B <sub>n</sub> ).....	42
Figura 13.	Estrutura do bloco: (a) polioxi(feniloximetileno)etileno (G <sub>n</sub> ) e (b) polioxiestireno (S <sub>n</sub> ).....	43
Figura 14.	Estrutura química da griseofulvina.....	43



Figura 15.	Estrutura química da (a) quercetina e (b) mangiferina.....	44
Figura 16.	Figura 16. Diagrama de fase dos copolímeros F87 (-), E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> (□) e das misturas E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> /F87: 50/50 (Δ), 60/40 (◆), 70/30 (●), 80/20 (▼) e 90/10 (x).....	53
Figura 17.	Espectro de emissão de fluorescência em função do comprimento de onda para o DPH em água e em soluções de copolímero tribloco E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> em concentrações de 10 <sup>-5</sup> a 10 <sup>-2</sup> g/L.....	56
Figura 18.	Dependência da intensidade de fluorescência em função do logaritmo da concentração aquosa do copolímero E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> a 45 °C.....	58
Figura 19.	Dependência do log <sub>10</sub> CMC(mol dm <sup>-3</sup> ) <i>versus</i> o comprimento do bloco hidrofóbico B (n) para copolímeros E <sub>m</sub> B <sub>n</sub> E <sub>m</sub> (30 °C): (●) dados da literatura, (■) este trabalho.....	59
Figura 20.	Valores da entalpia de van't Hoff por unidade de B (Δ <sub>mic</sub> H <sub>VH</sub> /n) <i>versus</i> o comprimento do bloco. (●) dados da literatura (ver Tabela 4), (■) este trabalho.....	60
Figura 21.	Dependência da intensidade de fluorescência em função do logaritmo da concentração aquosa dos copolímeros: (●) E <sub>155</sub> B <sub>76</sub> e (■) E <sub>209</sub> B <sub>45</sub> .....	62
Figura 22.	Dependência do log <sub>10</sub> CMC(mol dm <sup>-3</sup> ) <i>versus</i> o comprimento do bloco hidrofóbico B (n) para copolímeros E <sub>m</sub> B <sub>n</sub> : (●) dados da literatura, (■) este trabalho.....	63
Figura 23.	Valores da entalpia de van't Hoff por unidade de B (Δ <sub>mic</sub> H <sub>VH</sub> /n) <i>versus</i> o comprimento do bloco. (●) dados da literatura (ver Tabela 4), (■) este trabalho.....	64
Figura 24.	Gráficos de emissão de fluorescência <i>versus</i> log C (g/L) dos sistemas E <sub>65</sub> G <sub>5</sub> 45 °C.....	66
Figura 25.	Curva de calibração da griseofulvina (X), quercetina (■) e mangiferina (o).....	67
Figura 26.	Solubilidade da griseofulvina em função da concentração do polietilenoglicol 6000 a (■) 25 e (●) 37 °C.....	68
Figura 27.	Solubilidade da griseofulvina em função da proporção do copolímero E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> obtidos pelos métodos: 3 (filme) (■) S <sub>cp</sub> e (●) S <sub>h</sub> e 4 (sonicação) (□) S <sub>cp</sub> e (o) S <sub>h</sub> .....	72

Figura 28.	Variação da energia livre padrão de solubilização em função da porcentagem de copolímero tribloco $E_{43}B_{14}E_{43}$ na mistura obtido pelos métodos: (■) 3 (filme) e (●) 4 (sonicação).....	76
Figura 29.	O Efeito do comprimento do bloco B na solubilização da griseofulvina em soluções micelares de copolímeros $E_mB_n$ a 25 °C: (■) dissolução, (●) fundido e (▲) filme.....	78
Figura 30.	Variação da energia livre padrão de solubilização em função do comprimento do bloco B obtido pelos métodos: (■) 1 (dissolução), (●) 2 (fundido) e (▲) 3 (filme).....	80
Figura 31.	Curva de calibração obtida por HPLC dos fármacos quercetina (■) e mangiferina (○).....	85
Figura 32.	Cromatogramas das soluções de fármacos a 25 °C: (a) solução aquosa $QE_{65}G_5$ , (b) solução aquosa $QE_{65}G_7E_{65}$ , (c) solução aquosa de quercetina, (d) solução aquosa $ME_{65}G_5$ , (e) solução aquosa $ME_{65}G_7E_{65}$ , (f) solução aquosa de mangiferina.....	86
Figura 33.	Espectro de Infravermelho em pastilha de KBr: (a) griseofulvina, (b) $E_{43}B_{14}E_{43}$ e (c) $GE_{43}B_{14}E_{43}$ .....	91
Figura 34.	Espectros de FT-IR: (a) quercetina, (b) $E_{65}G_5$ e (c) $QE_{65}G_5$ .....	92
Figura 35.	Espectro FT-Raman: (a) griseofulvina, (b) $E_{43}B_{14}E_{43}$ e (c) $GE_{43}B_{14}E_{43}$ (método 3).....	95
Figura 36.	Espectro FT-Raman: (a) quercetina (b) $E_{65}G_5$ e (c) $QE_{65}G_5$ .....	97
Figura 37.	Espectro FT-Raman: (a) mangiferina, (b) $E_{65}G_5$ e (c) $ME_{65}G_5$ .....	98
Figura 38.	Difratogramas: (a) griseofulvina, (b) $E_{43}B_{14}E_{43}$ e (c) $GE_{43}B_{14}E_{43}$ (método 3).....	100
Figura 39.	Difratogramas: (a) quercetina, (b) $E_{65}G_5$ , (c) $QE_{65}G_5$ , (d) mangiferina, (e) $E_{65}G_5E_{65}$ e (f) $ME_{65}G_5E_{65}$ .....	101
Figura 40.	Curvas de distribuição de tamanho por volume para as micelas dos sistemas a 1%: (a) F87, (b) 50/50, (c) 60/40, (d) 70/30, (e) 80/20, (f) 90/10 e (g) $E_{43}B_{14}E_{43}$ .....	104
Figura 41.	Curvas de distribuição de tamanho por volume para as micelas dos sistemas a 1%: (a) $E_{65}G_5$ , (b) $E_{65}G_7E_{65}$ , (c) $QE_{65}G_5$ , (d) $QE_{65}G_7E_{65}$ , (e) $ME_{65}G_5$ e (f) $ME_{65}G_7E_{65}$ .....	106

Figura 42.	Micrografias: (a) $E_{65}G_5$ , (b) $E_{65}G_7E_{65}$ , (c) quercetina, (d) $QE_{65}G_5$ , (e) $QE_{65}G_7E_{65}$ , (f) mangiferina, (g) $ME_{65}G_5$ e (h) $ME_{65}G_7E_{65}$ .....	108
Figura 43.	Perfil de liberação da griseofulvina em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C: (■) encapsulado pelo método 3(filme) e (●) encapsulado pelo método 4 (sonicação) para o encapsulado no copolímero $E_{43}B_{14}E_{43}$ .....	110
Figura 44.	Liberação difusional da griseofulvina em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C : (■) encapsulado pelo método 3(filme) e (●) encapsulado pelo método 4 (sonicação) para o encapsulado no copolímero $E_{43}B_{14}E_{43}$ .....	111

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Concentração ( $c^*$ ) e temperatura crítica ( $T^*$ ) de formação de gel dos copolímeros F87, $E_{43}B_{14}E_{43}$ e suas misturas 50/50 a 90/10.....	54
Tabela 2.	Concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros F87 e $E_{43}B_{14}E_{43}$ em função da temperatura.....	57
Tabela 3.	Valores de concentração micelar crítica (CMC) da literatura (30°C) e massas molares ( $M_n$ ) de copolímeros $E_mB_nE_m$ .....	58
Tabela 4.	Concentração micelar crítica (CMC) da misturas dos copolímeros $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$ nas proporções 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 e 90/10 em função da temperatura.....	60
Tabela 5.	Massa molar média ( $M_n$ ) e concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros $E_mB_n$ a 25 °C.....	61
Tabela 6.	Valores de concentração micelar crítica (CMC) da literatura de copolímeros $E_mB_n$ a 30°C.....	62
Tabela 7.	Concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros dibloco $E_{65}G_5$ , e tribloco $E_{65}G_7E_{65}$ na faixa de 30-50 °C.....	65
Tabela 8.	Características moleculares dos copolímeros triblocos.....	69
Tabela 9.	Solubilização da griseofulvina em solução aquosa de F87 a 1 % m/v, 25 °C.....	70
Tabela 10.	Valores de $S_{cp}$ para o copolímero $E_{43}B_{14}E_{43}$ obtidos nesse trabalho e os citados na literatura.....	71
Tabela 11.	Valores de capacidade de solubilização, $S_{cp}$ , (mg/g copolímero) e capacidade de solubilização por bloco hidrofóbico ( $S_h$ ) obtidos pelos métodos 3 (filme) e 4 (sonicação) para os copolímeros F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ ), $E_{43}B_{14}E_{43}$ e suas misturas. $S_0 = 3,6$ mg/dL.....	72
Tabela 12.	Aumento ( $S/S_0$ ) das solubilidades da griseofulvina nas soluções a 1% dos sistemas poliméricos submetidos aos métodos 3 (Filme) e 4 (Sonicação).....	73
Tabela 13.	Propriedades micelares micelares ( $N_w$ – número de associação e $r_{h,app}$ – raio hidrodinâmico aparente) dos copolímeros triblocos F87, $E_{43}B_{14}E_{43}$ e sua mistura 50/50 publicados por Harrison e col. (2005).....	74

Tabela 14.	Valores de coeficiente de partição ( $P$ ) e energia livre padrão de solubilização ( $\Delta G^\circ$ ) obtidos pelos métodos 3 ( <i>Filme</i> ) e 4 ( <i>Sonicação</i> ) para os copolímeros triblocos F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ ), $E_{43}B_{14}E_{43}$ e suas misturas.....	75
Tabela 15.	Valores de capacidade de solubilização, $S_{cp}$ , (mg/g copolímero) e capacidade de solubilização por bloco hidrofóbico ( $S_h$ ) dos copolímeros diblocos a 25 °C submetidos aos métodos de dissolução (1), fundido (2) e filme (3).....	77
Tabela 16.	Aumento ( $S/S_0$ ) das solubilidades da griseofulvina nas soluções a 1% da série de diblocos submetidos aos métodos de dissolução (1), fundido (2) e filme (3).....	79
Tabela 17.	Valores de coeficiente de partição ( $P$ ) e energia livre padrão de solubilização ( $\Delta G^\circ$ ) obtidos pelos métodos de dissolução (1), fundido (2) e filme (3) para os copolímeros diblocos da série $E_mB_n$ .....	80
Tabela 18.	Características moleculares dos copolímeros dibloco $E_{65}G_5$ e tribloco $E_{65}G_7E_{65}$ .....	81
Tabela 19.	Parâmetros de solubilização dos copolímeros dibloco $E_{65}G_5$ e tribloco $E_{65}G_5E_{65}$ a 25 °C e 37°C obtidos pela espectroscopia de UV/Vis. $S_0 = 0,05$ e $0,10$ mg/dL para quercetina e $S_0 = 9,92$ e $15,6$ mg/dL para a mangiferina a 25 e 37°C, respectivamente.....	83
Tabela 20.	Parâmetros de solubilização dos copolímeros dibloco $E_{65}G_5$ e tribloco $E_{65}G_5E_{65}$ a 25 °C e 37°C obtidos pela HPLC. $S_0 = 0,05$ e $0,07$ mg/dL para quercetina e $S_0 = 10,69$ e $14,76$ mg/dL para a mangiferina a 25 e 37°C, respectivamente.....	88
Tabela 21.	Atribuições das frequências das principais bandas do fármaco griseofulvina.....	89
Tabela 22.	Atribuições das frequências das principais bandas dos copolímeros F87, $E_{43}B_{14}E_{43}$ , suas misturas e encapsulados.....	90
Tabela 23.	Atribuições das frequências das principais bandas dos fármacos quercetina e mangiferina.....	93
Tabela 24.	Atribuições das frequências das principais bandas dos copolímeros dibloco $E_{65}G_5$ , tribloco $E_{65}G_5E_{65}$ e seus encapsulados.....	94

Tabela 25.	Diâmetro hidrodinâmico médio de pico ( $D_h$ ) e raio hidrodinâmico médio de pico ( $r_h$ ) dos sistemas poliméricos a 1 %m/v.....	102
Tabela 26.	Diâmetro hidrodinâmico médio de pico ( $D_h$ ) e raio hidrodinâmico médio de soluções aquosas a 1 %m/v dos copolímeros dibloco $E_{65}G_5$ e tribloco $E_{65}G_7E_{65}$ puros e com os fármacos quercetina e mangiferina.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E	Óxido de etileno
P	Óxido de propileno
B	Óxido de butileno
VL	$\gamma$ -valerolactona
S	Óxido de estireno
G	Óxido de (feniloximetileno)etileno
CL	$\epsilon$ -caprolactona
F87	Copolímero E <sub>62</sub> P <sub>39</sub> E <sub>62</sub> (PLURONIC® F87)
E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub>	Copolímero tribloco contendo 43 unidades de E e 14 unidades de B
E <sub>m</sub> B <sub>n</sub>	Série de copolímeros diblocos contendo unidades variadas de E e B
E <sub>65</sub> G <sub>5</sub>	Copolímero dibloco contendo 65 unidades de E e 5 unidades de G
E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub>	Copolímero tribloco contendo 65 unidades de E e 7 unidades de G
50/50	Mistura de E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> /F87 na proporção de 50/50
60/40	Mistura de E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> /F87 na proporção de 60/40
70/30	Mistura de E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> /F87 na proporção de 70/30
80/20	Mistura de E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> /F87 na proporção de 80/20
90/10	Mistura de E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> /F87 na proporção de 90/10
PEG	Polietileno glicol
MPEG	Monometóxi polietileno glicol
PCL	Policaprolactona
CMC	Concentração micelar crítica
S	Solubilidade do fármaco na solução do copolímero em g/dL
S <sub>cp</sub>	Capacidade de solubilização em mg de fármaco por g de copolímero
S <sub>h</sub>	Capacidade de solubilização em mg de fármaco por g de bloco hidrofóbico
W <sub>h</sub>	Fração em massa do bloco hidrofóbico
W <sub>E</sub>	Fração em massa do bloco de polióxido de etileno

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 COPOLÍMEROS EM BLOCO .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 SÍNTESE DOS COPOLÍMEROS.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 MICELIZAÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4 GELEIFICAÇÃO E TERMORRESPONSIVIDADE DOS COPOLÍMEROS EM BLOCO .....</b>	<b>32</b>
<b>1.5 APLICAÇÃO DE COPOLÍMEROS NA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS .....</b>	<b>34</b>
<b>1.5.1 Administração de fármacos .....</b>	<b>34</b>
<b>1.5.2 Micelas de copolímeros como carreadores de fármacos .....</b>	<b>36</b>
<b>1.5.3 Solubilização de fármacos hidrofóbicos em sistemas micelares.....</b>	<b>39</b>
<b>1.6 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA .....</b>	<b>41</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 MATERIAIS .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 MISTURAS DOS COPOLÍMEROS .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 INVERSÃO DE TUBO .....</b>	<b>47</b>
<b>3.4 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC).....</b>	<b>47</b>
<b>3.5 SOLUBILIZAÇÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>3.5.1 ESPECTROSCOPIA DE UV/VIS.....</b>	<b>48</b>
<b>3.5.1.1 Método 1 (Dissolução) .....</b>	<b>48</b>
<b>3.5.1.2 Método 2 (Fundido) .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.1.3 Método 3 (Filme).....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.1.4 Método 4 (Sonicação) .....</b>	<b>49</b>
<b>3.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....</b>	<b>50</b>
<b>3.6 CARACTERIZAÇÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FT-IR) .....</b>	<b>50</b>



3.6.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN (FT-RAMAN).....	50
3.6.3 DIFRAÇÃO DE RAIO-X .....	51
3.6.4 TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS MICELAS .....	51
3.6.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	51
3.7 LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4.1 INVERSÃO DE TUBO .....	53
4.1.1 Triblocos F87, E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> e suas misturas .....	53
4.2 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC).....	56
4.2.1 Triblocos F87, E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> e suas misturas .....	57
4.2.2 Série de diblocos E <sub>m</sub> B <sub>n</sub> .....	61
4.2.3 Dibloco E <sub>65</sub> G <sub>5</sub> e tribloco E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub> .....	64
4.3 SOLUBILIZAÇÃO .....	67
4.3.1 ESPECTROSCOPIA DE UV/VIS.....	67
4.3.1.1 Triblocos F87, E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> e suas misturas .....	69
4.3.1.2 Série de diblocos E <sub>m</sub> B <sub>n</sub> .....	76
4.3.1.3 Dibloco E <sub>65</sub> G <sub>5</sub> e tribloco E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub> .....	81
4.3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	84
4.3.2.1 Dibloco E <sub>65</sub> G <sub>5</sub> e tribloco E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub> .....	84
4.4 CARACTERIZAÇÃO .....	89
4.4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FT-IR) .....	89
4.4.1.1 Triblocos F87, E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> e suas misturas e seus encapsulados.....	89
4.4.1.2 Dibloco E <sub>65</sub> G <sub>5</sub> e tribloco E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub> e seus encapsulados .....	92
4.4.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN (FT-RAMAN).....	94
4.4.2.1 Triblocos F87, E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> e suas misturas e seus encapsulados.....	94
4.4.2.2 Dibloco E <sub>65</sub> G <sub>5</sub> e tribloco E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub> e seus encapsulados .....	96
4.4.3 DIFRAÇÃO DE RAIO-X .....	99
4.4.3.1 Triblocos F87, E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> e suas misturas e seus encapsulados.....	99
4.4.3.2 Dibloco E <sub>65</sub> G <sub>5</sub> e tribloco E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub> e seus encapsulados .....	100
4.4.4 TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS MICELAS .....	102
4.4.4.1 Triblocos F87, E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> e suas misturas e seus encapsulados.....	102
4.4.4.2 Dibloco E <sub>65</sub> G <sub>5</sub> e tribloco E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub> e seus encapsulados .....	105

<b>4.4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....</b>	<b>107</b>
<b>4.4.4.1 Dibloco <math>E_{65}G_5</math> e tribloco <math>E_{65}G_7E_{65}</math> e seus encapsulados .....</b>	<b>107</b>
<b>4.5 LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>109</b>
<b>4.5.1 Tribloco <math>E_{43}B_{14}E_{43}</math> e seus encapsulados.....</b>	<b>109</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>112</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>114</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

O estudo sobre a utilização de copolímeros na dissolução de fármacos pouco solúveis em água vem sendo cada vez mais praticado, devido, principalmente, à baixa toxicidade desses carreadores e da sua alta eficiência no processo de dissolução. Com o uso de uma solução de copolímero é possível controlar o tempo e/ou atuar na liberação do fármaco no organismo (Oliveira e Lima, 2006). Em especial, os copolímeros anfifílicos em bloco têm despertado um interesse maior por apresentarem características de formarem nanopartículas tais como micelas (Letchford e Burt, 2007), o que viabiliza o carreamento do fármaco. É com base na utilização da formação dessas micelas que o estudo de dissolução de fármacos pouco solúveis é promovido.

Micelas são partículas de tamanho coloidal (10–100 nm) formadas em função da diminuição da energia entrópica do sistema dadas a natureza anfifílica do polímero (Letchford e Burt, 2007). Assim a utilidade das micelas poliméricas no campo da liberação de fármacos é baseado nas suas características de auto-associação que origina um núcleo nanoestruturado em meio aquoso para os copolímeros em bloco de poli(oxialquileno)s (Booth e Attwood, 2000), por exemplo. Em geral, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas são as forças diretivas de separação entre o núcleo e o meio aquoso circundante na formação das micelas (Gaucher e col., 2005). Os copoli(oxialquileno)s em bloco, em específico, têm sido bastante explorados quanto a capacidade de solubilização de fármacos pouco solúveis em água como por exemplo a griseofulvina (Crothers e col., 2005), dado a formação de micelas. As propriedades físico-químicas dos copoli(oxialquileno)s comercialmente disponíveis, preparados a partir do óxido de etileno e do óxido de propileno (os copolímeros Pluronic® ou Synperonic®), são muito estudadas (Sherlund, Brodin e Malmsten, 2000; Dong, Chowdhry e Leharne, 2006). Estes copolímeros são denominados  $E_mP_nE_m$ , onde E representa o monômero óxido de etileno  $[-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)-]$ , P, o monômero óxido de propileno  $[-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-]$ , e os subscritos  $m$  e  $n$  denotam o comprimento do bloco.

A auto-associação de copolímeros em bloco de poli(oxialquileno)s contendo blocos hidrofóbicos variados são estudados, particularmente, pelo grupo da Universidade de Manchester (Yang e col., 2003; Booth e Attwood, 2000; Hamley e col., 2001; Ricardo e col., 2006). Por exemplo, copolímeros diblocos e triblocos foram preparados com blocos E combinados com blocos B [B = monômero oxibutileno,  $[-$

$\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ ], ou blocos S [S = monômero oxifeniletieno, preparado a partir do óxido de estireno,  $-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)-$ ] (Booth e Attwood, 2000; Hamley e col., 2001). ou ainda bloco G [G = monômero óxido de (feniloximetileno)etilenos,  $-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_5)-$ ] (Taboada e col., 2005).

Estudos físico-químicos de misturas binárias de copolímeros com diferentes hidrofobicidades vêm sendo relatados há algum tempo (Ricardo e col., 2006; Harrison e col. 2005; Liu, Nace e Chu, 1999). No entanto, a potencialidade dessas misturas quanto à solubilização de fármacos pouco solúveis em água só foi investigada recentemente (Pinho e col., 2007). Segundo Kyung, Bronich e Kabanov (2004) as misturas de Pluronic de hidrofobicidades semelhantes apresentaram capacidade de solubilização maior do que os Pluronic isolados. Pinho e col. (2007) relataram que a solubilidade do fármaco aumenta com mistura de copolímeros triblocos com diferentes hidrofobicidades, principalmente com o aumento da proporção do copolímero mais hidrofóbico.

Em estudos realizados por Crothers e col. (2005) observou-se que a solubilização é afetada pela composição do núcleo micelar, pelo peso molecular e concentração do copolímero, pela temperatura, bem como pelo método empregado. Nesse contexto, estudos de misturas de copolímeros em bloco de diferentes hidrofobicidades e a síntese de copolímeros em bloco de balanço hidrofílico/hidrofóbico apropriado mostram-se promissores na solubilização de fármacos através de diferentes métodos de encapsulação, bem como seu estudo de liberação.

## 1.1 COPOLÍMEROS EM BLOCO

Polímeros são substâncias de alta massa molecular constituídas de unidades repetitivas (substâncias com moléculas de cadeia curta contendo relativamente poucos monômeros são chamadas oligômeros). Eles devem suas propriedades peculiares ao seu tamanho, sua forma tridimensional e, algumas vezes, à sua assimetria. A reatividade química dos polímeros depende da química de suas unidades monoméricas, mas suas propriedades dependem em grande parte da maneira como os monômeros são reunidos; é este fato que leva à versatilidade dos polímeros sintéticos. Uma macromolécula não é necessariamente um polímero, como é o caso de alguns macrociclos e do carbono (grafite, diamante, fulereno). A palavra polímero é de origem grega, onde *poli* = muitos

e *meros* = partes. Eles são encontrados largamente na natureza, incluem uma série de funções orgânicas, e desempenham importante papel biológico (carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos) e industrial (como a celulose das plantas, principal constituinte do papel, e o poliisopreno, da borracha natural). No entanto, visando propriedades que se apliquem aos interesses de vários ramos da indústria (petrolífero, farmacêutico, têxtil, de construção etc.), polímeros também têm sido sintetizados em escala laboratorial e industrial. Alguns polímeros sintéticos do nosso cotidiano são: polietileno, polipropileno, poliéster, TEFLON® (politetrafluoretileno), EVA (copolímero de etileno e acetato de vinila, Figura 1a) e PEG (polietileno glicol, Figura 1b).

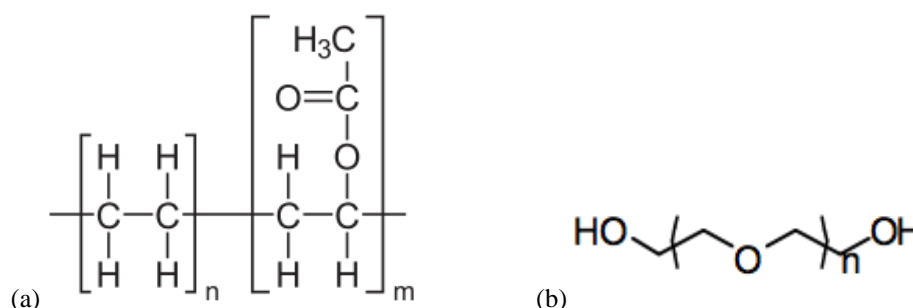


Figura 1. Estrutura química do (a) EVA e do (b) PEG.

Polímeros que contêm apenas uma unidade monomérica são chamados de homopolímeros (por exemplo, o PEG), enquanto os que contêm duas ou mais unidades monoméricas diferentes são conhecidos como copolímeros. De acordo com a disposição de seus monômeros, os copolímeros podem ser divididos em quatro classes: em bloco, alternado, estatístico, e enxertado (Yokoyama, 1992). Os copolímeros em bloco são formados por uma sequência de monômeros A ligados covalentemente a uma sequência de monômeros B, como é o caso do EVA (formado por um bloco de polietileno e um bloco de poliacetato de vinila). Os copolímeros em bloco podem ser classificados em grupos, de acordo com a disposição de seus blocos, como mostra a Figura 2:

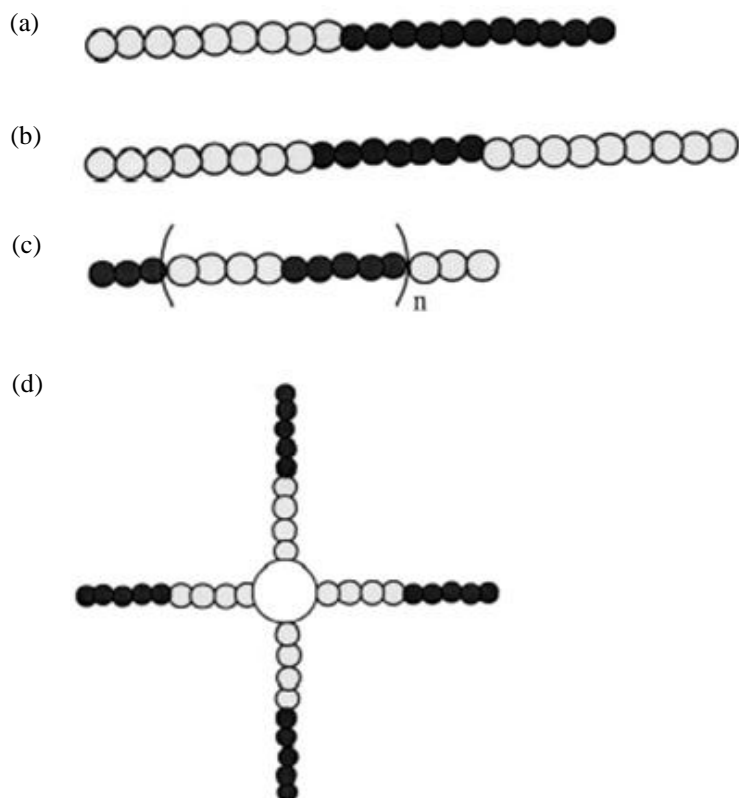


Figura 2. Diferentes tipos de copolímeros em bloco: (a) dibloco, (b) tribloco, (c) multibloco e (d) estrela (Kumar, Ravikumar e Domb, 2001).

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

## 1.2 SÍNTESE DOS COPOLÍMEROS

Os copolímeros em bloco são sintetizados por reação de polimerização de adição, que podem ser do tipo radicalar, aniônica, catiônica. Dentre elas a polimerização de

adição anônica é a mais utilizada na síntese de copolímeros (Matyjaszewski e Müller, 2006). As principais etapas dessa reação são:

- Iniciação
- Propagação
- Terminação

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

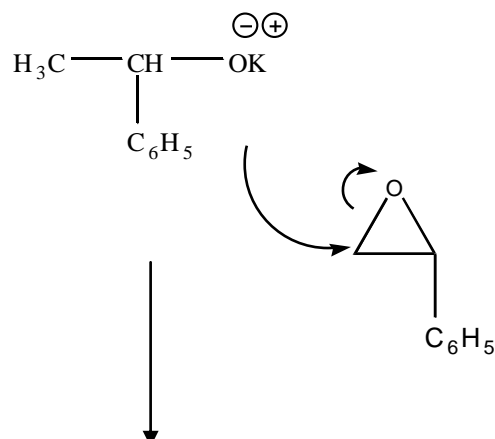
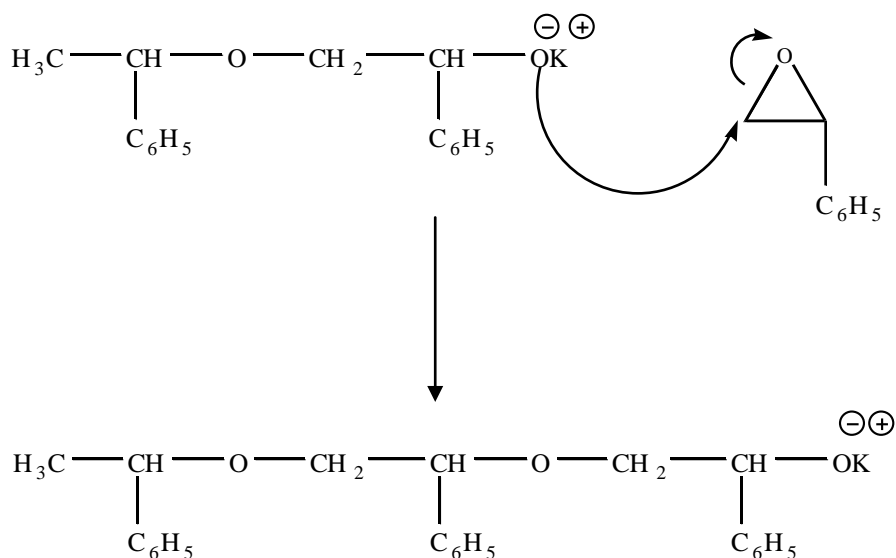
**Iniciação****Propagação**

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

Quando os monômeros da reação são cíclicos, a reação também é classificada como reação de polimerização aniônica por abertura de anel. Esse é o caso da síntese de copolímeros de óxido de alquilenos do tipo  $E_mG_n$ ,  $E_mB_n$ ,  $E_mP_nE_m$ ,  $E_mB_nE_m$ , que podem ser produzidos pela adição sequencial dos seus monômeros óxido de etileno – E, óxido de propileno – P, óxido de butileno – B, e óxido de (feniloximetileno)etileno – G (Figura 4).



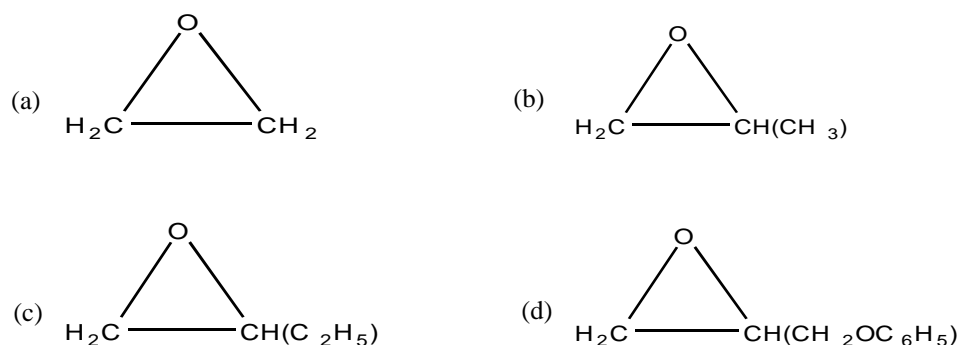


Figura 4. Estrutura dos monômeros (a) óxido de etileno, (b) óxido de propileno, (c) óxido de butileno e (d) óxido de (feniloximetileno)etileno.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Uma extensa faixa de copolímeros di- e tribloco de óxido de etileno / óxido de butileno tem sido sintetizada utilizando a técnica de ampolas e alto vácuo (Attwood, Zhou e Booth, 2007; Taboada e col., 2005 e 2006). Os copolímeros são caracterizados usando (RMN  $^{13}\text{C}$ ) para confirmação da arquitetura do bloco e obter comprimento médio da cadeia e massa molar média.

Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) é usada para obtenção da distribuição por tamanho das massas molares dos blocos individuais e do copolímero como um todo.

### 1.3 MICELIZAÇÃO

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

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

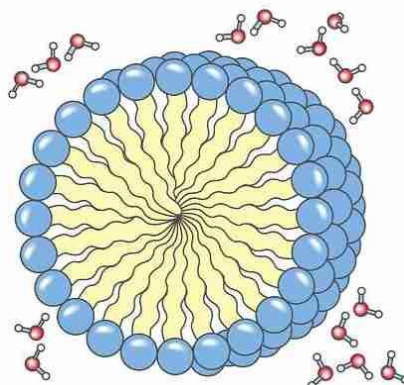


Figura 5. Estrutura simplificada de uma micela esférica em meio aquoso (Micelas y Liposomas, 2009).

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

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



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

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

Neste modelo, a concentração a partir da qual o surfactante preferencialmente se agrega em micelas ao invés de ficar livre em solução é chamada de concentração micelar crítica (CMC), onde o número de moléculas agregadas é aproximadamente o

número de moléculas livres em solução. A energia livre padrão para a micelização por mol de micelas é dada por:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dessa forma, diz-se que micelização é um processo dirigido pelo aumento de entropia. A causa para a entropia positiva não é inteiramente claro, mas uma contribuição muito provável envolve a configuração das cadeias hidrocarbônicas do

núcleo da micela, que provavelmente tem maior liberdade de movimento no interior da micela do que quando em contato com a água (Shaw, 1992). Para a variação de entalpia do processo, têm-se as seguintes expressões em função da relação entre CMC e temperatura (Myers, 1992; Kelarakis e col., 1998):

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

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

A CMC de um surfactante é um de seus parâmetros mais importantes, uma vez que muitas aplicações dos surfactantes, como a solubilização de compostos hidrofóbicos, dependem da existência de micelas no meio. A CMC depende da natureza química do surfactante, do solvente, da temperatura e de aditivos (pH, eletrólitos, substâncias orgânicas). Outro parâmetro importante é a temperatura micelar crítica (TMC) do surfactante, que é a temperatura a partir da qual, numa dada concentração, as moléculas começam a se agregar em micelas. Neste caso, só há sentido em falar em TMC quando o processo é endotérmico.

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

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

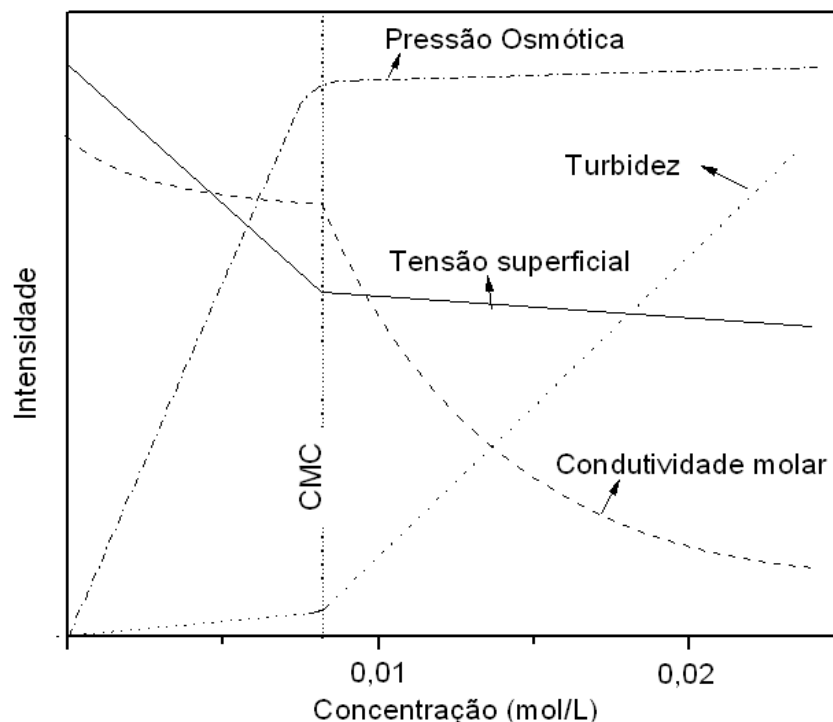


Figura 6. Propriedades físicas de uma solução de docecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante iônico, a 25 °C (adaptado de Shaw, 1992).

Dentre os copolímeros com propriedades surfactantes, os que são mais utilizados são os que possuem bloco hidrofílico de polioxietileno (Myers, 1992). Um exemplo são os poliéteres ou polioxialquilenos triblocos  $E_nP_mE_n$  (Figura 7), onde E denota a unidade monomérica óxido de etileno e P a unidade de óxido de propileno, de caráter hidrofóbico. Eles são conhecidos como Poloxamers, Pluronic<sup>®</sup>, Lutrol<sup>®</sup> ou Synperonic<sup>®</sup> e começaram a ser comercializados em 1951 pela BASF. Estudos quanto à sua micelização começaram a ser publicados em 1965 (Schmolka e Raymond, 1965).

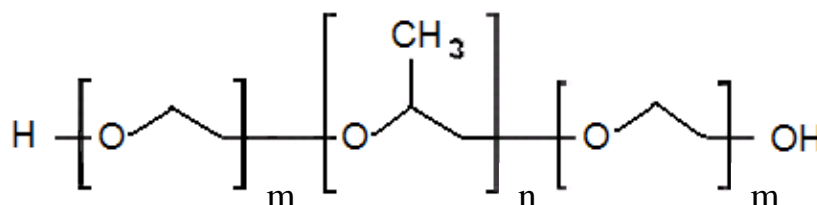


Figura 7. Estrutura geral dos Pluronic<sup>®</sup> ou Lutrol<sup>®</sup>.

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

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

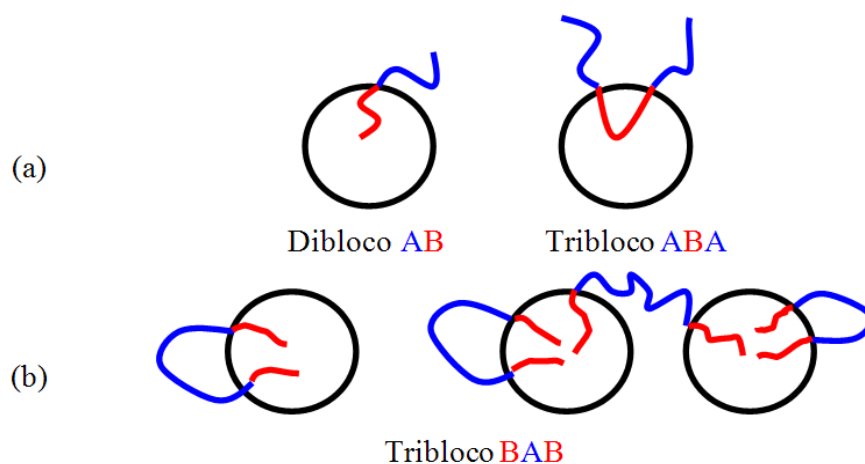


Figura 8. Representação esquemática das possíveis conformações micelares de copolímeros (a) dibloco AB e tribloco ABA e (b) tribloco BAB, onde A é o bloco hidrofílico e B o bloco hidrofóbico (Figura extraída de Pinho, 2006; adaptada de Booth e Attwood, 2000).

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

- O número de agregação da micela, representado por  $n$  nas equações (1), (2), (4), (5) e (6). É o número de moléculas (unímeros) que formam a micela. Ele depende das características moleculares do copolímero, da temperatura e da sua concentração. Em geral, um aumento de temperatura favorece um aumento de  $n$ .
- O raio hidrodinâmico ( $r_h$ ) da micela, que corresponde ao tamanho das micelas. Esse parâmetro é obtido através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, que mede o movimento Browniano das partículas suspensas em um líquido e o relaciona com o seu tamanho. O raio hidrodinâmico (ou raio de Stokes) é o raio da esfera rígida que promove a mesma difusão de luz das



micelas. A equação usada para essas medidas é a equação de Stokes-Einstein. Estes parâmetros, em geral, também crescem com a temperatura.

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

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

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

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

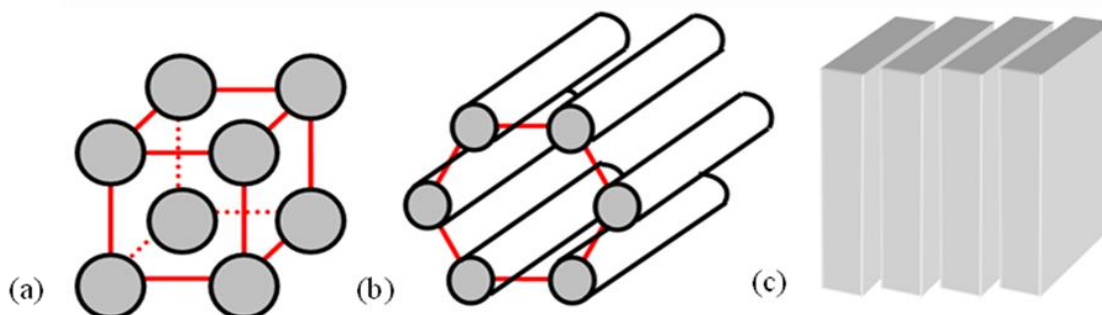


Figura 9. Representação esquemática das estruturas de mesofase: a) cúbica, b) hexagonal e c) lamelar. Adaptado de Pinho (2006).

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

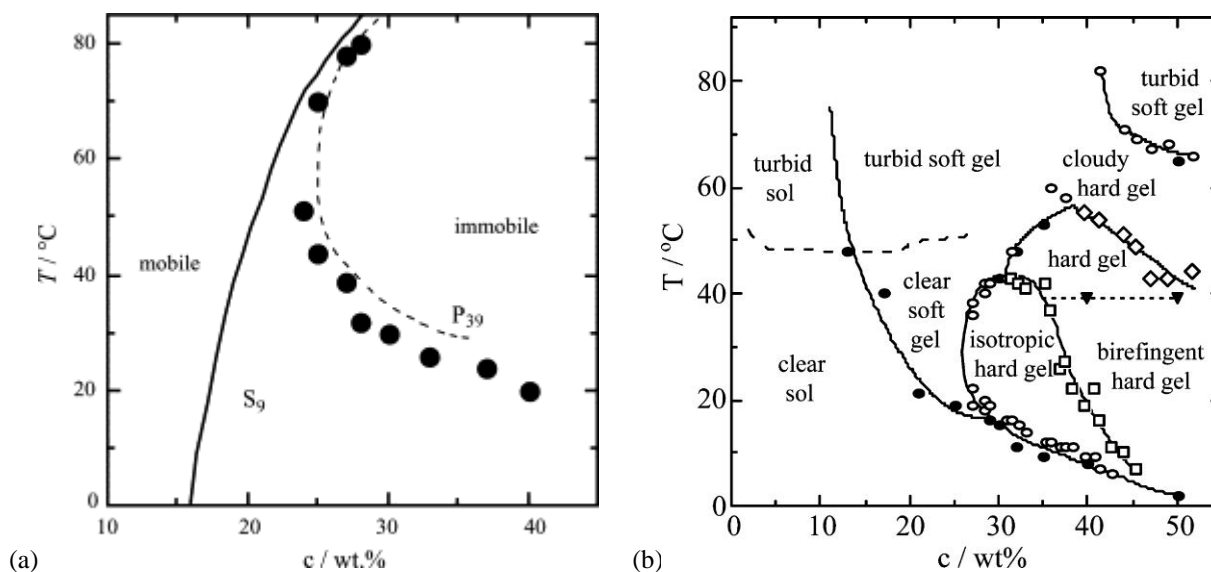


Figura 10. (a) Diagrama de fases de três sistemas:  $E_{62}P_{39}E_{62}$  (Pluronic® F87),  $E_{82}S_9E_{82}$  e sua mistura na proporção 1:1 (extraído de Ricardo e col., 2005); (b) Diagrama de fases do Pluronic® P123 ( $E_{21}P_{67}E_{21}$ ) (extraído de Chaibundit e col, 2007).

## 1.5 APLICAÇÃO DE COPOLÍMEROS NA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

### 1.5.1 Administração de fármacos

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

- **Solubilidade:** esse é um fator essencial para a eficácia do fármaco, independentemente de sua rota de administração. Relata-se que quase metade dos fármacos em potencial falha no seu progresso para formulações farmacêuticas devido à sua baixa solubilidade em água (Patravale, Date e Kullami, 2004). Um fator limitante para o desempenho *in vivo* de fármacos pouco solúveis em água é a sua resistência em ser umedecido e dissolvido nos fluidos do trato gastrointestinal. O aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água é, portanto, muito importante para incrementar sua taxa de absorção no organismo (biodisponibilidade).

- **Liberação:** existe um conceito farmacológico chamado de faixa terapêutica, que é a faixa de concentração do fármaco no organismo na qual ele exerce sua atividade com eficiência e sem causar danos ao paciente. Muitas vezes, ao se administrar um medicamento a um paciente, a sua concentração inicial é alta, podendo até ultrapassar a concentração máxima da dose terapêutica, e após um curto tempo fica abaixo da concentração mínima, seguindo um ciclo como mostra a Figura 11. Visando estabilizar a concentração do fármaco dentro dessa faixa terapêutica após sua administração e, assim, diminuir as doses do medicamento e seus efeitos colaterais, tem-se desenvolvido sistemas de encapsulação de fármacos para liberação controlada. Tais sistemas também possuem a vantagem de conferir uma maior estabilidade química ao fármaco, ao protegê-lo de fatores externos tais como o pH gástrico e o calor no ambiente de armazenagem do fármaco.

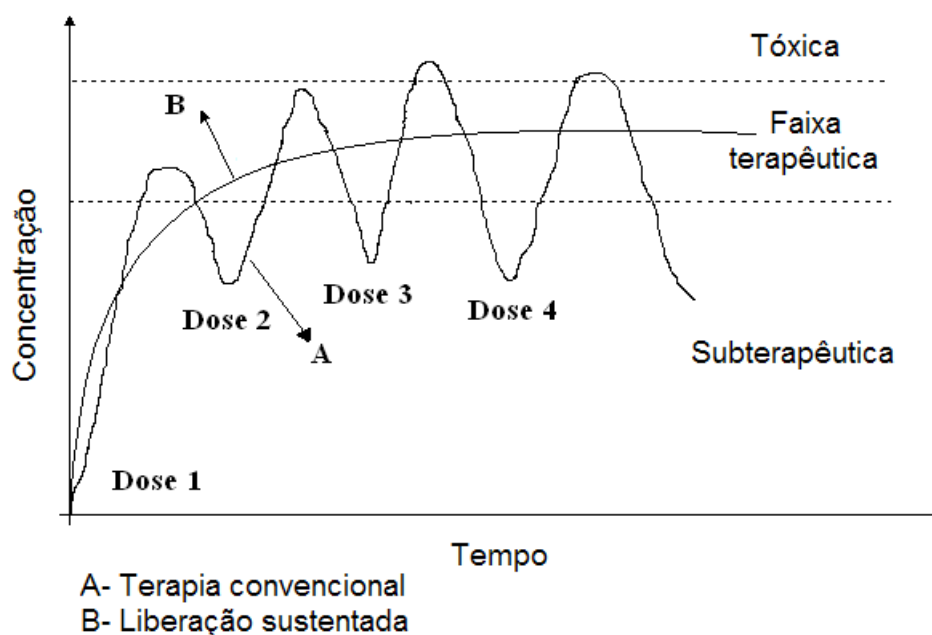


Figura 11. Gráfico da concentração sanguínea do fármaco *versus* tempo de administração: curva A, uma formulação convencional, e curva B, uma formulação ideal de liberação controlada. Adaptado de Peppas (1997).

- **Distribuição biológica:** quando um fármaco entra no organismo, ele é distribuído pela corrente sanguínea e atingem tecidos e órgãos que não são o foco do tratamento, podendo causar vários efeitos colaterais e assim diminuir a eficiência do fármaco no tratamento. No caso de formulações

quimioterápicas fortes, isso se torna ainda mais grave. Por isso, nos últimos anos, tem-se investigado sistemas “inteligentes” que direcionem o fármaco até o alvo específico (por exemplo, tecidos tumorais), onde são liberados.

### 1.5.2 Micelas de copolímeros como carreadores de fármacos

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

- Apresentam um diâmetro menor que 100 nm. Os vasos sanguíneos de tumores e locais de inflamação são mais permeáveis, o que permite o acúmulo de micelas carregadas de fármaco no seu interior, e dessa forma elas são investigadas como sistemas passivos que direcionem o fármaco para o sítio de ação, especialmente em quimioterapia (Aliabadi e Lavasanifar, 2006; Savic, Eisenberg e Maysinger, 2006a).
- O núcleo hidrofóbico age como hospedeiro de fármacos hidrofóbicos, proteínas, DNA, protegendo-os e controlando sua liberação no organismo.
- Possui uma versatilidade ímpar na estrutura núcleo-corona, o que permite desenvolver sistemas projetados individualmente com respeito a patofisiologia da doença, às propriedades físico-químicas do fármaco, seu sítio de ação e sua rota de administração.
- Baixa toxicidade (Schmolka, 1972, Kim e col. 2001, Kawaguchi e col. 2009). A maioria dos surfactantes usados como agentes de solubilização em formulações comerciais são, em geral, pouco eficientes e causam efeitos colaterais, como o etoxilato de óleo de rícino (Cremophor® EL, da BASF), usado para a solubilização de fármacos como o Paclitaxel (formulação Taxol®, da BMS), causa uma série de efeitos colaterais (Weiss e col., 1990, Tije e col. 2003). O Tween® 80 (Croda International), usado para a anfotericina B, é hemolítico (Ellis, Crinis, e Webster, 1996; Yu e col. 1998).

Como Attwood, Zhou e Booth (2007) relataram em uma revisão, copolímeros com porção hidrofílica de polioxietileno e porção hidrofóbica de polioxialquilenos ou

de poliésteres têm sido de considerável interesse nas últimas décadas com respeito à solubilização e liberação de fármacos pouco solúveis em água. Algumas vantagens específicas desses copolímeros são:

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

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

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

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

Nos estudos de solubilização, o método convencional é o chamado método de solução, no qual excesso de fármaco é adicionado a uma solução micelar, previamente preparada, cujo sistema é deixado em contato por tempo suficiente para formação de uma solução saturada de fármaco carregado. O processo de solubilização do fármaco por

esse método pode ser considerado como um processo dinâmico. As moléculas do fármaco em água tendem a se mover em direção ao núcleo da micela, direcionadas pelo potencial químico. O núcleo da micela se expande com a incorporação da molécula do fármaco, porém tende a se manter num estado de energia de Gibbs baixo, o qual inibe um largo crescimento da micela. A solubilização irá alcançar um nível máximo quando o equilíbrio é estabelecido. Nesse processo, a oportunidade para as moléculas de um fármaco se difundir para o núcleo micelar é baixo devido o pequeno tamanho da micela e a baixa razão de difusão através da corona micelar.

A solubilização usando o método fundido foi estudada por Crothers e col. (2005). Nesse método, o fármaco é dissolvido após fusão do copolímero e assim interage diretamente com os blocos hidrofóbicos do copolímero fundido. Então, suficiente quantidade de solvente é adicionada para misturar todas as cadeias do copolímero e as moléculas do fármaco agregadas para formar as micelas, nas quais as moléculas do fármaco estão encapsuladas nos domínios hidrofóbicos. Um aumento da capacidade de solubilização foi encontrado para o método do copolímero fundido, indicando que esse método é mais eficiente que o método de solubilização por dissolução (Crothers e col., 2005). Muitos fatores podem afetar a eficiência do carregamento do fármaco durante o experimento. O excesso de fármaco deve ser bem homogeneizado com o copolímero fundido, pois, devido à lenta dissolução do fármaco no copolímero fundido, um longo tempo de homogeneização é necessário para que as moléculas do fármaco interajam efetivamente com as cadeias do copolímero. Além disso, a mistura do fármaco com o copolímero fundido deve ser mantida sob a temperatura de fusão durante o processo de micelização, pois qualquer resfriamento pode favorecer a cristalização do fármaco ou copolímero fundido, e desse modo, reduzir a capacidade de solubilização.

O método do filme, técnica de solubilização por evaporação do solvente, é uma alternativa rápida e eficiente de solubilização de fármacos quando comparada ao método de dissolução. O copolímero e o fármaco são dissolvidos num solvente orgânico que é então evaporado formando um filme de copolímero e fármaco carregado, o qual é redisperso em água. O método da evaporação do solvente só deve ser usado para copolímeros em bloco que formam micelas de alto balanço hidrofílico-lipofílico, no qual o filme polimérico pode ser facilmente reconstituído em um meio aquoso (Aliabadi e Lavasanifar, 2006).

O método de sonicação pode ser aplicada no processo de solubilidade, uma vez que esse método baseia-se na formação de ondas no meio aquoso. As ondas geradas promovem o processo de cavitação que promove a solubilidade ou dispersão do sólido na solução aquosa do copolímero. A frequência aplicada tem forte influência nesse procedimento, uma vez que podem ocorrer processos de degradação do fármaco ou despolimerização do copolímero (Barboza e Serra, 1992). O uso da técnica de sonicação também tem sido utilizado na formação de microcápsulas a partir de proteínas de albumina sérica bovina (Avivi e col. 2003).

### 1.5.3 Solubilização de fármacos hidrofóbicos em sistemas micelares

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

## 1.6. JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A importância dos copolímeros em bloco pode ser visualizada pelos números de publicações. Uma pesquisa no SciFinder® exibiu mais de 7 mil artigos com o termo “block copolymer”, dos quais mais da metade (4 mil) está relacionado com sua aplicação no carreamento de fármaco (“drug”). Das 4 mil das publicações envolvendo fármacos e os copolímeros em bloco, metade está relacionada a patentes, das quais 82 são do ano de 2010. Os copolímeros em bloco contendo o polióxido de etileno como um dos blocos é muito comum (33 das 82 patentes publicadas no ano de 2010).

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

A preparação dos copolímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de butileno (Figura 12) foi divulgada pelo The Wyandotte Chemicals Corporation, em 1955 (atualmente conhecida por BASF-Wyandotte). Posteriormente, seguido de patentes da The Dow Chemical Company. Copolímeros diblocos e triblocos do tipo  $E_mB_n$  e  $E_mB_nE_m$  foram introduzidos como produtos comerciais pela The Dow Chemical Company, em 1993, com uma descrição de suas propriedades (espumante, turvação, etc), e extensas revisões no ano de 1996. A preparação desses copolímeros em bloco e estudos sistemáticos da sua micelização em solução aquosa diluída foi estudada pelo grupo de Manchester no início da década de 1990. Um ponto de interesse nesses copolímeros é o tipo de arquitetura (dibloco, tribloco e cíclico) em associação às propriedades em soluções aquosas diluídas (Ryan e col., 2001).

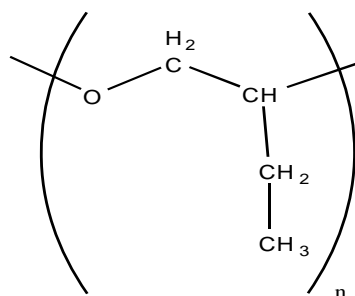


Figura 12. Estrutura do bloco polioxibutileno ( $B_n$ ).

Copolímeros com bloco hidrofóbico de polioxi(feniloximetileno)etileno, ( $G_n$ ), (Figura 13a) possuem um elevado potencial de solubilização para fármacos hidrofóbicos e aromáticos (como a griseofulvina, usada como fármaco-modelo) devido à hidrofobicidade de seus anéis aromáticos. Sua hidrofobicidade é similar ao polioxiestireno, ( $S_n$ ), (Figura 13b). Vários trabalhos com copolímeros em bloco do tipo  $E_mS_n$ ,  $E_mS_nE_m$ ,  $S_nE_m$ ,  $S_nE_mS_n$ , têm sido reportados visando o seu uso em formulações farmacêuticas (Crothers e col., 2002; Ricardo e col., 2004, Barbosa e col., 2007, Elsabahy e col., 2007, Ribeiro e col., 2009b). Dentre esses copolímeros, os diblocos e triblocos do tipo  $E_mS_n$  e  $E_mS_nE_m$  têm-se mostrado mais eficientes, pois possuem baixos valores de concentração micelar crítica (CMC) e temperatura micelar crítica (TMC). O mesmo comportamento é esperado também para os copolímeros diblocos e triblocos do tipo  $E_mG_n$  e  $E_mG_nE_m$ . No entanto, a alta temperatura de transição vítrea do poliestireno de cadeia longa, 100 °C significa que os núcleos das micelas formadas contendo cadeias relativamente curtas desse copolímero como bloco hidrofóbico são imóveis (“micelas congeladas”) na faixa de temperatura de interesse para a solubilização e liberação de fármacos, 10-40 °C (Jada e col., 1996; Hurtrez, Dumas e Riess, 1998). As temperaturas de transição vítrea do polioxi(feniloximetileno)etileno são menores, 18 °C para  $M_n = 6.000 \text{ g mol}^{-1}$ , com 40 unidade de G (Sunder e col., 2000), fazendo a investigação de soluções micelares dos copolímeros em bloco e  $E_mG_n$  e  $E_mG_nE_m$  uma proposta atraente.

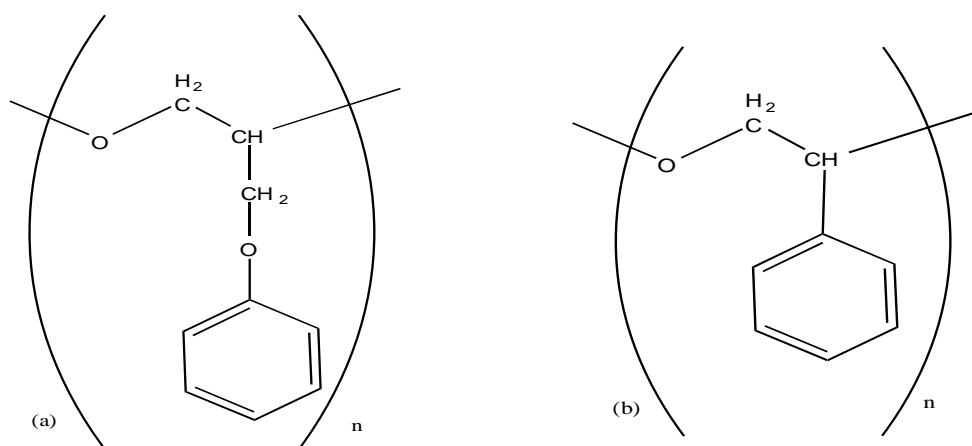


Figura 13. Estrutura do bloco: (a) polioxi(feniloximetileno)etileno ( $G_n$ ) e (b) polioxiestireno ( $S_n$ ).

A griseofulvina (Figura 14) é um fármaco aromático antifúngico de baixa solubilidade em água (3,6 mg/dL a 25 °C), usado em vários trabalhos para se comparar a capacidade de solubilização de copolímeros para fármacos hidrofóbicos (Rekatas e col., 2001; Chaibundit e col., 2002). A griseofulvina possui atividade antifúngica, sendo indicada nas infecções da pele, do couro cabeludo e das unhas causadas por Dermatophytes ou Sporprtrychum resistentes à terapêutica convencional. Pode ser isolada do *Penicillium griseofulvum dierckx* ou obtida por síntese (Finkelstein, Amichai e Grunwald, 1996).

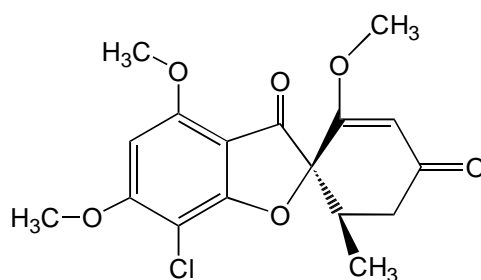


Figura 14. Estrutura química da griseofulvina.

A quercetina (Figura 15a) é um flavonóide obtido a partir da hidrólise da rutina. A rutina pode ser extraída de uma planta abundante no Nordeste brasileiro, a Fava D'anta. A quercetina, como qualquer flavonóide, possui ação antioxidante e outras atividades biológicas relacionadas, como vasoconstritora, antiinflamatória e antitumoral. Nos anos de 2007 e 2008 ela esteve entre os 10 principais produtos farmacêuticos exportados pelo Brasil (ABIQUIF, 2009). Ela é um fármaco em fase experimental, com vários estudos

clínicos em andamento, como mostra um sítio eletrônico do governo norte-americano (ClinicalTrials.gov, 2009).

A mangiferina (Figura 15b) é um composto derivado da xantona, distribuído em plantas superiores das famílias *Anacardiaceae* e de *Gentianaceae*. A mangiferina apresenta diversas atividades farmacológicas incluindo propriedades antidiabéticas, anti-HIV, anticancerígeno, imunomodulatório, antiinflamatório, e sua propriedade antioxidante, amplamente estudada.

Resolver o problema de baixa solubilidade em água destes fármacos (0,05 mg/dL e 9,92 mg/dL a 25 °C para quercetina e mangiferina, respectivamente) tem sido alvo de vários trabalhos, seja através de agentes solubilizantes (Ribeiro e col., 2009b; Gao e col., 2009), ou do desenvolvimento de pró-fármacos (Mulholland e col. 2001, Kim e col. 2001). Esses fatores impulsionaram o uso da quercetina e mangiferina nesta pesquisa.

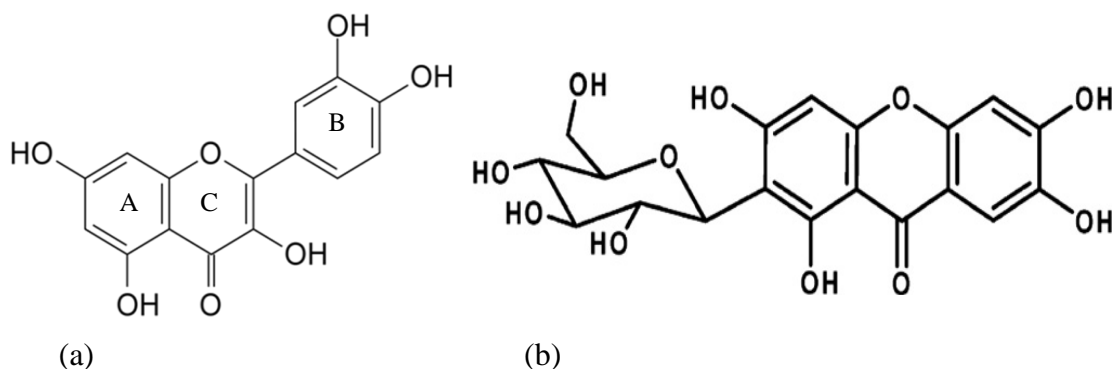


Figura 15. Estrutura química da (a) quercetina e (b) mangiferina.

## 2 OBJETIVOS

---

### *Objetivo Geral*

- Desenvolver sistemas poliméricos micelares para carrear o fármaco modelo griseofulvina através de diferentes métodos de solubilização e estudar a sua liberação, bem como o estudo da solubilização dos fármacos quercetina e mangiferina visando sua aplicação no carreamento e liberação controlada de fármacos *via* intravenosa, subcutânea e oral.

### *Objetivos Específicos*

- Determinar as concentrações e temperaturas críticas de gel para o copolímero tribloco F87 ( $E_{69}P_{39}E_{69}$ ) e suas misturas com copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$  através de diagrama de fase;
- Determinar a concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros triblocos F87 ( $E_{69}P_{39}E_{69}$ ),  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , e suas misturas; e dos diblocos da série  $E_mB_n$  por fluorescência;
- Testar as soluções dos copolímeros triblocos F87 ( $E_{69}P_{39}E_{69}$ ),  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas; e dos copolímeros diblocos da série  $E_mB_n$  como solubilizadores do fármaco griseofulvina através de diferentes métodos, quantificando-os através de Espectroscopia Ultravioleta/Visível (UV/Vis). Testar as soluções dos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  como solubilizadores da quercetina e mangiferina através do método de dissolução, quantificando-os através de Espectroscopia Ultravioleta/Visível (UV/Vis) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Caracterizar os copolímeros triblocos F87 ( $E_{69}P_{39}E_{69}$ ),  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas; e os copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  com e sem fármaco por infravermelho (FT-IR), FT-Raman, difração de raio-X e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Determinação de tamanho de partícula das amostras dos copolímeros triblocos F87 ( $E_{69}P_{39}E_{69}$ ),  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas; e dos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e  $E_{65}G_7E_{65}$  com e sem fármaco por Espalhamento de Luz;
- Estudar a liberação do fármaco griseofulvina nos sistemas poliméricos aplicados na encapsulação.

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

---

#### 3.1 MATERIAIS

O copolímero  $E_{62}P_{39}E_{62}$  comercialmente conhecido de Pluronic<sup>®</sup> F87 foi obtido da Uniquema (ICI Surfactants) e o copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$  denominado B20-5000 foi obtido da Dow Chemical Company. Os copolímeros diblocos da série  $E_mB_n$  [ $E_{100}B_{51}$ ,  $E_{110}B_{30}$ ,  $E_{114}B_{56}$ ,  $E_{155}B_{76}$ ,  $E_{209}B_{45}$  (E = óxido de etileno e B = óxido de butileno)] e os copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  [G = óxido de (feniloximetileno)etileno] foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Polímeros da Universidade de Manchester. Água milli-Q e metanol (SYNTH) foram utilizados como solventes. O fármaco griseofulvina foi obtido da Aldrich. Utilizou-se o corante 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) da Biochemika, membrana Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  e membrana de diálise de MWCO 2000 g/mol da Sigma.

Para melhor exposição dos resultados e discussão relativos aos fármacos griseofulvina encapsulada no copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , quercetina e mangiferina encapsuladas nos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  utilizou-se as seguintes nomenclaturas:

$GB_{14}E_{43}B_{14}$ : griseofulvina encapsulada no copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$ ;

$QE_{65}G_5$ : quercetina encapsulada no copolímero dibloco  $E_{65}G_5$ ;

$QE_{65}G_7E_{65}$ : quercetina encapsulada no copolímero tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$ ;

$ME_{65}G_5$ : mangiferina encapsulada no copolímero dibloco  $E_{65}G_5$ ;

$ME_{65}G_7E_{65}$ : mangiferina encapsulada no copolímero tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$ .

#### 3.2 MISTURAS DOS COPOLÍMEROS

As misturas foram preparadas com os copolímeros triblocos F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ ) e  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , com maior quantidade dos copolímeros mais hidrofóbico ( $E_{43}B_{14}E_{43}$ ) nas proporções 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 e 90/10.

Por exemplo, para obtenção de 0,5 g de uma mistura de  $E_{43}B_{14}E_{43}$ /F87 60/40 a 30% m/m é necessário o seguinte cálculo:

$$\left. \begin{array}{l} 30 \text{ g} \rightarrow 100 \text{ g} \\ x \leftarrow 0,5 \text{ g} \end{array} \right\} x = 0,15 \text{ g (150 mg)}$$

$$0,15 \text{ g} \times 0,6 \text{ E}_{43}\text{B}_{14}\text{E}_{43} \text{ (60\% E}_{43}\text{B}_{14}\text{E}_{43})} = 0,09 \text{ g (90 mg de E}_{43}\text{B}_{14}\text{E}_{43})$$

$$0,15 \text{ g} \times 0,4 \text{ F87 (40\% F87)} = 0,06 \text{ g (60 mg) de F87}$$

$$\text{mH}_2\text{O} = 0,5 - 0,15 = 0,35 \text{ g (350 mg de água milli-Q)}$$

Como mostrado no cálculo, primeiramente se encontra a massa que corresponde a 30% na massa total (0,5 g). Em seguida, multiplica-se a massa total de amostra encontrada pela proporção de cada copolímero na mistura e assim obtém-se a massa a ser pesada de cada um. A massa de água é a diferença entre a massa total (0,5 g) e a massa de amostra pesada (0,15 g no exemplo).

### 3.3 INVERSÃO DE TUBO

O diagrama de fase foi obtido pelo método de inversão de tubo, o qual serve para caracterizar se a solução é fluida ou não. Nesse estudo foram obtidos diagramas de fase para os copolímeros triblocos: F87,  $\text{E}_{43}\text{B}_{14}\text{E}_{43}$  e as misturas  $\text{E}_{43}\text{B}_{14}\text{E}_{43}$ /F87 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 e 90/10, respectivamente.

As soluções dos copolímeros e das misturas foram preparadas em tubos de diâmetro interno de 10 mm contendo massa total de 0,5 g em diferentes concentrações (1 a 50 %m/m), deixando-os em repouso sob refrigeração por vários dias (~5 a 10 dias) até atingir o equilíbrio. A possível modificação foi observada enquanto os frascos foram lentamente aquecidos (5–90 °C) num banho de água termostatizado ( $\pm 1$  °C). A velocidade de aquecimento foi de  $\pm 1^\circ \text{ min}^{-1}$ .

### 3.4 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A determinação da concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros triblocos F87,  $\text{E}_{43}\text{B}_{14}\text{E}_{43}$  e suas misturas  $\text{E}_{43}\text{B}_{14}\text{E}_{43}$ /F87 50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 e dos diblocos com longos blocos B ( $\text{E}_{100}\text{B}_{51}$ ,  $\text{E}_{110}\text{B}_{30}$ ,  $\text{E}_{114}\text{B}_{56}$ ,  $\text{E}_{155}\text{B}_{76}$  e  $\text{E}_{209}\text{B}_{45}$ ) foi realizada usando um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500. O corante 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) da Biochemika foi utilizado como recebido na determinação. Soluções estoque dos copolímeros foram preparadas por dissolução em água milli-Q, por 24 horas para completa solubilização antes das diluições necessárias ( $0,01 \text{ mg dm}^{-3}$ – $1 \text{ g dm}^{-3}$ ). O DPH foi dissolvido em metanol (0,4 mM) e adicionado a solução do copolímero na razão de 1:100 (40 $\mu\text{L}$  DPH: 4mL solução). Dessa forma foram obtidas



soluções dos copolímeros com 1% (v/v) de metanol e 0,004 mM de DPH. Os estudos foram realizados a 25, 30, 35, 40, 45 e  $50 \pm 0,2$  °C.

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

### **3.5 SOLUBILIZAÇÃO**

#### **3.5.1 ESPECTROSCOPIA DE UV/VIS**

A curva de calibração da griseofulvina, quercetina e mangiferina foi preparada a partir dos dados de concentração (mg/L) *versus* absorbância (A) com leitura no comprimento de onda de 292, 375 e 257 nm, respectivamente. Espectrofotômetro U-2000 da Hitachi foi utilizado no experimento. Os encapsulados de griseofulvina com os copolímeros triblocos F87, E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> e as misturas E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>/F87 50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 foram obtidas através de 4 métodos. Os encapsulados de griseofulvina com os copolímeros diblocos da série E<sub>m</sub>B<sub>n</sub> (E<sub>100</sub>B<sub>51</sub>, E<sub>110</sub>B<sub>30</sub>, E<sub>114</sub>B<sub>56</sub>, E<sub>155</sub>B<sub>76</sub>, E<sub>209</sub>B<sub>45</sub>) foram obtidos pelos métodos 1 (dissolução), 2 (fundido) e 3 (filme). Os encapsulados de quercetina e mangiferina nos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> foram obtidos apenas pelo método 1 (dissolução).

As soluções do copolímero E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> submetidas aos métodos 1 (dissolução) e 2 (fundido) foram divididas em dois grupos, onde um dos grupos passou pela etapa de centrifugação visando avaliar o efeito desta na solubilidade obtida por estes métodos. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

##### **3.5.1.1 Método 1 (Dissolução)**

Em alíquotas de 10 mL de cada solução estoque a 1% m/v dos copolímeros e misturas, foi adicionada 10 mg de griseofulvina. As soluções foram lentamente agitadas a 25 °C por 4 dias e posteriormente a 37 °C ( $\pm 0,1$  °C) pelo mesmo período em um banho termostaticado QUIMIS. Retirou-se alíquotas de 3 mL do sobrenadante, sendo posteriormente filtradas em membrana Millipore (0,45  $\mu$ m) para remoção de alguma porção de fármaco não solubilizado. Alíquotas das amostras filtradas foram diluídas

com metanol em concentrações conhecidas e a absorvância das soluções resultantes determinadas em comprimento de onda específico. Os valores das absorvâncias das soluções aquosas do fármaco e dos copolímeros foram obtidos e subtraídos dos valores obtidos para as soluções aquosas dos copolímeros com fármaco.

#### **3.5.1.2 Método 2 (Fundido)**

Em 100 mg do copolímero fundido a 65 °C foi adicionado 10 mg do fármaco griseofulvina e a mistura permaneceu sob agitação por 3 horas para dissolução. Após este período foi acrescentado 10 mL de água a 65 °C, necessária para compor a concentração de 1% m/v. Esta temperatura foi mantida por mais 1 hora e em seguida resfriada a 25 °C, temperatura na qual permaneceu por 4 dias. A solução foi filtrada em membrana Millipore 0,45 µm para remover o excesso do fármaco e procedimento de quantificação foi igual ao empregado no método 1 (dissolução).

#### **3.5.1.3 Método 3 (Filme)**

Utilizou-se a metodologia descrita por Elsabahy e col. (2007) com algumas modificações. O copolímero (100 mg) e o fármaco (10 mg) foram dissolvidos em etanol (10 mL). O solvente foi rotaevaporado à temperatura ambiente de 30 °C formando um filme do fármaco com o copolímero e o volume final reconstituído com água milli-Q (10 mL). As soluções obtidas ficaram sob agitação por 24 horas, sendo em seguida centrifugadas (6000 rpm, 30 minutos), o sobrenadante coletado e filtrado através de membrana Millipore 0,45 µm e procedimento de quantificação foi igual ao empregado no método 1 (dissolução).

#### **3.5.1.4 Método 4 (Sonicação)**

Em alíquotas de 5 mL de soluções dos copolímeros e misturas a 1% m/v utilizou-se 5 mg de griseofulvina. Um sonicador Sonifier<sup>®</sup>/Branson W-450D de alta frequência foi usado na amplitude de 20% (16 Watts) num intervalo de 1 minuto com pulsos alternados de 1s em banho de gelo, mantendo a temperatura em torno de 25 °C. As soluções obtidas foram centrifugadas (6000 rpm, 30 minutos), o sobrenadante coletado

e filtrado através de membrana Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  e procedimento de quantificação foi igual ao empregado no método 1 (dissolução).

### **3.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

A quantificação da quercetina e mangifeina encapsulada nos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi obtida na EMBRAPA. Utilizou-se um sistema de HPLC-Analítico Auto Sampler Varian 410, coluna de Zorbax SB-C18 da Agilent 4,6x150mm e uma pré-coluna Metaguard Pursuit 5u C18 da Agilent 4,6 mm, com fluxo de 1,0 mL/min e 20  $\mu\text{L}$  de volume injetado.

A mangiferina foi analisada a 40°C e fase móvel de 82,5% de fosfato monobásico e 0,05 M, pH 2,1 e 17,5% de Acetonitrila da Vetec e leitura no detector de UV/Vis em 317 nm.

A quercetina foi analisada a 30 °C e com fase móvel de água/ácido fórmico (99,7-0,3 v/v) na Bomba A e metanol/ácido fórmico (99,7-0,3 v/v) na Bomba B com as bombas programadas da seguinte forma: 0-10min a 30-50% B – 10-30min a 50-70% B – 30-40min a 70%B – 40-41min a 70-30% B e leitura no detector de UV/Vis em 370 nm.

## **3.6 CARACTERIZAÇÃO**

### **3.6.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FT-IR)**

Os copolímeros triblocos F87, E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> e as misturas E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>/F87 50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 e encapsulados com griseofulvina; o dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e o tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> e seus encapsulados com quercetina e mangiferina liofilizados foram preparados em pastilha de KBr (brometo de potássio para espectroscopia) e analisadas em equipamento FT-IR 8300 (Shimadzu) com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 10 varreduras.

### **3.6.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN (FT-RAMAN)**

As análises de FT-Raman, dos copolímeros triblocos F87 e E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>, as misturas E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>/F87 50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 e encapsulados com griseofulvina, o dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e o tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> e seus encapsulados com quercetina e

mangiferina liofilizados foram obtidas em um RAMII (Bruker) existente no Departamento de Física da UFC, com tempo de aquisição do sinal de 10 min e potência do laser de 50 mW. A linha de laser tem comprimento de onda de 1064 nm e cerca de 1.16eV.

### **3.6.3 DIFRAÇÃO DE RAIO-X**

As análises por difração de raios-X dos copolímeros triblocos F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , as misturas  $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$  50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 e encapsulados com griseofulvina; o dibloco  $E_{65}G_5$  e o tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  e seus encapsulados com quercetina e mangiferina liofilizados foram realizadas em um difratômetro Rigaku, modelo DMAXB existente no Departamento de Física da UFC com ângulo  $2\theta$  de 5-45° e uma velocidade de 0,5°/min.

### **3.6.4 TAMANHO DE PARTÍCULA DAS MICELAS**

O diâmetro hidrodinâmico médio e o raio hidrodinâmico médio dos copolímeros triblocos F87 e  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , as misturas  $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$  50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 e encapsulados com griseofulvina; o dibloco  $E_{65}G_5$  e o tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  e seus encapsulados com quercetina e mangiferina foram determinados a 25 °C utilizando o equipamento Nano Zetasizer da Malvern modelo ZEN 3500 existente no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. As medidas foram feitas para os sistemas obtidos após redispersão do material liofilizado em água milli-Q. As medidas foram feitas em triplicata.

### **3.6.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)**

As análises para avaliar a morfologia e superfície dos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e o tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  e seus encapsulados com quercetina e mangiferina liofilizados foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Engenharia Mecânica da UFC em microscópio eletrônico de varredura PHILIPS XL-30. Pequenas quantidades dos pós foram depositados sobre fita adesiva dupla face, fixada em suporte

metálico. A placa metálica foi recoberta com ouro em sputter coater Emitech K500, operando a 5 mA e 50 kV, fornecendo uma cobertura de aproximadamente 50 nm.

### **3.7 LIBERAÇÃO *IN VITRO***

O estudo de liberação *in vitro* da griseofulvina dos sistemas encapsulados pelos métodos 3 (filme) e 4 (sonicação) no copolímero E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> foi realizado através da técnica de difusão usando uma membrana de diálise de MWCO 2000 g/mol da Sigma. A massa de 1,32 mg de griseofulvina encapsulada no copolímero E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> (amostra liofilizada) foi dissolvida em 1 mL de tampão fosfato pH 7,4 ( $\pm 1$ ) inserido na membrana de diálise e imerso em 75 mL de tampão fosfato a 37 °C ( $\pm 0,2$  °C). Em intervalos de 1 em 1 h no primeiro dia e a cada 24 h por 10 dias, alíquotas de 3 mL foram retiradas e o volume final reconstituído com a solução tamponada (3 mL). As soluções foram diluídas em metanol (2x) e a quantidade de griseofulvina liberada foi determinada por UV/Vis no comprimento de onda de 292 nm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 INVERSÃO DE TUBO

O estado gel é denominado como gel rígido em função da imobilidade no teste de inversão de tubo, o qual pode ser confirmado por reologia, conforme estudos realizados por Ricardo e col., 2005 e Harrison e col., 2005.

#### 4.1.1 Triblocos F87, $E_{43}B_{14}E_{43}$ e suas misturas

A Figura 16 mostra os diagramas de fases de formação de gel dos copolímeros F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$  puros e suas misturas obtidos pelo teste de inversão de tubo. As propriedades termorresponsivas do F87 são similares ao copolímero comercial F127 ( $E_{98}P_{67}E_{98}$ ) e são explicadas pela instabilidade de suas micelas em meio aquoso a baixas temperaturas, efeito que é explicado por sua entalpia de micelização positiva (Chaibundit e col., 2007).

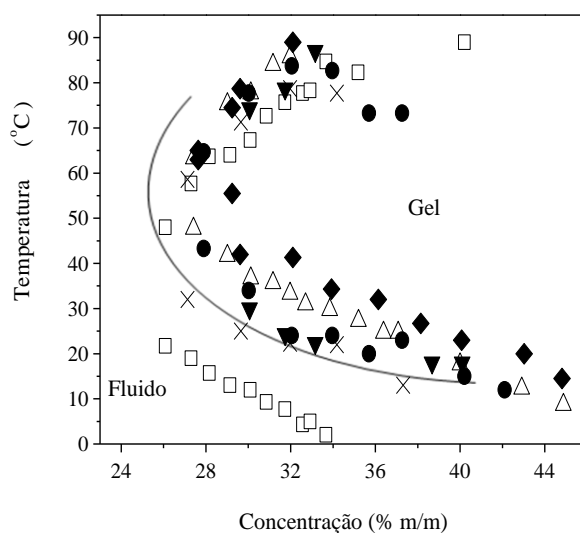


Figura 16. Diagrama de fase dos copolímeros F87 (-),  $E_{43}B_{14}E_{43}$  ( $\square$ ) e das misturas  $E_{43}B_{14}E_{43}$ /F87: 50/50 ( $\Delta$ ), 60/40 ( $\blacklozenge$ ), 70/30 ( $\bullet$ ), 80/20 ( $\blacktriangledown$ ) e 90/10 ( $\times$ ).

O limite inferior das misturas  $E_{43}B_{14}E_{43}$ /F87 coincide com o limite do tribloco F87 (as curvas estão deslocadas mais para direita). Supõe-se que o limite inferior de gel

da mistura possui o tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$  totalmente incorporado dentro da micela, enquanto que o tribloco F87 está parcialmente incorporado. Tal fato evidencia que o limite inferior da mistura depende criticamente da extensão de micelização do F87. A formação de géis desses sistemas com uma temperatura de transição na faixa entre a temperatura ambiente e a temperatura corpórea (25-37 °C) (Figura 16) torna essas misturas interessantes para a administração de medicamentos.

O limite superior de gel da mistura é intermediário aos copolímeros sozinhos (Figura 16). Isto é esperado, pois a altas temperaturas, os dois copolímeros estão totalmente micelizados e o limite resulta da redução da corona composta pelo bloco E, sendo este processo função da proporção de cada copolímero.

A concentração mínima (ou crítica) para formação de gel dos copolímeros F87 e  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas estão na Tabela 1. Observa-se que o aumento da proporção do copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$  promove uma diminuição da  $T^*$  (Tabela 1) sem variação significativa da  $c^*$ .

Tabela 1. Concentração ( $c^*$ ) e temperatura crítica ( $T^*$ ) de formação de gel dos copolímeros F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas 50/50 a 90/10.

Sistema	$c^*$ (% m/m)	$T^*$ (°C)
$E_{69}P_{39}E_{69}$ (F87)	25	59
50/50	27	48
60/40	28	55,5
70/30	28	44
80/20	30	30
90/10	27	32
$E_{43}B_{14}E_{43}$	26	22

Yu e col. (1992) e Nixon, Hvidt e Booth (2004) relataram que o efeito de geleificação no limite inferior aumenta com a extensão de micelização do copolímero. A micelização pode ser essencialmente completa em soluções aquosas a temperaturas tão baixas quanto 20 °C e concentrações tão baixas quanto  $10 \text{ g dm}^{-3}$  (1% m/m). Em soluções mais concentradas, as ligações de hidrogênio água-água, o qual é a origem do efeito hidrofóbico associado aos blocos B e P em soluções diluídas dos copolímeros, é parcialmente substituído por ligações hidrogênio água-polioxiétileno, com uma

conseqüente redução na entalpia de van't Hoff mudando o processo de micelização, e então a temperatura de início da micelização. Existe também uma contribuição entálpica da solução micelar para a geleificação, mas é muito pequena quando comparada com a da auto-micelização (Hvidt e col., 1994; Yu e col., 1992; Nixon, Hvidt e Booth, 2004).



## 4.2 CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

Os estudos realizados por Alexandridis, Holzwarth e Hatton (1994) indicaram a vantagem de usar a intensidade de fluorescência do DPH a 428 nm do que a intensidade de absorbância a 356 nm.

A partir dos espectros de emissão de fluorescência do DPH nos sistemas poliméricos diluídos (ver ilustração do sistema  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , Figura 17), fizeram-se gráficos da intensidade de emissão do DPH no comprimento de onda de 428 nm *versus* o logaritmo da concentração (g/L) dos sistemas poliméricos (ver Figura 18). A CMC dos sistemas poliméricos foi calculada a partir do vértice da curva de intensidade de emissão *versus* log C (ver Figura 18), onde começa a haver um aumento brusco da intensidade de emissão do DPH, devido à sua solubilização pelas micelas do sistema após a CMC (Alexandridis, Holzwarth e Hatton, 1994). Estima-se um erro de até  $\pm 25\%$  nas medidas.

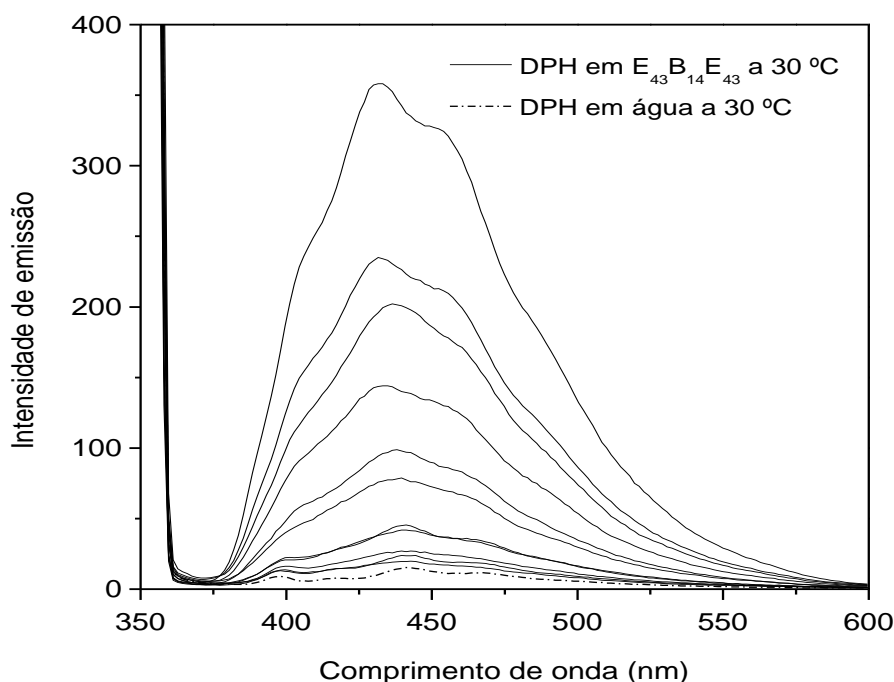


Figura 17. Espectro de emissão de fluorescência em função do comprimento de onda para o DPH em água e em soluções de copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$  em concentrações de  $10^{-5}$  a  $10^{-2}$  g/L.

#### 4.2.1 Triblocos F87, E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> e suas misturas

Os valores de concentração micelar crítica (CMC) obtidos para os copolímeros triblocos F87 e E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> em diferentes temperaturas estão na Tabela 2.

A concentração micelar crítica (CMC) para o copolímero sofre redução com o aumento de temperatura como observado para muitos copolímeros não-iônicos (Alexandridis, Holzwarth e Hatton, 1994).

Os valores de CMC em g/dm<sup>-3</sup> do E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> são bem menores que os valores do F87. O comprimento do bloco de E<sub>m</sub> não interfere na CMC, mas o caráter hidrofóbico do seu bloco hidrofóbico, sim (Yang. e col. 1995, Kellarakis e col. 1998, Attwood, Zhou e Booth, 2007). Quanto mais hidrofóbico, menor a CMC do copolímero, uma vez que a micelização reduz as interações desfavoráveis da cadeia hidrofóbica com a água. Por isso, tem-se que a CMC do F87 (E<sub>62</sub>P<sub>39</sub>E<sub>62</sub>) é maior, mesmo com um bloco hidrofóbico mais longo que o do copolímero E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>, pois a hidrofobicidade relativa entre uma unidade de P e uma unidade de B é de 1:6.

Tabela 2. Concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros F87 e E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> em função da temperatura.

Temperatura (°C)	F87* CMC (g dm <sup>-3</sup> )	E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub> CMC (g dm <sup>-3</sup> )
25	--	0,50
30	5,0	0,20
35	1,0	0,081
40	0,5	-
45	-	0,058
50	-	0,047

\* Harrison e col., 2005

Dados da dependência da intensidade de fluorescência e da concentração do copolímero E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> (escala logarítmica) a 45 °C estão na Figura 18.

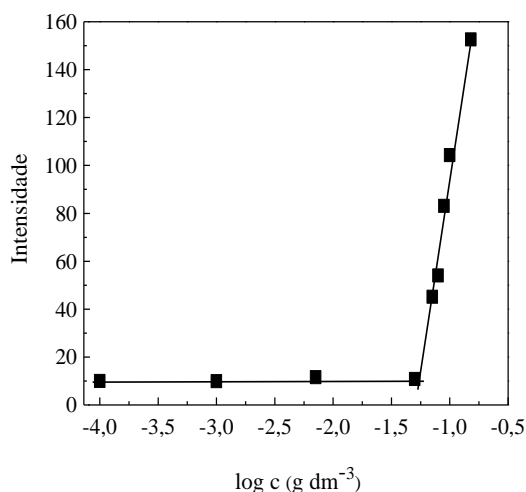


Figura 18. Dependência da intensidade de fluorescência em função do logaritmo da concentração aquosa do copolímero  $E_{43}B_{14}E_{43}$  a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Numa série de copolímeros, valores de CMC são afetados pela variação do comprimento do bloco hidrofílico E. Booth, Attwood e Price (2006) relataram que a dependência do CMC em função do número de unidades E no copolímero é pequena, a menos que, o comprimento do bloco hidrofóbico seja pequeno, isto é, menor que 10. Na verdade, quando dois copolímeros são nominalmente de mesmo comprimento de bloco hidrofóbico, o efeito do comprimento do bloco E é menor que a variação causada pela incerteza do comprimento do bloco hidrofóbico (Booth, Attwood e Price, 2006). Assim, apenas o comprimento do bloco hidrofóbico é analisado.

Tabela 3. Valores de concentração micelar crítica (CMC) da literatura ( $30^{\circ}\text{C}$ ) e massas molares ( $M_n$ ) de copolímeros  $E_mB_nE_m$ .

Copolímero	$M_n$ (g mol <sup>-1</sup> )	CMC (g dm <sup>-3</sup> )	Referência
$E_{21}B_8E_{21}$	2.390	7,0	Yang e col. (1994)
$E_{13}B_{10}E_{13}$	1.800	0,37	Yu e col. (1996)
$E_{33}B_{10}E_{33}$	3.660	3,4	Yu e col. (1996)
$E_{35}B_{10}E_{35}$	3.800	1,0	Yu e col. (2002)
$E_{60}B_{10}E_{60}$	6.480	10,0	Yu e col. (2002)
$E_{21}B_{11}E_{21}$	2.640	0,2	Yang e col. (1995)
$E_{43}B_{14}E_{43}$	4.790	0,2	Crothers e col. (2005)
$E_{45}B_{15}E_{45}$	4.700	0,16	Luo e col. (1993)
$E_{103}B_{15}E_{103}$	10.100	0,37	Kelarakis e col. (1998)
$E_{58}B_{17}E_{58}$	6.400	0,047	Luo e col. (1992)

Combinando o valor CMC a 30 °C do copolímero E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> (Tabela 2) com os valores de CMC já publicados (resumidos na Tabela 3) construiu-se um gráfico de  $\log(\text{CMC}/\text{mol dm}^{-3})$  versus comprimento do bloco (Figura 19).

Analisando a Figura 19, observamos que os dados podem ser representados satisfatoriamente por linhas mostrando duas transições, uma consistente com o início da formação de unímeros-micelas com  $n \sim 8$  e outra referente ao processo completo com  $n \sim 15$ .

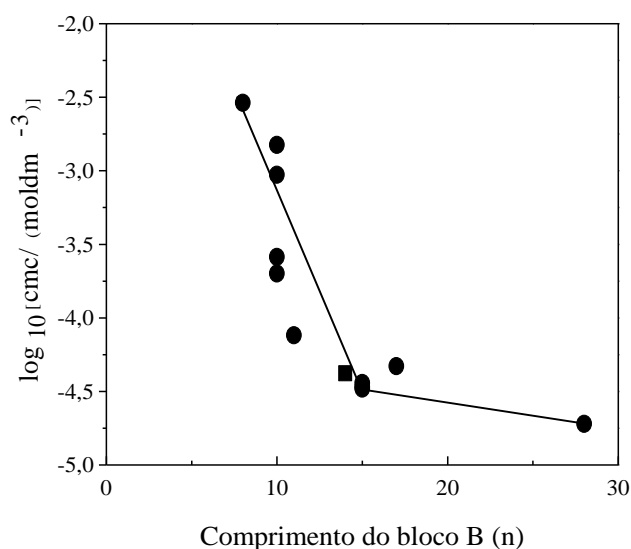


Figura 19. Dependência do  $\log_{10}\text{CMC}(\text{mol dm}^{-3})$  versus o comprimento do bloco hidrofóbico B (n) para copolímeros E<sub>m</sub>B<sub>n</sub>E<sub>m</sub> (30 °C): (●) dados da literatura, (■) este trabalho.

A dependência da temperatura do  $\log(\text{CMC})$  fornece o valor da entalpia de micelização de van't Hoff dado pela equação 8:

$$\Delta_{\text{mic}}H_{\text{VH}} = R[\text{dln}(\text{CMC}) / \text{d}(1/T)] \quad (8)$$

A relação dos valores entre  $\Delta_{\text{mic}}H_{\text{VH}}/n$ , onde n é o comprimento do bloco hidrofóbico versus o comprimento do bloco hidrofóbico estão plotados na Figura 20. Os valores de  $\Delta_{\text{mic}}H/n < 3 \text{ kJ mol}^{-1}$  são encontrados quando o comprimento do bloco hidrofóbico excede 15. Conforme descrito por Booth, Attwood e Price (2006), este efeito do comprimento do bloco no CMC (Figuras 19 e 20), é atribuído ao colapso do bloco hidrofóbico do unímero no ambiente aquoso. Um unímero com bloco hidrofóbico numa conformação compacta tem sido chamado de micela unimolecular (Yuan, Masters

e Price, 1992). Uma consequência do colapso do grupo hidrofóbico é a redução do contato com a água e por isso redução do efeito hidrofóbico (Kelarakis e col. 1998).

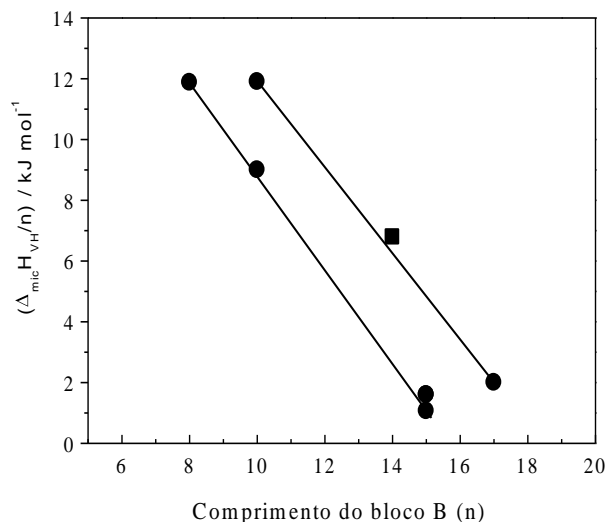


Figura 20. Valores da entalpia de van't Hoff por unidade de B ( $\Delta_{mic}H_{VH}/n$ ) versus o comprimento do bloco. (●) dados da literatura (ver Tabela 4), (■) este trabalho.

Os valores de concentração micelar crítica (CMC) obtidos para as misturas do copolímero  $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$  50/50 a 90/10 em diferentes temperaturas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração micelar crítica (CMC) da misturas dos copolímeros  $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$  nas proporções 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 e 90/10 em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Misturas [CMC (g dm <sup>-3</sup> )]				
	50/50	60/40	70/30	80/20	90/10
30	0,157	0,141	0,165	0,127	0,127
35	0,118	0,131	0,157	0,112	0,110
40	0,114	0,102	0,085	0,102	0,078
45	0,096	0,059	0,062	0,079	0,050
50	0,050	0,050	0,060	0,056	0,040

A concentração micelar crítica (CMC) das misturas dos copolímeros sofre redução com o aumento de temperatura como observado para muitos copolímeros não-

iônicos isolados (Alexandridis, Holzwarth e Hatton, 1994). As misturas conservam o perfil de dependência da temperatura que seus copolímeros isolados.

As CMC's ( $\text{g dm}^{-3}$ ) das misturas são intermediárias às dos polímeros puros a partir da temperatura de  $35^\circ \text{C}$ . Abaixo desta temperatura, os valores são menores que o copolímero mais hidrofóbico ( $\text{E}_{43}\text{B}_{14}\text{E}_{43}$ ). Por isso, devido os baixos valores de CMC na temperatura de administração, essas misturas são promissoras para aplicações farmacológicas devido à potencial estabilidade de suas micelas após a diluição sanguínea.

#### 4.2.2 Série de diblocos $\text{E}_m\text{B}_n$

Resultados da relação da intensidade de emissão obtidos por fluorescência *versus* a concentração do copolímero (escala logarítmica) estão na Figura 21. Os valores de cmc a  $25^\circ \text{C}$  estão na Tabela 5, juntamente com os valores de massa molar e fração molar do grupo hidrofóbico ( $W_h$ ) fornecidos por Ryan e col. (2001).

Tabela 5. Massa molar média ( $M_n$ ) e concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros  $\text{E}_m\text{B}_n$  a  $25^\circ \text{C}$ .

Copolímero	$M_n$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	$W_h$	CMC ( $\text{mg dm}^{-3}$ )
$\text{E}_{110}\text{B}_{30}$	12.400	0,261	1,70
$\text{E}_{209}\text{B}_{45}$	12.300	0,445	0,40
$\text{E}_{100}\text{B}_{51}$	7.000	0,309	0,50
$\text{E}_{114}\text{B}_{56}$	8.070	0,455	0,30
$\text{E}_{155}\text{B}_{76}$	9.050	0,446	0,37

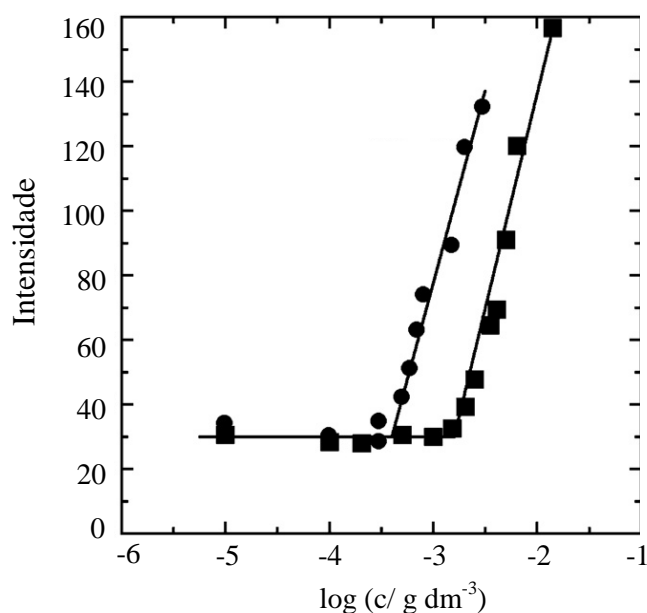


Figura 21. Dependência da intensidade de fluorescência em função do logaritmo da concentração aquosa dos copolímeros: (●)  $E_{155}B_{76}$  e (■)  $E_{209}B_{45}$ .

Combinando os valores da Tabela 5 com os valores de CMC já publicados (resumidos na Tabela 6) construiu-se um gráfico de  $\log(\text{CMC}/\text{mol dm}^{-3})$  versus comprimento do bloco na Figura 22.

Tabela 6. Valores de concentração micelar crítica (CMC) da literatura de copolímeros  $E_mB_n$  a 30 °C.

Copolímero	$M_n$ ( $\text{g mol}^{-1}$ )	CMC ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	Referência
$E_{27}B_7$	1.690	5,8	Tanodekaew e col. (1993)
$E_{11}B_8$	1.130	0,63	Chaibundit e col. (2002)
$E_{41}B_8$	2.380	0,35	Yu e col. (1997)
$E_{18}B_{10}$	1.510	0,063	Kelarakis e col. (2002)
$E_{24}B_{10}$	1.780	0,3	Bedells e col. (1993)
$E_{50}B_{13}$	3.140	0,02	Bedells e col. (1993)
$E_{45}B_{15}$	3.080	0,0095	Elsabahy e col. (2007)
$E_{106}B_{16}$	5.820	0,035	Rippner e col. (2002)
$E_{96}B_{18}$	5.500	0,008	Mingvanish e col. (1999)
$E_{45}B_{24}$	3.730	0,004	Elsabahy e col. (2007)

T=30 °C: exceção Elsabahy e col. 2007, 20 °C.

A variação da temperatura na determinação do CMC não é problema, pois valores de CMC de copolímeros  $E_mB_n$  são insensíveis a temperatura quando  $n \geq 15$  unidades. Entretanto, a variação no comprimento do bloco E tem efeito significativo, portanto, na construção do gráfico da Figura 22 usou-se  $\log_{10}(\text{CMC})/\text{dm}^3 = 0,004$  para ajustar os valores de CMC (unidade molar) para um comprimento de bloco E comum e igual ou superior a  $m = 100$ , um procedimento baseado nos resultados publicados por Alexandridis, Holzwarth e Hatton (1994) e Booth, Attwood e Price (2006).

Os dados da Figura 22 podem ser representados satisfatoriamente por linhas mostrando duas transições, uma consistente com o início da formação de unímeros-micelas com  $n \sim 12$  e outra referente ao processo completo com  $n \sim 30$ .

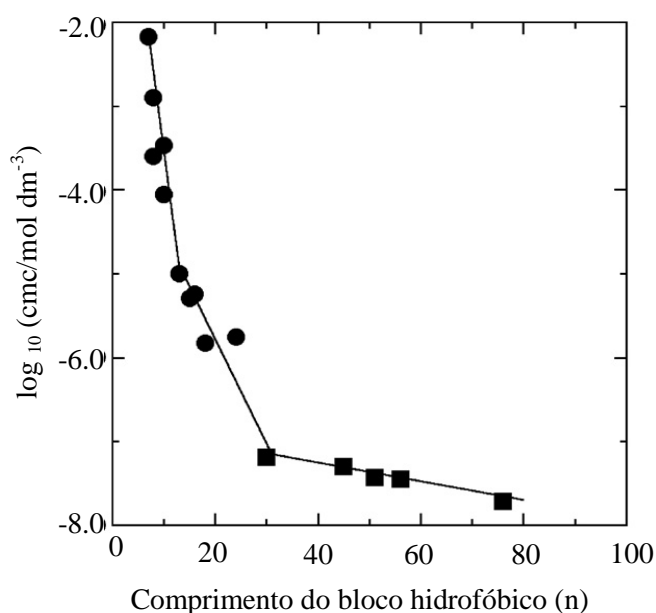


Figura 22. Dependência do  $\log_{10}\text{CMC}(\text{mol dm}^{-3})$  versus o comprimento do bloco hidrofóbico B (n) para copolímeros  $E_mB_n$ : (●) dados da literatura, (■) este trabalho.

Segundo Hall (1987), para altos valores de número de associação de micelas ( $N \geq 50$ )  $\Delta_{\text{mic}}H_{\text{VH}}$  é um valor verdadeiro para a entalpia padrão de micelização, uma situação normal quando  $n$  é grande. Para valores de  $n$  menores, a entalpia padrão é aparente, a qual, no entanto, descreve corretamente a dependência da CMC em relação à temperatura.



A relação entre os valores da entalpia de van't Hoff por unidade de B ( $\Delta_{\text{mic}}H_{\text{VH}}/n$ ) *versus* o comprimento do bloco mostra que os resultados para os copolímeros  $E_mB_n$  estão dentro de uma correspondência aceitável (Figura 23).

Valores muito baixos, especialmente  $\Delta_{\text{mic}}H_{\text{VH}} = 0$ , são característicos de copolímeros  $E_mB_n$  com  $n \geq 15$ , atribuído a transferência de uma molécula de copolímero como um novelo colapsado para um núcleo micelar. Um unímero com um bloco hidrofóbico numa conformação compacta tem sido chamado de micela unimolecular desde 1992 em estudos realizados por Yuan, Masters and Price.

Portanto, os valores de CMC descritos, os quais são independentes da temperatura, isto é, consistente com a entalpia de micelização de van't Hoff igual a zero, é encontrada para outros copolímeros em bloco com longos blocos hidrofóbicos (Yamamoto e col., 2002).

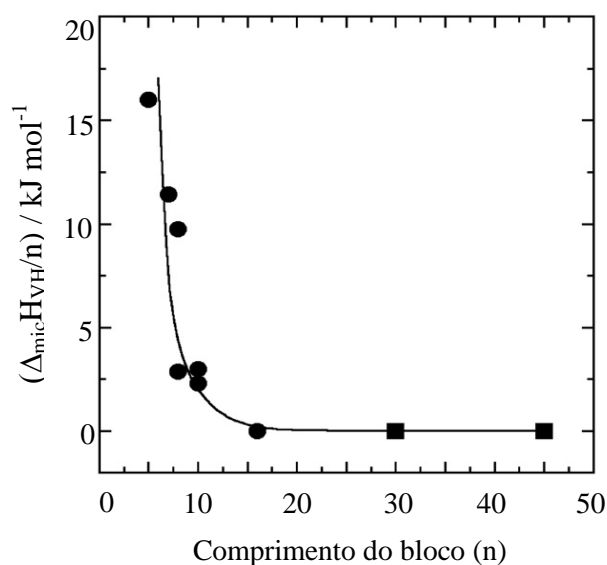


Figura 23. Valores da entalpia de van't Hoff por unidade de B ( $\Delta_{\text{mic}}H_{\text{VH}}/n$ ) *versus* o comprimento do bloco. (●) dados da literatura (ver Tabela 4), (■) este trabalho.

#### 4.2.3 Dibloco $E_{65}G_5$ e tribloco $E_{65}G_7E_{65}$

Os valores de concentração micelar crítica (CMC) obtidos para os copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  em diferentes temperaturas, em g/L e mmol/L estão na Tabela 7.

Tabela 7. Concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$ , e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  na faixa de 30-50 °C.

Sistemas	$E_{65}G_5$		$E_{65}G_7E_{65}$	
	cmc (mg dm <sup>-3</sup> )	cmc (mmol dm <sup>-3</sup> )	cmc (mg dm <sup>-3</sup> )	cmc (mmol dm <sup>-3</sup> )
30 °C	7,0	0,0023	32,0	0,0048
35 °C	6,7	0,0022	23,0	0,0034
40 °C	6,4	0,0021	21,0	0,0031
45 °C	6,3	0,0020	18,0	0,0027
50 °C	5,6	0,0018	16,0	0,0024

É possível observar que o CMC do copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  varia fracamente com a variação de temperatura, principalmente pela análise dos dados em mmol/L, enquanto para o tribloco  $E_{65}G_5E_{65}$  ocorre uma redução a metade, quando a temperatura aumenta de 30 para 50 °C. Os valores de CMC encontrados para estes copolímeros pelo método da solubilização do corante foram cerca de 4 a 10x menores que o CMC estudados por tensão superficial para copolímeros  $E_mG_n$  e  $E_mG_nE_m$  similares (Taboada e col. 2005 e 2006). Os valores de CMC para o dibloco são menores que o tribloco, expectativa esperada pela arquitetura mais compacta do dibloco, ou seja, maior número de moléculas na micela acarretando uma menor CMC.

Taboada e col. 2005 e 2006 relatam que a proximidade dos valores de concentração micelar crítica entre os diblocos  $E_mS_n$  e  $E_mG_n$  e os triblocos  $E_mS_nE_m$  e  $E_mG_nE_m$  deve ao fato de terem cadeia hidrofóbica quimicamente semelhantes [S – OCH<sub>2</sub>CH(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) e G – OCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)].

Dados da dependência da intensidade de fluorescência e da concentração do copolímero  $E_{65}G_5$  (escala logarítmica) a 45 °C estão na Figura 24.

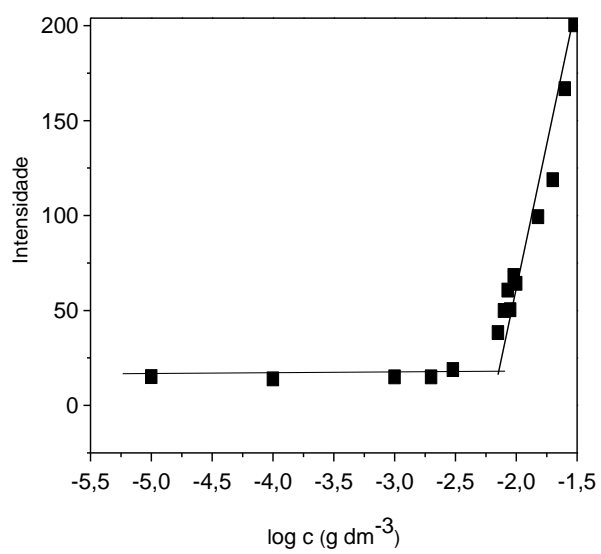


Figura 24. Gráfico de emissão de fluorescência *versus* log C (g/L) dos sistemas E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> 45 °C.

### 4.3 SOLUBILIZAÇÃO

#### 4.3.1 ESPECTROSCOPIA UV/VIS

A solubilização de fármacos em copoli(oxialquileno)s tem se desenvolvido nos últimos anos devido as propriedades destes copolímeros, tais como: capacidade de formação de géis termoreversíveis, formar micelas estáveis, promover maior tempo de circulação do fármaco no corpo, entre outros. O uso de copolímeros não-iônicos é vantajoso porque apresenta sensibilidade do pH reduzida à presença de eletrólitos no sistema. Outra vantagem de uso desses copolímeros é a flexibilidade na sua síntese, ou seja, é possível sintetizar a molécula com o grau de solubilidade requerido em função do tamanho do grupo hidrofílico.

A curva de calibração para os fármacos griseofulvina, quercetina e mangiferina em metanol é mostrada na Figura 25. A partir da curva de calibração foi obtida a equação que relaciona absorção e concentração ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ). As equações 13, 14 e 15 foram obtidas para griseofulvina, quercetina e mangiferina nos comprimentos de onda de 292, 375 e 257 nm, respectivamente.

$$A = 0,06173.[S] + 0,02734 \text{ (mg/L)} \quad (13)$$

$$A = 0,07200.[S] - 0,00810 \text{ (mg/L)} \quad (14)$$

$$A = 0,06173.[S] + 0,03120 \text{ (mg/L)} \quad (15)$$

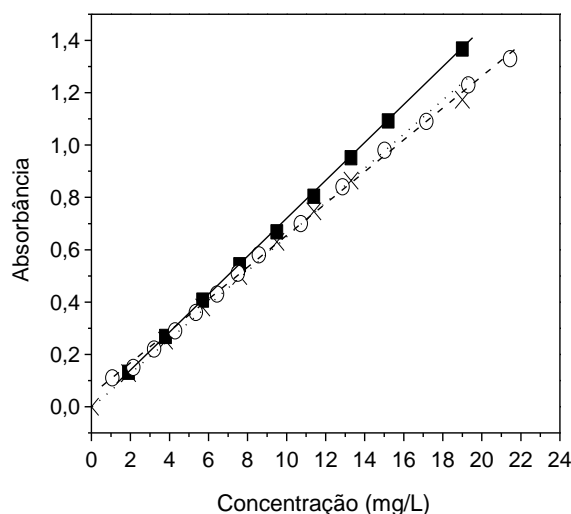


Figura 25. Curva de calibração da griseofulvina (X), quercetina (■) e mangiferina (o).

A solubilidade é estudada através da massa do fármaco solubilizada (mg) por massa de copolímero (g), chamada de capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ). A  $S_{cp}$  é calculada a partir da solubilidade total do fármaco na solução do copolímero ( $S_{tot}$ ) subtraída a solubilidade do fármaco em água ( $S_o$ ) dividido pela massa do copolímero ( $m_{cop}$ ):

$$S_{cp} = S_{tot} - S_o / m_{cop} \quad (16)$$

Visando verificar a contribuição da corona de polióxido de etileno na solubilização promovida pelo copolímero, Chaibundit e col. (2002) estudaram a solubilidade da griseofulvina numa solução de polietileno glicol a 5% m/m ( $M_n = 6000 \text{ g mol}^{-1}$ ) e verificaram que a solubilidade apresentou-se pouco diferente das medidas de solubilidade desse fármaco em água. Portanto, a solubilização na corona formada pelos blocos E não é uma consideração relevante. A Figura 26 mostra os valores de solubilidade da griseofulvina em função da concentração de polietileno glicol 6000 a 25 e 37 °C.

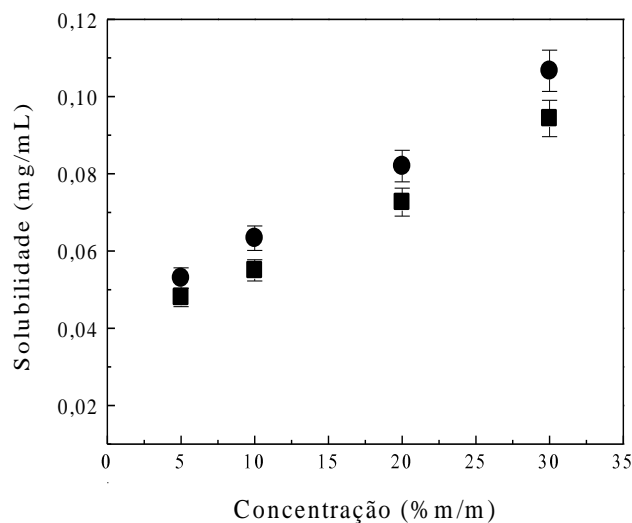


Figura 26. Solubilidade da griseofulvina em função da concentração do polietilenoglicol 6000 a (■) 25 e (●) 37 °C.

Crothers e col. (2005) também estimaram a capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ) da corona composta por blocos E usando o fármaco griseofulvina e concluíram que esta não influencia no valor de  $S_{cp}$  do copolímero como um todo. Assim, apenas a porção

hidrofóbica é levada em consideração e a capacidade de solubilização em mg/g de bloco hidrofóbico ( $S_h$ ) é analisada. A solubilidade é calculada a partir dos valores de  $S_{cp}$ , com:

$$S_h = S_{cp}/W_h \quad (17)$$

onde  $W_h$  é a fração em massa do bloco hidrofóbico ( $W_E - 1$ , onde  $W_E$  é a fração em massa do bloco hidrofílico e os valores de  $W_h$  calculados para as misturas são encontrados usando-se os valores separados dos copolímeros em função de sua proporção). A quantidade de  $S_h$  fornece uma medida direta da eficiência da solubilização em núcleos micelares, sendo independente da composição do copolímero.

#### 4.3.1.1. Triblocos F87, E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> e suas misturas

A Tabela 8 mostra as características moleculares dos copolímeros F87 (E<sub>62</sub>P<sub>39</sub>E<sub>62</sub>) e E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>, tais como massa molar numérica média ( $M_n$ ), fração em massa do bloco hidrofóbico ( $W_h$ ) obtido por espectroscopia de RMN <sup>13</sup>C e a razão  $M_w/M_n$  obtida por cromatografia de permeação em gel.

Tabela 8. Características moleculares dos copolímeros triblocos.

Copolímero	$M_n$ (g/mol)	$W_h$	$M_w/M_n$	Referência
F87 (E <sub>62</sub> P <sub>39</sub> E <sub>62</sub> )	7720	0,290	1,09	Ricardo e col. (2005)
E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub>	4790	0,307	1,08	Crothers e col. (2005)

Valores da absorvância total, que corresponde à absorvância da solução aquosa do copolímero com o fármaco, da absorvância do copolímero correspondem ao valor obtido para sua solução aquosa sem o fármaco no comprimento de onda de 292 nm e a absorvância da solução aquosa do fármaco encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Solubilização da griseofulvina em solução aquosa de F87 a 1% m/v, 25 °C.

F87	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3
Absorbância Total	0,277	0,299	0,309
Diluição ( $D_t$ )	10 x	10 x	10 x
Absorbância do copolímero	0,036	0,037	0,036
( $D_c$ )	10 x	10 x	10 x
Absorbância do fármaco em água ( $A_f$ )	0,217	0,232	0,226
Diluição ( $D_f$ )	10 x	10 x	10 x
mg/L		5,0	
mg/g F87 ( $s_{cp}$ )		0,5	
mg/g bloco hidrofóbico ( $s_h$ )		1,72	

A aplicação dos dados da Tabela 11 na curva de calibração para a griseofulvina fornece a concentração do fármaco na solução micelar:

$$A = 0,02734 + 0,06173.[S] \text{ (mg/L)} \quad (13)$$

$$(A_t - A_c - A_f) = 0,02734 + 0,06173.[S]$$

$$S = 0,5 \text{ mg/L (x Diluição)}$$

$$S = 5,0 \text{ mg/L}$$

As concentrações das soluções dos copolímeros ( $S_c$ ) é 1% m/v, ou seja, 1 g/100 mL. Portanto, a capacidade de solubilização  $S_{cp}$  é 0,5 mg/g copolímero. A capacidade de solubilização  $S_h$  é calculada levando-se em conta a fração em massa do bloco hidrofóbico ( $W_h$ ):

$$S_h = S_{cp} \text{ (mg/g)} / W_h \quad (17)$$

$$S_h = 0,5 / 0,29$$

$$S_h = 1,72 \text{ mg/g bloco hidrofóbico}$$

A análise dos valores de  $S_{cp}$  do copolímero  $E_{43}B_{14}E_{43}$  obtidos pelos métodos 1 e 2 demonstrou que tais valores estão abaixo dos dados encontrados na literatura, como mostra a Tabela 10. Entretanto, pode-se observar que o método 3 e 4 fornecem valores de  $S_{cp}$  intermediários entre os métodos 1 e 2 utilizando os dados da literatura para análise (Tabela 11). O mesmo foi observado para a serie de diblocos  $E_mB_n$  estudada.

A etapa de centrifugação não afeta a solubilização, uma vez que o sistema encontra-se saturado e apenas a filtração poderá remover qualquer porção insolúvel existente.

Tabela 10. Valores de  $S_{cp}$  para o copolímero  $E_{43}B_{14}E_{43}$  obtidos nesse trabalho e os citados na literatura.

Copolímero	Dissolução*	Dissolução		Fundido*	Fundido
	25 °C	25 °C	37 °C	25 °C	25 °C
$E_{43}B_{14}E_{43}$	3,3	2,0	2,5	6,1	2,9
$E_{43}B_{14}E_{43}^{**}$	-	2,3	2,6	-	3,0

\*Crothers e col., 2005

\*\*Soluções centrifugadas a 6000 rpm por 30 minutos.

Observou-se que para esse sistema, os métodos de solubilização por dissolução e fundido não promovem boa solubilidade do fármaco (Tabela 10), sendo compatível com a idéia de que cada sistema polímero/fármaco exerce uma interação que será dependente do método de solubilização utilizado (Attwood, Zhou e Booth, 2007).

Analisando os valores de  $S_{cp}$  para os copolímeros  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , F87 e suas misturas (Tabela 11) observou-se um aumento significativo da capacidade de solubilização para a mistura com 70% do bloco mais hidrofóbico ( $E_{43}B_{14}E_{43}$ ) pelo método 3 e 60% pelo método 4. Tal fenômeno foi também observado em estudos de solubilização para misturas do copolímero  $E_{137}S_{18}E_{137}$  e F87 contendo a partir de 70% do copolímero  $E_{137}S_{18}E_{137}$  (Pinho, 2006), destacando que diferentes métodos foram utilizados (Figura 16).

A capacidade de solubilização por bloco hidrofóbico obtido pelo método 3 (filme) mantém a razão 1:3 da solubilização do fármaco em sistemas com bloco hidrofóbico P: B (13,7 mg/g  $E_{43}B_{14}E_{43}$ /4,6 mg/g F87 = 2,98), que foi igualmente encontrado no estudo realizado por Rekatat e col. (2001), a qual é uma aproximação grosseira das razões de hidrofobicidade baseada nos valores de CMC (P: B: S = 1: 6:12) calculados por Booth e Attwood (2000).



Tabela 11. Valores de capacidade de solubilização,  $S_{cp}$ , (mg/g copolímero) e capacidade de solubilização por bloco hidrofóbico ( $S_h$ ) obtidos pelos métodos 3 (filme) e 4 (sonicação) para os copolímeros F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ ),  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas.  $S_0 = 3,6$  mg/dL

Sistema	Filme		Sonicação	
	$S_{cp}$ (mg/g)	$S_h$ (mg/g)	$S_{cp}$ (mg/g)	$S_h$ (mg/g)
F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ )	1,3	4,6	1,9	6,6
50/50	3,5	11,8	3,0	10,2
60/40	4,1	13,7	4,3	14,3
70/30	4,6	15,2	5,2	17,2
80/20	5,0	16,5	5,2	17,1
90/10	5,0	16,4	5,4	17,7
$E_{43}B_{14}E_{43}$	4,2	13,7	3,6	11,7

A Figura 27 mostra a variação da capacidade de solubilização por grama de copolímero ( $S_{cp}$ ) e a capacidade de solubilização por grama de bloco hidrofóbico ( $S_h$ ) para a solubilidade da griseofulvina obtida pelos métodos 3 e 4.

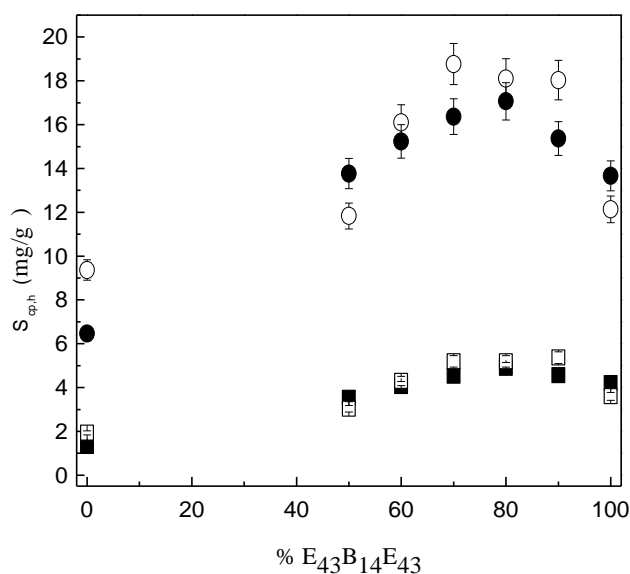


Figura 27. Solubilidade da griseofulvina em função da proporção do copolímero  $E_{43}B_{14}E_{43}$  obtidos pelos métodos: 3 (filme) (■)  $S_{cp}$  e (●)  $S_h$  e 4 (sonicação) (□)  $S_{cp}$  e (○)  $S_h$ .

A Tabela 12 mostra em quantas vezes a solubilidade em água da griseofulvina aumentou nas soluções aquosas a 1% dos copolímeros em função do método de solubilização aplicado (método 3 – filme e método 4 – sonicação). Esses valores de

$S/S_0$  expressam os resultados de solubilização para aplicação direta das formulações aquosas dos copolímeros a 1% (m/v).

A solubilidade da griseofulvina aumenta de 1,4 a 2,5 vezes em soluções micelares dos copolímeros a 1%. Sendo o maior aumento promovido pelas misturas de  $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$  a 70/30 obtida pelo método 3 (filme) e  $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$  a 60/40 obtida pelo método 4 (sonicação).

Tabela 12. Aumento ( $S/S_0$ ) das solubilidades da griseofulvina nas soluções a 1% dos sistemas poliméricos submetidos aos métodos 3 (Filme) e 4 (Sonicação).

Sistema	Filme		Sonicação	
	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$
F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ )	$4,9 \pm 0,76$	1,4	$5,5 \pm 0,51$	1,5
50/50	$7,1 \pm 0,11$	2,0	$6,6 \pm 0,32$	1,8
60/40	$7,7 \pm 0,71$	2,1	$7,9 \pm 0,17$	2,2
70/30	$8,2 \pm 0,39$	2,3	$8,8 \pm 0,27$	2,4
80/20	$8,6 \pm 0,31$	2,4	$8,8 \pm 0,18$	2,4
90/10	$8,6 \pm 0,11$	2,4	$9,0 \pm 0,28$	2,5
$E_{43}B_{14}E_{43}$	$7,8 \pm 0,09$	2,2	$7,2 \pm 0,15$	2,0

Os dados de raio hidrodinâmico aparente ( $r_{h, app}$ ) para os copolímeros  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , F87 e sua mistura 50/50 publicados por Harrison e col. (2005) dão suporte ao perfil de solubilização observado. Harrison e col. (2005) relatam que o copolímero F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ ) em solução a 20 °C apresenta um pico único com  $r_{h,app} \approx 2$  nm sendo característico da presença de unímeros em solução não associados. A 30 °C, picos dominantes de unímeros foram observados. A distribuição para soluções a 40 °C apresenta dois picos com  $r_{h,app} \approx 2$  nm (unímeros) e  $r_{h,app} \approx 10$  nm (micelas). Exceção ocorre na solução de  $c = 50$  g  $dm^{-3}$ , na qual a distribuição mostrou um único pico com  $r_{h,app} \approx 10$  nm (micelas), isto é, a distribuição evidencia um aumento da extensão de micelização com o aumento da concentração a essa temperatura. A 50 °C, as distribuições obtidas para as soluções mostraram picos únicos dentro da faixa de concentração estudada, com valor de  $r_{h,app} \approx 8-10$  nm indicativo de formação de micelas. Yang e col. (1997) também relataram picos com  $r_{h,app} \leq 4$  nm que são tratados como picos referentes a moléculas não associadas, ou seja, unímeros para copolímeros

triblocos do tipo  $E_m B_n E_m$ . O copolímero  $E_{43} B_{14} E_{43}$  apresentou picos únicos de  $r_{h,app}$  com valores de 6 – 6,6 nm na faixa de temperatura de 20 a 50°C, ou seja, há uma homogeneidade de micelas na faixa de temperatura estudada para este copolímero. A mistura  $E_{43} B_{14} E_{43}/F87$  50/50 apresentou perfil similar ao F87 às temperaturas de 20 – 40 °C, com valores de  $r_{h,app}$  menor que o observado para o copolímero  $E_{43} B_{14} E_{43}$  à temperatura de 30 °C. Tal evidência justifica menores valores de  $S_{cp}$  e  $S_h$  para esta mistura em todos os métodos estudados (25 e 30 °C). Os valores de número de associação ( $N_w$ ) exibem melhor o perfil. A mistura  $E_{43} B_{14} E_{43}/F87$  50/50 exibe menores valores de  $N_w$  que o copolímero  $E_{43} B_{14} E_{43}$ , ou seja, menor número de moléculas participa da mistura, justificando um menor efeito de solubilização. A Tabela 13 traz um resumo das propriedades micelares ( $N_w$  – número de associação e  $r_{h,app}$  – raio hidrodinâmico aparente) dos copolímeros  $E_{43} B_{14} E_{43}$ , F87 e sua mistura 50/50 publicados por Harrison e col. (2005).

Tabela 13. Propriedades micelares micelares ( $N_w$  – número de associação e  $r_{h,app}$  – raio hidrodinâmico aparente) dos copolímeros triblocos F87,  $E_{43} B_{14} E_{43}$  e sua mistura 50/50 publicados por Harrison e col. (2005).

Temperatura (°C)	$E_{43} B_{14} E_{43}$		F87 ( $E_{69} P_{39} E_{69}$ )		Mistura 50/50	
	$N_w$	$r_{h, app}$	$N_w$	$r_{h, app}$	$N_w$	$r_{h, app}$
20	6	6,0	-	-	-	-
30	11	6,3	-	-	6	5,9
40	14	6,1	-	-	9	7,1
50	16	6,6	11	9,8	14	7,7

Na Tabela 14 encontram-se os valores de coeficiente de partição ( $P$ ) e energia livre padrão de solubilização ( $\Delta G^\circ$ ) obtidos pelos métodos 3 (filme) e 4 (sonicação). Os resultados de solubilização obtidos pelos métodos 3 e 4 mostram que há um aumento significativo no coeficiente de partição do copolímero tribloco F87 ( $E_{62} P_{39} E_{62}$ ) para o copolímero tribloco  $E_{43} B_{14} E_{43}$ . Em estudos realizados com uma série de copolímeros do tipo  $E_m P_n E_m$  foi observado um aumento no coeficiente de partição em função da concentração e temperatura, mostrando que o copolímero torna-se mais hidrofóbico com o aumento da temperatura e de sua concentração no estudo de solubilização (Kadam, Yerramilli e Bahadur, 2009). Ao comparar copolímeros diferentes pode se

observar que quanto maior o coeficiente de partição mais hidrofóbico será o copolímero. No caso, o copolímero  $E_{43}B_{14}E_{43}$  é mais hidrofóbico do que o copolímero  $E_{62}P_{39}E_{62}$ . Nas misturas observa-se um aumento do coeficiente de partição com o aumento da proporção do copolímero mais hidrofóbico condizente com o discutido anteriormente, o qual se torna maior que o copolímero  $E_{43}B_{14}E_{43}$  a partir de 70% na mistura para o método 3 e 60% para o método 4.

Tabela 14. Valores de coeficiente de partição ( $P$ ) e energia livre padrão de solubilização ( $\Delta G^\circ$ ) obtidos pelos métodos 3 (*Filme*) e 4 (*Sonicação*) para os copolímeros triblocos F87 ( $E_{62}P_{39}E_{62}$ ),  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas.

Sistema	Filme (3)		Sonicação (4)	
	$P$	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)	$P$	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)
F87	0,36	+ 2,6	1,06	-0,1
50/50	0,96	+0,1	1,36	-0,8
60/40	1,12	-0,3	1,72	-1,3
70/30	1,26	-0,6	1,97	-1,7
80/20	1,37	-0,8	1,97	-1,7
90/10	1,37	-0,8	2,03	-1,8
$E_{43}B_{14}E_{43}$	1,15	-0,4	1,53	-1,0

A solubilização espontânea do fármaco griseofulvina nas soluções aquosas dos copolímeros e misturas é manifestada por valores negativos de energia livre padrão ( $\Delta G^\circ$ ), o qual sugere apreciável aumento do número de agregação de micela (Kadam, Yerramilli e Bahadur, 2009).

A Figura 28 apresenta o gráfico do valor da energia livre padrão de micelização em função da porcentagem de copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$  na mistura obtida pelos métodos 3 (filme) e 4 (sonicação).

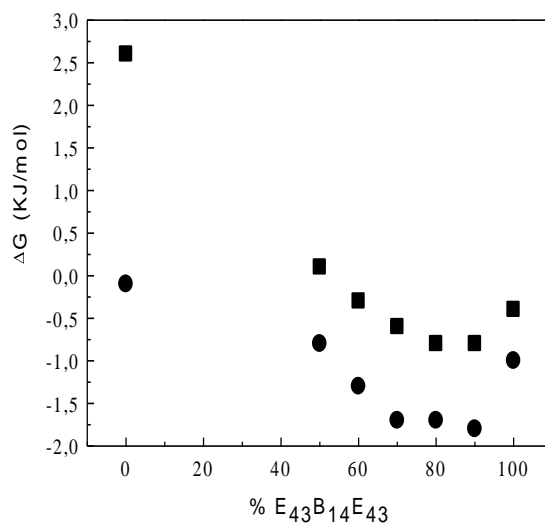


Figura 28. Variação da energia livre padrão de solubilização em função da porcentagem de copolímero tribloco E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> na mistura obtida pelos métodos: (■) 3 (filme) e (●) 4 (sonicação).

Os sistemas apresentam o perfil de espontaneidade pelo método 3, com exceção para o copolímero tribloco F87 (E<sub>62</sub>P<sub>39</sub>E<sub>62</sub>) e a mistura 50/50 que são pouco hidrofóbicos. O método 4 (sonicação) favoreceu a espontaneidade da solubilização. A espontaneidade de solubilização é obtida quando a solubilidade na solução micelar é igual ou maior ao dobro da solubilidade em água ( $P \geq 1$ ). As misturas favoreceram uma maior solubilidade, o que indica a existência de maior agregado micelar em relação aos copolímeros separados.

#### 4.3.1.2 Série de diblocos E<sub>m</sub>B<sub>n</sub>

A Tabela 15 mostra os resultados dos experimentos de solubilização da griseofulvina em soluções aquosas dos diblocos E<sub>m</sub>B<sub>n</sub> a 1% m/m obtidos pelos métodos de dissolução (1), fundido (2) e filme (3).

Os diblocos usados no estudo de solubilização eram turvos à temperatura ambiente. Chaibundit e col. (2005) e Zhou e col. (2008) relataram o mesmo fenômeno para o dibloco E<sub>17</sub>B<sub>12</sub>. Os autores justificaram que esse fenômeno é atribuído à presença de longas micelas em uma forma semelhante a uma minhoca (“worm”). Assim, como para o estudo de solubilização do dibloco E<sub>17</sub>B<sub>12</sub>, o efeito da turbidez não foi considerado na resposta da análise por UV, pois as soluções dos diblocos se mostraram límpidas dadas à diluição para leitura no comprimento de onda.

Tabela 15. Valores de capacidade de solubilização,  $S_{cp}$ , (mg/g copolímero) e capacidade de solubilização por bloco hidrofóbico ( $S_h$ ) dos copolímeros diblocos a 25 °C submetidos aos métodos de dissolução (1), fundido (2) e filme (3).

Copolímero	Dissolução (1)		Fundido (2)		Filme (3)	
	$S_{cp}$	$S_h$	$S_{cp}$	$S_h$	$S_{cp}$	$S_h$
E <sub>110</sub> B <sub>30</sub>	3,9	13	8,7	28	5,0	16
E <sub>209</sub> B <sub>45</sub>	2,9	11	7,1	27	4,5	17
E <sub>100</sub> B <sub>51</sub>	4,9	10	9,4	21	7,8	17
E <sub>114</sub> B <sub>56</sub>	4,7	11	9,2	21	6,4	14
E <sub>155</sub> B <sub>76</sub>	5,1	11	-	-	-	-

Os sistemas de copolímeros em bloco consistem em micelas poliméricas nano-reservatórias. Nesses sistemas, há formação de interações hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio entre a micela e o fármaco, o que representa a base para a solubilização e estabilização de fármacos em micelas poliméricas (Aliabadi e Lavasanifar, 2006).

A eficiência de solubilização foi a seguinte: método 2 (fundido) > método 3 (filme) > método 1 (dissolução).

O método 1 é preparado por adição direta e incubação do fármaco com copolímero em bloco no meio aquoso por um tempo pré-estabelecido para promover o equilíbrio. Este método não é muito eficiente em termos de níveis de fármaco carregado e não é viável para a maioria das estruturas copolímero/fármaco.

O método 3 (filme), que se dá pela evaporação do solvente, promove maior encapsulamento quando comparado ao método 1 (dissolução), pois há o favorecimento da difusão do fármaco no núcleo micelar (Elsabahy e col., 2007).

O método 2 (fundido) favoreceu o maior encapsulamento do fármaco, uma vez que favoreceu a uma rápida e irreversível transferência deste para o núcleo micelar quando o fármaco encapsulado por fusão do copolímero é transferido para fase aquosa a 65 °C (Crothers e col., 2005).

Analisando a Tabela 15, observa-se que a variação da composição do copolímero acarreta variação na capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ), o que desaparece se a capacidade de solubilização por grama de bloco hidrofóbico,  $S_h$ , for considerado. A Figura 29 mostra a relação entre a quantidade de  $S_h$  e o comprimento do bloco B. A evidência é que a solubilização da griseofulvina em núcleos de micelas de copolímeros E<sub>m</sub>B<sub>n</sub>, como

medido por  $S_h$ , é essencialmente independente do comprimento do bloco B na faixa de concentração estudada. Como o comprimento do bloco B é o maior determinante do tamanho do núcleo para micelas compactas, pode ser concluído que o tamanho do núcleo da micela não é uma consideração muito importante, contanto que n exceda 15 unidades de B. Tal fato deve-se a redução do contato com a água e então há redução do efeito hidrofóbico como consequência do colapso hidrofóbico que ocorre com  $n > 15$  (Booth, Attwood e Price, 2006; Kelarakis e col., 1998).

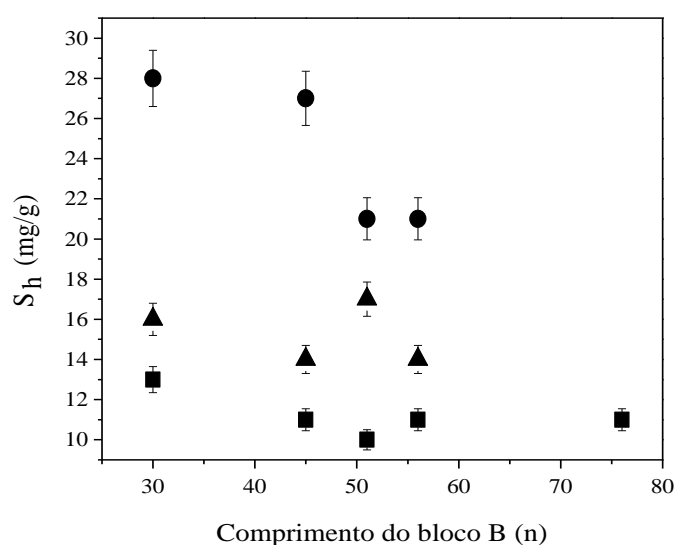


Figura 29. O Efeito do comprimento do bloco B na solubilização da griseofulvina em soluções micelares de copolímeros  $E_mB_n$  a 25 °C: (■) dissolução, (●) fundido e (▲) filme.

Sabe-se que, na prática farmacológica,  $S_{cp}$  é uma medida importante, e o valor de  $S_{cp}$  será alto se a fração de B no copolímero for alta. Os copolímeros estudados apresentaram valores de  $w_B$  na faixa de 0,26-0,45.

Copolímeros  $E_mB_n$  com blocos E curtos (por exemplo  $E_{17}B_{12}$ ,  $w_B \sim 0,54$ ) podem formar micelas em solução na forma de minhoca (“worm”), um efeito que aumenta a solubilização (Booth, Attwood e Price, 2006). Copolímeros com blocos B curtos podem ter significativo aumento no valor da CMC e podem ser micelizados incompletamente em solução a 1% a 25 °C. Um exemplo desse comportamento foi relatado para o copolímero  $E_{41}B_8$ , com valores de  $w_B \sim 0,24$  e CMC  $\sim 0,1\%$ , cujo efeito diminui a extensão da solubilização (Yu e col., 1997).

Uma vez que copolímeros com blocos curtos são mais facilmente preparados, o estudo sugere um dibloco  $E_{30}B_{15}$  ( $w_B = 0,45$ ) como uma composição satisfatória para um copolímero para solubilização de drogas aromáticas em micelas compactas e em soluções diluídas. Luo e col. (1993) relataram que o pequeno tamanho de moléculas não associadas de  $E_mB_n$  facilitam sua eventual saída do corpo, enquanto que a formação de géis de suas soluções micelares concentradas tornam-se potenciais no uso de mecanismos de liberação controlada. As considerações gerais levantadas podem ser estendidas a outros copolímeros baseados em poli(oxietileno)s, incluindo aqueles com bloco hidrofóbico de poliéster.

A Tabela 16 mostra em quantas vezes a solubilidade em água da griseofulvina aumentou nas soluções aquosas a 1% dos copolímeros em função do método de solubilização aplicado (método 1 – dissolução, 2 – fundido e 3 – filme). Esses valores de  $S/S_0$  expressam os resultados de solubilização para aplicação direta das formulações aquosas dos copolímeros a 1% (m/v).

A solubilidade da griseofulvina aumenta de 1,8 a 3,6 vezes em soluções micelares dos copolímeros a 1%. Sendo o maior aumento promovido pela amostras obtidas pelo método 2 (fundido), conforme discutido.

Tabela 16. Aumento ( $S/S_0$ ) das solubilidades da griseofulvina nas soluções a 1% da série de diblocos submetidos aos métodos de dissolução (1), fundido (2) e filme (3).

Copolímeros	Dissolução (1)		Fundido (2)		Filme (3)	
	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$
$E_{110}B_{30}$	$7,5 \pm 0,57$	2,1	$12,3 \pm 0,26$	3,4	$8,6 \pm 0,33$	2,4
$E_{209}B_{45}$	$6,5 \pm 0,25$	1,8	$10,7 \pm 0,65$	3,0	$8,1 \pm 0,48$	2,3
$E_{100}B_{51}$	$8,5 \pm 0,18$	2,4	$13,0 \pm 0,87$	3,6	$11,4 \pm 0,59$	3,2
$E_{114}B_{56}$	$8,3 \pm 0,54$	2,3	$12,8 \pm 0,77$	3,6	$10,0 \pm 0,13$	2,8
$E_{155}B_{76}$	$8,7 \pm 0,41$	2,4	-	-	-	-

Na Tabela 17 encontram-se os valores de coeficiente de partição ( $P$ ) e energia livre padrão de solubilização ( $\Delta G^\circ$ ) obtidos pelos métodos de dissolução (1), fundido (2) e filme (3).



Tabela 17. Valores de coeficiente de partição ( $P$ ) e energia livre padrão de solubilização ( $\Delta G^\circ$ ) obtidos pelos métodos de dissolução (1), fundido (2) e filme (3) para os copolímeros diblocos da série  $E_mB_n$ .

Copolímero	Dissolução		Fundido		Filme	
	$P$	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)	$P$	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)	$P$	$\Delta G^\circ$ (KJ/mol)
$E_{110}B_{30}$	1,08	-0,2	2,42	-2,2	1,37	-0,8
$E_{209}B_{45}$	0,80	+0,6	1,97	-1,7	1,23	-0,5
$E_{100}B_{51}$	1,36	-0,8	2,61	-2,4	2,14	-1,9
$E_{114}B_{56}$	1,30	-0,7	2,56	-2,3	1,75	-1,4
$E_{155}B_{76}$	1,42	-0,9	-	-	-	-

A Figura 30 mostra a variação da energia livre padrão de solubilização ( $\Delta G^\circ$ ) e o comprimento do bloco B para os três métodos de solubilização empregados (dissolução, fundido e filme).

Através dos valores de entalpia padrão de solubilização é possível verificar a pouca influência do comprimento do bloco B no aumento da espontaneidade da solubilização, fato verificado pela análise dos valores de capacidade de solubilização por bloco hidrofóbico. Os resultados estão em concordância com o fato de acima de 15 unidades de bloco B não haver fortes variações na solubilidade do fármaco, dado a redução do contato com a água e então redução do efeito hidrofóbico como consequência do colapso hidrofóbico que ocorre.

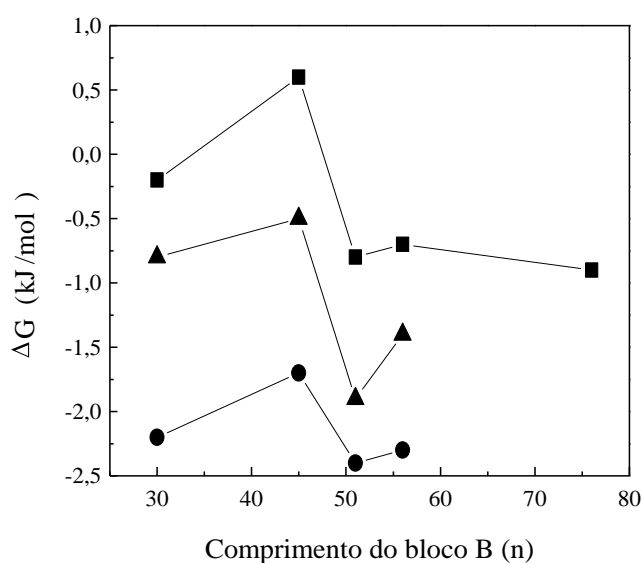


Figura 30. Variação da energia livre padrão de solubilização em função do comprimento do bloco B obtido pelos métodos: (■) 1 (dissolução), (●) 2 (fundido) e (▲) 3 (filme).

#### 4.3.1.3. Dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub>

A Tabela 18 mostra as características moleculares dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub>, tais como massa molar numérica média ( $M_n$ ), fração em massa do bloco hidrofóbico ( $W_h$ ) obtido por espectroscopia de RMN <sup>13</sup>C e a razão  $M_w/M_n$  obtida por cromatografia de permeação em gel.

Tabela 18. Características moleculares dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub>.

Copolímero	$M_n$ (g/mol)	$W_h$	$M_w/M_n$	Referência
E <sub>65</sub> G <sub>5</sub>	3100	0,210	1,03	Taboada e col., 2006
E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub>	6700	0,180	1,05	Taboada e col., 2005

A Tabela 19 mostra os resultados de solubilização dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub>E<sub>65</sub> a 25 °C e 37 °C obtidos pela espectroscopia de UV/Vis.

Podemos observar que a solubilização dos fármacos é significativa, principalmente para a quercetina que é bastante insolúvel em água ( $S_0 = 0,05$  e  $0,10$  mg/dL a 25 e 37 °C, respectivamente), ocorrendo aumento de solubilidade de 85 a 260 vezes. Já a mangiferina tem uma solubilidade em água mais elevada ( $S_0 = 9,92$  e  $15,6$  mg/dL a 25 e 37 °C, respectivamente), o que favoreceu pouco a sua solubilidade (aumentos de 2,6 a 3,1). Resultados similares foram encontrados por Zhou e col., 2008 no estudo da solubilização da carbamazepina, griseofulvina e espironolactona. Como a carbamazepina é moderadamente solúvel em solução tampão e, como consequência de sua afinidade para a fase aquosa, o reforço de solubilidade através do uso de uma solução micelar é baixa,  $S/S_0 < 2$  para as soluções a 25 °C, logo sua penetração no núcleo hidrofóbico é baixa. Já os fármacos griseofulvina e espironolactona são pouco solúveis em água e forneceram maiores valores de  $S/S_0$ , na faixa de 3-7 vezes para soluções a 25 °C. Então, o que se observa que o a solubilidade do fármaco em água interfere ou afeta o perfil de solubilidade do copolímero, confirmando, portanto sua eficiência para fármacos mais hidrofóbicos.

Observa-se uma solubilidade ligeiramente superior promovida pelo copolímero dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub>, diferente do encontrado por Taboada e col., 2005 e 2006 no estudo da griseofulvina, no qual o dibloco (E<sub>67</sub>G<sub>5</sub>, 12,4 mg/g a 25 °C) solubilizou muito mais que o tribloco (E<sub>62</sub>G<sub>8</sub>E<sub>62</sub>, 8,0 mg/g a 25 °C). A menor capacidade de solubilização do

tribloco é uma consequência da sua arquitetura, pois o diâmetro máximo possível de micelas esféricas formadas a partir de um copolímero dibloco linear será aproximadamente o dobro de uma micela formada a partir do copolímero tribloco correspondente devido ao enlaçamento do bloco central no núcleo micelar.

Tabela 19. Parâmetros de solubilização dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub>E<sub>65</sub> a 25 °C e 37 °C obtidos pela espectroscopia de UV/Vis. S<sub>0</sub> = 0,05 e 0,10 mg/dL para quercetina e S<sub>0</sub> = 9,92 e 15,6 mg/dL para a mangiferina a 25 e 37 °C, respectivamente.

Sistemas	T (°C)	E <sub>65</sub> G <sub>5</sub>				E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub>			
		S (mg/dL)	S/S <sub>0</sub>	S <sub>cp</sub> (mg/dL)	S <sub>h</sub> (mg/g)	S (mg/dL)	S/S <sub>0</sub>	S <sub>cp</sub> (mg/dL)	S <sub>h</sub> (mg/g)
Quercetina	25	13,28 ± 1,41	261	13,23	63	12,66 ± 1,85	249	12,61	70
	37	8,84 ± 0,29	85	8,73	41,6	9,94 ± 1,56	95	9,84	54,7
Mangiferina	25	30,63 ± 3,43	3,1	20,71	98,6	28,39 ± 3,43	2,9	18,47	102,6
	37	44,92 ± 3,47	2,9	29,33	139,7	40,14 ± 7,19	2,6	24,55	136,4

Observa-se um comportamento diferenciado entre os fármacos com o aumento da temperatura. A quercetina sofre diminuição da solubilidade em ambos os copolímeros, enquanto a mangiferina aumenta sua solubilidade em água com o aumento da temperatura.

Taboada e col. 2005 estudaram a solubilização da grisofulvina em copolímeros com bloco hidrofóbico G. Um estudo comparativo foi realizado com copolímeros de bloco hidrofóbico S e observaram que, em média, a capacidade de solubilização de um núcleo esférico G é mais que o dobro de um núcleo esférico S, atribuindo esse comportamento, em parte, a hidrofobicidade ligeiramente maior de unidades G, mas, principalmente, à alta mobilidade dos blocos G em um núcleo micelar comparados aos blocos de S. Mobilidade dos blocos no núcleo micelar facilita o processo de solubilização em temperatura ambiente, o que justifica os altos valores de solubilidade encontrados para os sistemas deste trabalho.

#### **4.3.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

##### **4.3.2.1 Dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub>**

A curva de calibração dos fármacos quercetina e mangiferina obtidas por HPLC nos comprimentos de onda 317 e 370 nm, respectivamente encontram-se na Figura 31. As Equações 18 e 19 foram obtidas a partir da curva de calibração para quercetina e mangiferina nos comprimentos de onda de 375 e 257 nm, respectivamente.

$$A = 78,52 \cdot 10^4 \cdot [S] \quad (18)$$

$$A = 38,21 \cdot 10^4 \cdot [S] \quad (19)$$

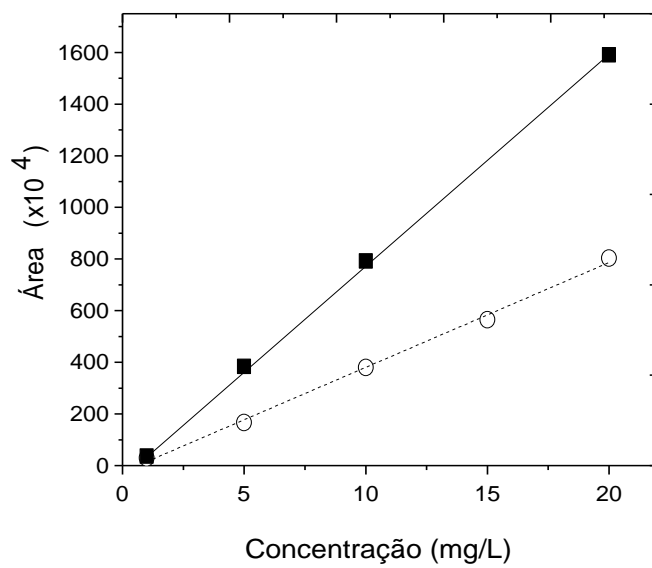


Figura 31. Curva de calibração obtida por HPLC dos fármacos quercetina (■) e mangiferina (○).

A Figura 32 exibe os cromatogramas dos fármacos quercetina e mangiferina em água e nas soluções aquosas dos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$ . A quercetina apresenta tempo de retenção de 16,5 min e a mangiferina de 2,8 min.

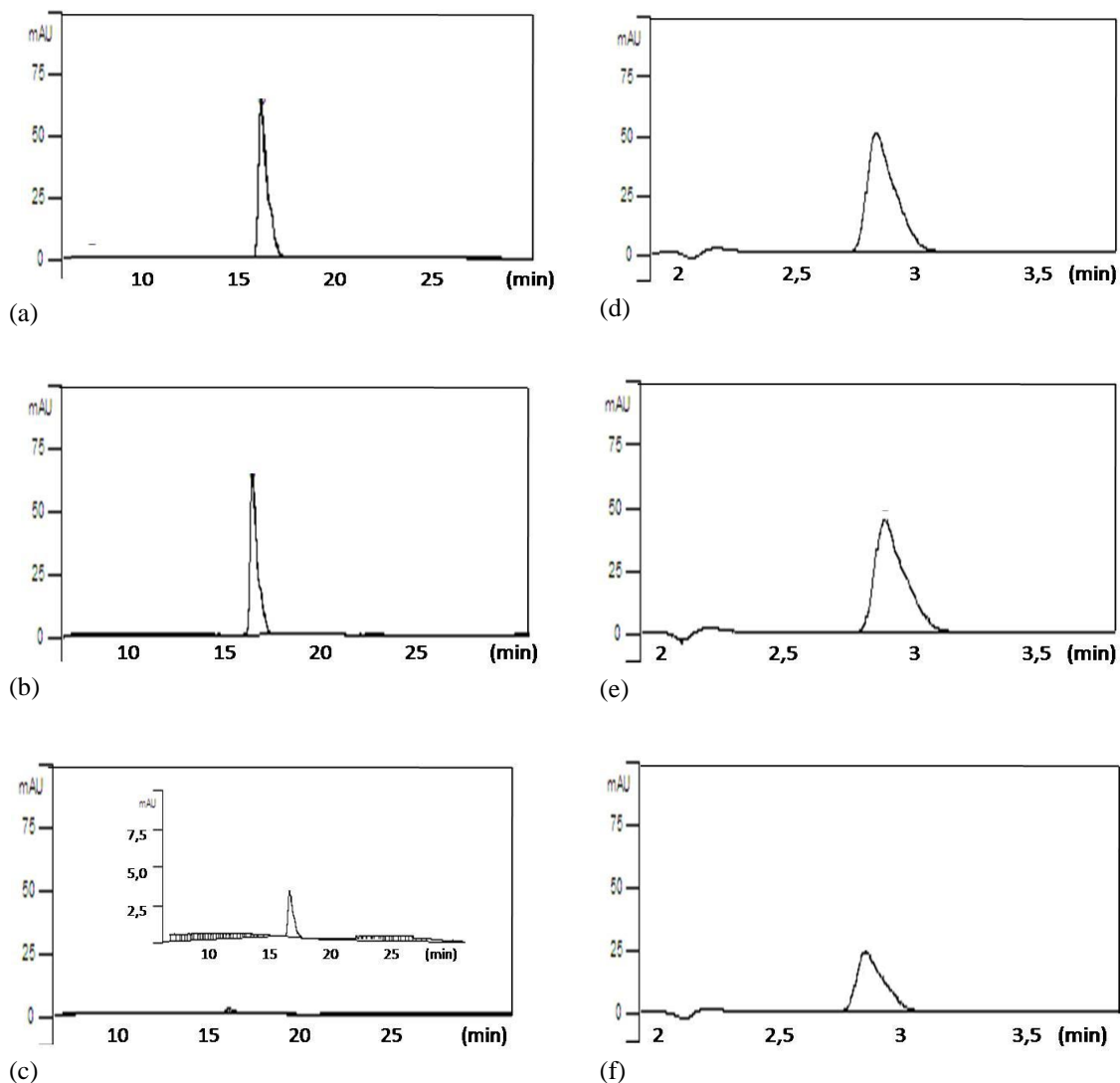


Figura 32. Cromatogramas das soluções de fármacos a 25 °C: (a) solução aquosa  $QE_{65}G_5$ , (b) solução aquosa  $QE_{65}G_7E_{65}$ , (c) solução aquosa de quercetina, (d) solução aquosa  $ME_{65}G_5$ , (e) solução aquosa  $ME_{65}G_7E_{65}$ , (f) solução aquosa de mangiferina.

A Tabela 20 mostra os resultados de solubilização dos fármacos quercetina e mangiferina nos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  obtidos por HPLC.

Os resultados obtidos por HPLC mantêm o mesmo perfil descrito para os resultados obtidos pelo método de espectroscopia de UV/Vis. Podemos observar que os resultados obtidos por espectroscopia de UV/Vis apresentam valores bem próximos ao

obtidos por HPLC (técnica mais eficiente), sendo, portanto, uma técnica de quantificação viável para o estudo de solubilização.



Tabela 20. Parâmetros de solubilização dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub>E<sub>65</sub> a 25 °C e 37 °C obtidos pela HPLC. S<sub>0</sub> = 0,05 e 0,07 mg/dL para quercetina e S<sub>0</sub> = 10,69 e 14,76 mg/dL para a mangiferina a 25 e 37 °C, respectivamente.

Sistemas	T (°C)	E <sub>65</sub> G <sub>5</sub>				E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub>			
		S (mg/dL)	S/S <sub>0</sub>	S <sub>cp</sub> (mg/dL)	S <sub>h</sub> (mg/g)	S (mg/dL)	S/S <sub>0</sub>	S <sub>cp</sub> (mg/dL)	S <sub>h</sub> (mg/g)
Quercetina	25	13,20 ± 0,29	253	13,15	62,3	13,22 ± 0,56	253	13,17	73,2
	37	8,27 ± 0,51	124	8,21	39,1	9,47 ± 0,96	142	9,40	52,2
Mangiferina	25	30,64 ± 3,46	2,9	19,95	95	29,44 ± 3,20	2,8	18,75	104,2
	37	38,23 ± 1,03	2,6	23,47	111,8	40,49 ± 1,04	2,7	25,73	142,9

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO

A caracterização dos copolímeros, misturas de copolímeros e encapsulados foi realizada por espectroscopia de infravermelho (FT-IR), espectroscopia RAMAN (FT-RAMAN), Raio-X, tamanho de partícula e microscopia eletrônica de varredura (MEV) visando obter informações a respeito dos copolímeros e seus encapsulados.

### 4.4.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FT-IR)

#### 4.4.1.1 Triblocos F87, E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> suas misturas e seus encapsulados

Os espectros de infravermelho dos copolímeros puros e das misturas com griseofulvina encapsulada foram obtidos apenas para confirmar os principais grupos funcionais dos copolímeros e para verificar se houve interação química entre eles. Todas as amostras dos polímeros apresentaram espectros, praticamente, com as mesmas bandas de absorção, e nenhuma nova banda apareceu nos espectros das misturas. Por isso, apenas o espectro da griseofulvina, do copolímero tribloco E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> e da griseofulvina encapsulada no copolímero tribloco E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> foram apresentados na Figura 33.

A Tabela 21 mostra as principais bandas do fármaco griseofulvina.

Tabela 21. Atribuições das frequências das principais bandas do fármaco griseofulvina.

Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
1708,0	>C=O
1660,0	>C=O
1618,0	δ (C-C) anel aromático
1587,0	δ (C-C) anel aromático
1470,0	δ (CH <sub>2</sub> )
1428,0	δ <sub>as</sub> (CH <sub>3</sub> )
1355,0	δ <sub>s</sub> (CH <sub>3</sub> )
1219,0	δ <sub>as</sub> (O-C≡C)
1059,0	δ <sub>s</sub> (O-C≡C)

A diferença observada no espectro é relativo a banda em 2967,0 cm<sup>-1</sup>, que é associada à frequência assimétrica do grupamento metila (CH<sub>3</sub>), bastante discreta no

copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , mas melhor visualizada no copolímero tribloco F87, mistura  $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$  50/50 e seus encapsulados.

A Tabela 22 mostra as principais bandas com suas atribuições dos copolímeros e seus encapsulados.

Tabela 22. Atribuições das frequências das principais bandas dos copolímeros F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , suas misturas e encapsulados.

Nº de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições
2967,0	$\nu_{\text{as}}$ ( $\text{CH}_3$ )
2914,0	$\nu_{\text{as}}$ ( $\text{CH}_2$ )
2883,0	$\nu_{\text{s}}$ ( $\text{CH}_3$ )
1644,0	$\delta(\text{O}-\text{C})$
1467,0	$\delta_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
1355,0	$\delta$ ( $\text{CH}_2$ ), $\nu$ (C-C)
1300,7	$\delta$ ( $\text{CH}_2$ )
1254,0	$\delta$ ( $\text{CH}_2$ ), $\nu$ (C-O)
1104,0	$\nu$ (C-O-C)
951,0	$\delta$ ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), $\nu$ (C-O-C)
841,5	$\delta$ ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), $\nu$ (C-O)

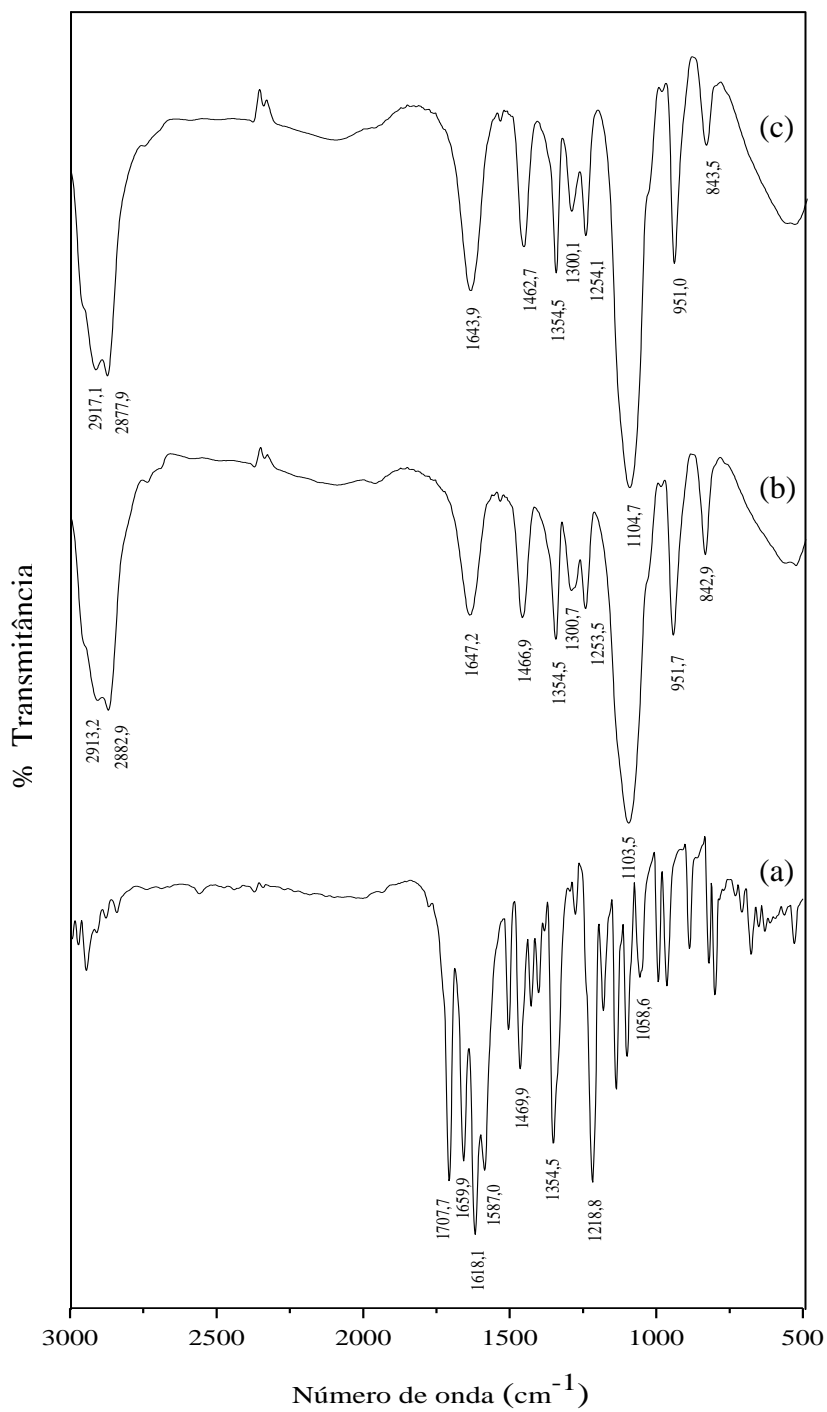


Figura 33. Espectro de Infravermelho em pastilha de KBr: (a) griseofulvina, (b)  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e (c)  $GE_{43}B_{14}E_{43}$ .

#### 4.4.1.2 Dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> e seus encapsulados

As amostras dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e o tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> apresentaram espectros com as mesmas bandas de absorção, e nenhuma nova banda apareceu nos espectros dos copolímeros contendo os fármacos quercetina e mangiferina. Por esta razão, apenas o espectro da quercetina, do copolímero dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e o encapsulado de quercetina no copolímero dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> (QE<sub>65</sub>G<sub>5</sub>) foram apresentados na Figura 34.

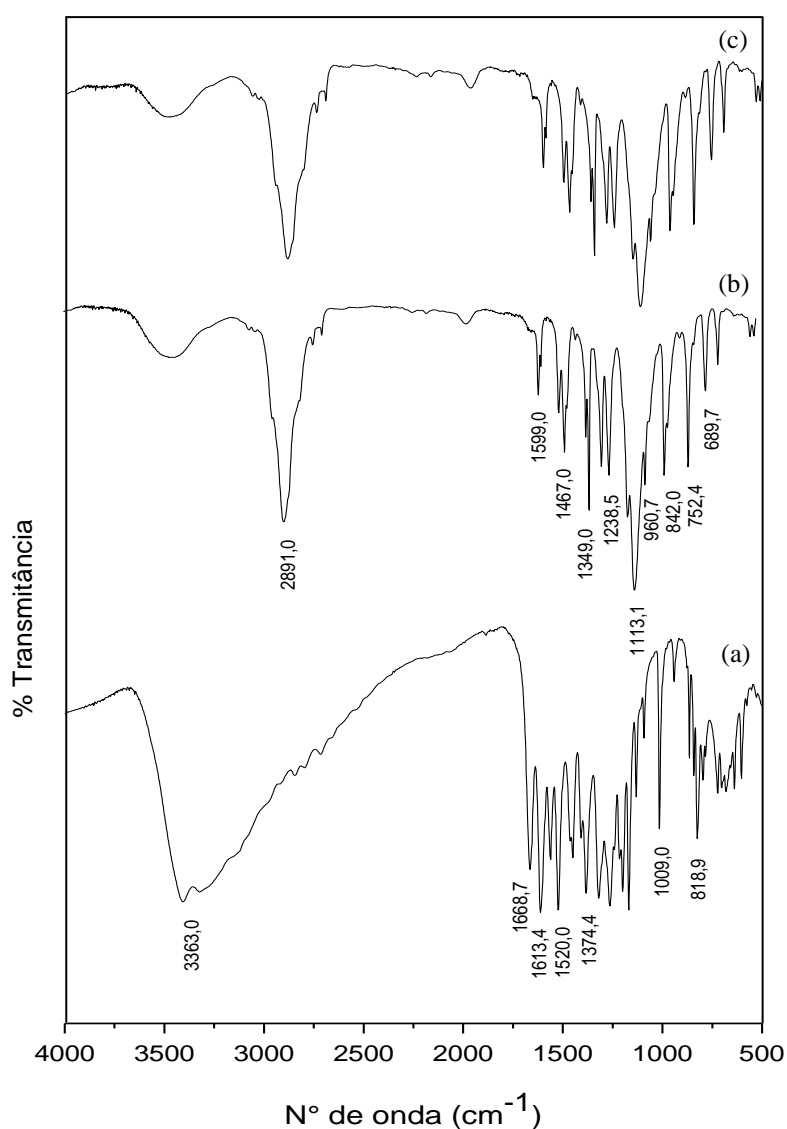


Figura 34. Espectros de FT-IR: (a) quercetina, (b) E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e (c) QE<sub>65</sub>G<sub>5</sub>.

A Tabela 23 mostra as principais bandas dos fármacos quercetina e mangiferina.

Tabela 23. Atribuições das frequências das principais bandas dos fármacos quercetina e mangiferina.

Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições quercetina	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições mangiferina
3363,0	ligação OH	3285,4	ligação OH
1668,7	C=O conjugada	2931,4	v(CH <sub>2</sub> )
1613,4	δ (C-C) aromático	2882,9	v(CH <sub>2</sub> )
1520,0	C=C aromático	1647,7	C=O
1374,4	-C-O-C-	1487,9	álcool primário
1316,2	-C-O-C-	1092,2	álcool primário
1009,0	-C-O-C-	842,7	β-D-glicopiranosídeo
818,9	substituintes aromáticos	821,8	Estrutura da xantona

A Tabela 24 mostra as principais bandas com suas atribuições dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub>, o tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> e seus encapsulados de querectina e mangiferina.

Tabela 24. Atribuições das frequências das principais bandas dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub>, tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> e seus encapsulados.

Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
2891,0	v <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> )
1599,0	δ (C-C) aromático
1467,0	δ <sub>s</sub> (CH <sub>2</sub> ) e v (C-C) aromático.
1349,0	δ (CH <sub>2</sub> ), v (C-C)
1279,6	δ (CH <sub>2</sub> )
1238,5	δ (CH <sub>2</sub> ), v (C-O)
1113,1	v (C-O-C)
960,7	δ (CH <sub>2</sub> -O), v (C-O-C)
842,0	δ (CH <sub>2</sub> -O), v (C-O)
752,4	δ (C-H) arom monossustituído
689,7	δ (C-H) arom monossustituído

#### 4.4.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN (FT-RAMAN)

##### 4.4.2.1 Triblocos F87, E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>, suas misturas e seus encapsulados

A espectroscopia FT-Raman foi utilizada neste trabalho para verificar a ocorrência de interação da griseofulvina com os copolímeros, uma vez que a espectroscopia de infravermelho não foi sensível. A Figura 35 mostra os espectros (na mesma escala) da griseofulvina, do copolímero e do encapsulado obtido pelo método 3.

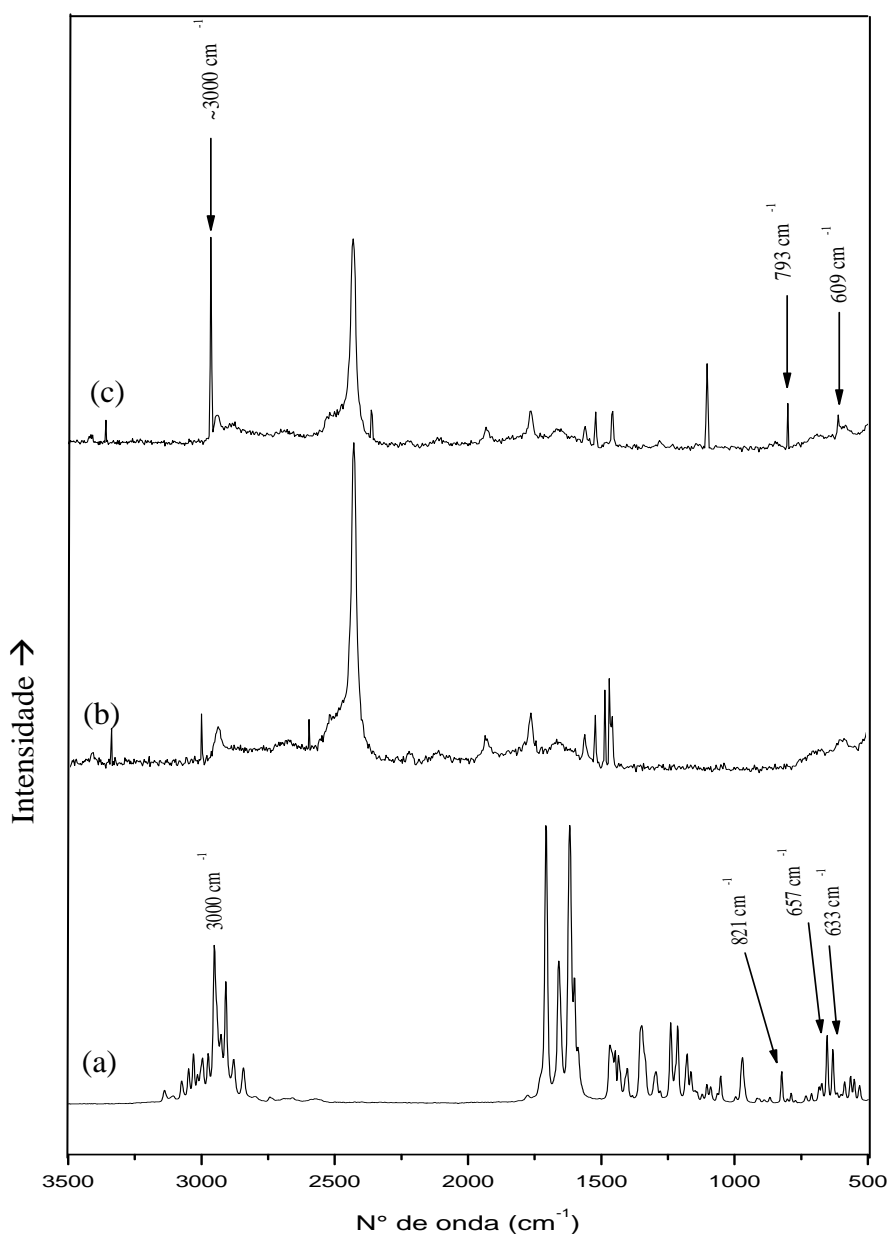


Figura 35. Espectro FT-Raman: (a) griseofulvina, (b) E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> e (c) G E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> (método 3).

Na região de 800-1600 cm<sup>-1</sup> contém informações das ligações do copolímero, enquanto na região de 2700-3000 cm<sup>-1</sup> reflete a presença dos grupos laterais e cadeias terminais (Nace, 1996).

A griseofulvina apresenta em 3000 cm<sup>-1</sup> alongamento C-H. Tal região apresenta-se intensificada no espectro do encapsulado. As duas bandas presentes na região de 633-657 cm<sup>-1</sup> são referentes à cristalinidade do fármaco, que no espectro do encapsulado apresenta-se como uma banda discreta em 609 cm<sup>-1</sup>, o qual pode ser atribuído a presença e consequente interação do fármaco com o copolímero. A banda em 821 cm<sup>-1</sup>



também é relativa ao fármaco em sua forma cristalina, que se desloca  $793\text{ cm}^{-1}$  no encapsulado (Feng, Pinal e Carvajal, 2008).

#### 4.4.2.2 Dibloco $E_{65}G_5$ e tribloco $E_{65}G_7E_{65}$ e seus encapsulados

A espectroscopia FT-Raman mostrou informações importantes a respeito das interações dos fármacos quercetina e mangiferina e os copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_5E_{65}$ , uma vez que a espectroscopia de infravermelho não foi sensível. Os espectros dos copolímeros dibloco e tribloco são iguais, assim como os espectros de ambos contendo os fármacos, por isso apenas o espectro dos fármacos, do copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  e seus encapsulados são exibidos. A Figura 36 mostra os espectros (na mesma escala) da quercetina, do copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  e da quercetina encapsulada no copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  ( $QE_{65}G_5$ ) e a Figura 37 mostra os espectros (na mesma escala) da mangiferina, do copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  e da mangiferina encapsulada no copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  ( $ME_{65}G_5$ )

Na região de  $3000$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$  não há bandas características do fármaco quercetina, por esta razão, a região do espectro analisada limitou-se a faixa de  $1700$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  (Figura 36).

A espectroscopia Raman é muito utilizada para validar propostas de mecanismos de complexos. Cornard e Merlin 2002 estudaram por FT-Raman a formação de complexos com quercetina, propondo pontos de interação em função do aparecimento/desaparecimento de bandas. Assim, é possível, portanto supor alguma interação dos fármacos com os sistemas encapsulantes por mudanças no perfil dos espectros.

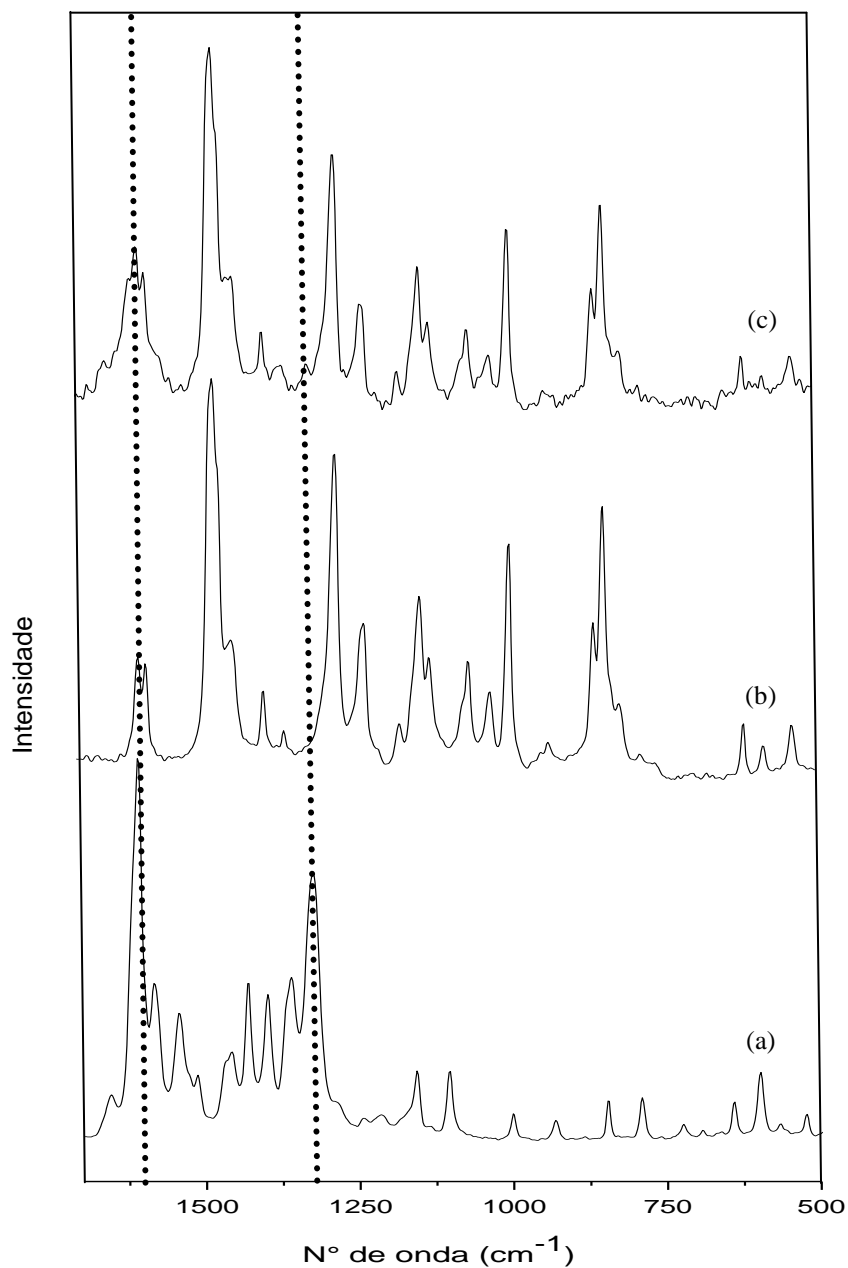


Figura 36. Espectro FT-Raman: (a) quercetina (b) E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e (c) QE<sub>65</sub>G<sub>5</sub>.

As duas bandas em 1612 e 1584 cm<sup>-1</sup> presentes na quercetina aparecem no espectro da quercetina encapsulada no copolímero dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub>, com a banda em 1600 cm<sup>-1</sup> mais pronunciada no espectro do encapsulado, indicando uma interação do fármaco e o copolímero carreador. Cornard e Merlin 2002 sugerem que a modificação no perfil destas bandas está associada a mudanças no modo de vibração nos dois anéis aromáticos A e B (Figura 15a, página 27), mostrando que a estrutura dos dois anéis é

modificada com a interação. Observa-se ainda uma nova banda no espectro do encapsulado na região de  $1324\text{ cm}^{-1}$ , confirmando que a quercetina está interagindo com os copolímeros estudados.

Os espectros da mangiferina encapsulada nos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  não apresentaram indícios de interações, pois não foi visualizado mudanças nos espectros. Sabe-se que o fármaco encontra-se presente nos sistemas poliméricos, mas sua interação é fraca.

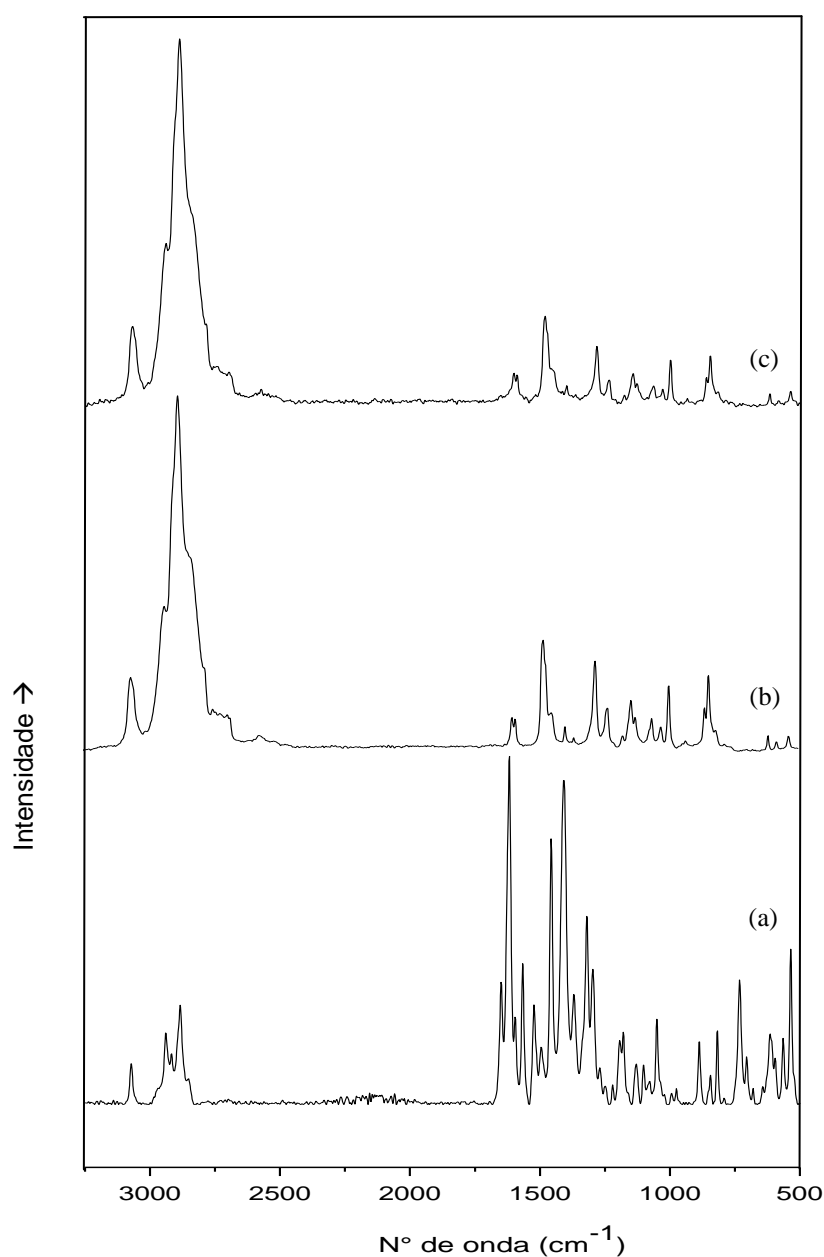


Figura 37. Espectro FT-Raman: (a) mangiferina, (b)  $E_{65}G_5$  e (c)  $ME_{65}G_5$ .

### 4.4.3 DIFRAÇÃO DE RAIO-X

#### 4.4.3.1 Triblocos F87, E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>, suas misturas e seus encapsulados

A Figura 38 mostra os difratogramas (na mesma escala) da griseofulvina, do copolímero tribloco E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> e do encapsulado de griseofilvina no copolímero tribloco E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> obtido pelo método 3. Todos os copolímeros e misturas apresentaram difratogramas similares. A difração de raios-X foi utilizada neste trabalho para verificar a eficiência da encapsulação da griseofulvina nos copolímeros. Vários trabalhos mostram a utilização dessa técnica para verificar a eficiência de encapsulação de fármacos em micropartículas: o desaparecimento dos picos de difração do fármaco cristalino nas micropartículas indica total eficiência de encapsulação devido à dispersão formada com a matriz polimérica (Asada e col., 2004, Cavalcante e col., 2007).

Todas as amostras são consideradas cristalinas devido à presença de picos bem definidos (Figura 38). O difratograma da griseofulvina neste trabalho (ver Figura 38a) apresenta diversos picos; dentre eles, os principais são: 12,6°, 15,4°, 16,9°, 19,2°, 27,8°, 31,2° e 33,2°, o qual encontra-se similar ao relatado na literatura (Feng, Bates e Carvajal, 2009). A amostra do copolímero tribloco E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> sem griseofulvina (Figura 38b) apresentou dois picos que se destacam: 22,3° e 27,3°. O padrão de cristalinidade dos copolímeros é semelhante, variando apenas o valor do pico de difração (Wei e col. 2009a). O método de preparo não modificou os seus padrões cristalinos.

A ausência dos picos da griseofulvina cristalina no difratograma do encapsulado (Figura 38c) indica que a griseofulvina foi encapsulada na estrutura nuclear da micela. Observa-se uma pequena diminuição na intensidade de cristalinidade no encapsulado. Relatos de encapsulados que não apresentam os picos de cristalinidade do fármaco revelam que ele encontra-se encapsulado em sua forma amorfa (Wei e col. 2009). Sugere-se que a griseofulvina foi encapsulada em sua forma amorfa. Tais micelas podem ser resuspensas em água para formar micelas poliméricas contendo o fármaco amorfo no núcleo micelar a assim permanecer encapsulado.

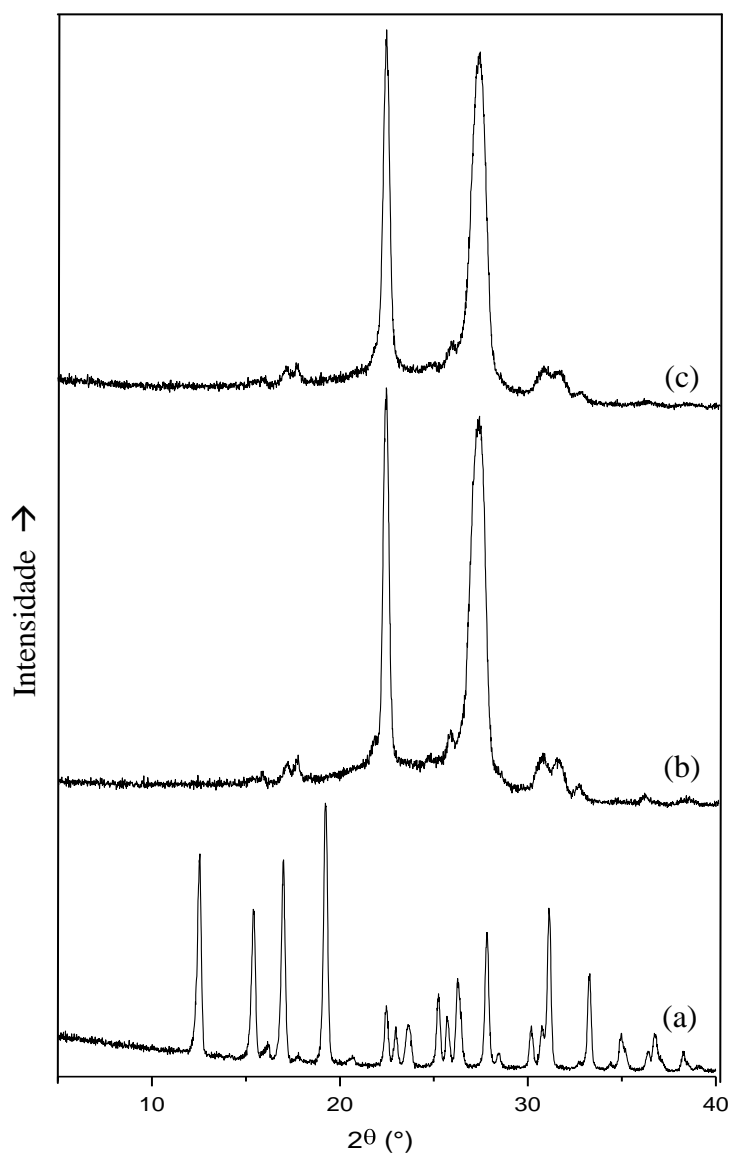


Figura 38. Difratomogramas: (a) griseofulvina, (b)  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e (c)  $GE_{43}B_{14}E_{43}$  ( método 3).

#### 4.4.3.2 Dibloco $E_{65}G_5$ e tribloco $E_{65}G_7E_{65}$ e seus encapsulados

A Figura 39 mostra os difratogramas (na mesma escala) dos fármacos quercetina e mangiferina, do copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  e dos encapsulados de quercetina no copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  ( $QE_{65}G_5$ ) e da mangiferina no copolímero tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  ( $ME_{65}G_7E_{65}$ ).

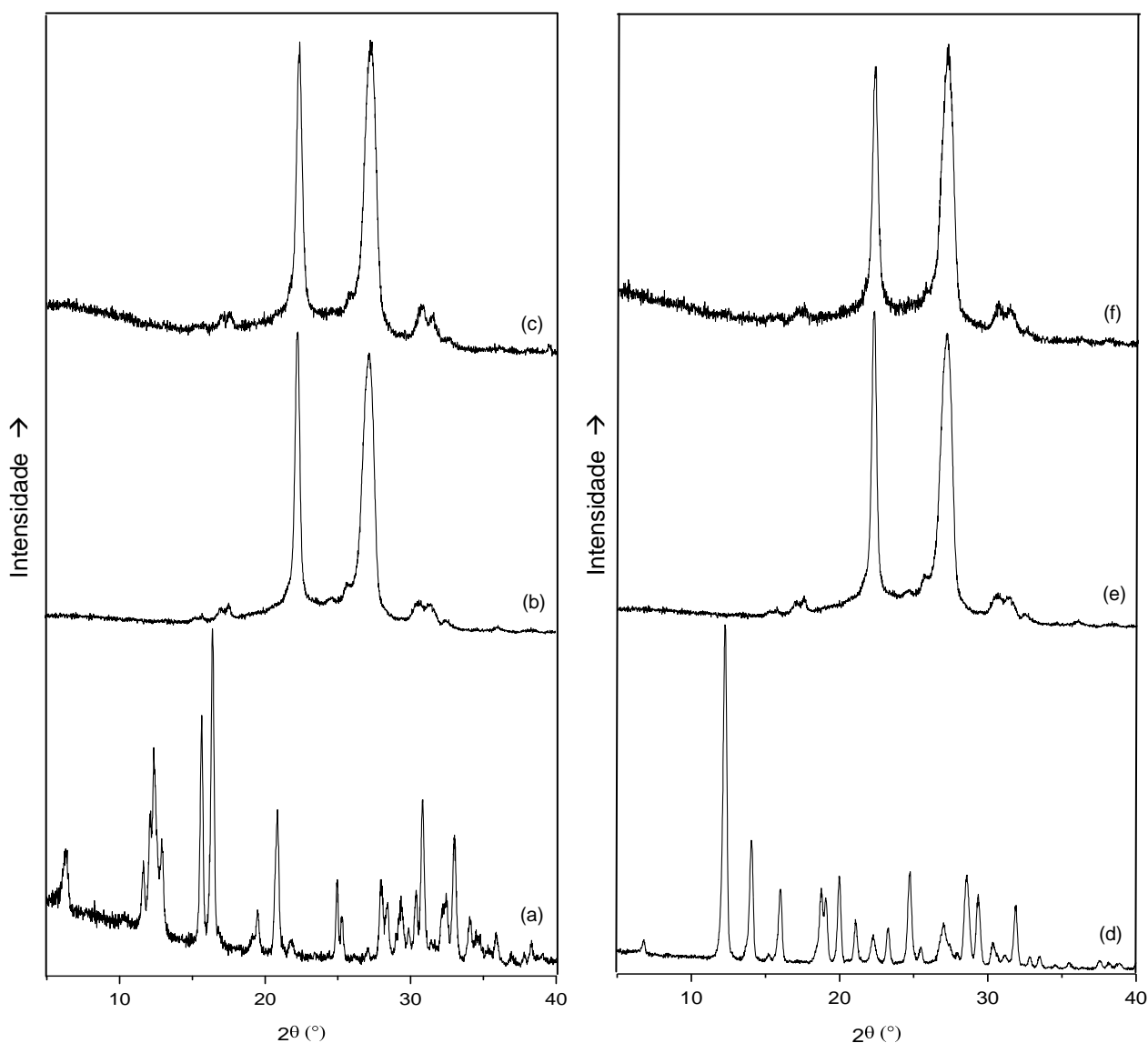


Figura 39. Difratomogramas: (a) quercetina, (b)  $E_{65}G_5$ , (c)  $QE_{65}G_5$ , (d) mangiferina, (e)  $E_{65}G_5E_{65}$  e (f)  $ME_{65}G_5E_{65}$ .

Todas as amostras são consideradas cristalinas devido à presença de picos bem definidos (Figura 39). O difratograma da quercetina utilizada neste trabalho (ver Figura 39a) apresenta diversos picos; dentre eles, os principais são:  $12,3^\circ$ ,  $15,6^\circ$ ,  $16,4^\circ$ ,  $20,8^\circ$ ,  $30,9^\circ$  e  $33,0^\circ$ . O difratograma da mangiferina (Figura 39d) apresenta como principais picos:  $12,3^\circ$ ,  $14,1^\circ$ ,  $16,0^\circ$ ,  $20,0^\circ$ ,  $24,8^\circ$ ,  $28,7^\circ$  e  $31,9^\circ$ . Os copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_5E_{65}$  apresentam os mesmos picos presentes no copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , que são  $22,3^\circ$  e  $27,3^\circ$  e de igual modo o método empregado não provocou mudanças no padrão de cristalinidade.

Os difratogramas das amostras de quercetina e mangiferina encapsuladas pelos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> apresentaram os mesmos picos dos copolímeros puros indicando que os fármacos encontram-se nos sistemas na forma amorfa conforme verificado em vários estudos de encapsulados de fármacos (ver Pralhad e Rajendrakumar, 2004; Asada e col., 2004, Cavalcante e col., 2007).

#### 4.4.4 TAMANHO DE PARTÍCULA DAS MICELAS

##### 4.4.4.1 Triblocos F87, E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>, suas misturas e seus encapsulados

Os gráficos de distribuição de tamanho por volume das nanopartículas (micelas) dos sistemas poliméricos a 1% em água estão apresentados na Figura 40. Pode-se observar que as distribuições são todas unimodais, com apenas um pico para os copolímeros F87 e E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> puros e para as misturas E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>/F87 50/50 a 90/10. Os valores de diâmetro hidrodinâmico médio de pico (D<sub>h</sub>) e raio hidrodinâmico médio (r<sub>h</sub>) são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Diâmetro hidrodinâmico médio de pico (D<sub>h</sub>) e raio hidrodinâmico médio de pico (r<sub>h</sub>) dos sistemas poliméricos a 1% m/v.

Sistemas	1% (m/v)	
	D <sub>h</sub> pico (nm)	r <sub>h</sub> pico (nm)
F87	4,22 ± 0,46	2,11 ± 0,23
50/50	6,36 ± 0,11	3,18 ± 0,06
60/40	8,28 ± 0,29	4,14 ± 0,15
70/30	8,36 ± 0,36	4,18 ± 0,18
80/20	8,30 ± 0,22	4,15 ± 0,11
90/10	8,10 ± 0,18	4,05 ± 0,09
E <sub>43</sub> B <sub>14</sub> E <sub>43</sub>	8,14 ± 0,24	4,07 ± 0,12

Todos esses sistemas estão em concentrações acima de sua CMC a 25 °C, então suas micelas apresentam um tamanho médio menor que 200 nm, que é uma grande vantagem para seu uso em aplicações farmacológicas intravenosas ou subcutâneas. A distribuição unimodal das micelas e nos sistemas sugere que os copolímeros se comicelizaram, ou seja, formaram micelas com unímeros dos dois copolímeros, como já foi observado para outras misturas de copolímeros (Ricardo e col. 2006). O diâmetro

médio das misturas a partir da proporção de 60% do copolímero mais hidrofóbico é ligeiramente maior que os copolímeros isolados. Tal resultado justifica o aumento de solubilidade da griseofulvina obtido a partir de 60% do copolímero mais hidrofóbico na mistura (método 3). A única exceção é a mistura E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>/F87 90/10 que apresenta diâmetro hidrodinâmico médio ligeiramente menor que o copolímero tribloco E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> puro.



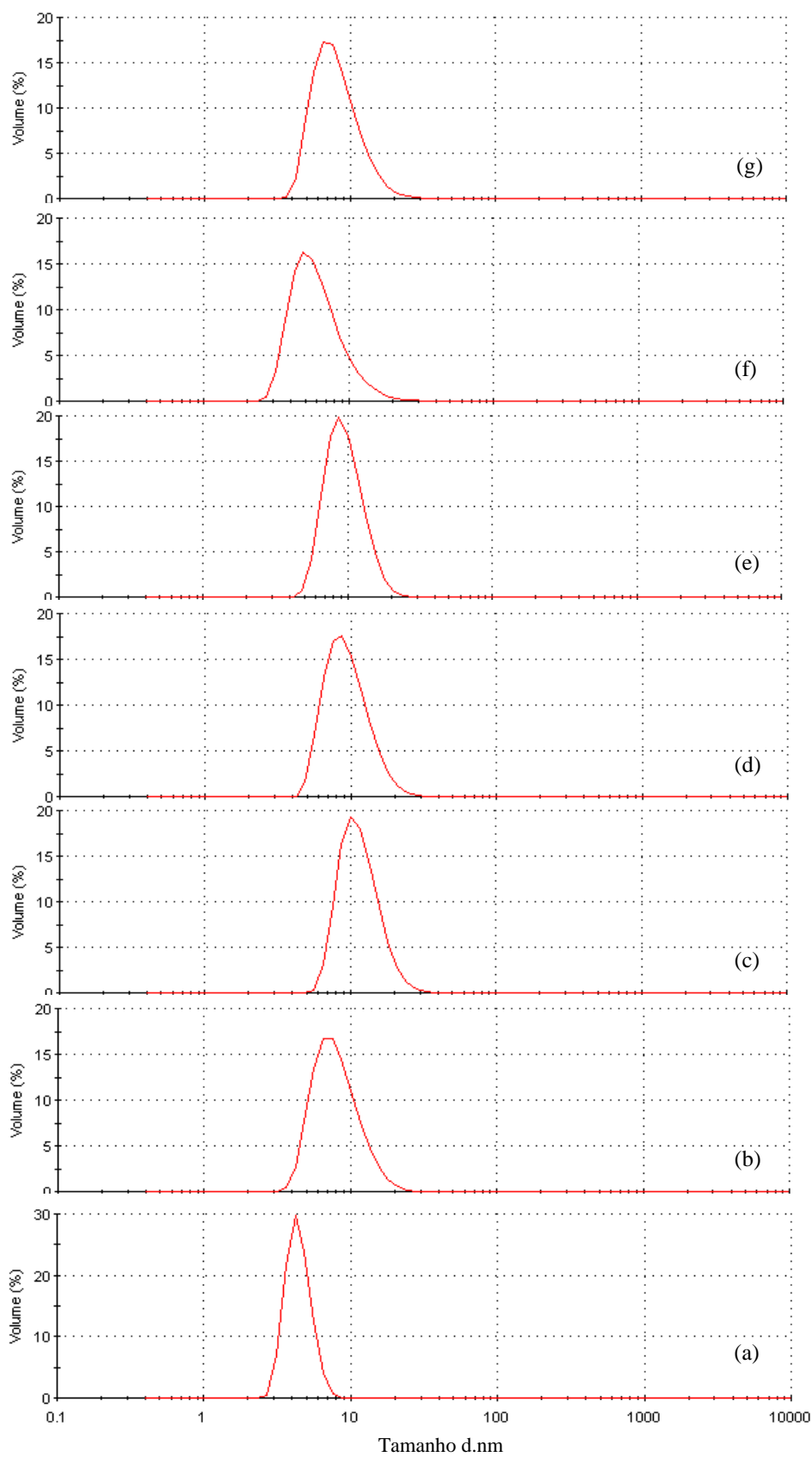


Figura 40. Curvas de distribuição de tamanho por volume para as micelas dos sistemas a 1%: (a) F87, (b) 50/50, (c) 60/40, (d) 70/30, (e) 80/20, (f) 90/10 e (g)  $E_{43}B_{14}E_{43}$ .

#### 4.4.4.2 Dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> e seus encapsulados

Os gráficos de distribuição de tamanho por volume das nanopartículas (micelas) dos sistemas poliméricos a 1% em água com e sem fármaco estão apresentados na Figura 41. Pode-se observar que as distribuições são todas unimodais, com apenas um pico. Dessa forma, os valores de diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_h$ ) e de raio hidrodinâmico médio ( $r_h$ ) estão na Tabela 26.

O raio hidrodinâmico do copolímero dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> é maior que o do copolímero tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub>, uma vez que a arquitetura do dibloco promove um arranjo com maior número de moléculas e, por conseguinte maior raio. Observa-se que a presença do fármaco não afeta o  $r_h$  da micela. Os dados de raio hidrodinâmico ( $r_h$ ) encontrados neste trabalho são um pouco menores do que os encontrados por Taboada e col. 2005 e 2006 para copolímeros similares (7,9 nm para E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e 6,4 nm para E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> a 20 e 30 °C).

Tabela 26. Diâmetro hidrodinâmico médio de pico ( $D_h$ ) e raio hidrodinâmico médio de soluções aquosas a 1% m/v dos copolímeros dibloco E<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e tribloco E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub> puros e com os fármacos quercetina e mangiferina.

Sistemas	1% (m/v)	
	$D_h$ pico (nm)	$r_h$ pico (nm)
E <sub>65</sub> G <sub>5</sub>	13,47 ± 0,46	6,73 ± 0,23
E <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub>	9,48 ± 0,11	4,74 ± 0,06
QE <sub>65</sub> G <sub>5</sub>	12,70 ± 1,12	6,35 ± 0,56
QE <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub>	9,51 ± 0,29	4,75 ± 0,15
ME <sub>65</sub> G <sub>5</sub>	12,15 ± 0,36	6,08 ± 0,18
ME <sub>65</sub> G <sub>7</sub> E <sub>65</sub>	9,49 ± 0,29	4,75 ± 0,15

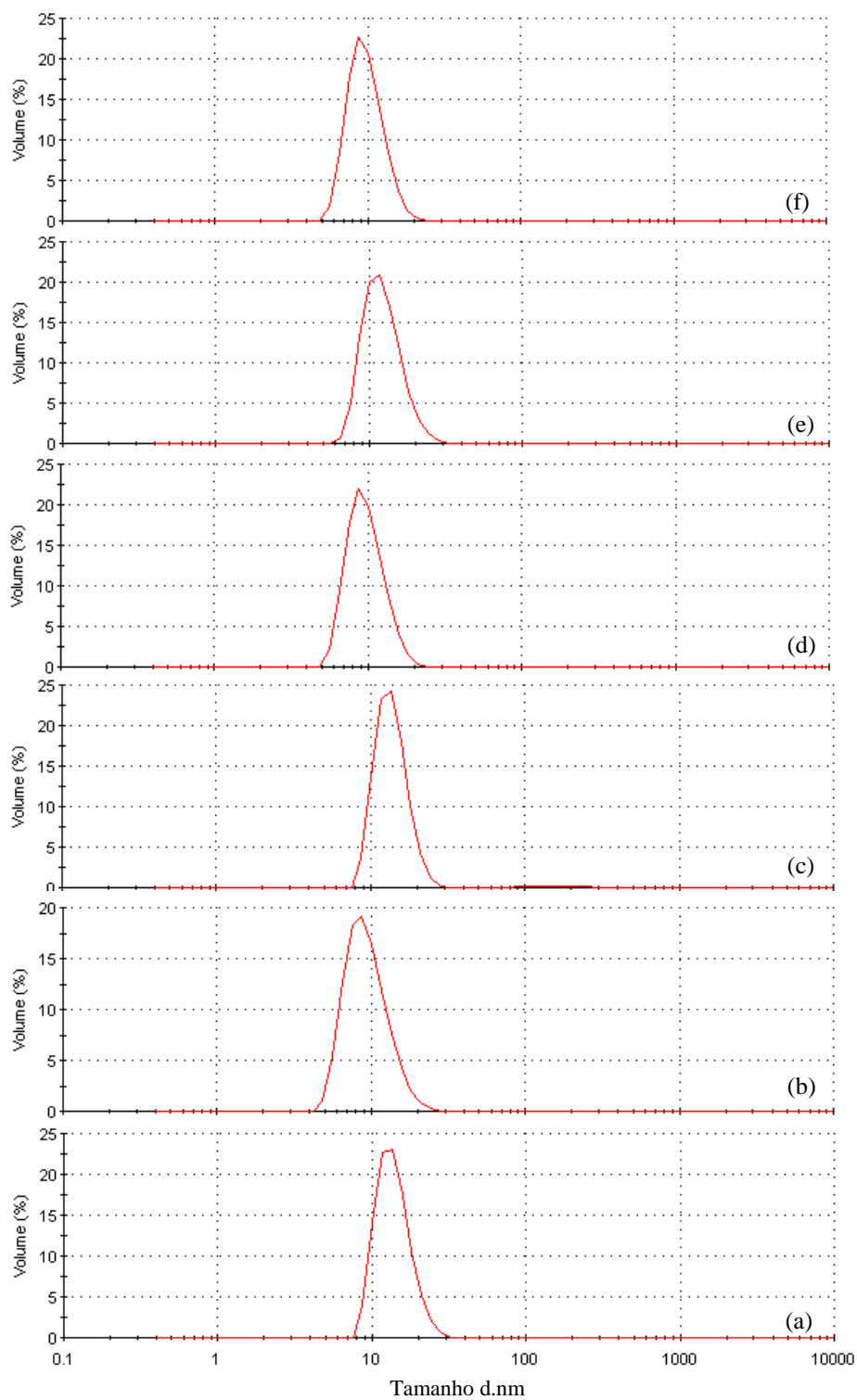


Figura 41. Curvas de distribuição de tamanho por volume para as micelas dos sistemas a 1%: (a) E<sub>65</sub>G<sub>5</sub>, (b) E<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub>, (c) QE<sub>65</sub>G<sub>5</sub>, (d) QE<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub>, (e) ME<sub>65</sub>G<sub>5</sub> e (f) ME<sub>65</sub>G<sub>7</sub>E<sub>65</sub>.

#### 4.4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

##### 4.4.5.1 Dibloco $E_{65}G_5$ e tribloco $E_{65}G_7E_{65}$ e seus encapsulados

A Figura 42 mostra as micrografias (todas na mesma escala – 200 vezes) obtidas para fármacos quercetina e mangiferina, os copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  e dos encapsulados de quercetina no copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  ( $QE_{65}G_5$ ) e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  ( $QE_{65}G_7E_{65}$ ) e da mangiferina no copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  ( $ME_{65}G_5$ ) e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  ( $ME_{65}G_7E_{65}$ ).

A análise de formulações farmacêuticas baseadas em micelas por microscopia eletrônica de varredura tem sido foco de muitos estudos (Tommaso e col., 2010). Algumas informações podem ser obtidas pelas observações dos materiais liofilizados com e sem fármaco (Pralhad e Rajendrakumar, 2004).

As micrografias dos copolímeros de dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  são semelhantes. Ambos apresentam-se como partículas de formato irregular, entretanto as partículas do dibloco (Figura 42a) apresentam-se um pouco mais aglomeradas que as do tribloco (Figura 42b).

Na micrografia da quercetina (Figura 42c) observamos a presença de seus cristais de forma alongada, os quais não são visualizados nas micrografias dos seus encapsulados (mesmo com ampliações de 2000 vezes – não apresentado) nos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  (Figura 42d) e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  (Figura 42e), o que é consistente com seu encapsulamento no núcleo micelar.

Na micrografia da mangiferina (Figura 42f) é possível observar a presença de seus cristais de forma aglomerada, não alongada. Nas micrografias de seus encapsulados não é possível visualizar presença de seus cristais (mesmo com ampliações de 2000 vezes – não apresentado), mas observa-se um aspecto diferenciado entre o dibloco e o tribloco (Figuras 42g e 42h).

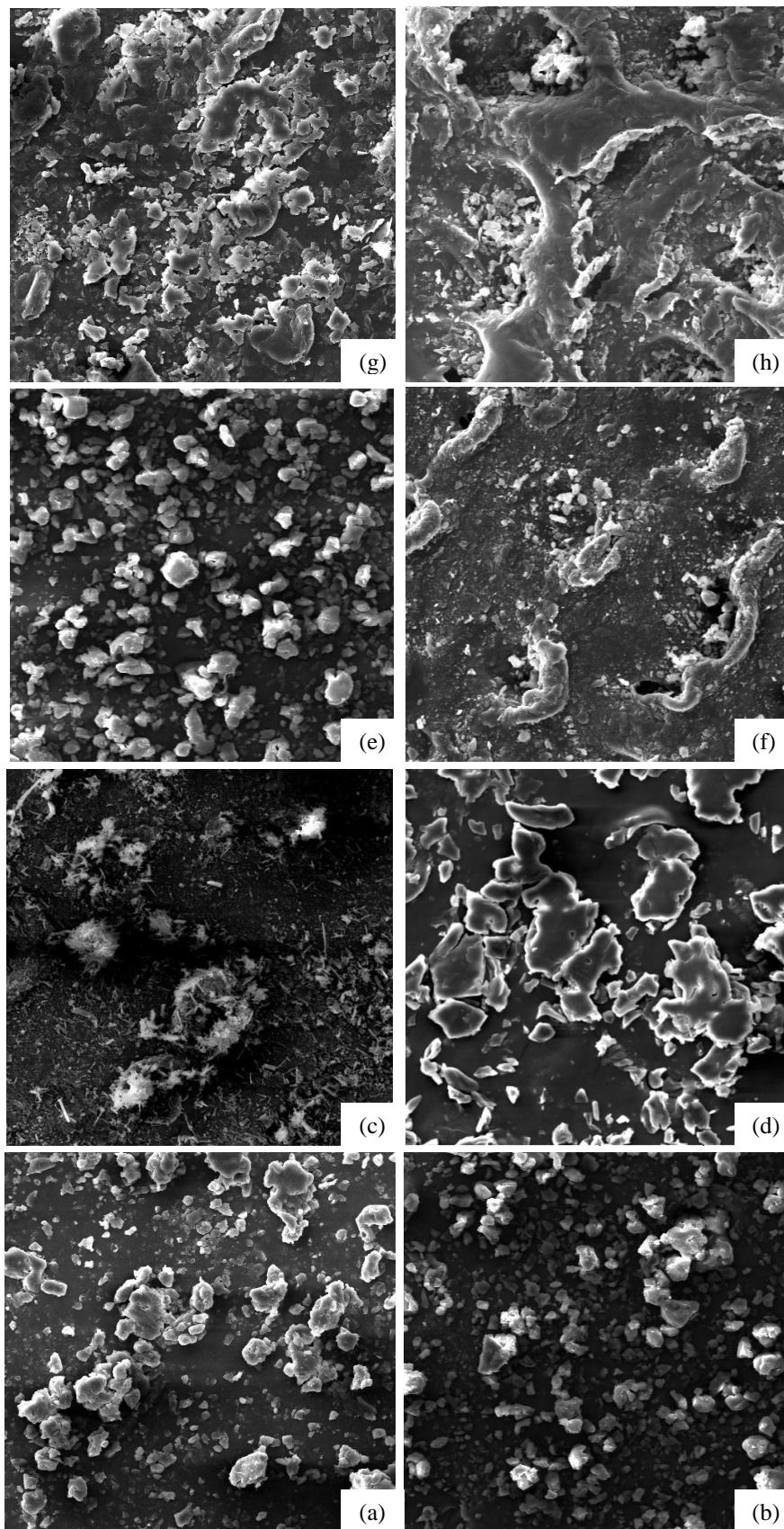


Figura 42. Micrografias: (a)  $E_{65}G_5$ , (b)  $E_{65}G_7E_{65}$ , (c) quercetina, (d)  $QE_{65}G_5$ , (e)  $QE_{65}G_7E_{65}$ , (f) mangiferina, (g)  $ME_{65}G_5$  e (h)  $ME_{65}G_7E_{65}$ .

## 4.5 LIBERAÇÃO *IN VITRO*

### 4.5.1 Tribloco E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub> e seus encapsulados

A liberação de fármacos lipofílicos de nanopartículas estruturadas na forma de núcleo-corona é largamente dependente das propriedades hidrofóbicas do núcleo (Allen, Maysinger e Eisenberg, 1999). Os encapsulados de griseofulvina exibem taxas de liberação que diferem em função do método de encapsulação empregado, os quais encontram-se na Figura 43. Os encapsulados pelo método 4 (sonicação) exibem uma rápida liberação da griseofulvina no estágio inicial. Aproximadamente 7% de massa total de fármaco foi liberado nas duas horas iniciais. Enquanto que para o método 3 (filme) a liberação inicial foi lenta, apenas 3% do fármaco liberado nas duas horas iniciais.

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

No caso de copolímeros com baixa taxa de degradação, a taxa de liberação é mais fortemente influenciada por fatores como: a força de interação entre o fármaco e o bloco formador do núcleo (principal fator), o estado físico do núcleo micelar, a quantidade de fármaco encapsulado, a massa molecular do fármaco, o comprimento do bloco formador do núcleo e a localização do fármaco dentro da micela (Allen e col., 2000).

A forte interação entre o fármaco e o núcleo micelar acarretam baixa taxa de liberação do fármaco pela micela (Allen e col., 2000). Pode-se observar que o método de encapsulação por sonicação (método 4) promoveu maior interação do fármaco com o núcleo micelar como pode ser observado pelo coeficiente de partição e energia livre padrão de solubilização.

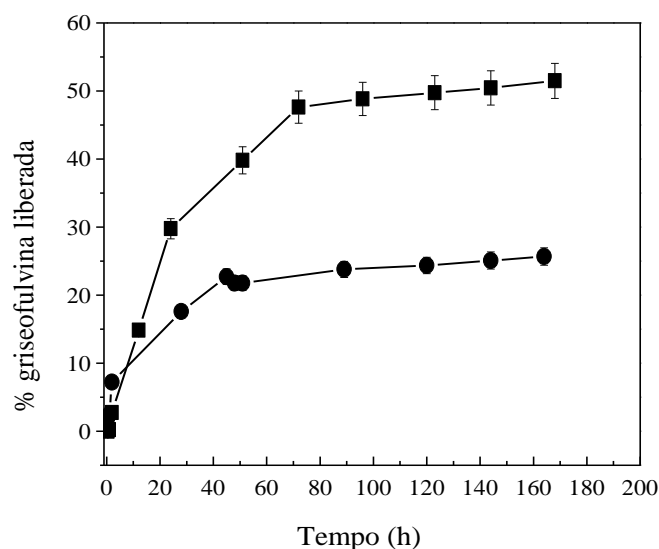


Figura 43. Perfil de liberação da griseofulvina em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C: (■) encapsulado pelo método 3 (filme) e (●) encapsulado pelo método 4 (sonicação) para o encapsulado no copolímero E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>.

Uma liberação sustentada para a griseofulvina de 50% (método 3) e 20% (método 4) ocorreu em 160 h. Devido a alta interação entre o fármaco e o copolímero, no encapsulamento pelo método 4 (sonicação), a taxa de liberação é menor. O tipo de método empregado na encapsulação, bem como a hidrofobicidade do copolímero promovem diferentes perfis de liberação. O sistema que possui maior quantidade de fármaco encapsulado possui menor taxa de liberação conforme observado no estudo de liberação realizado por Soo e col. (2005) do estradiol em micelas do copolímero em bloco de policaprolactona-polióxido de etileno.

A liberação ocorre através do mecanismo de difusão durante as 160 h, correspondente a 7 dias, período de importância clínica – que pode ser observado pela linearidade do gráfico de % de fármaco liberado *versus* a raiz quadrada do tempo em horas, conforme o modelo de Higuchi (Siepmann e Peppas, 2001; Soo e col., 2002). Isto excluindo os tempos iniciais, nos quais ocorre rápido processo de liberação ( $t < 24h$ ). O que é condizente com o tipo de interação não-covalente entre a griseofulvina e nanomicela (Missirlis e col. 2006). A Figura 44 mostra a variação da % de griseofulvina liberada em função da raiz quadrada do tempo em horas.

A liberação da griseofulvina por difusão permite controle sobre a liberação. Além disso, o caráter micelar acarreta maior tempo de circulação sanguínea (Letchford e

Burt, 2007), acrescido da minimização dos efeitos colaterais causados pelo fármaco em sua forma livre.

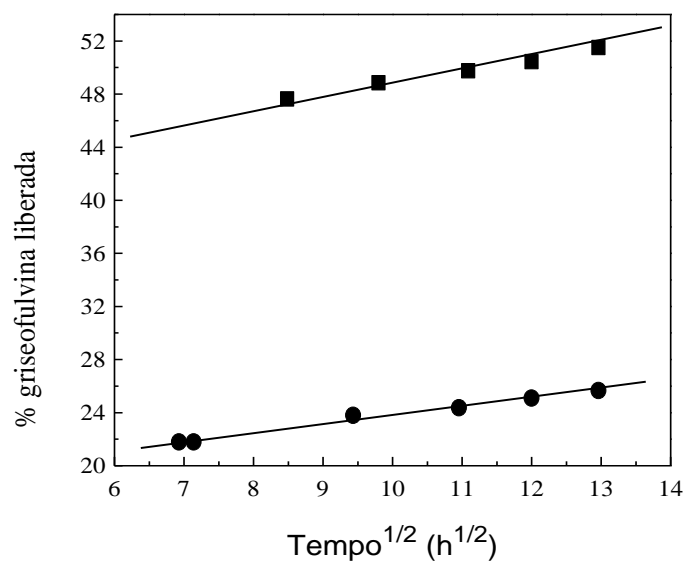


Figura 44. Liberação difusional da griseofulvina em tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C: (■) encapsulado pelo método 3 (filme) e (●) encapsulado pelo método 4 (sonicação) para o encapsulado no copolímero E<sub>43</sub>B<sub>14</sub>E<sub>43</sub>.



## 5 CONCLUSÃO

---

As misturas dos copolímeros triblocos F87 e  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , em todas as proporções estudadas, guardam as características de seus constituintes isolados, o que as tornam interessantes para aplicação farmacológica.

A concentração micelar crítica (CMC) do copolímero F87 é maior que a CMC do copolímero tribloco  $E_{43}B_{14}E_{43}$ , resultado condizente a menor hidrofobicidade do seu bloco central. As CMC's dos copolímeros F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$  e suas misturas sofrem influência da temperatura, o que promove aumento do número de moléculas na micela. As CMC's das misturas dos copolímeros triblocos F87 e  $E_{43}B_{14}E_{43}$  são inferiores às CMC's dos copolímeros separados, tornando as misturas viáveis para aplicações farmacológicas, devido à potencial estabilidade de suas micelas após a diluição sanguínea. As CMC's da série de diblocos  $E_mB_n$  não variam com a temperatura, o que é condizente com diblocos do tipo  $E_mB_n$  com  $n \geq 15$ , mostrando que diblocos contendo 15 unidades de bloco hidrofóbico são estáveis. Os valores de CMC encontrados para o copolímero dibloco  $E_{65}G_5$  são menores que os CMC's do copolímero tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$ . Apenas o copolímero tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  varia com o aumento da temperatura.

As misturas  $E_{43}B_{14}E_{43}/F87$  são alternativas promissoras, as quais combinam as características de geleificação tão boas quanto seus constituintes separadamente e melhor capacidade de solubilização. Destaca-se que a capacidade de solubilização apresenta a maior vantagem do uso de mistura de copolímeros contendo o copolímero mais hidrofóbico a partir de 70% na mistura obtida pelo método 3 (filme) e 60% na mistura obtida pelo método 4 (sonicação). O método de sonicação do copolímero se mostrou mais eficiente para carrear o fármaco griseofulvina na série de misturas de copolímeros triblocos F87 e  $E_{43}B_{14}E_{43}$  estudados. O método de fusão do copolímero se mostrou mais eficiente para carrear o fármaco griseofulvina na série de diblocos estudados e assim como na CMC, bloco a partir de 15 unidades de B não promovem um aumento significativo na solubilização. O fármaco quercetina, sofreu um aumento da solubilidade de até

260 vezes (temperatura ambiente – 25 °C) e de 90 vezes (temperatura corpórea – 37 °C) com o uso das soluções poliméricas do dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$ . Tal fato incentiva em muito a aplicabilidade desses copolímeros. A mangiferina não obteve números tão expressivos de aumento de solubilidade até mesmo porque sua

solubilização em água já é bem significativa. Porém, um aumento da ordem de 3 vezes também é válido até mesmo que esses valores são bem estáveis às mudanças de temperatura.

Os resultados de FT-IR não apresentam mudanças significativas para os copolímeros e encapsulados estudados. O FT-Raman confirmou a presença dos fármacos griseofulvina e quercetina nos seus encapsulados, mas não foi possível verificar a interação da mangiferina nos encapsulados dos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$ .

Os resultados de raio-x confirmaram que os fármacos griseofulvina, quercetina e mangiferina encontram-se encapsulados nos sistemas poliméricos nas formas amorfas, como indica a ausência dos picos cristalinos dos fármacos.

O resultado de tamanho de partícula das micelas encontra-se na escala nano, o que favorece a administração desses sistemas no fluido corpóreo. O tamanho das partículas das misturas dos copolímeros triblocos F87,  $E_{43}B_{14}E_{43}$  são maiores que os copolímeros isolados, o que justifica a maior solubilidade do fármaco quando solubilizados nas misturas. O tamanho de partícula do copolímero dibloco  $E_{65}G_5$ , fornecido pelo raio hidrodinâmico ( $r_h$ ), é maior que o do tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$ , uma vez que a arquitetura do dibloco promove um arranjo com maior número de moléculas e por conseguinte maior raio. Os fármacos quercetina e mangiferina não afetam o tamanho de partícula dos copolímeros dibloco  $E_{65}G_5$  e tribloco  $E_{65}G_7E_{65}$  estudados.

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode-se observar que estruturalmente têm-se diferenças significativas entre a quercetina e a mangiferina, fato que pode explicar valores e comportamentos diferentes de CMC e solubilidade desses fármacos nas soluções poliméricas.

Os encapsulados do copolímero  $E_{43}B_{14}E_{43}$  apresentam liberação sustentada por uma semana, período de importância clínica, bem como sofrem influência do método de encapsulação empregado.

## 6 REFERÊNCIAS

---

- Adams, M. L., Lavasanifar, A., Kwon, G. S., *J. Pharm. Sci.*, **2003**, 92, 1343.
- Ahmed, H., Buckton, G., Rawlins, D. A., *Int. J. Pharm.*, **1998**, 167, 139.
- Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica - ABIQUIF: Estatísticas 2008. Disponível em <[http://www.abiquif.org.br/mercado\\_estatisticas.html](http://www.abiquif.org.br/mercado_estatisticas.html)>. Acesso em: 01 jun. 2009.
- Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., Hatton, T. A. *Macromol.*, **1994**, 27, 2414.
- Alexandridis, P., *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.*, **1997**, 2, 478.
- Aliabadi, H. M., Lavasanifar, A., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2006**, 3, 139.
- Allen, C., Maysinger, D., Eisenberg, A., *Coll. Surf. B: Biointerf.*, **1999**, 16, 3.
- Allen, C., Han, J., Yu, Y., Maysinger, D., Eisenberg, A., *J. Contr. Rel.*, **2000**, 63, 275.
- Almgren, M., Brown W., Hvidt S., *Coll. Polym. Sci.*, **1995**, 273, 2.
- Altinok, H., Nixon, S. K., Gorry, P. A., Attwood, D., Booth, C., Kelarakis, A., Havredaki V., *Colloid Surface B*, **1999**, 16, 73.
- Ammar, H. O., Salama, H. A., Ghorab, M., Mahmoud, A. A., *Int. J. Pharm.*, **2006**, 320, 53.
- Arenas, R., Ruiz-Esmenjaud, J., *An. Bras. Dermatol.*, **2004**, 79, 225.
- Asada, M., Takahashi, H., Okamoto, H., Tanino, H., Danjo, K., *Int. J. Pharm.*, **2004**, 270, 167.
- Attwood, D., Zhou, Z., Booth, C., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2007**, 4, 533.
- Avivi, S., Nitzan, Y., Dror, R., Gedanken, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 15712.

Barboza, J. C. S., Serra, A. A., *Quim. Nova*, **1992**, 15, 302.

Blaak, R. J., *J. Chem. Phys.*, **2000**, 112, 9041.

Bedells, A. D., Arafah, R. M., Yang, Z., Attwood, D., Heatley, F., Padget, J. C., Price, C., Booth, C., *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, **1993**, 89, 1235.

Booth, C., Attwood, D., *Macromol. Rapid Commun.*, **2000**, 21, 501.

Booth, C., Attwood, D., Price, C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2006**, 8, 3612.

Cavalcante, I.M., Costa, F. M. L. L., Gonzaga, M. L. C., Ribeiro, M. E. N. P., Fonseca, S. G.C., Vieira, I. G. P., Ricardo, N. M. P. S., in Anais do 9º Congresso Brasileiro de Polímeros, Campina Grande, **2007**.

Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S., Crothers, M., Booth, C., *Langmuir*, **2002**, 18, 4277.

Chaibundit, C., Sumanatrakool, P., Chinchew, S., Kanatharana, P., Tattershall, C. E., Booth, C., Yuan, X-F., *J. Coll. Interf. Sci.*, **2005**, 283, 544.

Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S., Costa, F. M. L. L., Yeates, S. G. e Booth, C., *Langmuir*, **2007**, 23, 9229.

Chattopadhyay, A., London, E., *Anal. Biochem.* **1984**, 139, 408.

Chu, B., *Langmuir*, **1995**, 11, 414.

Chu, B., Zhou, Z-K, **1996**, p. 67, 'Nonionic Surfactants, Poly(oxyalkylene) Block Copolymers', Surfactant Science Series, Vol. 60, ed. V. M. Nace, Marcel Dekker, New York.

ClinicalTrials.gov: Found 9 studies for the search of: quercetin. Disponível em <<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=quercetin>>. Acesso em: 26 ago. 2009.

Collett, J. H., Tobin, E. A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1979**, 31, 174.

- Cornard, J. P., Merlin, J. C. *J. of Inorganic Biochemistry*, **2002**, 92, 19.
- Croy, S. R., Kwon, G. S., *J. Contr. Rel.*, **2004**, 95, 161.
- Crothers, M., Attwood, D., Collett, J. H., Yang, Z., Booth, C., Taboada, P., Mosquera, V., Ricardo, N. M. P. S., Martini, L., *Langmuir*, **2002**, 18, 8685.
- Crothers, M., Zhou, Z-Y., Ricardo, N. M. P. S., Yang, Z., Taboada, P., Chaibundit, C., Attwood, D., Booth, C., *Int. J. Pharm.*, **2005**, 293, 91.
- da Silva, R. C., Loh, W., *J. Coll. Interf. Sci.*, **1998**, 202, 385.
- Dong, J., Chowdhry, B. Z., Leharne, S. A., *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2006**, 277, 249.
- Ellis, A. G., Crinis, N. A., Webster, L. K., *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **1996**, 38, 81.
- Elsabahy, M., Perron, M-E., Bernard, N., Yu, G-E., Leroux, J.-C., *Biomacromol.*, **2007**, 8, 2250.
- Feng, T., Pinal, R., Carvajal, M. T., *J. Pharm. Scie.*, **2008**, 97, 3207.
- Feng, T., Bates, S., Carvajal, M. T., *Int. J. Pharm.*, **2009**, 367, 16.
- Finkelstein, E. Amichai, B. Grunwald, M. H., *Int. J. Antimicrobial Agents*, **1996**, 6, 189.
- Gao, Y., Wang, Y., Ma, Y., Yu, A., Cai, F., Shao, W., Zhai, G. *Colloid Surface B*, **2009**, 71, 306.
- Gaucher, G., Dufresne, M-H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D., Leroux, J-C., *J. Contr. Rel.*, **2005**, 109, 169.
- Gordon, M. H., Roeding-Penman, A., *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 97, 79.
- Goodman. I., **1985**. 'Developments in Block Copolymers-2', Elsevier Applied Science, New York.
- Haken, J. K., Tan, L., *J. Polym. Sci.*, **1998**, 26, 1315.

- Hall, D. G., **1987**. Thermodynamics of micelle formation. In: Schick, M.J. (Ed.), *Nonionic Surfactants, Physical Chemistry*, vol. 23. Marcel Dekker, New York, pp. 247–296.
- Hamley, I. W., Pople, J. A., Ameri, M., Attwood, D., Booth, C., *Colloid Surface A*, **1998**, 145, 185.
- Hamley, I. W., Mai, S-M., Ryan, A. J., Fairclough, J. P. A., Booth, C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, 3, 2972.
- Harris, J. K., Rose, G. D., Bruening, M. L. *Langmuir*, **2002**, 18, 5337.
- Harrison, W. J., Aboulgasem, G. J., Elathrem, F. A. I., Nixon, S. K., Attwood, D., Price, C., Booth, C., *Langmuir*, **2005**, 21, 6170.
- Hurtrez, G., Dumas, P., Riess, G. *Polym. Bull.* **1998**, 40, 203.
- Hvidt, S., Jørgenesen, E. B., Brown, W., Schillen, K., *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 2320.
- Jada, A., Hurtrez, G., Siffert, B., Riess, G. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, 197, 3697.
- Jones, M-C., Leroux, J-C., *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, **1999**, 48, 101.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., Alakhov, V. Y., *J. Contr. Rel.*, **2002**, 82, 189.
- Kabanov, A.V., Lemieux, P., Vinogradov, S. Alakhov, V., *Adv. Drug Deliv. Reviews*, **2002**, 54, 223.
- Kadam, Y., Yerramilli, U., Bahadur, A., *Coll. Surf. B: Biointerf.*, **2009**, 72, 141.
- Karlstrom, G., *J. Phys. Chem.*, **1995**, 89, 4962.
- Kataoka, K., Kwon, G., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., *J. Contr. Rel.*, **1992**, 24, 119.
- Kataoka, K., Kwon, G.S., Yokoyama M., Okano T., Sakurai, Y. *J. Control. Rel.*, **1993**, 24, 119.

Kawaguchi, T., Honda, T., Nishihara, M., Yamamoto, T., Yokoyama, M., *J. Control. Rel.*, **2009**, 136, 240.

Kelarakis, A., Havredaki, V., Derici, L., Yu, G-E., Booth, C., Hamley, I. W., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1998**, 94, 3639.

Kelarakis, A., Havredaki, V., Booth, C., Nace, V. M., *Macromol.*, **2002**, 35, 5591.

Kelarakis, A., Castelletto, V., Krysmann, M. J., Havredaki, V., Viras, K., Hamley, I. W., *Langmuir*, **2008**, 24, 3767.

Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W., Seo, M. H., *J. Control. Rel.*, **2001**, 72, 191.

Kyung, T. O., Bronich, T. K., Kabanov, A. V., *J. of Contr. Rel.*, **2004**, 94, 411.

Kumar, N., Ravikumar, M. N. J., Domb, A. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 53, 23.

Letchford, K., Burt, H., *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, **2007**, 65, 259.

Li, H., Yu, G.-E., Price, C., Booth, C. Hecht, E., Hoffmann, H., *Macromolecules*, **1997**, 30, 1347.

Liu, T., Nace, V. M., Chu, B., *Langmuir*, **1999**, 15, 3109.

Living polymerization. Disponível em <[www.iupac.org/goldbook/L03597.pdf](http://www.iupac.org/goldbook/L03597.pdf)>. Acesso em: 01 jun. 2009.

Luo, Y-Z., Nicholas, C. V., Attwood, D., Collett, J. H., Price, C., Booth, C., *Coll. Polym. Sci.*, **1992**, 270, 1094.

Luo, Y-Z., Nicholas, C. V., Heatley, F., Attwood, D., Collett, J. H., Price, C., Booth, C., Chu, B., Zhou, Z-K., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1993**, 89, 539.

Mai, S., Ludhera, S., Heatley, F., Attwood, D., Booth, C., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1998**, 94, 567.

Malmsten, M., Lindman, B., *Macromol.*, **1992**, 25, 5440.

Mansur, C. R. E., González, G., Lucas, E. F., *Polym. Degrad. Stabil.*, **2003**, 80, 579.

Mata, J. P., Majhi, P. R., Guo, C., Liu, Z., Bahadur, P., *J. Coll. Interf. Sci.*, **2005**, 292, 548.

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

McBain, J., *Trans. Faraday Soc.*, **1913**, 9, 99.

Micelas y Liposomas. Disponível em  
<<http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Lipidos/micelas.htm>>. Acesso em: 01 jun. 2009.

Mingvanish, W., Mai, S.-M., Heatley, F., Booth, C., Attwood, D. *J. Phys. Chem. B.*, **1999**, 103, 11269.

Missirlis, D., Kawamura, R., Tirelli, N., Hubbell, J. A., *Europ. J. Pharmac. Sci.*, **2006**, 29, 120.

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

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

Nace, V. M., Nonionic surfactants: polyoxyalkylene block copolymers, *Surfactant Science Series*, v. 60, **1996**.

Nakashima, K., Bahadur, P., *Adv. Coll. Interf. Sci.*, **2006**, 123-126, 75.

Nicholas, C. V., Luo, Y-Z., Deng, N-J., Attwood, D., Collett, J. H., Price, C., Booth, C., *Polymer*, **1993**, 34, 138.

Nixon, S. K., Hvidt, S., Booth, C., *J. Coll. Interf. Sci.*, **2004**, 280, 219.

Oh, K. T., Bronich, T. K., Kabanov, A. V., *J. Contr. Rel.*, **2004**, 94, 411.

Oliveira, R. B., Lima, E. M., *Rev. Eletr. Farm.*, **2006**, 3, 29.



Patravale, V. B., Date, A. A., Kulkarni, R. M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **2004**, 56, 827.

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

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

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

Pinho, M.E.N., Solubilização de fármacos em formulações micelares de misturas de copolímeros triblocos, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2006**.

Pralhad, T., Rajendrakumar, K., *J. of Pharm. and Biomedical Anal.* **2004**, 34, 333.

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

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

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

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

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

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

Rippner, B., Boschkova, K., Claesson, P. M., Arnebrant, T., *Langmuir*, **2002**, 18, 5213.

Ryan, A. J., Mai, S-M., Fairclough, J. P. A., Hamley, I.W., Booth, C. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, 3, 2961.

- Rosler, A., Vandermeulen, G. W., Klok, H-A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 53, 95.
- Santacesaria, E., Sevio, M., Lisi, L., Gelosa, D., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1990**, 29, 719.
- Santacesaria, D. , Gelosa, M., DiSerio, Tesser, R., *J. Appl. Polym. Sci.*, **1991**, 42, 2053.
- Sastry, N.V., Hoffmann, H., *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2004**, 250, 247.
- Savic, R., Eisenberg, A., Maysinger D., *J. Drug Target*, **2006a**, 14, 343.
- Savić, S. D., Savić, M. M., Vesić, S. A., Vuleta, G. M., Müller-Goymann, C. C., *Int. J. Pharm*, **2006b**, 320, 86.
- Scherlund, M., Brodin, A., Malmsten, M., *Int. J. Pharm*, **2000**, 211, 37.
- Schmolka I. R., Raymond A.J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1965**, 44, 559.
- Schmolka, I. R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **1972**, 6, 571.
- Shaw, D. J., *Introduction to colloid and surface chemistry*, 4. Ed. Oxford: Butterworth-Heinemann LTD, **1992**, 84.
- Siepmann, J., Peppas, N. A., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 48, 139.
- Solomons, T.W.G, *Química orgânica*, 9.ed. LTC, Rio de Janeiro, **2009**, v.1, 675 p.
- Soo, P. L., Luo, L. B., Maysinger, D., Eisenberg, A., *Langmuir*, **2002**, 18, 9996.
- Soo, P., L., Lovric, J., Davidson, P., Maysinger, D., Eisenberg, A., *Molecular Pharm.*, **2005**, 2, 519.
- Stainsby, S., Alexander, A., *Trans. Faraday Soc.*, **1950**, 46, 587.
- Su, Y-l., Wang, J., Liu, H-Z., *J. Coll. Interf. Sci.*, **2002**, 251, 417.
- Sunder, A., Türk, H., Haag, R., Frey, H. *Macromol.* **2000**, 33, 7682.
- Svenson, S., Tomalia, D. A., *Adv. Drug Deliv. Reviews*, **2005**, 57, 2106.

Szwarc, M., *Nature*, **1956**, 176, 1168.

Taboada, P., Velasquez, G., Barbosa, S., Castelletto, V., Nixon, S. K., Yang, Z., Heatley, F., Hamley, I. W., Ashford, M., Mosquera, V., Attwood, D., Booth, C. *Langmuir*, **2005**, 21, 5263.

Taboada, P., Velasquez, G., Barbosa, S., Yang, Z., Nixon, S. K., Zhou, Z., Heatley, F., Hamley, I. W., Ashford, M., Mosquera, V., Attwood, D., Booth, C., *Langmuir*, **2006**, 22, 7465.

Tanodekaew, S., Deng, N-J., Smith, S., Yang, Y-W., Attwood, D., Booth, C. *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 11847.

Tanford, C., **1980**. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2<sup>nd</sup> Ed.; J. Wiley and Sons, New York.

Tije, A J., Verwij, J., Loos, W. J., Sparreboom, A., *Clin. Pharmacokinet.*, **2003**, 42, 665.

Tommaso, C. D., Como, C., Gurny, R., Möller, M. *European J. of Pharm. Scie.*, **2010**, 40, 38.

Wanka, G., Hoffman, H., Ulbricht, W. *Colloid Polym. Sci.* **1990**, 268, 101.

Wanka, G., Hoffmann, H., Ulbricht, W., *Macromol.*, **1994**, 27, 4145.

Wei, X. W., Gong, C. Y., Shi, S, Fu, S. Z., Men, K., Zeng, S., Zheng, X. L., Gou, M. L., Chen, L. J., Qian, Z. Y., *Int. J. Pharm.*, **2009a**, 369, 170.

Weiss, R., Donehower, R., Wiernik, P., Ohnuma, T., Gralla, R., Trump, D., Baker Jr., J., Van Echo, D., Von Hoff, D., Leyland-Jones, B., *J. Clin. Oncol.*, **1990**, 1263.

Wiedmann, T. S., Bathia, R. Wattenberg, L. W., *Macromol.*, **1994**, 27, 4145.

Yang, Z., Pickard, S., Deng, N.-J., Barlow, R. J., Attwood, D., Booth, C., *Macromol.*, **1994**, 27, 2371.

Yang, Y-W., Deng, N-J, Yu, G-E., Zhou, Z-K., Attwood, D., Booth, C., *Langmuir*, **1995**, 11, 4703.

Yang, Y-W, Brine, G., Yu Ga-Er, Heatley, F., Attwood, D., Booth, C., *Polym.*, **1997**, 38, 1659.

Yang, Z., Crothers, M., Ricardo, N. M. P. S., Chaibundit, C., Taboada, P., Mosquera, V., Kellarakis, A., Havredaki, V., Martini, L., Valder, C., Collett, J. H., Attwood, D., Heatley, F., Booth, C., *Langmuir*, **2003a**, 19, 943.

Yang, Z., Crothers, M., Attwood, D., Collett, J. H., Ricardo, N. M. P. S., Martini, L. G. A., Booth, C., *J. Coll. Interf. Sci.*, **2003b**, 263, 312.

Yamamoto, Y., Yagusi, K., Harada, A., Nagasaki, Y., Kurata, K. *J. Cont. Rel.*, **2002**, 82, 359–371.

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

Yu, G-E., Deng, Y-L., Dalton, S., Wang, Q-G., Attwood, D., Price, C., Booth, C., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1992**, 88, 2537.

Yu, G-E., Yang, Y-M., Yang, Z., Attwood, D., Booth, C., Nace, V. M., *Langmuir*, **1996**, 12, 3404.

Yu, G-E., Yang, Z., Ameri, M., Attwood, D., Collett, J. H., Price, C., Booth, C., *J. Phys. Chem. B.*, **1997**, 101, 4394.

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

Yu, G-E., Li, H., Price, C., Booth, C., *Langmuir*, **2002**, 18, 7756.

Yuan, X-F., Masters, A. J., Price, C., *Macromol.*, **1992**, 25, 6876.

Zhou, Z., Chu, B., *J. Coll. Interf. Sci.*, **1988**, 126, 171.

Zhou, Z., Yang, Y., Booth, C., Chu, B., *Macromol.*, **1996**, 29, 8357.

Zhou, Z., Chaibundit, C., D'Emanuele, A., Lennon, K., Attwood, D., Booth, C., *Int. J. Pharm.*, **2008**, 354, 82.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)