

N° d'ordre : 3153

**THESE
en cotutelle
entre**

**L'UNIVERSITE BORDEAUX 1
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
et
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM QUIMICA**

présentée au BRESIL

par Betina GIEHL ZANETTI

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : POLYMERES

**EVALUATION DU POTENTIEL D'UTILISATION D'UN POLYURETHANE
OBTENU A PARTIR D'UN POLYOL D'ORIGINE NATUREL COMME
MATERIEL POLYMERIQUE POUR LA MICRO ET NANO ENCAPSULATION
D'AGENTS ACTIFS.**

Soutenue le : 20 avril 2006.

Après avis de :

| | | |
|---------------|--|------------|
| M. C. ROCHAS | Directeur de Recherche CNRS - Grenoble, France | Rapporteur |
| M. C. TEDESCO | Professeur - USP /Ribeirão Preto, Brèsil | Rapporteur |

Devant la commission d'examen formée de :

| | | |
|-------------------|---------------------------------|-------------------------|
| M. N. A. DEBACHER | Professeur - UFSC | Président et Rapporteur |
| M. R. BORSALI | Directeur de Recherche -CNRS | Directeur de thèse |
| M. V. SOLDI | Professeur - UFSC | Directeur de thèse |
| M. C. ROCHAS | Directeur de Recherche -CNRS | Examineur |
| M. C. TEDESCO | Professeur - USP | Examineur |
| M. H. CRAMAIL | Professeur-Université Bordeaux1 | Examineur |

Membres invités :

| | |
|---------------------|---------------------------|
| M. E. CLOUTET | Chargé de Recherche -CNRS |
| Mme. E. LEMOS-SENNA | Professeur UFSC |

para
Ricardo

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1. Características dos diisocianatos empregados na obtenção dos poliuretanos..... | 35 |
| TABELA 2. Formulações testadas no estudo preliminar de preparação de micropartículas de poliuretano. | 37 |
| TABELA 3. Fatores de formulação estudados..... | 39 |
| TABELA 4. Composição, parâmetros de formulação e rendimento das formulações preparadas pela técnica de suspensão-poliadição..... | 49 |
| TABELA 5. Dados da análise granulométrica..... | 51 |
| TABELA 6. Diâmetro médio e índice de polidispersidade determinado pelo Zetasizer..... | 59 |
| TABELA 7. Potencial Zeta e pH das partículas preparadas pela técnica de suspensão-poliadição..... | 63 |
| TABELA 8. Valores de eficiência de encapsulação do levofloxacino nas formulações preparadas pela técnica de suspensão-poliadição..... | 65 |
| TABELA 9. Nanopartículas de poliuretano sintetizadas por miniemulsão usando 3 % (p/p) de óleo de oliva (versus quantidade de monômeros) como agente hidrofóbico..... | 74 |
| TABELA 10. Características dos surfactantes usados nas formulações sintetizadas por miniemulsão..... | 78 |
| TABELA 11. Diâmetro médio das partículas, Índice de polidispersidade e Rendimento em função da velocidade de agitação. | 83 |
| TABELA 12. Potencial zeta das partículas e pH das formulações preparadas por miniemulsão..... | 89 |
| TABELA 13. Doseamento e eficiência de encapsulação das formulações preparadas por miniemulsão..... | 91 |
| TABELA 14. Descrição das formulações submetidas ao teste de degradação. | 95 |
| TABELA 15. Valores de intensidade para a formulação F10M diluída em água ou tampão fosfato pH= 7,4..... | 112 |

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi pela orientação e dedicação prestada.

Ao Prof. Dr. Redouane Borsali pela orientação e apoio durante minha estadia na França.

À Profa. Dra. Elenara Lemos Senna pela co-orientação e contribuições feitas ao trabalho.

Aos Profs. Drs. Eric Cloutet e Henri Cramail pela colaboração na realização da síntese das nanopartículas pela técnica de miniemulsão.

Às Profs. Dras. Joana Cahan e Valérie Ravaine pela disponibilidade de equipamentos.

À Profa. Maria da Graça Nascimento.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química e do programa de Pós-Graduação em Química.

Ao diretor, professores e funcionários do Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques em especial a Catherine Roulinat e Corinne Gonçalves.

Aos colegas e amigos do POLIMAT e do LCPO.

Aos órgãos financiadores CAPES (Brasil) e Programa Alban (França).

Aos meus pais, minha irmã, familiares e amigos pelo carinho e amizade.

Ao Ricardo, por tudo.

A todos que, mesmo não citados, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS | 1 |
| 1.1 Introdução..... | 2 |
| 1.2 Justificativa | 4 |
| 1.3 Objetivo Geral | 4 |
| 1.4 Objetivos Específicos..... | 4 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 6 |
| 2.1 Poliuretanos..... | 7 |
| 2.2 A Encapsulação de fármacos | 14 |
| 2.2.1 Técnicas de preparação de micro e nanopartículas..... | 17 |
| 2.2.1.1 Suspensão-Poliadição..... | 18 |
| 2.2.1.2 Miniemulsão..... | 20 |
| 2.3 Biodegradação..... | 21 |
| 2.4 Liberação..... | 30 |
| 3. SÍNTESE DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE POLIURETANO PELA TÉCNICA DE SUSPENSÃO-POLIADIÇÃO. | 33 |
| 3.1 Materiais..... | 34 |
| 3.1.1 Matérias-primas | 34 |
| 3.1.2 Equipamentos..... | 34 |
| 3.2. Metodologia..... | 35 |
| 3.2.1 Estudo preliminar | 35 |
| 3.2.1.1 Preparação das microesferas..... | 35 |
| 3.2.1.2 Avaliação da morfologia | 38 |
| 3.2.1.3 Análise granulométrica das microesferas | 39 |
| 3.2.2 Avaliação de fatores de formulação sobre o tamanho médio e distribuição granulométrica das partículas. | 39 |
| 3.2.2.1 Análise granulométrica..... | 40 |
| 3.2.2.2 Morfologia das partículas..... | 41 |
| 3.2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de levofloxacino nas formulações por espectrofluorimetria. | 41 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Caracterização Físico-Química | 43 |
| 3.3.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)..... | 43 |
| 3.3.2 Determinação do Potencial Zeta..... | 43 |
| 3.3.3 Espalhamento de Luz..... | 44 |
| 3.4 Estudo de degradação <i>in vitro</i> das partículas..... | 44 |
| 3.5 Estudo de liberação do levofloxacino | 45 |
| 3.6 Resultados e discussão..... | 46 |
| 3.6.1 Resultados do estudo preliminar | 46 |
| 3.6.1.1 Avaliação da morfologia | 46 |
| 3.6.1.2 Distribuição granulométrica | 47 |
| 3.6.2 Síntese de partículas de poliuretano pela técnica de suspensão-poliadição..... | 47 |
| 3.6.3 Análise granulométrica..... | 51 |
| 3.6.4 Análise da Morfologia..... | 54 |
| 3.6.4.1 Micropartículas | 54 |
| 3.6.4.2 Nanopartículas..... | 55 |
| 3.6.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR | 56 |
| 3.6.6 Espalhamento de luz..... | 58 |
| 3.6.7 Potencial Zeta | 62 |
| 3.6.8 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco. ... | 64 |
| 4. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE POLIURETANO PELA TÉCNICA DE MINIEMULSÃO. | 67 |
| 4.1 Materiais..... | 68 |
| 4.1.1 Matérias-primas | 68 |
| 4.1.2 Equipamentos..... | 68 |
| 4.2 Metodologia..... | 69 |
| 4.2.1 Preparação de nanopartículas..... | 69 |
| 4.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier .. | 69 |
| 4.2.3 Tamanho de partícula | 70 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.4 Morfologia das partículas..... | 70 |
| 4.2.5 Potencial Zeta | 70 |
| 4.2.6 Determinação da eficiência de encapsulação do levofloxacino nas nanopartículas por espectrofluorimetria..... | 71 |
| 4.2.7 Estudo de degradação <i>in vitro</i> das nanopartículas. | 71 |
| 4.2.8 Estudo de liberação do levofloxacino a partir das nanopartículas. | 71 |
| 4.3 Resultados e Discussão | 72 |
| 4.3.1 Preparação de nanopartículas..... | 72 |
| 4.3.2 Caracterização do polímero por FTIR | 76 |
| 4.3.3 Determinação do tamanho de partícula..... | 78 |
| 4.3.3.1 Efeito do tipo de surfactante | 78 |
| 4.3.3.2 Efeito da concentração de surfactante | 79 |
| 4.3.3.3 Efeito do agente hidrofóbico | 82 |
| 4.3.3.4 Efeito da velocidade de agitação | 82 |
| 4.3.4 Espalhamento de luz..... | 85 |
| 4.3.5 Análise da morfologia..... | 87 |
| 4.3.6 Potencial Zeta | 89 |
| 4.3.7 Doseamento | 91 |
| 5. DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS PARTÍCULAS DE POLIURETANO..... | 93 |
| 5.1 Efeito do aquecimento sobre a degradação | 95 |
| 5.2 Degradação enzimática..... | 97 |
| 5.2.1 Efeito da Concentração de Papaína | 104 |
| 5.2.2 Teste com estearase | 108 |
| 5.3 Degradação Química..... | 109 |
| 5.4 Efeito do tampão fosfato..... | 112 |
| 5.5 Estudo da dependência angular..... | 115 |
| 5.5.1 Observações sobre o raio hidrodinâmico no estudo de dependência angular | 119 |
| 6. AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO | 126 |
| 6.1 Modelos de liberação | 132 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 137 |

| | |
|---|-----|
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 141 |
| ANNEXE - résumé en français..... | 153 |
| ANEXO -Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de micro e nanopartículas de poliuretano..... | 201 |

Artigo publicado no Macromolecular Symposia

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Representação de a) esfera e b) cápsula..... | 15 |
| FIGURA 2. Esquema de preparação das microesferas..... | 36 |
| FIGURA 3. Esquema de preparação das partículas pela técnica de suspensão- poliadição..... | 40 |
| FIGURA 4. Estrutura do levofloxacino (PM=370,38) | 42 |
| FIGURA 5. Morfologia e estrutura interna das microesferas obtidas por MEV | 46 |
| FIGURA 6. Distribuição granulométrica das microesferas preparadas no estudo preliminar. | 47 |
| FIGURA 7. Estrutura idealizada do poli(ol de origem natural (esquerda). A direita, foto da mamona. | 48 |
| FIGURA 8. Esquema reacional da síntese do poliuretano..... | 50 |
| FIGURA 9. Modelos da matriz polimérica das partículas preparadas a) sem PEG e b) com PEG..... | 51 |
| FIGURA 10. Efeito da adição de poli(etileno glicol) e da velocidade de agitação sobre o diâmetro médio das partículas. | 52 |
| FIGURA 11. Efeito do poli(etileno glicol) na redução do tamanho de partícula. | 53 |
| FIGURA 12. Partículas da formulação F10, preparada com 10% de PEG em aumentos de 100 e 500 vezes..... | 54 |
| FIGURA 13. Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas obtidas com (a) 0% PEG e velocidade de agitação de 20000 rpm, formulação F13 e (b) 10% PEG e velocidade de agitação de 16000 rpm, formulação F10. | 55 |
| FIGURA 14. Micropartícula da formulação F12 contendo levofloxacino. Corte transversal..... | 55 |
| FIGURA 15. Imagens obtidas por MET para a formulação F12. | 56 |
| FIGURA 16. Espectros de FTIR-ATR dos monômeros MDI e poli(ol e das formulações F12 e F13 preparadas com e sem PEG, respectivamente. | 57 |
| FIGURA 17. Diâmetro médio das nanopartículas da formulação F12 com e sem levofloxacino, medido pelo Zetasizer..... | 60 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 18. Função de correlação da F12 medida a 25°C e ângulos de 60°, 90° e 120°. | 61 |
| FIGURA 19. Γ versus q^2 para a formulação F12..... | 62 |
| FIGURA 20. Curva de calibração do levofloxacino..... | 65 |
| FIGURA 21. Desenho esquemático da distribuição do fármaco nas formulações preparadas pela técnica de suspensão-poliadição..... | 66 |
| FIGURA 22. Esquema de formação das nanopartículas de poliuretano por miniemulsão..... | 73 |
| FIGURA 23. Esquema de preparação das nanopartículas de poliuretano por miniemulsão..... | 73 |
| FIGURA 24. Espectros FTIR-ATR do IPDI, Poliol, F16M (poliol e IPDI) e F10M (poliol, PEG e IPDI). | 77 |
| FIGURA 25. Efeito da concentração de surfactante sobre o rendimento da formulação (%). | 80 |
| FIGURA 26. Efeito da concentração de surfactante sobre o diâmetro médio das partículas (nm). | 81 |
| FIGURA 27. Rendimento em função da concentração de tween 80 e da adição de PEG. | 82 |
| FIGURA 28. Efeito da velocidade de agitação sobre o diâmetro médio de partícula (nm). | 83 |
| FIGURA 29. Funções de correlação medidas a 25°C e ângulos de $\theta = 60^\circ, 90^\circ$ e 120° para (a) F10M (com PEG) e (b) F16M (sem PEG), respectivamente..... | 85 |
| FIGURA 30. Raio hidrodinâmico R_h (nm) das formulações F10M (com PEG) (a) e F16M (sem PEG) (b). | 86 |
| FIGURA 31. Γ versus q^2 para formulação F10M..... | 87 |
| FIGURA 32. Imagem obtida por MET das partículas de poliuretano obtidas por miniemulsão..... | 88 |
| FIGURA 33. Imagem obtida por MET da formulação F10M preparada com PEG..... | 89 |
| FIGURA 34. Distribuição do levofloxacino nas formulações preparadas por miniemulsão..... | 92 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 35. Cinética de degradação das nanopartículas submetidas ao aquecimento de 80°C onde $[R_{vv}(q)]_0$ e $[R_{vv}(q)]_t$ é a razão de Rayleigh no tempo zero e no tempo t, respectivamente. $\theta = 90^\circ$ | 96 |
| FIGURA 36. Redução do raio hidrodinâmico em função do tempo para a amostra F16M preparada pela técnica de miniemulsão e submetida a aquecimento de 80°C durante 30 dias. $\theta = 90^\circ$ | 97 |
| FIGURA 37. Esquema de degradação. | 98 |
| FIGURA 38. Rh (nm) e intensidade para amostra F10M diluída 500x em água milli Q e com fraca concentração de enzima (estearase) medidos a $\theta = 20^\circ$ e temperatura de 25°C durante 130 dias. | 99 |
| FIGURA 39. Aumento do valor da intensidade a pequenos ângulos observado para a formulação F10M com adição de 10 unidades de papaína a 37°C. | 99 |
| FIGURA 40. Redução do valor da intensidade a grandes ângulos observado para a formulação F10M com adição de 10 unidades de papaína a 37°C. | 100 |
| FIGURA 41. Comportamento da intensidade no teste de degradação da formulação F10M com papaína nos ângulos de 20° e 90°..... | 100 |
| FIGURA 42. Intensidades para a formulação F12 em presença de papaína medida a ângulos de 20° e 90°..... | 101 |
| FIGURA 43. Cinética de degradação para as formulações desenvolvidas pela técnica de suspensão-poliadição. $\theta = 90^\circ$, temperatura = 37°C..... | 102 |
| FIGURA 44. Rh (nm) em função do tempo de degradação para a formulação F12. $\theta = 20^\circ$, temperatura 37°C. | 103 |
| FIGURA 45. Valores de intensidade em função da concentração de enzima $\theta = 20^\circ$ | 104 |
| FIGURA 46. $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ em função da concentração de papaína. $\theta = 90^\circ$ | 105 |
| FIGURA 47. Degradação da formulação F10M contendo 5 unidades de papaína a) $\theta = 20^\circ$; b) $\theta = 90^\circ$ | 106 |
| FIGURA 48. Degradação da formulação F10M contendo 10 unidades de papaína. a) $\theta = 20^\circ$; b) $\theta = 90^\circ$ | 107 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 49. Comportamento do Rh da formulação F10M submetida a 10 unidades de estearase a temperatura de 25°C. $\theta = 20^\circ$ | 108 |
| FIGURA 50. Intensidade da formulação F10M em presença de HCl 0,5 M em ângulos de 20° e 90°..... | 109 |
| FIGURA 51. $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ da formulação F10M em HCl 0,5 M ou NaOH 0,5 M medido em angulo de 90°..... | 110 |
| FIGURA 52. Rh para a formulação F10M submetida à degradação alcalina com NaOH 0,5 M. a) $\theta = 20^\circ$; b) $\theta = 90^\circ$ | 111 |
| FIGURA 53. Intensidade da F10M submetida ao tampão fosfato (3mg/mL) em temperatura de 37°C e ângulos de 20° e 90°..... | 113 |
| FIGURA 54. Efeito do tampão fosfato sobre o raio hidrodinâmico da formulação F10M, medido a $\theta = 20^\circ$ | 114 |
| FIGURA 55. $\Gamma \times q^2$ para a F10M..... | 115 |
| FIGURA 56. Intensidade em função do tempo em diferentes ângulos. | 116 |
| FIGURA 57. Intensidade em função de q..... | 116 |
| FIGURA 58. $\Gamma \times q^2$ para as partículas da F10M nas primeiras 8 horas de degradação. | 117 |
| FIGURA 59. $\Gamma \times q^2$ para as partículas da F10M e aglomerados após 24 horas de degradação..... | 118 |
| FIGURA 60. $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ em função do tempo de degradação nos ângulos de 90°, 120° e 140°. | 119 |
| FIGURA 61. Rh (nm) em função do tempo em presença de papaína. | 119 |
| FIGURA 62. Redução do Rh nas 32 horas de degradação com papaína à temperatura de 37°C. | 120 |
| FIGURA 63. Redução do Rh em função do tempo de degradação no estudo de dependência angular..... | 121 |
| FIGURA 64. Comportamento do Rh (nm) nos diferentes ângulos estudados, a temperatura de 37°C. | 124 |
| FIGURA 65. Esquema de ligação entre o polímero e o fármaco..... | 127 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 66. Cinética de liberação da formulação F12, preparada com 30% de PEG através da técnica de suspensão-poliadição. | 128 |
| FIGURA 67. Cinética de liberação da formulação F13, preparada sem PEG através da técnica de suspensão-poliadição. | 129 |
| FIGURA 68. Cinética de liberação da formulação F10M (com PEG) preparada pela técnica de miniemulsão. | 131 |
| FIGURA 69. Cinética de liberação da formulação F16M (sem PEG), preparada pela técnica de miniemulsão. | 132 |
| FIGURA 70. Quantidade de levofloxacino liberado da formulação F10M versus tempo ^{1/2} (horas). | 134 |
| FIGURA 71. Quantidade de levofloxacino liberado da formulação F16M versus tempo ^{1/2} (horas). | 134 |
| FIGURA 72. Quantidade de levofloxacino liberado da formulação F12 versus tempo ^{1/2} (horas)..... | 134 |
| FIGURA 73. Quantidade de levofloxacino liberado da formulação F13 versus tempo ^{1/2} (horas)..... | 135 |

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------|--|
| θ | Ângulo |
| Å | Angstrom |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitaria |
| ASTM | American Society for Testing and Materials |
| ATR | Attenuated total reflection |
| BAEE | α -n-benzoil-L-arginina etil ester |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| CLAE | Cromatografia liquida de alta eficiência |
| D | Coefficiente de difusão |
| EE | Eficiência de encapsulação percentual |
| FTIR-ATR | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no modo de ATR |
| $G^{(2)}$ | Função do tempo de correlação da intensidade de espalhamento |
| HDI | Hexano diisocianato |
| HMDI | Diciclohexilmetano diisocianato |
| IPDI | Isoforona diisocianato |
| MDI | Metileno difenil diisocianato |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| NPG | Neopentil glicol |
| PBS | Poli(butileno succinato) |
| PCA | Poli(cianoacrilato) |
| PEG | Poli(etileno glicol) |
| PLA | Poli(ácido lático) |
| PLG | Poli(ácido -glicólico) |
| PLGA | Poli(ácido lático-co-glicólico) |
| PU | Poliuretano |
| q | Vetor de onda de espalhamento |
| Rh | Raio hidrodinâmico |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SEM | Scanning electronic microscopy |
| SPAN | Monooleato de sorbitano |
| TDA | Tolueno diamina |
| TDI | Tolueno diisocianato |
| TEM | Transmission electronic microscopy |
| TWEEN | Polisorbato |
| Γ | Constante de Correlação |

RESUMO

Poliuretanos constituem uma classe polimérica com aplicações em diferentes áreas, dentre estas a farmacêutica, onde o emprego de polímeros biodegradáveis tem sido importante e desejável. Com a intenção de obter um material biodegradável, foi realizada a síntese de um poliuretano a partir de um monômero de origem natural, um polioli derivado do óleo de mamona (*Ricinus communis*), uma planta que existe em abundância no Brasil. Com a preocupação de reduzir o uso de solventes orgânicos e produzir formulações mais “seguras” foram utilizadas técnicas de síntese que utilizam o meio aquoso no processo de polimerização. Através da técnica de suspensão-poliadição foram sintetizadas micro e nanopartículas de poliuretano, cujo diâmetro diminuiu com o aumento da velocidade de agitação e com a adição de poli(etileno glicol) como co-monômero. Análises por granulometria a laser indicaram a formação de partículas com larga distribuição granulométrica, com diâmetro médio variando entre 5 μm e 400 μm , dependendo da formulação. Para solucionar este problema e sintetizar nanopartículas com tamanho controlado, foi utilizada a técnica de miniemulsão, sendo avaliado neste processo de polimerização, a influência do tipo e concentração de surfactante, do agente hidrofóbico e da velocidade de homogeneização sobre o tamanho de partícula e sobre o rendimento da formulação. Quantidades crescentes de surfactante resultaram num melhor rendimento de formulação e na redução do tamanho de partícula. A velocidade de agitação não afetou o rendimento, mas uma velocidade de 14000 rpm foi necessária para a obtenção de partículas com distribuição monomodal de tamanho e com diâmetro de aproximadamente 290 nm (determinado por espalhamento de luz). A formação do poliuretano foi confirmada por espectroscopia de infravermelho e o desaparecimento da banda em 2200 cm^{-1} referente ao grupo NCO do isocianato, evidenciou que a reação foi completa. A forma esférica e a presença de porosidade na superfície das micropartículas com a adição poli(etileno glicol), foram observadas por microscopia. Estudos de degradação química e enzimática das nanopartículas foram monitorados por espalhamento de luz, confirmando o caráter biodegradável do polímero sintetizado e revelando aspectos interessantes como, a redução do raio hidrodinâmico das nanopartículas durante o processo de degradação. Os resultados mostraram ainda que a presença de poli(etileno glicol) e tipo de diisocianato utilizado na composição das partículas, influenciaram a degradação. Para análise da capacidade de encapsulação do sistema, o fármaco levofloxacino foi encapsulado como modelo nas partículas de poliuretano e o doseamento realizado por espectroscopia de fluorescência. Os resultados revelaram que a adição de poli(etileno glicol) reduziu a eficiência de encapsulação de 70% para 20% nas partículas preparadas pela técnica de suspensão-poliadição. Na técnica de miniemulsão, os valores de eficiência de encapsulação foram de 48% nas partículas preparadas com ou sem poli(etileno glicol), fato este associado provavelmente à adição do agente hidrofóbico que atua como uma barreira evitando a saída do fármaco para o meio de polimerização. O perfil de liberação do levofloxacino foi investigado em tampão fosfato pH= 7,4 na presença e ausência de enzimas. Para a maioria das formulações, a quantidade total de fármaco foi liberada em 48 horas de estudo. Aparentemente, tanto a degradação da matriz polimérica como a difusão influenciaram na liberação do fármaco.

Palavras-chave: poliuretano, polioli natural, suspensão-poliadição, miniemulsão, micro e nanopartículas.

ABSTRACT

Polyurethanes are a polymeric class with a wide range of applications, such as in the pharmaceutical field, where the use of biodegradable polymers is important and desirable. To obtain a biodegradable material, polyurethane was synthesized from a natural monomer (polyol) derived from the castor oil (*Ricinus communis*), a plant that exists in abundance in Brazil. In order to reduce the use of organic solvents and to produce safe formulations, polymerization methods in aqueous media were employed. Polyurethane particles at the micro and nano scale were synthesized by the suspension-polyaddition technique. The particle diameter decreased with increasing stirring rate and with increasing concentration of poly(ethylene glycol), added as co-monomer. Laser granulometry analysis depicted a particle formation with a wide size distribution and diameter varying from 5 μm to 400 μm , depending on the formulation. Considering these results, the miniemulsion polymerization technique was used to produce nanoparticles with controlled size. The influence of several factors, such as the nature and concentration of surfactant, the hydrophobic agent, and the rate of homogenization on the particle size and formulation yield was evaluated. Increasing amounts of surfactant enhanced formulation yields and reduced particle size. The stirring rate did not affect the yield; however, rates higher than 14000 rpm were necessary to obtain particles with a monomodal size distribution with diameter of ca. 290 nm (determined by light scattering). The polyurethane formation was confirmed by infra-red spectroscopy. The absence of the band at 2200 cm^{-1} of NCO isocyanate group was evidence of a complete reaction. Microscopy analysis revealed a spherical form and the presence of surface porosities on the microparticles, due the poly(ethylene glycol) (PEG) addition. Chemical and enzymatic degradation of the nanoparticles were monitored by light scattering analysis, which confirmed the biodegradable character of polyurethane and disclosed interesting aspects, such as the reduction of the hydrodynamic radius of the nanoparticles during the degradation process. The results showed that the presence of poly(ethyleneglycol) and isocyanate nature in the particles composition has influence on the degradation. For the determination of the system encapsulation capacity, levofloxacin was encapsulated as model in the polyurethane particles and analyzed by fluorescence spectroscopy. The results showed that the poly(ethyleneglycol) addition reduced the encapsulation efficiency from 70% to 20% for particles prepared by suspension-polyaddition technique. On the other hand, an encapsulation efficiency of 48% was reached using the miniemulsion technique to prepare particles with and without PEG, suggesting that the hydrophobic agent act as a barrier preventing the drug release from the polymerization phase. The levofloxacin release profile was investigated in phosphate buffer solution (PBS) pH = 7.4, in presence and absence of enzyme. For the majority of the formulations, the total amount of drug was set free in 48 h. Both, the polymeric matrix degradation and the diffusion influenced the drug release.

keywords: polyurethane, natural polyol, suspension-polyaddition, miniemulsion, micro and nanoparticles.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

O tratamento de uma doença aguda ou crônica é geralmente realizado pela administração de fármacos usando várias formas farmacêuticas tais como comprimidos, cápsulas, supositórios, cremes e pomadas. Estas formas farmacêuticas convencionais são freqüentemente administradas em várias doses, gerando flutuações nos níveis plasmáticos dos fármacos e, conseqüentemente, aparecimento de efeitos colaterais indesejáveis. Neste sentido, novas estratégias têm sido desenvolvidas, permitindo o controle da velocidade de liberação do fármaco, a manutenção da atividade terapêutica por períodos prolongados, ou ainda, o direcionamento do agente terapêutico para um alvo específico de ação (Watts *et al.*, 1990).

Novos sistemas de liberação de fármacos têm sido introduzidos na comunidade biomédica desde a metade da década de 70. Eles cresceram mais que os sistemas convencionais e, baseados em alta tecnologia, gradualmente os substituem. A liberação de um fármaco em um alvo específico de ação é conhecida por ser um processo complexo constituído por múltiplos passos sendo que o objetivo é obter um sistema onde a máxima segurança seja alcançada (Chien, 1990).

Os polímeros desempenham um papel fundamental na constituição destes novos sistemas de liberação, pois eles funcionam como suporte para o fármaco encapsulado constituindo uma barreira polimérica que é capaz de controlar a sua liberação. Há aproximadamente 30 anos atrás os polímeros começaram a ter aplicações biomédicas e farmacêuticas. Após a introdução dos primeiros polímeros sintéticos destinados aos sistemas de liberação de fármacos aumentou o interesse em desenvolver a síntese de polímeros biodegradáveis que dispensam a necessidade de remoção, muitas vezes por intervenção cirúrgica, dos sistemas de liberação após terem liberado o fármaco (Pillai e Panchagnula, 2001).

Um polímero inovador que tem demonstrado potencial na encapsulação de fármacos é a classe dos poliuretanos. Os poliuretanos têm diversas aplicações. Eles são extensamente utilizados na área médica como dispositivos intravasculares, na

reconstituição de menisco, no reparo de cartilagens e ossos (Lelah e Cooper, 1986). Na área farmacêutica estão sendo utilizados como veículo para a liberação sustentada de fármacos. Os poliuretanos têm excelentes propriedades mecânicas, alta capacidade de alongação, boa resistência à abrasão, alta flexibilidade e dureza e boa biocompatibilidade (Jabbari e Khakpour, 2000). A modificação na composição dos poliuretanos pode originar produtos com características bastante diferenciadas e destinadas a aplicações bem específicas como, por exemplo, no caso da síntese de poliuretanos biodegradáveis.

Neste trabalho, um poliuretano baseado num poliálcool de origem natural (óleo de mamona), promissor por ser biodegradável, foi sintetizado e testado quanto a sua capacidade em encapsular um fármaco modelo em sistemas de micro e nanopartículas. Embora existam relatos na literatura a respeito do uso do óleo de mamona para a síntese do poliuretano, a utilização deste poliálcool na síntese de micro e nanopartículas ainda não havia sido descrita.

As micropartículas são estruturas que apresentam diâmetros entre 10 e algumas centenas de micrômetros podendo alcançar, em alguns casos, até 2500 μm . Já as nanopartículas têm diâmetros que variam de 10 a 1000 nm. O aspecto tamanho é muito importante uma vez que este limita a via de administração da forma farmacêutica. Por exemplo, para a via intravenosa só é possível administrar nanopartículas. Por outras vias como a intramuscular e intraperitoneal é possível administrar micropartículas, na forma de suspensão, com até uma centena de micrômetros. Partículas maiores podem ser administradas por via oral.

Várias técnicas são utilizadas na síntese dos poliuretanos, entretanto a maioria delas envolve a utilização de solventes orgânicos, que é um aspecto não desejável, tendo em vista uma aplicação farmacêutica. As técnicas de suspensão-poliadição e miniemulsão foram utilizadas na síntese do poliuretano e preparo das micro e nanopartículas e satisfatoriamente, estas dispensam a utilização de solventes orgânicos, pois a polimerização é feita em meio aquoso.

1.2 Justificativa

Este trabalho foi motivado na utilização do óleo de mamona como polioli natural para sintetizar micro e nanopartículas de poliuretano destinadas a encapsulação de fármacos. Este polioli, fornecido por uma indústria nacional, foi utilizado no intuito de obter um material biodegradável com características apropriadas para sistemas de encapsulação e economicamente viável.

Existe atualmente uma preocupação em não utilizar solventes orgânicos por razões de segurança, saúde e preservação do meio ambiente. Por esta razão, a síntese de polímeros em solventes considerados “saudáveis”, em geral a água, é importante e necessária. Portanto, para a síntese do poliuretano foram selecionadas técnicas de polimerização em meio aquoso. A técnica de suspensão-poliadição foi inicialmente empregada na síntese das partículas dando origem a formulações polidispersas em tamanho, onde micro e nanopartículas existem concomitantemente. No intuito de obter formulações constituídas somente por nanopartículas a técnica de miniemulsão foi utilizada.

1.3 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo preparar micro e nanopartículas de poliuretano a partir de um polioli de origem natural e verificar a capacidade de encapsulação de fármacos e de biodegradabilidade destes sistemas.

1.4 Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar micro e nanopartículas de poliuretano a partir de um polioli de origem natural pelas técnicas de suspensão-policondensação e miniemulsão.
- Investigar os mecanismos de formação das partículas.

- Estudar a influência da agitação e da adição de um segundo diol como co-monomero na formação das partículas pela técnica de suspensão-poliadição.
- Estudar a influência de parâmetros como o tipo de surfactante, concentração de surfactante, tipo de agente hidrofóbico e velocidade de agitação na formação das partículas pela técnica de miniemulsão.
- Avaliar a capacidade das diferentes formulações em encapsular o levofloxacino.
- Avaliar o perfil de liberação do fármaco encapsulado a partir das partículas.
- Avaliar o perfil de degradação das partículas *in vitro* pela técnica de espalhamento de luz.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Poliuretanos

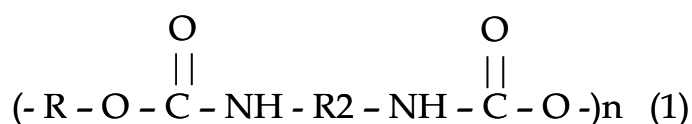
Os poliuretanos (PU) foram primeiramente desenvolvidos por Otto Bayer, em 1937, tornando-se uma fantástica história de sucesso e um negócio de muitos bilhões de dólares no mundo atual. Os PU são produzidos pela reação de poliadição ou policondensação de um isocianato (segmento duro com grupos $N=C=O$) com um diol ou polioliol (segmentos macios com grupos OH) na presença ou não de outros reagentes como extensores de cadeia, catalisadores, agentes de expansão e surfactantes. Os isocianatos podem ser aromáticos ou alifáticos. Os polióis, compostos hidroxilados, podem variar quanto ao peso molecular, natureza química e funcionalidade e podem ser poliéteres, poliésteres ou possuir estrutura hidrocarbônica (Poliuretanos, 2003). Se o diol possuir um tamanho pequeno é chamado de extensor de cadeia e em associação às moléculas de diisocianato reforça a estrutura do polímero. As propriedades do polímero final estão relacionadas à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio inter cadeias que se estabelecem entre os segmentos rígidos formados pelos diisocianatos e o extensor de cadeia, aumentando localmente a densidade dos grupos CO e NH (Brosse, *et al.* 1995). A natureza química bem como a funcionalidade dos reagentes deve ser escolhida de acordo com as propriedades finais desejadas. Esta flexibilidade possibilita a obtenção de materiais com diferentes propriedades físicas e químicas e faz com que os poliuretanos ocupem posição importante no mercado mundial de polímeros sintéticos de alto desempenho. Na realidade, os poliuretanos estão presentes em muitos aspectos da vida moderna, sendo usados na área médica, automotiva, industrial, e os produtos derivados vão desde fibras, borrachas, espumas até pele sintética. Apresentam resistência à degradação pela água, óleos e solventes (Howard, 2002). Entretanto, quando a solubilidade em água é um requisito importante, modificações na sua superfície por meio de oxidações e enxertos de monômeros polares podem torná-lo mais hidrofílico. O aumento da hidroflicidade destes polímeros pode melhorar a adesão de filmes metálicos, ajudar na imobilização de

enzimas, aumentar a compatibilidade sangüínea e reduzir danos de lentes de contato ao tecido intra-ocular (Pulat e Babayigit, 2001).

Nos PU a maioria das reações dos isocianatos ocorre através da adição à dupla ligação C=N. Um centro nucleofílico contendo um átomo de hidrogênio ativo ataca o carbono eletrofílico e o átomo de hidrogênio ativo é então adicionado ao nitrogênio. Grupos aceptores de elétrons, ligados ao grupamento NCO, aumentam sua reatividade e os doadores a reduzem, e por isso, os isocianatos aromáticos são mais reativos do que os alifáticos. A ocorrência de impedimento estérico tanto no grupo isocianato, quanto no composto com hidrogênio ativo provocam diminuição na reatividade (Poliuretanos, 2003).

Em termos de produtividade industrial, na ausência de catalisadores, o grupo isocianato reage lentamente com álcoois, água e ele próprio. A escolha do catalisador para a manufatura dos PU é normalmente dirigida para a obtenção de um perfil adequado entre as diversas reações que podem ocorrer durante os processos de fabricação. Diferentes tipos de catalisadores são usados para a reação do isocianato com água e com polióis, os quais podem ser aminas terciárias alifáticas ou aromáticas, e compostos organometálicos. Os organometálicos têm efeito muito forte na reação de formação do PU, entre o isocianato e o álcool e fraco na reação de expansão, entre o isocianato e água. Por sua vez, aminas terciárias têm efeito catalítico forte, tanto na reação de formação do PU, quanto na reação de expansão (Poliuretanos, 2003).

A fórmula estrutural (1) mais simples de um poliuretano linear pode ser representada por :



onde, n é o número de repetições e R₂ é a cadeia hidrocarbônica. R representa um hidrocarboneto contendo o grupo OH. Os diisocianatos são empregados na produção do PU porque reagem com componentes contendo hidrogênio ativo (Howard, 2002).

É possível obter infinitas variações de produtos pela combinação de diferentes tipos de matérias-primas como polióis, isocianatos e aditivos. Centenas de aplicações foram desenvolvidas para atender diversos segmentos do mercado. Observando-se as publicações científicas, percebe-se que a pesquisa envolvendo poliuretanos, na sua grande maioria, estuda a influência da sua composição sobre diversos aspectos.

Na área farmacêutica, esta tendência também é observada quando o alvo da pesquisa são os poliuretanos. Shantha e Rao (1993) preparam microesferas de poliuretano pelo método de condensação/polimerização utilizando o 2,4-tolueno diisocianato (TDI) e o metileno difenil diisocianato (MDI). Os autores constataram diferenças na morfologia das partículas, sendo que as microesferas produzidas com MDI apresentaram-se mais porosas quando comparadas àquelas produzidas com TDI. Entretanto, as microesferas de TDI apresentaram menor tamanho de partícula. O azul de bromotimol foi utilizado como modelo nos estudos de liberação *in vitro* e os resultados indicaram que as microesferas de MDI conduziram à liberação mais rápida do composto encapsulado. Este resultado foi atribuído à morfologia das partículas; as microesferas de MDI mais porosas teriam facilitado a liberação quando comparadas às microesferas de TDI de superfície mais compacta. Estes autores também verificaram que a distribuição de tamanhos não foi grandemente influenciada pela alteração na proporção da fase dispersa em relação à fase dispersante.

Poliuretanos lineares foram sintetizados pela reação entre um macrodiol, um diisocianato alifático, usando o etanodiol como extensor de cadeia, num estudo realizado por Brosse *et al.* (1995). A escolha das matérias-primas foi efetuada levando-se em consideração a biocompatibilidade e as propriedades físico-químicas e mecânicas do polímero. Um poliuretano solúvel em solvente orgânico, destinado à microencapsulação pela técnica de evaporação do solvente, foi obtido. Os autores verificaram que a massa do macrodiol não teve influência determinante sobre a massa final do polímero. Este resultado foi atribuído a maior reatividade dos grupamentos isocianatos.

Poliuretanos segmentados foram produzidos por Lan *et al.* (1996). Foram utilizados poli(etileno glicol), poli(propileno glicol) e poli(óxido de etileno)-

poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (Pluronic) associados a diferentes diisocianatos como MDI, isoforona diisocianato (IPDI) e diciclohexilmetano diisocianato (HMDI) e como extensores de cadeia o 1,4 butanodiol e etilenodiamina.

Hong e Park (1999) prepararam cápsulas de poliuréia por emulsão polimerização utilizando blendas de IPDI, um diisocianato alifático com TDI, um diisocianato aromático. O efeito do tipo de diisocianato no tamanho médio da partícula, distribuição granulométrica e propriedades térmicas foi investigado. O tamanho médio das partículas aumentou com o aumento da concentração de TDI na amostra, indicando que diisocianatos alifáticos geram partículas de tamanho menor. As microcápsulas preparadas somente com TDI apresentaram uma parede mais espessa, enquanto as microcápsulas preparadas somente com IPDI apresentaram maior estabilidade térmica.

Jabbari e Khakpour (2000) investigaram o efeito de agentes extensores de cadeia sobre a porosidade e perfil de liberação a partir das microesferas de poliuretanos preparadas pelo método de suspensão/policondensação. Metileno difenil diisocianato, poli(etileno glicol) 400 e 1,4-butadienol foram empregados na preparação das microesferas. Este último foi usado como extensor de cadeia, objetivando aumentar a proporção de segmentos macios da rede polimérica. Neste trabalho, os autores verificaram que a porosidade foi significativamente afetada pela quantidade de 1,4-butadienol adicionada, sendo que, o tamanho dos poros diminuiu quando a concentração do agente extensor foi aumentada para 50%. Concentrações maiores inibiram a formação de poros.

Tang *et al.* (2003) sintetizaram um policarbonato baseado em poliuretanos, variando o conteúdo e o tipo de segmentos duros através da utilização de três diferentes diisocianatos: o hexano diisocianato (HDI), o metileno difenil diisocianato (MDI) e o diciclohexilmetano diisocianato (HMDI). Os autores verificaram que a degradação hidrolítica pela enzima colesterol estearase foi influenciada pelo conteúdo e pelo tipo de diisocianato utilizado (HDI > HMDI > MDI). A diferença na estabilidade destes materiais segundo a estrutura do diisocianato está associada ao grau de ligações de hidrogênio entre os diferentes segmentos e os tipos específicos de grupamentos químicos expostos na superfície.

Durrieu *et al.* (2004) prepararam dispersões aquosas de poli(uretano-urea) e analisaram a influência da natureza e da proporção dos grupos uretano na dispersão e nas propriedades do polímero. Os autores relataram que o emprego de diisocianatos alifáticos em dispersões aquosas é preferível em relação aos diisocianatos aromáticos devido a sua menor reatividade em água. Num estudo mais recente, Durrieu e Gandini (2005) estudaram a influência da estrutura e da massa molar do macrodiol sobre a dispersão e propriedades do polímero. Foi verificado que a massa molar do diol interfere no tamanho de partícula e que o emprego de diol hidrofílico pode reduzir o tamanho de partícula.

Na literatura encontram-se exemplos de estudos envolvendo a encapsulação de fármacos. Hidrogéis de poliuretanos foram preparados pela reação de diisocianatos com óxido de etileno anfifílico e triol, visando à liberação do cloridrato de propranolol (Van Bos e Schacht, 1987).

Subhaga *et al.* (1995) utilizaram um poliuretano alifático biomédico, Tecoflex®, para avaliar a liberação da teofilina a partir de microesferas. As partículas apresentaram formato esférico e uma taxa de encapsulação de 35%.

Kreitz *et al.* (1996) fabricaram e caracterizaram membranas microporosas de poliuretano contendo microesferas poliméricas. Estes compósitos foram preparados usando Cardiothane® 51, um poliuretano de grau biomédico, e microesferas de poli(ácido lático-co-glicólico). Os resultados indicaram o potencial destas estruturas para liberação localizada de substâncias bioativas.

Davaran e Entezami (1997) sintetizaram conjugados de poliuretano e ibuprofeno, reagindo poli(etileno glicol) com HDI e o ibuprofeno; o estudo de liberação revelou que o fármaco foi liberado através da hidrólise das ligações ésteres formadas com o poliuretano. O conjugado ibuprofeno-poliuretano teve longa duração de ação, devido à lenta liberação do fármaco.

Iskakov *et al.* (1998) utilizaram poliuretanos para encapsular fármacos antitumorais como tiofosfamida e vincristina. Os pesquisadores verificaram que a liberação dos fármacos apresentou uma cinética de primeira ordem e que o mecanismo de liberação foi controlado por difusão.

Kim *et al.* (2000) desenvolveram matrizes de poliuretanos pelo método de dissolução e evaporação lenta do solvente, incorporando nesta matriz um antibiótico que teve como finalidade prevenir a adesão e o crescimento bacteriano.

Yamaoka *et al.* (2000) utilizaram poliuretanos contendo grupo azo como material de revestimento (filme) de um fármaco para sua liberação específica no cólon; o grupo azo é metabolizado pela azo redutase, enzima produzida pela bactéria intestinal e, deste modo, o fármaco é liberado no próprio sítio de ação.

Brosse *et al.* (2000) prepararam microcápsulas de poliuretano e álcool polivinílico modificados por estearil isocianato pelo processo de evaporação do solvente, para encapsular moléculas alergênicas. A eficiência da encapsulação, dependendo do agente encapsulado, variou de 22 a 45%.

Rojas *et al.* (2000) sintetizaram poliuretanos contendo anticorpos bioativos para reduzir a adesão bacteriana, por meio de um mecanismo imune. Este sistema com liberação de agente antimicrobiano é interessante para o revestimento de catéteres, sendo promissores na redução de infecções associadas ao uso desses dispositivos.

Pesquisas que visam o desenvolvimento de poliuretanos biodegradáveis pela adição de componentes de origem natural datam de bastante tempo. Bennett *et al.* (1967) relataram que uma formulação de espuma rígida de poliuretano pode ser constituída com 10-40% de amido. Este estudo também demonstrou que as espumas contendo amido são mais resistentes ao calor e são mais rapidamente atacadas por microorganismos do solo. Ge *et al.* (2002) prepararam espumas de poliuretano biodegradável como material de revestimento para a liberação controlada de fertilizantes, utilizando extrato da casca de *Acácia mearnsi* e amido de milho. O uso do óleo de mamona na obtenção de diferentes formas de poliuretanos tem sido descrito por vários autores como, por exemplo, elastômeros (Kirk-Othmer, 1979; Quipeng *et al.* 1990; Yeganeh e Mehdizadeh, 2004), adesivos e revestimentos (Yeadon *et al.* 1959; Trevino e Trumbo, 2002; Somani *et al.* 2003), filmes (Patel e Suthar, 1988; Xie e Guo, 2002; Jayabalan e Lizymol, 1997) espumas (Ehrlich *et al.* 1959; Ogunniyi *et al.*, 1996) micro e nanopartículas (Zanetti-Ramos *et al.* 2005). Trân e Pham (1997) realizaram a caracterização estrutural do óleo de mamona.

Poliuretanos biodegradáveis foram utilizados na fabricação de filmes plásticos, num estudo realizado por Lee *et al.* (2001). Os poliuretanos foram sintetizados a partir do poli(butileno succinato) (PBS, M_n 1650), poli(etileno glicol) (PEG, M_n 1000) e 4,4-diciclohexilmetano diisocianato, usando 1,4 butanodiol como extensor de cadeia. Os filmes foram hidroliticamente degradados mais rapidamente em solução de NaOH 3% a 37°C, com perda de massa entre 30 e 60% em dois dias, dependendo do conteúdo de PEG e de segmentos duros. Com o aumento no conteúdo de PEG, a degradação hidrolítica dos copolímeros aumentou, mas a temperatura de fusão e a cristalinidade diminuíram. Por outro lado, os poliuretanos contendo somente PBS como segmentos macios apresentaram uma velocidade de degradação mais lenta em condições idênticas.

Mahkam e Sharifi-Sanjani (2003) prepararam poliuretanos biodegradáveis pela reação entre diisocianato e poli(etileno glicol) com morfina para prolongar a atividade do fármaco, liberando-o lentamente da matriz de poliuretano. Resinas de poliuretanos têm sido empregadas para se depositarem nos capilares bloqueando o suprimento sanguíneo e impedindo o crescimento de tumores sólidos.

Entre os materiais sintéticos, os poliuretanos têm sido considerados como o material mais apropriado para várias aplicações biomédicas, em função das suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e controle de microestrutura e propriedades. Um aspecto importante para a utilização segura dos poliuretanos na área médica é a avaliação da citotoxicidade, que é o teste preliminar na determinação da biocompatibilidade. Sheikh (2003) avaliou a citocompatibilidade de filmes de poliuretano através de testes em culturas de células. Na presença de segmentos duros (isocianatos), a quantidade de células aderidas é diminuída. Os resultados demonstraram que o filme de poliuretano não tem influência relevante sobre a toxicidade celular.

Outro emprego interessante dos poliuretanos pode ser na área de remediação. Kim *et al.* (2003) estudaram o efeito de nanopartículas anfifílicas de poliuretano na absorção e desorção do fenantreno em materiais aquáticos. As nanopartículas anfifílicas de poliuretano formaram dispersões estáveis na fase aquosa e extraíram

95% do poluente hidrofóbico fenantreno, demonstrando alta eficiência no processo de remediação aquática.

Embora exista um número significativo de trabalhos envolvendo o emprego de poliuretanos na encapsulação de substâncias ativas verifica-se que uma grande parte encontra-se na forma patenteada como é o caso da patente norte-americana associada a um adesivo cutâneo à base de poliuretano contendo nicotina que objetiva ajudar as pessoas a pararem de fumar (Baker, 1989). Em relação a dispersões de poliuretano, mais de 1000 patentes foram depositadas nas últimas cinco décadas (Li *et al.* 2005). Isto evidencia o potencial da classe dos poliuretanos no desenvolvimento de produtos comercialmente viáveis, seja pelo aspecto econômico ou pela flexibilidade de aplicações em virtude da sua composição, como vimos anteriormente. Esta vasta possibilidade de variáveis demonstra que, em se tratando de poliuretanos, as pesquisas encontram-se apenas no início e que os temas pertinentes a este assunto podem ser considerados praticamente inesgotáveis.

2.2 A Encapsulação de fármacos

Desde a década de 1980, vários sistemas de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos para melhorar a eficiência dos agentes ativos e minimizar efeitos tóxicos adversos (Hans e Lowman, 2002). A encapsulação passou a ser uma opção interessante como estratégia de liberação de fármacos, em função da possibilidade de reduzir a toxicidade sistêmica, proteger moléculas que são vulneráveis à degradação em ambiente fisiológico, induzir através de propriedades específicas a liberação controlada ou mesmo mascarar um sabor indesejável.

Recentemente, nanopartículas poliméricas atraíram atenção, como potenciais dispositivos para liberação controlada de fármacos devido a sua habilidade para direcionar a liberação em órgãos ou tecidos específicos, como carreadores de DNA na terapia gênica e liberar proteínas, peptídeos e genes. As nanopartículas poliméricas também ajudam a aumentar a estabilidade de fármacos e proteínas (Soppimath *et al.*

2001) e podem liberar fármacos em várias áreas do corpo por períodos prolongados (Hans e Lowman, 2002).

O fármaco é dissolvido, encapsulado ou ligado a matriz polimérica e dependendo do método de preparação podem ser obtidas nanoesferas ou nanocápsulas. Nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o fármaco está confinado na cavidade da partícula e envolvido por uma única camada polimérica de espessura variável, enquanto que nanoesferas são sistemas matriciais em que o fármaco está fisicamente e uniformemente disperso (Soppimath *et al.* 2001). Esta mesma classificação se aplica também às micropartículas (Figura 1).

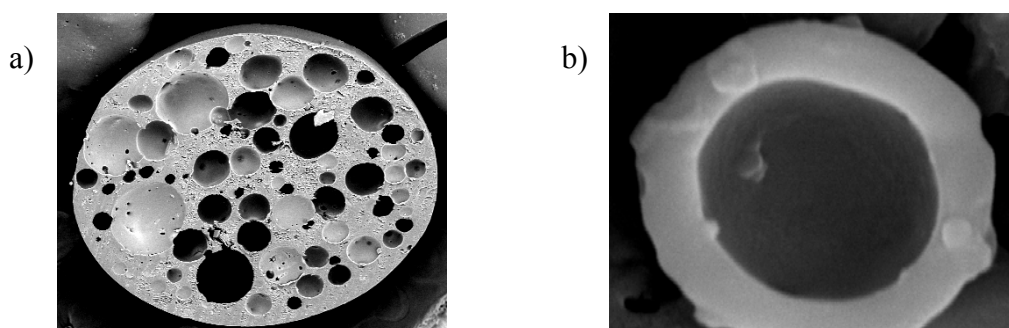


FIGURA 1. Representação de a) esfera e b) cápsula.

As nanopartículas apresentam vantagens sobre as micropartículas porque podem ser administradas por via intravenosa. Os menores capilares do corpo têm 5-6 μm de diâmetro, então partículas menores que 5 μm podem ser administradas sem formarem agregados e sem risco de ocasionar embolia. Além disso, as nanopartículas podem ser administradas por várias vias, liberar fármacos hidrofílicos, hidrofóbicos, proteínas, vacinas, moléculas biológicas e ser formuladas para liberar em alvos específicos, como o sistema linfático, cérebro, pulmão, fígado, ou ainda permanecer por longos períodos na circulação sistêmica. Entre as características mais importantes das nanopartículas estão, o tamanho, a eficiência de encapsulação e as características de liberação (Hans e Lowman, 2002).

Utilizando-se polímeros na encapsulação, o tamanho das partículas pode ser controlado, podendo-se obter micro ou nanopartículas (Whelan, 2001). Vários

polímeros têm sido testados e podem efetivamente conduzir à liberação do fármaco em um alvo específico e assim, aumentar o benefício terapêutico e reduzir os efeitos adversos. A liberação controlada de agentes farmacologicamente ativos no local específico da ação, numa velocidade ótima, tem sido o maior objetivo no desenvolvimento destes sistemas.

As propriedades físicas, mecânicas e farmacocinéticas podem ser manipuladas pela variação nos polímeros utilizados e também pela incorporação de outros materiais na estrutura como lipídeos, enzimas, polietilenoglicóis e outros grupos como aminas e hidroxilas que permitem estabelecer uma modificação química na superfície (Whelan, 2001). Os polietilenoglicóis apresentam propriedades importantes na microencapsulação de fármacos, destacando a sua capacidade como agente formador de poros, modulando desta maneira, a liberação do fármaco através das partículas poliméricas (Zanetti *et al.* 2002).

Os formadores de poros são compostos biologicamente inativos e solúveis em água que podem ajudar na liberação de fármacos pela formação de canais na matriz polimérica. D-manitol, PEG 1450 e BSA foram escolhidos como formadores de poros por serem altamente solúveis em água e por possuírem baixa atividade biológica e toxicidade num estudo realizado por Kim *et al.* (2000). Os autores verificaram que a velocidade de liberação e a quantidade total de fármaco liberado a partir das matrizes de poliuretano podem ser controladas pela variação da proporção do agente formador de poros e do tamanho das partículas.

A maioria dos trabalhos sobre micro e nanopartículas relata o emprego de polímeros tais como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido -glicólico) (PLG), poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA), poli(cianoacrilato) (PCA) e mais recentemente o emprego de quitosanas, gelatina, alginato de sódio e outros polímeros biodegradáveis e hidrofílicos (Soppimath *et al.* 2001). A seleção de um polímero é uma tarefa desafiadora, em decorrência da diversidade de estruturas e requer o entendimento de propriedades que estão associadas a uma função química, interfacial, mecânica ou biológica. A escolha de um polímero, em adição as suas propriedades físico-químicas, é dependente também das suas características toxicológicas. Propriedades de superfície tais como hidrofilicidade, rugosidade entre outras podem governar, por

exemplo, a compatibilidade sangüínea e o perfil de degradação. Outras propriedades como adesão, peso molecular e solubilidade podem interferir no mecanismo de liberação (Pillai e Panchagnula, 2001).

2.2.1 Técnicas de preparação de micro e nanopartículas

Existem várias técnicas de preparação de micro e nanopartículas, cuja seleção baseia-se no tipo de fármaco e na via de liberação desejada.

As partículas poliméricas podem ser preparadas por métodos físicos e químicos. A estrutura das microesferas preparadas por métodos físicos tais como separação de fases, evaporação do solvente e secagem em tone de aspersão (spray drying) tem sido extensivamente estudada. Os métodos químicos incluem emulsão, suspensão, precipitação, dispersão, polimerização interfacial e suspensão policondensação ou poliadição, miniemulsão (Jabbari e Khakpour, 2000, Landfester, 2001).

Convencionalmente as partículas são preparadas principalmente por dois métodos: a dispersão de polímeros pré-formados (métodos físicos) e a polimerização de monômeros (métodos químicos). O método de dispersão de polímeros pré-formados geralmente utiliza solventes orgânicos e se dividem em várias técnicas específicas como a evaporação do solvente; emulsificação espontânea e difusão do solvente; emulsificação salting-out e difusão e fluído supercrítico. Já os métodos de polimerização compreendem várias técnicas que envolvem, principalmente, reações de policondensação ou poliadição. As técnicas de polimerização por policondensação ou poliadição, para formação de partículas, podem ser divididas em duas principais categorias, a polimerização normal e a polimerização interfacial. Na polimerização normal os monômeros estão presentes em uma única fase, já na polimerização interfacial os monômeros estão presentes em duas fases imiscíveis, sendo que o mecanismo de formação é muito diferente nos dois sistemas (Arshady, 1989).

Partículas de poliuretano têm sido sintetizadas por várias técnicas tais como suspensão-policondensação (Jabbari e Khakpour, 2000), suspensão-poliadição (Zanetti-Ramos *et al.* 2005), policondensação interfacial combinada com emulsificação

espontânea (Bouchemal *et al.* 2004), dispersão em dióxido de carbono supercrítico (Chambon *et al.* 2005), miniemulsão poliadição (Tiarks *et al.* 2001) e policondesação interfacial em miniemulsão (Torini *et al.* 2005).

Arshady e George (1993) descrevem a preparação de partículas com resinas de poliuretano por meio de uma técnica que consistiu na agitação da fase monomérica num meio de polimerização aquoso, numa alta velocidade por 5 minutos e depois por mais um tempo a 200 rpm. A mistura foi aquecida a 50°C por 1h e a 75°C por 2h. A temperatura foi aumentada para 86°C para destilação azeotrópica da mistura de água e tolueno por 1h e microsferas de poliuretano apresentando diâmetro médio de 100 µm foram obtidas.

Brosse *et al.* (1994) sintetizaram poliuretanos destinados à microencapsulação, através da ação de monoisocianato sobre segmentos de álcool polivinílico resultando num polímero solúvel em meio orgânico para a encapsulação de compostos pelo método de evaporação do solvente.

Os polímeros condensados são usualmente menos empregados para aplicações químicas por razões de funcionalidade e/ou estabilidade. Por outro lado, muitos polímeros policondensados (poliésteres, poliamidas, poliuretanos, etc.) são basicamente mais biocompatíveis e/ou biodegradáveis, e como tal são mais destinados para aplicação biomédica e farmacêutica (Arshady, 1989).

As técnicas de suspensão-poliadição e miniemulsão, utilizadas neste trabalho para a preparação das partículas, envolvem a síntese do poliuretano através da reação de poliadição e serão descritas a seguir.

2.2.1.1 Suspensão-Poliadição

Na técnica de suspensão-poliadição, a polimerização ocorre através do modo normal e os monômeros ou a fase que contém os monômeros é insolúvel no meio de polimerização. A fase monomérica é dispersa no meio de polimerização na forma de pequenas gotas por meio de agitação e com a utilização de tensoativo. O meio de polimerização pode ser a água ou outro líquido que contenha o tensoativo. Nestas

condições, as gotas de monômero são diretamente convertidas em partículas poliméricas apresentando aproximadamente o mesmo tamanho. Micro e nanopartículas são produzidas por esta técnica.

O sucesso da produção de micro e nanopartículas pela técnica de suspensão-poliadição está relacionado ao uso de um tensoativo adequado. A principal função do tensoativo é formar um filme muito fino ao redor das gotas de monômero/partículas poliméricas para reduzir a tensão superficial e dissipar o impacto de energia durante as colisões, impedindo a precipitação. Entretanto, a estabilidade geral de um sistema disperso depende também de vários outros fatores operacionais que são usualmente alcançados empiricamente (Arshady, 1989).

Em particular, o tamanho médio das partículas sintetizadas pela técnica de suspensão-poliadição é controlada, entre outros fatores, pelo tipo e concentração do tensoativo, pelo tipo e velocidade de agitação e pela concentração de monômeros na fase monomérica. O tamanho das partículas pode ser reduzido pela redução da fração de volume entre a fase monomérica e o meio de polimerização. A distribuição de tamanho também é altamente dependente da configuração do recipiente de polimerização e da uniformidade da agitação durante a homogeneização. Em geral, quanto mais simétrica for a configuração do recipiente e a agitação, mais uniforme será a distribuição granulométrica das partículas (Arshady, 1989).

Microcápsulas de poliuréia contendo o pesticida metil-paration foram produzidas pela técnica de suspensão-policondensação através de uma mistura de poli(isocianato de metileno-propileno), tolueno diisocianato e metil-paration dissolvidos num solvente orgânico. Esta mistura orgânica foi suspensa em água contendo um estabilizante. Em contato com a água, os grupos isocianatos são parcialmente hidrolisados e convertidos em grupos amino. Estes grupos aminos então iniciam a policondensação com os grupos isocianatos que ainda não reagiram. O tamanho, o conteúdo de pesticida e as características de liberação das microcápsulas são controlados pelo ajuste na velocidade de agitação e/ou na composição da fase monomérica (Arshady, 1989).

Bouchemal *et al.* (2004) sintetizaram nanopartículas de poliuretano e polieteruretano pela técnica de policondensação interfacial combinada com

emulsificação espontânea, para encapsular o α -tocoferol, um antioxidante muito utilizado em aplicações cosméticas. Os poliuretanos foram obtidos da condensação de diisocianato e polioliol (1,2-etanodiol, 1,4-butanodiol, 1,6-hexanodiol). Os copolímeros polieteruretanos foram obtidos pela substituição dos dióis por oligômeros de poli(etileno glicol) de massa molar 200, 300, 400 e 600. A massa molar dos dióis e polióis influenciou consideravelmente as características das nanocápsulas. O aumento da massa molar dos polióis aumentou o diâmetro médio das partículas e levou à formação de uma população de aglomerados de partículas. A eficiência de encapsulação aumentou com o aumento do comprimento da cadeia do polioliol.

Na policondensação interfacial existe a possibilidade dos diisocianatos reagirem com a água e do fármaco ou substância a ser encapsulada se difundir para a fase contínua, reduzindo a eficiência de encapsulação (Frère *et al.* 1998).

Jabbari e Khakpour (2000) investigaram o efeito do agente extensor de cadeia sobre a porosidade e o comportamento de liberação de microesferas de poliuretano preparadas pelo método de suspensão policondensação em dois passos, usando o MDI como isocianato, o PEG 400 como diol e o 1,4-butanodiol como extensor de cadeia.

2.2.1.2 Miniemulsão

A técnica de miniemulsão foi desenvolvida há aproximadamente 30 anos e vem sendo estudada com interesse, pois a polimerização é feita em meio aquoso, dando origem a nanopartículas de tamanho controlado.

A miniemulsão é definida como dispersões estáveis de gotas de óleo em meio aquoso, com tamanhos que variam de 50 a 500 nm e obtida geralmente por uma eficiente homogeneização de um sistema que contenha o óleo, a água, o surfactante e um co-estabilizador (ou agente hidrofóbico) (Sudol *et al.* 1997). Na polimerização por miniemulsão o agente hidrofóbico age como um supressor da troca de massa entre as gotas de óleo pelas forças osmóticas (the Ostwald ripening - Efeito Ostwald). O efeito de Ostwald está relacionado com a instabilidade da emulsão, onde partículas

grandes crescem às custas das menores em função da troca de massa, portanto o número de partículas diminui e o tamanho aumenta. O agente hidrofóbico evita o efeito de Ostwald. O fundamento da miniemulsão consiste em iniciar a polimerização em cada pequena gota estabilizada, também chamada "nanoreator". Na polimerização por miniemulsão, a formulação apropriada, quando cuidadosamente preparada, resulta em partículas que têm quase o mesmo tamanho que as gotas iniciais (Landfester *et al.* 2000). Fatores tais como o tipo de homogeneização e a adição do agente hidrofóbico são importantes na miniemulsão (Landfester, 2001).

Vários polímeros têm sido sintetizados pela técnica de miniemulsão, especialmente o poliestireno. A síntese de poliuretano por miniemulsão também é descrita na literatura (Barrère e Landfester, 2003).

Tiarks *et al.* (2001) usaram como monômeros a isoforona diisocianato (IPDI) e o 1,12-dodecanediol para sintetizar dispersões de poliuretano por poliadição em miniemulsão obtendo partículas com tamanho em torno de 200 nm. Os autores analisaram a influência da concentração do lauril sulfato de sódio e do hexadecano usados respectivamente como surfactante e agente hidrofóbico.

Torini *et al.* (2005) sintetizaram nanocápsulas de poliuretano com 200 nm de diâmetro pela técnica de policondensação interfacial em miniemulsão utilizando como monômeros o IPDI e o 1,6-hexanodiol. Os autores estudaram a influência do tipo e concentração do surfactante e da concentração do agente hidrofóbico hexadecano.

Li *et al.* (2005) sintetizaram nanopartículas híbridas de poliuretano/acrilato via miniemulsão. Landfester *et al.* (2005) também sintetizaram nanopartículas híbridas constituídas por poli(siloxane)/uretano através da poliadição em miniemulsão.

2.3 Biodegradação

Um grande número de polímeros biodegradáveis tem sido sintetizado recentemente e alguns microorganismos e enzimas capazes de degradá-los têm sido

identificados. A poluição por polímeros sintéticos tem assumido proporções perigosas e para solucionar este problema vem-se tentando torná-los biodegradáveis, por meio de modificações em suas estruturas (Lee *et al.* 2001).

A biodegradação é um processo natural pelo qual materiais orgânicos/químicos são convertidos a compostos mais simples no meio ambiente, mineralizados e redistribuídos através de ciclos elementares, como o ciclo do carbono e nitrogênio.

Plásticos biodegradáveis podem ser definidos, segundo a American Society for Testing and Materials (ASTM), como materiais que sofrem cisões de ligações na cadeia principal do polímero através de forças químicas, biológicas ou físicas no meio ambiente, a uma velocidade que leva a sua fragmentação ou desintegração. Num aspecto mais geral, a biodegradação é definida como um processo onde bactérias, fungos e enzimas consomem uma substância como fonte de alimentação até que a forma original desapareça que sob condições apropriadas de umidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio é um processo relativamente rápido (Chandra e Rustgi, 1997).

Polímeros biodegradáveis são úteis para várias aplicações médicas, agrícolas, liberação de fármacos e materiais de embalagem.

Biopolímeros são polímeros formados na natureza durante o ciclo de crescimento de alguns organismos, e por isto também são referenciados como polímeros naturais. Sua síntese geralmente envolve crescimento da cadeia por polimerização dos monômeros ativados, catalisados por enzimas, que são tipicamente formados dentro de células por processo metabólico complexo. Como exemplos de biopolímeros podemos citar: polissacarídeos (amido, celulose, quitosana, ácido algínico), polipeptídeos de origem natural (gelatina) e poliésteres bacterianos (Chandra e Rustgi, 1997).

Polímeros biodegradáveis sintéticos que contenham ligações hidrolisáveis ao longo da cadeia polimérica, por exemplo, ligações amida, éster, uréia e uretano são susceptíveis a biodegradação por microorganismos e enzimas hidrolíticas (Sullivan e Birkinshaw, 2002). Os poliuretanos podem ter grupos estruturais característicos de poliésteres e poliamidas e possuem ligações hidrolisáveis. Em geral a biodegradabilidade de poliuretanos foi avaliada por ser dependente da condição do

prepolímero ser um poliéster ou um poliéter. Os poliuretanos baseados em poliéter são resistentes à biodegradação enquanto que poliuretanos constituídos com poliéster são susceptíveis à degradação (Chandra e Rustgi, 1997). A degradação microbiana de poliuretanos é dependente de muitas propriedades do polímero tais como a orientação molecular, cristalinidade, grau de reticulação e grupos químicos presentes nas cadeias moleculares que determinam a acessibilidade aos sistemas enzimáticos. A degradação microbiana do poliéster poliuretano parece ocorrer principalmente devido à hidrólise das ligações ésteres pelas enzimas esterases (Howard, 2002). Muitos microorganismos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus funeigatus*, *Fusarium solanii*, *Cryplococcus lacirentii*, etc.) e enzimas (papaína, esterase, etc.) são efetivos na degradação de poliuretanos. Já é conhecido que os poliuretanos derivados de diisocianatos alifáticos são degradados mais rapidamente que àqueles derivados de diisocianatos aromáticos (Chandra e Rustgi, 1997).

A regularidade na estrutura do polímero sintético permite que a cadeia polimérica se empacote facilmente resultando na formação de regiões cristalinas que limitam a acessibilidade das cadeias poliméricas aos agentes degradativos (Howard, 2002). Em outras palavras, os polímeros sintéticos geralmente têm unidades de repetição curtas e esta regularidade aumenta a cristalização, fazendo com que os grupos hidrolisáveis fiquem inacessíveis para as enzimas. A degradação química seletiva de amostras poliméricas semicristalinas apresenta certas mudanças de características. Durante a degradação, a cristalinidade da amostra aumenta rapidamente o que é atribuído ao eventual desaparecimento das porções amorfas. Microscopia eletrônica de varredura mostrou que a degradação por fungos de um filme de poli(caprolactona) parcialmente cristalino acontece de maneira seletiva, sendo que a região amorfa é degradada antes que a região cristalina. Esta seletividade pode ser atribuída ao empacotamento menos ordenado das regiões amorfas que permite mais facilmente o acesso de enzimas nas cadeias poliméricas. O tamanho, forma e número de cristalitos têm um pronunciado efeito sobre a mobilidade das regiões amorfas, afetando desta forma a velocidade de degradação (Chandra e Rustgi, 1997).

Muitos estudos relacionados com o efeito do peso molecular sobre a biodegradação têm sido realizados. A maioria das diferenças observadas pode ser atribuída ao limite de detecção das mudanças durante a degradação ou mais freqüentemente, as diferenças na morfologia e hidrofiliicidade /hidrofobicidade das amostras e variação no peso molecular de polímeros. Microorganismos produzem ambas exoenzimas (degradam polímeros a partir de grupos terminais) e endoenzimas (degradam polímeros randomicamente ao longo da cadeia). A degradação é muito lenta em parafinas, poli(etileno glicóis) e alquil benzenos lineares quando a cadeia polimérica excede 24 a 30 átomos de carbonos. Esta conclusão deve-se a estudos que verificaram que plásticos baseados em alcanos com massa molar que excede 400-500 daltons (i.e. maiores que 30 átomos de carbono) podem ser degradados em moléculas pequenas por fotodegradação, ou outro meio químico ou enzimático antes da biodegradação (Chandra e Rustgi, 1997).

Como agentes da biodegradação encontram-se os microorganismos (fungos e bactérias) e enzimas. As enzimas são essencialmente catalisadores biológicos, com a mesma ação dos catalisadores químicos. Pela diminuição na energia de ativação podem induzir ao aumento na velocidade de reação em um meio desfavorável para reações químicas, por exemplo, água a pH 7 e 30°C. Na presença de enzimas, a velocidade de reação aumenta 10^8 a 10^{20} vezes. A maioria das enzimas são proteínas que contém uma cadeia polipeptídica com uma complexa estrutura tridimensional a qual está relacionada à sua atividade. Portanto, a biodegradação pode ser de origem enzimática, química ou microbiana e estes podem operar separadamente ou simultaneamente e são freqüentemente influenciados por muitos outros fatores. Alguns fatores que afetam a biodegradação dos polímeros são citados a seguir:

- Estrutura química e composição;
- Fatores físico-químicos (pH, força iônica);
- Fatores físicos (tamanho, forma, defeitos na cadeia);
- Morfologia (amorfa, semicristalina, cristalina);
- Mecanismo de degradação (enzimática, hidrólise, microbiano)
- Distribuição de peso molecular;

- Condições de processo e esterilização;
- Condições de estocagem;
- Via de administração e local de ação.

Polímeros que contêm somente ligações carbono não apresentam ou apresentam muito pouca susceptibilidade para reações de degradação catalisada por enzimas, especialmente se tiverem alta massa molar. Várias alterações podem ser feitas para permitir o ataque enzimático na cadeia polimérica. Destacam-se a inserção de grupos funcionais na cadeia principal, especialmente grupos ésteres que podem ser clivados por hidrólise, e a inserção de grupos funcionais dentro ou sobre a cadeia principal que podem sofrer reações fotoquímicas de clivagem na cadeia, tipicamente grupos carbonil. Alguns ligantes fracos permitem a degradação controlada numa amostra de alta massa molar ou polímero hidrofóbico já que são consumidos por microorganismos no processo de degradação (Chandra e Rustgi, 1997).

Com respeito aos polímeros biodegradáveis é essencial reconhecer que a degradação é um processo químico, enquanto que a erosão é um fenômeno físico dependente da dissolução e do processo de difusão. Dependendo da estrutura química do polímero a erosão pode ocorrer na superfície ou por intumescimento. A erosão de superfície ocorre quando a sua velocidade excede a velocidade de permeação da água para o interior do polímero, sendo desejável porque a cinética de erosão e a velocidade de liberação do fármaco (ordem zero) são altamente reprodutíveis. A erosão por intumescimento ocorre quando as moléculas de água penetram na matriz numa velocidade maior que a erosão, exibindo assim uma complexa cinética degradação/erosão. O processo de erosão pode ser manipulado pela modificação da área superficial dos sistemas de liberação ou por incluir unidades monoméricas hidrofóbicas no polímero (Pillai e Panchagnula, 2001).

A compreensão de alguns termos relacionados ao processo de degradação são importantes e, portanto veremos algumas definições a seguir. A degradação do polímero é o processo de cisão da cadeia pelo qual a cadeia polimérica é quebrada em oligômeros e monômeros. Materiais biodegradáveis são aqueles em que o processo de degradação é pelo menos parcialmente mediado por um sistema

biológico. Erosão é definida como o processo de perda de material. O termo bioerosível indica que o sistema biológico é envolvido num processo cinético. Em virtude dessas definições, a degradação de polímeros insolúveis em água é parte do seu processo de erosão (Siepmann e Göpferich, 2001).

Huang e Roby (1986) testaram a biodegradabilidade de poliamidas-uretanas para propósitos médicos. Eles sintetizaram poliuretanos com longas unidades de repetição e alternaram grupos amida e uretanos a partir do 2-aminoetanol. A região amorfa do PU foi degradada antes das regiões cristalinas. Foi observado que os poliuretanos com unidades de repetição longa e grupos hidrofílicos tiveram menor empacotamento na região altamente cristalina, em relação aos poliuretanos normais, e estes polímeros foram mais acessíveis a biodegradação. Estes autores também verificaram que os poliuretanos preparados com diisocianatos alifáticos foram mais resistentes ao ataque fúngico do que aqueles preparados com diisocianato aromático. Vários pesquisadores sugeriram que o ataque microbiano aos poliuretanos pode ocorrer através da ação enzimática das hidrolases como as ureases, proteases e estearases, mas que este ataque ocorrerá somente se houver um número suficientemente grande de cadeias carbônicas entre as ligações uretano e preferencialmente com grupos metilenos adjacentes. Estudos também revelaram que os poliuretanos do tipo poliéster são mais susceptíveis ao ataque fúngico que as outras formas. Em adição, poliéter-poliuretano mostraram-se moderadamente mais resistentes (Howard, 2002). As enzimas são ineficientes em contato com substratos insolúveis e para transpor este obstáculo, as enzimas que degradam substratos insolúveis possuem algumas características que permitem a sua adesão na superfície do substrato hidrofóbico. Estudos realizados por Akutsu *et al.* (1998) indicaram que a poliuretanase degrada os poliuretanos em duas etapas: adsorção hidrofóbica na superfície da molécula seguida da hidrólise das ligações ésteres. A PU estearase foi considerada por ter um domínio de ligação na superfície do poliuretano hidrofóbico e um domínio catalítico, sendo que o domínio de ligação na superfície foi essencial para a degradação do polímero.

Dois tipos de enzimas que degradam o poliuretano têm sido isolados e caracterizados: a PU-estearase associada à membrana e a PU-estearase extracelular.

Estes dois tipos de enzima parecem ter papéis diferentes na degradação do poliuretano, a PU-estearase ligada à membrana permite o contato por intermédio celular com o substrato insolúvel do polímero, enquanto que a PU-estearase extracelular pode se ligar à superfície do substrato e realizar a hidrólise (Howard, 2002).

Kim e Kim (1998) avaliaram o efeito da estrutura sobre a biodegradação de poliuretanos. Os experimentos foram conduzidos por degradação hidrolítica em solução de NaOH, degradação enzimática e em condições que imitam a degradação no solo, que por ser um teste *in vitro* é um método rápido para avaliar a biodegradabilidade dos polímeros no meio natural. Os autores verificaram que a degradação hidrolítica e enzimática diminuiu com o aumento de dióis na cadeia de carbono do polioliol e aumentou com a substituição do diisocianato aromático pelo alifático. Foi considerado que a hidrofobicidade e a formação do segmento duro parecem gerar resistência na degradação hidrolítica e enzimática dos poliuretanos. Quando a quantidade de segmentos duros (hidrofóbicos) foi aumentada, a velocidade de biodegradação diminuiu, por inibir a penetração de água no material. A hidrólise não-enzimática é facilitada pelo aumento da hidrofilicidade na estrutura polimérica. A degradação enzimática (lipases) foi acelerada pela hidrofilicidade e baixa cristalinidade dos poliuretanos e foi quantificada pela perda de peso por unidade de área do filme polimérico. Poliuretanos constituídos por diisocianatos alifáticos apresentam maior velocidade de biodegradação que os poliuretanos constituídos por diisocianatos aromáticos. Este fato indica que a presença e conteúdo dos segmentos duros nos poliuretanos afetam a biodegradabilidade. A hidrofobicidade da superfície é satisfatória para a boa adesão bacteriana na superfície do polímero.

A utilização de poli(etileno glicol) (PEG) nas formulações de poliuretanos tem se mostrado viável uma vez que os segmentos hidrofílicos do PEG podem aumentar a degradação do material. O PEG tem sido ainda utilizado como co-monômero na preparação de polímeros biodegradáveis, devido a sua boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. Lee *et al.* (2001) sintetizaram poliuretanos contendo PEG como segmentos moles. A rápida degradação em solução aquosa alcalina ocorreu

principalmente devido à presença dos segmentos hidrofílicos do PEG. Neste estudo, os autores revelaram que a incorporação de PEG em poliuretanos pode aumentar muito a velocidade de degradação e a alongação. Mahkam e Sharifi-Sanjani (2003) também observaram que a introdução do PEG aumenta da hidrofiliidade e flexibilidade do polímero com susceptibilidade à hidrólise.

A biodegradação de poliuretanos sintetizados com tolueno diisocianato (TDI), em alguns casos, pode levar à liberação de um produto de degradação potencialmente tóxico, o tolueno diamina (TDA), e tem uso limitado em implantes que requeiram períodos prolongados. O TDA é suspeito de ser um agente carcinogênico e a sua detecção a partir de produtos de degradação é essencial para a avaliação toxicológica de poliuretanos implantados. Wang *et al.* (1997) desenvolveram um trabalho interessante sintetizando um poliuretano com tolueno diisocianato, poliéster diol e etileno diamina e o submetendo a degradação enzimática com a enzima colesterol estearase. Os produtos de degradação foram isolados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. Mais de 20 produtos de degradação foram isolados. A ausência do pico equivalente ao TDA no cromatograma sugere que não foi encontrado TDA livre nas amostras analisadas ou que a sua concentração é inferior a 2 ng estando fora do limite de detecção, confirmando a ausência do TDA como produto significativo na mistura.

Veizin e Florence (1978) investigaram a hidrólise de éster usando a enzima estearase como catalisador biológico e concluíram que a velocidade de degradação foi independente da quantidade de enzima presente. Eles verificaram que as cadeias poliméricas permaneceram intactas, mas gradualmente tornaram-se mais hidrofílicas até que se tornaram solúveis em água.

Tang *et al.* (2003) estudaram o efeito da colesterol estearase na biodegradação de policarbonato-poliuretano. As células inflamatórias têm um papel importante na biodegradação de poliuretanos. A enzima colesterol estearase tem uma atividade hidrolítica que aumenta de duas a quatro vezes a diferenciação de monócitos em macrófagos. Esta enzima degrada ambos poli(éster uretano) e poli(éter-uretano), no entanto, para a degradação do poli(éter uretano) uma maior quantidade de enzima é

requerida. Devido as diferentes estabilidades das ligações, a energia requerida para a hidrólise de cada ligação também poderá ser diferente.

A liberação controlada de fertilizantes é um método efetivo de aplicação racional e representa um dos maiores desenvolvimentos na indústria nesta área. Entretanto, após a liberação dos fertilizantes o material de revestimento permanece no solo acumulando-se como um novo tipo de poluição branca. Ge *et al.* (2002) prepararam espumas de poliuretano biodegradável como material de revestimento para a liberação controlada de fertilizantes. Os constituintes da espuma foram diisocianato, poliéster, extrato da casca de *Acacia mearnsi* e amido de milho. A velocidade de liberação do fertilizante diminuiu com o aumento da quantidade da biomassa nas espumas e aumentou com o aumento das quantidades de água usada como agente formador da espuma na preparação do poliuretano. A introdução de componentes de plantas nas formulações de poliuretano tem sido relatada. Lignina, lignocelulose e amido de milho foram adicionados em formulações de espumas de poliuretanos em substituição aos polióis sintéticos. As espumas de poliuretanos derivadas da casca de *Acacia mearnsi* (BK) mostraram-se hábeis em absorver íons de metais pesados e proteínas em função do componente BK. Taninos e BK podem ser incorporados com sucesso em formulações de espumas de PU e promovem o aumento da biodegradabilidade por alguns fungos encontrados em madeiras podres e microorganismos do solo.

Como é possível perceber, a biodegradabilidade de polímeros tem sido extensivamente estudada em função das vantagens que estes materiais apresentam principalmente quando são empregados em sistema de liberação de fármacos.

Geralmente os ensaios de degradação são realizados em condições específicas e determinam o percentual de degradação através da diferença entre a massa inicial da amostra e a massa final após a realização do ensaio (Kim e Kim, 1998) ou consumo de oxigênio, ou seja, resultados macroscópicos.

A degradação de nanopartículas em particular, ainda é pouco explorada e o emprego da técnica de espalhamento de luz para quantificar a degradação destes sistemas tem sido descrita principalmente pelo grupo de Chi Wu (Wu e Gan 1997).

O espalhamento de luz por ser um método sensível e largamente usado como método analítico na caracterização de polímeros e colóides em solução pode ser utilizado para monitorar *in situ* a degradação química e enzimática das nanopartículas poliméricas pela mudança da intensidade do espalhamento e distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas (Wu e Gan 1997).

2.4 Liberação

A determinação da velocidade de liberação de fármacos é importante sob vários aspectos. Os resultados obtidos podem ser empregados com o objetivo de controlar a qualidade do produto manufaturado assegurando a constância do perfil de liberação e elucidar a estrutura do sistema, bem como os mecanismos envolvidos na liberação, ou ainda prever a conduta deste sistema *in vivo* (Chien, 1990).

A liberação de um fármaco a partir de uma microesfera consiste na combinação de várias etapas de transferência do mesmo entre os diferentes sítios da partícula. O fármaco se desloca através da microesfera por meio de um fenômeno de difusão pelos poros ou por entre as cadeias poliméricas alcançando a superfície até atravessar a camada interfacial em direção à fase contínua. Se disperso na matriz polimérica na forma de cristais, ele necessita ser previamente dissolvido, sendo a capacidade de hidratação da partícula importante nestas situações. Conseqüentemente, a velocidade determinada experimentalmente é o resultado do conjunto destes processos, embora apenas um seja considerado limitante, dominando a cinética de liberação. O mecanismo de liberação do fármaco torna-se mais complexo quando a degradação da partícula ocorre concomitantemente com o fenômeno de difusão (Washington, 1996).

Dois sistemas de liberação de fármacos estão especificamente relacionados com a biodegradação da matriz polimérica. No sistema de liberação ativado pela hidrólise é o processo de hidrólise que ativa a liberação das moléculas do fármaco que pode estar encapsulado numa microcápsula, microesfera, nanopartícula ou num dispositivo implantável. A liberação do fármaco através da matriz polimérica é

ativada pela degradação induzida pela hidrólise das cadeias do polímero e controlada pela velocidade de degradação do polímero. O outro sistema de liberação é ativado pela enzima. Este tipo de sistema depende de um processo enzimático para ativar a liberação do fármaco que pode estar fisicamente ou quimicamente ligado nas cadeias poliméricas de biopolímeros. A liberação do fármaco é ativada pela hidrólise enzimática dos biopolímeros por uma enzima específica no tecido alvo.

O controle da liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação controlada, matriz ou membrana, é essencialmente governado pelos mesmos princípios físico-químicos definidos na Lei de Fick. Vários modelos matemáticos podem ser empregados na tentativa de melhor caracterizar o perfil de liberação do fármaco a partir de um sistema de liberação. O modelo mais simples assume que o fármaco é liberado a partir de uma matriz homogênea com um coeficiente de difusão constante. Neste caso, a velocidade de liberação inicial é inversamente dependente do tamanho da partícula e proporcional a raiz quadrada do tempo. Esta relação, primeiramente proposta por Higuchi (1963), pode ser aplicada para várias formas farmacêuticas.

Para polímeros biodegradáveis, modelos matemáticos relatados na literatura descrevem a liberação do fármaco controlada pela erosão em duas categorias: (i) modelos empíricos que assumem um processo de ordem zero para controlar a velocidade de liberação e (ii) modelos que consideram fenômenos físico-químicos que estimulam a degradação do polímero usando as técnicas de Monte Carlo (Siepmann e Göpferich, 2001).

Dependendo da composição do dispositivo erodível (tipo de polímero, quantidade de fármaco, aditivos) e da sua geometria (tamanho e forma), numerosos fenômenos de transporte de massa e de reação química afetam a cinética de liberação do fármaco tais como:

- Entrada de água nos dispositivo;
- Dissolução do fármaco;
- Degradação do polímero;
- Criação de poros;
- Mudanças de pH;

- Efeitos osmóticos;
- Intumescimento do polímero;
- Processo de adsorção/desorção

Algumas etapas de transferência podem ser descritas em sentido contrário, se a concentração do fármaco no meio de liberação é suficientemente alta. Nestas condições, o equilíbrio natural do fenômeno de difusão será atingido e, para evitá-lo, o emprego de condições sink torna-se desejável, simplificando a interpretação dos dados experimentais. Para a obtenção de condições perfeitamente sink preconiza-se que a concentração máxima de fármaco dissolvida na fase contínua não exceda 10% da sua concentração à saturação. (Washington, 1996).

Para fármacos pouco ou muito pouco solúveis, a concentração no meio de dissolução pode facilmente aproximar-se da concentração à saturação. Nestes casos, recorre-se muitas vezes ao emprego de substâncias auxiliares que, quando adicionadas à fase contínua, conduzem à obtenção de condições sink. Entre estas substâncias encontram-se os tensoativos que promovem a liberação do fármaco, seja por aumentar a sua solubilidade, seja por permitir a maior penetração do solvente na micropartícula. Além disso, a inclusão de tensoativos no meio de dissolução produz uma tensão interfacial mais representativa dos fluidos biológicos (Watts *et al.* 1990).

As duas principais técnicas utilizadas para avaliar o perfil de liberação do fármaco *in vitro* a partir de nanopartículas são: a técnica de difusão através de uma membrana de diálise e a técnica de separação baseada na filtração ou ultracentrifugação (Soppimath, *et al.* 2001).

3. SÍNTESE DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE POLIURETANO PELA TÉCNICA DE SUSPENSÃO-POLIADIÇÃO.

3.1 Materiais

3.1.1 Matérias-primas

- Levofloxacino (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos - LTDA)
- Metileno difenil diisocianato (MDI) (Bayer)
- Poliol de origem natural (Kehl - LTDA)
- Catalisador organometálico, Dibutil estanho dilaurilmercaptideo (DABCO 120, Air Products)
- Poli(etileno glicol) Mw = 400 (PEG 400) (Vetec, LTDA)
- Monooleato de sorbitano (SPAN 80; Beraca Ind. Com. LTDA)
- Polisorbato 80, poli(óxido de etileno)₂₀-monooleato de sorbitano (TWEEN 80; Beraca Ind. Com. LTDA)
- Água destilada
- Estearase de fígado de porco, 24 unidades/mg de sólido, EC 3.1.1.1 lote 123K7033 (Sigma/ Aldrich)
- Papaína de *Papaya latex*, 3,3 unidades/mg de sólido, EC 3.4.22.2 lote 045K2516 (Sigma/ Aldrich)
- Solução HCl e NaOH 0,5 M e 5 M.
- Tampão fosfato pH = 7,4

3.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético, Corning
- Balança Analítica
- Dispersor Extratur, Quimis
- Espectrofotômetro de fluorescência, Safas-Monaco
- Microscópio eletrônico de varredura, Philips XL 30

- Microscópio eletrônico de transmissão, JEOL JEM - 2000FX
- Espectrofotômetro FTIR, Bruker Tensor 27
- Granulômetro à laser, Cilas 1064 Líquido
- Zetasizer 3000 HSA, Malvern
- ALV 5000E, ALV
- Ultracentrifuga, Beckman-Optima™ TLX.

3.2. Metodologia

3.2.1 Estudo preliminar

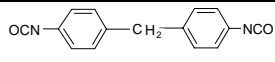
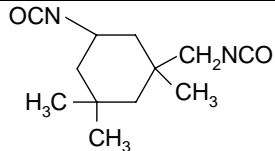
3.2.1.1 Preparação das microesferas

As microesferas foram preparadas pela técnica de suspensão-poliadição. Esta técnica consiste em emulsificar a fase monomérica (que contém os monômeros precursores do poliuretano) em um meio de polimerização (que deve ser um não solvente para os monômeros), sob a forma de gotas. Neste método, as gotas de monômero são convertidas diretamente a partículas do polímero correspondente (Arshady, 1989).

Quando ingredientes imiscíveis em água como o isocianato e o polioliol são dispersos em meio aquoso é necessário adicionar um emulsificante para que a tensão interfacial seja reduzida entre os monômeros e o meio de polimerização, evitando assim a separação de fases. Em nossas formulações foi utilizado um sistema constituído por dois emulsificantes: um hidrofílico, Tween 80, e o outro hidrofóbico, Span 80.

Neste trabalho de tese foram utilizados como isocianatos o difenil metano diisocianato (MDI) e a isoforona diisocianato (IPDI) (Tabela 1).

TABELA 1. Características dos diisocianatos empregados na obtenção dos poliuretanos.

| NOME | FÓRMULA | ESTRUTURA | MASSA MOLAR (g/mol) | TEMP. FUSÃO |
|---|----------------------|--|---------------------|-------------|
| 4,4'-difenil metano diisocianato (MDI)/1,1'-metileno bis (4-isocianato benzeno) | $C_{15}H_{10}O_2N_2$ |  | 250,3 | 39,5°C |
| Isoforona diisocianato (IPDI)/5-isocianato-1-(metilisocianato)-1,3,3'-trimetil ciclohexano | $C_{12}H_{18}O_2N_2$ |  | 222,3 | -60 °C |

Apud Poliuretanos, 2003.

Na preparação das micropartículas a fase monomérica foi composta por MDI, polioliol de origem natural, catalisador organometálico e tensoativo hidrofóbico (Span 80). O meio de polimerização foi composto por água destilada e tensoativo hidrofílico (Tween 80). Portanto, a técnica consistiu em suspender 10 g de monômeros com 0,12 g de catalisador (2% em relação à massa de polioliol) e 1 g de Span 80 em 200 mL de água destilada contendo 1g de Tween 80 sob agitação magnética de 1000 rpm. A emulsão formada foi mantida sob agitação por 3 horas a 1000 rpm em temperatura ambiente. Após preparadas, as microesferas foram filtradas, secas a temperatura ambiente e estocadas (Figura 2).

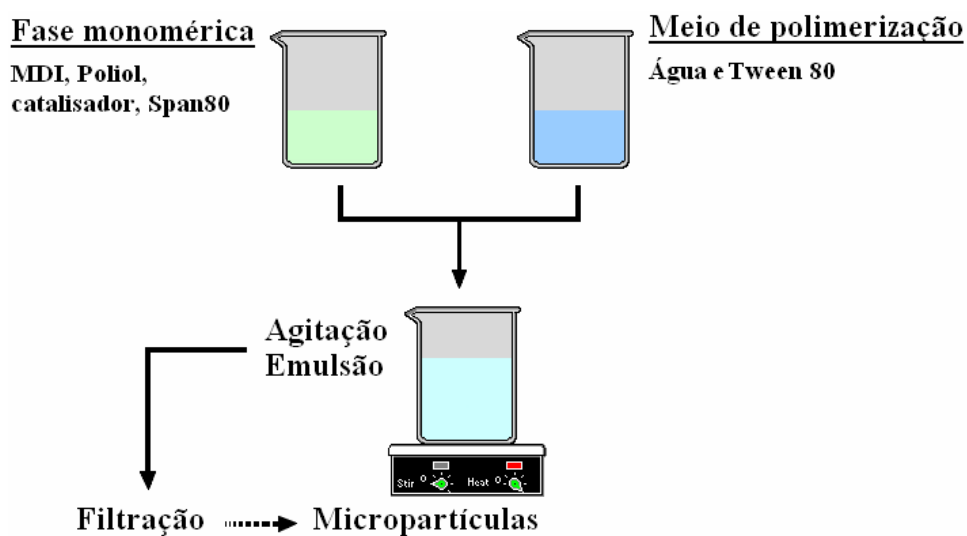


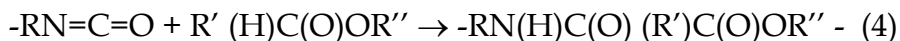
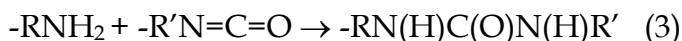
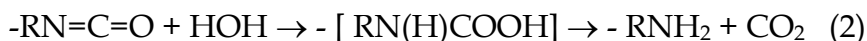
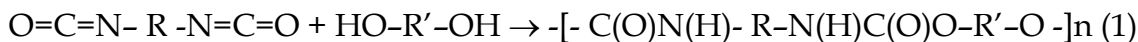
FIGURA 2. Esquema de preparação das microesferas.

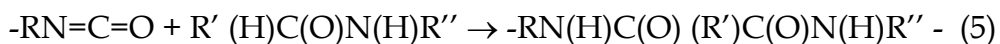
Este estudo preliminar teve como objetivo verificar a viabilidade de preparação de micropartículas de poliuretano pela técnica de suspensão-poliadição e testar diferentes concentrações dos monômeros MDI e polioliol que constituem os poliuretanos, a relação $[NCO]/[OH]$. Baseado em dados da literatura que demonstram que o aumento dos segmentos macios (polióis - grupos OH) dos poliuretanos propicia melhor característica de biodegradabilidade ao produto, procurou-se testar o limite máximo de concentração de polioliol na constituição de micropartículas de poliuretano. Para tanto, testamos quatro formulações diferentes descritas na Tabela 2.

TABELA 2. Formulações testadas no estudo preliminar de preparação de micropartículas de poliuretano.

| Formulação | F1 | F2 | F3 | F4 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Fase monomérica</i> | | | | |
| MDI (g) | 5,0 | 4,5 | 4,0 | 3,5 |
| Polioliol (g) | 5,0 | 5,5 | 6,0 | 6,5 |
| Catalisador (g) | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 |
| Span 80 (g) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Relação molar $[NCO]/[OH]$ | 2,5 | 2,0 | 1,6 | 1,3 |
| <i>Meio de polimerização</i> | | | | |
| Água (mL) | 200,0 | 200,0 | 200,0 | 200,0 |
| Tween 80 (g) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

Na reação de poliadição a fase monomérica dispersa na água pode sofrer as seguintes reações segundo Jabbari e Khakpour, (2000) :





Na reação (1) os grupos isocianatos (MDI) reagem com os grupos hidroxil do polioliol para formar as cadeias de poliuretano. Na reação (2) os grupos isocianatos reagem com a água do meio de polimerização para formar um grupo aminoácido que é instável e se dissocia dentro da cadeia como grupos amina terminais e dióxido de carbono. A extensão da formação de dióxido de carbono por esta reação contribui significativamente para a porosidade das microesferas. Na reação (3), a cadeia com grupos terminais amina reagem com um grupo isocianato terminal para formar uma ligação uréia. Na reação (4) um grupo terminal isocianato reage com um grupo NH uretano para formar um alofano. Na reação (5), um grupo terminal isocianato reage com um NH uréia para formar um biureto. As reações 4 e 5 causam interconexões e reticulação das cadeias de poliuretano (Jabbari e Khakpour, 2000).

Na tentativa um tanto empírica de testar o limite máximo de polioliol na constituição das microesferas de poliuretano observamos que, com exceção da formulação F4, as demais preparações foram viáveis. As partículas da formulação F4 apresentaram um aspecto demasiadamente elástico o que pode ser atribuído a grande quantidade de polioliol na amostra.

3.2.1.2 Avaliação da morfologia

A avaliação da morfologia das micropartículas, bem como das propriedades de superfície foi realizada pela observação das fotomicrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) num equipamento Philips XL 30 do Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica - Centro Tecnológico da UFSC. As amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita dupla face. Estes suportes foram recobertos com uma camada de ouro de 350 Å de espessura em um aparelho à vácuo Polaron E 5000. Para a visualização da estrutura interna, as micropartículas foram seccionadas transversalmente antes de serem aderidas aos suportes.

3.2.1.3 Análise granulométrica das microesferas

A análise granulométrica das microesferas foi realizada por meio de medição, pelo diâmetro de Ferret das partículas visualizadas nas fotomicrografias ampliadas obtidas por microscopia eletrônica.

3.2.2 Avaliação de fatores de formulação sobre o tamanho médio e distribuição granulométrica das partículas.

O interesse na obtenção de nanopartículas a partir de um poliuretano biodegradável para aplicação em sistemas de liberação de fármacos, associado aos resultados obtidos no estudo preliminar, fez com que escolhêssemos dois fatores como variáveis para este trabalho: a velocidade de agitação durante a etapa de dispersão da fase monomérica e a adição de um segundo diol (PEG) na fase monomérica. Foi investigada a influência destes fatores sobre o diâmetro médio das partículas e sobre a eficiência de encapsulação do levofloxacino.

A velocidade de agitação foi selecionada como variável de estudo porque é um dos fatores mais importantes que afetam o tamanho das partículas. O aumento da velocidade de agitação tende a reduzir o tamanho. A adição de poli(etileno glicol), em diferentes proporções em relação ao polioliol, visou aumentar a biodegradabilidade das partículas.

As variáveis estudadas e suas respectivas denominações encontram-se demonstradas na tabela 3.

TABELA 3. Fatores de formulação estudados.

| Adição de PEG (%) | Agitação (rpm) | | | |
|-------------------|----------------|-------|-------|-------|
| | 1000 | 12000 | 16000 | 20000 |
| 0 ^a | F1 | F5 | F9 | F13 |
| 10 | F2 | F6 | F10 | F14 |
| 20 | F3 | F7 | F11 | F15 |
| 30 | F4 | F8 | F12 | F16 |

^a Percentual de PEG em relação à quantidade de monômeros (g).

A proporção MDI/poliol foi mantida constante e igual a 4:6 respectivamente, mas o poli(etileno glicol) PEG 400 ($M_w = 400\text{g/mol}$) foi adicionado como comonomer (segundo diol) em concentrações variando de 0 a 30% (p/p) em concentração relativa a quantidade de monômeros (substituição ao poliol natural, 16, 33 e 50%).

As formulações foram preparadas pelo método de suspensão-poliadição, conforme descrito em 3.2.1.1. A dispersão da fase monomérica foi realizada por meio de agitação magnética (1000 rpm) ou em um dispersor Extratur® (12000, 16000 e 20000 rpm), durante 5 minutos. Após, as formulações foram mantidas sob agitação magnética (1000 rpm) por mais 3 horas a temperatura ambiente, para permitir a polimerização (Figura 3).

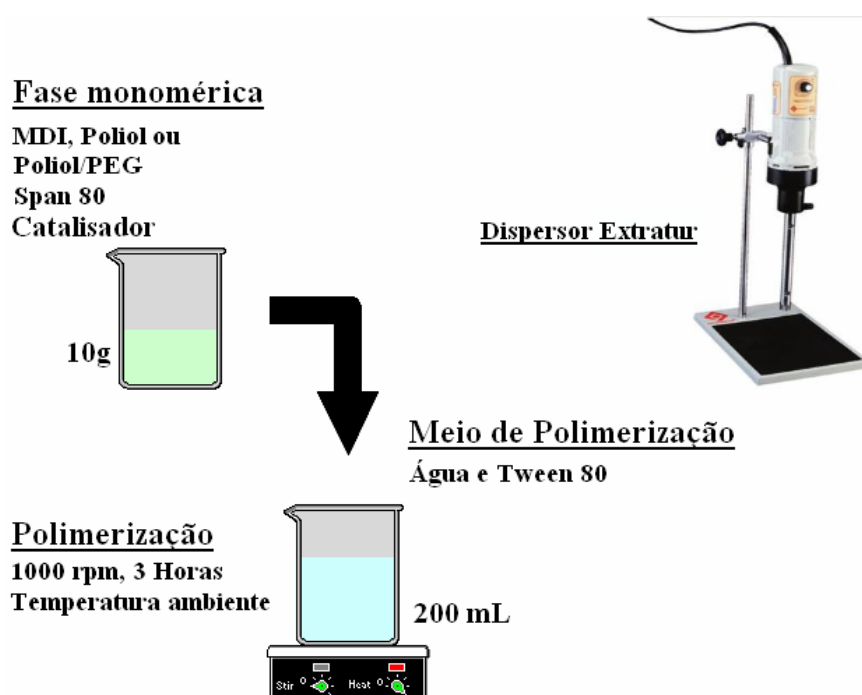


FIGURA 3. Esquema de preparação das partículas pela técnica de suspensão-poliadição.

3.2.2.1 Análise granulométrica

A análise granulométrica das partículas foi realizada num granulômetro a laser (CILAS) do Laboratório de Tecnologia Mineral e Ambiental da Universidade Federal

do Rio Grande do Sul. O limite de detecção por este método encontra-se entre 0,04 – 500 μm .

3.2.2.2 Morfologia das partículas

A morfologia e estrutura interna das micropartículas foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), num microscópio Phillips XL 30 do Laboratório de materiais da UFSC. As micropartículas foram fixadas em suportes de alumínio com fita dupla face e recobertas com uma fina camada de ouro.

A morfologia da fração de nanopartículas foi visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) num equipamento Jeol - JEM - 2000FX do CREMEM (Centre de Ressources en Microscopie Electronique et Microanalyse), Université Bordeaux 1, França. As amostras foram preparadas pela deposição de uma gota da formulação em suportes constituídos de grades de cobre com película de Formvar®.

3.2.2.3 Determinação da eficiência de encapsulação e teor de levofloxacino nas formulações por espectrofluorimetria.

Na tentativa de determinar a capacidade de encapsulação destes sistemas, quatro formulações foram selecionadas para encapsular o levofloxacino (F10, F11, F12 e F13).

O levofloxacino (RDC 268, ANVISA) é um antibiótico e foi escolhido como fármaco modelo por ser fluorescente, facilitando desta maneira a quantificação da eficiência de encapsulação no sistema em estudo.

A estrutura química do levofloxacino ((-)-(S)-fluor-0-metil-3 (metil-4-piperazinil-1) 10-oxo-7 di-hidro-2, 3-7H-pirido/1,2,3-de/benzoxazina-1, 4 carboxílico-6 ácido) está demonstrada na Figura 4 (Barré, 2001).

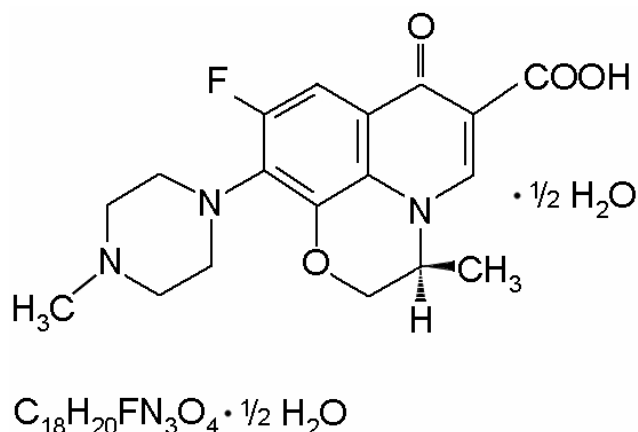


FIGURA 4. Estrutura do levofloxacino (PM=370,38)

Na forma sólida, o levofloxacino é um pó cristalizado sem odor e de coloração branca-amarelada. Possui ponto de fusão em 228,6°C. O levofloxacino é praticamente insolúvel em água, mas é solúvel em metanol e clorofórmio e também numa mistura de etanol-água (González *et al.* 2000).

A solução a 1% em água apresenta um pH de 6,5-7,5. O pH influencia na intensidade de fluorescência das soluções de levofloxacino, sendo que exibe fluorescência máxima a um pH na faixa de 3,0-5,0 (Wimer, *et al.* 1998; González *et al.* 2000).

Para a encapsulação, 500 mg de levofloxacino foram adicionados na fase monomérica e a encapsulação ocorreu durante a síntese das partículas de poliuretano.

A eficiência de encapsulação é a diferença entre a concentração total do fármaco adicionado à suspensão e a concentração encontrada no sobrenadante após separação das partículas por ultracentrifugação. Em nosso estudo foi realizada uma ultracentrifugação de 50000 rpm por 2 horas a 20°C numa ultracentrífuga Beckman-Optima™ TLX do Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP), Université Bordeaux 1.

O doseamento do levofloxacino foi realizado num espectrofotômetro SAFAS - Mônaco da Ecole Nationale Superieure de Chimie et Phisique de Bordeaux,

Université Bordeaux 1. As condições de análise foram: λ excitação = 350 nm, λ emissão = 450 nm, fendas de 10 nm, HT = 332V.

O levofloxacino não apresenta comportamento linear entre concentração e intensidade de fluorescência para toda a faixa de concentração (efeito de auto-absorção). O fenômeno de auto-absorção é uma supressão de fluorescência e ocorre em sistemas muito concentrados (grandes quantidades de fluoróforos) quando ocorre a sobreposição das bandas de excitação e emissão de modo que a radiação emitida é absorvida para a excitação de outras moléculas, chegando apenas parte da radiação emitida ao detector. Portanto, para a realização da curva de calibração é importante determinar a faixa de linearidade. Uma solução padrão de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi preparada dissolvendo o levofloxacino numa mistura de água/etanol (97:3). Uma amostra de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi preparada pela diluição da solução padrão com água milli Q. A intensidade de fluorescência versus concentração de levofloxacino foi linear na faixa entre 0,1 a 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH = 7 e 25°C.

3.3 Caracterização Físico-Química

3.3.1 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A estrutura do polímero foi verificada por espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier num espectrofotômetro Bruker Tensor 27, no modo ATR (Attenuated total reflection). A suspensão de partículas foi depositada sobre o cristal de ATR para formar um filme e os espectros foram feitos na região de 4000 – 500 cm^{-1} .

3.3.2 Determinação do Potencial Zeta

O potencial zeta das partículas foi determinado após diluição das suspensões com água milli Q num equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments, UK).

3.3.3 Espalhamento de Luz

Além da determinação do tamanho de partícula a técnica de espalhamento de luz foi empregada para monitorar a degradação *in vitro* das partículas como será descrita no item destinado à degradação.

Os equipamentos utilizados nos experimentos de espalhamento de luz foram o Zetasizer (Malvern) que trabalha a um ângulo fixo de 90° e o ALV onde é possível trabalhar numa faixa ampla de variação angular.

As medidas de espalhamento de luz a vários ângulos foram realizadas num equipamento ALV-5000 equipado com uma mesa goniométrica automática, um medidor digital e uma célula de controle de temperatura da amostra (Ebeling *et al.* 1999). A temperatura de $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ foi empregada nas medidas. A luz dispersada foi medida a diferentes ângulos numa faixa entre 60° e 120°.

As suspensões foram submetidas a diluições variadas em água milli Q. Frações com e sem filtração foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico. Filtros de celulose de 0,45 ou 0,22 μm foram utilizados e, nestes casos, somente a fração de nanopartículas foi analisada.

Para a determinação do diâmetro, as formulações F10, F11, F12 e F13 preparadas com e sem levofloxacino foram diluídas e filtradas com membrana de celulose com poros de 0,2 μm .

3.4 Estudo de degradação *in vitro* das partículas.

Os estudos de degradação química *in vitro* das nanopartículas foram realizados em meio constituído de ácido clorídrico 0,5 M (meio ácido) e hidróxido de sódio 0,5 M (meio alcalino). Estudos de degradação enzimática foram realizados em água

contendo as enzimas estearase de fígado de porco e papaína em diferentes concentrações. As amostras foram previamente diluídas em água milli Q e filtradas em filtros de celulose (Millipore®) de 0,22 μm . Os experimentos foram realizados a 25° C e 37° C. Para este estudo, somente nanopartículas foram utilizadas. A degradação das nanopartículas foi monitorada pela técnica de espalhamento de luz, por períodos de tempo variados.

O espalhamento de luz por ser um método sensível e largamente usado como método analítico na caracterização de polímeros e colóides em solução, foi utilizado neste estudo para monitorar *in situ* a degradação química e enzimática das nanopartículas poliméricas pela mudança da intensidade do espalhamento e distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas (Wu e Gan 1997).

Em um típico experimento de degradação enzimática, uma determinada quantidade da solução aquosa de enzima foi adicionada *in situ* a 7 mL da suspensão de nanopartículas devidamente filtrada. Células com diâmetro de 20 mm foram usadas. A degradação foi monitorada em ângulos de 20° e 90°.

Para uma solução diluída e a ângulos de espalhamento relativamente pequenos θ , a razão de Rayleigh ($R_{vv}(q)$) que é a razão entre a intensidade da luz espalhada e a intensidade da luz incidente, pode ser relacionada a massa molar média. Com $q \rightarrow 0$ e $C \rightarrow 0$, $R_{vv}(q) \sim KCM_w$, ou seja é proporcional a massa molar da partícula ou a concentração de partículas (Fu e Wu, 2001; Chu, 1991).

$R_{vv}(q)$ e $G^{(2)}(t, q)$ foram medidos simultaneamente durante a degradação.

Os resultados do estudo de degradação serão discutidos no capítulo 5.

3.5 Estudo de liberação do levofloxacino

Uma alíquota de 2,0 mL da suspensão de nano e micropartículas foi diluída em 18,0 mL de tampão fosfato pH 7,4, contendo ou não estearase ou papaína na concentração de 20 unidades/mL. Em tempos determinados, uma alíquota de 1 mL foi coletada e submetida a ultracentrifugação a 50000 rpm durante uma hora. O

sobrenadante foi coletado e analisado quanto ao teor de levofloxacino por espectrofluorimetria nas condições descritas em 3.2.2.3.

A partir dos resultados, curvas demonstrando o percentual do fármaco liberado em função do tempo foram construídas.

Os resultados do estudo de liberação do levofloxacino serão discutidos no capítulo 6.

3.6 Resultados e discussão

3.6.1 Resultados do estudo preliminar

3.6.1.1 Avaliação da morfologia

A análise da morfologia das partículas demonstra que as mesmas apresentam estrutura esférica e com porosidade no seu interior (Figura 5), embora apresentem superfície lisa e compacta. A presença de poros no interior da partícula é satisfatória, pois os mesmos podem servir como caminho difusional para a liberação de agentes ativos como fármacos e fertilizantes.

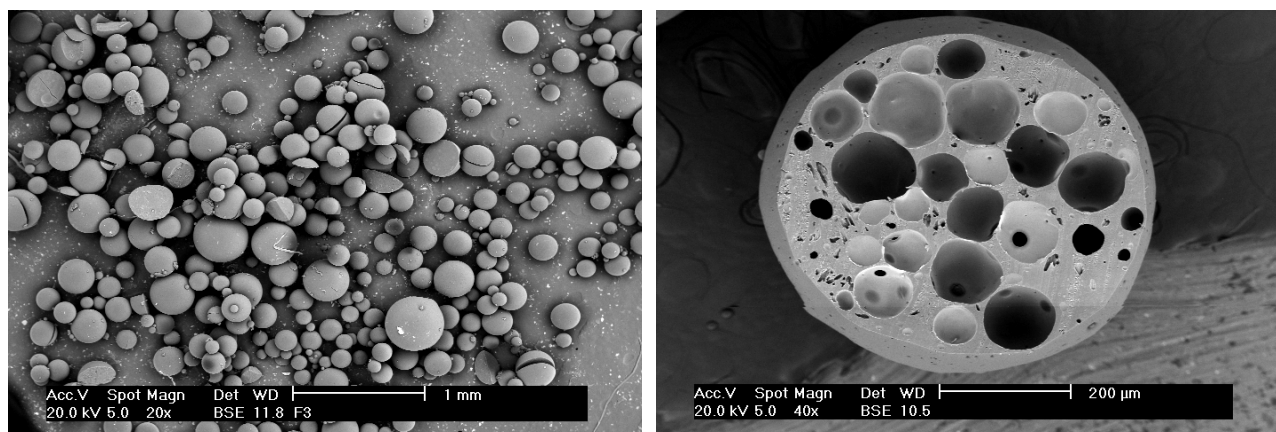


FIGURA 5. Morfologia e estrutura interna das microsferas obtidas por MEV

Através do corte transversal foi possível visualizar o interior das partículas e classificá-las como esferas.

3.6.1.2 Distribuição granulométrica

A Figura 6 mostra a distribuição de tamanho das três formulações de microesferas viáveis.

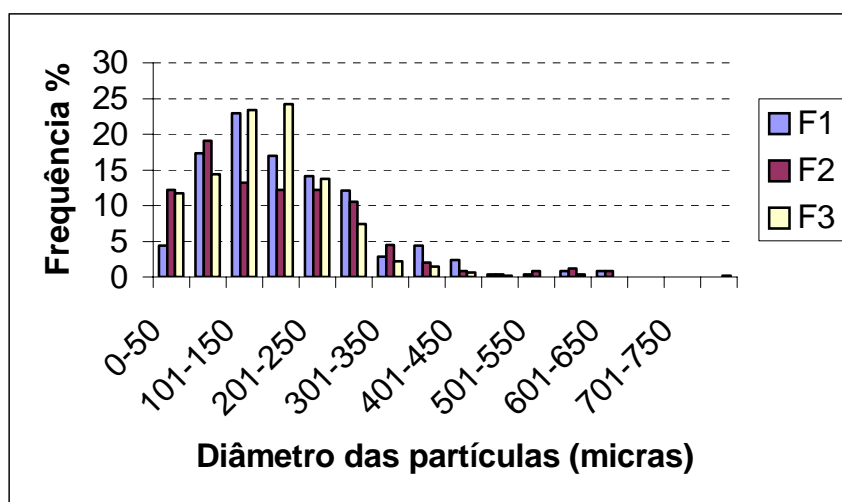


FIGURA 6. Distribuição granulométrica das microesferas preparadas no estudo preliminar.

Conforme pode ser observado na Figura 6, o diâmetro das partículas manteve-se em torno de 250 μm . A alteração na proporção dos monômeros parece não ter influenciado a distribuição de tamanho das partículas entre as diferentes formulações.

3.6.2 Síntese de partículas de poliuretano pela técnica de suspensão-poliadição.

Polióis de origem natural têm sido usados na preparação de poliuretanos conferindo-lhes características biodegradáveis. O óleo de mamona é constituído por um triglicerídeo derivado do ácido ricinoléico, possuindo três grupos hidroxila. O óleo de mamona é obtido da semente da planta *Ricinus communis* que é encontrada em regiões tropicais e subtropicais sendo, portanto muito abundante no Brasil. O

óleo pode ser obtido pela prensagem das sementes ou por extração com solvente. Cerca de 90% do ácido graxo presente na molécula é o ácido ricinoléico sendo os 10% restantes constituídos de ácidos graxos não hidroxilados, principalmente ácidos oléico e linoléico. A funcionalidade do óleo de mamona é cerca de 2,7 (Yeganeh e Mehdizadeh, 2004).

A estrutura idealizada do polioliol de origem natural está na Figura 7.

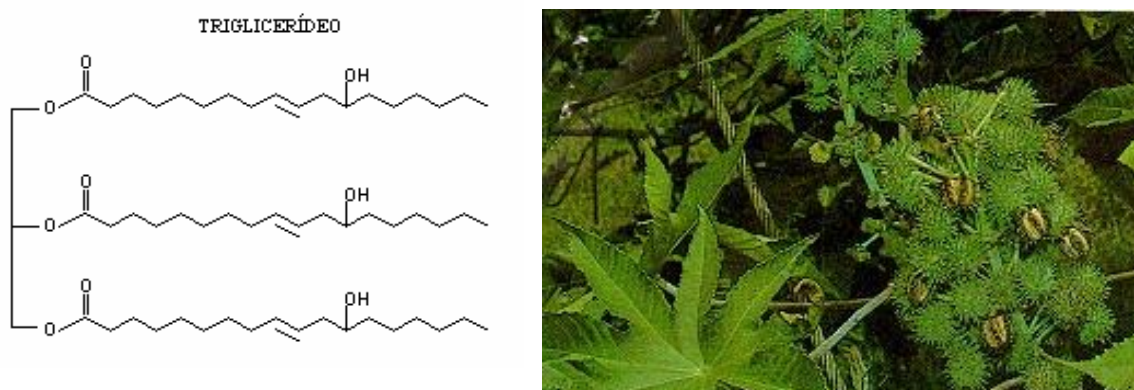


FIGURA 7. Estrutura idealizada do polioliol de origem natural (esquerda). A direita, foto da mamona.

A fase monomérica foi constituída por metileno difenil diisocianato (4g), polioliol de origem natural (6g), catalisador organometálico (0,12g) e Span 80 como surfactante hidrofóbico (1g). Quando o levofloxacino foi encapsulado, 500 mg foram adicionados na fase monomérica. O meio de polimerização foi o mesmo para todas as formulações sendo constituído por 200 mL de água destilada contendo tween 80 (1g), como surfactante hidrofílico. A concentração de monômeros no meio de polimerização foi 5% para todas as formulações testadas, ou seja, 10g. Neste estudo foi utilizado um sistema de dois surfactantes para garantir a estabilidade da emulsão. O uso de dois surfactantes na síntese de nanocápsulas de poliuretanos pela técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea foi também descrito por Bouchemal *et al.* (2004).

A tabela 4 descreve as formulações desenvolvidas.

TABELA 4. Composição, parâmetros de formulação e rendimento das formulações preparadas pela técnica de suspensão-poliadição.

| Formulação | Monômeros | % PEG | Velocidade de agitação (rpm) | Rendimento (%) ^a |
|------------|-------------------------------|-------|------------------------------|-----------------------------|
| F1 | MDI:Poliol (4:6) ^b | 0 | 1000 | 94 |
| F2 | MDI:Poliol:PEG (4:5:1) | 10 | 1000 | 96 |
| F3 | MDI:Poliol:PEG (4:4:2) | 20 | 1000 | 95 |
| F4 | MDI:Poliol:PEG (4:3:3) | 30 | 1000 | 90 |
| F5 | MDI:Poliol (4:6) | 0 | 12000 | 93 |
| F6 | MDI:Poliol:PEG (4:5:1) | 10 | 12000 | 97 |
| F7 | MDI:Poliol:PEG (4:4:2) | 20 | 12000 | 96 |
| F8 | MDI:Poliol:PEG (4:3:3) | 30 | 12000 | 98 |
| F9 | MDI:Poliol (4:6) | 0 | 16000 | 90 |
| F10 | MDI:Poliol:PEG (4:5:1) | 10 | 16000 | 92 |
| F11 | MDI:Poliol:PEG (4:4:2) | 20 | 16000 | 97 |
| F12 | MDI:Poliol:PEG (4:3:3) | 30 | 16000 | 98 |
| F13 | MDI:Poliol (4:6) | 0 | 20000 | 95 |
| F14 | MDI:Poliol:PEG (4:5:1) | 10 | 20000 | 94 |
| F15 | MDI:Poliol:PEG (4:4:2) | 20 | 20000 | 93 |
| F16 | MDI:Poliol:PEG (4:3:3) | 30 | 20000 | 98 |

^a Calculado pela diferença entre a massa de monômeros e massa de resíduo após a polimerização.

^b Os números entre parêntesis correspondem à proporção de cada monômero na formulação.

Todas as formulações apresentaram bom rendimento, superior a 90%.

O esquema reacional da síntese é apresentado na figura 8. A reação de formação do poliuretano ocorre entre o grupo OH do polioliol e o NCO do isocianato. Sendo que o polioliol apresenta estrutura semelhante a um triglicerídeo, possuindo três grupos OH é possível prever que a estrutura do poliuretano formado será bastante reticulada. Quando o poli(etileno glicol) é utilizado como co-monômero ele pode reagir com o isocianato e tornar a matriz polimérica menos reticulada devido ao fato dele ser linear.

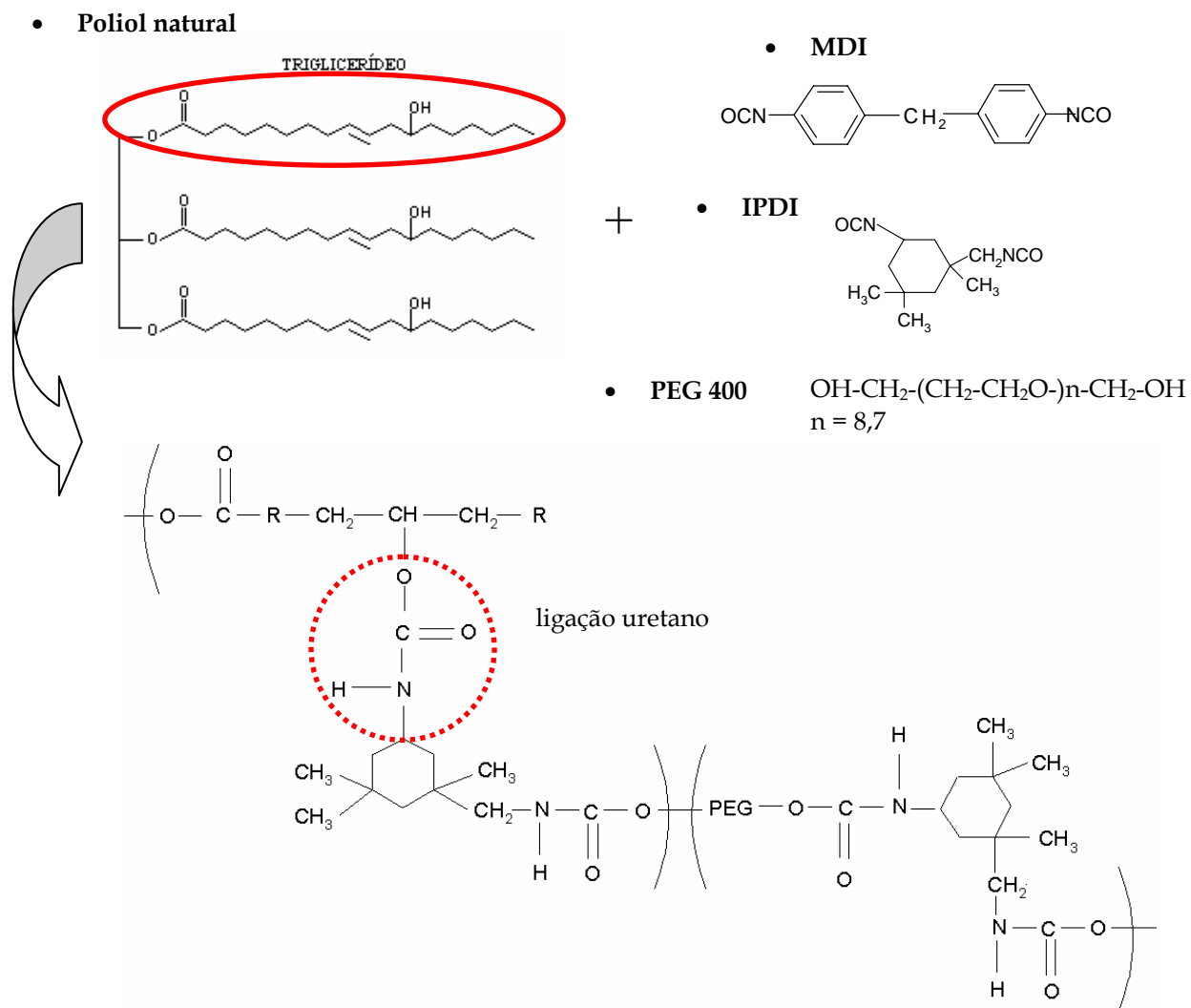


FIGURA 8. Esquema reacional da síntese do poliuretano.

A reação de poliadição ocorre entre o grupo OH do poliol ou do PEG e o NCO do isocianato, formando o uretano.

Modelos da matriz polimérica das partículas preparadas com e sem PEG são sugeridos na figura 9. Quando somente poliol e isocianato reagem, a matriz polimérica resultante é mais compacta devido à reticulação. O emprego do PEG como co-mônômero pode tornar a matriz polimérica menos compacta e mais porosa, pois sendo ele um polímero linear reduz a reticulação e pelo seu caráter hidrofílico aumenta a porosidade da matriz. A estrutura da matriz polimérica teve influência na degradação das partículas e no perfil de liberação do fármaco encapsulado conforme será visto posteriormente.

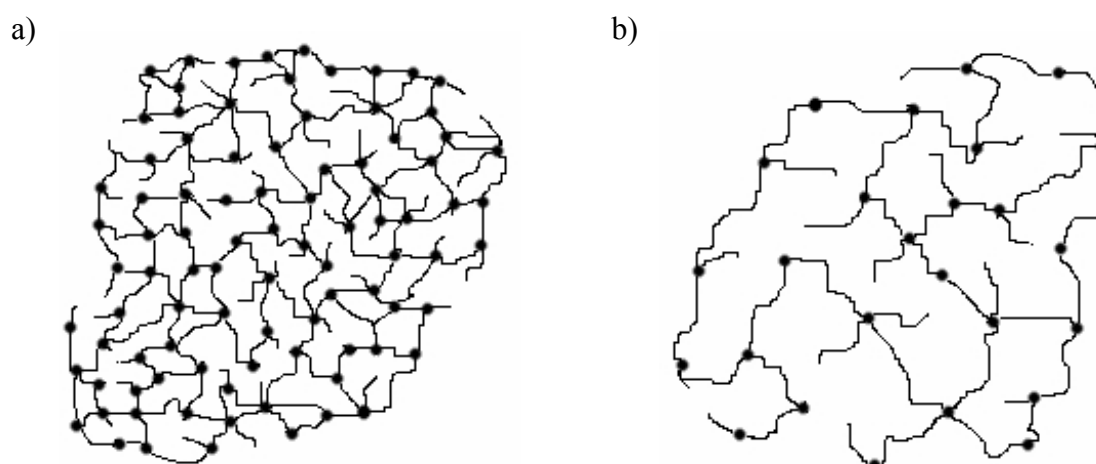


FIGURA 9. Modelos da matriz polimérica das partículas preparadas a) sem PEG e b) com PEG.

3.6.3 Análise granulométrica

Os dados da distribuição granulométrica das formulações são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5. Dados da análise granulométrica.

| Formulação | Diâmetro médio (μm) | Faixa granulométrica |
|------------|----------------------------------|--------------------------|
| F2 | 64 | 0,07 – 400 μm |
| F3 | 110 | 0,04 – 400 μm |
| F4 | 104 | 0,04 – 400 μm |
| F6 | 79 | 0,04 – 240 μm |
| F7 | 48 | 0,20 – 140 μm |
| F8 | 33 | 0,04 – 140 μm |
| F10 | 19 | 0,04 – 71 μm |
| F11 | 5 | 0,04 – 45 μm |
| F12 | 5 | 0,04 – 36 μm |
| F13 | 52 | 0,07 – 300 μm |
| F14 | 56 | 0,07 – 180 μm |
| F15 | 34 | 0,04 – 140 μm |
| F16 | 23 | 0,04 – 112 μm |

As formulações F1, F5 e F9, ou seja, as formulações que não contém PEG não puderam ser analisadas em função do seu tamanho, certamente por possuírem partículas com tamanho maior que 500 μm . Para efeitos de visualização no gráfico estas formulações foram consideradas como tendo diâmetro maior que 250 μm (Figura 10).

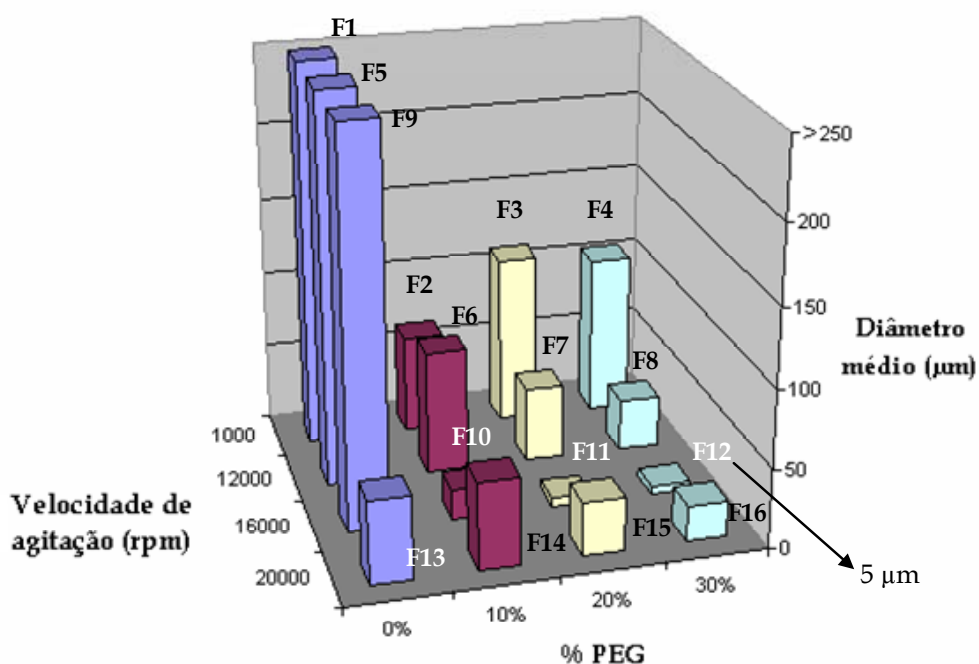


FIGURA 10. Efeito da adição de poli(etileno glicol) e da velocidade de agitação sobre o diâmetro médio das partículas.

O tamanho médio de partículas sintetizadas pela técnica de suspensão-poliadição pode ser controlado, entre outros fatores, pelo tipo e concentração do surfactante, relação entre quantidade de monômeros e meio de polimerização e velocidade de agitação (Arshady, 1989).

Neste trabalho verificamos que o tamanho de partícula pode também ser influenciado pela adição de PEG 400 na fase monomérica. A adição de quantidades crescentes de poli(etileno glicol) reduziu significativamente o diâmetro médio das partículas de 400 μm para 5 μm . Este efeito pode estar associado ao caráter hidrofílico do PEG que tende a migrar para a fase aquosa (meio de polimerização), contribuindo

para a quebra das gotas de monômero e conseqüentemente reduzindo o tamanho das partículas (Figura 11).

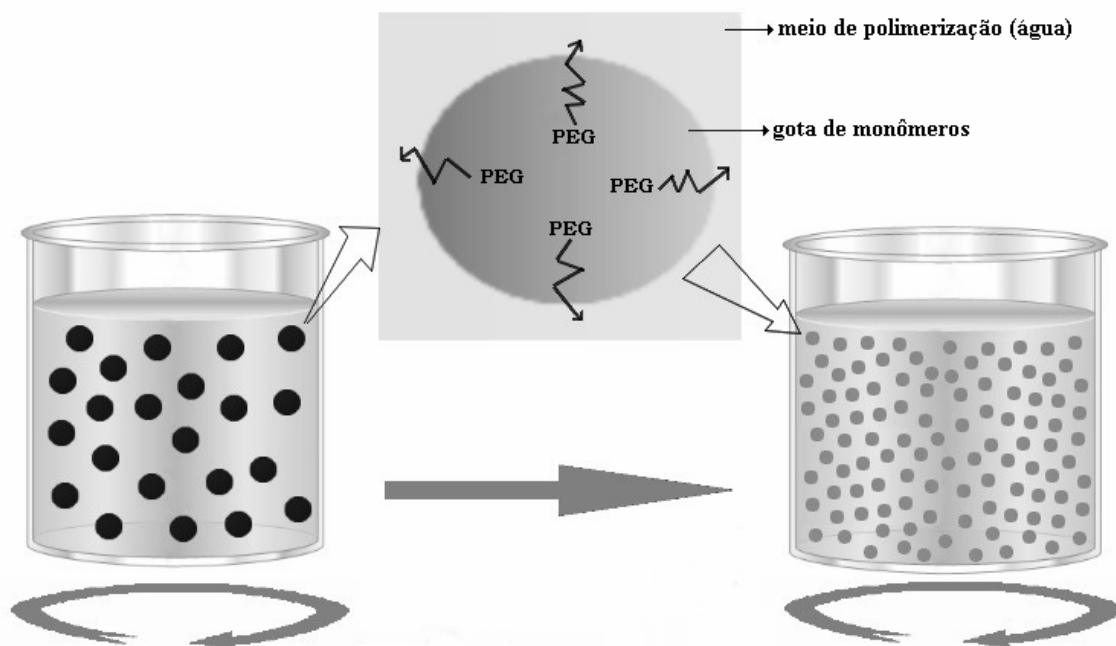


FIGURA 11. Efeito do poli(etileno glicol) na redução do tamanho de partícula.

Este resultado está de acordo com dados da literatura. Durrieu e Gandini (2005), também verificaram a redução no tamanho de partícula quando um macrodiol hidrofílico foi usado na preparação de dispersões aquosas de poliuretano. A substituição parcial de 50 mol % do 1,12-dodecanodiol por outro diol altamente solúvel em água (Neopentil glicol, NPG), localizado na fase aquosa na síntese de partículas de poliuretano pela técnica de miniemulsão, resultou na formação de partículas menores num estudo realizado por Tiarks *et al.* 2001.

Entretanto, quando o PEG não foi adicionado às formulações uma velocidade de agitação igual a 20000 rpm foi necessária para obter partículas com tamanho em torno de 50 μm . Adicionalmente, a velocidade de 16000 rpm demonstrou ser mais efetiva na produção de partículas de menor tamanho. De acordo com a literatura (Watts *et al.* 1990), quanto maior a velocidade de agitação menor é o tamanho de partícula. Excepcionalmente para a velocidade de agitação igual a 20000 rpm esta relação não foi constatada em todas as formulações.

3.6.4 Análise da Morfologia

3.6.4.1 Micropartículas

A forma, morfologia e estrutura interna das partículas foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

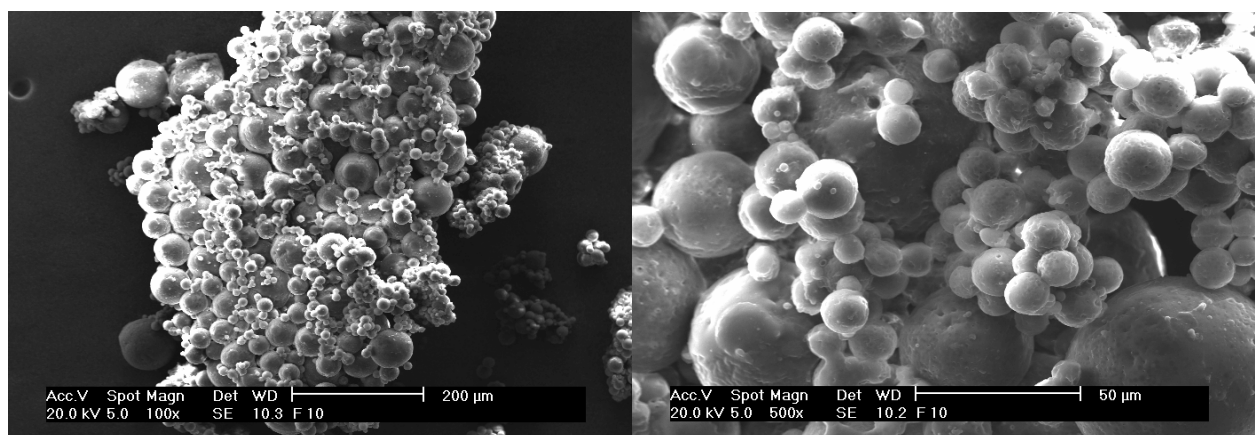


FIGURA 12. Partículas da formulação F10, preparada com 10% de PEG em aumentos de 100 e 500x.

Partículas esféricas foram obtidas em todas as formulações como demonstrado na figura 12. Entretanto, a porosidade das partículas foi aumentada quando o PEG foi adicionado na fase monomérica (Figura 13). O poli(etileno glicol) atua como formador de poros na matriz polimérica, sendo esta uma maneira interessante de modular a liberação de fármacos encapsulados (Zanetti *et al.* 2002).

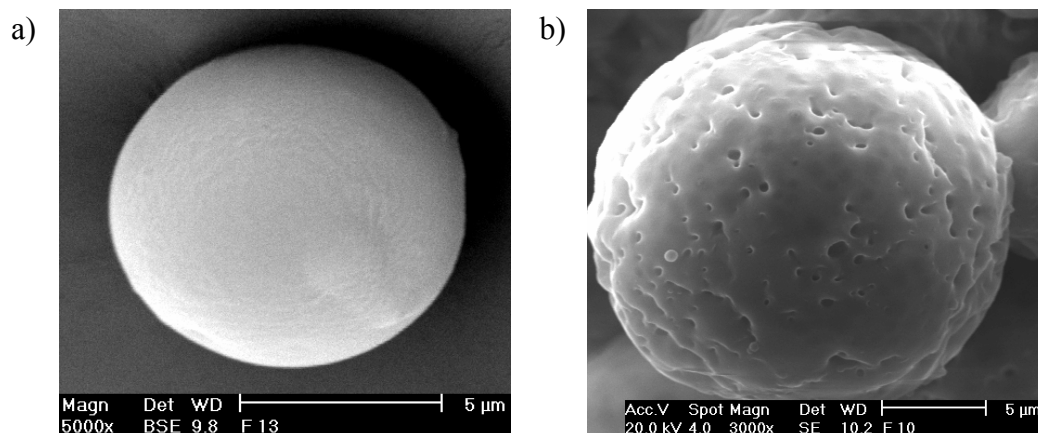


FIGURA 13. Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas obtidas com (a) 0% PEG e velocidade de agitação de 20000 rpm, formulação F13 e (b) 10% PEG e velocidade de agitação de 16000 rpm, formulação F10.

A formação de poros nos poliuretanos pode ser atribuída à formação de CO₂ advinda da reação secundária entre isocianato e água durante a reação de síntese (Jabbari e Khakpour 2000). Entretanto, em nosso estudo, a formulação F13 preparada sem PEG não apresentou porosidade sendo esta uma forte indicação de que o PEG é realmente responsável pela formação de poros nas partículas.

A figura 14 apresenta uma partícula preparada com 30% de PEG e contendo levofloxacino, cortada transversalmente. É possível perceber os cristais do fármaco encapsulado na partícula.

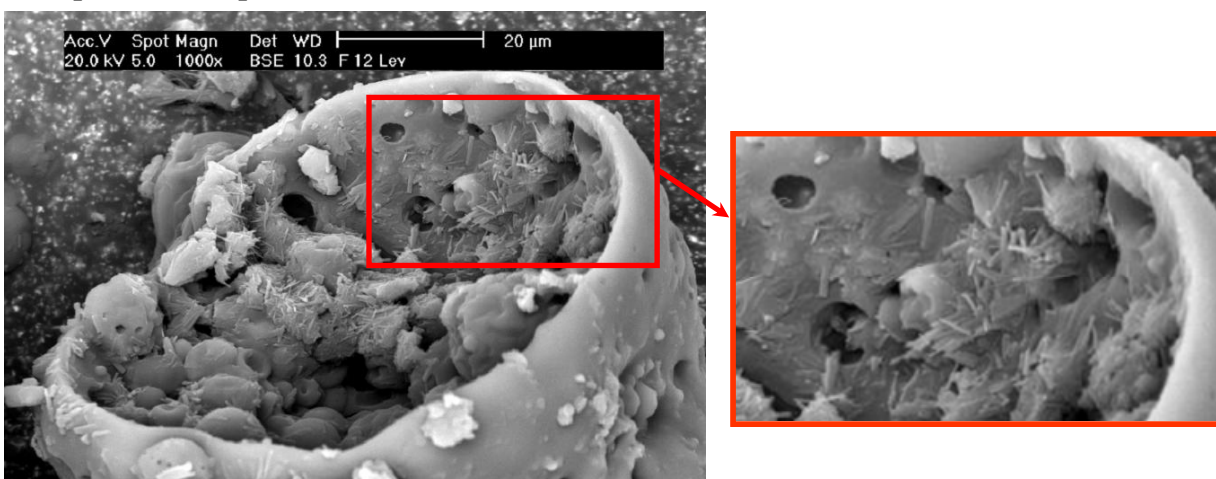


FIGURA 14. Micropartícula da formulação F12 contendo levofloxacino. Corte transversal.

3.6.4.2 Nanopartículas

A fração de nanopartículas pôde ser visualizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), confirmando a existência concomitante de micro e nanopartículas nas formulações preparadas pela técnica de suspensão-poliadição. A figura 15 apresenta as fotos obtidas para a formulação F12 onde é possível perceber que as nanopartículas são esféricas e apresentam polidispersidade no tamanho conforme já havia sido evidenciado por outras técnicas.

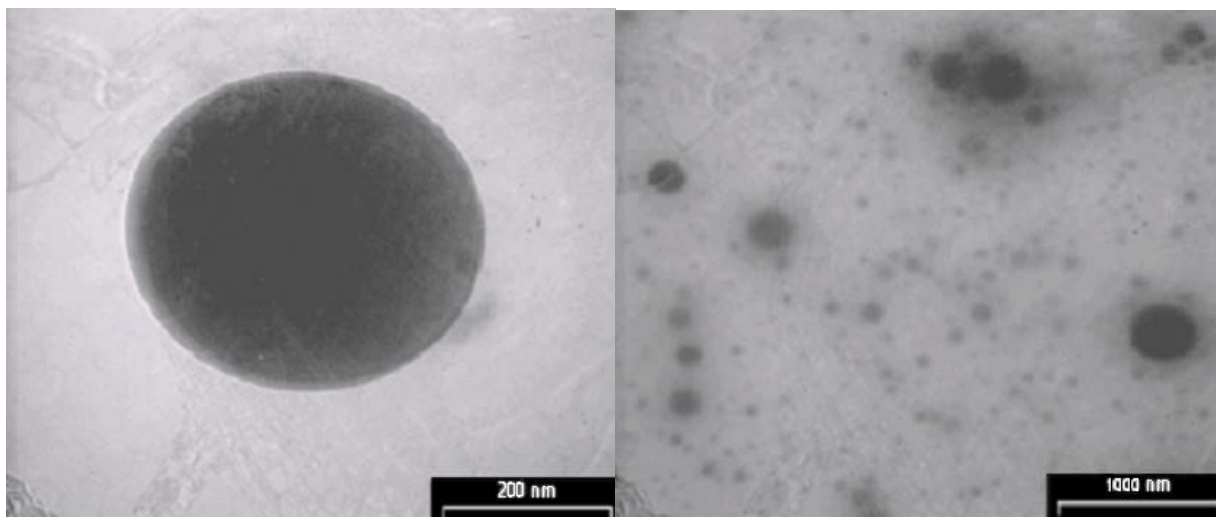


FIGURA 15. Imagens obtidas por MET para a formulação F12.

3.6.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

A técnica de FTIR possibilitou verificar a completa síntese do poliuretano. A forte banda de absorção localizada em 2272 cm^{-1} é atribuída ao grupo NCO do isocianato e caracteriza o MDI. O desaparecimento desta banda nas formulações é um indício de que o poliuretano foi formado. As bandas amida em 3300 cm^{-1} , carbonila a 1729 cm^{-1} e CN do grupo amida em 1534 cm^{-1} também são fortes evidências da formação do poliuretano (Jabbari e Khakpour, 2000; Brosse, *et al.* 1995). A figura 16 apresenta o espectro dos monômeros (MDI e polioliol) e das formulações F12 e F13 preparadas com e sem PEG, respectivamente.

Nas partículas sintetizadas pela técnica de suspensão-poliadição a relação $[\text{NCO}]/[\text{OH}]$ foi igual a 1,6, tendo-se portanto um excesso de grupos NCO. Estes grupos por serem muito reativos, quando na ausência de OH proveniente do polioliol irão reagir com a água formando amina e isto foi verificado através da banda em 3500 cm^{-1} . A ausência da banda em 2272 cm^{-1} nos espectros das formulações confirma que todos os grupos NCO reagiram.

A banda em 1635 cm^{-1} corresponde ao grupo C=O da uréia que está presente em maior intensidade na formulação F12. Este resultado é coerente, pois na presença do PEG que é hidrofílico a reação entre o isocianato e a água é favorecida e grupamentos uréia podem ser formados.

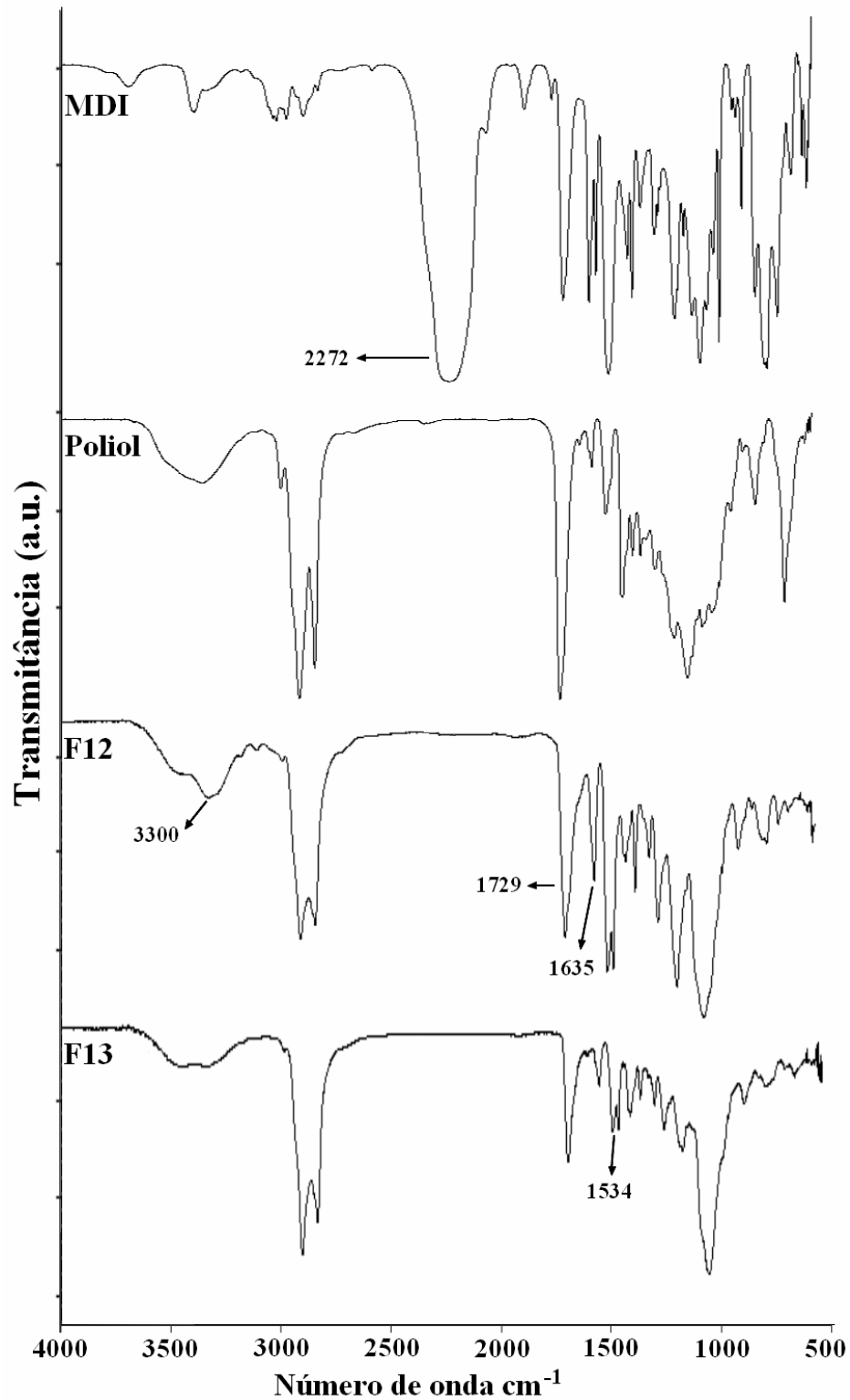


FIGURA 16. Espectros de FTIR-ATR dos monômeros MDI e polioli e das formulações F12 e F13 preparadas com e sem PEG, respectivamente.

3.6.6 Espalhamento de luz

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) também designado quase-elástico permite a rápida obtenção do coeficiente de difusão de macromoléculas em solução, a partir da análise da distribuição de frequência das flutuações na intensidade de luz espalhada em uma dada direção. Estas flutuações originam-se das variações no índice de refração dentro do volume de espalhamento, devido ao movimento browniano das partículas. Estas flutuações estão relacionadas com o coeficiente de difusão aparente e o vetor de onda de espalhamento pela equação $\Gamma = D \times q^2$ onde Γ é a constante de correlação ou relaxação, D é o coeficiente de difusão aparente e q é o vetor de onda do espalhamento.

O espalhamento é uma interação da radiação com partículas suspensas em um meio através do qual a radiação é transmitida. Ao incidir na partícula, parte da radiação é espalhada e a intensidade do espalhamento depende, basicamente, do tamanho da partícula (Lucas, *et al.* 2001). A distribuição do tamanho das nanopartículas será medida em suspensão aquosa por espalhamento de luz dinâmico sendo que as medidas da distribuição de tamanho serão realizadas pelo princípio da difração a laser. A amostra colocada num módulo fluido circula a uma velocidade constante, um feixe de luz é difratado sobre as partículas e a luz difratada é coletada pelo detector (Bouchemal *et al.* 2004).

Em espalhamento de luz dinâmico, a função do tempo de correlação da intensidade de espalhamento $G^{(2)}(t, q)$ é medida. A inversão de Laplace de $G^{(2)}(t, q)$, resulta na distribuição $G(\Gamma)$. Para uma pura relaxação difusiva, Γ é relacionado ao coeficiente de difusão translacional D por $\Gamma/q^2 = D$ com $q \rightarrow 0$ e $C \rightarrow 0$, então a constante de correlação $G(\Gamma)$ pode ser diretamente convertida à distribuição de difusão translacional $G(D)$ ou a distribuição do raio hidrodinâmico $f(R_h)$ usando a equação de Stocks-Einstein: $R_h = k_B T / (6\pi\eta D)$ onde k_B , T , e η são a constante de Boltzman, a temperatura absoluta e viscosidade de solvente, respectivamente.

A função de correlação da intensidade dispersada foi analisada por meio do método cumulativo e da análise de CONTIN para fornecer o coeficiente de difusão efetivo e o tamanho de partícula correspondente.

Normalmente a faixa granulométrica possível de ser analisada por esta técnica é de 5 nm a 5 μ m.

A tabela 6 apresenta o diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersidade medido pelo equipamento Zetasizer (Malvern) com ângulo de 90° a 25°C.

TABELA 6. Diâmetro médio e índice de polidispersidade determinado pelo Zetasizer.

| Formulação | Sem levofloxacino | | Com levofloxacino | |
|------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------|
| | Diâmetro médio (nm) $\pm \sigma$ | IP ^a $\pm \sigma$ | Diâmetro médio (nm) $\pm \sigma$ | IP $\pm \sigma$ |
| F10 (MDI:P:PEG, 4:5:1) | 93,4 \pm 2,40 | 0,430 \pm 0,06 | 106,5 \pm 0,7 | 0,447 \pm 0,01 |
| F11 (MDI:P:PEG, 4:4:2) | 84,9 \pm 0,60 | 0,441 \pm 0,02 | 110,5 \pm 0,20 | 0,368 \pm 0,02 |
| F12 (MDI:P:PEG, 4:3:3) | 123,8 \pm 1,20 | 0,258 \pm 0,03 | 115,1 \pm 1,00 | 0,272 \pm 0,09 |
| F13 (MDI:P, 4:6) | 130,3 \pm 0,60 | 0,278 \pm 0,03 | 109,5 \pm 2,10 | 0,354 \pm 0,02 |

^a Índice de polidispersidade

A formulação F12 foi a que apresentou o menor índice de polidispersidade em ambos os casos quando foi preparada com ou sem levofloxacino.

A adição de levofloxacino não pareceu afetar significativamente o diâmetro das partículas. A figura 17 apresenta o diâmetro médio das partículas obtido pelo Zetasizer. As medidas foram realizadas em triplicata.

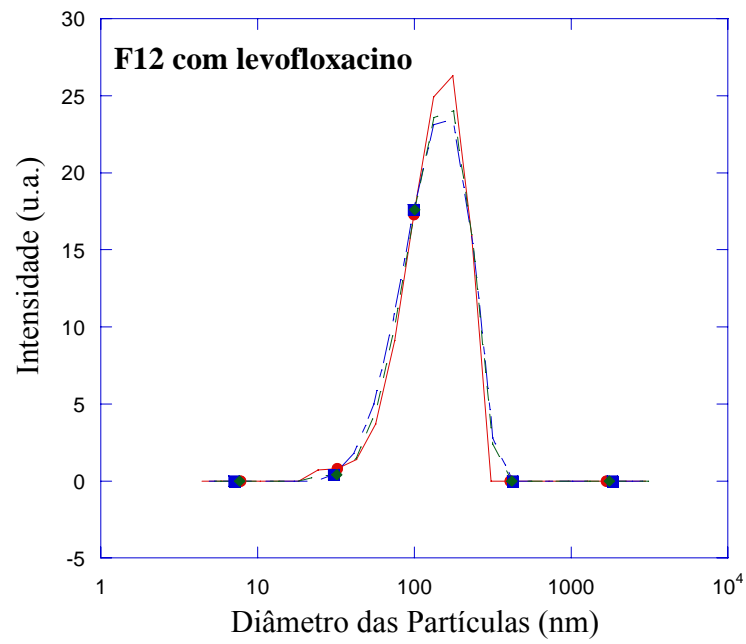
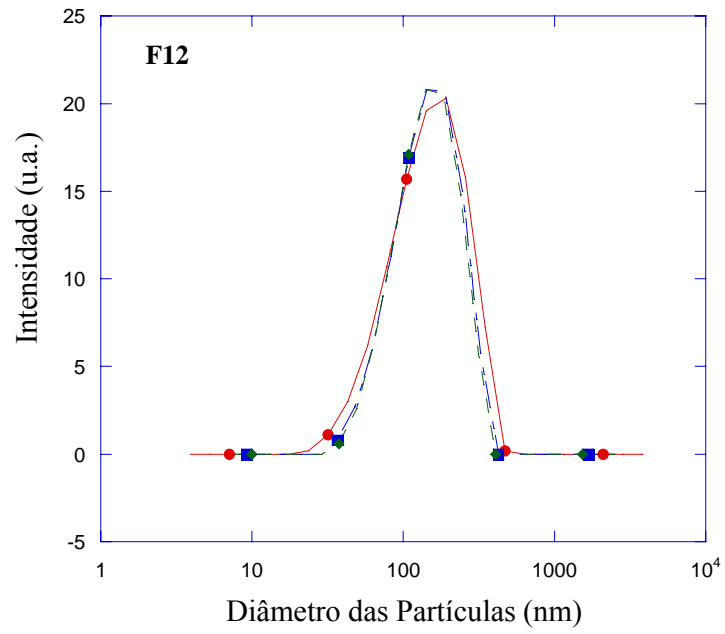


FIGURA 17. Diâmetro médio das nanopartículas da formulação F12 com e sem levofloxacino, medido pelo Zetasizer.

A formulação F12 também foi analisada no equipamento ALV a vários ângulos. As medidas foram realizadas em ângulos de 60°, 90° e 120°. As amostras filtradas apresentaram raio hidrodinâmico em torno de 70 nm o que esta de acordo com os resultados obtidos via Zetasizer. A função de correlação para a formulação F12 é apresentada na Figura 18.

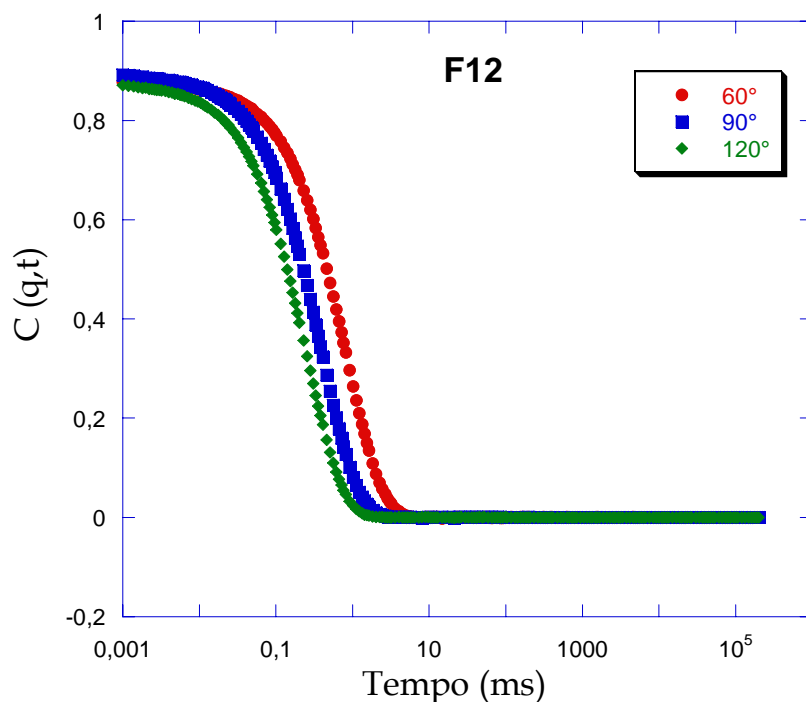


FIGURA 18. Função de correlação da F12 medida a 25°C e ângulos de 60°, 90° e 120°.

As funções de correlação são essencialmente representadas por uma curva exponencial simples, monoexponencial o que sugere a boa correlação da amostra.

Os coeficientes de difusão fornecem informações importantes sobre organização molecular e estrutura de fases. A difusão molecular consiste nos movimentos aleatórios (brownianos) das moléculas, devidos à energia térmica do sistema. A equação de Stokes-Einstein ($D = kT/6\pi\eta R_h$) fornece a dependência do coeficiente de difusão de uma partícula esférica, em solução, à diluição infinita, com o seu raio hidrodinâmico R_h , com a viscosidade do solvente η do e com a temperatura da solução T (k é a constante de Boltzmann). (Souza e Laverde, 2002).

A variação angular da frequência medida em função de q^2 indica o movimento difusivo da amostra F12 e a existência de objetos esféricos (Figura 19).

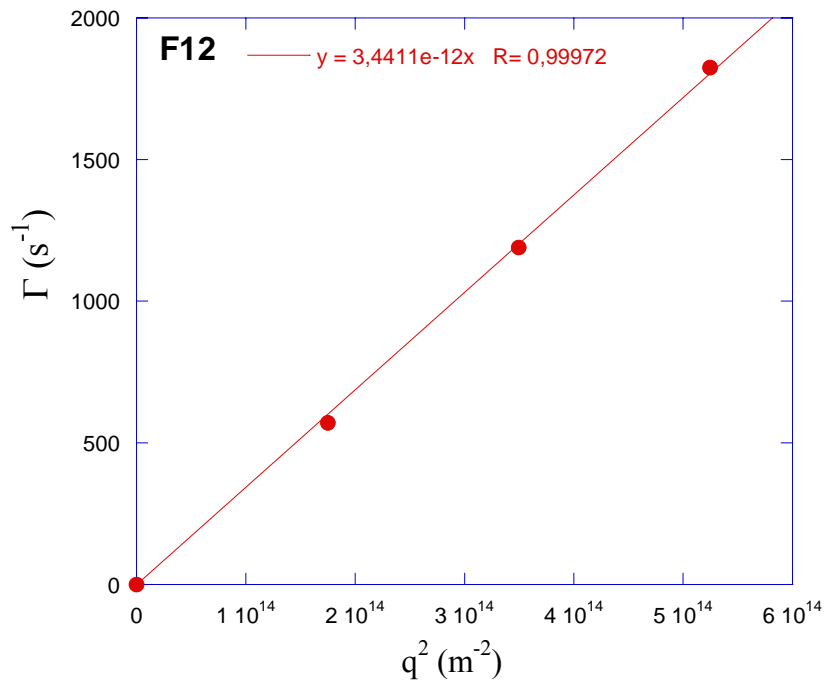


FIGURA 19. Γ versus q^2 para a formulação F12.

Valores típicos de coeficientes de difusão em líquidos, a temperaturas moderadas (25-30° C), vão desde $10^{-12} m^2s^{-1}$ (polímeros de alta massa molar, em solução) até $10^{-9} m^2s^{-1}$ (moléculas pequenas, em soluções pouco viscosas) (Souza e Laverde, 2002). O coeficiente de difusão para a formulação F12 nas condições estudadas foi igual a $3,4 \times 10^{-12} m^2s^{-1}$.

3.6.7 Potencial Zeta

O potencial zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como este reflete a carga efetiva nas partículas, pode ser correlacionado com a repulsão eletrostática das partículas e com a estabilidade da suspensão. O potencial zeta pode

ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Quanto maior o potencial zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação.

O potencial zeta das partículas medido após diluição das amostras em água milli Q está apresentado na tabela 7.

TABELA 7. Potencial Zeta e pH das partículas preparadas pela técnica de suspensão-poliadição.

| Formulação | Potencial Zeta (mV) | | | |
|----------------------------|---------------------|-----|-------------------|-----|
| | Sem levofloxacino | pH | Com levofloxacino | pH |
| F10 (10% PEG) ^a | - 24,4 | 7,2 | - 25,5 | 6,7 |
| F11 (20% PEG) | - 24,6 | 7,1 | - 19,9 | 6,7 |
| F12 (30% PEG) | - 25,8 | 7,2 | - 22,7 | 6,5 |
| F13 (sem PEG) | - 34,6 | 7,0 | - 35,5 | 6,8 |

As medidas do potencial zeta foram realizadas num n=5.

^a Quantidade percentual em massa de PEG em relação à quantidade de monômeros

Os valores negativos do potencial zeta observados na tabela 7 podem ser atribuídos à utilização de tensoativos ou a presença de grupos funcionais na superfície das partículas, indicando que as mesmas têm carga negativa.

Conforme pode ser observado na tabela 7, a presença de poli(etileno glicol) influencia os valores de potencial zeta. A utilização do poli(etileno glicol) reduziu o potencial zeta de -34,6 para em torno de -25 mV. Estes valores sugerem que as partículas podem estar recobertas pelo PEG, que por ser hidrofílico, reduziu a carga superficial das partículas. Nossos resultados estão em acordo com dados da literatura apresentados por Fontana *et al.* 2001 e Farias *et al.* 2005.

Para as formulações preparadas sem PEG ou com 10% de PEG, a adição de levofloxacino não alterou os valores de potencial zeta, sugerindo que o fármaco não está localizado na superfície das partículas e sim no seu interior, conforme foi confirmado por MEV. Entretanto, uma pequena redução nos valores de potencial zeta foi obtida para as partículas preparadas com levofloxacino e PEG nas concentrações de 20 e 30%. Esta evidência sugere que o fármaco pode interagir

eletrostaticamente com o polímero na superfície das partículas alterando o seu potencial (Page-Clisson, *et al.* 1998). A redução da eficiência de encapsulação observada nas formulações preparadas com poli(etileno glicol) (item 3.6.8) pode também justificar a propensão de interação entre o fármaco e o polímero na superfície da partícula.

Uma leve redução nos valores de pH foi observada quando o levofloxacino foi adicionado às formulações.

3.6.8 Determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco.

A eficiência de encapsulação é a diferença entre a concentração total do fármaco adicionado à formulação e a concentração encontrada no sobrenadante após separação das partículas por ultracentrifugação. Neste estudo, frações totais da formulação foram utilizadas, ou seja, micro e nanopartículas. A eficiência de encapsulação percentual (EE) foi calculada através da equação:

$$EE = 100 - \left(\frac{C_s}{C_t} \times 100 \right)$$

onde, C_s é a concentração de levofloxacino encontrada no sobrenadante após a ultracentrifugação e C_t é a concentração total adicionada à formulação.

O sobrenadante foi dosado por fluorescência e a quantidade de levofloxacino encontrada no sobrenadante, portanto, a quantidade não encapsulada, foi determinada com base na curva de calibração: intensidade de fluorescência versus concentração de levofloxacino (figura 20). A curva de calibração foi realizada conforme descrito em 3.2.2.3.

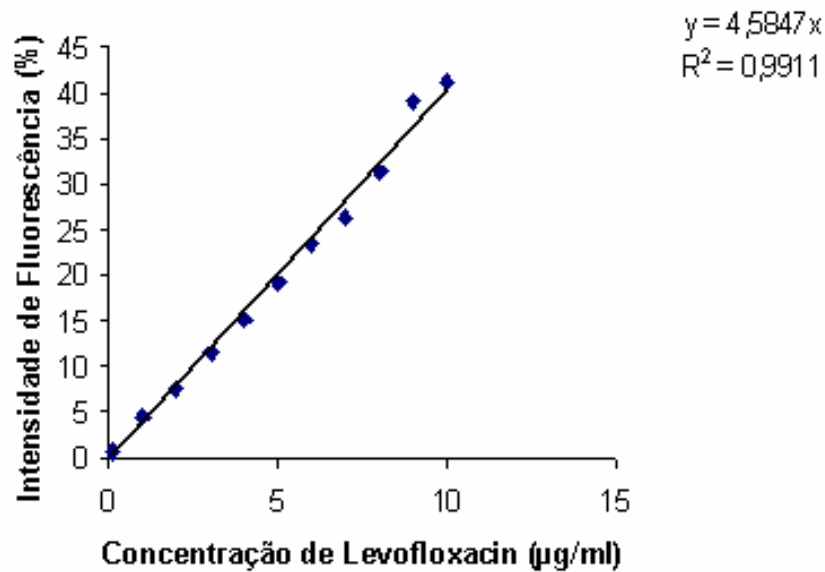


FIGURA 20. Curva de calibração do levofloxacin.

Comparado aos outros métodos espectrofotométricos de detecção, a espectroscopia de fluorescência possui uma boa seletividade analítica, alta capacidade contra interferentes e bom limite de detecção (Du *et al.* 2004). As principais vantagens da espectroscopia de fluorescência sobre o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são: a sua rapidez (por não necessitar de pré-tratamentos complexos e por ter uma medida instantânea) e a ausência do uso de solventes orgânicos (González *et al.* 2000).

Os valores de eficiência de encapsulação são apresentados na tabela 8.

TABELA 8. Valores de eficiência de encapsulação do levofloxacin nas formulações preparadas pela técnica de suspensão-poliadição.

| Formulação | C_T^a | | C_S^b | | Eficiência de encapsulação | |
|---------------|---------|-----|---------|------|----------------------------|------|
| | mg/mL | % | mg/mL | % | mg/mL | % |
| F10 (10% PEG) | 2,50 | 100 | 2,01 | 80,6 | 0,49 | 19,4 |
| F11 (20% PEG) | 2,50 | 100 | 1,96 | 78,7 | 0,54 | 21,3 |
| F12 (30% PEG) | 2,50 | 100 | 1,98 | 79,4 | 0,52 | 20,6 |
| F13 (0% PEG) | 2,50 | 100 | 0,78 | 31,2 | 1,72 | 68,8 |

^{a.} C_T : Concentração total de levofloxacin adicionada à formulação;

^{b.} C_S : Concentração de levofloxacin encontrada no sobrenadante após ultracentrifugação a 50000 rpm por 2 horas.

Conforme pode ser observado na tabela 8, a adição do poli(etileno glicol) como co-mônômero reduziu a eficiência de encapsulação de 70% (formulação F13 preparada sem PEG) para em torno de 20% (formulações contendo PEG). Este fenômeno já foi observado em outros estudos (Zanetti *et al.* 2002) e pode ser explicado pelo fato do PEG agir como co-solvente, aumentando a solubilidade do levofloxacin e contribuindo para a sua partição para a fase aquosa (meio de polimerização) e conseqüentemente reduzindo a eficiência de encapsulação. Entretanto, a concentração de PEG na formulação não pareceu interferir nos valores de encapsulação (tabela 8, F10-F12).

A distribuição do fármaco na formulação pode ser melhor compreendida com o auxílio dos desenhos esquemáticos da figura 21.

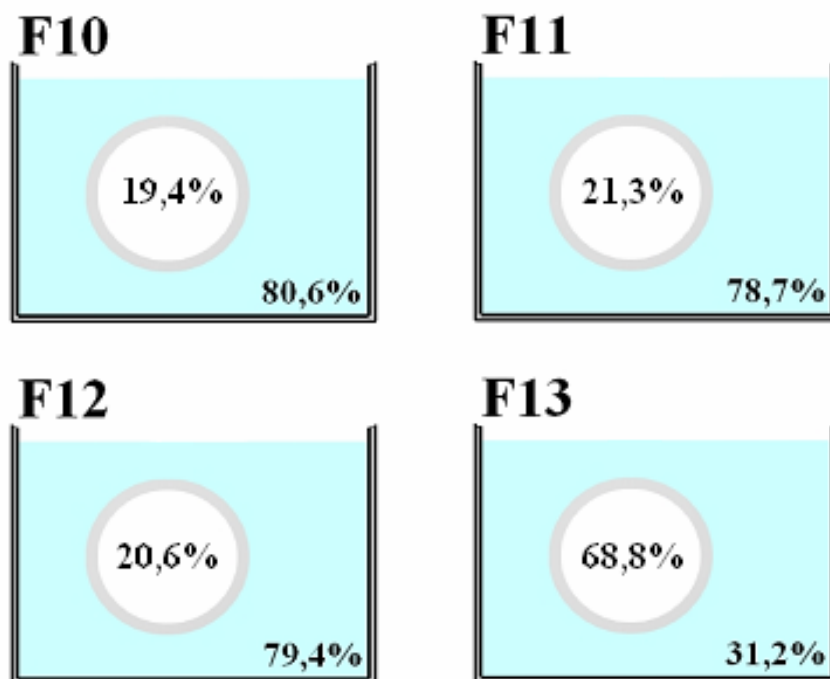


FIGURA 21. Desenho esquemático da distribuição do fármaco nas formulações preparadas pela técnica de suspensão-poliadição.

4. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE POLIURETANO PELA TÉCNICA DE MINIEMULSÃO.

Realizada em colaboração com Eric Cloutet e Henri Cramail, Laboratoire de Chimie des Polymères Organique (LCPO), Université Bordeaux 1, France.

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Levofloxacino (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos - LTDA)
- Isoforona diisocanato (IPDI, Aldrich),
- Poli(ol de origem natural (Kehl - LTDA),
- Poli(etileno glicol) Mw = 400 g/mol (PEG 400, Vetec),
- Dodecil sulfato de sódio (SDS, Aldrich),
- Poli(óxido de etileno)₇₇-poli(óxido de propileno)₂₉-poli(óxido de etileno)₇₇, Poloxamer (Pluronic F68, BASF),
- Polisorbato 80, poli(óxido de etileno)₂₀-monooleato de sorbitano (Tween 80; Beraca Ind. Com. LTDA)
- Óleo de oliva (Yola)
- Água Milli Q
- Estearase de fígado de porco, 24 unidades/mg de sólido, EC 3.1.1.1 lote 123K7033 (Sigma, Aldrich)
- Papaína de *Papaya látex*, 3,3 unidades/mg de sólido, EC 3.4.22.2 lote 045K2516 (Sigma, Aldrich)
- Solução HCl e NaOH 0,5 M e 5 M.
- Tampão fosfato pH = 7,4

4.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético e mecânico
- Balança Analítica
- Ultra Turrax®, T18, IKA
- Spectrofotômetro de fluorescência, Safas-Monaco.
- Microscópico eletrônico de transmissão, JEOL JEM - 2000FX

- Espectrofotômetro FTIR, Bruker Tensor 27.
- Zetasizer 3000 HSA, Malvern
- ALV 5000E, ALV
- Ultracentrífuga Beckman-Optima™ TLX.

4.2. Metodologia

4.2.1 Preparação de nanopartículas

Uma mistura de monômeros (10g) contendo diisocianato e polioli em uma relação molar $[NCO]/[OH] = 1,1$ e 3 % ou 5 % de óleo de oliva (em relação a quantidade de monômeros) foi adicionada a temperatura ambiente a soluções aquosas (Milli Q, Millipore) contendo um surfactante (entre o SDS, o tween 80 ou pluronic F68) em concentrações entre 5 e 20% em relação a quantidade de monômeros. A concentração de monômeros no meio de polimerização foi 5% para todas as formulações testadas.

As nanogotas dos monômeros foram obtidas usando um homogeneizador (Ultra-Turrax®, T18, IKA) em uma velocidade de 18000 rpm por 15 minutos. As dispersões foram mantidas sob agitação mecânica (800 rpm) a 60°C por 4 horas para permitir a formação completa do poliuretano, dispensando o uso de catalisador.

Em algumas formulações o PEG 400 ($M_w = 400 \text{ g mol}^{-1}$) foi adicionado como um co-monômero na substituição de 50 mol % do polioli natural, correspondendo a 30% (p/p) da quantidade de monômeros.

4.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A formação do poliuretano foi confirmada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no modo de ATR (Attenuated total reflection). Os latexes foram depositados em um cristal de ATR formando um filme e os espectros

foram realizados na região de 4000 – 500 cm^{-1} usando um espectrofotômetro Bruker - Tensor 27.

4.2.3 Tamanho de partícula

O tamanho de partícula foi medido em suspensão aquosa, por espalhamento de luz através de dois equipamentos Zetasizer 3000 HSA (Malvern) e ALV 5000E (ALV).

As amostras foram preparadas pela diluição de uma alíquota da formulação em água milli Q. Amostras sem filtração foram analisadas para se conhecer o tamanho real das partículas, pois pela técnica de miniemulsão somente nanopartículas foram sintetizadas. As medidas de espalhamento de luz a vários ângulos foram realizadas num equipamento ALV 5000E.

4.2.4 Morfologia das partículas

A morfologia das nanopartículas foi investigada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) num equipamento Jeol - JEM - 2000FX. As amostras foram preparadas pela deposição de gotas do látex de poliuretano em suportes específicos constituídos de grades de cobre com película de Formvar.

4.2.5 Potencial Zeta

O potencial zeta das formulações foi determinado após diluição das suspensões com água milli Q num equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments, UK).

4.2.6 Determinação da eficiência de encapsulação do levofloxacino nas nanopartículas por espectrofluorimetria.

Para a realização dos estudos de eficiência de encapsulação, 250 mg de levofloxacino foram adicionados à fase monomérica durante a síntese das nanopartículas. A eficiência de encapsulação percentual foi considerada como a diferença entre a concentração total do fármaco adicionado à formulação e aquela encontrada no sobrenadante após sedimentação das partículas por ultracentrifugação. A ultracentrifugação foi realizada a 50000 rpm por 2 horas numa temperatura de 20°C numa ultracentrífuga Beckman-Optima™ TLX.

O doseamento do levofloxacino e a determinação da eficiência de encapsulação foram realizados conforme descrito em 3.2.2.3.

4.2.7 Estudo de degradação *in vitro* das nanopartículas.

Este estudo realizado por espalhamento de luz conforme descrito em 3.4.

Os resultados do estudo de degradação serão discutidos no capítulo 5.

4.2.8 Estudo de liberação do levofloxacino a partir das nanopartículas.

O estudo de liberação foi realizado através do método de ultracentrifugação conforme descrito em 3.5.

Os resultados do estudo de liberação do levofloxacino serão discutidos no capítulo 6.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Preparação de nanopartículas

Para que a síntese de partículas de poliuretano seja bem sucedida pelo processo de miniemulsão, alguns requisitos são importantes:

- baixa solubilidade dos reagentes em água;
- a reação entre o diisocianato e o polioliol deve ser mais lenta do que o tempo necessário para a etapa da miniemulsão;
- a reação secundária do diisocianato com água no meio de polimerização deve ser mais lenta do que a reação entre o diisocianato e o polioliol. Para esta última exigência, é necessário considerar que a quantidade de moléculas de diisocianato localizadas na interface gota/água é muito menor do que aquelas localizadas dentro da gota (Tiarks *et al.* 2001).

Neste contexto, o IPDI por ser um diisocianato alifático e, portanto menos reativo, é o monômero de escolha para a síntese de poliuretanos por miniemulsão devido a sua reatividade lenta com a água que constitui o meio de polimerização (Torini *et al.* 2005).

O processo de poliadição foi conduzido entre IPDI e o polioliol natural ou uma mistura do polioliol e PEG 400 na presença do óleo de oliva como agente hidrofóbico e diferentes surfactantes em meio aquoso (figura 22).

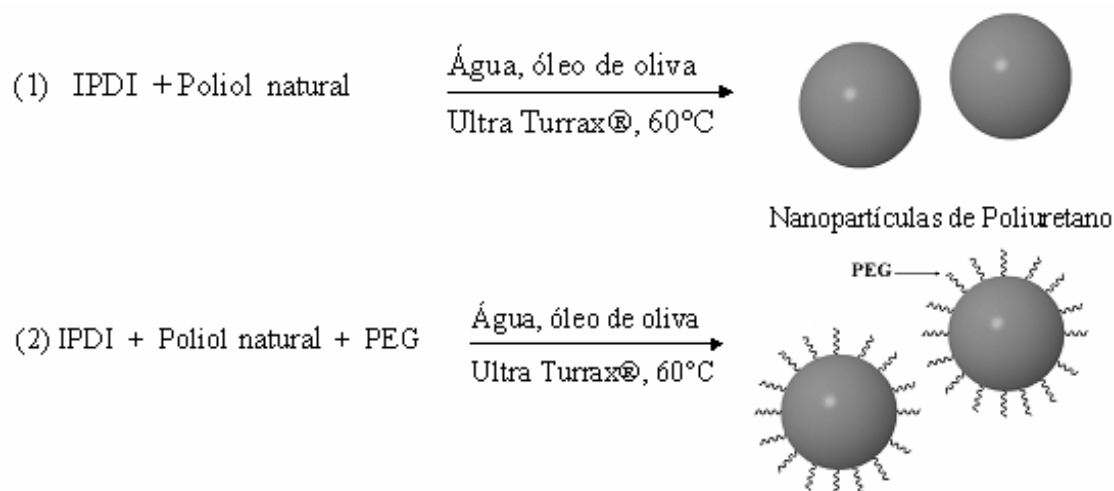


FIGURA 22. Esquema de formação das nanopartículas de poliuretano por miniemulsão.

A miniemulsão foi formada adicionando-se os monômeros e o agente hidrofóbico numa solução aquosa contendo surfactante a temperatura ambiente e usando um homogeneizador (Ultra Turrax®) com velocidades de agitação variando entre 10000 e 22000 rpm. A turbidez da formulação aumentou rapidamente nos primeiros minutos da homogeneização, tornando-se leitosa e permanecendo então constante (Figura 23).

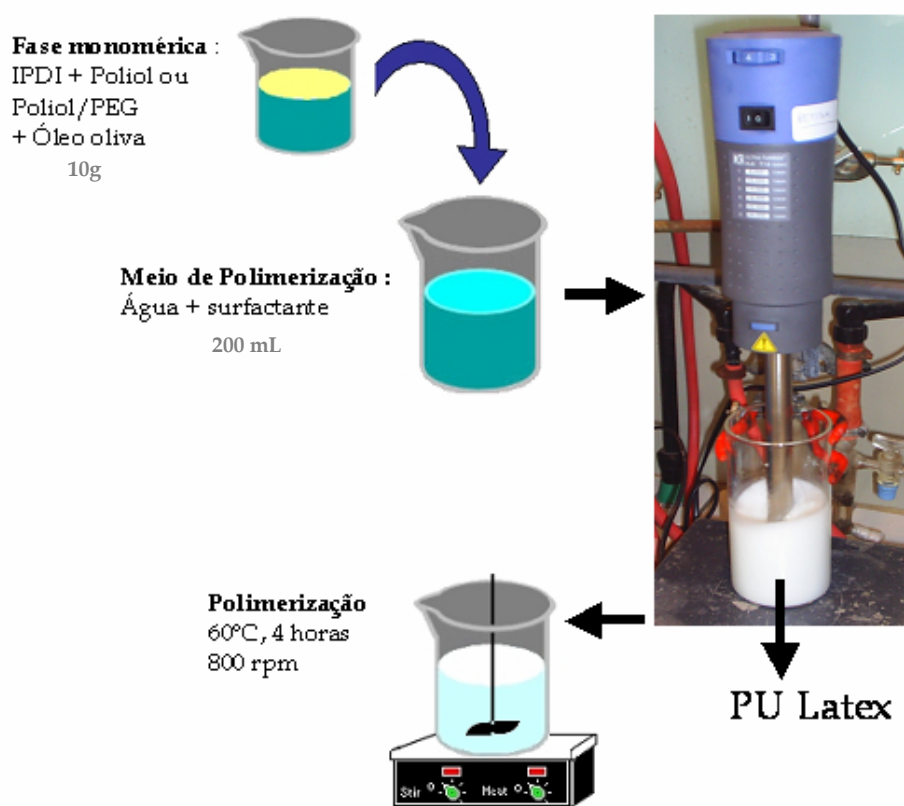


FIGURA 23. Esquema de preparação das nanopartículas de poliuretano por miniemulsão.

Em relação à formação das nanopartículas, os melhores resultados de distribuição de tamanho foram obtidos com agitação de 18000 rpm por 15 minutos. A etapa de polimerização foi realizada em 4 horas sob agitação mecânica de 800 rpm a 60°C. A polimerização foi realizada com agitação mecânica porque o uso de

homogeneizadores de alta potência poderia destruir a estabilidade de partículas do polímero durante da polimerização (Huang *et al.* 1998).

Na tabela 9 são apresentadas as formulações desenvolvidas por miniemulsão com diferentes misturas de monômeros e de surfactantes. É importante esclarecer que a composição das formulações preparadas por miniemulsão é diferente da composição das formulações preparadas por suspensão-poliadição. O nome de cada formulação sintetizada por miniemulsão é seguido pela letra “M”, e a designação numérica seguiu a ordem cronológica dos experimentos. Por exemplo, a formulação F10 foi preparada pela técnica de suspensão-poliadição e é constituída por MDI, poliol natural, 10% de PEG e tween 80 e span 80 como tensoativos. Já a formulação F10M foi preparada pela técnica de miniemulsão e é constituída por IPDI, poliol natural, 30 % de PEG, tween 80 como tensoativo e óleo de oliva como agente hidrofóbico.

TABELA 9. Nanopartículas de poliuretano sintetizadas por miniemulsão usando 3 % (p/p) de óleo de oliva (versus quantidade de monômeros) como agente hidrofóbico.

| Latex | Monômeros (g) | Surfactante (massa % vs monômeros) | Rendimento ^a (%) | Diâmetro médio das partículas ^b (nm) | IP ^c |
|-------------------|-----------------------------------|--|--------------------------------|---|-----------------|
| F10M | Poliol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Tween 20,0 | 97 | 261 (100%) ^d | 0,39 |
| F11M | Poliol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Tween 10,0 | 97 | 282 (100%) | 0,37 |
| F12M | Poliol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Tween 5,0 | 88 | 292 (100%) | 0,35 |
| F13M | Poliol 7,0 IPDI 3,0 | Tween 5,0 | 58 | 297 (100%) | 0,36 |
| F16M | Poliol 7,0 IPDI 3,0 | Tween 20,0 | 96 | 246 (100%) | 0,40 |
| F18M ^e | Poliol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Tween 10,0 | 92 | 194 (59%) 661 (41%) | 0,42 |
| F19M | Poliol 3,6 PEG 3,1 | SDS 10,0 | 53 | 463 (53%) 2473 (47%) | 0,94 |

| | | | | | | | |
|------|--------|-----|----------|------|----|------------|------|
| | IPDI | 3,3 | | | | | |
| F20M | Poliol | 3,6 | Pluronic | 10,0 | 86 | 285 (100%) | 0,31 |
| | PEG | 3,1 | | | | | |
| | IPDI | 3,3 | | | | | |

- Medido por gravimetria;
- Determinado por espalhamento de luz (Zetasizer/Malvern);
- Índice de Polidispersidade, determinado por Malvern;
- Valor percentual da distribuição de tamanho;
- Formulação preparada com 5 % de óleo de oliva.

Em geral o tamanho das partículas variou entre 200 e 300 nm e o índice de polidispersidade foi entre 0,3 e 0,4.

A quantidade de surfactante afetou o tamanho de partícula. O diâmetro médio das partículas diminuiu gradualmente de 292 nm para 261 nm quando a quantidade de tween 80 aumentou de 0,5 para 2,0 g (tabela 9, F10M, F11M e F12M). Os melhores resultados em relação à distribuição do tamanho de partícula foram obtidos quando tween e pluronic foram utilizados como surfactantes e serão discutidos posteriormente.

Enquanto o uso de macrodiol hidrofílico na preparação de dispersões aquosas de poliuretanos tem sido apresentado na literatura por reduzir o tamanho de partícula (Tiarks *et al.* 2001; Zanetti-Ramos *et al.* 2005; Durrieu *et al.* 2005) nós observamos que partículas com diâmetro ligeiramente maior foram obtidas quando o PEG 400 foi usado como co-monômero na miniemulsão.

A presença de PEG aumentou o diâmetro das partículas de 246 para 261 nm (tabela 9, F10M e F16M). Este fenômeno diferente da influência do PEG no tamanho das partículas que observamos entre as duas técnicas utilizadas neste trabalho pode ser atribuído ao efeito do agente hidrofóbico adicionado na miniemulsão. O papel do agente hidrofóbico é criar uma barreira na partícula que impeça a troca de massa entre elas em decorrência das colisões durante a síntese. Esta barreira pode ter impedido ou reduzido a saída do PEG da gota de monômero para o meio de polimerização, que foi sugerido como causa da redução no tamanho de partícula na técnica de suspensão-poliadição (ver figura 11).

4.3.2 Caracterização do polímero por FTIR

A formação do poliuretano foi monitorada por FTIR no modo ATR. A reação completa de poliadição entre IPDI e polioliol ou IPDI e Polioliol/PEG400 foi confirmada pela análise de FTIR-ATR. Como exemplo, os espectros FTIR-ATR de algumas formulações são apresentados na Figura 24 comparativamente aos espectros dos monômeros IPDI e polioliol. Uma atenção particular foi dada à banda de vibração do isocianato situada em 2235 cm^{-1} para acompanhar a formação do poliuretano. Conforme mostrado na figura 24, esta banda desapareceu completamente nas amostras (F10M e F16M). Além disso, a vibração NH em 3300 cm^{-1} , a vibração carbonila em 1743 cm^{-1} e a vibração C-N do grupo amida em 1550 cm^{-1} são fortes evidências da formação do poliuretano (Tiarks *et al.* 2001; Durrieu *et al.* 2004).

A faixa de absorção entre 1000 e 1300 cm^{-1} foi usada para identificar o PEG 400 na formulação F10M (Jabbari e Khakpour, 2000). Quando o PEG foi adicionado como co-monômero (F10M) a reação entre o isocianato e a água ocorreu e a formação de uréia foi evidenciada (pico em 1635 cm^{-1}). Na ausência do PEG (F16M) a vibração em 1635 cm^{-1} (carbonila da uréia) é menos intensa indicando que a reação do isocianato com água é secundária. A formação de uréia na formulação F10M pode ser explicada pela hidrofiliabilidade do PEG que favorece a reação entre o isocianato e a água.

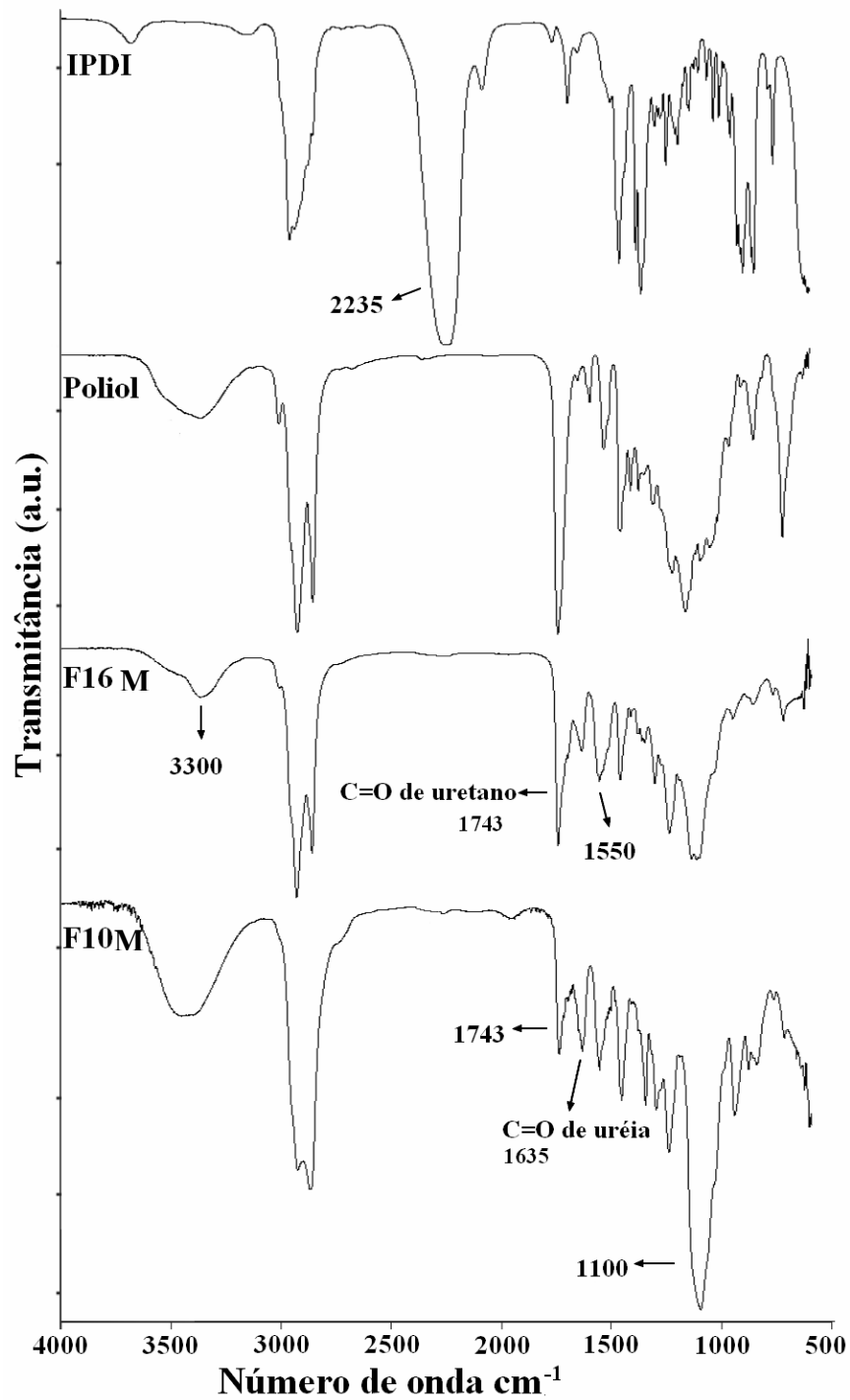


FIGURA 24. Espectros FTIR-ATR do IPDI, Poliol, F16M (poliol e IPDI) e F10M (poliol, PEG e IPDI).

4.3.3 Determinação do tamanho de partícula

Em miniemulsão, a formulação apropriada resulta em partículas que têm aproximadamente o mesmo tamanho das gotas iniciais (Landfester *et al.* 2000). Na polimerização por miniemulsão, o tamanho das partículas é determinado pela densidade do monômero, pela solubilidade do monômero, pela quantidade de surfactante e de agente hidrofóbico, mas inicialmente o tamanho da gota é uma função da potência da homogeneização (Fontenot e Schork, 1993).

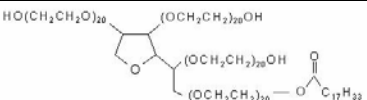
Neste trabalho, o tamanho das partículas de poliuretano baseado em um polioli natural sintetizadas pela técnica de miniemulsão foi influenciado pelo tipo e concentração de surfactante, velocidade de agitação e quantidade de agente hidrofóbico conforme será discutido a seguir.

4.3.3.1 Efeito do tipo de surfactante

Para as formulações preparadas por miniemulsão, uma grande variedade de surfactantes aniônicos, catiônicos e não-iônicos pode ser usada, resultando em dispersões poliméricas estáveis e diferentemente carregadas. Surfactantes aniônicos e catiônicos têm sido relatados na formação de gotas monodispersas entre 30 e 200 nm enquanto que surfactantes poliméricos ou oligoméricos não iônicos formam gotas entre 100 e 800 nm (Landfester, 2001). A maioria dos protocolos descritos na literatura utiliza o dodecil sulfato de sódio (SDS) como modelo de surfactante.

Em nosso estudo, utilizamos o SDS e dois surfactantes não-iônicos, o tween 80 e o pluronic F68 (tabela 10).

TABELA 10. Características dos surfactantes usados nas formulações sintetizadas por miniemulsão.

| Surfactante | Estrutura | Tipo | Mw (g mol ⁻¹) | CMC * |
|-------------|---|------------|---------------------------|--------------------------|
| Tween 80 |  | Não-iônico | 1310 | 1,2 x 10 ⁻⁵ M |

| | | | | |
|--------------|---|------------|------|--------------------------------|
| Pluronic F68 | $\text{OH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{77}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})_{28}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{77}\text{H}$ | Não-iônico | 8400 | $1,3 \times 10^{-2} \text{ M}$ |
| SDS | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2\text{O}^- \text{ Na}^+$ | Iônico | 288 | $8,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ |

* Concentração Micelar Crítica obtida da literatura (Merck Index).

O surfactante SDS não foi eficiente em nosso sistema, resultando em um baixo rendimento (cerca de 53%) e em partículas com duas populações de tamanho (tabela 9, F19M). Por outro lado, os surfactantes não-iônicos deram origem a partículas com distribuição monomodal de tamanho e bom rendimento de formulação (ver tabela 9). As partículas sintetizadas com tween 80 ou pluronic F68 foram muito similares em termos de rendimento e tamanho de partícula (tabela 9, F11M e F20M) o que demonstra que os dois surfactantes tiveram eficiência semelhante para o sistema estudado. Tween e pluronic podem ser considerados como surfactantes poliméricos que estabilizam a miniemulsão por efeito estérico, o que parece ser mais apropriado para a estabilização de grandes monômeros como o polioliol natural.

O efeito da concentração que será discutido a seguir foi testado somente com o tween 80. Convém ressaltar que o tween 80 é utilizado em vários produtos farmacêuticos e cosméticos por apresentar custo atrativo e baixa toxicidade (Simões *et al.* 2005). Por outro lado o SDS, o surfactante mais utilizado na miniemulsão, apresenta problemas de toxicidade por atacar a estrutura das membranas (Sirisattha *et al.* 2004).

4.3.3.2 Efeito da concentração de surfactante

A concentração de tween 80 variou de 5 a 20% (em relação à quantidade de monômeros). É importante notar que a concentração de surfactante usada na polimerização por miniemulsão geralmente é abaixo do valor da CMC (concentração micelar crítica) para evitar uma polimerização micelar colateral (Huang *et al.* 1998). Surpreendentemente, não foram observadas diferenças na distribuição do tamanho de partícula quando as formulações foram preparadas com quantidades de

surfactantes acima ou abaixo do seu valor de CMC. Por exemplo, as formulações F11M (preparada com tween 80, 5mg/mL = 4mM) e F20M (preparada com Pluronic F68, 5mg/mL = 0,6mM) mostraram resultados similares em termos de características de partícula mesmo nas concentrações de surfactante acima e abaixo dos valores de CMC, respectivamente.

Foi observado ainda que uma concentração mínima de 5% de tween 80 (em relação à quantidade de monômeros) foi necessária para estabilizar as partículas e evitar a agregação.

O rendimento da formulação foi aumentado em maiores concentrações de surfactante (tabela 9 e Figura 25). O aumento da concentração de surfactante pode promover uma melhor estabilização das gotas de monômeros e gerar portanto, melhor rendimento de formulação.

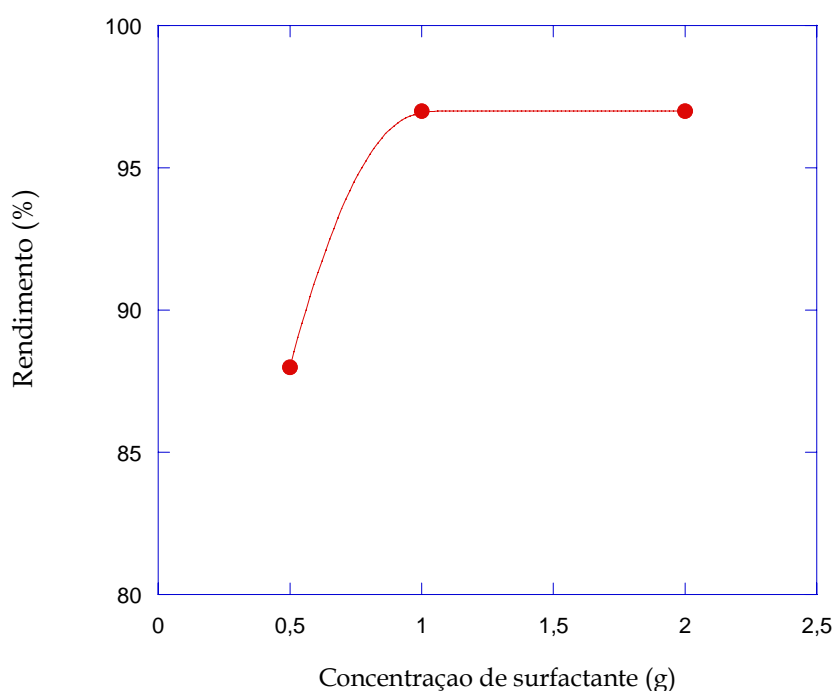


FIGURA 25. Efeito da concentração de surfactante sobre o rendimento da formulação (%).

Em acordo com dados da literatura (Delgado *et al.* 1986; Landfester *et al.* 1999; Feng e Huang, 2001; Luo e Zhou, 2004) o tamanho das partículas diminuiu quando a concentração do surfactante aumentou de 5% para 20% (Figura 26).

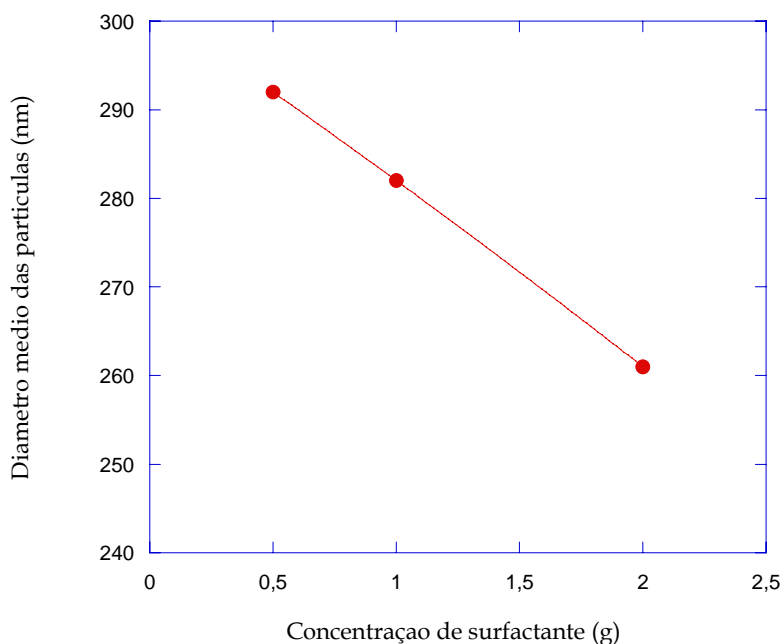


FIGURA 26. Efeito da concentração de surfactante sobre o diâmetro médio das partículas (nm).

O rendimento da formulação contendo PEG como co-mônômero e 5% de tween 80 foi de 88% (Tabela 9, F12M). Quando a mesma concentração de tween foi empregada na ausência de PEG, o rendimento da formulação foi reduzido a 58% (Tabela 9, F13M) (Figura 27). Esta redução de rendimento na ausência de PEG pode estar associada com o efeito cosurfactante do PEG, que pode ajudar na estabilidade das partículas.

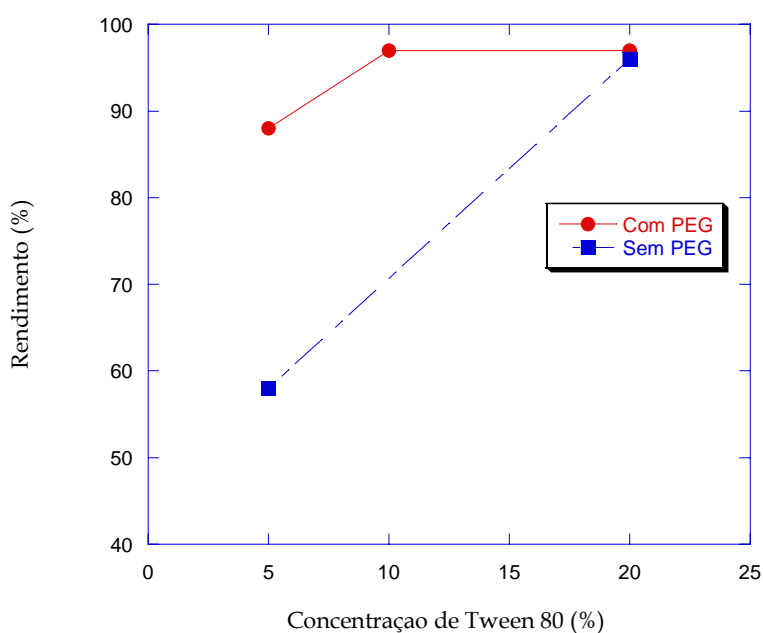


FIGURA 27. Rendimento em função da concentração de tween 80 e da adição de PEG.

4.3.3.3 Efeito do agente hidrofóbico

O agente hidrofóbico tem um papel importante na polimerização por miniemulsão no sentido de prevenir o efeito Oswald (troca de massa entre as gotas de monômeros). A efetividade do agente hidrofóbico aumenta com a diminuição da sua solubilidade em água (meio de polimerização) (Landfester, 2001). O óleo de oliva tem sido descrito na literatura como substância modelo para testar suspensões óleo/água (Freitas *et al.* in press) e como carreador em cosméticos (Murkovic *et al.* 2004; Gurib-Fakim, 2005). No entanto, existem poucos relatos a respeito do uso de óleo de oliva ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$) como agente hidrofóbico em polimerização por miniemulsão. O óleo de oliva foi escolhido neste estudo como agente hidrofóbico devido a sua baixa solubilidade em água e a sua compatibilidade com o poliol natural. O hexadecano também foi testado em nosso sistema, porém deu origem a agregados e um baixo rendimento de formulação (dados não apresentados).

Uma distribuição bimodal no tamanho de partícula foi observada na formulação F18M quando uma maior quantidade de agente hidrofóbico foi empregada. Este resultado está de acordo com Landfester (2003) que descreveu que maiores quantidades de agente hidrofóbico aumentam as gotas em tamanho até que a pressão osmótica em todas as gotas seja equilibrada, criando uma dispersão bimodal.

4.3.3.4 Efeito da velocidade de agitação

Com a intenção de investigar o efeito da velocidade de agitação sobre a formação das partículas, a formulação F11M foi sintetizada com diferentes taxas de agitação entre 10000 e 22000 rpm (tabela 11).

TABELA 11. Diâmetro médio das partículas, Índice de polidispersidade e Rendimento em função da velocidade de agitação.

| Latex | Monômeros (g) | Velocidade de agitação ^a (rpm) | Rendimento ^b (%) | Diâmetro médio das partículas ^c (nm) | IP ^d |
|-------|---------------|---|-----------------------------|---|-----------------|
| F21M | Poliol | 3,6 | 10000 | 245 (48%) ^e | 0,86 |
| | PEG | 3,1 | | | |
| | IPDI | 3,3 | | | |
| F23M | Poliol | 3,6 | 14000 | 279 (100%) | 0,39 |
| | PEG | 3,1 | | | |
| | IPDI | 3,3 | | | |
| F11M | Poliol | 3,6 | 18000 | 282 (100%) | 0,37 |
| | PEG | 3,1 | | | |
| | IPDI | 3,3 | | | |
| F22M | Poliol | 3,6 | 22000 | 306 (100%) | 0,39 |
| | PEG | 3,1 | | | |
| | IPDI | 3,3 | | | |

a. Ultra-Turrax®;

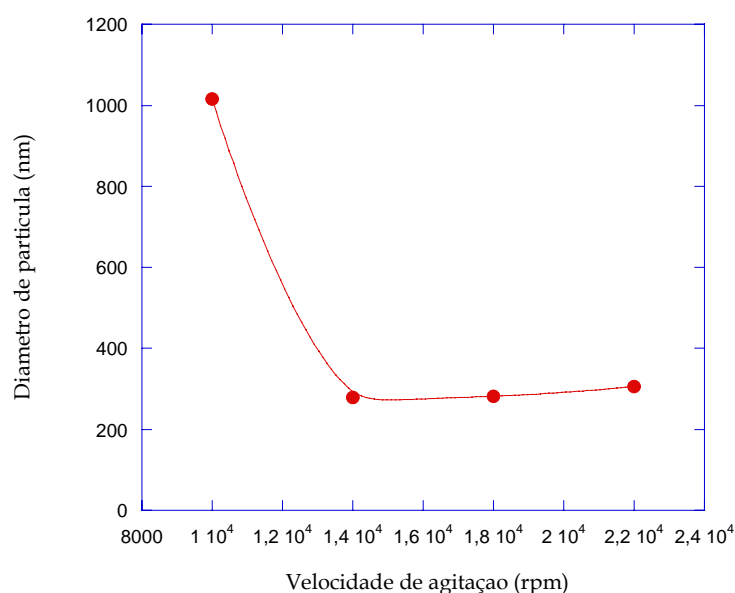
b. Medido por gravimetria;

c. Determinado por espalhamento de luz (Zetasizer/Malvern);

d. Índice de Polidispersidade, determinado pelo Malvern;

e. Valor percentual da distribuição de tamanho.

O diâmetro médio das partículas foi afetado pela velocidade de agitação do Ultra-Turrax® (Figura 28).

**FIGURA 28.** Efeito da velocidade de agitação sobre o diâmetro médio de partícula (nm).

O aumento da velocidade de agitação não reduziu o diâmetro de partícula que foi em torno de 290 nm, pois na miniemulsão o tamanho é controlado por um fator mais importante que é a utilização do agente hidrofóbico que visa gerar partículas poliméricas com aproximadamente o mesmo tamanho. Entretanto, uma homogeneização eficaz é importante para a obtenção de partículas com distribuição monomodal de tamanho. Conforme pode ser observado na tabela 11, a velocidade de 10.000 rpm foi insuficiente para uma boa homogeneização do sistema e partículas com distribuição bimodal foram obtidas onde 52% apresentaram o diâmetro médio de 1016 nm e 48% diâmetro de 245 nm. Kawahara *et al.* (2001) observaram que o aumento da velocidade de agitação de 4000 para 12000 rpm reduziu o tamanho das partículas de resina epóxido/acrilato (de 3000 para 300 nm) preparadas por polimerização miniemulsão, mas uma distribuição bimodal foi obtida em ambas as velocidades de agitação.

A homogeneização de emulsões no processo de miniemulsão pode ser obtida por diferentes métodos. A maioria dos artigos descreve o uso da ultrasonificação, mas o uso do omni-mixer e ultra-turrax também são descritos. A ultrasonificação é usada especialmente para a homogeneização de pequenas quantidades enquanto que homogeneizadores de alta pressão são necessários para a emulsificação de grandes quantidades (Landfester, 2001).

Tang *et al.* (1991) estudaram a polimerização de miniemulsões preparadas com diferentes homogeneizadores e observaram que a miniemulsão preparada com microfluidizer é mais rápida e resulta em partículas menores e mais uniformes que aquelas preparadas com omnimixer.

Abismail *et al.* (1999) e Landfester (2001) descreveram que o uso de homogeneizadores de mistura como o ultra-turrax não é suficiente para a obtenção de partículas pequenas e com boa distribuição de tamanho. Entretanto, em contradição com a literatura, observamos no presente trabalho, que o Ultra Turrax® demonstrou ser um bom homogeneizador na obtenção de nanopartículas de poliuretano pela técnica de miniemulsão.

4.3.4 Espalhamento de luz

As amostras foram diluídas em água milli Q e analisadas por espalhamento de luz dinâmico (ALV) sem previa filtração. A figura 29 apresenta a função de correlação obtida em diferentes ângulos $\theta = 60^\circ, 90^\circ$ e 120° em temperatura de 25°C para as amostras F10M e F16M. É importante notar que as funções de correlação são representadas por curvas monoexponenciais indicando a boa correlação da amostra.

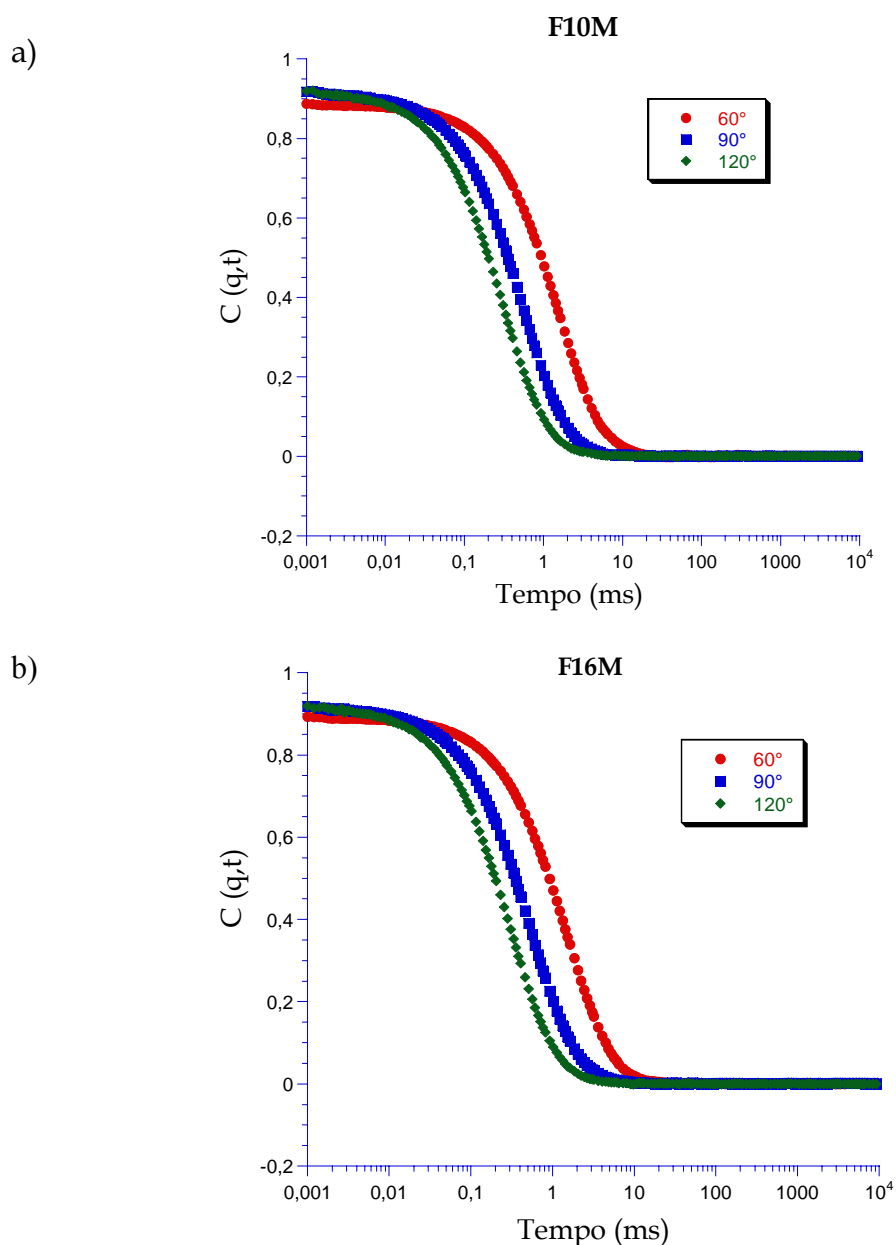


FIGURA 29. Funções de correlação medidas a 25°C e ângulos de $\theta = 60^\circ, 90^\circ$ e 120° para (a) F10M (com PEG) e (b) F16M (sem PEG), respectivamente.

Para ambas as formulações (F10M e F16M), o raio hidrodinâmico das partículas foi determinado usando o equipamento ALV 5000E e foi igual a 131 e 113 nm, respectivamente (Figura 30).

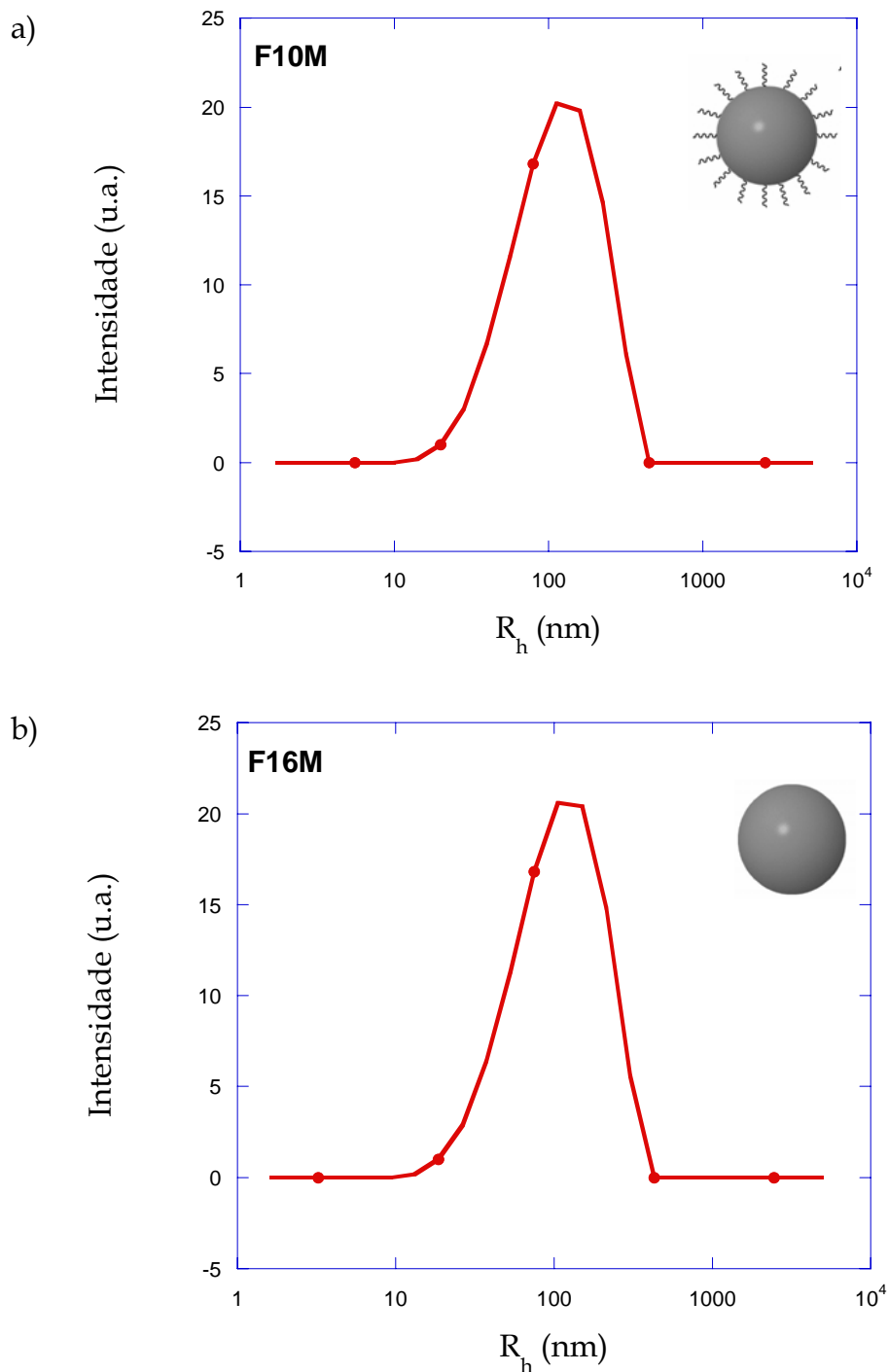


FIGURA 30. Raio hidrodinâmico R_h (nm) das formulações F10M (com PEG) (a) e F16M (sem PEG) (b)

A variação angular da frequência $\Gamma = 1/\tau_s$ medida em função de q^2 indica um movimento difusivo da amostra (Pecora, 1985), com coeficiente de difusão $D = 2,2 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (Figura 31) e a existência de objetos esféricos.

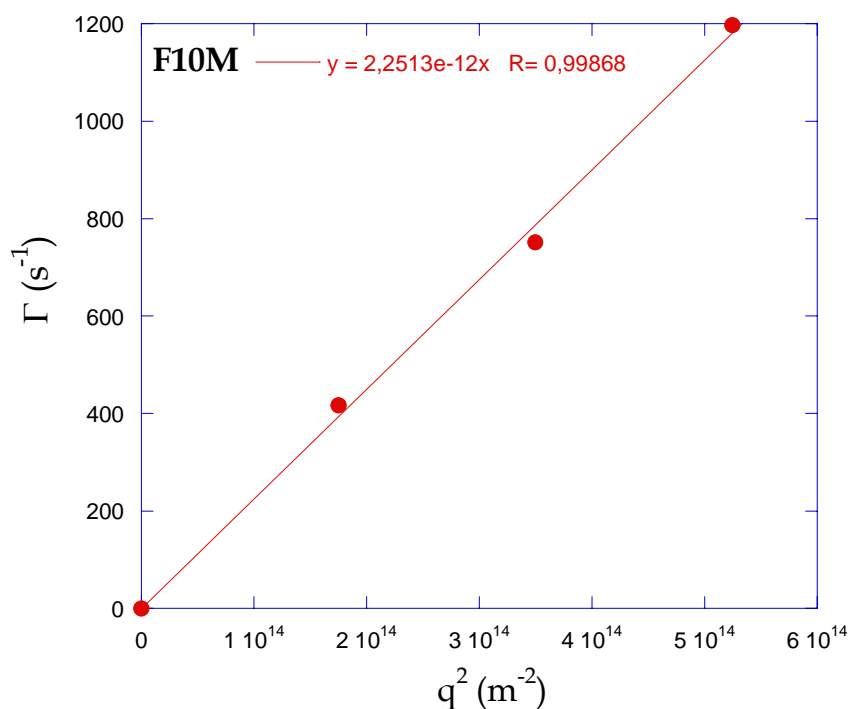


FIGURA 31. Γ versus q^2 para formulação F10M.

4.3.5 Análise da morfologia

Imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), do látex de poliuretano sintetizado pela técnica de polimerização por miniemulsão são apresentadas nas figuras 32 e 33. O tamanho das partículas observado por MET está em acordo com os resultados obtidos por espalhamento de luz.

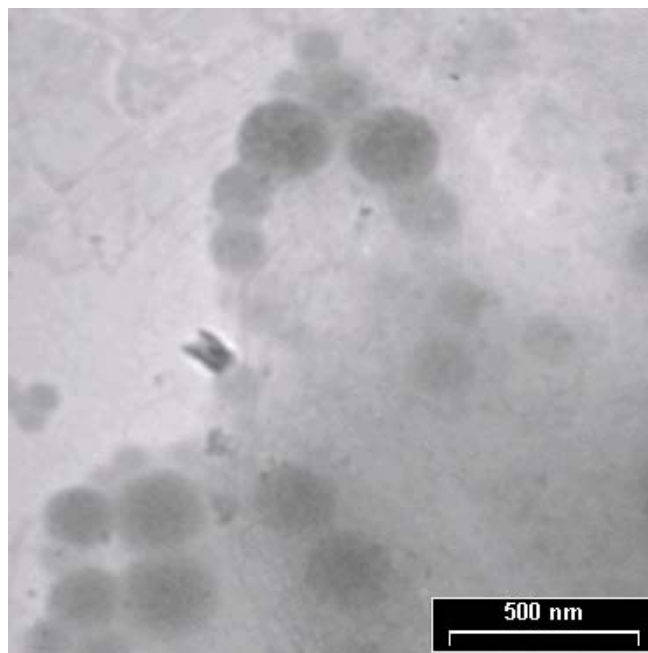


FIGURA 32. Imagem obtida por MET das partículas de poliuretano obtidas por miniemulsão.

A figura 33 apresenta a estrutura das nanopartículas de poliuretano preparadas com PEG como co-mônômero. Neste caso, uma fração de PEG (diol hidrofílico) pode migrar para a interface partícula/água formando uma camada protetora ao redor da partícula. A estrutura destas nanopartículas pode ter sido influenciada pela adição do agente hidrofóbico, que por agir como uma barreira na gota de monômeros pode ter impedido a saída do PEG para a fase aquosa, fazendo com que ele permanecesse na interface partícula/meio de polimerização e contribuindo desta maneira para a ocorrência de ligações de PEG na superfície das partículas. Nas partículas sintetizadas pela técnica de suspensão-poliadição, onde o agente hidrofóbico não foi utilizado, o PEG pôde migrar para a fase aquosa tornando as partículas porosas e influenciando na redução de tamanho das mesmas. Infelizmente, não é possível analisar a porosidade das nanopartículas pela técnica de MET.

A cobertura das nanopartículas pelo PEG é muito importante para evitar a resposta imune (ataque de macrófagos) e aumentar o tempo de circulação das partículas no sangue (Gref *et al.* 1995; Fontana *et al.* 2001, Ahsan *et al.* 2002). Portanto,

as partículas desenvolvidas podem ser úteis para a encapsulação de fármacos para aplicação endovenosa.

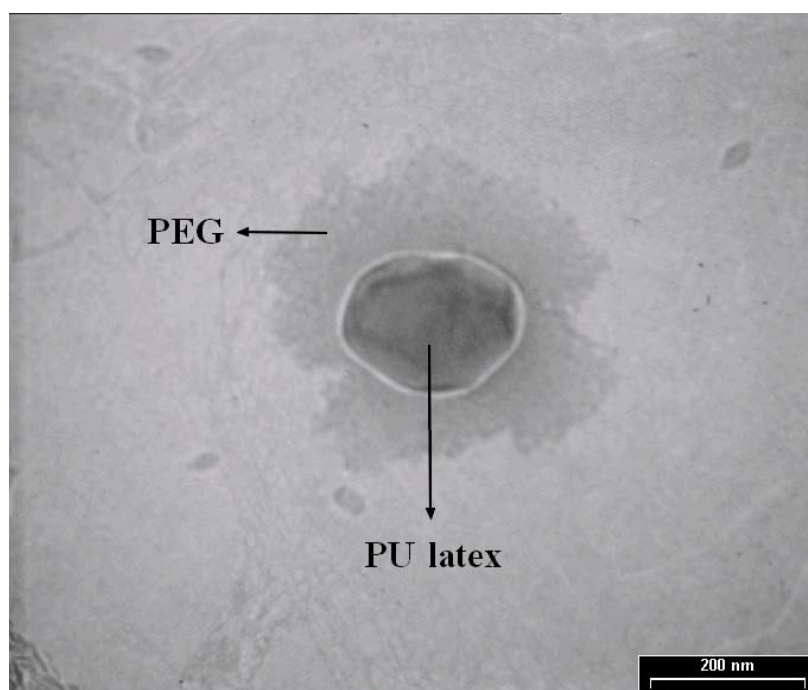


FIGURA 33. Imagem obtida por MET da formulação F10M preparada com PEG.

4.3.6 Potencial Zeta

O potencial zeta das formulações medido após diluição das amostras em água milli Q está apresentado na tabela 12.

TABELA 12. Potencial zeta das partículas e pH das formulações preparadas por miniemulsão.

| Formulação | Potencial Zeta (mV) | pH |
|-----------------|---------------------|-----|
| F10M | - 22,1 | 6,9 |
| F11M (Tween 80) | - 23 | 6,8 |
| F12M | - 31,5 | 7,1 |
| F13M | - 34,6 | 7,1 |
| F16M | - 16,2 | 7,1 |
| F18M | - 31,9 | 7,0 |
| F19M (SDS) | - 52,3 | 6,8 |

| | | |
|--------------------------|--------|-----|
| F20M (Pluronic F68) | -25 | 6,9 |
| <u>Com levofloxacino</u> | | |
| F10M | - 29,1 | 7,6 |
| F16M | - 28,8 | 7,0 |

As medidas do potencial zeta foram realizadas num n = 5.

Todas as formulações foram preparadas com PEG, exceto as formulações F13M e F16M.

A composição das formulações encontram-se descritas na tabela 9.

A adição de poli(etileno glicol) também reduziu o potencial zeta das nanopartículas preparadas pela miniemulsão, de -34,6 para -22,1 mV se compararmos a formulação F13M preparada sem PEG e a formulação F10M preparada com PEG. Entretanto, quando a quantidade de tensoativo foi aumentada na formulação preparada sem PEG (F16M) o potencial zeta foi reduzido para -16,2 mV.

A redução nos valores do potencial zeta também é uma evidência da presença do PEG na superfície das partículas estando de acordo com as imagens obtidas por MET.

A influência do tipo de surfactante pôde ser observada quando a mesma formulação foi preparada com diferentes tipos de surfactante (F11M, F19M e F20M). A formulação F19M, preparada com SDS, apresentou o maior valor de potencial zeta (-52,3 mV) devido ao surfactante ser do tipo aniônico e conferir carga negativa à partícula. Valores próximos de potencial zeta foram observados para as formulações F11M (-23 mV) e F20M (-25 mV) que foram preparadas com tween 80 e pluronic F68, respectivamente. Estes dois surfactantes são do tipo não iônico e, portanto não influenciam na carga da partícula, mas podem reduzir o potencial zeta em função do seu recobrimento.

A redução na concentração de Tween 80 aumentou o valor do potencial zeta (ver tabela 12, F10M - F12M), indicando um menor revestimento de tensoativo na superfície das partículas quando a concentração do mesmo é reduzida.

Quando o levofloxacino foi adicionado às formulações o potencial zeta aumentou de -22,1 para -29,1 mV para a formulação F10M e de -16,2 para -28,8 mV para a F16M. Este aumento nos valores do potencial zeta pode indicar a presença de fármaco não encapsulado na superfície das partículas.

O agente hidrofóbico (óleo de oliva) também parece influenciar no potencial zeta das partículas. Um aumento no potencial zeta foi verificado para a formulação F18M preparada com 5% de agente hidrofóbico (-31,9 mV) em relação a formulação F11M preparada com 3% de agente hidrofóbico (-23 mV).

4.3.7 Doseamento

O doseamento do levofloxacino nas formulações preparadas por miniemulsão foi realizado conforme descrito em 3.6.8. A tabela 13 apresenta os valores referentes ao doseamento e a eficiência de encapsulação.

TABELA 13. Doseamento e eficiência de encapsulação das formulações preparadas por miniemulsão.

| Formulação | C_T^a | | C_S^b | | Eficiência de Encapsulação | |
|----------------|---------|-----|---------|------|----------------------------|------|
| | mg/mL | % | mg/mL | % | mg/mL | % |
| F10M (com PEG) | 1,25 | 100 | 0,65 | 52,1 | 0,60 | 47,9 |
| F16M (sem PEG) | 1,25 | 100 | 0,66 | 52,9 | 0,59 | 47,1 |

^a C_T : Concentração total de levofloxacino adicionada à formulação;

^b C_S : Concentração de levofloxacino encontrada no sobrenadante após ultracentrifugação a 50000 rpm por 2 horas.

Conforme pode ser observado na tabela 13, a utilização do PEG como comonômero na síntese de nanopartículas de poliuretano por miniemulsão não afetou a eficiência de encapsulação do levofloxacino que foi próxima a 48%. O uso do agente hidrofóbico, fundamental na técnica de miniemulsão, pode ter sido o responsável por estes valores semelhantes de encapsulação nas formulações contendo ou não PEG. O agente hidrofóbico pode ter agido como uma barreira de impedimento para a saída do fármaco no momento da polimerização.

A figura 34 apresenta um desenho esquemático da distribuição do fármaco nas formulações.

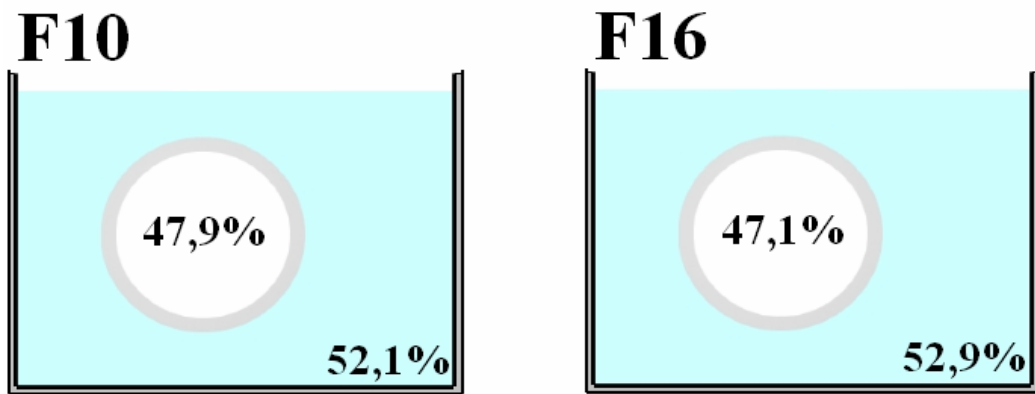


FIGURA 34. Distribuição do levofloxacino nas formulações preparadas por miniemulsão.

**5. DEGRADAÇÃO *IN VITRO* DAS PARTÍCULAS DE
POLIURETANO**

A utilização de polímeros biodegradáveis na área de encapsulação de agentes ativos contribuiu para a melhoria dos sistemas de liberação de fármacos, pois os mesmos sendo degradados no organismo dispensam a necessidade de intervenção cirúrgica para removê-los após terem sido aplicados. Geralmente os ensaios de degradação são realizados em condições específicas e determinam o percentual de degradação através da diferença entre a massa inicial da amostra e a massa final após a realização do ensaio (Kim e Kim, 1998) ou consumo de oxigênio, ou seja, resultados macroscópicos. A quantificação da degradação pela perda de massa é interessante para filmes poliméricos, mas em nossos estudos preliminares, verificamos que esta metodologia não é adequada para quantificar a degradação de micro e nanopartículas (dados não apresentados). A degradação química e enzimática envolve a hidrólise da cadeia polimérica e dependem de propriedades micro e macroscópicas como a estrutura química, massa molar, morfologia, tamanho e forma da partícula.

A degradação de nanopartículas em particular, ainda é pouco explorada e o emprego da técnica de espalhamento de luz para quantificar a degradação destes sistemas tem sido descrita principalmente pelo grupo de Chi Wu (Wu e Gan, 1997; Zhao *et al.* 1990; Zhao *et al.* 2004; Fu e Wu, 2001).

O espalhamento de luz por ser um método sensível e largamente usado como método analítico na caracterização de polímeros e colóides em solução será utilizado neste estudo para monitorar *in situ* a degradação química e enzimática das nanopartículas poliméricas pela mudança da intensidade do espalhamento e distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas (Wu e Gan 1997).

A metodologia empregada neste estudo foi descrita no item 3.4 e este capítulo é reservado para os resultados e discussões do estudo de degradação das partículas de poliuretano sintetizadas pelas técnicas de suspensão-poliadição e miniemulsão. A tabela 14 descreve as formulações submetidas ao teste de degradação com informações relevantes para a discussão deste capítulo.

TABELA 14. Descrição das formulações submetidas ao teste de degradação.

| Formulação | Técnica de síntese | Presença do PEG | Tipo de diisocianato |
|------------|--------------------------|-----------------|----------------------|
| F12 | Suspensão- poliadição | sim | MDI |
| F13 | Suspensão- poliadição | não | MDI |
| F10M | Miniemulsão | sim | IPDI |
| F16M | Miniemulsão | não | IPDI |

5.1 Efeito do aquecimento sobre a degradação

Para este teste, as amostras foram diluídas com água milli Q e aquecidas a 80°C. A degradação foi acompanhada por medidas de espalhamento de luz com ângulo de 90° pelo período de um mês.

Com exceção da formulação F13, preparada pela técnica de suspensão-poliadição e sem a presença de PEG, as demais formulações apresentaram redução nos valores de intensidade indicando a degradação. Por exemplo, as formulações preparadas com PEG (F12 e F10M) sofreram degradação de 25% no período de 30 dias (Figura 35).

As partículas da formulação F13 por apresentarem estrutura mais compacta e lisa podem ter menor susceptibilidade para a degradação. Outro fator que pode estar associado à menor degradação desta formulação é o fato de ela ter sido preparada com o MDI, que é um diisocianato aromático. Segundo a literatura, os poliuretanos derivados de diisocianatos alifáticos são degradados mais rapidamente que àqueles derivados de diisocianatos aromáticos (Chandra e Rustgi, 1997). Isto pode explicar porque a formulação F16M preparada com IPDI, um diisocianato alifático, apresentou boa degradação mesmo tendo sido preparada sem PEG.

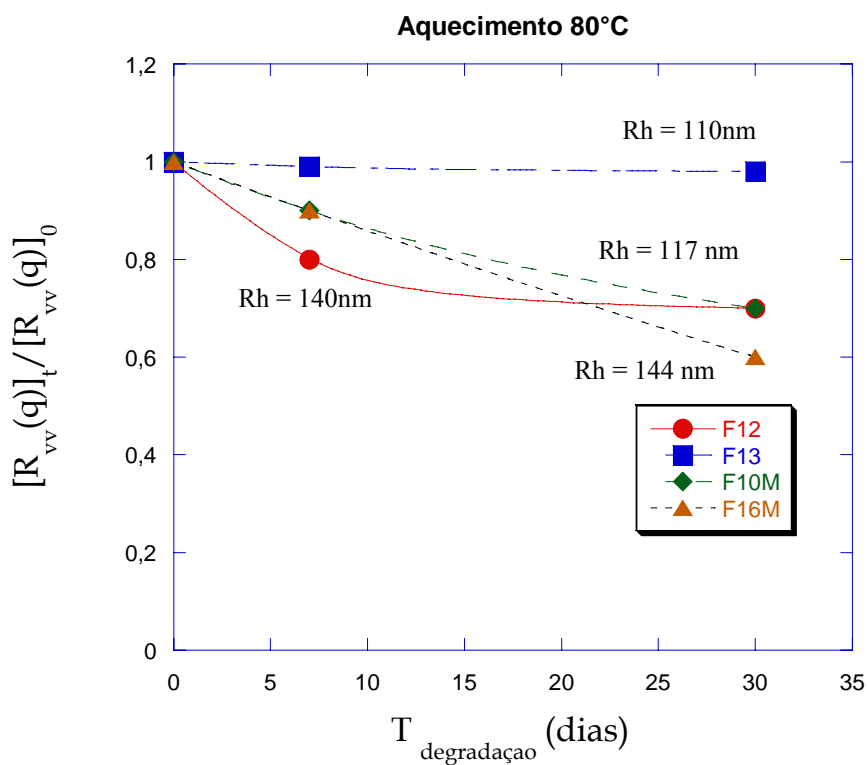


FIGURA 35. Cinética de degradação das nanopartículas submetidas ao aquecimento de 80°C onde $[R_{vv}(q)]_0$ e $[R_{vv}(q)]_t$ é a razão de Rayleigh no tempo zero e no tempo t, respectivamente. $\theta = 90^\circ$.

A redução do raio hidrodinâmico (Rh) também foi observada com o aquecimento de 80°C como é mostrado na Figura 36.

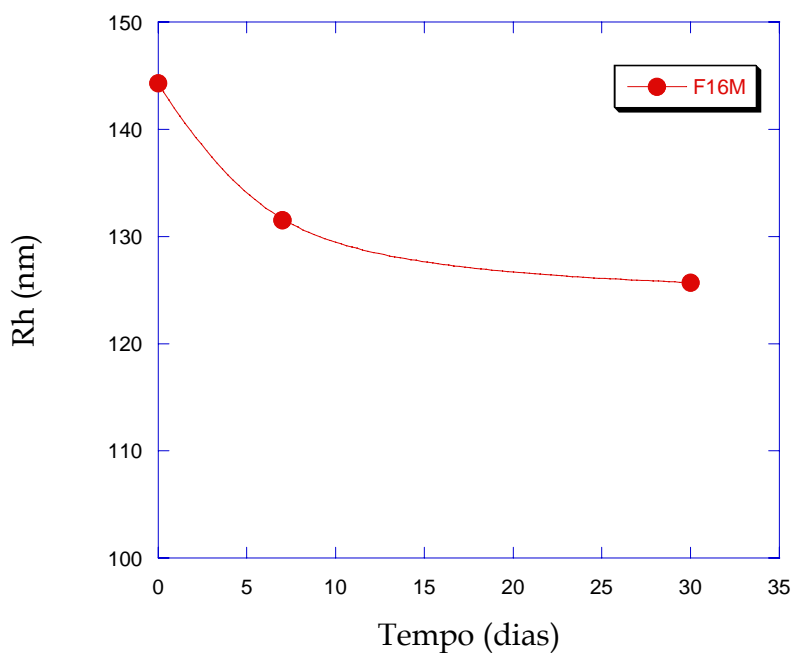
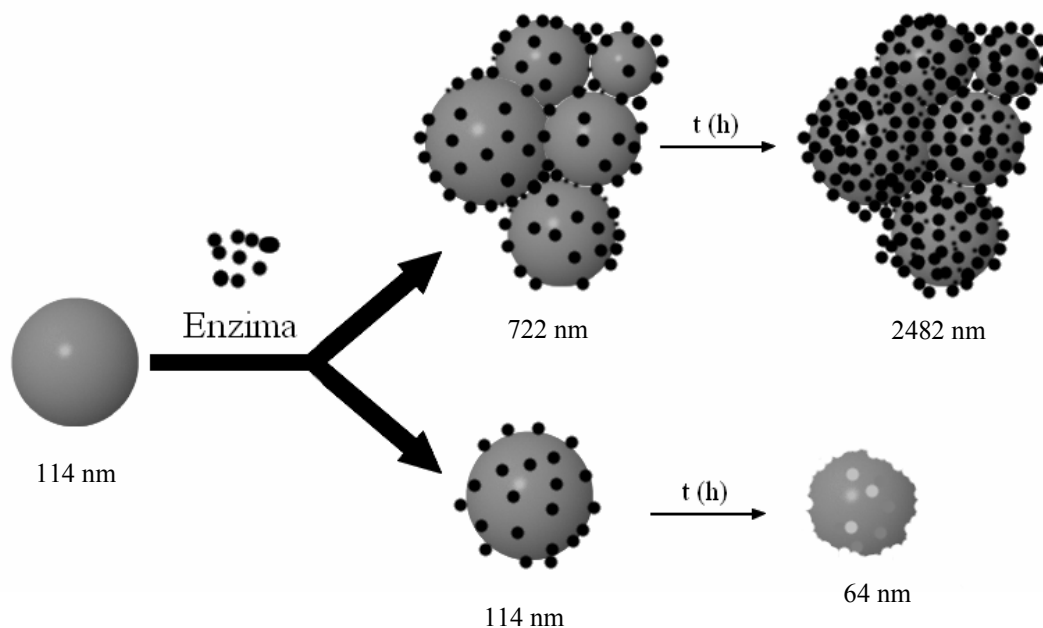


FIGURA 36. Redução do raio hidrodinâmico em função do tempo para a amostra F16M preparada pela técnica de miniemulsão e submetida a aquecimento de 80°C durante 30 dias. $\theta = 90^\circ$.

5.2 Degradação enzimática

No estudo de degradação enzimática observou-se o aparecimento de um segundo pico de maior raio hidrodinâmico provavelmente constituído por aglomerados de partículas e enzimas, enquanto que o pico correspondente às nanopartículas reduziu de intensidade em função do tempo. A redução do Rh, coerente com a degradação, foi observada em nossos resultados contrariando os estudos publicados por Wu e Gan, (1997). Para estes autores, a redução da intensidade é atribuída à degradação das nanopartículas, porém o raio hidrodinâmico das mesmas permaneceu constante e devido a isto, os autores sugeriram que as enzimas atacam e degradam as partículas uma de cada vez.

O esquema de degradação enzimática de nosso estudo está representado na figura 37. Como evidências da degradação destacam-se a redução do Rh e formação de agregados.



* Os valores apresentados correspondem ao diâmetro de partícula e agregados da formulação F10M na presença de 10 unidades de papaína, medidos a ângulo de 40°.

FIGURA 37. Esquema de degradação.

Diferentes relações nanopartícula/enzima foram testadas. A concentração de nanopartículas foi variada com diferentes diluições das formulações em água milli Q. Embora alguns autores se refiram à concentração de enzima em g mL^{-1} nós preferimos adotar a concentração de enzima em unidades. Uma unidade de papaína, por exemplo, é a quantidade de enzima capaz de hidrolisar $1,0 \mu\text{mol}$ do substrato protéico α -n-benzoil-L-arginina etil ester (BAEE) por minuto a $\text{pH} = 6,2$ e 25°C .

Para uma concentração de nanopartículas igual a $1,0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$ a adição de 1 unidade de enzima (estearase) fez com que o valor da intensidade tivesse comportamento semelhante ao comportamento do raio hidrodinâmico (Figura 38). Isto é coerente, pois quando se trabalha com soluções diluídas em espalhamento de luz dinâmico, o valor da intensidade é proporcional à massa molar ou a concentração de partículas no meio.

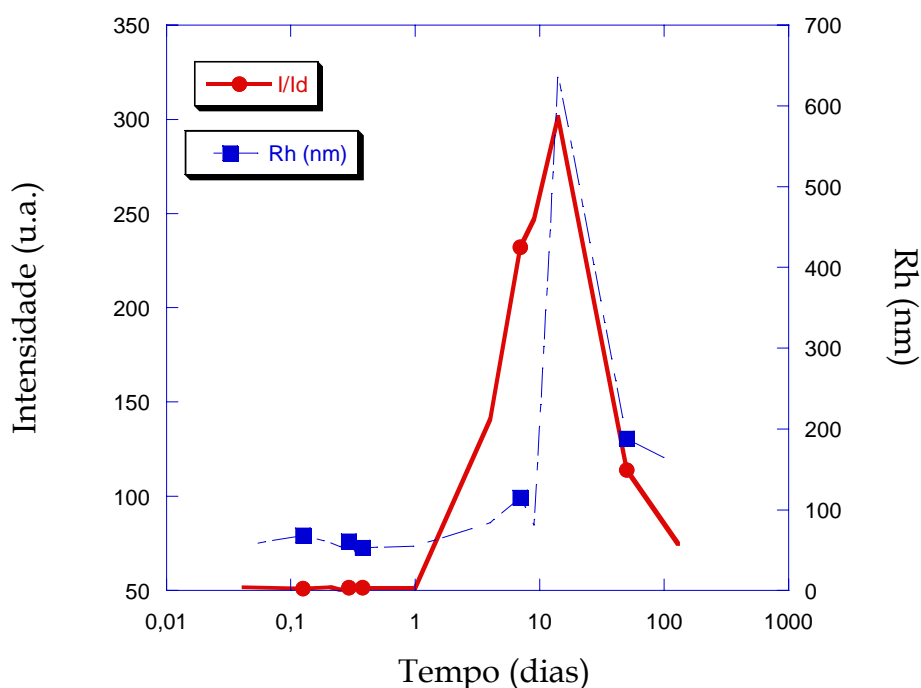


FIGURA 38. Rh (nm) e intensidade para amostra F10M diluída 500 vezes em água milli Q e com fraca concentração de enzima (estearase) medidos a $\theta = 20^\circ$ e temperatura de 25°C durante 130 dias.

A concentração de nanopartículas escolhida para a realização do estudo de degradação foi igual a $5,0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$ e a de enzima igual a 10 unidades que corresponde a $4,3 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$ (para a papaína). A degradação do poliuretano pela papaína ocorre através da hidrólise das ligações amida.

Num teste realizado com a formulação F10M em presença de papaína a 37°C foi observado a pequenos ângulos ($\theta = 20^\circ$) um aumento nos valores da intensidade (Figura 39) referente ao aumento do pico de aglomerados. A grandes ângulos ($\theta = 90^\circ$) foi observado a redução da intensidade em função do tempo (Figura 40) que corresponde à degradação das nanopartículas. Na figura 41 são apresentados os valores de intensidade para os dois ângulos estudados.

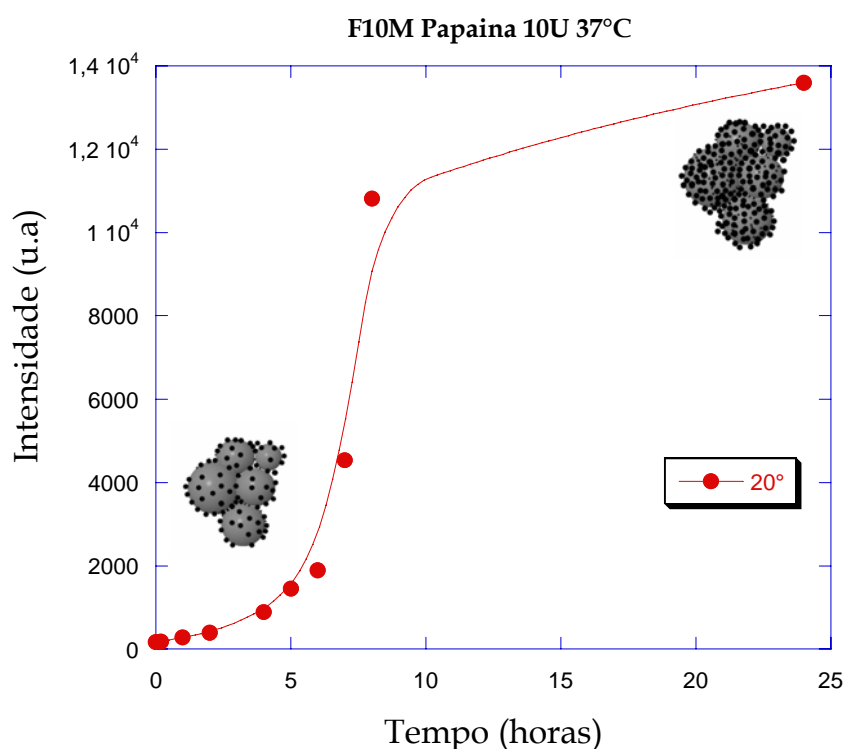


FIGURA 39. Aumento do valor da intensidade a pequenos ângulos observado para a formulação F10M com adição de 10 unidades de papaína a 37°C .

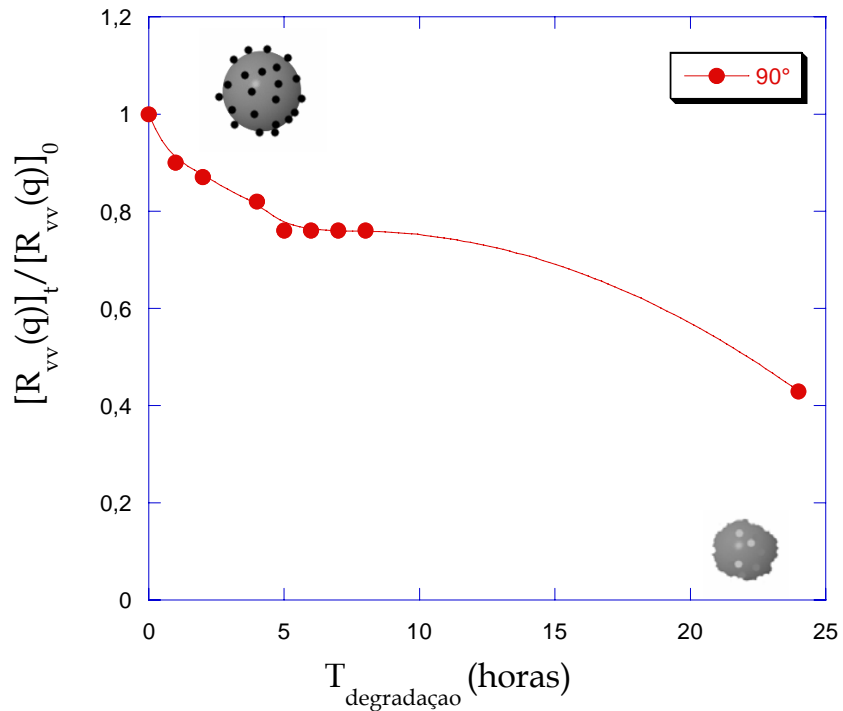


FIGURA 40. Redução do valor da intensidade a grandes ângulos observado para a formulação F10M com adição de 10 unidades de papaína a 37°C.

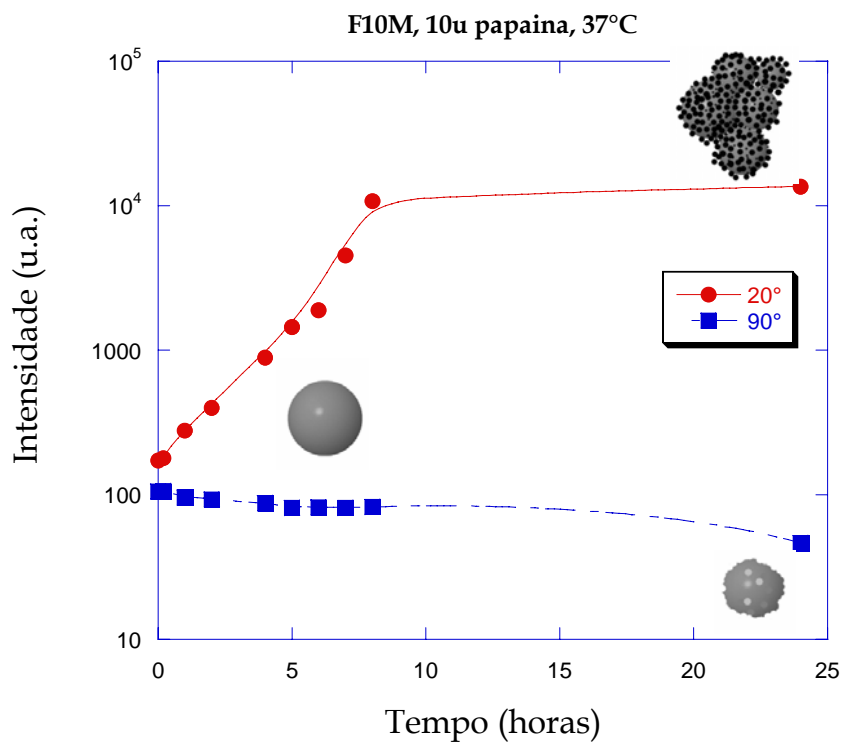


FIGURA 41. Comportamento da intensidade no teste de degradação da formulação F10M com papaína nos ângulos de 20° e 90° .

A redução de $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ pode ser atribuída à redução da massa molar da partícula ou da concentração de partículas na solução, indicando que ocorreu degradação.

Para as formulações desenvolvidas pela técnica de suspensão-poliadição, resultados similares foram obtidos.

As formulações F12 e F13 preparadas com e sem a adição de PEG 400, respectivamente foram submetidas à degradação com 10 unidades de papaína a 37°C. As amostras foram diluídas 100 vezes e filtradas em filtro Millipore 0,22 μm . A figura 42 mostra o comportamento da intensidade para os ângulos de 20° e 90° no teste da formulação F12 com papaína.

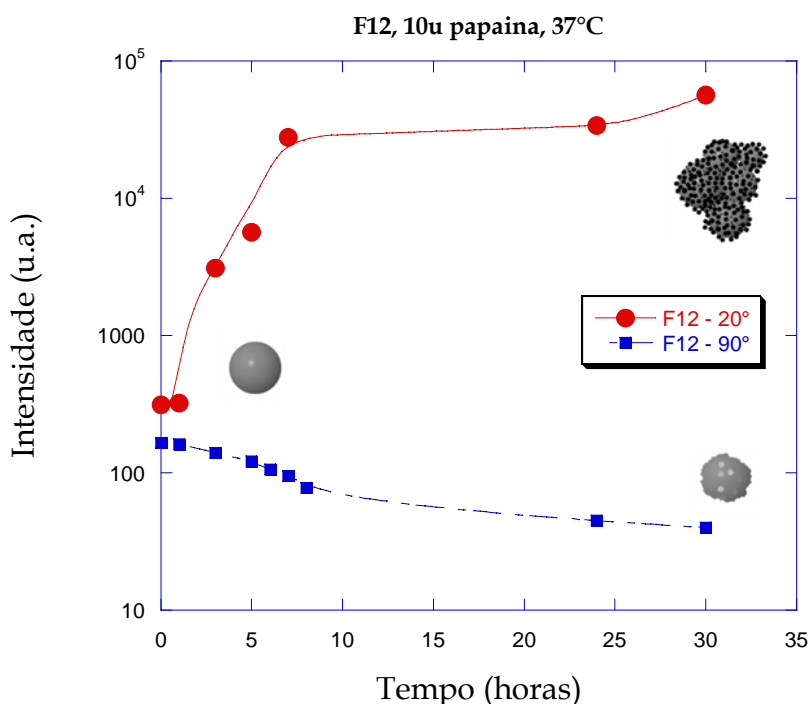


FIGURA 42. Intensidades para a formulação F12 em presença de papaína medida a ângulos de 20° e 90°.

O gráfico de degradação para as formulações F12 e F13 em presença de papaína a 37°C está apresentado na figura 43.

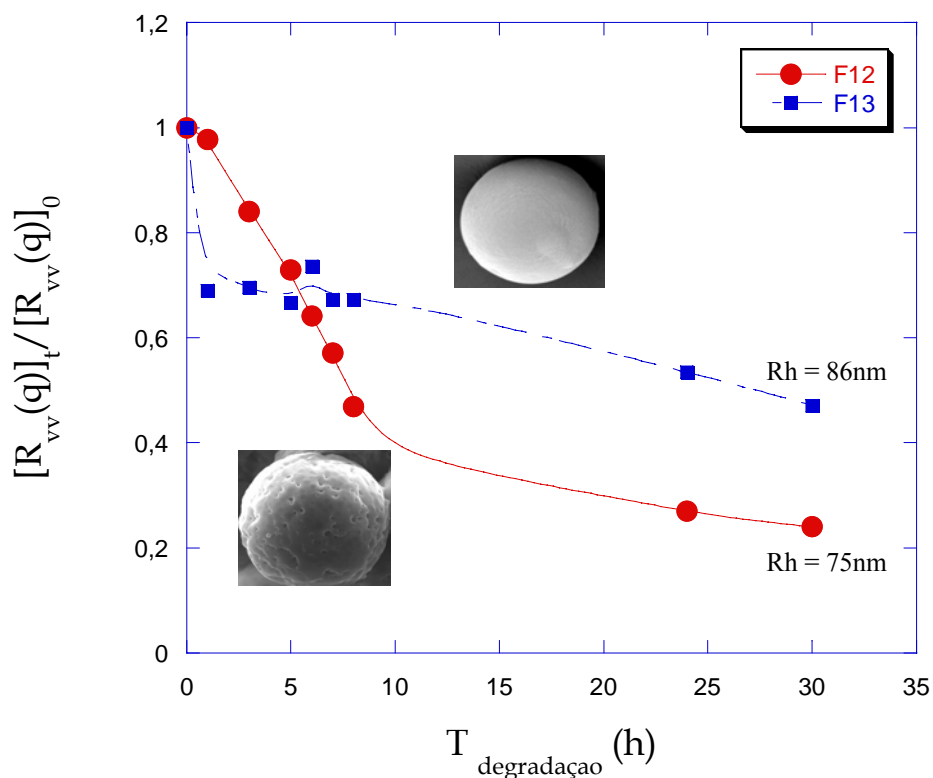


FIGURA 43. Cinética de degradação para as formulações desenvolvidas pela técnica de suspensão-poliadição. $\theta = 90^\circ$, temperatura = 37°C .

Num período de 30 horas, a formulação F13 teve uma degradação de 53% enquanto que a formulação F12, preparada com PEG 400, foi degradada em 76%. Como esperado, a formulação preparada com PEG (F12) apresentou melhor perfil de degradação. Este resultado confirma que o PEG por formar uma matriz polimérica menos compacta e mais porosa facilita o acesso das enzimas aos sítios de degradação.

A formulação F13 que não apresentou degradação com o aquecimento de 80°C foi susceptível à degradação enzimática.

A redução do raio hidrodinâmico das nanopartículas em função do tempo também foi confirmada para a formulação F12 (figura 44).

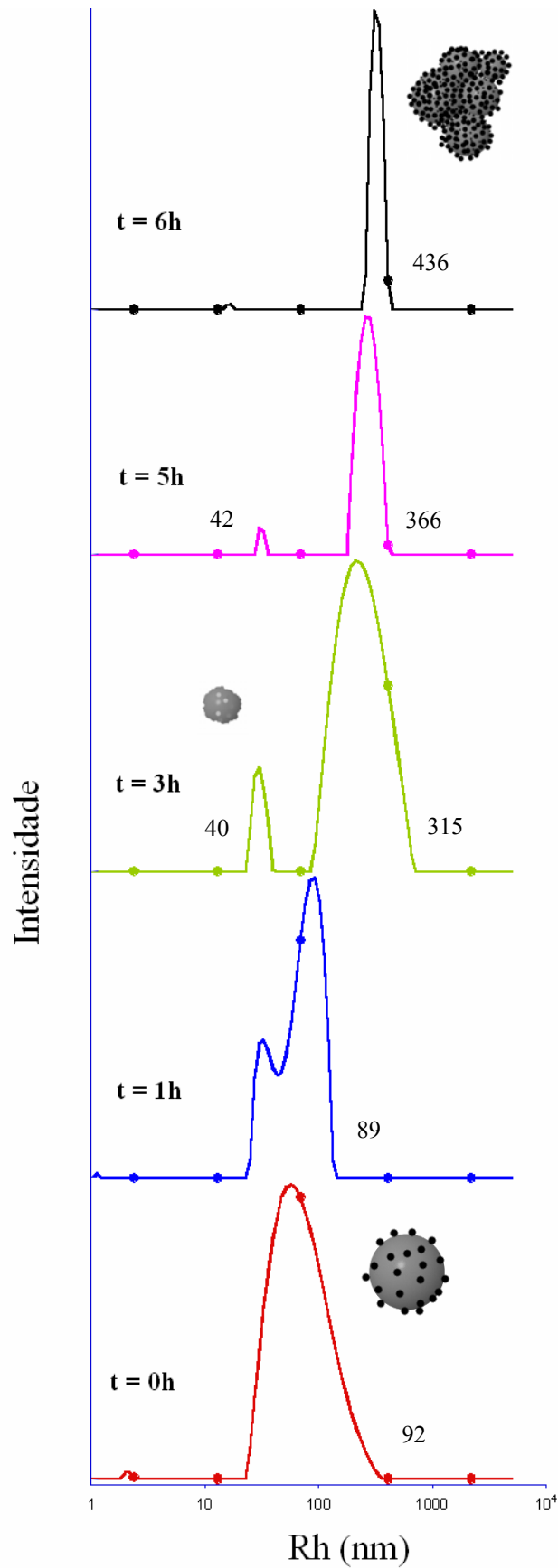


FIGURA 44. Rh (nm) em função do tempo de degradação para a formulação F12. $\theta = 20^\circ$, temperatura 37°C .

5.2.1 Efeito da Concentração de Papaína

A influência da concentração de papaína sobre a degradação foi testada para a formulação F10M. O comportamento da intensidade pode ser observado nas figuras 45 e 46.

A relação partícula/enzima pareceu influenciar a dinâmica do sistema.

A concentração de papaína igual a 10 unidades foi a que apresentou efeitos mais significativos sobre a degradação.

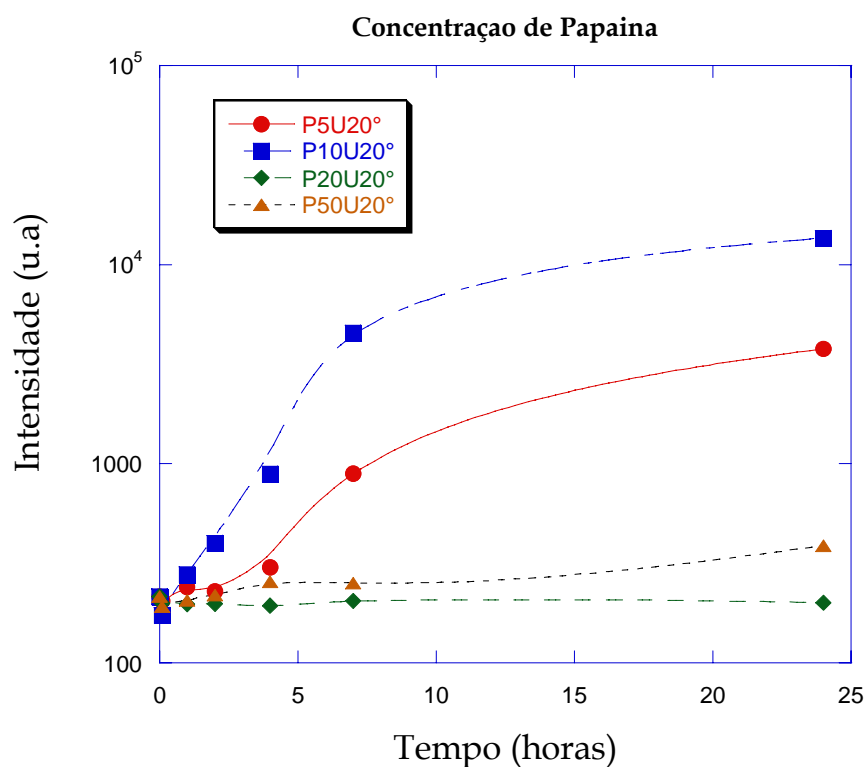


FIGURA 45. Valores de intensidade em função da concentração de enzima $\theta = 20^\circ$.

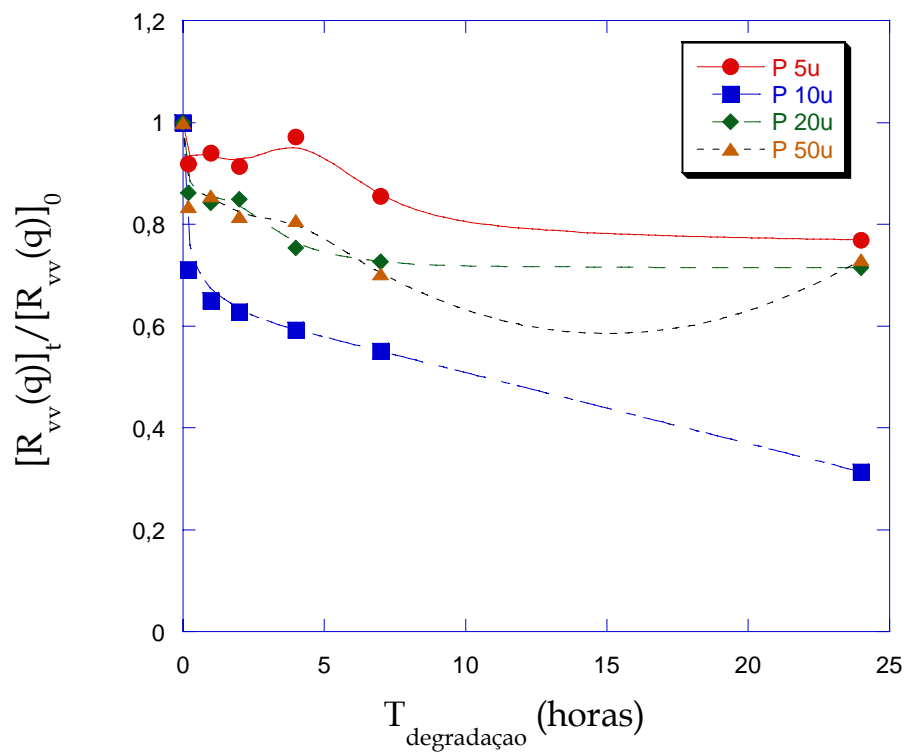


FIGURA 46. $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ em função da concentração de papaína. $\theta = 90^\circ$.

Os valores de intensidade revelam que para a concentração de papaína igual a 10 unidades houve degradação próxima a 70% em 24 horas.

A redução do raio hidrodinâmico das nanopartículas em função do tempo pode ser observada na figura 47. A redução do Rh implica também na redução da massa molar conforme já havia sido observado pelos valores de $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$.

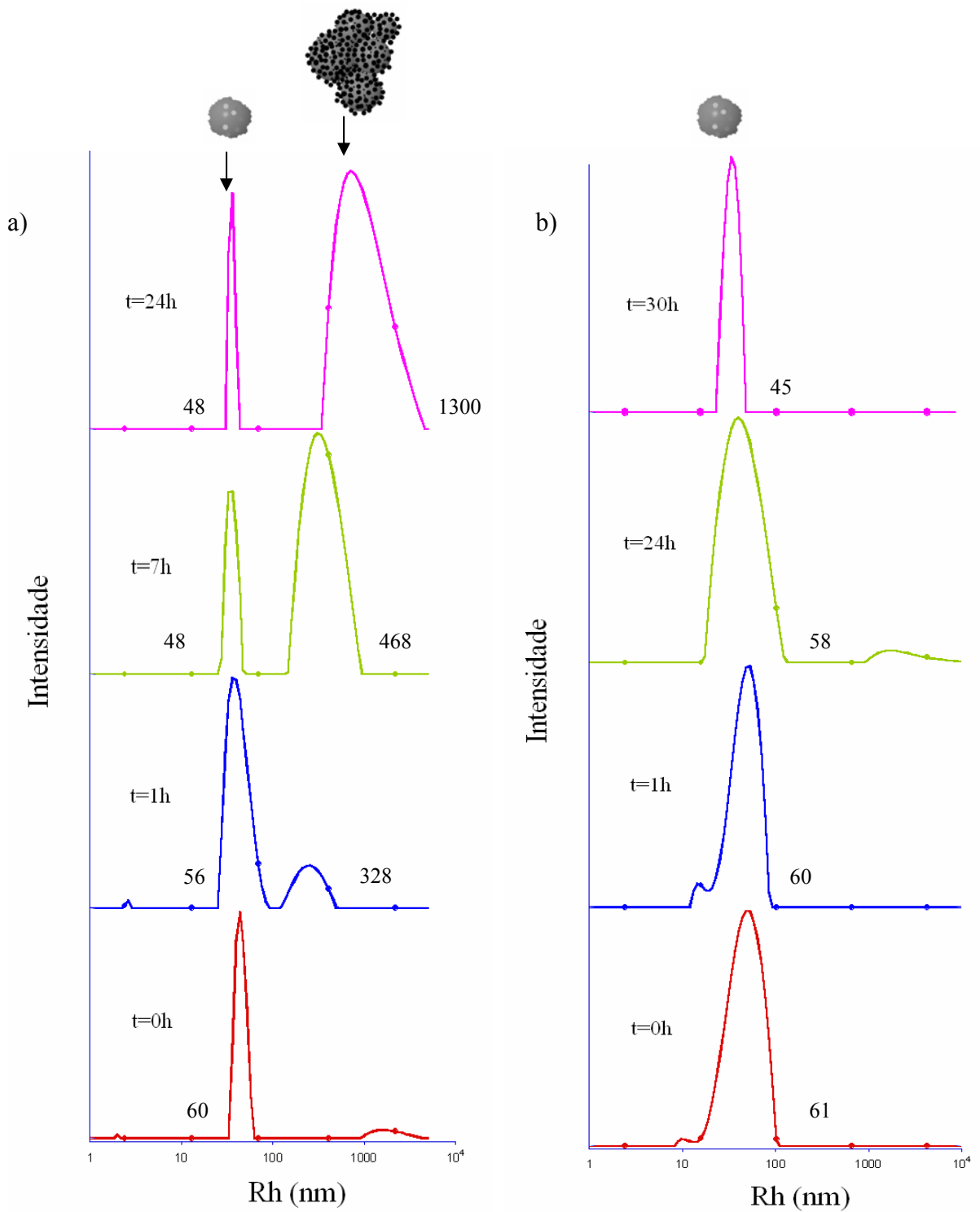


FIGURA 47. Degradação da formulação F10M contendo 5 unidades de papaína a) $\theta = 20^\circ$; b) $\theta = 90^\circ$.

A degradação da formulação F10M com 5 unidades de papaína apresentou a $\theta = 20^\circ$ aparecimento de um pico de maior Rh que pode ser atribuído ao aparecimento de aglomerados entre partículas e enzimas. Já as nanopartículas presentes inicialmente, tiveram seu Rh reduzido em função do tempo. A $\theta = 90^\circ$ somente foi possível observar a redução do Rh das nanopartículas.

Quando 10 unidades de papaína foram utilizadas na degradação, o pico de agregados pôde ser visto também a $\theta = 90^\circ$ (figura 48).

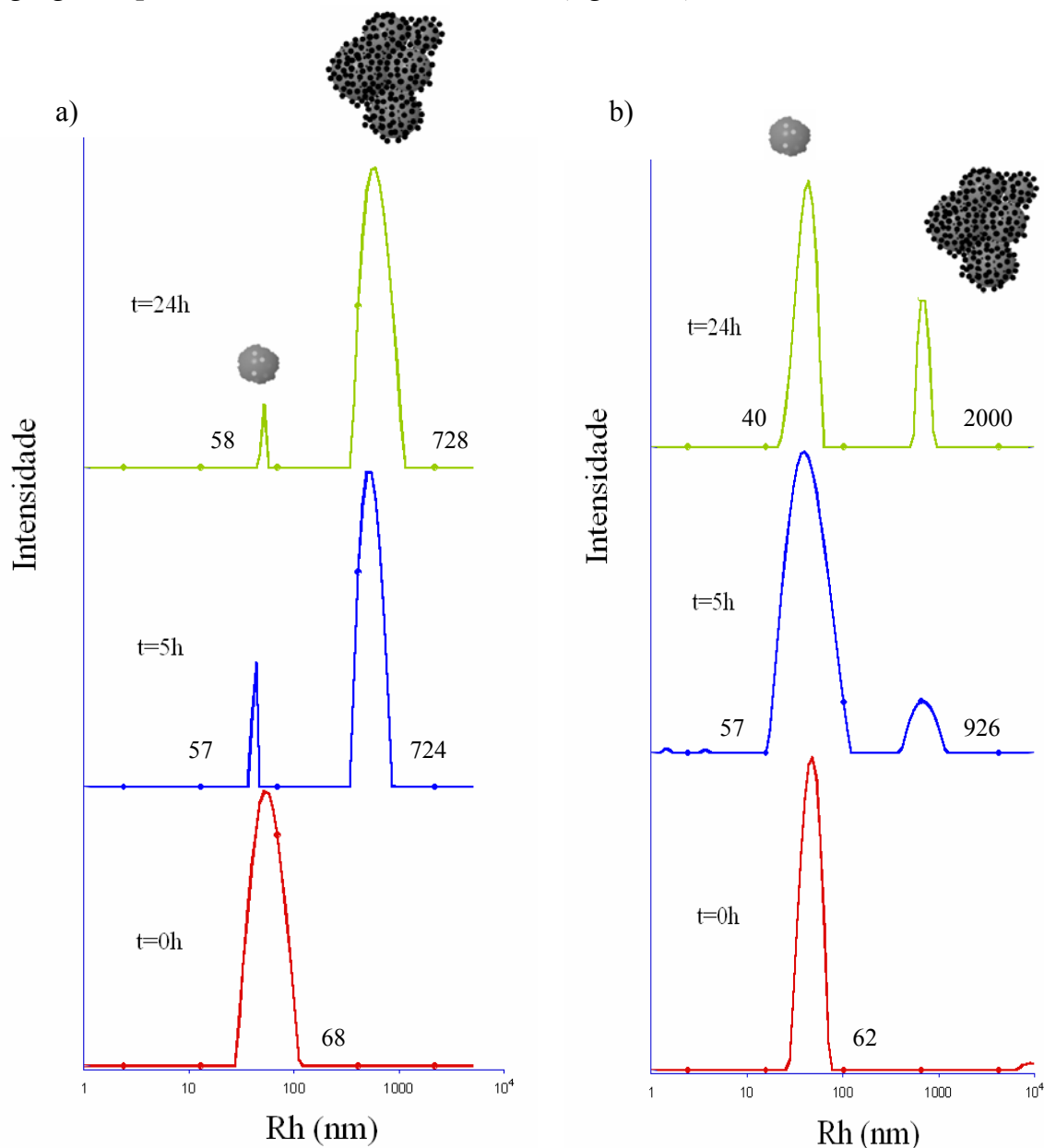


FIGURA 48. Degradação da formulação F10M contendo 10 unidades de papaína. a) $\theta = 20^\circ$; b) $\theta = 90^\circ$

5.2.2 Teste com estearase

A degradação do poliuretano pela estearase ocorre através da hidrólise das ligações éster. O teste de degradação com a estearase foi realizado a 25°C. Quando a formulação F10M diluída 100x com água e filtrada em filtro 0,22 µm foi colocada em contato com 10 unidades de estearase observou-se a formação de um pico de aglomerados. Entretanto, não foi observada redução no Rh nas 48 horas do estudo (Figura 49). Acredita-se que a lenta degradação seja em função da temperatura de trabalho, 25°C e não devido ao tipo da enzima. A 25°C as enzimas se organizam, mas a sua ação é mais lenta. O efeito da temperatura sobre a degradação de nanopartículas foi relatado por Fu e Wu (2001).

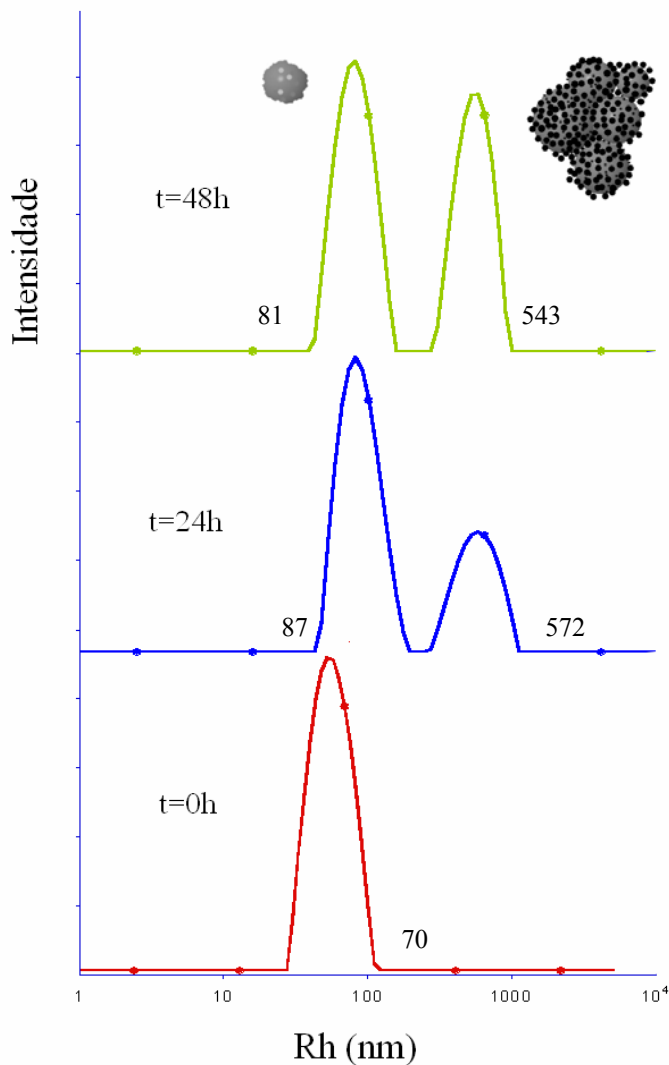


FIGURA 49. Comportamento do Rh da formulação F10M submetida a 10 unidades de estearase a temperatura de 25°C. $\theta = 20^\circ$.

5.3 Degradação Química

Para a realização da degradação química foi adicionada uma quantidade específica de HCl (degradação em meio ácido) ou NaOH (degradação em meio alcalino) à formulação F10M (diluída 100 vezes e filtrada em filtro Millipore 0,22 μm) para uma solução final com concentração igual a 0,5 e 5 M. A concentração de 5 M foi muito alta ocorrendo separação de fase no momento da adição. Para a concentração de 0,5 M foi possível acompanhar a degradação.

A figura 50 mostra que na presença de HCl 0,5 M o valor da intensidade sofreu um leve aumento para o ângulo de 20° e ficou estável para o ângulo de 90°.

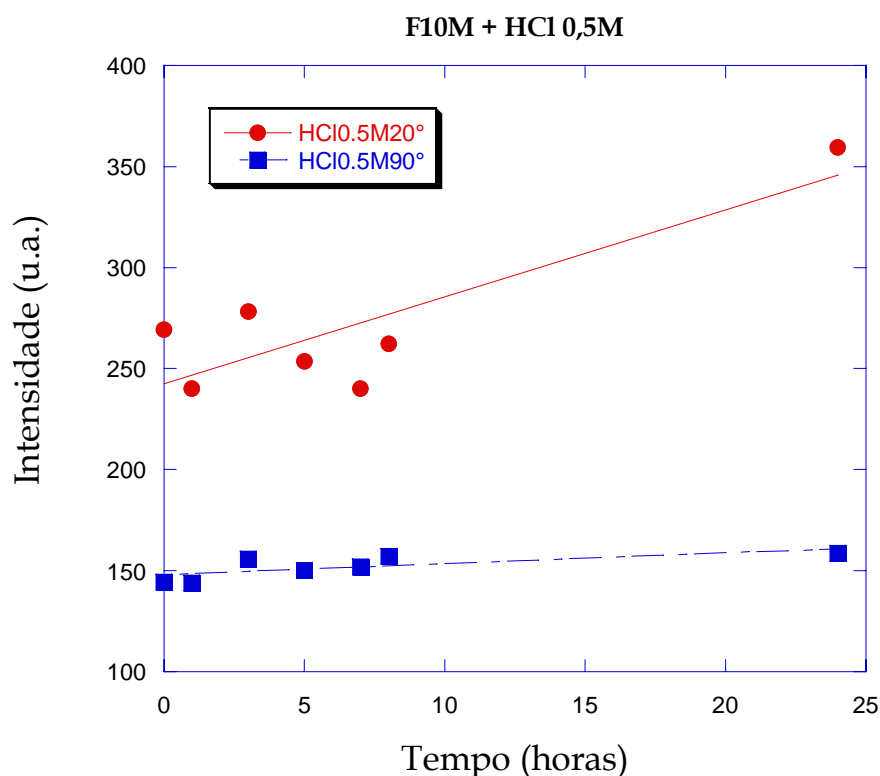


FIGURA 50. Intensidade da formulação F10M em presença de HCl 0,5 M em ângulos de 20° e 90°.

A comparação entre a degradação em meio ácido e alcalino revelou que as partículas são mais susceptíveis à degradação hidrolítica com NaOH conforme pode ser visualizado na figura 51, onde 60% foi degradado em 24 horas. Portanto, trata-se de uma degradação por hidrólise alcalina. Este resultado está de acordo com estudos preliminares de degradação realizados com as micropartículas sintetizadas pela técnica de suspensão-poliadição (dados não apresentados). Como o poliuretano sintetizado deriva de um poliéster este resultado é coerente, pois as ligações éster são mais facilmente hidrolisadas em condições alcalinas (Marquardt e Eifer-Lima, 2001).

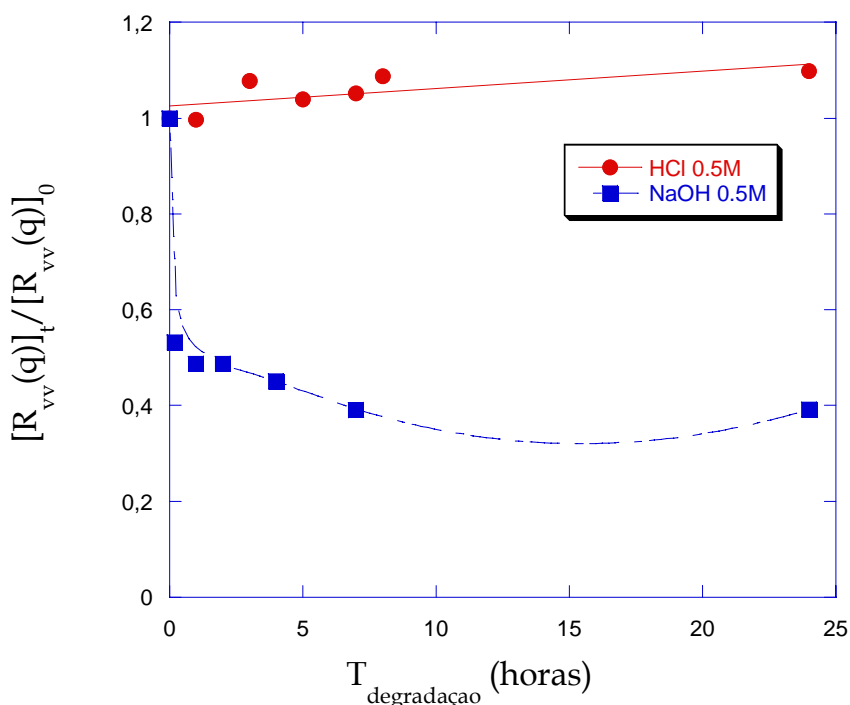


FIGURA 51. $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ da formulação F10M em HCl 0,5 M ou NaOH 0,5 M medido em angulo de 90°.

Alterações no raio hidrodinâmico também foram observadas na degradação alcalina (figura 52).

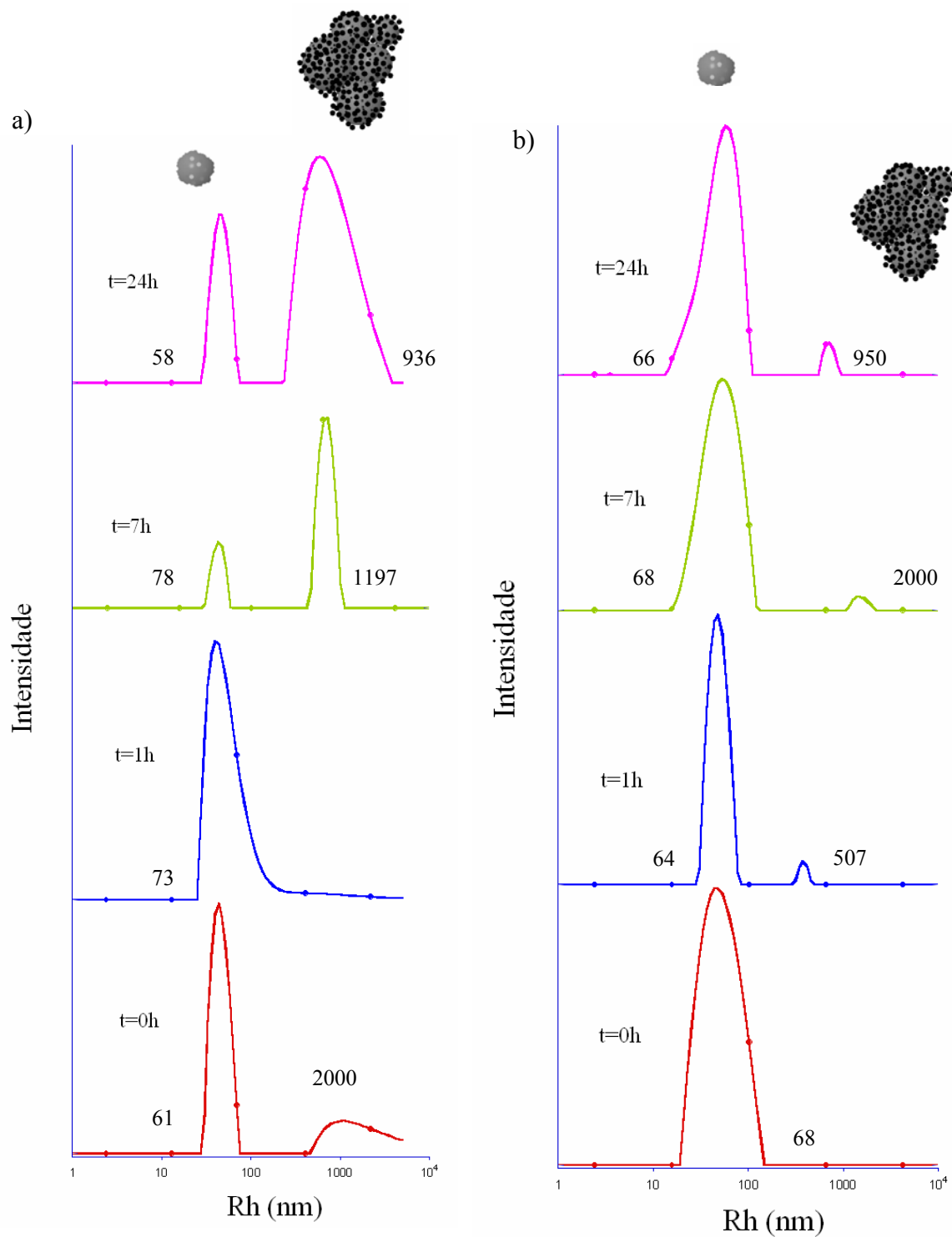


FIGURA 52. Rh para a formulação F10M submetida à degradação alcalina com NaOH 0,5 M. a) $\theta = 20^\circ$; b) $\theta = 90^\circ$

5.4 Efeito do tampão fosfato

Como o estudo de liberação apresentou resultados importantes relacionados ao tampão fosfato pH=7,4 (como será apresentado no capítulo 6), teve-se interesse em testar a degradação das partículas neste meio.

Foi observada uma importante redução nos valores de intensidade quando a formulação F10M foi diluída 100 vezes em tampão fosfato pH=7,4 (10 mg/mL) em comparação com a mesma diluição em água (tabela 15).

TABELA 15. Valores de intensidade para a formulação F10M diluída em água ou tampão fosfato pH= 7,4.

| Angulo | Água (25°C) | Água (37°C) | Tampão Fosfato (25°C) | Tampão Fosfato (37°C) |
|--------|----------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| 20° | 215 | 173 | 13 | 18 |
| 90° | 148 | 105 | 7 | 9 |

As soluções foram aquecidas a 37°C e a intensidade foi monitorada após 24 horas. Para a amostra diluída em água foi observada uma pequena redução na intensidade indicando que o aquecimento pode ajudar na degradação das partículas. Entretanto, para a solução diluída com tampão fosfato o valor se manteve praticamente estável, sugerindo que uma importante degradação ocorreu pelo efeito do tampão fosfato pH = 7,4 e não da temperatura. As partículas em tampão fosfato são degradadas por hidrólise. A hidrólise ocorre quando o polímero é exposto em soluções aquosas e este processo pode ser controlado variando o pH e/ou temperatura (Kiss e Vargha-Butler, 1999).

A literatura demonstra que dispositivos feitos de poli(ácido lático) (PLA) ou poli(ácido lático co-glicólico) (PLGA) podem ser degradados via difusão dos íons hidróxido do tampão fosfato pH 7,4 utilizado como meio de liberação (Park, 1995).

Copolímeros feitos de 1,3-bis(p-carboxifenoxi)propano (CPP) e ácido sebácico (AS) também sofreram erosão em tampão fosfato (Göpferich, 1997).

Num outro experimento, uma gota de uma solução concentrada de tampão fosfato foi adicionada numa amostra de F10M diluída 100 vezes em água para uma concentração final de tampão fosfato igual a 3 mg/mL. Foi observado um leve aumento nos valores de intensidade para o ângulo de 90° e um intenso aumento para o ângulo de 20° (figura 53), o que pode ser atribuído à formação de agregados.

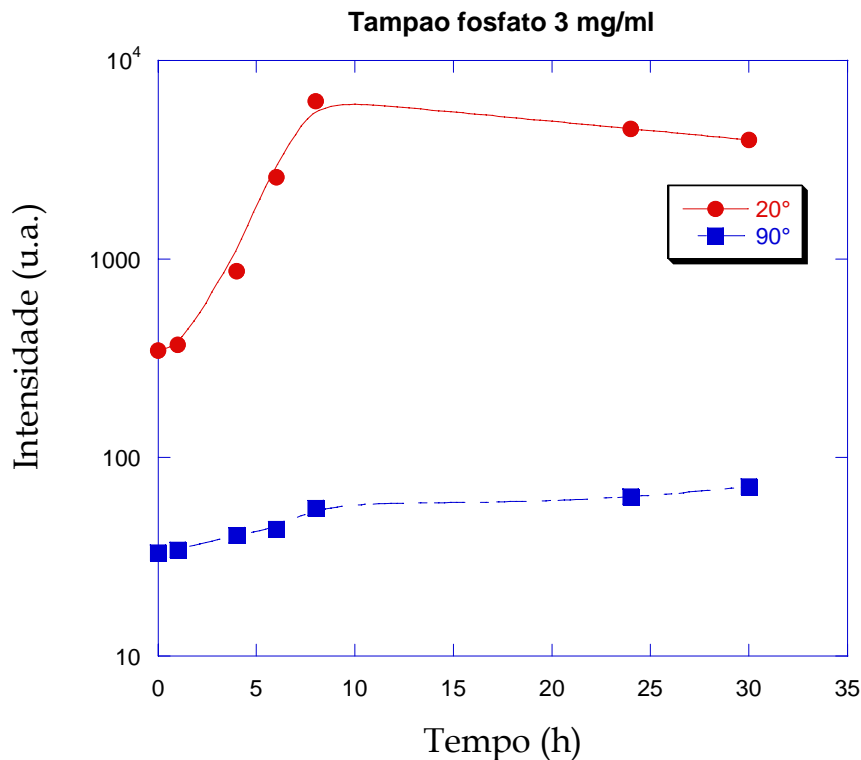


FIGURA 53. Intensidade da F10M submetida ao tampão fosfato (3mg/mL) em temperatura de 37°C e ângulos de 20° e 90°.

Um comportamento de degradação semelhante ao que foi observado na degradação enzimática e por hidrólise alcalina (NaOH) também foi verificado com o emprego do tampão fosfato.

O aparecimento de agregados imediatamente após a adição do tampão fosfato ($t=0$) e a redução do Rh puderam ser monitorados no ângulo de 20° (figura 54).

Um pequeno aumento no Rh das nanopartículas pôde ser observado no início da degradação ($t=1h$) provavelmente referente ao intumescimento das partículas.

5.5 Estudo da dependência angular

O estudo da dependência angular foi realizado nas mesmas condições que o estudo de degradação, ou seja, com a formulação F10M diluída em água 100 vezes e filtrada com filtro 0,22 μm . A amostra foi estudada antes e após a adição de 10 unidades de papaína em solução aquosa.

O estudo foi realizado a 37°C em ângulos de 20°, 40°, 60°, 90°, 120° e 140°.

A figura 55 mostra o gráfico de Γ em função de q^2 para a amostra F10M sem adição de enzima. O movimento é difusivo, $D= 6,44 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ e os objetos são esféricos.

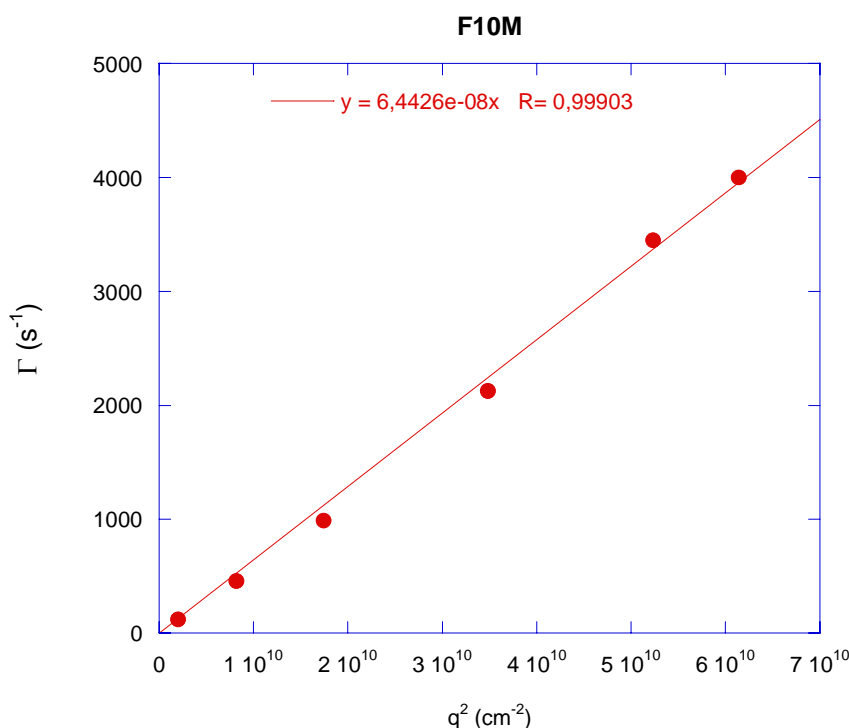


FIGURA 55. $\Gamma \times q^2$ para a F10M.

A figura 56 mostra os valores de intensidade em função do tempo após a adição de enzima e nos diferentes ângulos estudados.

Observa-se o aumento da intensidade nos pequenos ângulos e a redução em grandes ângulos, conforme já discutido anteriormente.

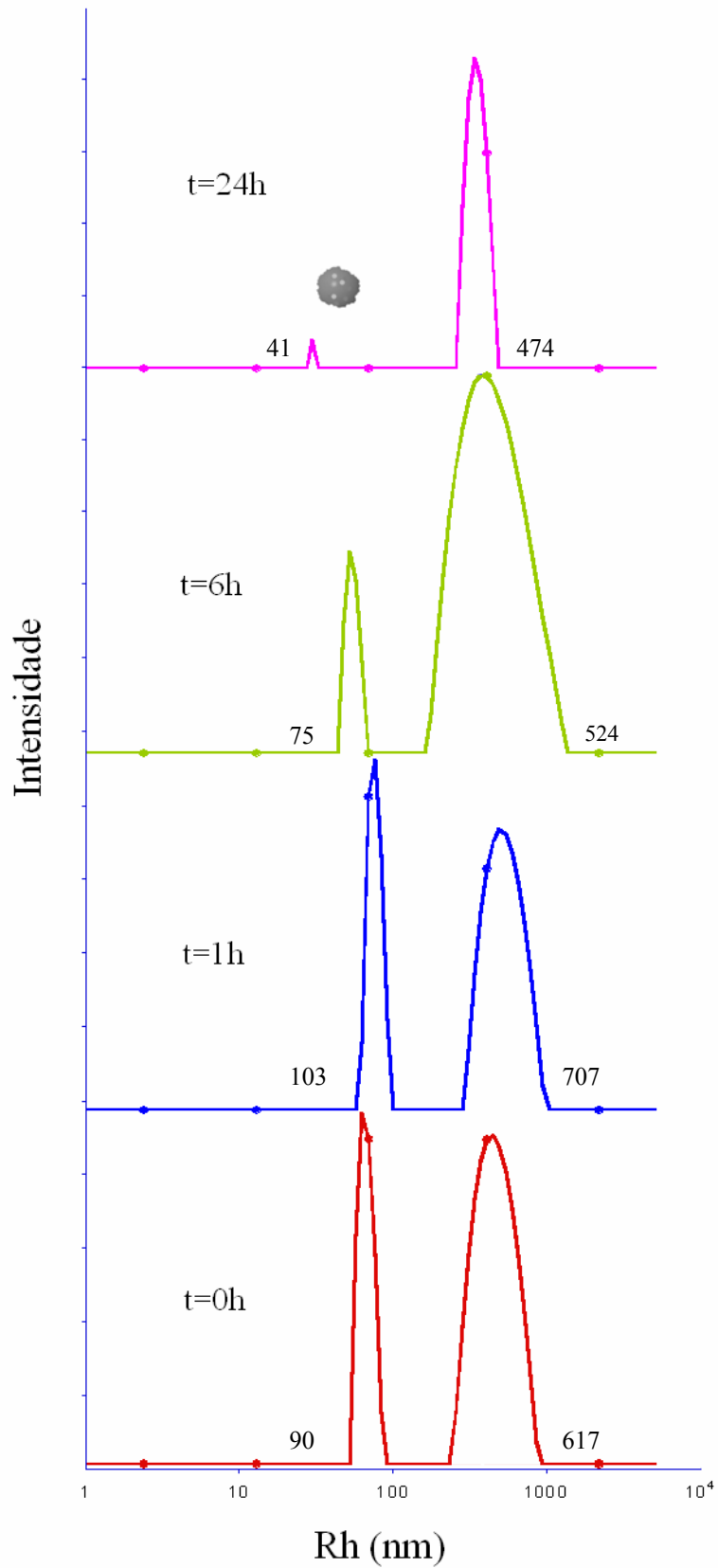


FIGURA 54. Efeito do tampão fosfato sobre o raio hidrodinâmico da formulação F10M, medido a $\theta = 20^\circ$.

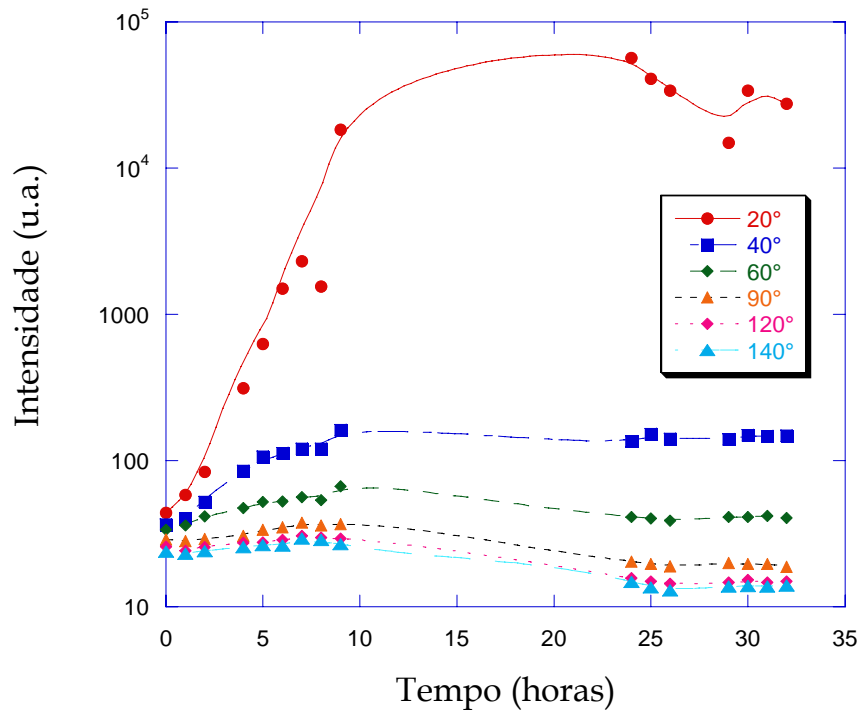


FIGURA 56. Intensidade em função do tempo em diferentes ângulos.

A figura 57 apresenta o gráfico de intensidade em função de q (cm^{-1}). A pequenos ângulos são observados os aglomerados, em ângulos intermediários a coexistência dos dois sistemas e a grandes ângulos as nanopartículas.

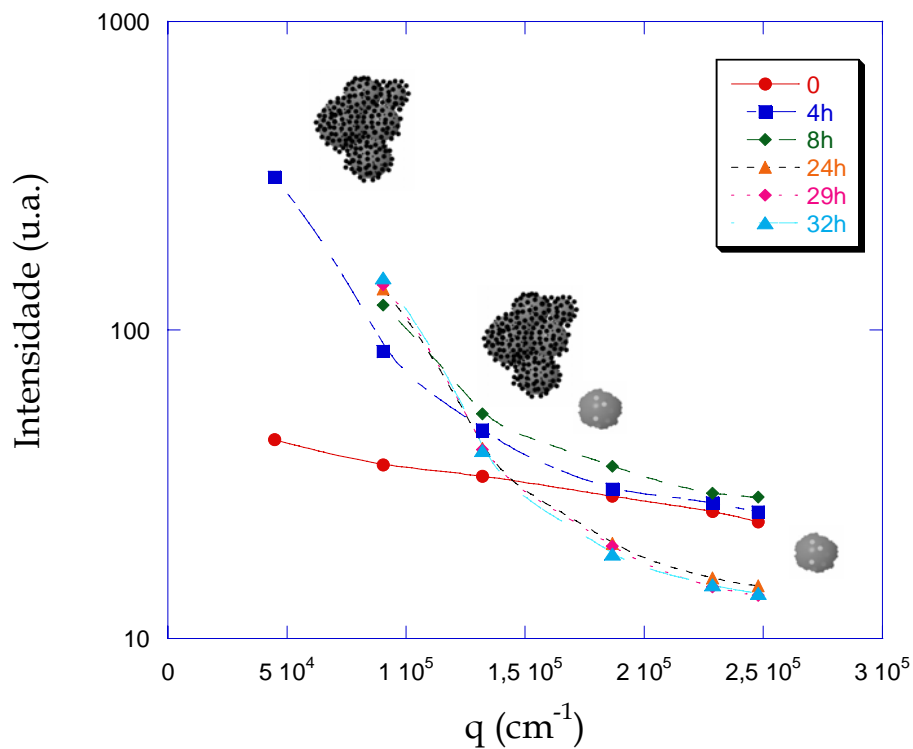


FIGURA 57. Intensidade em função de q .

A figura 58 apresenta o gráfico de Γ em função de q^2 para a amostra F10M na presença de papaína. O movimento é difusivo e o valor do coeficiente de difusão das partículas é em torno de $6,0 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ nas primeiras oito horas de degradação.

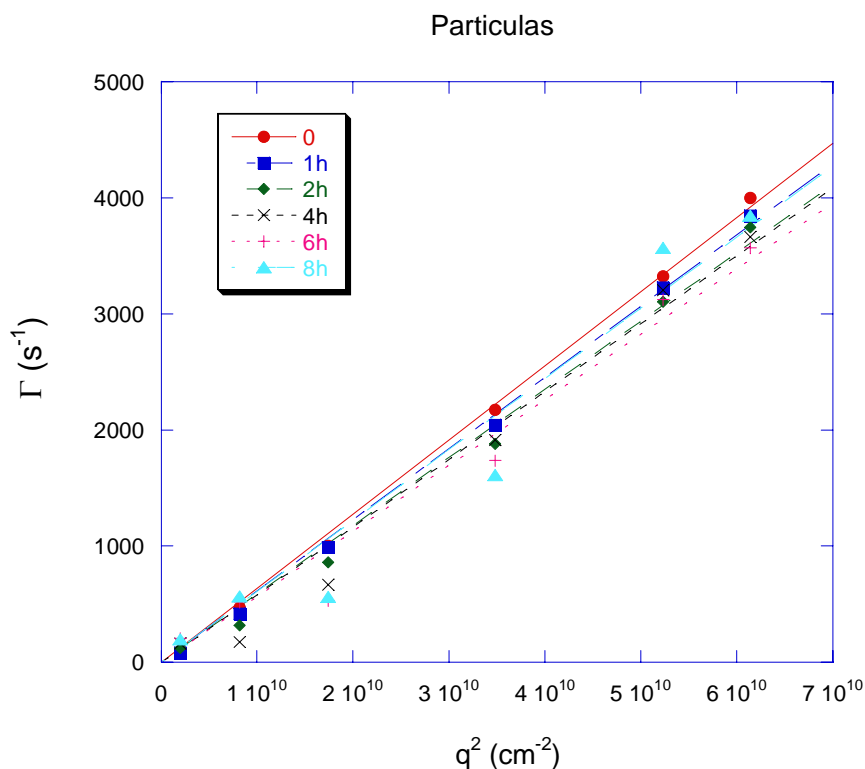


FIGURA 58. $\Gamma \times q^2$ para as partículas da F10M nas primeiras 8 horas de degradação.

O pico de aglomerados que surgiu durante a degradação é apresentado juntamente com as nanopartículas na figura 59 que mostra Γ em função de q^2 após 24 e 32h de degradação.

A partir de 24 horas foi observada a redução do raio hidrodinâmico das partículas o que pode ser confirmado pelos valores do coeficiente de difusão que é de $7,6 \times 10^{-8}$ e $8,3 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ para o tempo 24h e 32h, respectivamente (figura 59).

Quanto maior o valor do coeficiente de difusão menor é o tamanho da partícula o que prova a redução de tamanho em função da degradação, pois sem a adição de enzimas $D = 6,44 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$.

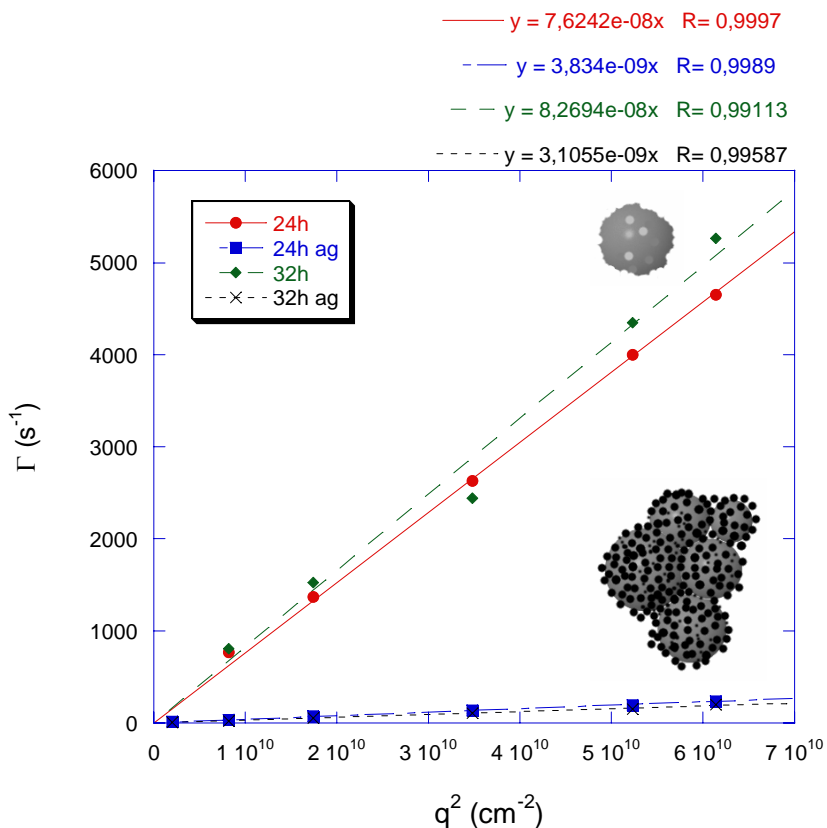


FIGURA 59. $\Gamma \times q^2$ para as partículas da F10M e aglomerados após 24 horas de degradação.

Esta amostra foi mantida por mais 6 dias a 25°C. Após este período, o valor da intensidade foi reduzido à metade indicando a continuidade da degradação (figura 60).

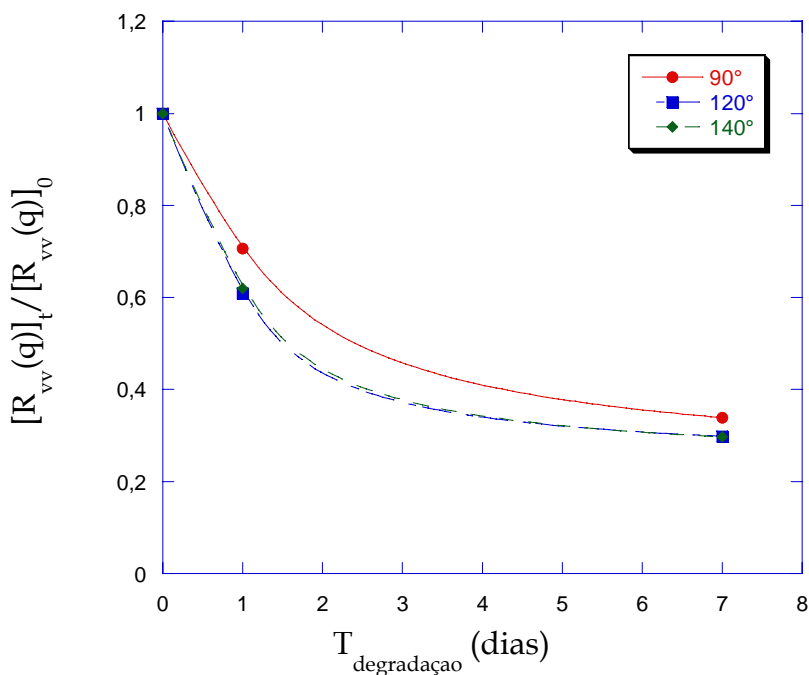


FIGURA 60. $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ em função do tempo de degradação nos ângulos de 90° , 120° e 140° .

5.5.1 Observações sobre o raio hidrodinâmico no estudo de dependência angular

A figura 61 apresenta a variação do Rh em função do tempo para os diferentes ângulos na presença de papaína. Para o ângulo de 20° foi observada a redução do Rh de 76 nm para 31 nm nas primeiras 8 horas de degradação com posterior desaparecimento do pico. Para os ângulos de 40° , 60° e 90° observou-se um aumento inicial do Rh (devido à adesão de enzimas ou intumescimento da partícula) e redução do Rh passadas 24 horas do início do teste de degradação.

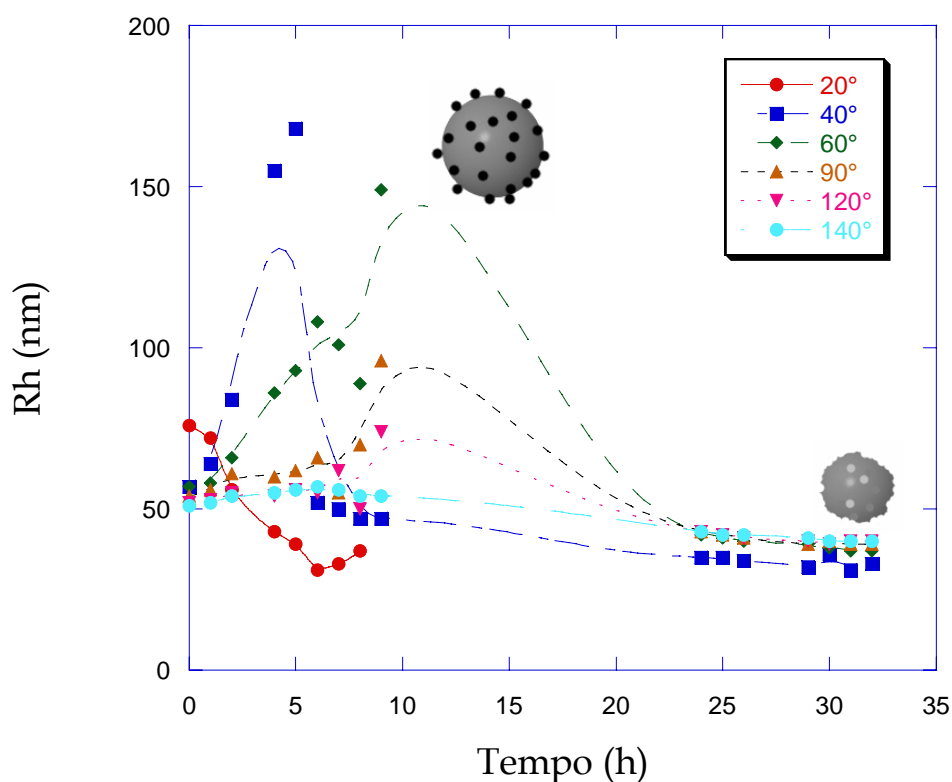


FIGURA 61. Rh (nm) em função do tempo em presença de papaína.

Com exceção do ângulo de 20° , foi possível observar um aumento do Rh nas primeiras horas de contato entre as nanopartículas e as enzimas possivelmente

devido à primeira etapa da degradação que corresponde à adesão das enzimas na superfície das partículas. Após 24 horas de teste observou-se a redução do Rh em função do tempo o que também foi confirmado pelos valores do coeficiente de difusão.

Comparando o raio hidrodinâmico inicial que a $\theta = 90^\circ$ é de 54 nm foi observado que após 32 horas de degradação com a enzima papaína o Rh foi reduzido para 39 nm, ou seja, aproximadamente 30%. Isto representa uma redução de 30 nm no diâmetro da partícula (figura 62).

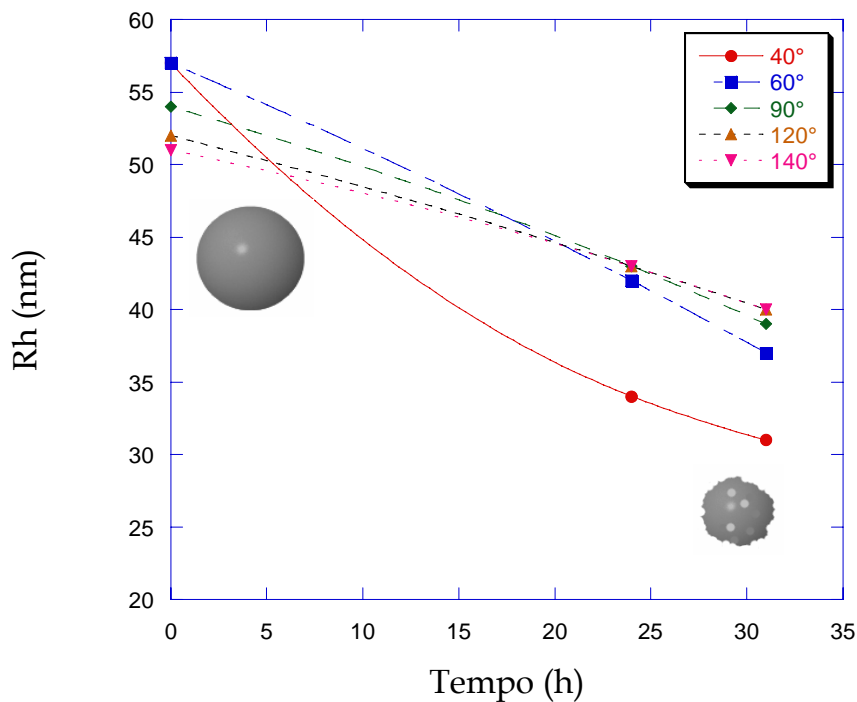


FIGURA 62. Redução do Rh nas 32 horas de degradação com papaína à temperatura de 37°C.

A redução do raio hidrodinâmico sugere que a degradação ocorreu preferencialmente por erosão na superfície. Como regra básica, polímeros que possuem grupos reativos funcionais tendem a degradar mais rápido por erosão na superfície enquanto que polímeros que possuem menos grupos reativos funcionais tendem a degradar por erosão no interior do dispositivo (Siepmann e Göpferich, 2001).

Quando a amostra foi mantida por mais 6 dias a 25°C, além da redução nos valores de intensidade que indicaram a continuidade da degradação (figura 60) observou-se também a redução do raio hidrodinâmico para ângulos igual e maior que 60° (figura 63) embora em menor proporção, pois na temperatura de 25°C e velocidade de degradação é mais lenta.

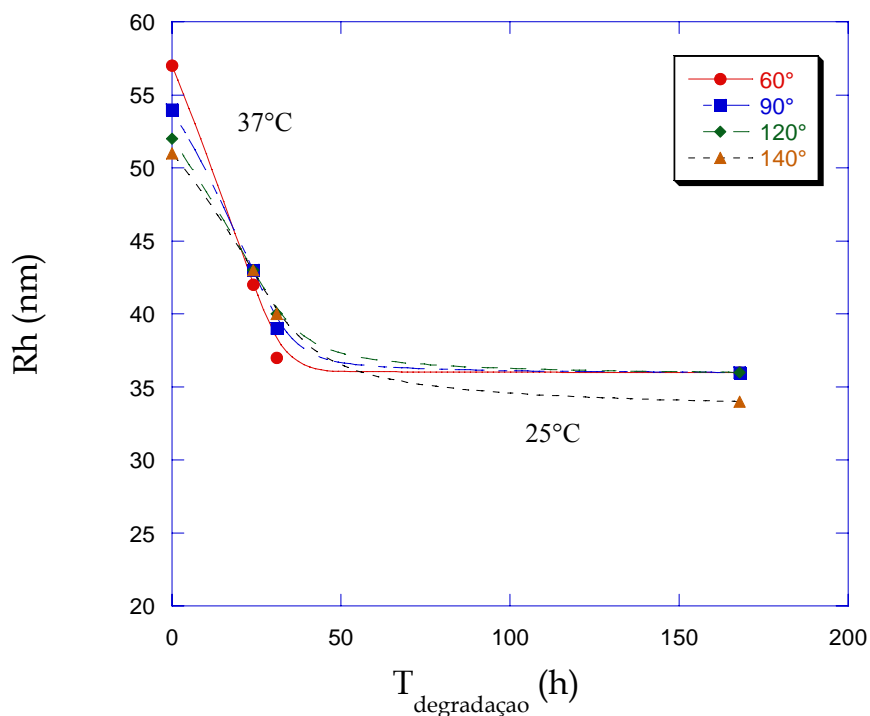
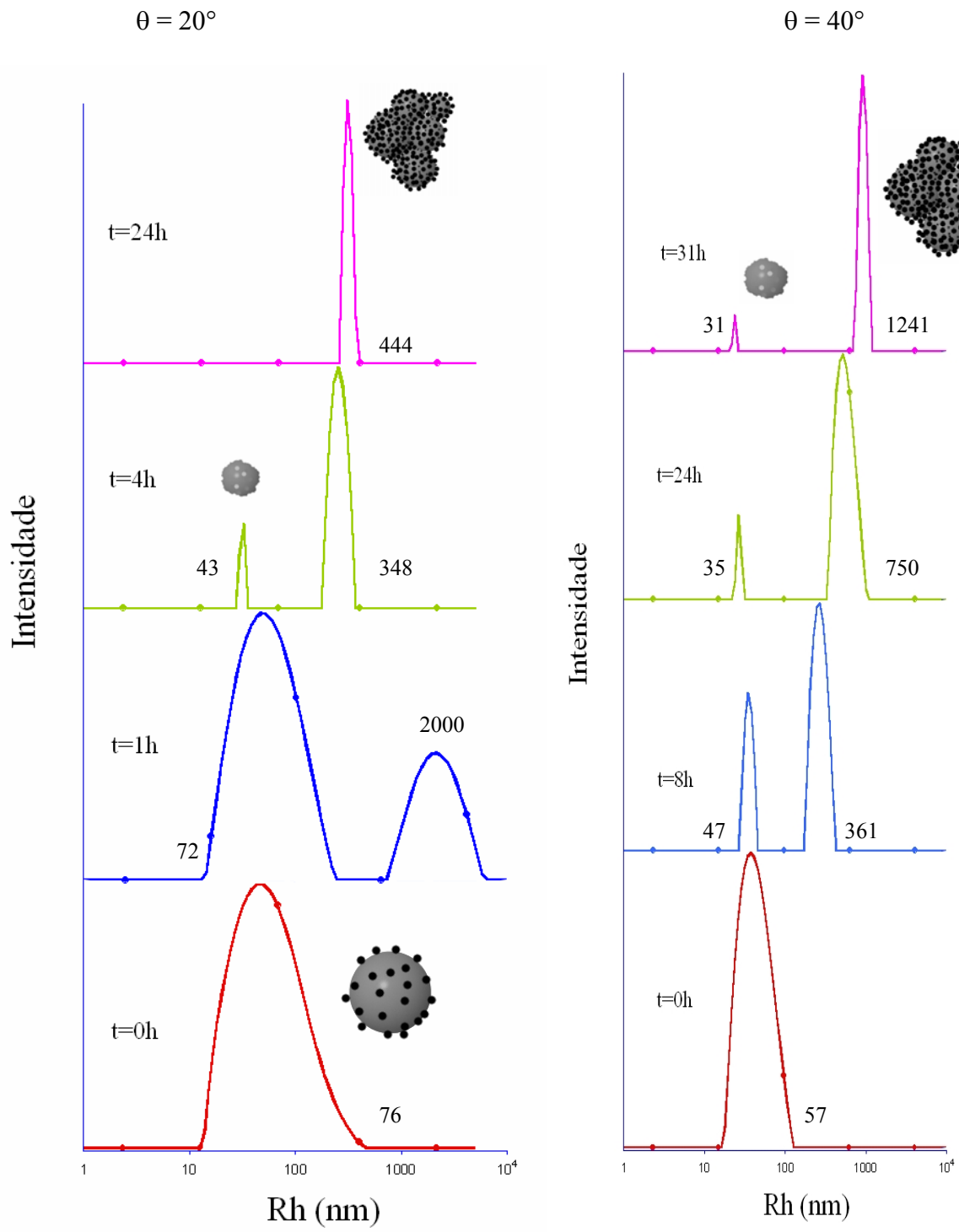
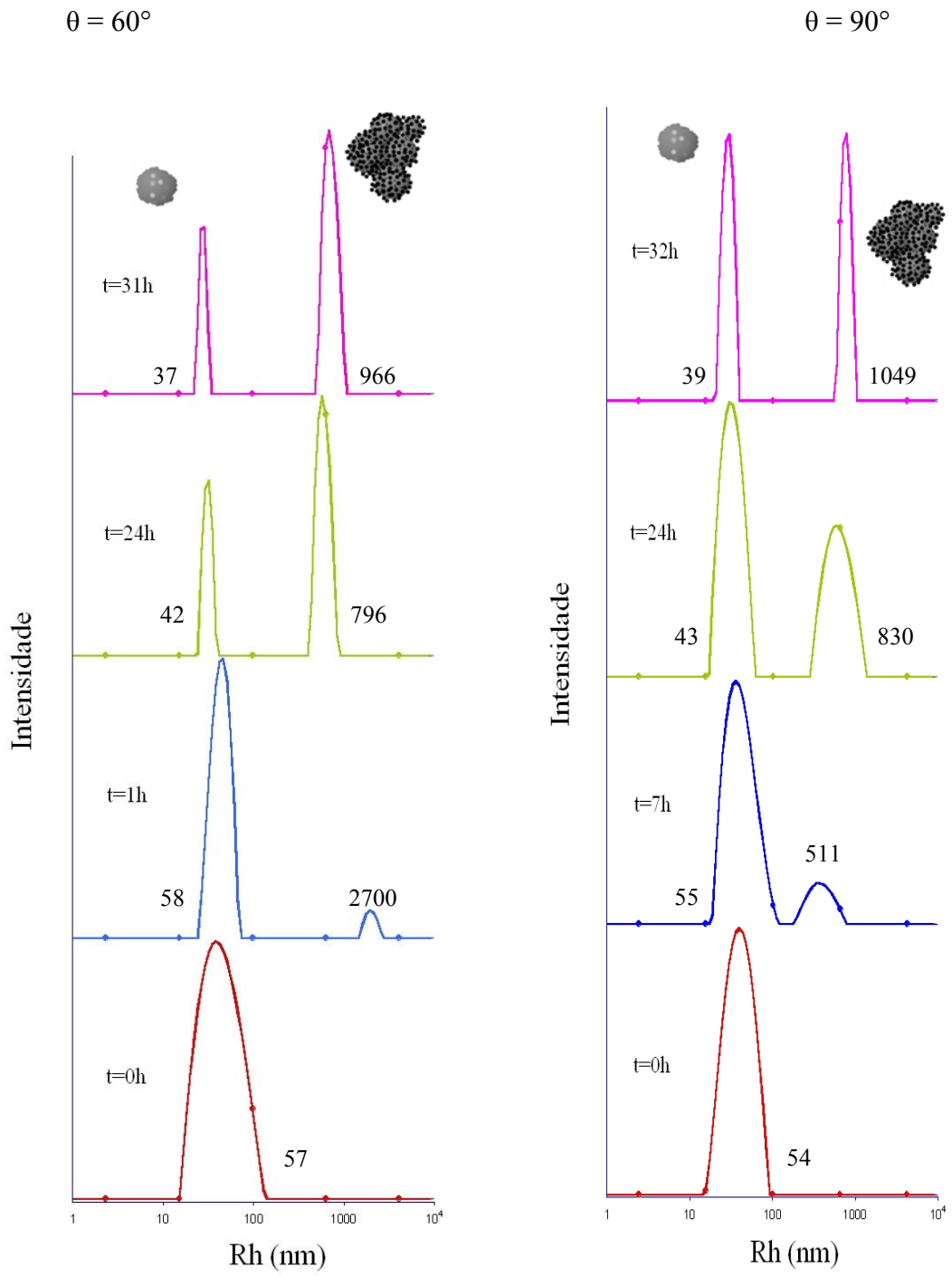


FIGURA 63. Redução do Rh em função do tempo de degradação no estudo de dependência angular.

A modificação no raio hidrodinâmico das partículas também é apresentada a seguir no formato de picos para os diferentes ângulos estudados.

Para todos os ângulos, observa-se o aparecimento de um pico de maior raio hidrodinâmico atribuído aos aglomerados de partículas e enzimas e a redução gradual do pico de nanopartículas, indicando a degradação (Figura 64).





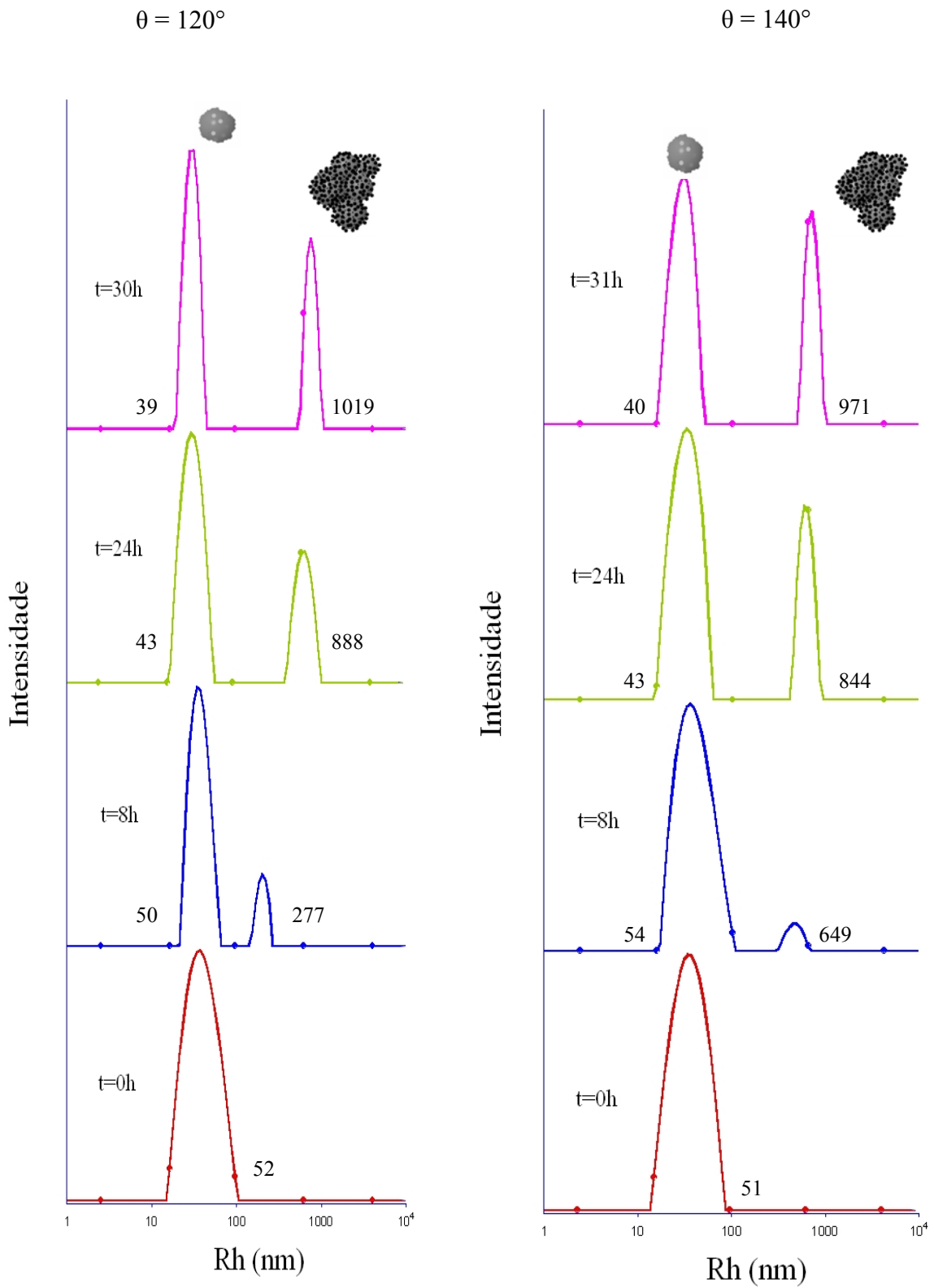


FIGURA 64. Comportamento do Rh (nm) nos diferentes ângulos estudados, a temperatura de 37°C .

Com o estudo de dependência angular foi possível verificar que a formação de agregados e a redução do raio hidrodinâmico, sugerido no início deste capítulo como evidências da degradação, puderam ser observadas em todos os ângulos estudados atribuindo confiabilidade ao estudo.

A realização dos testes de degradação foi uma das principais propostas deste trabalho de tese. Através dele conseguimos comprovar que o poliuretano sintetizado em nosso estudo a partir de um polioliol natural é biodegradável o que aumenta a potencialidade de uso deste material.

Quanto à composição das partículas, conclusões interessantes e condizentes com a literatura foram obtidas. A formulação F16M preparada com IPDI (diisocianato alifático) apresentou melhor degradação que a formulação F13 preparada com MDI (diisocianato aromático), estando de acordo com dados de Chandra e Rustgi (1997). Entretanto, quando o poli(etileno glicol) foi utilizado na preparação das partículas, o perfil de degradação das formulações F12 (preparada com MDI) e F10M (preparada com IPDI) foi semelhante independente do diisocianato utilizado (em 24 horas a formulação F12 foi degradada em 73% e a F10M em 70%, ver figuras 43 e 46). O aumento da biodegradação de poliuretanos preparados com PEG foi também relatado por Lee *et al.* (2001) e Mahkam e Sharifi-Sanjani (2003).

Ambos os fatores, tipo de diisocianato e adição de PEG, contribuem na determinação da estrutura da matriz polimérica, tornando-a mais ou menos compacta o que influencia na acessibilidade das enzimas aos sítios de degradação. Quanto menos compacta e mais porosa for a matriz polimérica, mais fácil é o acesso das enzimas e mais rápida será a degradação.

As partículas foram susceptíveis à degradação hidrolítica dependente do pH (tampão fosfato pH = 7,4 e em meio alcalino) e enzimática.

O estudo de degradação será correlacionado com o estudo de liberação do levofloxacino no capítulo 6.

6. AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE LIBERAÇÃO

Difusão através da matriz polimérica e erosão/degradação são mecanismos de liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais. A velocidade com que estes fenômenos ocorrem e que diretamente afeta a velocidade de liberação, depende de fatores tais como as características físico-químicas do fármaco e do polímero, tamanho e morfologia da partícula, cristalinidade e peso molecular do polímero, interação entre o fármaco e o polímero, estado físico do fármaco, entre outros (Chandra e Rustgi, 1997). Portanto, a difusão e a degradação são processos que controlam a liberação do fármaco.

A encapsulação do levofloxacinó foi feita durante a síntese das partículas existindo, portanto, a possibilidade do fármaco reagir e estar fisicamente ligado à cadeia polimérica que constitui as partículas. A possível reação entre o fármaco e o polímero poderia ocorrer entre o grupo COOH do levofloxacinó e o grupo NCO do isocianato conforme representado na figura 65. Entretanto, a probabilidade de que ocorra reação entre o levofloxacinó e o diisocianato é pequena, pois o NCO reage preferencialmente com o grupo OH do poliál e do PEG.

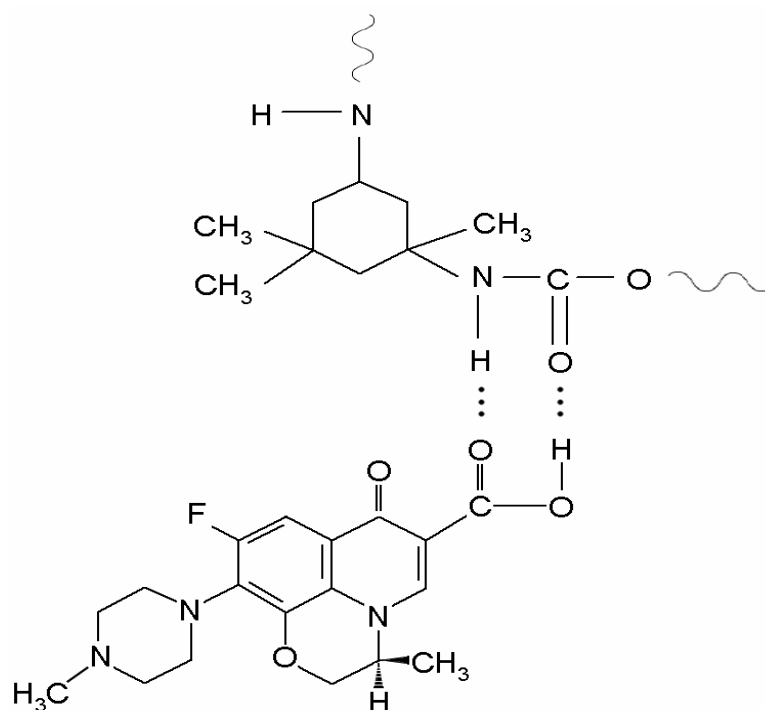


FIGURA 65. Esquema de ligação entre o polímero e o fármaco.

O estudo do perfil de liberação do levofloxacinó encapsulado nas partículas foi realizado conforme descrito em 3.5.

As formulações submetidas ao estudo de liberação foram as mesmas do estudo de degradação, mas para o estudo de liberação foi utilizada a fração total de partículas (sem filtração) e para o estudo de degradação as formulações foram previamente filtradas em filtro 0,22 μm . (ver tabela 14).

Após o doseamento por espectroscopia de fluorescência, foram construídos gráficos da quantidade de fármaco liberado em função do tempo. O meio de liberação utilizado no estudo foi o tampão fosfato (TF) pH = 7,4. A liberação do levofloxacin em cada formulação foi estudada na presença de papaína e estearase em tampão fosfato (20 unidades/mL) e em tampão fosfato sem enzimas.

As figuras 66 e 67 representam a cinética de liberação das formulações F12 e F13, preparadas com e sem PEG, respectivamente pela técnica de suspensão-poliadição. O percentual de levofloxacin no tempo zero foi considerado como a quantidade de fármaco não encapsulado e que, portanto já se encontra livre no sobrenadante.

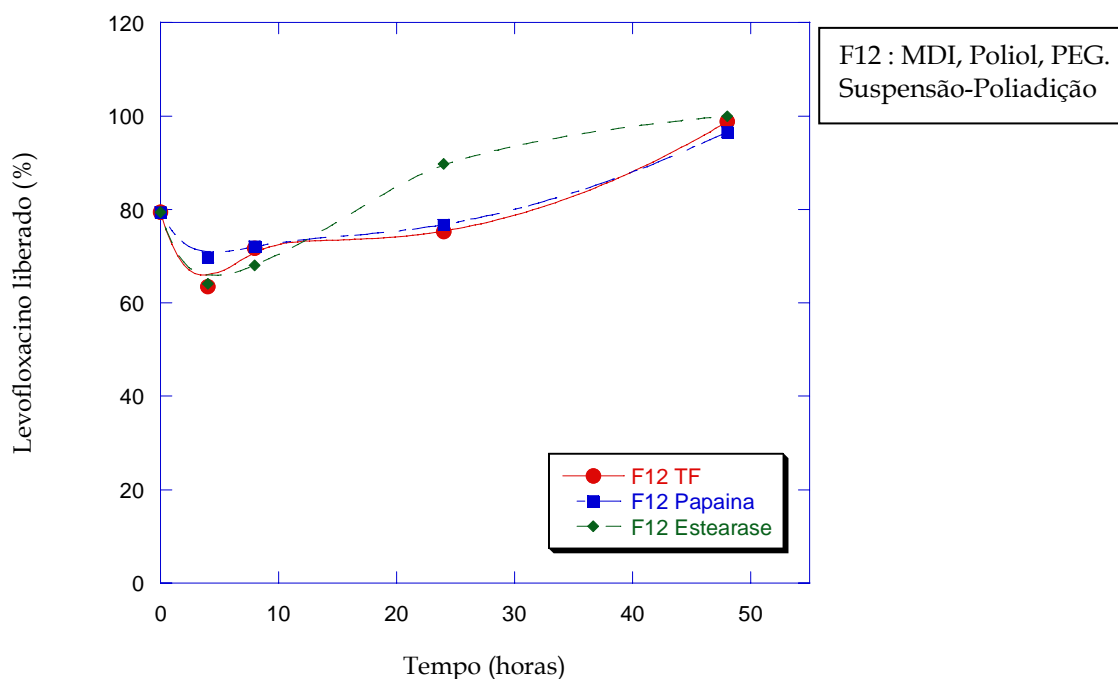


FIGURA 66. Cinética de liberação da formulação F12, preparada com 30% de PEG através da técnica de suspensão-poliadição.

Analisando-se as cinéticas de liberação do levofloxacin encapsulado na formulação F12, verifica-se que 100% do fármaco foi detectado no sobrenadante em

dois dias de estudo. Como a eficiência de encapsulação desta formulação foi de 20%, a quantidade de fármaco não encapsulada equivalente a 80% foi utilizada no tempo zero do estudo de liberação. Portanto, a quantidade de fármaco liberada em dois dias foi de 20%, ou seja, todo o levofloxacino encapsulado foi liberado em 48 horas.

Na presença de estearase a formulação F12 apresentou maior quantidade de fármaco liberado no primeiro dia talvez pela maior facilidade de quebra da ligação éster em relação a ligação amida que é hidrolisada pela papaína, mas num período de dois dias, 100% do levofloxacino foi dosado no sobrenadante também na ausência de enzimas. Por esta razão, foram realizados estudos de degradação das nanopartículas em presença de tampão fosfato pH = 7,4 sendo comprovada a degradação hidrolítica das partículas neste meio. A degradação hidrolítica em função do pH ou temperatura para polímeros na presença de tampão fosfato é descrita principalmente para o PLA e PLGA (Kiss e Vargha-Butler, 1999; Park, 1995).

Conforme foi verificado no capítulo 5, a formulação F12 teve uma degradação de 76% em 30 horas de estudo na presença de papaína. Estes resultados apresentam coerência entre o perfil de degradação e o perfil de liberação, sugerindo que a degradação da matriz polimérica possa estar envolvida na liberação do fármaco.

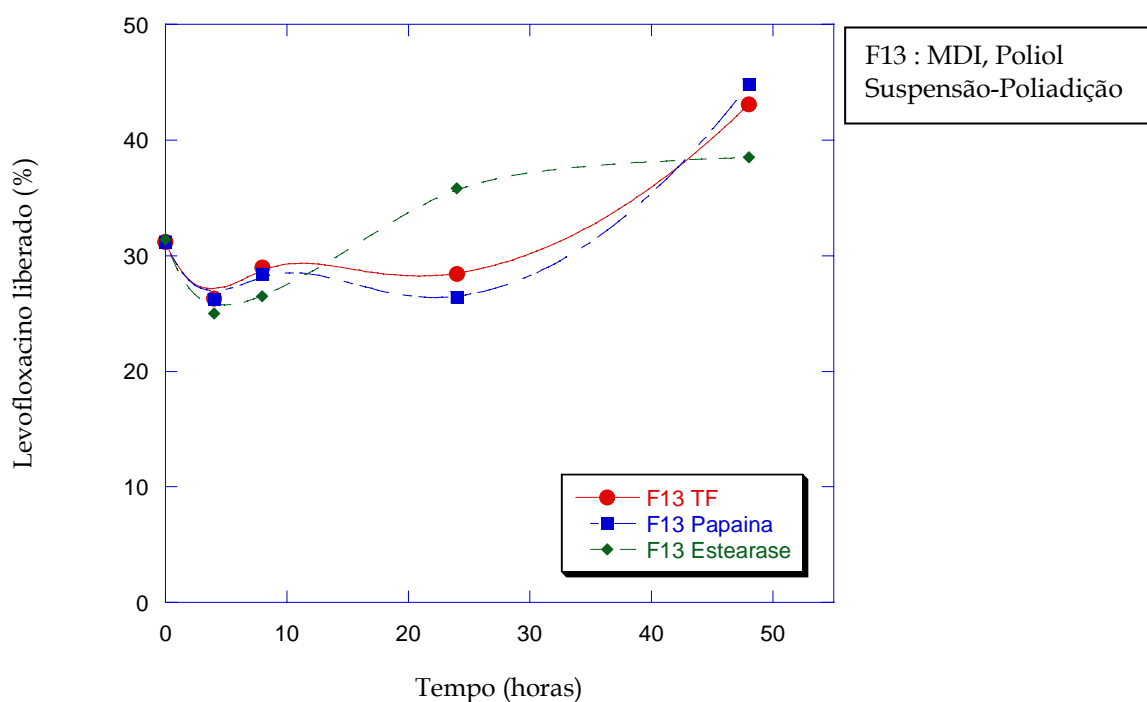


FIGURA 67. Cinética de liberação da formulação F13, preparada sem PEG através da técnica de suspensão-poliadição.

Na figura 67, é apresentado o perfil de liberação das partículas da formulação F13 preparadas sem PEG pela técnica de suspensão-poliadição. A eficiência de encapsulação desta formulação foi de 70% portanto, os 30% de levofloxacino no tempo zero correspondem à quantidade de fármaco não encapsulada. Em dois dias de estudo foi detectado 45% de levofloxacino no sobrenadante sendo que 15% foi liberado das partículas, restando ainda 55% a ser liberado. A formulação F13 também apresentou melhor liberação na presença de estearase nas primeiras 24 horas de ensaio. Estudos de degradação revelaram que uma menor degradação foi obtida para a formulação F13 (53% em 30 horas na presença de papaína) em comparação com a F12.

Outro fator que pode influenciar a liberação é o tamanho de partícula. Para o teste de liberação foi utilizada a fração total das partículas, que segundo dados de granulometria a laser apresentado no item 3.6.3, a formulação F13 apresenta diâmetro médio de 52 μm e distribuição de tamanho entre 0,07 a 300 μm e a formulação F12 (preparada com PEG) apresenta diâmetro médio de 5 μm e distribuição de tamanho entre 0,04 a 36 μm . Para a liberação via difusão, quanto maior o diâmetro médio da partícula, maior será o caminho que o fármaco deverá percorrer até atingir a fase contínua e menor será, portanto, a velocidade com que isto ocorre (Chien, 1990). Esta afirmação também é verdadeira para a degradação, quanto maior a área superficial mais rápida é a degradação. Wu e Gan (1997), verificaram que a degradação de nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) foi 10^3 vezes mais rápida que o filme do mesmo material, ressaltando a importância da área de superfície no processo de degradação.

Para os testes de degradação realizados em nosso trabalho, as formulações foram filtradas com filtro 0,22 μm e somente as nanopartículas foram analisadas. Portanto, não se pode fazer uma correlação direta entre os resultados de degradação e de liberação sem levar em conta o tamanho das partículas, sobretudo para as formulações preparadas pela técnica de suspensão-poliadição onde micro e nanopartículas foram obtidas na mesma formulação. Entretanto, se consideramos que ocorreu degradação durante o estudo de liberação a questão do tamanho é relevante.

As figuras 68 e 69 representam a cinética de liberação das formulações F10M e F16M preparadas com e sem PEG respectivamente, pela técnica de miniemulsão.

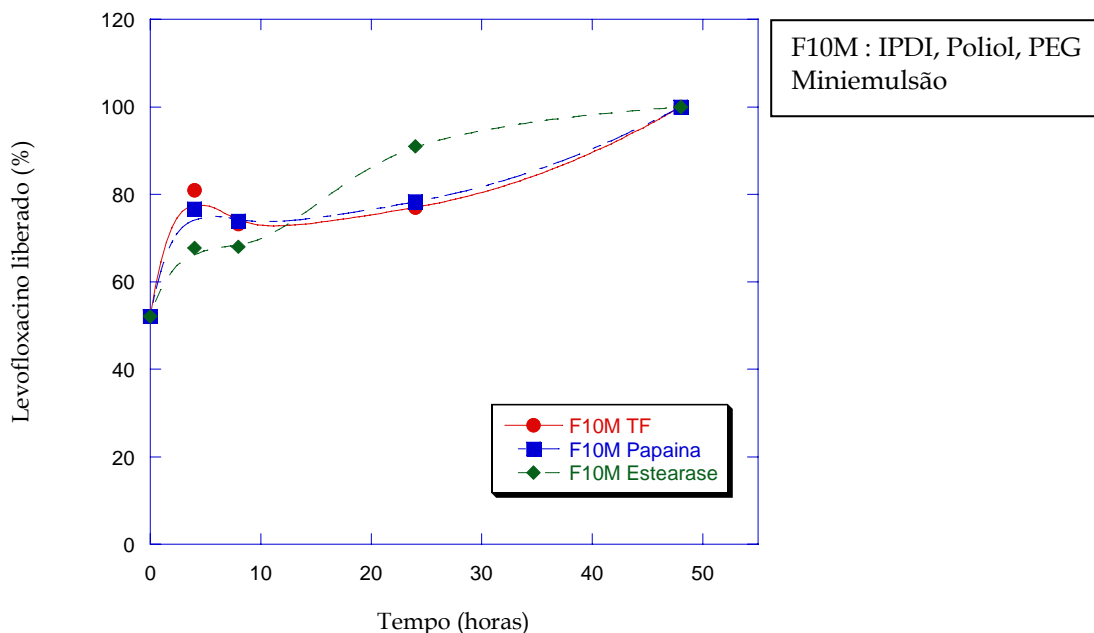


FIGURA 68. Cinética de liberação da formulação F10M (com PEG) preparada pela técnica de miniemulsão.

Através da análise dos gráficos apresentados nas figuras 68 e 69 observa-se que 100% do fármaco foi detectado no sobrenadante em 48 horas sendo que de maneira semelhante ao que foi verificado para as partículas sintetizadas pela técnica de suspensão-poliadição as formulações testadas com estearase apresentaram melhor perfil de liberação no primeiro dia (hidrolise das ligações éster), porém no segundo dia todo o fármaco foi liberado inclusive no meio de liberação na ausência de enzimas.

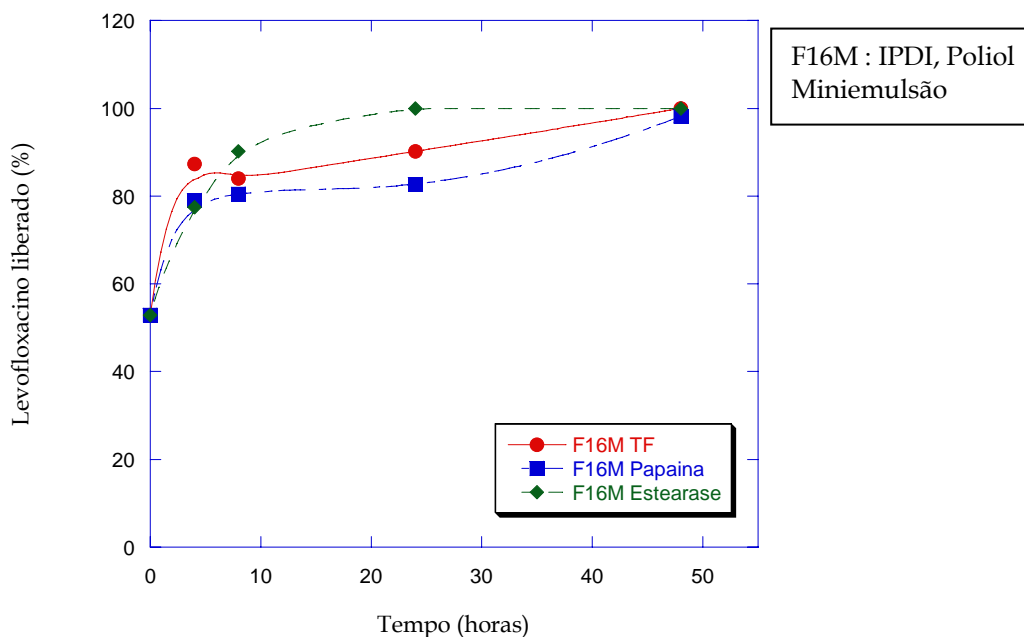


FIGURA 69. Cinética de liberação da formulação F16M (sem PEG), preparada pela técnica de miniemulsão.

As formulações preparadas por miniemulsão, com ou sem PEG, tiveram valores semelhantes de eficiência de encapsulação próximo a 48%. O valor em torno de 52% correspondente ao tempo zero nos gráficos de liberação é referente à quantidade de fármaco não encapsulada. Neste sentido, estas formulações liberaram 48%, ou seja, a quantidade total de levofloxacino encapsulado em 48 horas. Esta maior quantidade liberada pelas formulações da miniemulsão em relação às formulações da suspensão-poliadição pode ser devido à diferença de tamanho e/ou tipo de diisocianato utilizado, conforme discutido anteriormente.

Também foi verificada a coerência entre os valores de degradação e de liberação. A formulação F10M, por exemplo, foi degradada em 70% em 24 horas na presença de papaína. No estudo de liberação, 80 % do levofloxacino foi detectado no sobrenadante no mesmo período de tempo e na presença de papaína.

Nas formulações da miniemulsão (figura 68 e 69), as curvas de liberação parecem ser bifásicas, sugerindo que tenha ocorrido liberação por difusão e degradação da matriz polimérica concomitantemente. É possível que a maior velocidade de liberação observada nas primeiras quatro horas de estudo seja devido à difusão do fármaco. Após este período, a liberação tornou-se lenta e gradual sugerindo que ela possa estar associada à erosão da matriz.

6.1 Modelos de liberação

O transporte dos fármacos no interior dos sistemas farmacêuticos e a sua liberação envolvem, por vezes, múltiplas etapas provocadas por diferentes fenômenos físicos ou químicos, tornando-se neste caso, difícil, senão mesmo impossível, arranjar um modelo matemático que descreva de modo correto todo esse conjunto complexo de acontecimentos. Os modelos descrevem melhor a liberação

dos fármacos a partir dos sistemas farmacêuticos quando ela resulta de um fenômeno simples ou quando esse fenômeno, pelo fato de ser a etapa limitante, condiciona todo o processo (Costa, 2002).

A liberação controlada de moléculas de fármaco a partir de um sistema de liberação do tipo matricial fabricado com polímeros biodegradáveis ou bioerosíveis é mais complicada e pode ser vista como o resultado de dois processos cinéticos concorrentes: a difusão do fármaco na matriz polimérica e a erosão hidrolítica de primeira ordem (ou degradação) do polímero (Chien, 1990).

Entretanto, os modelos matemáticos de liberação de sistemas bioerosíveis não são tão desenvolvidos como os modelos de difusão ou controlados por intumescimento porque eles são geralmente muito mais complexos. Fenômenos de transferência de massa e reações químicas tais como a quebra da cadeia polimérica devem ser considerados nos sistemas bioerosíveis (Siepmann e Göpferich, 2001).

Para tentar elucidar o mecanismo que foi limitante na liberação do levofloxacinó a partir das partículas de poliuretano, foi utilizado o modelo de Higuchi que descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo ($f_t = K_{HT} t^{1/2}$). Desse modo um gráfico da quantidade liberada do fármaco versus a raiz quadrada do tempo deve ser linear para indicar que a liberação foi regida pelo processo de difusão (Costa, 2002). Os gráficos obtidos são apresentados nas figuras 70 a 73.

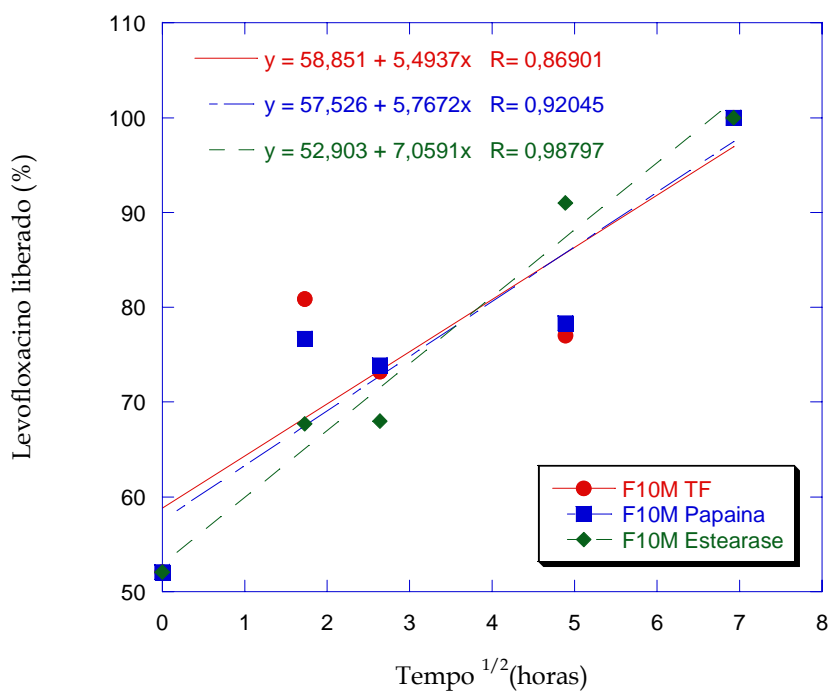


FIGURA 70. Quantidade de levofloxacino liberado da formulação F10M versus tempo $^{1/2}$ (horas).

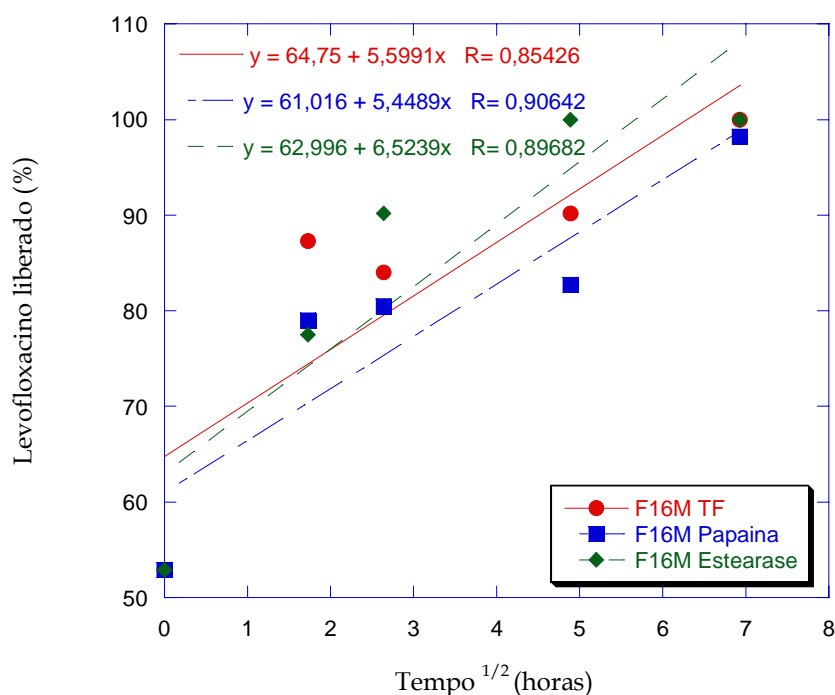


FIGURA 71. Quantidade de levofloxacino liberado da formulação F16M versus tempo $^{1/2}$ (horas).

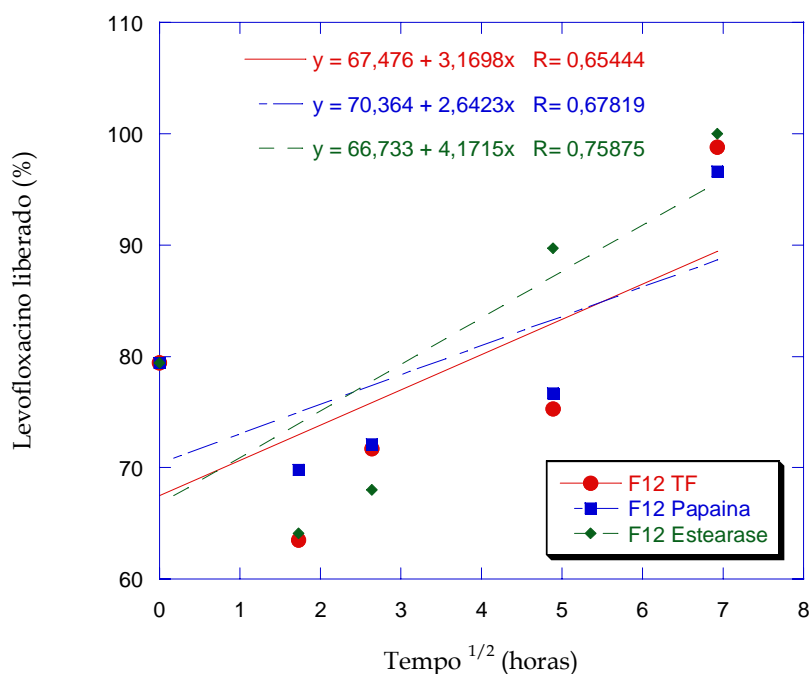


FIGURA 72. Quantidade de levofloxacino liberado da formulação F12 versus tempo $^{1/2}$ (horas).

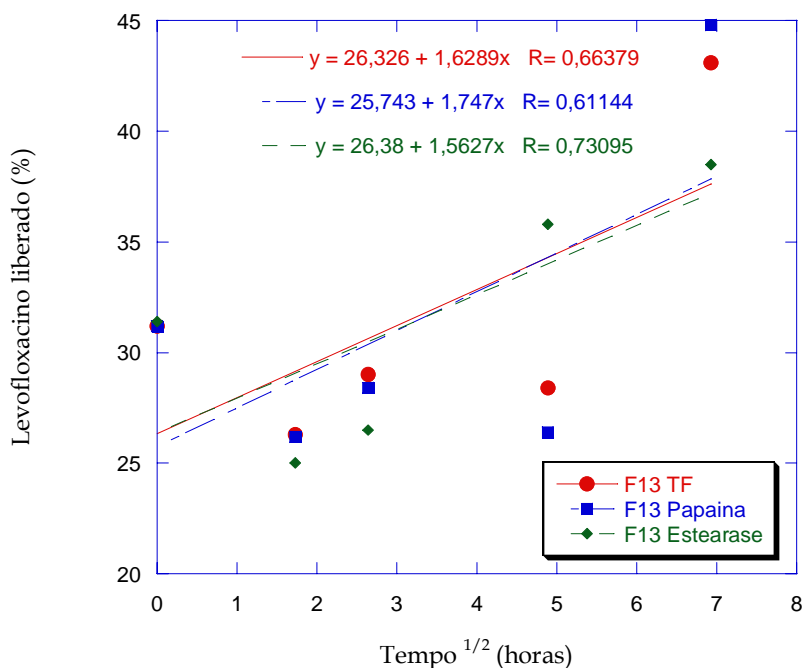


FIGURA 73. Quantidade de levofloxacino liberado da formulação F13 versus tempo ^{1/2} (horas).

Conforme verificado nos gráficos acima, os baixos de “r” indicaram que em nenhuma das formulações a quantidade de levofloxacino liberado foi proporcional à raiz quadrada do tempo o que sugere que a difusão não foi o mecanismo de liberação predominante e que o modelo de Higuchi não se aplica e estes perfis de liberação. Entretanto, a definição do mecanismo limitante da liberação só é possível com a aplicação de modelos matemáticos específicos.

De acordo com os resultados do capítulo 5, é muito provável de que a degradação da matriz polimérica esteja envolvida na liberação do fármaco, mas a possibilidade de liberação por difusão concomitantemente, não pode ser descartada.

Dentre os sistemas de liberação de fármacos dois especificamente estão relacionados com a biodegradação da matriz polimérica. No sistema de liberação ativado pela hidrólise é o processo de hidrólise que ativa a liberação das moléculas do fármaco que pode estar encapsulado numa microcápsula, microesfera, nanopartícula ou num dispositivo implantável. Todos estes sistemas são preparados a partir de um polímero erodível ou biodegradável. A liberação do fármaco através

da matriz polimérica é ativada pela degradação induzida pela hidrólise das cadeias do polímero e controlada pela velocidade de degradação do polímero. O outro sistema de liberação é ativado pela enzima. Este tipo de sistema depende de um processo enzimático para ativar a liberação do fármaco que pode estar fisicamente ou quimicamente ligado nas cadeias poliméricas de biopolímeros. A liberação do fármaco é ativada pela hidrólise enzimática dos biopolímeros por uma enzima específica no tecido alvo.

Observando-se os perfis de liberação do levofloxacino pode-se, num primeiro momento, sugerir que em nosso sistema a liberação tenha sido ativada pela hidrólise, pois as partículas sofreram degradação em meio alcalino e na presença de tampão fosfato mesmo na ausência de enzimas. Entretanto, os estudos de degradação enzimática foram realizados em meio aquoso e provaram que as enzimas realizam a degradação do polímero podendo também ativar a liberação do fármaco. Portanto, os dois tipos de degradação podem ter ativado a liberação, mas não é possível tecer informações conclusivas sobre qual foi o predominante.

7. CONCLUSÕES

Como conclusões deste trabalho destacam-se:

- A viabilidade do uso de um polioliol natural derivado do óleo de mamona como monômero na síntese de micro e nanopartículas de poliuretano.
- A utilização da técnica de suspensão-poliadição permitiu a preparação de partículas esféricas com granulometria variada (presença de micro e nanopartículas na mesma formulação).
- A adição de quantidades crescentes de poli(etileno glicol) na síntese de partículas pela técnica de suspensão-poliadição reduziu significativamente o diâmetro médio das partículas (de 400 μm para 5 μm). Entretanto, na ausência de PEG foi necessária uma velocidade de agitação de 20000 rpm para a obtenção de partículas com tamanho médio próximo a 50 μm . Este efeito do PEG na redução do diâmetro não foi verificado para as partículas sintetizadas pela técnica de miniemulsão.
- A uso do poli(etileno glicol) como co-monômero nas partículas sintetizadas pela técnica de suspensão-poliadição reduziu a eficiência de encapsulação de 70% (para formulações preparadas sem PEG) para em torno de 20% (formulações com PEG). Para as partículas sintetizadas pela miniemulsão, a adição de PEG como co-monômero não alterou os valores de eficiência de encapsulação.
- A utilização de 10% de PEG em relação à quantidade de monômeros aumentou a porosidade na superfície das partículas.
- A técnica de miniemulsão originou nanopartículas com distribuição monomodal de tamanho, em torno de 290 nm.

- Nas partículas sintetizadas por miniemulsão, maior rendimento de formulação foi obtido com o uso de surfactantes não-iônicos.
- O aumento da concentração de tween 80 nas formulações sintetizadas por miniemulsão reduziu o tamanho de partícula e aumentou o rendimento das formulações.
- Uma velocidade de homogeneização mínima de 14000 rpm foi necessária para obter nanopartículas com distribuição monomodal de tamanho pela técnica de miniemulsão.
- A redução nos valores de potencial zeta das partículas sugeriu que o PEG está recobrando as mesmas, o que foi confirmado por MET. Na presença de levofloxacino, os valores de potencial sugeriram que uma fração do fármaco não encapsulado possa estar na superfície das partículas.
- A técnica de espalhamento de luz permitiu acompanhar a degradação *in situ* das nanopartículas de poliuretano.
- Como evidência da degradação destacou-se a redução do raio hidrodinâmico das nanopartículas em função do tempo de ensaio.
- As nanopartículas foram susceptíveis à degradação por hidrólise em tampão fosfato e solução de NaOH 0,5 M e degradação enzimática com as enzimas estearase e papaína.
- A composição das formulações influenciou a velocidade de degradação. Partículas preparadas com diisocianato alifático (IPDI) degradaram mais rapidamente que aquelas preparadas com diisocianato aromático (MDI).

Entretanto, quando o poli(etileno glicol) foi utilizado como co-monômero mesmo as partículas preparadas com MDI apresentaram boa degradação.

- O perfil de liberação do levofloxacino sugere que a degradação das partículas está envolvida na liberação do fármaco, mas a difusão pode atuar concomitantemente em alguma etapa do processo.

Destacam-se como principais vantagens do sistema desenvolvido:

- Uso do poliálcool natural como monômero
- Uso de diisocianatos não tóxicos
- Polimerização em água
- Uso do óleo de oliva como agente hidrofóbico (miniemulsão)
- Polimerização sem catalisador (miniemulsão)
- Partículas biodegradáveis
- Partículas não tóxicas (ver estudo de citotoxicidade e genotoxicidade em anexo)
- Produto ecologicamente correto
- Produto economicamente viável

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABISMAIL, B., CANSELIER, J. P., WILHELM, A. M., DELMAS, H., GOURDON, C. **Ultrasonics Sonochemistry**, 6, 75-83, 1999.
- AHSAN, F., RIVAS, I. P., KHAN, M. A., SUÁREZ, A. I. T. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. **Journal of Controlled Release**, n. 79, p. 29-40, 2002.
- AKUTSU, Y., NAKAJIMA-KAMBE, T., NOMURA, N., NAKAHARA T., Purification and properties of a poliéster polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 62-67, 1998.
- ARSHADY, R., GEORGE, M. Suspension, Dispersion and Interfacial Polycondensation: A Methodological Survey. **Polymer Engineering and Science**, v. 33, n. 14, p.865-876, 1993.
- ARSHADY, R. Preparation of nano- and microspheres by polycondensation techniques. **Journal of Microencapsulation**, v. 6, n.1, p. 1-12, 1989.
- BAKER, R. W., US Patent 4839, 174 (1989).
- BARRE, J. Caractéristiques pharmacocinétiques des nouvelles fluoroquinolones. **Méd. Mal. Infect**, v. 31, n. 5, p. 637-641, 2001.
- BARRÈRE, M., LANDFESTER, K. High Molecular Weight Polyurethane and Polymer Hybrid Particles in Aqueous Miniemulsion. **Macromolecules** 36, 5119-5125, 2003.
- BENNETT, L, OTEY, F. H., MEHLETTER., C. L. *J Cell. Past.*, n. 3, 369, 1967.
- BOUCHEMAL, K., BRIANÇON, S., PERRIER, E., FESSI, H., BONNET, I., ZYDOWICZ. N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, 269, 89-100, 2004.
- BROSSE, C. SOUTIF, J-C, BROSSE, J-C, Preparation of microcapsules for skin allergy testing by the solvent evaporation process. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n.1 p. 111-116, 2000.
- BROSSE, C., EL HAMDAOUI A, SOUTIF, J-C ET BROSSE, J-C. Synthèse de polyuréthanes utilisables pour des techniques de microencapsulation - I.

- Modification chimique d'alcool polyvinylique par des isocyanates d'alkyle. **European Polymer Journal**, v. 31, n. 5, p. 425-429, 1994.
- BROSSE, C., FONTAINE, L., SOUTIF, J-C ET BROSSE, J-C. Synthèse de polyuréthanes utilisables pour des techniques de microencapsulation - II. Synthèse de polyuréthanes linéaires. **European Polymer Journal**, v. 31, n. 10, p. 931-936, 1995.
- CHAMBON, P., CLOUTET, E., CRAMAIL, H., TASSAING, T., BESNARD, M. Synthesis of core-shell polyurethane-polydimethylsiloxane particles in cyclohexane and in supercritical carbon dioxide used as dispersant media: a comparative investigation. **Polymer**, 46, 1057-1066, 2005.
- CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Progress Polymer Science**, v. 23, p. 1273-1335, 1997.
- CHIEN, YIE W. **Novel Drug Delivery Systems**. Marcel Dekker, Inc., 2 Ed. New York, 1990.
- CHU, B. "**Laser Light Scattering. Basic Principles and Practice**", 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1991.
- COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, 141-153, 2002.
- DAVARAN, S., ENTEZANI, A. Synthesis and hydrolysis of polyurethanes containing ibuprofen pendent groups. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 12, n. 1, p. 47-58, 1997.
- DELGADO, J., EL-AASSER, M. S., VANDERHOFF, J. W. Miniemulsion Copolymerization of vinyl acetate and butyl acrylate. I. Differences between the miniemulsion copolymerization and the emulsion copolymerization processes. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 24, 861-874, 1986.
- DU, L. M., YANG, Y. Q., WANG, Q. M. Spectrofluorimetric determination of certain quinolone through charge transfer complex formation. **Analytica Chimica Acta**, n. 516, p. 237-243, 2004.
- DURRIEU, V., GANDINI, A. Preparation of aqueous anionic poly(urethane-urea) dispersions. Influence of the structure and molecular weight of the macrodiol

- GE, J., WU, R., SHI, X., YU, H., WANG, M., LI, W. Biodegradable Polyurethane Materials from Bark and Starch II. Coating Material for Controlled-Release Fertilizer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, p. 2948-2952, 2002.
- GONZÁLEZ, J. A. O., MOCHÓN, M. C., DE LA ROSA, F. J. B. Spectrofluorimetric determination of levofloxacin in tablets, human urine and serum. **Talanta**, n.52, p. 1149-1156, 2000.
- GÖPFERICH, A. Erosion of composite polymer matrices. *Biomaterials*, 18, 397-403, 1997.
- GRAF, R., DOMB, A., QUELLEC, P., BLUNK, T., MULLER, R. H., VERBAVATZ, J., LANGER, M. R. **Adv. Drug Delivery Rev.**, 16, 215-233, 1995.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, article in press, available on line in www.sciencedirect.com 2005.
- HANS, M. L., LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science** n.6, p. 319-327, 2002.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.
- HONG, K., PARK, S. Preparation of polyurea microcapsules with different composition ratios: structures and thermal properties. **Materials Science and Engineering A**, n.272, p. 418-421, 1999.
- HOWARD, G. T. Biodegradation of polyurethane: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 49, p. 245-252, 2002.
- HUANG, H., ZHANG, LI, H. J., CHENG, S., HU, F., TAN, B. Miniemulsion copolymerization of styrene and butyl acrylate initiated by redox system at lower temperature-preparation and polymerization of miniemulsion. **Journal of Applied Polymer Science**, 68, 2029-2039, 1998.
- HUANG, S. J., ROBY, M.S., Biodegradable polymers poly(amide-urethanes). **Journal of Bioactive Compatible Polymers**, n.1, p. 61-71, 1986.

- ISKAKOV, R., BATYRBEKOV, E., ZHUBANOV, B., TELEUOVA, T., VOLKOVA, M. Polyurethanes as carriers of antitumorous drugs. **Polymer for Advanced Technologies**, v.9, p. 266-270, 1998.
- JABBARI, E., KHAKPOUR, M. Morphology of and release behavior from porous polyurethane microspheres. **Biomaterials**, 21, 2073-2079, 2000.
- JAYABALAN, M., LISYMOL, P. P. Studies on the effect of crosslinker on the stability of castor-oil-based aliphatic polyurethane potting compound. **Polymer Degradation and Stability**, 58, 251-255, 1997.
- KAWAHARA, H., GOTO, T., OHNISHI, K., OGURA, H., KAGE, H. Preparation of Epoxy resin/acrylic composite latexes by miniemulsion polymerization method. **Journal of Applied Polymer Science**, 81, 128-133, 2001.
- KIM, J-E, KIM, S-R, LEE, S-H, LEE, C-H, KIM, D-D. The effect of pore formers on the controlled release of cefadroxil from a polyurethane matrix. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 201, p. 29-36, 2000.
- KIM, J-Y., SHIM, S-B, SHIM, J-K. Effect of amphiphilic polyurethane nanoparticles on sorption-desorption of phenantherene in aquifer material. **Journal of Hazardous Materials**, n. 98, p. 145-160, 2003.
- KIM, Y. D., KIM, S. C. Effect of chemical structure on the biodegradation of polyurethanes under composting conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 62, p. 343-352, 1998.
- KIRK-OTHEMER. Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 5. John Wiley & Sons, New York, 1979.
- KISS, E', VARGHA-BUTLER, E.I. Novel method to characterize the hydrolytic decomposition of biopolymer surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 15, p. 181-193, 1999.
- KREITZ, M, R., WEBBER, W. L., GALLETI, P. M., MATHIOWITZ, E. Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes I. Fabrication and characterization of microporous polyurethanes membranes containing polymeric microspheres. **Biomaterials**, v. 18, p. 597-603, 1996.

- LAN, P. N. CORNEILLIE, S., SCHACHT, E., DAVIES M., SHARD, A. Synthesis and characterization of segmented polyurethanes based on amphiphilic polyether diols. **Biomaterials**, v. 17, p. 2273-2280, 1996.
- LANDFESTER, K. Polyreactions in Miniemulsions. **Macromolecular Rapid Communications**, 22, 896-936, 2001.
- LANDFESTER, K. The generation of nanoparticles in miniemulsion. **Advanced Materials**, 13, 765-768, 2001.
- LANDFESTER, K., BECHTHOLD, N., FÖRSTER, S., ANTONIETTI, M. Evidence for the preservation of the particle identity in miniemulsion polymerization. **Macromol. Rapid Commun.**, 20, 81-84, 1999.
- LANDFESTER, K., PAWELZIK, U., ANTONIETTI, M. Polydimethylsiloxane latexes and copolymers by polymerization and polyaddition in miniemulsion. **Polymer**, 46, 9892-9898, 2005.
- LANDFESTER, K., TIARKS, F., HENTZE, H-P, ANTONIETTI, M. Polyaddition in miniemulsions: A new route to polymer dispersions. **Macromol. Chem. Phys.** 201, 1-5, 2000.
- LEE, S.I., YU, S-C, LEE, Y-S. Degradable polyurethanes containing poly(butylenes succinate) and poly(ethylene glycol). **Polymer Degradation and Stability**, n. 72, p. 81-87, 2001.
- LELAH, M.D., COOPER, S.L. **Polyurethanes in medicine**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986.
- LI, M., DANIELS, E. S., DIMONIE, V., SUDOL, E. D. EL-AASSER, M. S. Preparation of polyurethane/acrylic hybrid nanoparticles via a miniemulsion polymerization process. **Macromolecules**, 38, 4183-4192, 2005.
- LUCAS, E., SOARES, B E MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros - Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Editora e-papers, 366 páginas. Rio de Janeiro, 2001.
- LUO, Y., ZHOU, X. Nanoencapsulation of a hydrophobic compound by miniemulsion polymerization process. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, 42, 2145-2154, 2004.

- on the dispersion and polymer properties. **Polymer International**, 54, 1280-1287, 2005.
- DURRIEU, V., GANDINI, A., BELGACEM, M. N., BLAYO, A., EISELE, G., PUTAUX, J-L. Preparation of Aqueous anionic poly-(urethane-urea) dispersions: influence of the nature and proportion of the urethane groups on the dispersion and polymer properties. **Journal of Applied Polymer Science**, 94, 700-710, 2004.
- EBELING, T., BORSALI, R., PAILLET, M., DIAT, O., CAVAILLE, J. Y., CHANZY, H., DUFRESNE, A. **Langmuir**, 19, 6123, 1999.
- EHRlich, A., SMITH, M.K., PATTON, T.C. Castor polyols for urethane foams. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 36, 149-154, 1959.
- FARIAS, T. J., CAMPOS, A M. LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of poly(D,L-lactide) (PLA) and Poly(D,L-Lactide)-Poly(Ethylene Glycol) (PLA-PEG) nanocapsules containing antitumoral agent methotrexate. **Macromolecular Symposia**, 229, 228-233, 2005.
- FENG, S., HUANG G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers. **Journal of Controlled Release** 71, 53-69, 2001.
- FONTANA, G., LICCIARDI, M., MANSUETO, S., SCHILLACI, D., GIAMMONA, G. Amoxicilin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. **Biomaterials**, 22, 2857-2865, 2001.
- FONTENOT, K., SCHORK, F. J. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 32, 373-385, 1993.
- FREITAS, S., HIELSCHER, G., MERKLE, H. P., GANDER, B. Continuous contact- and contamination-free ultrasonic emulsification - a useful tool for pharmaceutical development and production. **Ultrasonics Sonochemistry**, in press.
- FRÈRE, Y., DANICHER, L., GRAMAIN, P. Preparation de poliuretanes microcapsules by interfacial polycondensation. **European Polymer Journal**. n. 34, 193-199, 1998.
- FU, J., WU, C. Laser light scattering study of the degradation of poly(sebacic anhydride) nanoparticles. **Journal of Polymer Science Part B: polymers Physics**, v. 39, 703-708, 2001.

- MAHKAM M., SHARIFI-SANJANI, N. Preparation of new biodegradable polyurethanes as a therapeutic agent. **Polymer Degradation and Stability**, n. 80, p. 199-202, 2003.
- MARQUARDT, EIFER-LIMA. **Quimica Nova**, 6, 24, p. 846-855, 2001.
- MERCK AND COMPANY, INC. PUBLISHERS, **The Merck Index**. 11° Edição Rahway, New Jersey: S. Budavari, Ed., 1989.
- MURKOVIC, M., LECHNER, S., PIETZKA, A., BRATACOS, M., KATZOGIANNOS, E. Analysis of minor components in olive oil. **Journal of biochemical and biophysical methods**, 61, 155-160, 2004.
- OGUNNIYI, D.S., FAKAYEJO, W.R.O., OLA, A. Preparation and properties of polyurethanes from toluene diisocyanate and mixtures of castor oil and polyol. **Iranian Polym. J.** 5, 56-59, 1996.
- PAGE-CLISSON, M. E., PINTO-ALPHANDARY, H., OUREVITCH, M., ANDREMONT, A., COUVREUR, P. Development of ciprofloxacin-loaded nanoparticles: physicochemical study of the drug carrier. **Journal of Controlled Release**, 56, 23-32, 1998.
- PARK, T. G. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition. **Biomaterials**, 16, 1123-1130, 1995.
- PATEL, P., SUTHAR, B. Interpenetrating polymer network from castor oil-based polyurethanes. **Polym. Eng. Sci.** 28, 901-905, 1988.
- PECORA, R. "**Dynamic Light Scattering**", ed. Plenum Press, New York, 1985.
- PILLAI, O., PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current opinion in Chemical Biology**, n.5, p. 447-451, 2001.
- Poliuretanos. Disponível em www.poliuretanos.com.br/livro/livro.htm. Acesso em: (01,03,2003).
- PULAT, M., BABAYIGIT, D. Surface modification of PU membranes by graft copolymerization with acrylamide and itaconic acid monomers. **Polymer Testing**, n.20, p. 209-216, 2001.
- QUIPENG, G., SHIXIA, F., QINGYU, Z. Polyurethanes from 2,4-toluene diisocyanate and a mixture of castor oil and hydroxyether of bisphenol A. **Eur. Polym. J.** 26, 1177-1180, 1990.

- ROJAS, I. A., SLUNT, J. B., GRAINGER, D. W. Polyurethane coatings release bioactive antibodies to reduce bacterial adhesion. **Journal of Controlled Release**, n. 63, p. 175-189, 2000.
- SHANTHA, K. L., RAO, K. P. Drug-Release Behavior of Polyurethane Microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 50, p. 1863-1870, 1993.
- SHEIKH, N. The effect of radiosterilization on cytotoxicity on polyurethane film. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 208, p. 214-219, 2003.
- SIEPMANN, J. GÖPFERICH, A Mathematical modelling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 48, 229-247, 2001.
- SIMÕES, S.I., TAPADAS, J.M., MARQUES C.M., CRUZ, M.E.M., MARTINS, M.B.F., CEVC, G. Permeabilization and solubilization of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 26, 307-317, 2005.
- SIRISATTHA, S., MOMOSE, Y., KITAGAWA, E., IWAHASHI, H. Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. **Water Research**, 38, 61-70, 2004.
- SOMANI, K.P., KANSARA, S.S., PATEL, N.K., RAKSHIT, A.K. Castor Oil based polyurethane adhesives for wood-to-wood bonding. **Int. J. Adhesion Adhesives** 23, 269-275, 2003.
- SOPPIMATH, K. S., AMINABHAVI, T. M., KULKARNI, A. R., RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, n. 70, p. 1-20, 2001.
- SOUZA, A A, LAVERDE JR, A. Aplicação da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear para estudos de Difusão Molecular em líquidos: A Técnica Dosy. **Química Nova** v.25, n.6^a, 2002.
- SUBHAGA, C. S., RAVI, K. G., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, n.6 p. 617-625, 1995.
- SUDOL, E. D., EL-AASSER, M. S. in: **"Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers"**, P. A. Lovell, M. S. El-Aasser, Eds., Chichester 1997, p. 699

- SULLIVAN, C. O., BIRKINSHAW. Hydrolysis of poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles using esterase. **Polymer Degradation and Stability**, n. 78, p. 7-15, 2002.
- TANG, P.L., SUDOL, E. D. SILEBI, C. A., EL-AASSER, M. S. Miniemulsion Polymerization - A comparative study of preparative variables. **Journal of Applied Polymer Science**, 43, 1059-1066, 1991.
- TANG, Y. W., LABOW, R. S., SANTERRE, J. P. Enzyme induced biodegradation of polycarbonate-polyurethanes: dose dependence effect of cholesterol esterase. **Biomaterials**, n. 24, p. 2003-2011, 2003.
- TIARKS, F., LANDFESTER, K. ANTONIETTI, M. One-step preparation of polyurethane dispersions by miniemulsion polyaddition. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, 39, 2520-2524, 2001.
- TORINI, L., ARGILLIER, J.F. ZYDOWICK, N. Interfacial polycondensation encapsulation in miniemulsion. **Macromolecules**, 38, 3225-3236, 2005.
- TRÂN, N. B. VIALLE, J. PHAM, Q. T. Castor oil-based polyurethanes: 1. Structural characterization of castor oil - nature of intact glycerides and distribution of hydroxyl groups. **Polymer**, 38, 2467-2473, 1997.
- TREVINO, A.S., TRUMBO, D.L. Acetoacetylated castor oil in coatings applications. **Prog. Org. Coat.** 44, 49-54, 2002.
- VAN BOS, M., SCHACHT, E. **Acta Pharm. Technol.**, v. 33 n. 3, p. 120, 1987.
- VENZIN, W., FLORENCE, A. In vitro degradation rates of biodegradable poly-N-alkyl-cyanocrylates. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**, 27-31, 1978.
- WANG, C. C., YU, N. S., CHEN, C. Y., KUO J. F. Miniemulsion polymerization of styrene. I. Preparation by redox initiator and new agitation mixer. **Journal of Applied Polymer Science**, 60, 493-501, 1996.
- WANG, G. B., SANTERRE, J. P, LABOW, R. S. High-performance liquid chromatographic separation and tandem mass spectrometric identification of breakdown products associated with biological hydrolysis of a biomedical polyurethane. **Journal of Chromatography B** v. 698, p. 69-80, 1997.

- WASHINGTON, C. Drug release from microparticulate systems. In: BENITA, S. (Ed). **Microencapsulation methods and industrial applications**. New York: Marcel Dekker, INC., p. 155-181, 1996.
- WATTS, P. J., DAVIES, M. C., MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.
- WHELAN, J. Nanocapsules for controlled drug delivery. **Drug Delivery Today**, v. 6, n. 23, p. 1183-1184, 2001.
- WIMER, S. M., SCHOONOVER, L, GARRISON, M. W. Levofloxacin: A Therapeutical Review. **Clinical Therapeutics**, v. 20, n. 6, p. 1049-1069, 1998.
- WU, C., GAN, Z. A novel method of studying polymer biodegradation. **Polymer**, v. 39, n. 18, p. 4429-4431, 1997.
- XIE, H.Q., GUO, J.S. Room temperature synthesis and mechanical properties of two kinds of elastomeric interpenetrating polymer networks based on castor oil. **Eur. Poly. J.** 38, 2271-2277, 2002.
- YAMAOKA, T. MAKITA, Y., SASATANI, H. KIM, S, KIMURA, Y. Linear type azo-containing polyurethane as drug-coating material for colon-specific delivery: its properties, degradation behavior and utilization for drug formulation. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 187-197, 2000.
- YEADON, D.A., MCSHERRY, W.F., GOLDBLATT, L.A. Preparation and properties of castor oil urethane foams. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 36, 16-20, 1959.
- YEGANEH, H., MEHDIZADEH M. R. Synthesis and properties of isocyanate curable millable polyurethane elastomers based on castor oil as a renewable resource polyol. **European Polymer Journal**, 40, 1233-1238, 2004.
- ZANETTI, B. G., SOLDI, V. E LEMOS-SENNA, E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 229-236, 2002.

ZANETTI-RAMOS, B., SOLDI, V., LEMOS-SENNA, E. BORSALI, R. Use of natural monomer in the synthesis of nano and microparticles of polyurethane by Suspension-Polyaddition Technique. **Macromolecular Symposia**, 229, 234-245, 2005.

ZHAO, Y., HU, T., LV, Z., WANG, S., WU, C. Laser light-Scattering studies of poly(caprolactone-b-ethylene oxide-b-caprolactone) nanoparticles and their enzymatic biodegradation. **Journal of Polymer Sciences: Part B: Polymer Physics**, v. 37, 3288-3293, 1999.

ZHAO, Y., FU, J., NG, D. K. P., WU, C. Formation and degradation of poly(D,L-lactide) nanoparticles and their potential application as controllable releasing devices. **Macromolecular Bioscience**. 4, 901-906, 2004.

ANNEXE - RESUME EN FRANÇAIS

Introduction

Le traitement d'une maladie aiguë ou chronique est généralement réalisé par l'administration de médicaments en utilisant plusieurs formes pharmaceutiques tels des comprimés, capsules, suppositoires, crème et pommades. De telles administrations entraînent souvent des effets collatéraux indésirables. Pour pallier ces effets secondaires, de nouvelles stratégies ont été développées, permettant de contrôler la vitesse de libération du principe actif, le maintien de l'activité thérapeutique dans des périodes prolongées, ou encore, de cibler l'action de l'agent thérapeutique.

Les nouveaux systèmes de libération de médicaments ont été introduits dans la communauté biomédicale depuis la moitié des années 70. Ils se sont depuis développés très rapidement et remplacent progressivement les systèmes classiques. La libération d'un médicament vers une cible spécifique est connue pour être un processus complexe lequel est composé de multiples étapes, l'objectif final étant d'obtenir un système présentant le maximum de sécurité pour le patient (Chien, 1990).

Les polymères jouent un rôle fondamental dans la constitution de ces nouveaux systèmes de libération vu qu'ils recouvrent l'agent actif en constituant une barrière polymère laquelle est capable de contrôler la libération du médicament. Cela fait presque 30 ans que les polymères sont utilisés à des fins biomédicales et pharmaceutiques. Après l'introduction des premiers polymères synthétiques destinés aux systèmes de libération de médicaments, l'utilisation de polymères biodégradables s'est fortement développée pour ce type d'application (Pillai et Panchagnula, 2001).

Les polyuréthanes sont apparus comme des matériaux intéressants dans le domaine. Ils sont utilisés dans le secteur médical comme dispositifs intra vasculaires, pour la reconstitution du ménisque ou encore pour la réparation de cartilages et d'os. Dans le secteur pharmaceutique, ils sont utilisés comme véhicule pour la libération soutenue d'agents actifs. Les polyuréthanes ont excellentes propriétés mécaniques, une haute capacité d'élongation, une bonne résistance à l'abrasion et généralement sont biocompatibles (Jabbari et Khakpour, 2000). La versatilité des compositions des polyuréthanes peut donner lieu à des produits ayant des caractéristiques très différenciées et destinés à des applications spécifiques.

Dans cette étude, un matériau polyuréthane sous la forme de particules nano et micrométriques, issu d'un monomère d'origine naturelle, et donc potentiellement biodégradable, a été synthétisé puis testé pour l'encapsulation des agents actifs.

Plusieurs techniques sont envisageables pour la synthèse des polyuréthanes ; la plupart d'entre elles impliquent l'utilisation de solvants organiques ce qui représente un handicap eu égard des objectifs visés. La polyaddition en suspension dans l'eau a ainsi été sélectionnée dans un premier temps pour la synthèse de particules de polyuréthane. Néanmoins, par cette technique, des particules hétérogènes en taille ont été obtenues, nous conduisant à envisager la technique de mini-émulsion dans une seconde étape, permettant l'accès à des particules de polyuréthane calibrées.

Justificatif

Ce travail a été motivé par l'utilisation d'huile de « mamona » (castor oil) comme polyol naturel pour synthétiser des micro- et nanoparticules de polyuréthane, destinées à l'encapsulation d'agents actifs. Bien que la littérature décrive l'utilisation d'huile de mamona pour la synthèse du polyuréthane, l'utilisation de ce polyol pour la synthèse de micro et de nanoparticules de PU a été réalisée de manière inédite dans ce travail.

La technique de polyaddition en suspension a été initialement employée pour produire des formulations contenant des mélanges de micro et nanoparticules. Avec l'intention d'obtenir des formulations constituées seulement par des nanoparticules, la technique de polyaddition en mini-émulsion a ensuite été utilisée.

Objectif Général

Ce travail a eu comme objectif de préparer des micro et nanoparticules d'un polyuréthane basé sur un polyol d'origine naturelle et de vérifier d'une part la capacité de ces systèmes à encapsuler des agents actifs et, d'autre part, à se dégrader.

Objectifs Spécifiques

- Préparer des micro et nanoparticules de polyuréthane issu d'un polyol naturel par les techniques de polyaddition en suspension et de polyaddition en mini-émulsion;
- Évaluer l'effet de l'utilisation du poly(éthylène glycol) de masse molaire 400g/mol. comme co-monomère dans la synthèse des particules;
- Étudier l'influence de la vitesse d'agitation et de l'addition du poly(éthylène glycol) sur la taille des particules obtenues par la technique de polyaddition en suspension;
- Étudier l'influence de paramètres comme le type de tensio-actif, sa concentration, le type d'agent hydrophobe et la vitesse d'agitation sur le diamètre des particules et la stabilité de la formulation préparée par polyaddition en miniémulsion;
- Expérimenter la capacité des systèmes préparés à encapsuler et libérer efficacement les principes actifs;
- Évaluer par la technique de diffusion de la lumière la dégradation *in vitro* des particules;
- Réaliser une étude *in vitro* pour déterminer le profil de libération du principe actif encapsulé dans les particules.

SYNTHÈSE DE MICRO ET NANOPARTICULES DE POLYURÉTHANE PAR POLYADDITION EN SUSPENSION.

Étude préliminaire

Microsphères

Cet étude préliminaire a eu pour objectif de vérifier la viabilité de la préparation des microparticules de polyuréthane par la technique de polyaddition en suspension et d'examiner différentes concentrations en monomères (polyol et MDI) ainsi que le rapport $[NCO]/[OH]$.

Cette technique consiste à émulsifier sous la forme de gouttelettes les monomères précurseurs du polyuréthane dans le milieu de polymérisation (lequel doit être un non-solvant pour des monomères) contenant le tensio-actif. Dans cette méthode, les gouttelettes de monomères sont directement converties en particules de polymère. Le schéma de préparation est donné figure 1.

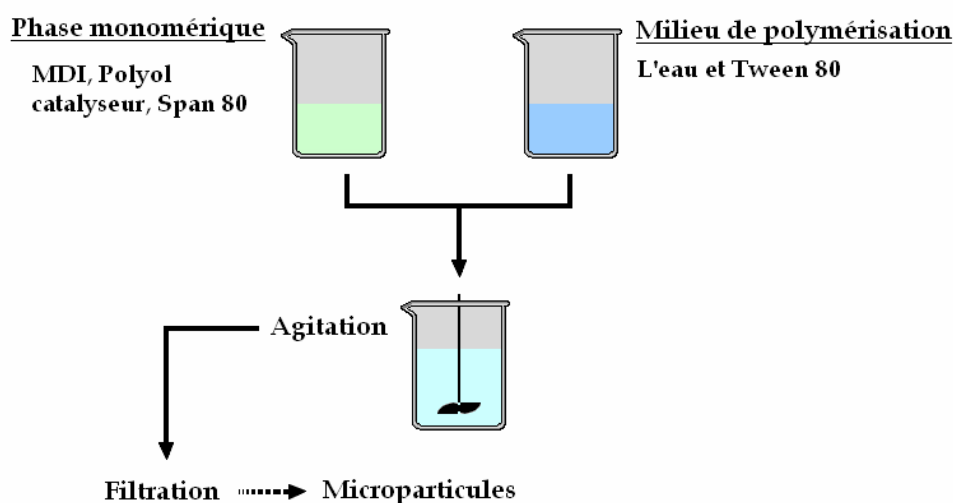


FIGURE 1. Schéma de préparation des microsphères.

L'évaluation de la morphologie

L'analyse de la morphologie a démontré que les particules sont sphériques et poreuses (figure 2). La présence des pores dans la particule est intéressante, dans la mesure où ces

derniers peuvent servir comme chemin de diffusion pour la libération des agents actifs encapsulés.

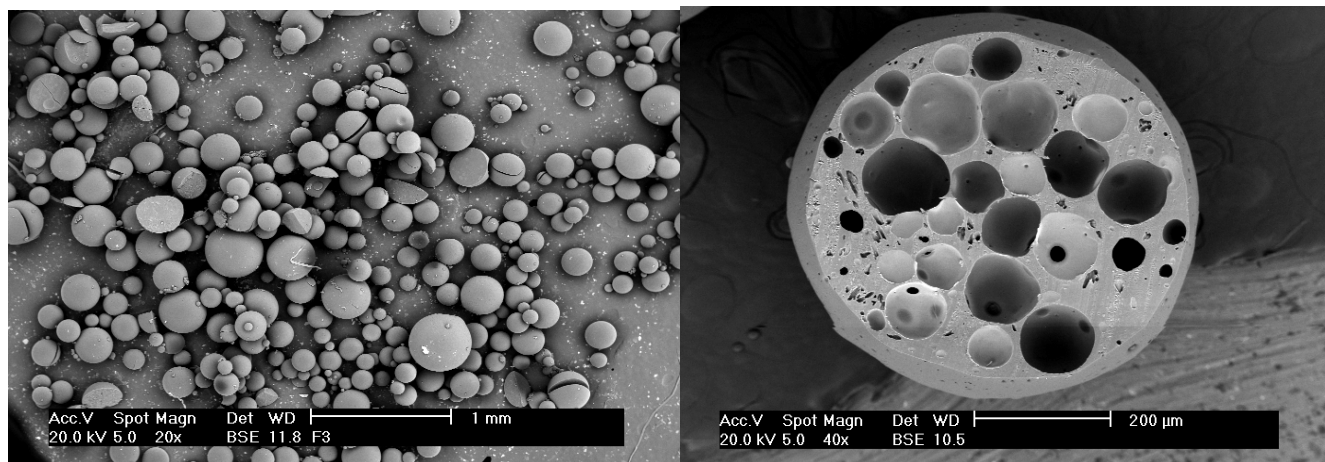


FIGURE 2. Photos obtenues par MEB.

L'étude définitive

Deux facteurs de formulation ont été choisis dans cette étude: la vitesse d'agitation et l'addition du second polyol poly(éthylène glycol) (PEG) dans la phase monomère. L'influence de ces facteurs sur le diamètre moyen des particules et sur l'efficacité de l'encapsulation a été étudiée.

La vitesse d'agitation a été choisie en tant que variable de l'étude parce qu'elle est un des facteurs les plus importants dans la détermination de la taille des particules. L'augmentation de la vitesse d'agitation peut réduire la taille des particules. Le poly(éthylène glycol) a été choisi dans l'objectif d'augmenter la biodégradabilité des particules.

Préparation des formulations

Les formulations ont été préparées selon le schéma présenté sur la figure 3.

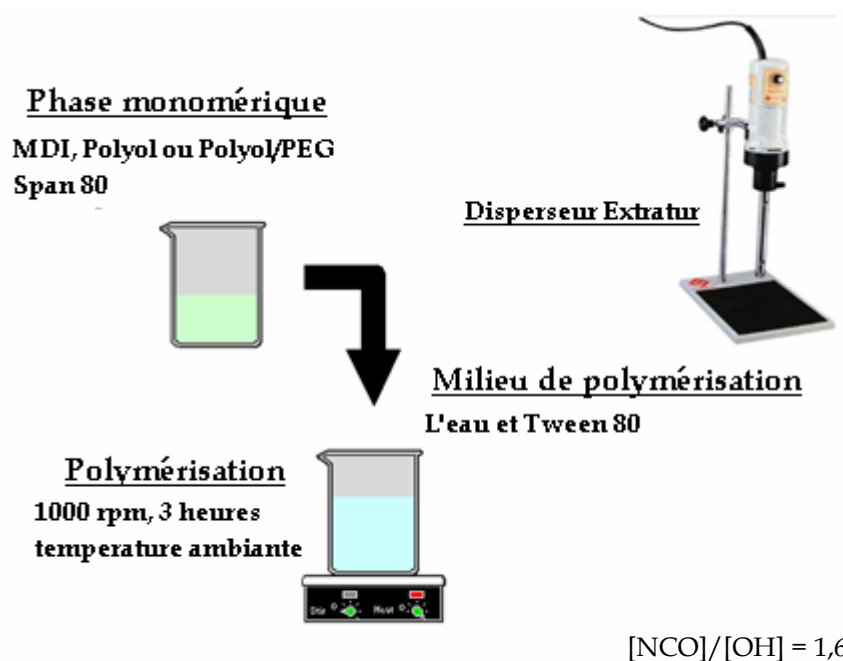


FIGURE 3. Schéma de préparation des particules selon la technique polyaddition en suspension.

Les formulations développées sont présentées dans le tableau 1.

TABLEAU 1. Composition, paramètres de formulation et rendement.

| Formulation | Monomères | % PEG | Vitesse d'agitation (rpm) | Rendement (%) |
|-------------|------------------------|-------|---------------------------|---------------|
| F1 | MDI:Polyol (4:6) | 0 | 1000 | 94 |
| F2 | MDI:Polyol:PEG (4:5:1) | 10 | 1000 | 96 |
| F3 | MDI:Polyol:PEG (4:4:2) | 20 | 1000 | 95 |
| F4 | MDI:Polyol:PEG (4:3:3) | 30 | 1000 | 90 |
| F5 | MDI:Polyol (4:6) | 0 | 12000 | 93 |
| F6 | MDI:Polyol:PEG (4:5:1) | 10 | 12000 | 97 |
| F7 | MDI:Polyol:PEG (4:4:2) | 20 | 12000 | 96 |
| F8 | MDI:Polyol:PEG (4:3:3) | 30 | 12000 | 98 |
| F9 | MDI:Polyol (4:6) | 0 | 16000 | 90 |
| F10 | MDI:Polyol:PEG (4:5:1) | 10 | 16000 | 92 |
| F11 | MDI:Polyol:PEG (4:4:2) | 20 | 16000 | 97 |
| F12 | MDI:Polyol:PEG (4:3:3) | 30 | 16000 | 98 |
| F13 | MDI:Polyol (4:6) | 0 | 20000 | 95 |
| F14 | MDI:Polyol:PEG (4:5:1) | 10 | 20000 | 94 |
| F15 | MDI:Polyol:PEG (4:4:2) | 20 | 20000 | 93 |
| F16 | MDI:Polyol:PEG (4:3:3) | 30 | 20000 | 98 |

Les effets des facteurs de formulation sur la taille des particules sont présentés dans la figure 4.

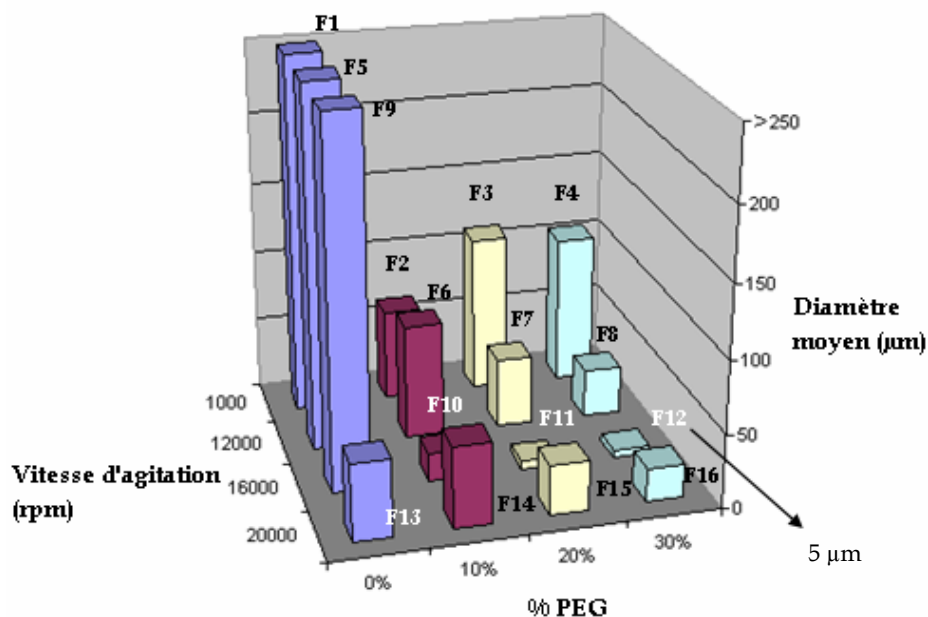


FIGURE 4. Effet des variables, addition de poly(éthylène glycol) et vitesse d'agitation, sur le diamètre moyen des particules.

La taille moyenne des particules synthétisées par la technique de polyaddition en suspension peut être influencée, entre autres facteurs, par la nature et la concentration du tensio-actif, par la quantité de monomères introduits et par la vitesse d'agitation (Arshady, 1989).

Dans ce travail, nous avons vérifié que la taille des particules peut également être influencée par l'addition de PEG dans la phase monomère. L'addition des quantités croissantes de PEG 400 a réduit de manière significative le diamètre moyen des particules de 400 µm à 5 µm. Cet effet peut être associé au caractère hydrophile du PEG qui a tendance à migrer dans la phase aqueuse (milieu de polymérisation) entraînant une réduction de la taille des particules (Figure 5). Cependant, quand le PEG n'est pas été ajouté dans les formulations, une vitesse d'agitation égale à 20000 rpm s'est avérée nécessaire pour obtenir des particules de taille autour du 50 µm. En plus, la vitesse de 16000 rpm s'est avérée être la plus efficace pour produire des nanoparticules. Selon la littérature (Watts, *et al.* 1990), plus la vitesse d'agitation est grande, plus la taille des particules est petite. Exceptionnellement, pour la vitesse d'agitation de 20000 rpm, cette relation n'est pas démontrée pour toutes les formulations.

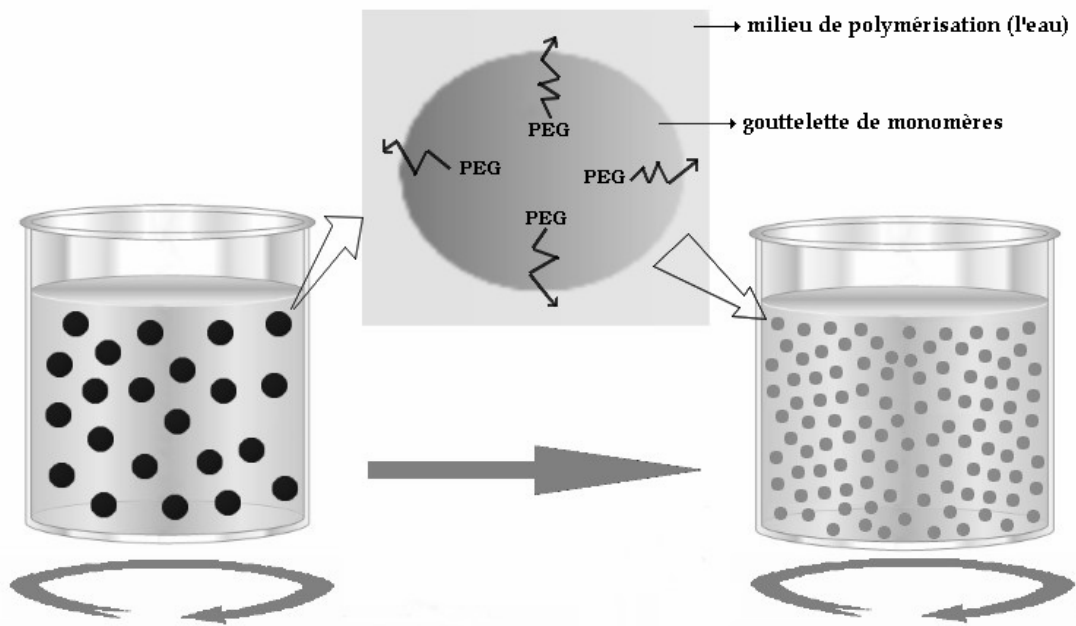


FIGURE 5. L'effet du PEG dans la réduction de la taille de particule.

Morphologie

La Figure 6 présente les images des microparticules préparées sans PEG (a) et avec 10% de PEG (b). Des particules sphériques ont été obtenues dans les deux formulations mais la porosité des particules est accrue quand le PEG est ajouté dans la phase monomère.

Le PEG peut entraîner la formation de pores dans le matériau, phénomène intéressant pour moduler la libération des agents actifs qui sont encapsulés (Zanetti, *et al.* 2002).

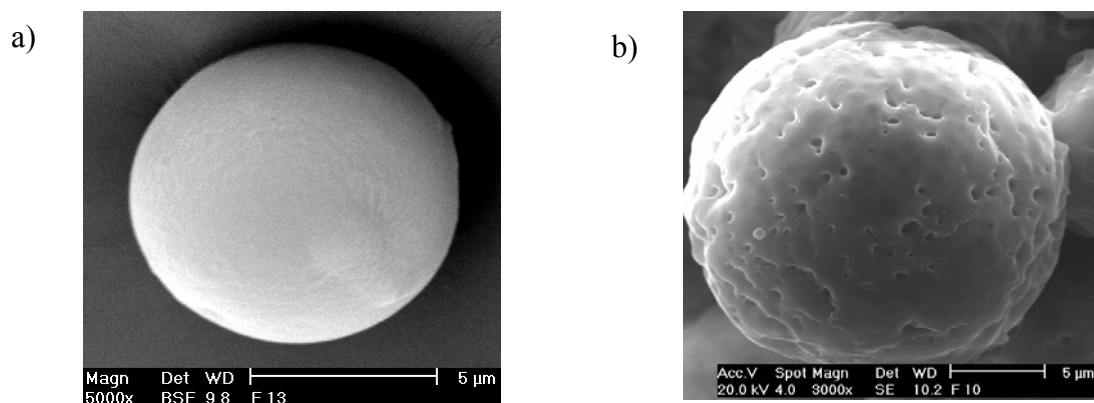


FIGURA 6. Microscopie électronique à balayage des microparticules obtenues (a) sans PEG et vitesse d'agitation de 20000 rpm et (b) avec 10% de PEG et vitesse d'agitation de 16000 rpm.

La fraction des nanoparticules a été visualisée par microscopie électronique à transmission (MET). La Figure 7 présente les photos obtenues pour la formulation F12. On peut observer que les nanoparticules sont également sphériques et présentent une polydispersité en taille comme déjà démontrée par d'autres techniques.

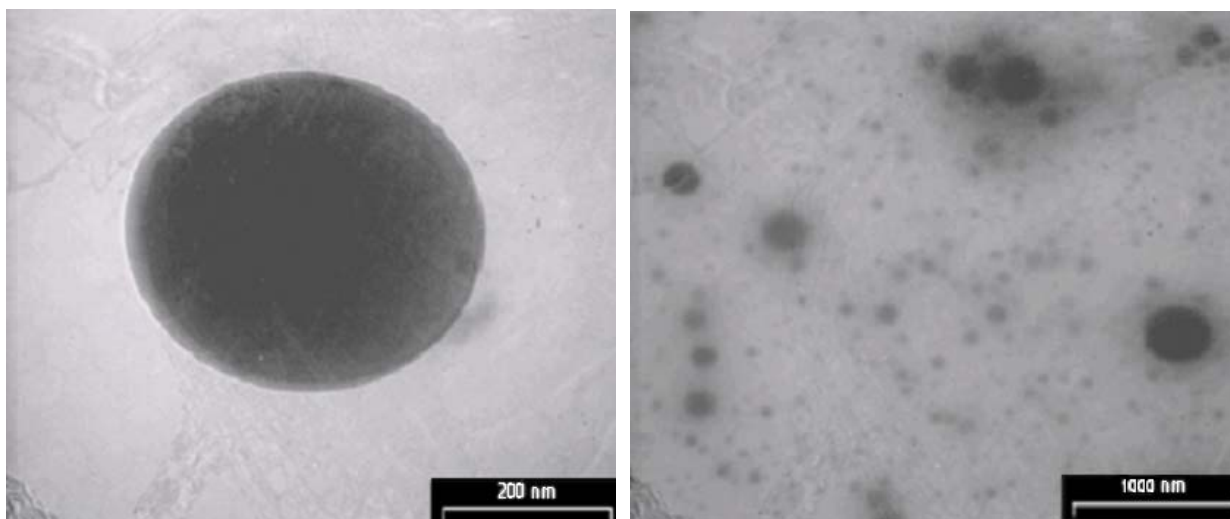


FIGURE 7. Images obtenues par MET de la formulation F12.

Spectroscopie d'infrarouge avec transformée de Fourier – FTIR

La technique de FTIR nous a permis de vérifier que la synthèse du PU a été complète. La bande d'absorption située en 2272 cm^{-1} est attribuée au groupe NCO de l'isocyanate MDI. La disparition de cette bande dans les formulations est une preuve de que le polyuréthane a été formé. La bande « amide » en 3300 cm^{-1} , « carbonyle » 1729 cm^{-1} et « CN » de l'amide à 1534 cm^{-1} sont également des évidences de la formation du polyuréthane (Jabbari et Khakpour, 2000) (Brosse, *et al.* 1995). La figure 8 présente le spectre des monomères (MDI et polyol) et des formulations F12 et F13 préparés avec et sans PEG, respectivement.

L'excès de NCO ($[\text{NCO}]/[\text{OH}] = 1,6$) a réagi avec l'eau en formant l'amine comme peut être observée par la bande en 3500 cm^{-1} . La bande en 1635 cm^{-1} correspond au groupe C=O de l'urée et elle est plus intense dans la formulation F12. Ce résultat est logique, car en présence du PEG qui est hydrophile, la réaction entre l'isocyanate et l'eau est favorisée et les groupements urée sont formés.

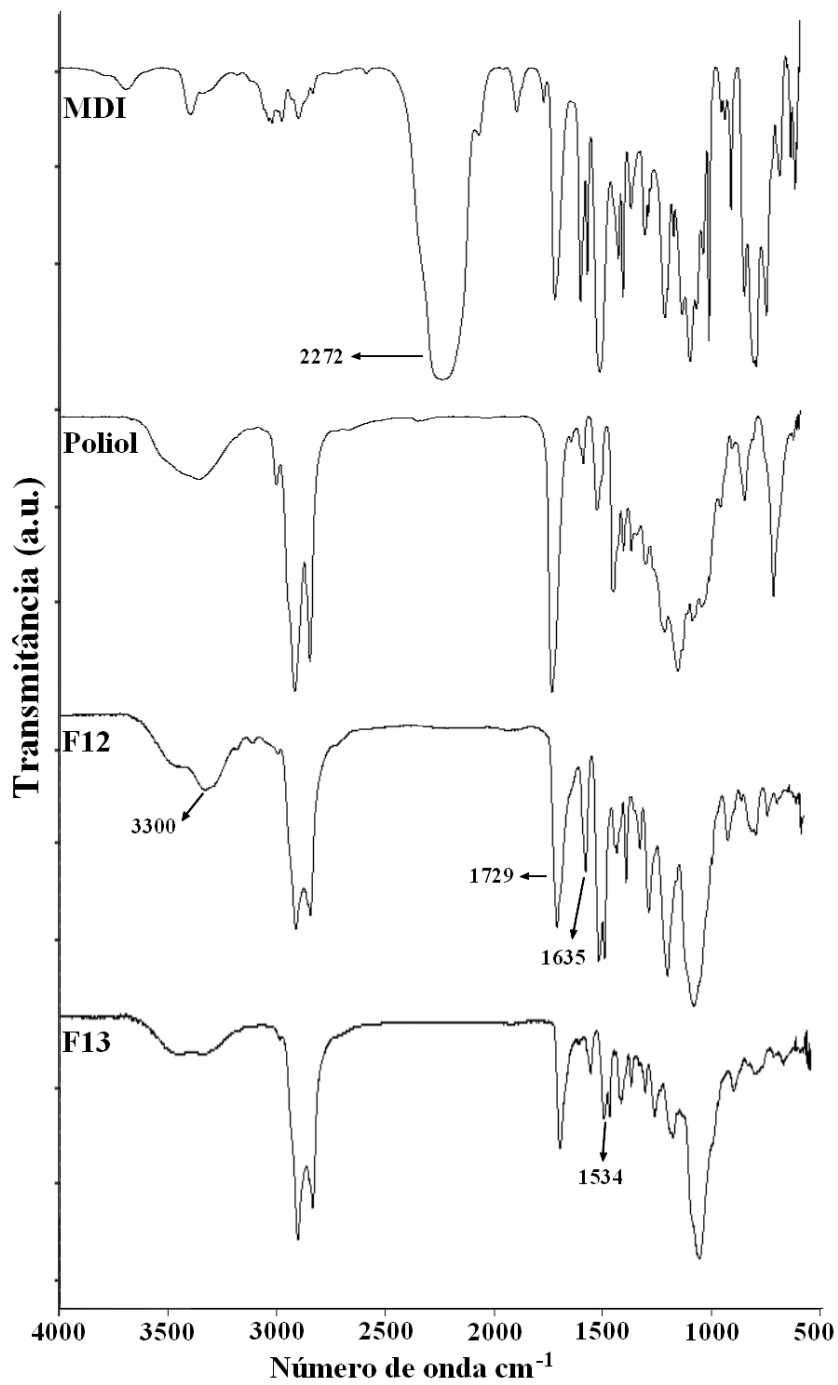


FIGURE 8. Spectres de FTIR-ATR des monomères MDI, polyol et des formulations F12 et F13 préparés avec et sans le PEG, respectivement.

Diffusion de la lumière

La formulation F12 a été analysée par ALV à quelques angles. Les mesures ont été réalisées dans les angles de 60°, 90° et 120°. Les échantillons filtrés (0,22 μm) ont un rayon hydrodynamique autour de 70 nm. La fonction de corrélation pour la formulation F12 est présentée sur le Figure 9. La courbe mono-exponentielle confirme la bonne corrélation de l'échantillon.

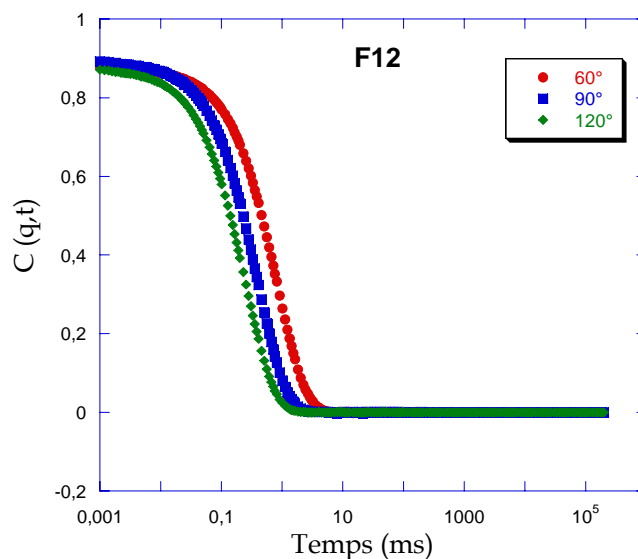


FIGURE 9. Fonction de corrélation mesurée à 25°C et angle de 60°, 90° et 120°.

La variation angulaire de la fréquence mesurée en fonction de q^2 indique le mouvement diffusif de l'échantillon F12 et l'existence des objets sphériques (Figure 10).

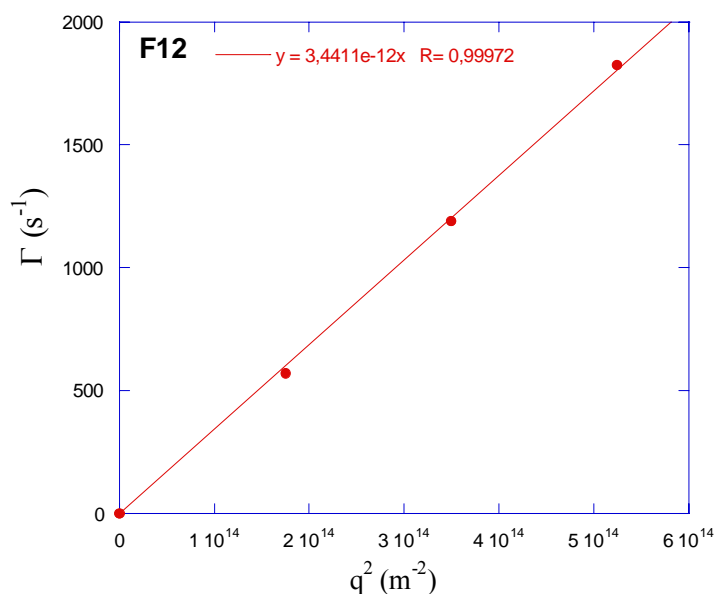


FIGURE 10. Γ versus q^2 pour la formulation F12.

Dosage

Pour l'étude de l'encapsulation, nous avons choisi le levofloxacin (antibiotique) comme principe actif modèle parce que il est fluorescent et permet un dosage facile.

La quantité de levofloxacin encapsulé a été déterminée par la différence entre la quantité de principe actif ajoutée à la formulation et la quantité mesurée dans le surnageant après ultracentrifugation des échantillons à 50000 rpm pendant 2 h.

Le dosage du surnageant a été fait par spectroscopie de fluorescence.

TABLEAU 2. Valeurs de dosage du levofloxacin dans les formulations.

| Formulation | C_T^a | | C_S^b | | Efficacité d'encapsulation ^c | |
|-------------|---------|-----|---------|------|---|------|
| | (mg/mL) | (%) | (mg/mL) | (%) | (mg/mL) | (%) |
| F10 | 2,5 | 100 | 2,01 | 80,6 | 0,49 | 19,4 |
| F11 | 2,5 | 100 | 1,96 | 78,7 | 0,54 | 21,3 |
| F12 | 2,5 | 100 | 1,98 | 79,4 | 0,52 | 20,6 |
| F13 | 2,5 | 100 | 0,78 | 31,2 | 1,72 | 68,8 |

^a C_T : Concentration totale de levofloxacin ajoutée dans la formulation;

^b C_S : Concentration de levofloxacin détectée dans le surnageant après l'ultracentrifugation de 50000 rpm pendant 2h;

^c La concentration du levofloxacin encapsulée dans la particule.

Le tableau 2 présente les efficacités d'encapsulation. L'addition du PEG comme comonomère a réduit l'efficacité d'encapsulation de 70% (F13 préparé sans PEG) à 20% (formulations avec PEG). Ce phénomène a déjà été observé dans une autre étude (Zanetti, *et al.* 2002) et s'explique par le fait que le PEG agit comme co-solvant et augmente la solubilité du levofloxacin dans l'eau, contribuant ainsi à sa sortie dans la phase aqueuse (milieu de polymérisation) et réduisant ainsi l'efficacité d'encapsulation.

La distribution du levofloxacin dans chaque formulation peut être mieux comprise avec l'aide de la figure 11.

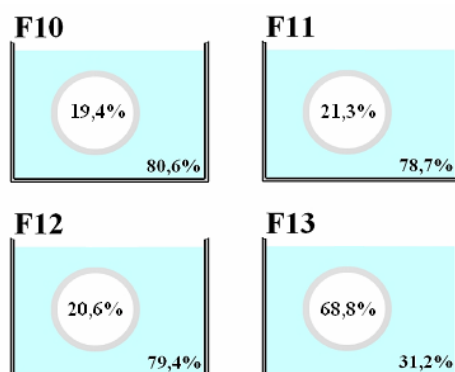


FIGURE 11. Figure schématique de la distribution du levofloxacin dans les formulations préparées par la technique de polyaddition en suspension.

Libération

L'étude de la libération du principe actif a été réalisée par la méthode d'ultracentrifugation. 2 mL de la suspension a été ajoutée à 18 mL de tampon phosphate pH = 7,4 avec et sans enzymes à température de 37° C.

Les enzymes étudiées ont été la estérase et la papaine, 20 unités/mL. Dans les périodes déterminées de temps, 1 mL de la solution a été ultra-centrifugé et le surnageant a été dosé pour déterminer la quantité de levofloxacin libre.

Le même essai a été fait dans le tampon phosphate pH = 7,4 sans enzymes.

Le pourcentage de levofloxacin à temps zéro a été considéré comme la quantité de principe actif non encapsulé.

Les figures 12 et 13 représentent la cinétique de la libération des formulations F12 et F13 préparées avec et sans PEG, respectivement.

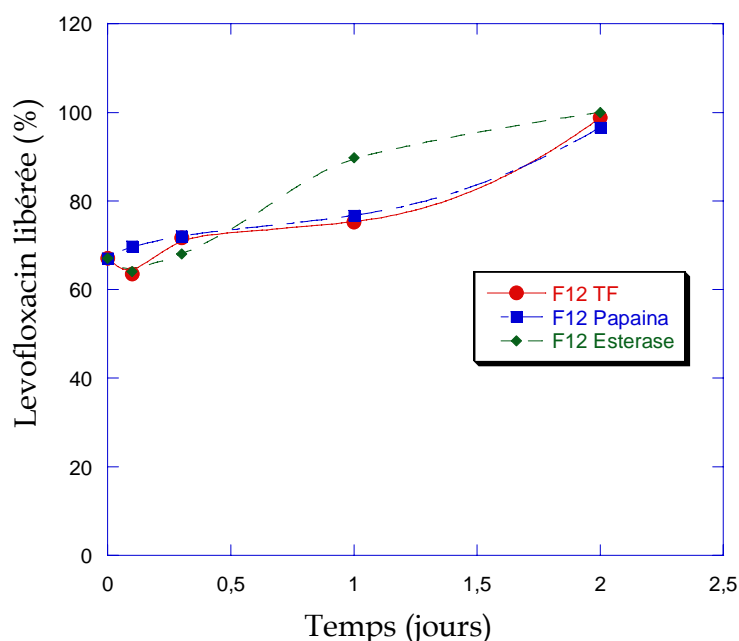


FIGURE 12. Cinétique de libération de la formulation F12 (avec PEG). TF = tampon phosphate.

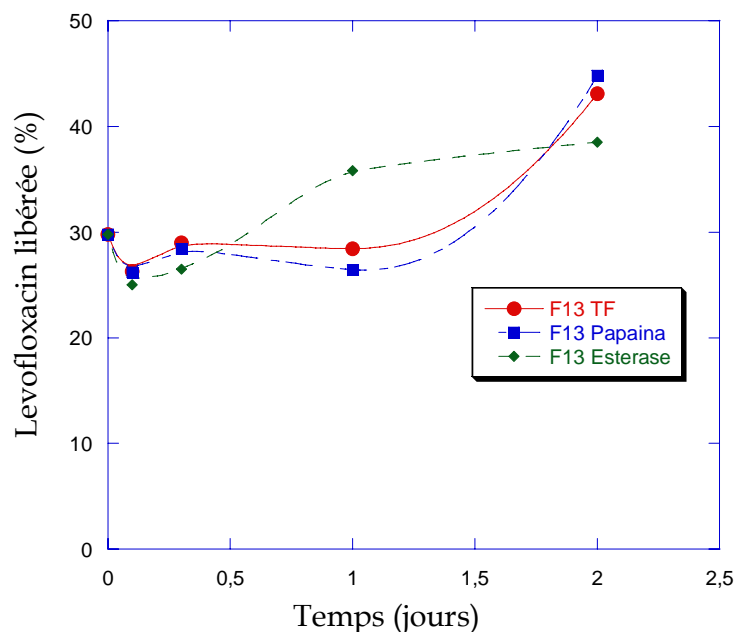


FIGURE 13. Cinétique de libération de la formulation F13 (sans PEG). TF = tampon phosphate.

L'analyse de la cinétique de libération, a permis de vérifier que 100% du levofloxacine a été dosé dans le surnageant en deux jours pour la formulation F12. Comme l'efficacité d'encapsulation de F12 est égale à 20%, la quantité de levofloxacine non encapsulée (80%) a été considérée comme la quantité du principe actif au temps zéro dans le graphique de libération en fonction du temps. Le résultat est différent pour la formulation F13 où les particules ont été préparées sans PEG. Seulement 45% de levofloxacine a été dosé en deux jours. Avec une efficacité d'encapsulation de 70%, cela signifie que seulement 15% de principe actif a été libéré en 48 heures. Ce résultat est parfaitement justifié, car en l'absence de PEG (formulation F13), les particules ont une surface compacte rendant plus difficile la libération du levofloxacine. La plus grosse taille des particules (formulation F13) peut aussi avoir retardé la libération du principe actif.

La libération du levofloxacine a été influencée par la dégradation des particules mais la diffusion peut aussi contribuer dans le procédé.

SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES DE POLYURÉTHANE PAR LA TECHNIQUE DE POLYADDITION EN MINIEMULSION.

Réalisée en collaboration avec Henri Cramail et Eric Cloutet – LCPO/ENSCP/Un. Bordeaux1

Préparation des nanoparticules

Un mélange de monomères (10g) (le diisocyanate et le polyol dans un rapport molaire $[NCO]/[OH] = 1,1$) avec 3 % ou 5 % d'huile d'olive (par rapport à la quantité des monomères) est ajouté, à température ambiante, à une solution aqueuse (Milli Q, Millipore®) comprenant un tensio-actif (i.e. le SDS, le tween 80 ou le pluronic F68) (cf figure 14). La concentration de monomère par rapport au milieu de polymérisation a été de 5% pour toutes les formulations préparées.

Les gouttelettes des monomères ont été obtenues en utilisant un homogénéisateur (Ultra-Turrax, T18, IKA®) avec une vitesse de 18000 rpm pendant 15 minutes. Ensuite, la polymérisation a été conduite sous agitation mécanique (800 rpm), à 60°C pendant 4 heures. Le PEG 400 a été ajouté dans quelques formulations comme co-monomère en substitution de 50 moles % du polyol naturel.

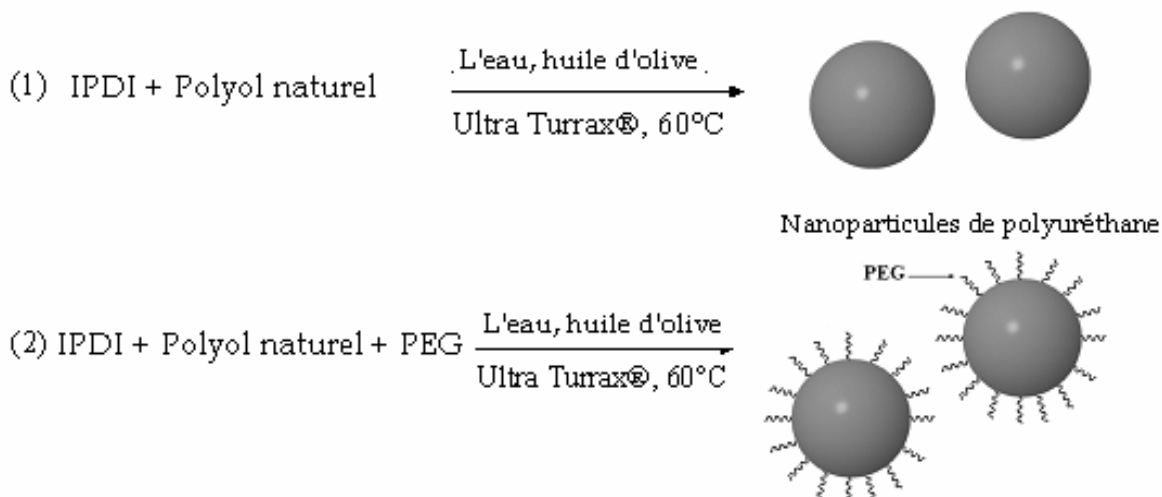


FIGURE 14. Schéma de formation de nanoparticules de polyuréthane par polyaddition en miniémulsion.

Le schéma de préparation des particules est décrit sur la figure 15.

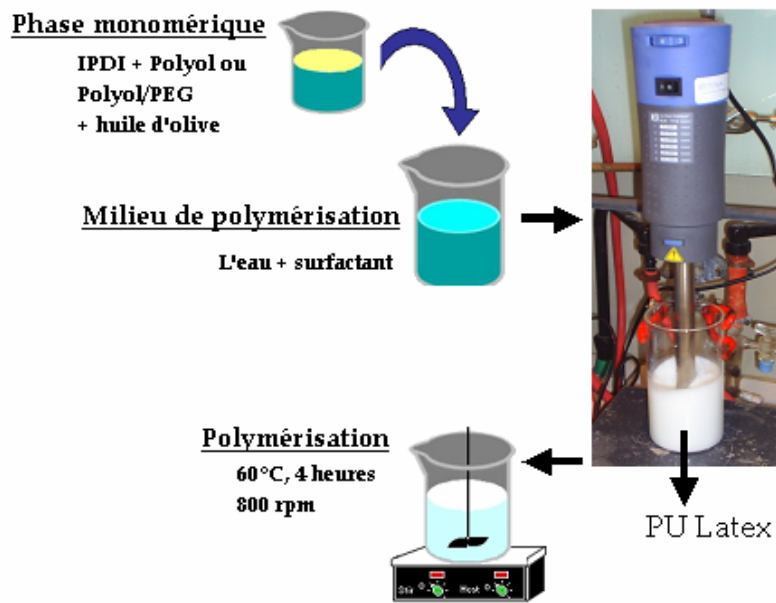


FIGURE 15. Préparation des nanoparticules de PU par mini-émulsion.

Le schéma réactionnel de formation du polyuréthane est présenté figure 16.

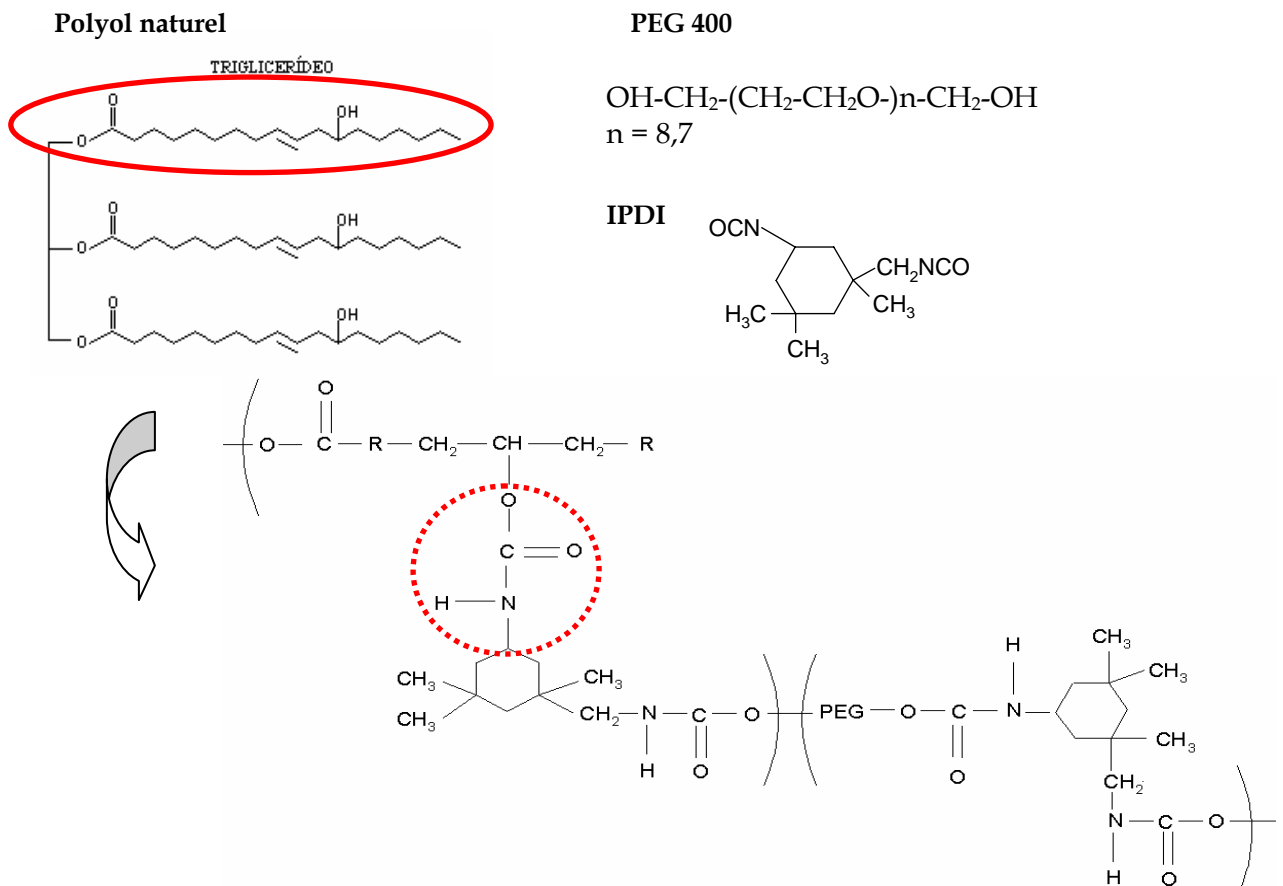


FIGURE 16. Schéma de formation du polyuréthane.

Dans le tableau 3 sont présentées les formulations obtenues par mini-émulsion avec différents mélanges de monomères et divers types de tensio-actifs.

TABLEAU 3. Nanoparticules de PU synthétisées par mini-émulsion.

| Latex | Monomères (g) | Tensio-actif (% par rapport des monomères) | Rendement ^a (%) | Diamètre moyen des particules ^b (nm) | PDI ^c |
|-------------------|-----------------------------------|--|----------------------------|---|------------------|
| F10M | Polyol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Tween 20,0 | 97 | 261 (100%) ^d | 0,39 |
| F11M | Polyol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Tween 10,0 | 97 | 282 (100%) | 0,37 |
| F12M | Polyol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Tween 5,0 | 88 | 292 (100%) | 0,35 |
| F13M | Polyol 7,0 IPDI 3,0 | Tween 5,0 | 58 | 297 (100%) | 0,36 |
| F16M | Polyol 7,0 IPDI 3,0 | Tween 20,0 | 96 | 246 (100%) | 0,40 |
| F18M ^e | Polyol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Tween 10,0 | 92 | 194 (59%) 661 (41%) | 0,42 |
| F19M | Polyol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | SDS 10,0 | 53 | 463 (53%) 2473 (47%) | 0,94 |
| F20M | Polyol 3,6 PEG 3,1 IPDI 3,3 | Pluronic 10,0 | 86 | 285 (100%) | 0,31 |

^a. Mesuré par gravimétrie;

^b. Déterminé par diffusion de la lumière (Zetasizer/Malvern);

^c. Indice de polymétrie, déterminé par Zetasizer;

^d. Valeur de la distribution en taille;

^e Formulation préparée avec 5 % d'huile d'olive.

En général, la taille des particules a été déterminée entre 200 et 300 nm avec une polymétrie comprise entre 0,3 et 0,4. Par la technique de mini-émulsion, nous avons obtenu des formulations avec des rendements élevés en nanoparticules.

Par exemple, la quantité de tensio-actif a affecté la taille des particules (tableau 3, F10-F12).

Effet du type de tensio-actif

Dans notre étude, nous avons employé le SDS (tensio-actif anionique) et deux tensio-actifs non ioniques, le Tween 80 et le Pluronic F68. Le SDS s'est avéré inefficace dans notre système, donnant pour résultat un rendement faible (environ 53%) et deux populations de particules (tableau 1). Les tensio-actifs non ioniques ont, quant à eux, donné des particules de distribution monomodale en taille avec de bons rendements. Le Tween et le Pluronic (tensio-actifs polymères) semblent être les plus appropriés pour la stabilisation de monomères de masse molaire élevée comme le polyol utilisé ici.

L'effet de la concentration en tensio-actif

L'effet de la concentration en tensio-actif sur la formation des nanoparticules et sur le rendement a été étudié avec le Tween 80 (cf figures 17 et 18).

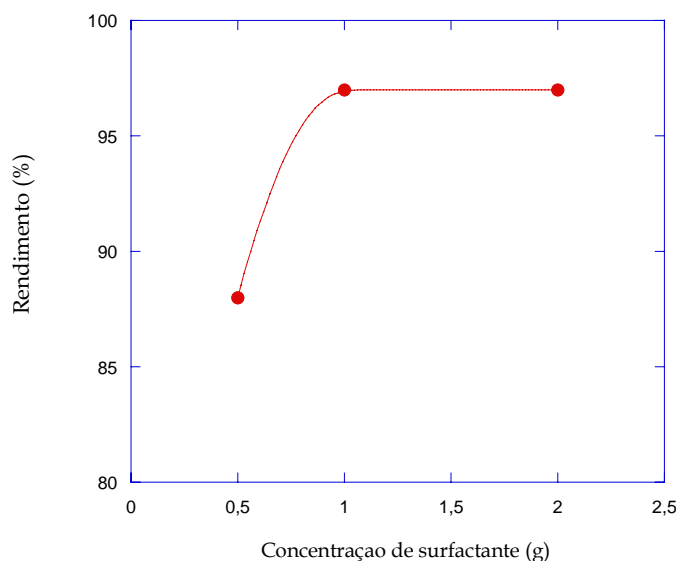


FIGURE 17. Effet de la concentration en tensio-actif Tween 80 sur le rendement de la formulation (%).

Le rendement de la formulation croît avec l'augmentation de la concentration en tensio-actif.

La taille des particules décroît lorsque la concentration du tensio-actif augmente de 5 à 20% (figure 18). Le diamètre moyen des particules diminue légèrement de 292 nm à 261 nm quand la quantité de tween 80 augmente de 0,5 à 2,0 g (tableau 3, F10-F12).

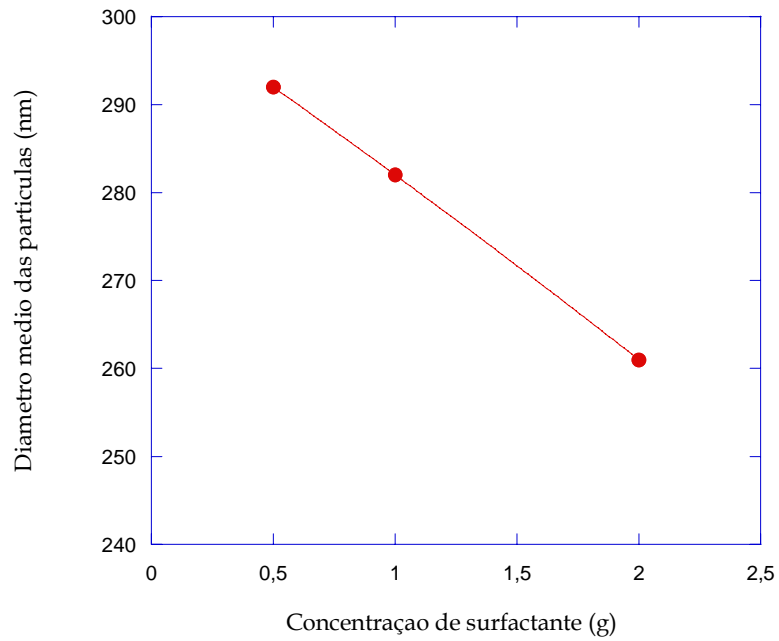


FIGURE 18. Effet de la concentration de Tween 80 sur le diamètre moyen des particules (nm).

Effet de la vitesse d'agitation

Les résultats de l'effet de la vitesse d'agitation sur la synthèse de nanoparticules de polyuréthane sont présentés dans le tableau 4.

TABLEAU 4. Diamètre moyen des particules, PDI et rendement en fonction de la vitesse d'agitation.

| Latex | Monomères | (g) | Vitesse de l'agitation ^a (rpm) | Rendement ^b (%) | Diamètre moyen des particules ^c (nm) | PDI ^d |
|-------|-----------|-----|--|-------------------------------|--|------------------|
| F21 | Polyol | 3,6 | 10000 | 98 | 245 (48%) ^e | 0,86 |
| | PEG | 3,1 | | | 1016 (52%) | |
| | IPDI | 3,3 | | | | |
| F23 | Polyol | 3,6 | 14000 | 97 | 279 (100%) | 0,39 |
| | PEG | 3,1 | | | | |
| | IPDI | 3,3 | | | | |
| F11 | Polyol | 3,6 | 18000 | 97 | 282 (100%) | 0,37 |
| | PEG | 3,1 | | | | |
| | IPDI | 3,3 | | | | |
| F22 | Polyol | 3,6 | 22000 | 97 | 306 (100%) | 0,39 |
| | PEG | 3,1 | | | | |
| | IPDI | 3,3 | | | | |

^a. Ultra-Turrax;

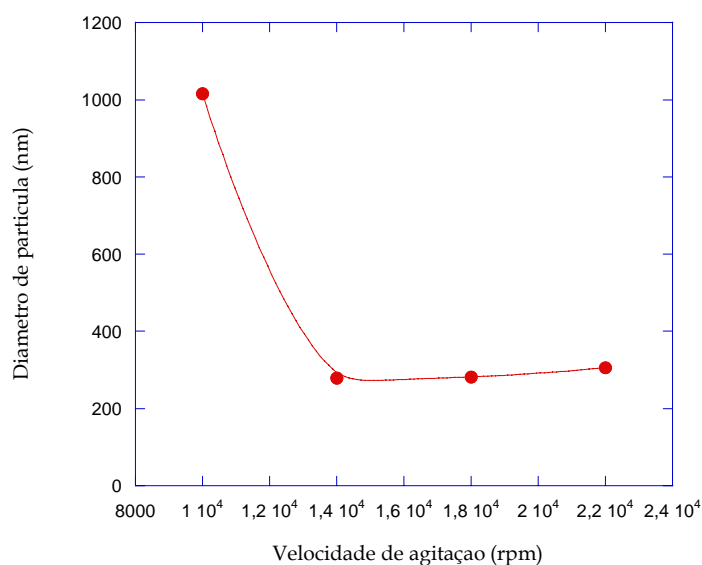
^b. Mesuré par gravimétrie;

^c. Déterminé par diffusion de la lumière (Zetasizer/Malvern);

^d. Indice de polymétrie, déterminé par le Malvern;

^e. Valeur % de la distribution en taille.

Dans un procédé de mini-émulsion, la taille des particules est dépendante de l'ajout d'agent hydrophobe et d'une homogénéisation efficace. Nous avons observé qu'une vitesse de 10000 rpm n'était pas suffisante pour former des nanoparticules de distribution monomodale en taille.

**FIGURE 19.** Effet de la vitesse d'agitation sur la taille des particules.

Caractérisation du polymère par FTIR

La formation du polyuréthane a été suivie par FTIR dans le mode ATR. La réaction complète de polyaddition entre l'IPDI et le polyol ou l'IPDI et le mélange Polyol/PEG400 a été confirmée par analyse FTIR-ATR. Pour exemples, les spectres FTIR-ATR des formulations F10M et F16M sont présentés dans la figure 19 avec les spectres des monomères IPDI et polyol. Une attention particulière a été donnée à la bande de vibration de l'isocyanate située à 2235 cm^{-1} pour suivre la formation du polyuréthane. Comme représenté sur le figure 20, cette bande a disparu complètement dans les échantillons (F10M et F16M). Par ailleurs, les bandes de vibration correspondant à l'amide à 3300 cm^{-1} , au carbonyle à 1743 cm^{-1} et à la liaison C-N de l'amide à 1550 cm^{-1} sont aussi des évidences de la formation du polyuréthane. Il est important de souligner que la disparition de la bande NCO n'est pas une preuve irréfutable que la polyaddition a été totale car les groupements isocyanate se transforment relativement facilement en groupements amino par réaction avec de l'eau (cf bande entre vers 3300 cm^{-1})

La bande d'absorption entre 1000 et 1300 cm^{-1} a été utilisée pour identifier le PEG 400 dans la formulation F10M. Quand le PEG a été ajouté comme co-monomère (F10M), la réaction entre l'isocyanate et l'eau a été favorisée et la formation urée a été établie (1635 cm^{-1}). En l'absence du PEG (F16M) la vibration à 1635 cm^{-1} (carbonyle de l'urée) est moins intense, indiquant que la réaction de l'isocyanate avec l'eau est moins favorisée.

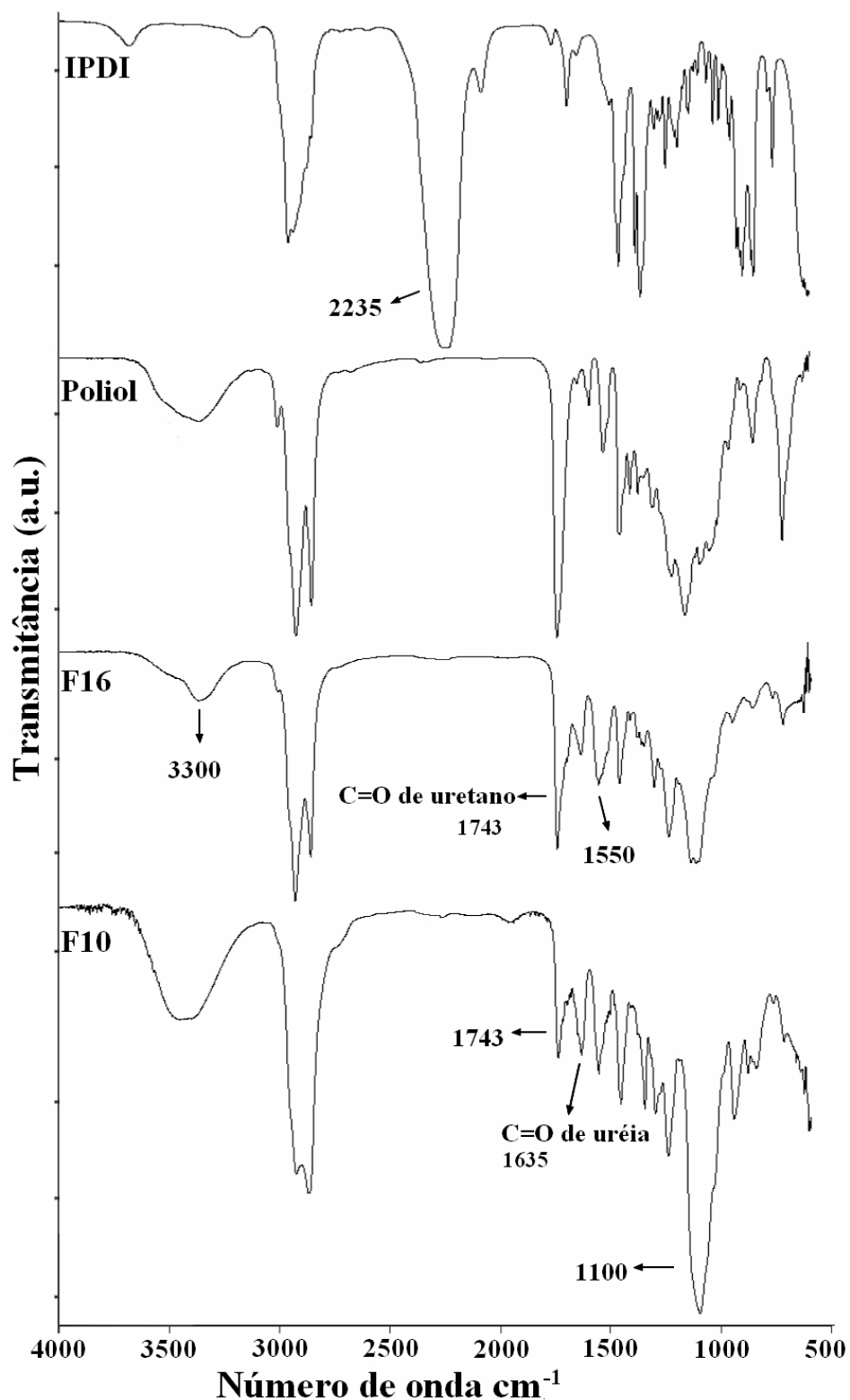


FIGURE 20. Spectres FTIR de l'IPDI, Polyol, F16M (polyol e IPDI) et F10M (polyol, PEG et IPDI).

Diffusion de la lumière

Les échantillons ont été dilués dans de l'eau milli Q et analysés par diffusion de la lumière dynamique (ALV) sans filtration. La figure 21 présente la fonction de corrélation obtenue aux différents angles $\theta = 60^\circ$, 90° et 120° , à température de 25°C pour les échantillons F10M et F16M. Il est important de noter que les fonctions de corrélation sont essentiellement représentées par une courbe mono-exponentielle.

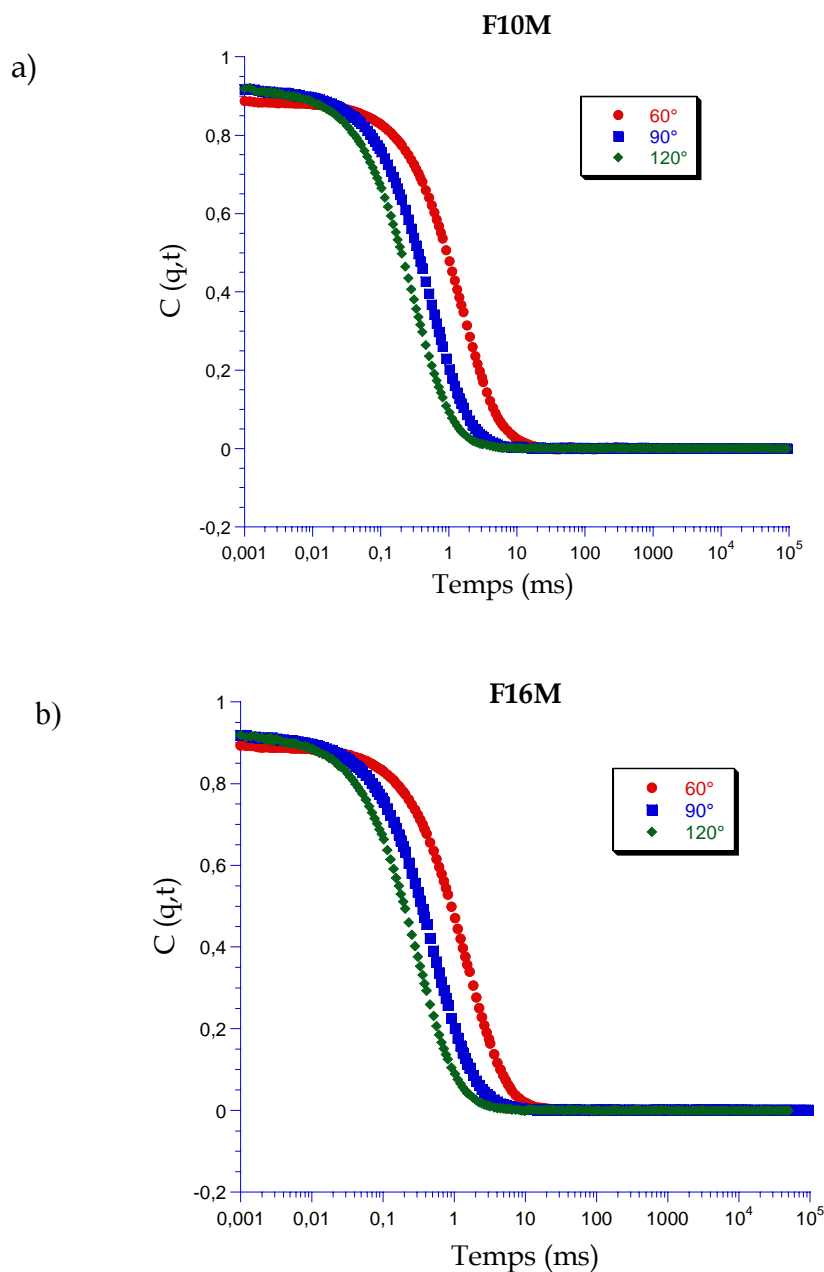


FIGURE 21. Fonctions de corrélation à 25°C mesurées à $\theta = 60^\circ$, 90° e 120° pour (a) F10M et (b) F16M, respectivement.

La variation angulaire de la fréquence $\Gamma = 1/\tau_s$ mesuré en fonction de q^2 indique le mouvement diffusif de l'échantillon F10M et l'existence d'objets sphériques (figure 22).

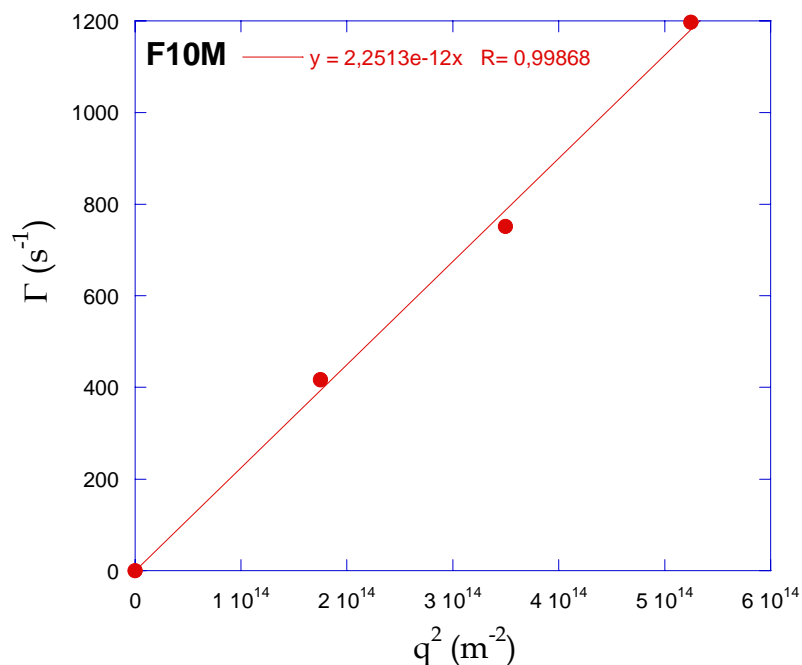


FIGURE 22. Γ versus q^2 pour la formulation F10M.

Analyse de la morphologie

Les images obtenues par microscopie électronique à transmission de latex de polyuréthane synthétisés par la technique de polyaddition en mini-émulsion sont présentées sur les figures 23 et 24. La taille des particules observées est en accord avec les résultats obtenus par la technique de diffusion de la lumière.

La figure 24 présente une nanoparticule préparée avec le PEG comme co-monomère. Dans ce cas, une fraction de PEG (diol hydrophile) peut rester à l'interface en formant une couche protectrice autour de la particule. La couverture des nanoparticules par le PEG est très importante pour empêcher la réponse immunitaire (attaque des macrophages) et pour augmenter la période de circulation des particules dans le sang. Cet effet est très intéressant pour l'application parentérale des nanoparticules.

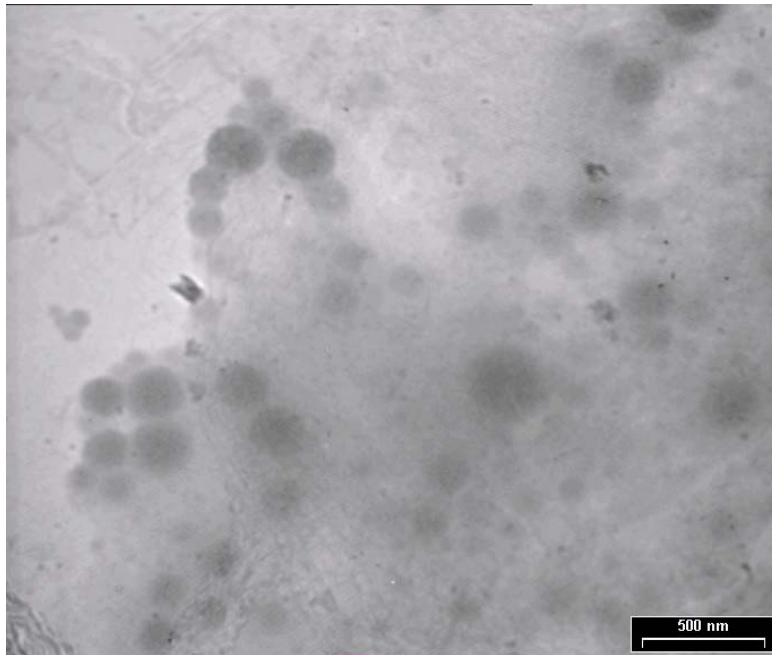


FIGURE 23. Image des particules de polyuréthane obtenues par mini-émulsion.

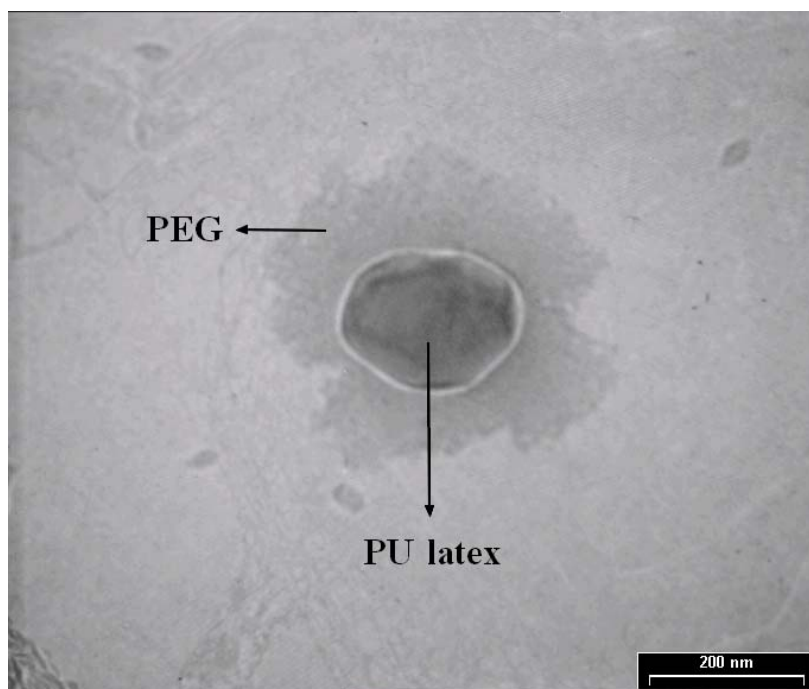


FIGURE 24. Image obtenue de la Formulation F10M préparé avec le PEG.

Dosage

Le tableau 5 présente les valeurs de l'efficacité d'encapsulation.

TABLEAU 5. Dosage et efficacité de l'encapsulation des formulations préparées par mini-émulsion.

| Formulation | C_T^a | | C_S^b | | Efficacité d'encapsulation ^c | |
|-------------|---------|-----|---------|------|---|------|
| | (mg/mL) | (%) | (mg/mL) | (%) | (mg/mL) | (%) |
| F10M | 1,25 | 100 | 0,65 | 52,1 | 0,60 | 47,9 |
| F16M | 1,25 | 100 | 0,66 | 52,9 | 0,59 | 47,0 |

^{a.} Concentration totale de levofloxacin ajoutée a la formulation;

^{b.} Concentration de levofloxacin détectée dans le surnageant après ultracentrifugation de 50000 rpm pendant 2h;

^{c.} Concentration de levofloxacin encapsulée dans la particule.

On peut observer dans le tableau 5, que l'utilisation de PEG comme co-monomère pour la synthèse des nanoparticules de polyuréthane par mini-émulsion n'a pas affecté l'efficacité de l'encapsulation du levofloxacin (48% de produit encapsulé). L'utilisation de l'agent hydrophobe peut être le responsable de ces valeurs semblables d'encapsulation dans les différentes formulations.

La figure 25 présente la distribution du médicament dans les formulations F10M (préparé avec PEG) et F16M (préparé sans PEG).

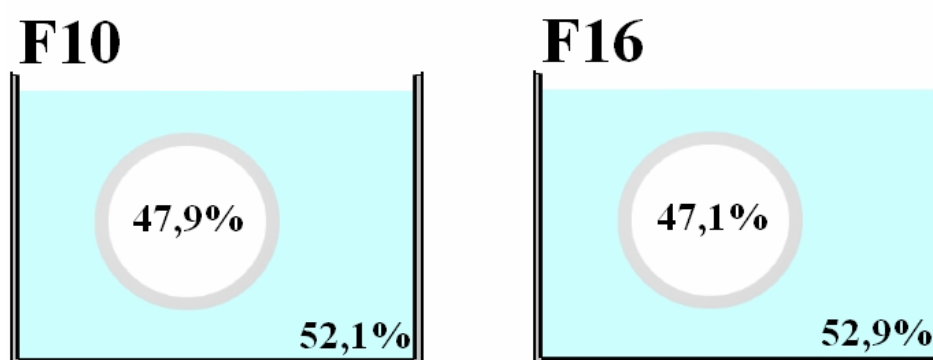


FIGURE 25. Distribution de levofloxacin dans les formulations préparées par mini-émulsion.

Libération

L'étude de la libération de la levofloxacin a été faite avec et sans enzyme en utilisant la méthode d'ultracentrifugation. Un milieu tampon phosphate (TF) a été utilisé pour cette étude.

Les figures 26 et 27 représentent la cinétique de libération pour les formulations F10M et F16M, respectivement.

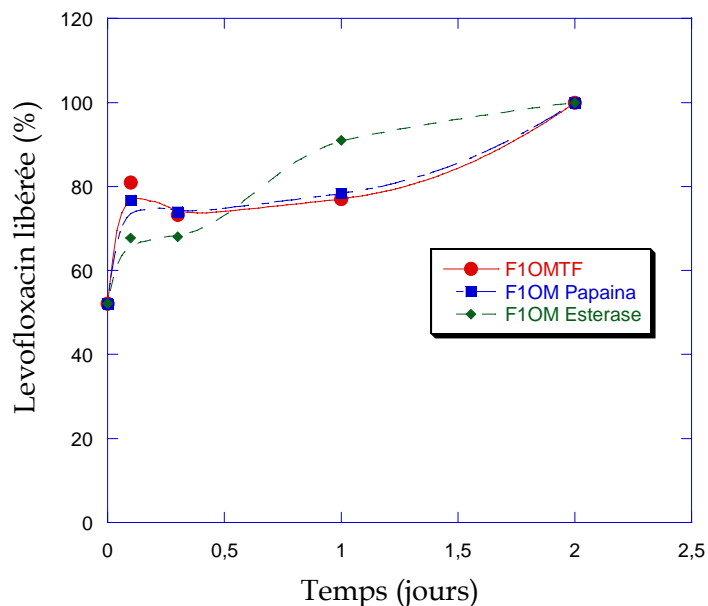


FIGURE 26. Cinétique de libération pour la Formulation F10M (avec PEG). TF = tampon phosphate.

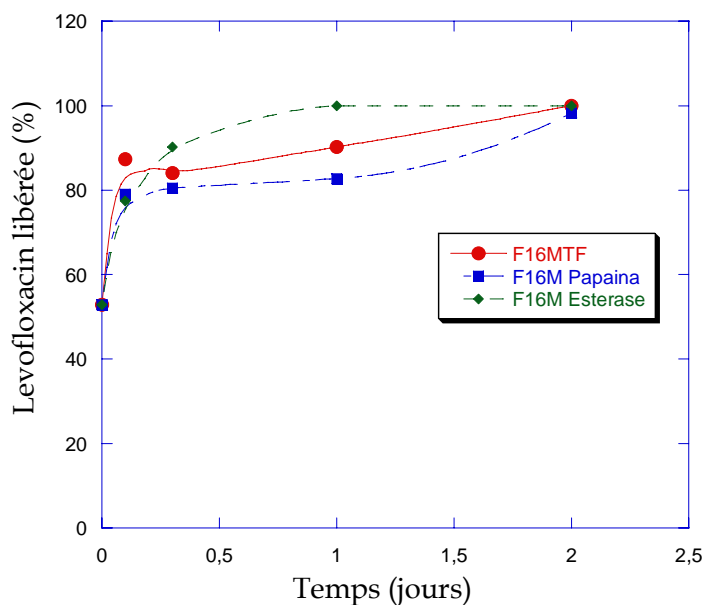


FIGURE 27. Cinétique de libération pour la Formulation F16M (sans PEG). TF = tampon phosphate.

Les graphiques démontrent que 100% du principe actif a été dosé dans le surnageant en deux jours. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus pour les particules synthétisées par la technique de polyaddition en suspension. Les formulations avec l'enzyme estérase présentent un meilleur profil de libération au premier jour. Rappelons que l'estérase fait l'hydrolyse des liaisons ester tandis que la papaïne fait l'hydrolyse des liaisons amide.

Les formulations synthétisées par mini-émulsion, avec et sans PEG, ont des valeurs d'efficacité d'encapsulation autour de 48%. La valeur de 52% considérée au temps zéro du graphique de libération représente la quantité de levofloxacin non encapsulée. Ces formulations ont libéré la quantité totale de levofloxacin encapsulé (48%) en 48 heures. Ce type de "meilleur profil de libération" obtenu pour les formulations de mini-émulsion, par rapport aux résultats de la polyaddition en suspension, semble être fonction de la taille des particules et/ou du type de diisocyanate utilisé dans la synthèse.

La libération ou diffusion de la levofloxacin est dépendante de la dégradation de la matrice polymère. Ce phénomène est lent comme en attestent les figures 26 et 27.

ÉTUDE DE LA DEGRADATION *IN VITRO*

La diffusion de la lumière est une méthode très adaptée pour la caractérisation des polymères et des colloïdes en solution et a été employée dans cet étude pour contrôler *in situ* la dégradation chimique et enzymatique des nanoparticules en mesurant la variation de l'intensité diffusée de la suspension et de la distribution de la taille hydrodynamique des nanoparticules (Wu et Gan, 1997). Notons que l'utilisation de cette technique pour quantifier la dégradation de ces systèmes « *in situ* » est un sujet relativement nouveau et reste encore peu exploitée à ce jour. Dans cette partie, nous nous efforcerons de mettre en évidence les avantages de cette méthode et essaierons de quantifier le suivi de la dégradation de ces particules notamment en mesurant les intensités élastiques diffusées et les temps de relaxation très étroitement liés à la taille hydrodynamique et donc de leur dégradation.

Méthodologie

La dégradation a été suivie par diffusion de la lumière (équipement ALV). La suspension des nanoparticules et la solution aqueuse d'enzymes ont été filtrées (diamètre de 0,22 μm). Nous avons examiné la dégradation chimique au milieu acide (HCl) et basique (NaOH) et la dégradation enzymatique avec des enzymes estérase et papaïne.

Dans une expérience typique de dégradation enzymatique, une quantité déterminée de la solution aqueuse d'enzymes a été ajoutée *in situ* à 7 mL de la suspension des nanoparticules déjà filtré. Des cellules de diffusion de diamètre de 20 millimètres ont été employées. Les expériences ont été réalisées à 37° C et la dégradation a été suivie par diffusion de lumière statique et dynamique à des angles de 20° et de 90°.

En diffusion de la lumière dynamique, la fonction d'autocorrélation $G^{(2)}(t, q)$ est mesurée et la transformé de Laplace inverse de cette fonction $G^{(2)}(t, q)$, est directement liée à la distribution $G(\Gamma)$ des temps ou fréquences de relaxation. Pour une relaxation diffusive, Γ est reliée au coefficient de diffusion de translation D par $\Gamma/q^2 = D$ à $q \rightarrow 0$ et $C \rightarrow 0$ et $G(\Gamma)$ peut être directement converti à une distribution de diffusion de translation $G(D)$ ou à une distribution de rayon hydrodynamique $f(R_h)$ en utilisant l'équation de Stocks Einstein : $R_h = k_B T / (6\pi\eta D)$ ou k_B , T , et η étant la constant de Boltzman, la température absolue, et la viscosité du milieu, respectivement.

Pour une solution diluée et à petite angle θ , le rapport de Rayleigh $R_{vv}(q)$ peut être associé à la masse molaire moyenne. À $q \rightarrow 0$ et $C \rightarrow 0$, $R_{vv}(q) \sim KCM_w$. Donc, la réduction de l'intensité est une conséquence soit de la réduction de la masse molaire soit de la concentration des particules. Ainsi les deux paramètres $R_{vv}(q)$ et $G^{(2)}(t, q)$ ont été mesurés simultanément pendant la dégradation.

Effet du chauffage sur la dégradation

Les échantillons ont été dilués avec l'eau milli Q et chauffés à 80° C. La dégradation a été suivie par des mesures de diffusion de la lumière à l'angle de 90° pendant une période d'un mois.

À l'exception de la formulation F13, préparée par la technique de polyaddition en suspension et sans PEG, les autres formulations ont montré une diminution de l'intensité indiquant manifestement une dégradation. Par exemple, les formulations préparées avec le PEG (F12 et F10M) ont été dégradées de 25% pendant une période de 30 jours (figure 28). Les particules de la formulation F13 qui présentent une structure plus compacte et sans porosité sont par conséquent moins susceptibles à la dégradation.

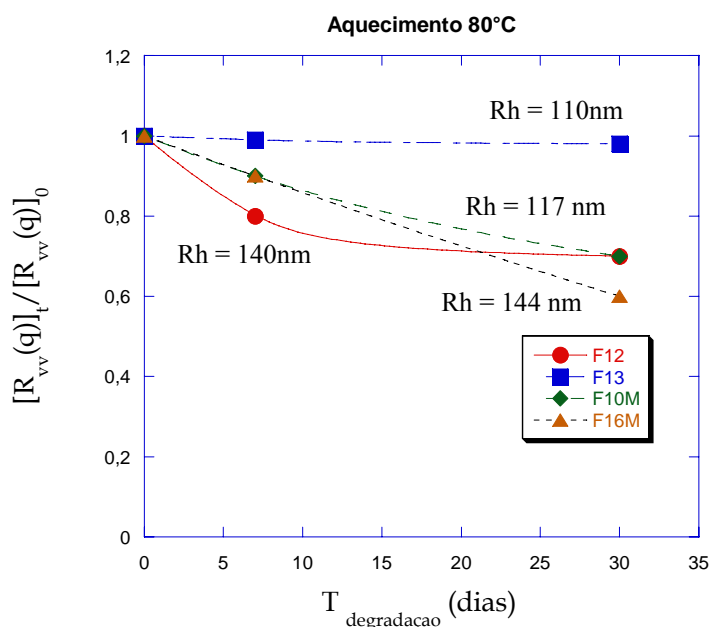


FIGURE 28. Cinétique de la dégradation des nanoparticules soumis à un chauffage de 80° C où $[R_{vv}(q)]_0$ et $[R_{vv}(q)]_t$ sont le rapport de Rayleigh à temps zéro et à temps t, respectivement. $\theta = 90^\circ$.

On a observé une diminution du Rh également avec le chauffage. Ce résultat est illustré sur la figure 29.

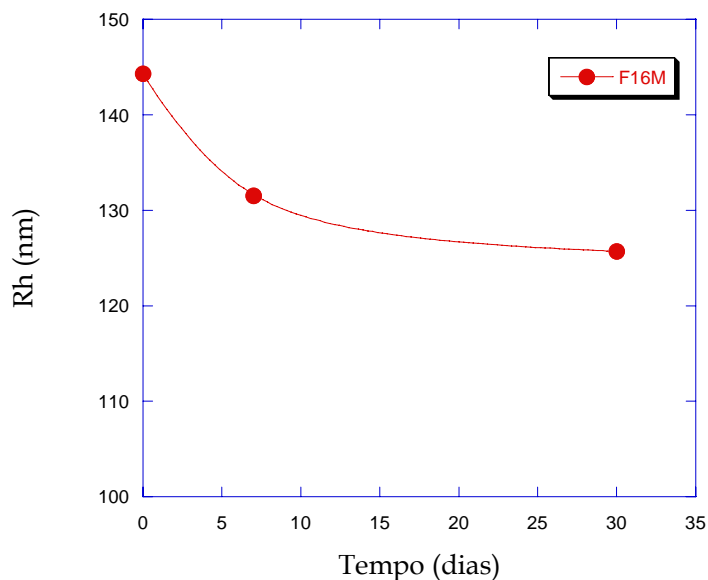


FIGURE 29. Réduction du rayon hydrodynamique en fonction du temps pour l'échantillon F16M préparé par la technique de miniémulsion et soumis à chauffage de 80° C pendant 30 jours. $\theta = 90^\circ$.

Dégradation enzymatique

Dans l'étude de la dégradation avec des enzymes, nous avons observé des aspects intéressants comme l'apparition d'un pic de diffusion correspondant à des tailles de rayon hydrodynamique important, conséquence de l'existence d'agrégats de particules et enzymes et la réduction du pic des nanoparticules en fonction du temps. La diminution du Rh, montrant la dégradation des nanoparticules a été clairement observé dans nos études, contrairement aux travaux publiés par Chi Wu et collaborateurs.

Le schéma de la dégradation enzymatique est représenté sur la figure 30.

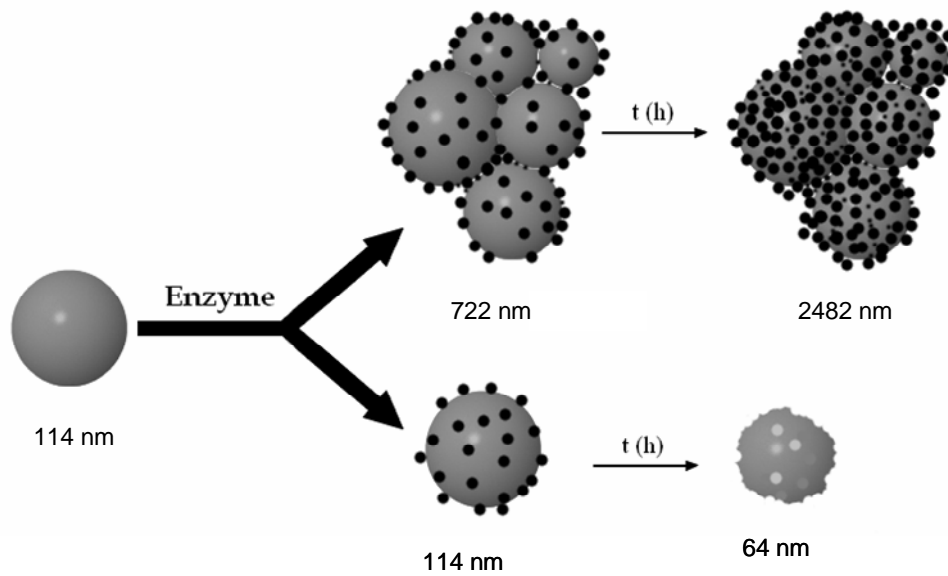


FIGURE 30. Schéma de dégradation. Les valeurs correspondent au diamètre de particules et des agrégats de la formulation F10M dans la présence de 10 unités de papaïne, angle mesuré 40° .

On observe aux petits angles (20°) une augmentation des valeurs de l'intensité (figure 31) qui est la conséquence de l'augmentation de la présence des agrégats. Aux grands angles (90°) on observe la diminution de l'intensité diffusée (figure 32) qui correspond à la dégradation des nanoparticules. Sur la figure 33 est présenté les valeurs de l'intensité aux deux angles étudiés.

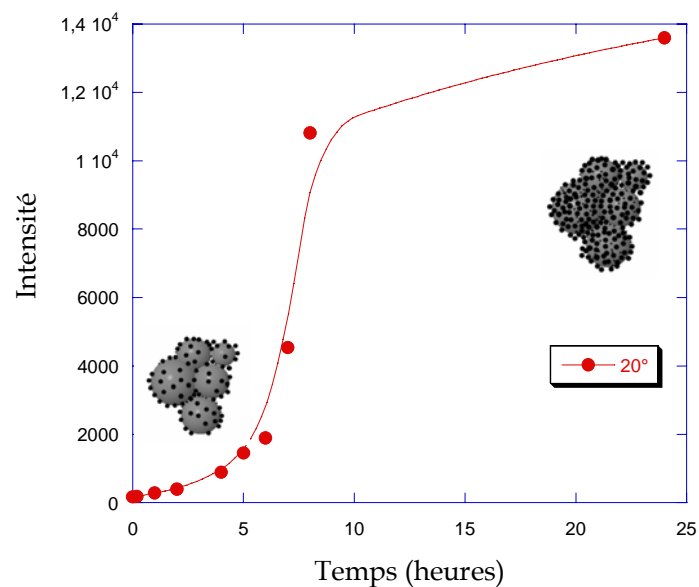


FIGURE 31. Augmentation de la valeur de l'intensité diffusées aux petits angles observés pour la Formulation F10M avec addition de 10 unités de papaine à 37°C.

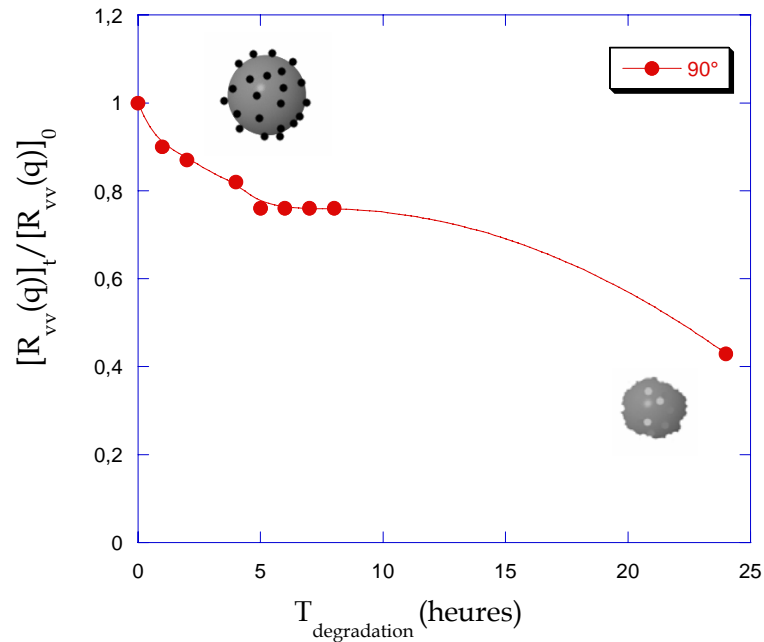


FIGURE 32. Diminution de la valeur de l'intensité aux grands angle observée pour la formulation F10M avec addition de 10 unités de papaine à 37° C. Dégradation d'environ 60% en 24 h.

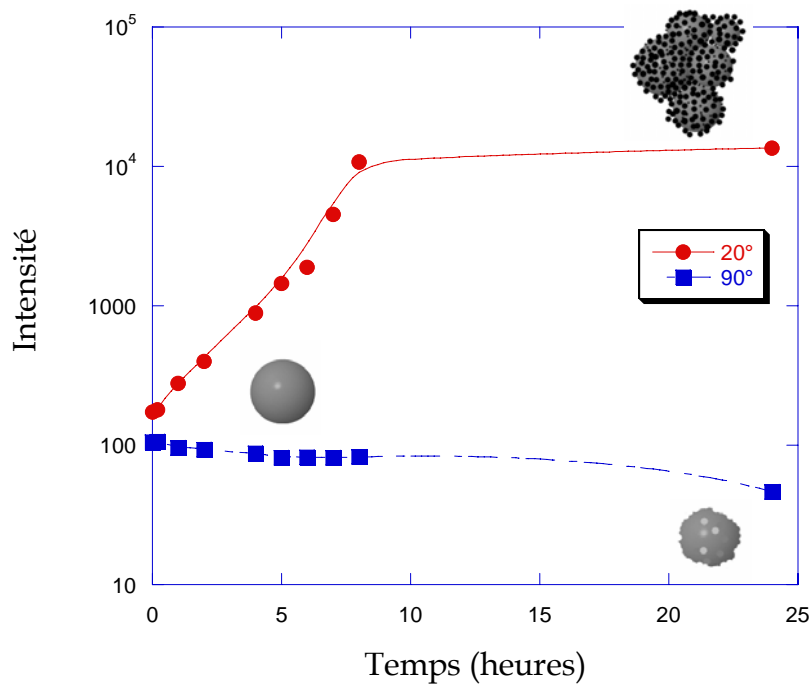


FIGURE 33. Variation de l'intensité diffusée aux angles de 20° et de 90°.

La diminution de $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ peut être attribuée aisément à la diminution de la masse molaire de la particule ou de la concentration de particules dans la solution, indiquant la clairement une dégradation.

Pour les formulations obtenues par la technique de polyaddition en suspension, des résultats similaires ont été également obtenus.

Le résultat de la dégradation des formulations F12 et F13 en présence de papaine est représenté sur la figure 34. En 30 heures, la formulation F13 a subi une dégradation de 53% tandis que la formulation de F12, préparée avec le PEG 400, a été dégradée à 76%. D'autre part la formulation préparée avec le PEG (F12) a présenté un meilleur profil de dégradation parce que elle est constituée par une plus grand quantité de PEG et donc plus poreuse.

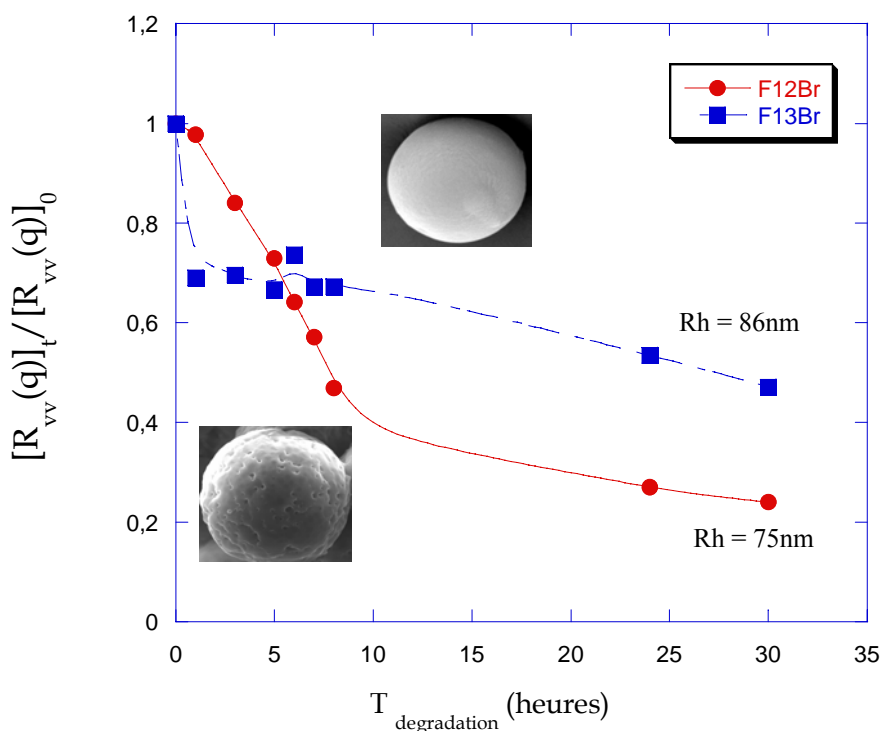


FIGURE 34. Cinétiques de dégradation des formulations obtenues par la technique de polyaddition en suspension. $\theta = 90^\circ$ et température = 37° C.

La diminution du Rh en fonction du temps également confirmée pour la formulation F12 (figure 35) at $\theta = 20^\circ$.

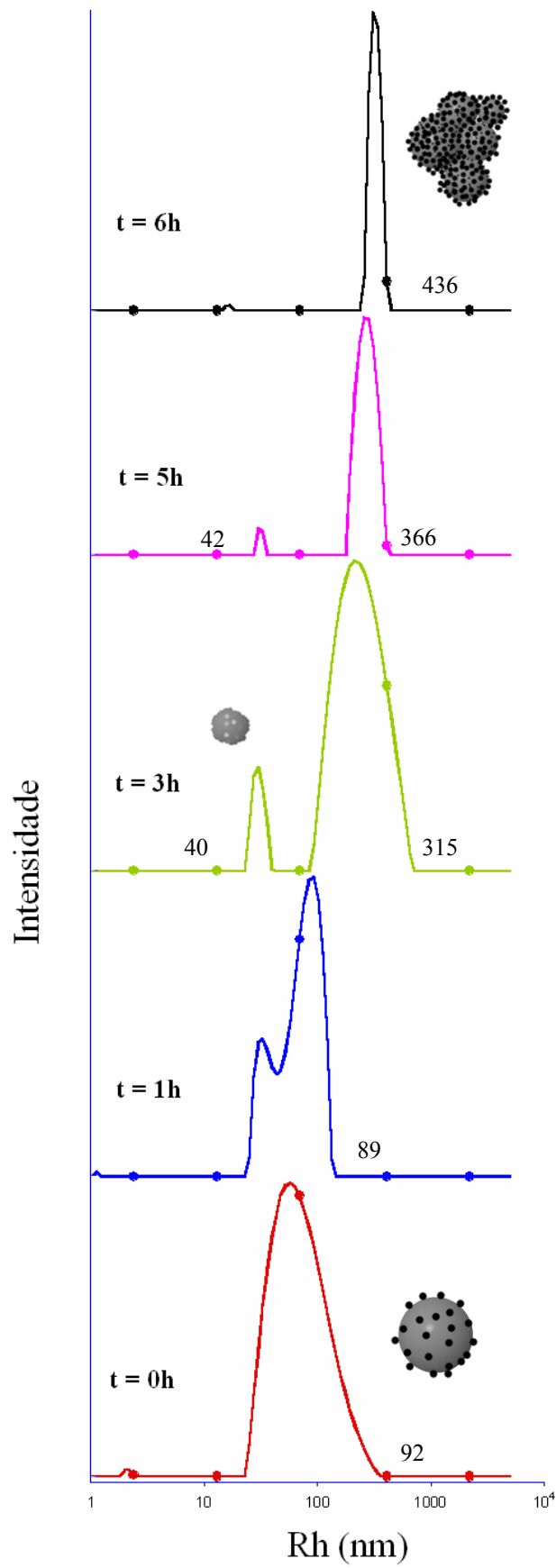


FIGURE 35. Rh (nm) en fonction du temps de dégradation pour la formulation F12. $\theta = 20^\circ$

Effet de la concentration de Papaine

L'influence de la concentration de la papaine sur la dégradation de la formulation F10M a été examinée. Le variation de l'intensité diffusée est illustrée dans les figures 36 et 37.

Le rapport nanoparticule/enzyme est un facteur très important et doit influencer certainement la dynamique du système.

Une concentration de la papaine (=10 unités) a montré un effet le plus significatif sur la dégradation.

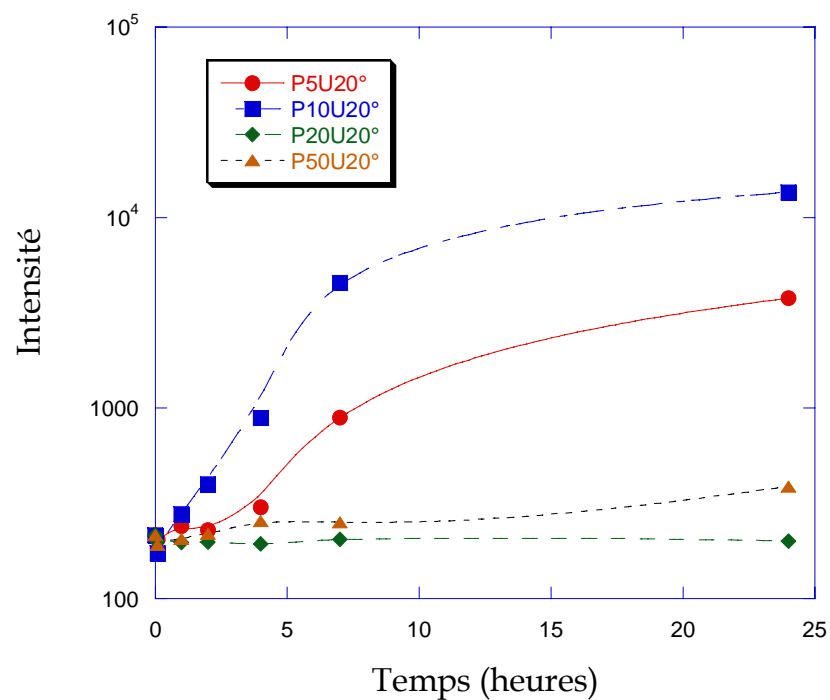


FIGURE 36. Valeurs de l'intensité diffusée en fonction de la concentration de la papaine. $\theta = 20^\circ$

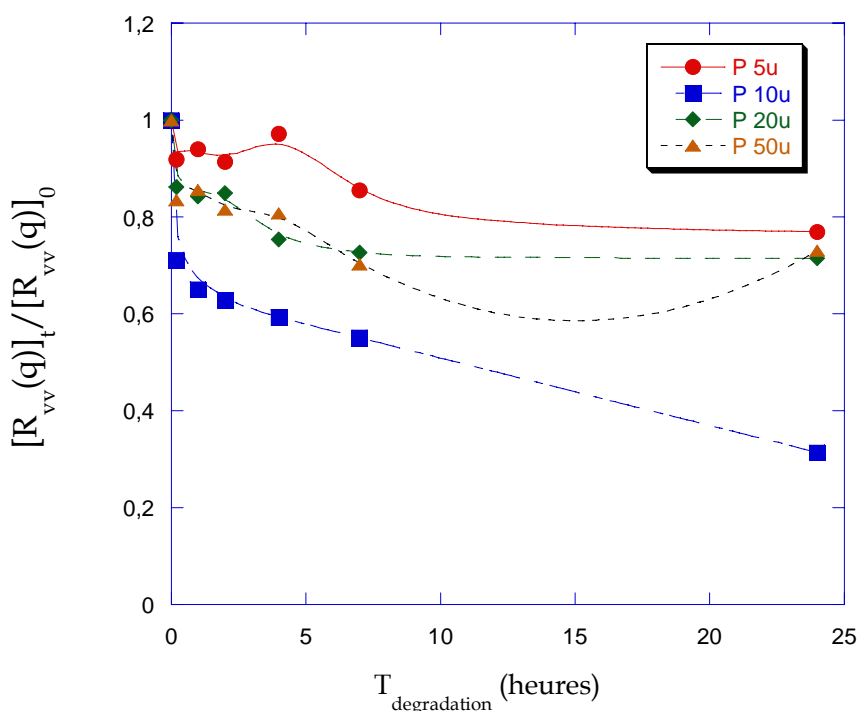


FIGURE 37. $[R_{vv}(q)]_t / [R_{vv}(q)]_0$ en fonction de la concentration de papaine. $\theta = 90^\circ$

Les valeurs de l'intensité diffusée révèlent que pour la concentration de la papaine égale à 10 unités, environ 70% des particules ont été dégradées en 24 heures.

La diminution du rayon hydrodynamique des nanoparticules en fonction du temps peut être observée dans le figure 38. La diminution du Rh implique également une diminution de la masse molaire et ceci a déjà été observé pour les valeurs de l'intensité diffusée normalisées $[R_{vv}(q)]_t / [R_{vv}(q)]_0$.

La dégradation de la Formulation F10M avec 10 unités de papaine est illustrée en figure 38. On observe que la distribution des tailles de Rh (valeurs importantes) peut être attribué à des agrégats constitués de particules et d'enzymes. En revanche la diminution de Rh (correspondant aux faibles valeurs) en fonction du temps a été aussi observée et correspond à la distribution de la taille des nanoparticules.

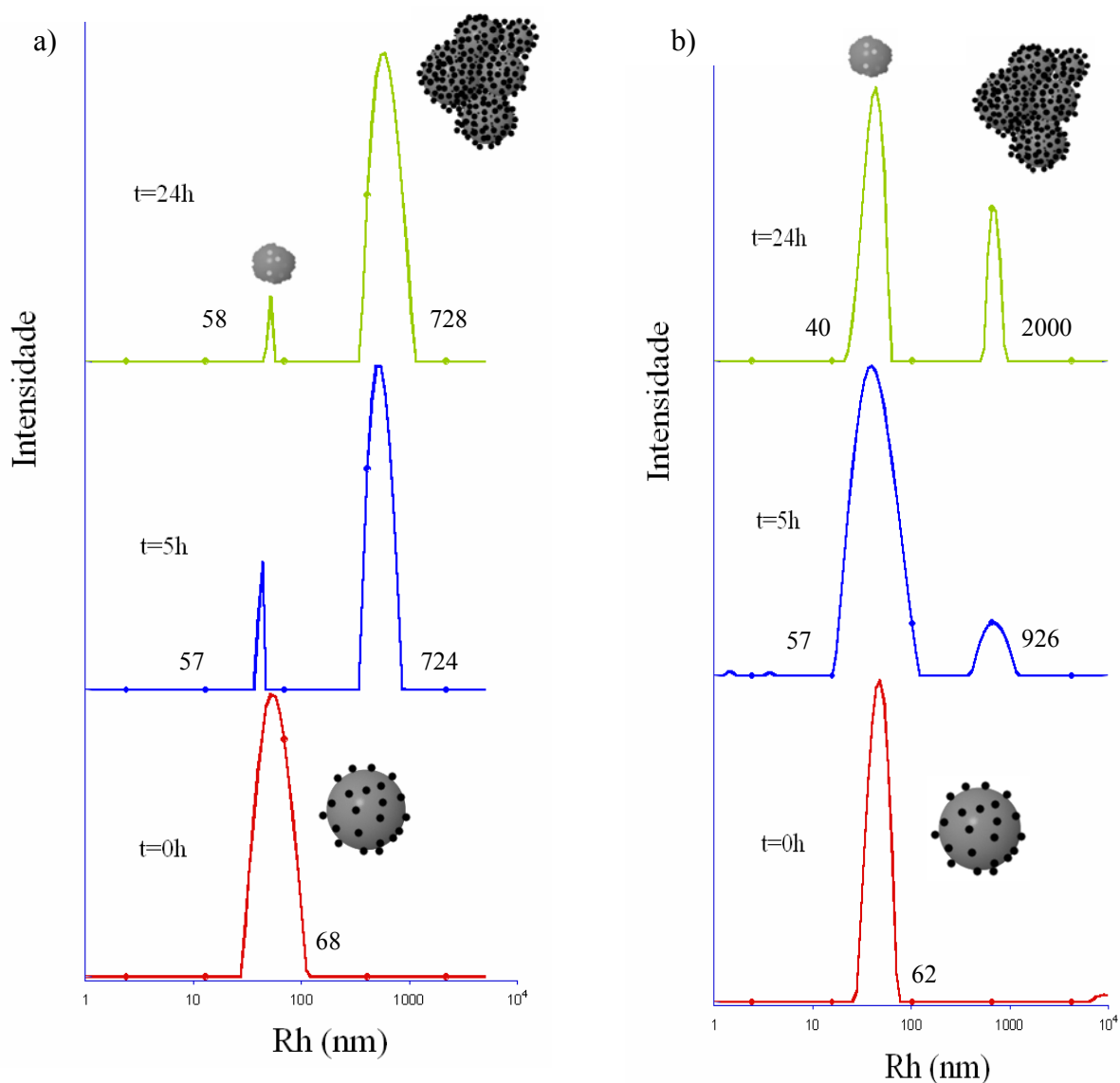


FIGURE 38. Dégradation de la formulation F10M avec 10 unités de papaïne. a) $\theta = 20^\circ$; b) $\theta = 90^\circ$

Dégradation Chimique

Pour l'étude de la dégradation chimique, une quantité de HCl ou de NaOH a été ajoutée à la formulation F10M (dilué 100 fois et filtrée avec filtre Millipore 0,22 μm) pour une solution finale à la concentration égale à 0,5 et 5 M. La concentration de 5 M a montré une séparation de phase au moment de l'addition et par conséquent n'a pas été étudiée. Pour la concentration de 0,5 M il a été donc possible de suivre la dégradation.

La comparaison de la dégradation en milieu acide et basique a révélé que les particules sont plus sensibles à la dégradation avec le NaOH. Les résultats sont illustrés sur la figure 39, où 60% a été dégradé en présence du NaOH et aucune de dégradation n'a été observé en présence du HCl pendant 24 heures. C'est une dégradation qui finalement du pH.

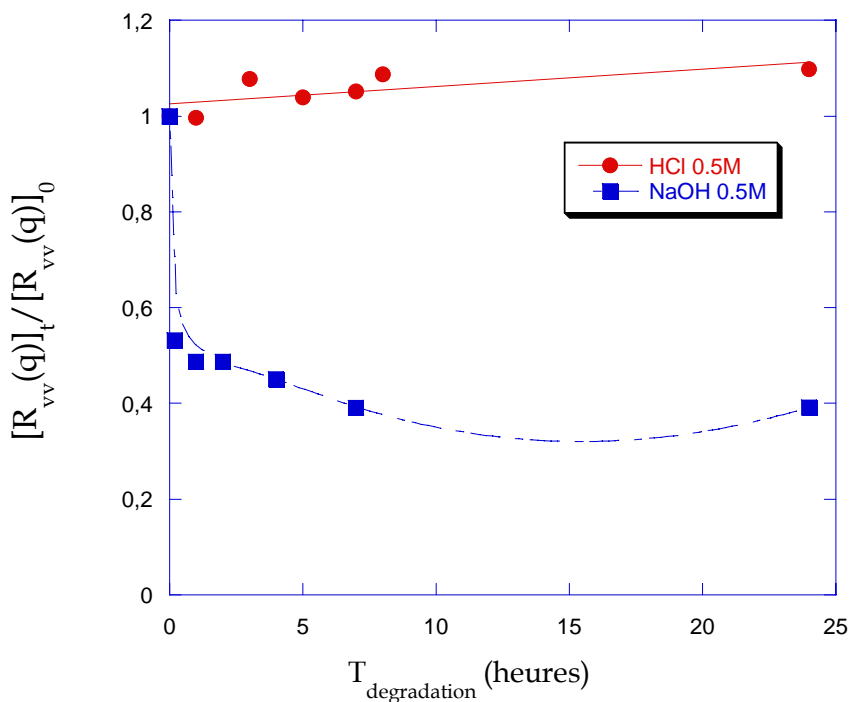


FIGURE 39. Variation de $[R_{vv}(q)]_t / [R_{vv}(q)]_0$ de la formulation F10M dans HCl 0,5 M ou NaOH 0,5 M, mesuré à un angle de diffusion de 90° .

Étude de la variation angulaire

L'étude de la dépendance angulaire a été réalisée dans les mêmes conditions que l'étude de dégradation. L'échantillon F10M a été étudié avant et après addition de 10 unités de papaïne dans la solution aqueuse de nanoparticules.

L'étude a été faite à 37°C aux angles de 20° , 40° , 60° , 90° , 120° et 140° .

La figure 40 représente la variation de Γ en fonction de q^2 pour l'échantillon F10M sans addition d'enzymes. Le mouvement est diffusif avec $D = 6,44 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ et les particules sont sphériques.

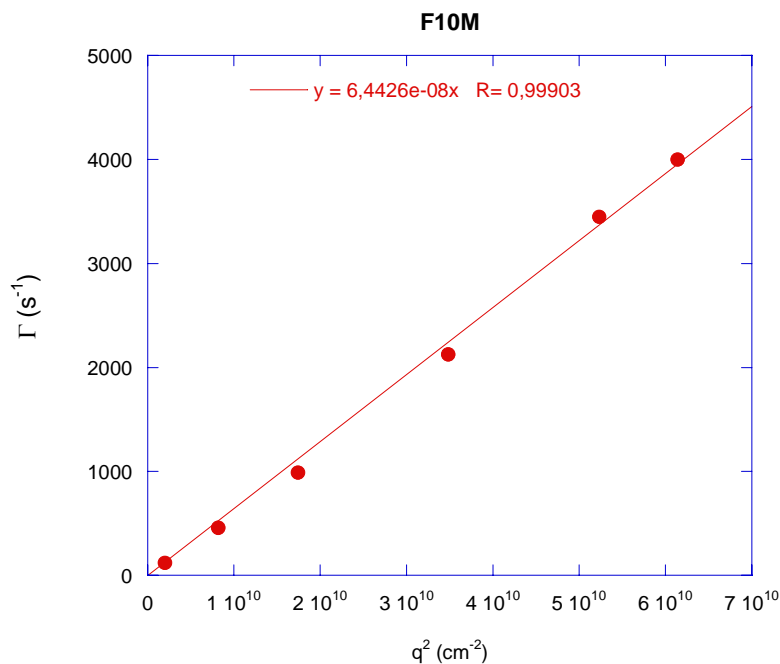


FIGURE 40. Variation de Γ en fonction de q^2 pour la formulation F10M sans enzymes.

Le figure 41 montre les valeurs de intensité en fonction du temps après addition d'enzymes et à différents angles de diffusion étudiés.

On observe une augmentation de l'intensité diffusée aux petits angles et une diminution aux grands angles, comme déjà discuté précédemment.

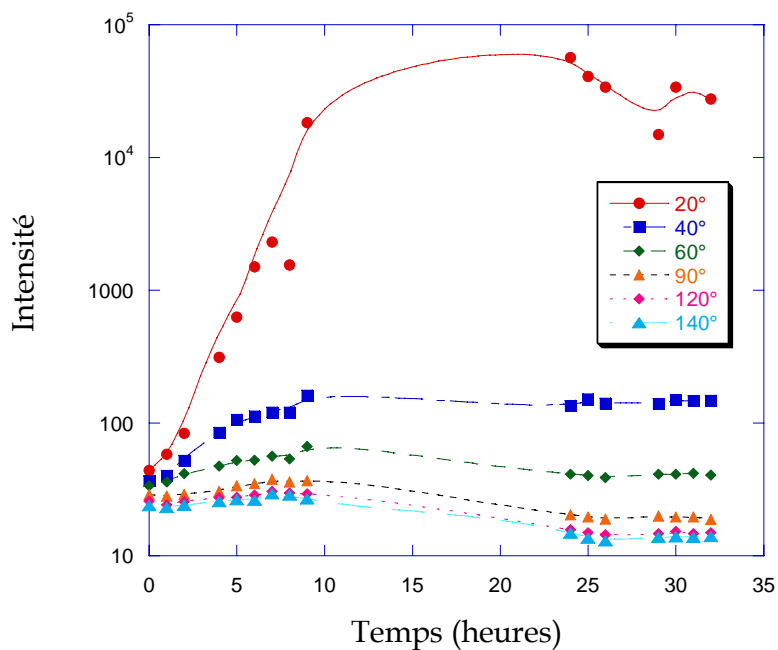


FIGURE 41. Intensité diffusée en fonction du temps à différents angles.

La figure 42 présente la variation de l'intensité diffusée en fonction de q (cm^{-1}). Aux petits angles on observe principalement les agrégats, aux angles intermédiaires on observe la coexistence des deux systèmes et aux grands angles on observe essentiellement les nanoparticules.

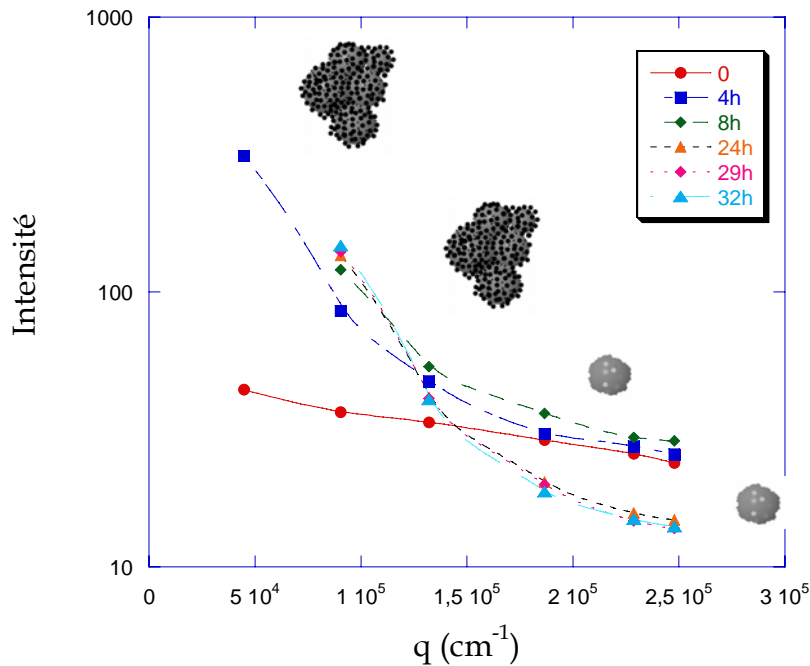


FIGURE 42. Intensité en fonction de q .

La figure 43 présente la variation de Γ en fonction de q^2 pour l'échantillon F10M en présence de papaine. Le mouvement est diffusif et la valeur du coefficient de diffusion des particules est environ de $6,0 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ pendant les huit premières heures de dégradation.

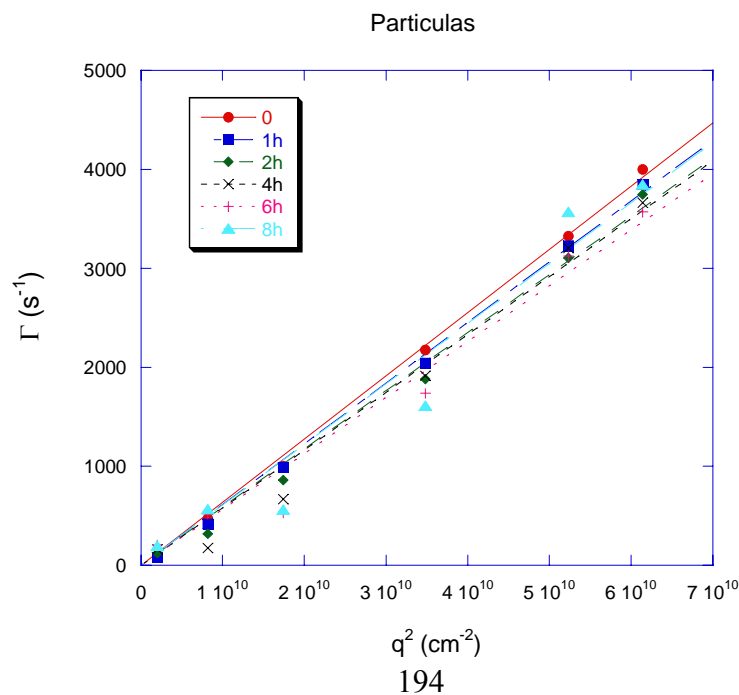


FIGURE 43. Variation de Γ en fonction de q^2 pour la formulation F10M dans les 8 premières heures de dégradation.

Après 24h nous avons observé une diminution du rayon hydrodynamique des particules confirmé par les valeurs du coefficient de diffusion ($7,6 \times 10^{-8}$ et $8,3 \times 10^{-8}$ pendant le temps de 24h et 32h, respectivement (figure 44).

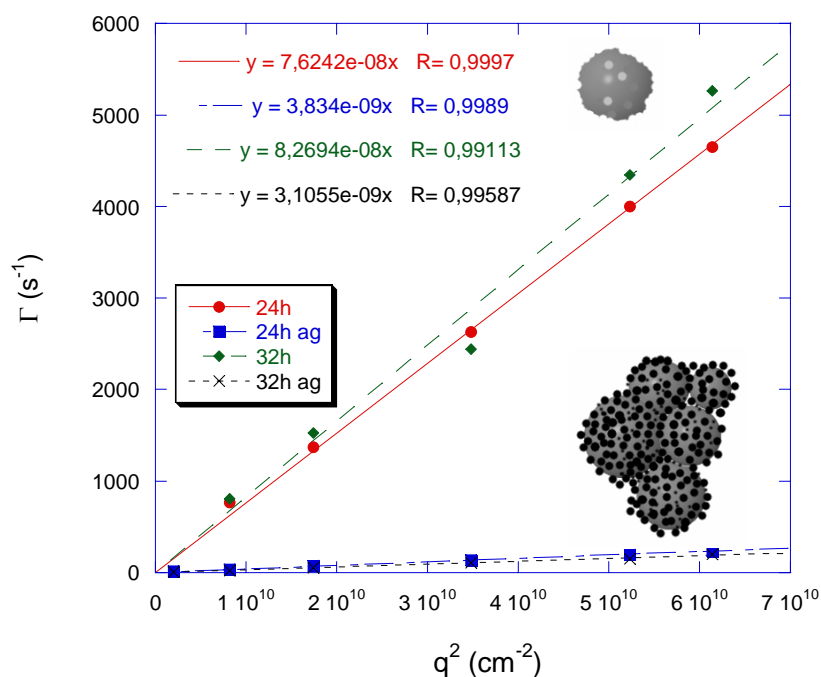


FIGURE 44. Variation de Γ en fonction de q^2 pour les particules et agrégats après 24 heures de dégradation.

L'analyse de l'échantillon après 7 jours a révélé que la valeur de l'intensité diffusée a été réduite de moitié indiquant que la dégradation continue (figure 45).

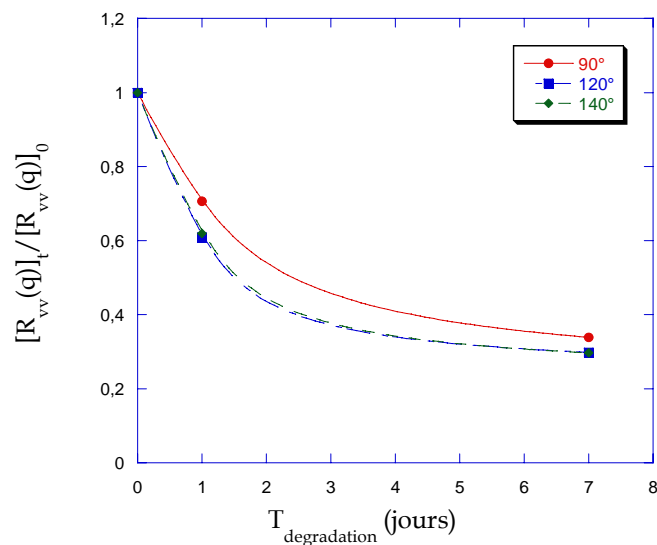


FIGURE 45. Variation de $[R_{vv}(q)]_t/[R_{vv}(q)]_0$ en fonction du temps de dégradation mesurée aux angles de 90° , 120° et 140° .

Commentaires sur le rayon hydrodynamique dans l'étude de la dépendance angulaire

Le rayon hydrodynamique initiale mesurée à $\theta = 90^\circ$ est de 54 nm et on a observé que après 32h de dégradation avec de l'enzyme papaïne le Rh a été réduit à 39 nm, approximativement 30%. Donc, le diamètre de la particule a été réduit de 30 nm (figure 46).

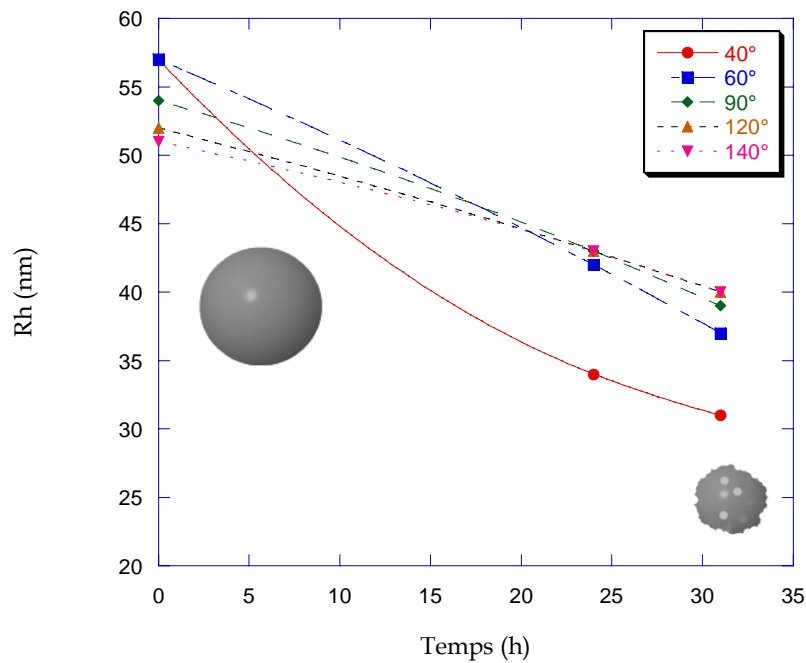


FIGURE 46. Diminution de Rh pendant 32 heures de dégradation, température de 37°C .

Pour tous les angles étudiés la diminution de Rh a été confirmée. La figure 47 présente la réduction aux angles de 40° et 90° .

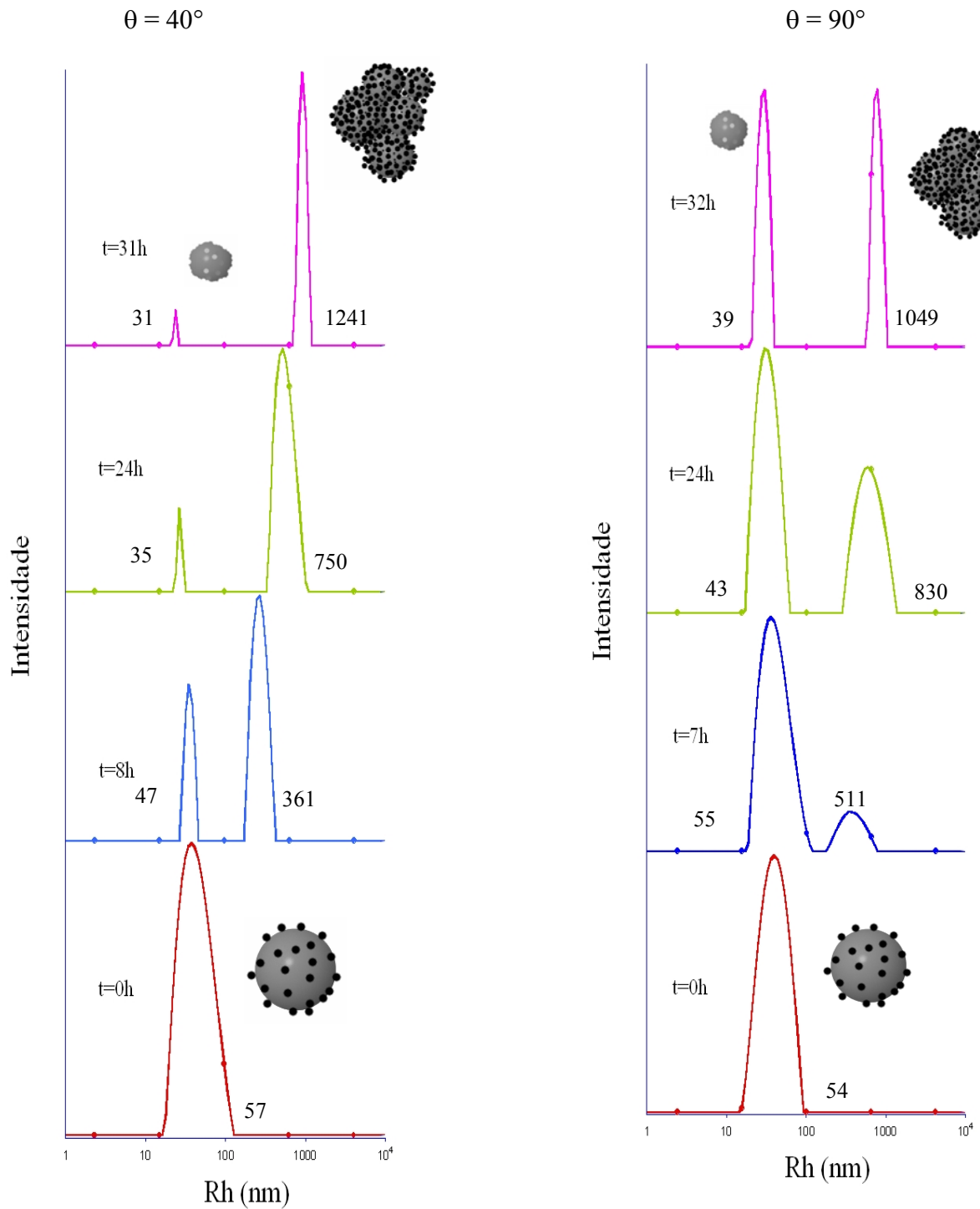


FIGURE 47. Valeur de R_h en fonction du temps pour l'échantillon F10M et 10 unités de papaïne. $\theta = 40^\circ$ et 90° .

CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous avons développé et utilisé deux méthodes (polyaddition/suspension et mini-émulsion) pour préparer des micro et nanoparticules à base de polyuréthane. Ces particules ont été caractérisées par des techniques physico-chimiques et plus particulièrement par la diffusion de lumière élastique et quasi-élastique. Nous avons ensuite étudié et suivi la dégradation de ces mêmes particules en présence d'enzymes et dans des milieux acides et basiques. Cette dégradation de la particule s'accompagne aussi de la présence d'agrégats favorisés par les interactions entre enzymes et nanoparticules de polyuréthanes. Cette étude peut être résumé comme suit :

- L'emploi du polyol naturel comme monomère dans la synthèse de micro et nanoparticules de polyuréthane s'est avéré très intéressant et est décrit de manière originale dans ce travail.
- L'utilisation de la technique de polyaddition en suspension a permis l'obtention de particules sphériques et polymérique.
- L'addition de PEG dans la synthèse des particules par la technique de polyaddition en suspension a réduit le diamètre moyen des particule de 400 μm à 5 μm . Quand le PEG n'a été pas ajouté, une vitesse de agitation de 20000 rpm a été nécessaire pour obtenir des particules avec la taille moyenne autour de 50 μm . Cet effet du PEG dans la réduction du diamètre n'a été pas vérifié pour les particules préparées par la miniémulsion.
- Le PEG a réduit l'efficacité d'encapsulation des particules préparées par polyaddition en suspension de 70% (formulations préparées sans PEG) à 20% (formulations avec PEG). Pour les particules synthétisées par polyaddition en miniémulsion, l'addition de PEG n'a pas influencé l'efficacité d'encapsulation.

- Par la technique de polyaddition en suspension l'addition de 10% de PEG par rapport à quantité de monomères a augmenté la porosité de la surface des particules et en l'absence de PEG, des particules compactes ont été obtenus.
- La technique de miniémulsion a permis l'obtention de nanoparticules avec une distribution monomodal de taille, autour de 290 nm.
- Dans la technique de miniémulsion, un plus grand rendement de formulation a été obtenu avec l'utilisation de surfactants non ioniques.
- L'augmentation de la concentration de tween 80 dans les formulations préparées par miniémulsion a conduit à la diminution de la taille des particules et à l'augmentation du rendement des formulations.
- Une vitesse d'homogénéisation de 14000 rpm a été nécessaire pour obtenir des nanoparticules avec une distribution monomodal de taille par la technique de miniémulsion.
- La réduction des valeurs du potentiel zéta des particules suggère que le PEG se trouve à la surface des particules et ceci a été confirmé par MET. En présence de levofloxacine, les valeurs de potentiel zéta suggèrent qu'une quantité de médicament non encapsulée se trouve sur la surface des nanoparticules.
- La technique de diffusion de la lumière a permis le suivi de la dégradation *in situ* des nanoparticules de polyuréthane.
- La diminution du rayon hydrodynamique des nanoparticules en fonction du temps est une évidence de la dégradation.
- Les nanoparticules ont été dégradées par hydrolyse en tampon phosphate pH =7,4 et en solution de NaOH 0,5 M et par dégradation enzymatique (estérase et papaine).

- La composition des formulations a influencé la vitesse de dégradation. Les particules préparées avec le diisocyanate aliphatique (IPDI) ont été dégradées plus rapidement que celles préparées en utilisant le diisocyanate aromatique (MDI).
- Le profil de libération du levofloxacin suggère que la dégradation des particules a influencé la libération du médicament, mais la diffusion peut aussi contribuer dans le mécanisme de libération de ces principes actifs.

Avantages du système développé :

- Polyol – monomère naturel
- Diisocyanates non toxiques
- Polymérisation dans l'eau
- Huile d'olive comme agent hydrophobique (miniemulsion)
- Polymérisation sans catalyseur (miniemulsion)
- Particules biodégradables
- Sans toxicité
- Ecologiquement correcte
- Economiquement viable

**ANEXO - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E
GENOTOXICIDADE DE MICRO- E NANOPARTICULAS DE
POLIURETANO.**

*Realizado por Thiago Caon, acadêmico do curso de Farmácia UFSC, bolsista IC, CNPq
Orientadora : Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Centro de Ciências da Saúde*

RESUMO

O uso de micro e nanopartículas poliméricas biodegradáveis em sistemas carreadores de fármacos é cada vez mais freqüente. Além de conferirem boa estabilidade, absorção e transferência tissular elas podem ser facilmente conjugadas a outras moléculas. Outro aspecto relevante é que a encapsulação diminui os efeitos colaterais devido a uma maior especificidade, associada à vantagem da possibilidade do uso de doses mais baixas. Considerando-se que as nanopartículas serão administradas terapêuticamente em organismos vivos é importante avaliar a toxicidade das partículas intactas bem como dos produtos de degradação. Foram analisadas 4 formulações: F11, F12, F6 e F7. Efetuou-se a degradação das formulações F11 e F12 em três diferentes estágios (7, 14 e 30 dias). Os componentes isolados das formulações também foram analisados quanto à toxicidade. Todas as soluções-estoque das formulações foram preparadas na concentração de 1mg/ml. A avaliação da citotoxicidade foi realizada em duas linhagens celulares diferentes: VERO e MA104. Após o período de incubação das células com os materiais testes, em diferentes concentrações, partindo-se de 500 µg/mL (razão 1:2), analisaram-se as alterações morfológicas nas células por microscopia óptica e então, efetuou-se o ensaio colorimétrico com MTT, por espectrofotometria a 540 nm. A ação genotóxica das formulações foi avaliada através do ensaio do Cometa, em células VERO, em concentrações não citotóxicas e que exibiram uma viabilidade celular superior a 75%. Os materiais testes F11 e F12 não apresentaram citotoxicidade e genotoxicidade nas concentrações testadas. O mesmo foi evidenciado para os produtos de degradação. Não ocorreram alterações morfológicas significativas ($p > 0,05$). Logo, a citotoxicidade apresentada pelas nanopartículas intactas e degradadas foi superior a 500 µg/mL. As suspensões F6 e F7 apresentaram uma concentração citotóxica a 50% (CC_{50}) de, respectivamente, $11,49 \pm 1,83$ e $495,96 \pm 54,58$ µg/mL para as células VERO e de $11,59 \pm 0,84$ e $330,94 \pm 32,78$ µg/mL para as células MA 104. O Tween 80 e o SDS apresentaram valores de concentração citotóxica a 50% (CC_{50}) de, respectivamente, $326,44 \pm 27,12$ e $47,95 \pm 3,37$ µg/mL para as células VERO e, de $267,61 \pm 68,82$ e $45,15 \pm 7,74$ µg/mL para as células MA 104. Não foi evidenciada citotoxicidade para o hexadecano e poliol, nas concentrações testadas. O Tween 80, como constituinte da nanopartícula, teve um comportamento citotóxico diferenciado de quando testado isoladamente, para células MA 104. Essa diferença não foi observada quando esse mesmo tratamento foi feito com células VERO. O SDS, como constituinte da nanopartícula, teve um comportamento citotóxico semelhante de quando testado isoladamente, tanto para células MA104 quanto para células VERO. As suspensões F6 e F7 apresentaram ação genotóxica, para as células VERO, nas concentrações de 11,49 µg/mL e 495,96 µg/mL, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de métodos de cultura celular na toxicologia tem duas diferentes áreas de aplicação: 1) estudos de mecanismos de efeitos tóxicos (efeitos sobre membranas celulares, DNA, proteínas, atividade mitocondrial, atividade lisossomal, biotransformação de xenobióticos, etc.); 2) análise quanti- e qualitativa da toxicidade de diferentes materiais. A escolha do modelo de cultura celular dependerá de sua aplicação. Nos estudos de mecanismos de efeitos tóxicos, primeiramente evidencia-se a presença de relatos clínicos de toxicidade de um composto, em determinado órgão, e então, selecionam-se modelos de cultura celular específicos, que possibilitem esse estudo. Quando os métodos de cultura celular são usados para testar a toxicidade de um composto desconhecido, é importante utilizar um sistema adequado e padronizado, comparando-se com estudos em outros laboratórios. Nesse último caso, é mais comum a ocorrência de erros nos estudos toxicológicos em função da utilização de modelos de cultura celular não representativos. Em função disso, atualmente, uma série de outros estudos de toxicidade, tais como imunotoxicidade, teratogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, devem acompanhar os ensaios com cultura celular (BARILE, 1994).

A segurança de uso de nanopartículas concentra certa preocupação, apesar do seu potencial de uso. As propriedades das nanopartículas não dependem apenas do seu tamanho, mas também da sua estrutura e superfície de revestimento. Atualmente, ainda não está claro qual o tamanho de partícula e quais superfícies de revestimento têm influência sobre determinados aspectos toxicológicos. Estudos, nas quais as partículas testadas apresentavam a mesma superfície de revestimento, mas com diferenças em relação ao seu processamento e síntese, demonstraram diferenças quanto à toxicidade. Desta forma, estudos de toxicidade em nanopartículas não devem incluir apenas dados relacionados à superfície de revestimento (YIN; TOO; CHOW, 2005).

1.1 Citotoxicidade

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como o conjunto de alterações da homeostase celular, que ocasiona várias modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, assim como em sua sobrevivência, multiplicação, divisão e desempenho de funções metabólicas. Desta forma, a reação *in vitro* das células frente a uma substância qualquer pode ser evidenciada microscopicamente pela desorganização do tapete

celular, acompanhada do aspecto granuloso e arredondado das células (STREISSLE *et al.* 1981). A intensidade da lesão celular é influenciada por inúmeros fatores, tais como a concentração e a permeabilidade celular do material testado, o tempo de exposição, a linhagem celular, entre outros (HU; HSIUNG, 1989).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são de grande importância nos estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos, pois além de avaliar sua capacidade de causar alterações celulares, podem definir os intervalos de concentrações a serem utilizadas (EISENBRAND *et al.* 2002) em avaliações posteriores, como por exemplo, o estudo de genotoxicidade (SILVA *et al.* 2002).

Os ensaios mais comumente utilizados para a avaliação da citotoxicidade baseiam-se na alteração da permeabilidade celular (BABICH; BORENFREUND, 1991), nas funções celulares ou mitocondriais (HAMID *et al.* 2004; WILSON, 2000; EISENBRAND *et al.* 2002) e nas alterações da morfologia celular e proliferação celular (STREISSLE *et al.* 1981).

Para a avaliação da citotoxicidade dos materiais-testes utilizou-se o ensaio do MTT, que é apropriado para uma variedade de linhagens celulares que apresentam crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial (BARILE, 1994).

A determinação da citotoxicidade é um aspecto importante para permitir a utilização segura dos poliuretanos na área biomédica, por se tratar de um teste preliminar para determinação da biocompatibilidade.

1.2 Genotoxicidade

Os estudos de genotoxicidade fornecem informações importantes que devem ser levadas em conta no processo de desenvolvimento de novos fármacos (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002), devendo ser realizados nos estágios iniciais desse processo, a fim de prognosticar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica, e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; SNYDER; GREEN, 2001).

Os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992).

Alguns ensaios de toxicidade *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da mutagenicidade, genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes químicos ou

físicos (EISENBRAND *et al.* 2002), a saber: teste de Ames (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003; GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000), teste de micronúcleo (MCGREGOR; CASCIANO; MÜLLER, 2000; SILVA, *et al.* 2002) e o ensaio do Cometa (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; SNYDER; GREEN, 2001; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002), entre outros.

O ensaio do Cometa é usado como um teste de genotoxicidade, no biomonitoramento humano, em estudos de epidemiologia molecular e de ecotoxicologia, bem como na pesquisa de danos e reparos de DNA. Trata-se de um ensaio que utiliza um gel de eletroforese para visualizar e quantificar as quebras da fita de DNA, em células individuais usando microscopia de fluorescência. De uma forma simples, as células são embebidas em agarose, aplicadas em lâminas que são mergulhadas numa solução de lise para remover lipídeos e proteínas, e expostas a um campo elétrico. Depois da eletroforese, o DNA é corado usando-se um tipo de corante fluorescente, e então visualizado por microscopia de fluorescência. Imagens individuais podem ser obtidas e analisadas para obter-se informações, tais como a distância que o DNA migrou e a porcentagem de DNA que migrou (OLIVE, 2002).

As vantagens deste ensaio incluem: 1) sensibilidade para a detecção de baixos níveis de dano ao DNA; 2) simplicidade e baixo custo; 3) uso de pequeno número de células por amostra; 4) coleta de dados de células individuais, permitindo análises estatísticas mais robustas; 5) virtualmente, qualquer população de células eucarióticas pode vir a ser analisada; 6) uso de pequenas quantidades de material teste, fácil aplicação e curto período de tempo para concluir o experimento; 7) capacidade para avaliar o dano do DNA de células não proliferativas e, sendo um ensaio de células individuais, pode-se detectar respostas não uniformes numa população mista de células; 8) capacidade para avaliar a genotoxicidade em ensaios *in vivo* e *in vitro* (COLLINS *et al.* 1997; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; TICE *et al.* 2000). A população de células mais adequada dependerá das características da exposição, da amostra, do acesso e do objetivo do estudo (ALBERTINI *et al.* 2000).

Segundo Tice *et al.* (2000), as únicas desvantagens são a necessidade de suspensões celulares individuais, e o fato de que pequenas amostras celulares podem não ser representativas da população celular total.

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Geral:

Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de micro- e nanopartículas de poliuretano.

2.2 Específicos:

- Avaliar um método de esterilização adequado para as amostras a serem testadas.
- Avaliar a geno- e citotoxicidade das formulações F11 e F12, em diferentes concentrações, em diferentes estágios de degradação (7, 14 e 30 dias), através do ensaio do Cometa e do ensaio colorimétrico do MTT, respectivamente.
- Avaliar a geno- e citotoxicidade das formulações F6 e F7, pelos ensaios do Cometa e MTT, respectivamente.
- Avaliar a citotoxicidade dos componentes isolados das formulações F6 e F7.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Culturas celulares

3.1.1 Células

Foram utilizadas células VERO (ATCC: CCL 81), que são culturas contínuas de fibroblastos de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), e células MA104, que são culturas contínuas de fibroblastos, obtidas a partir de rins embrionários de macaco *Rhesus*.

3.1.2 Meio de cultura e reagentes

O meio utilizado para o crescimento das células MA 104 foi DMEM (Cultilab) enquanto que para as células VERO utilizou-se o meio MEM (Cultilab).

Ambas as culturas celulares, foram suplementadas com soro fetal bovino (SFB-Cultilab), na concentração de 10% para crescimento e 5% para manutenção.

Adicionou-se uma solução de antibióticos e antifúngicos (PSA) visando prevenir contaminações por bactérias, fungos e leveduras, na proporção de 1mL de penicilina G / estreptomicina / anfotericina B (10.000U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B - Cultilab) para cada 100 mL de meio.

A enzima proteolítica tripsina a 0,25% (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1:250, Sigma) foi o agente de dispersão celular utilizado para a obtenção de subculturas, para manutenção de células e para realização de experimentos.

Para a lavagem e remoção de células mortas, utilizou-se tampão PBS, devidamente esterilizado por autoclavagem.

3.2 Materiais-teste

3.2.1 Micro- e nanopartículas de poliuretano

Micro e nanopartículas de poliuretano baseado num monômero natural derivado do óleo de mamona foram sintetizadas através da técnica de suspensão-poliadição pela doutoranda Betina Giehl Zanetti Ramos (Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos, POLIMAT, Departamento de Química, UFSC).

Foram testadas 4 formulações : F11, F12, F6 e F7.

Tabela 1: Proporção dos componentes das formulações estudadas.

| Amostras | MDI | Poliol | PEG 400 |
|----------|-----|--------|---------|
| F11 | 4 | 4 | 2 |
| F12 | 4 | 3 | 3 |

Na preparação das formulações contendo apenas nanopartículas, F6 e F7, utilizou-se a mesma quantidade de poliol e MDI, diferindo quanto ao tensoativo utilizado (Tabela 2).

Tabela 2: Quantificação dos constituintes das formulações F6 e F7

| Constituintes | Formulações | |
|------------------|-------------|-----|
| | F6 | F7 |
| Poliol (g) | 6,7 | 6,7 |
| MDI (g) | 3,0 | 3,0 |
| Hexadecano (mL) | 0,3 | 0,3 |
| Água (mL) | 200 | 200 |
| Tensoativo [mM]* | 5,2 | 1,9 |

*Obs.: Na formulação F6 o tensoativo utilizado foi o SDS enquanto que para a F7 foi o Tween 80.

3.2.2 Degradação

As formulações F11 e F12 foram submetidas à degradação em tampão fosfato pH = 7,4 e 37°C e com agitação de 150 rpm no Laboratório de Farmacotécnica da UFSC.

Prepararam-se 12 amostras de cada formulação (três permaneceram intactas e as outras nove foram submetidas à degradação). Estas nove amostras foram divididas na mesma proporção entre três estágios de degradação (7, 14 e 30 dias).

3.3 Avaliação da autoclavagem como método de esterilização

Visto a importância da esterilidade das amostras, e a fim de se obter uma melhor representatividade das mesmas nos testes de toxicidade a serem realizados, testou-se o método de esterilização em autoclave.

As amostras foram colocadas em autoclave (Phoenix), submetidas à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm por 20 min.

Após, uma nova análise granulométrica foi realizada no Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, Université Bordeaux 1, França.

Utilizou-se uma solução aquosa de tioglicolato a 10% para a avaliação qualitativa da presença de contaminantes biológicos, como bactérias e fungos. A amostra foi misturada em quantidade equivalente à da solução do tioglicolato. Incubou-se em estufa na temperatura de 37°C por sete dias, com monitoramento diário. A presença de turvação serviu como indicativo para contaminação.

3.4 Avaliação da citotoxicidade através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

O sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-*i*)2,5-difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido a formazana, um composto de coloração azul-escura, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico do MTT mede a quantidade de formazana formada através de espectroscopia e é sensível e quantitativo, visto que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis. Neste trabalho, foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991)

Procedimento: Uma suspensão de células MA 104 ou células VERO, contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída (100µL/cavidade) em placa de 96 cavidades. As contagens foram

realizadas em câmara de Neubauer e as células MA 104 foram mantidas em meio DMEM, enquanto que as VERO em meio MEM, ambos suplementados com 5% SFB, 1% PSA a 37°C/5%CO₂ até confluência (24h). Em seguida, o meio foi aspirado e foram adicionados 200 µL/cavidade dos materiais-testes diluídos na razão 1:2, a partir de 500 µg/mL. Foram testadas cinco concentrações de cada formulação. Aos controles celulares adicionou-se 200 µL meio, MEM ou DMEM de acordo com a linhagem celular e, no branco, adicionou-se 100 µL de DMSO em cada uma das cavidades. Em seguida, as placas foram mantidas a 37°C/5%CO₂, por 72h. Transcorrido esse período, os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados, sendo em seguida adicionados 50 µL da solução de MTT/cavidade (Sigma), a 1 mg/mL em meio, DMEM ou MEM, de acordo com a linhagem celular. Mantiveram-se as placas por mais 4 h, nas mesmas condições. Após esse período, foi retirado o meio contendo o MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionou-se 100 µL de DMSO/cavidade (Nuclear) para solubilização dos cristais de formazana. As placas foram agitadas, levemente, a temperatura ambiente, por 10 min, para que toda a formazana fosse solubilizada, e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm (Bio-Tek, EL_x 800).

As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares. Para cada material-teste, foi calculado o valor de CC₅₀, por análise de regressão, que é definido como a concentração que reduz 50% a absorbância das células, quando comparada aos controles celulares.

3.5 Avaliação das alterações morfológicas por microscopia

A citotoxicidade se traduz pela desorganização do tapete celular, bem como pelo aspecto granuloso e arredondado das células, e conseqüentemente aparecimento de alterações morfológicas quando as células são expostas a agentes externos (STREISSLE *et al.* 1981).

Para avaliar a citotoxicidade dos materiais-testes usaram-se duas linhagens celulares.

Procedimento: uma suspensão de células VERO ou MA104, contendo aproximadamente 2,5x10⁵ células/mL, foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 µL por cavidade). Após 24 h de incubação, a 37°C, em estufa de CO₂, o tapete celular estava confluyente e foram adicionadas as diferentes concentrações dos materiais-testes, dissolvidas em meio, MEM ou DMEM, conforme a linhagem celular, na razão de 1:2. O meio da placa foi descartado por aspiração e as diluições foram transferidas para a placa. Nos controles

celulares foi adicionado somente meio. As placas foram incubadas, a 37°C, em estufa de CO₂, e as alterações morfológicas foram acompanhadas, no microscópio invertido, depois de 72 h.

As alterações morfológicas que, eventualmente, surgiram foram comparadas com os controles celulares. Esta técnica permitiu estimar a concentração que causa citotoxicidade a 50% das células de uma cavidade (CC₅₀). As alterações morfológicas do tapete celular foram classificadas em cinco categorias, de acordo com as porcentagens de alterações morfológicas celulares:

1 = de 0 a 20% aproximadamente do tapete celular com alterações

2 = de 21 a 40% aproximadamente do tapete celular com alterações

3 = de 41 a 60% aproximadamente do tapete celular com alterações

4 = de 61 a 80% aproximadamente do tapete celular com alterações

5 = de 81 a 100% aproximadamente do tapete celular com alterações

A CC₅₀ foi estimada a partir dos valores das categorias (1 a 5), em relação aos controles celulares, por análise de regressão.

3.6 Avaliação da genotoxicidade através do ensaio do Cometa

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Ostiling e Johanson (1984), com algumas modificações segundo Gontijo e Tice (2003). Primeiramente, células VERO foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5x10⁵ células/mL), até a formação de um tapete celular confluyente (24h). Adicionou-se à placa 500 µL de cada material-teste em uma concentração não citotóxica (\leq CC₅₀) e incubou-se durante 90 min a 37°C/5% CO₂.

Os controles positivos consistiram de 500 µL da solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Nuclear) 200 e 100 µM, e os controles negativos apenas do meio de manutenção.

Após os tratamentos, lavou-se o tapete celular por três vezes com tampão PBS e então tripsinizou-se. Em cada cavidade, adicionou-se 150 µL de tripsina, incubou-se em estufa a 37°C por 5 min, e então foi adicionado 500 µL de meio suplementado com soro fetal bovino. Efetuou-se a análise de viabilidade celular com azul de Trypan. Para dar seqüência ao teste, a viabilidade celular deveria ser superior a 75%.

As células foram recolhidas em tubo (Falcon) e centrifugou-se por 350xg por 3 min. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o aglomerado de células com 200 µL de meio, de forma a obter uma suspensão de aproximadamente 1x10⁶ células/mL.

Em um tubo (tipo eppendorf), adicionou-se 40 µL de suspensão celular a 60 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Gibco BRL) 0,5%, matinda a 37°C. O conteúdo desse tubo

foi colocado sobre duas lâminas previamente cobertas com agarose (normal) 1,5%. Foram colocadas lamínulas para evitar que a agarose secasse. As lâminas foram armazenadas na geladeira por 15 min para solidificar a agarose.

As lamínulas foram retiradas e as lâminas colocadas em uma cuba de vidro, onde foram adicionados 100 mL da solução de lise gelada (4°C), na qual as lâminas devem permanecer, no mínimo, por 1h e, no máximo, por 30 dias. A solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, qsq de NaOH 10 N para obter pH 10) é uma solução detergente contendo altas concentrações de sais, que promove a desintegração das membranas celulares.

As lâminas foram submetidas ao tratamento alcalino em solução tampão de pH = 13 (300mM NaOH e 1 mM EDTA), previamente refrigerada, por 30 min, em banho de gelo. A corrida de eletroforese foi feita numa cuba horizontal disposta num banho de gelo, com voltagem constante (25 Volts) e amperagem de 280-300 mA, por 30 min.

Após a corrida eletroforética, as lâminas foram lavadas 3 vezes com uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH = 7,5) para que, então, pudesse ser realizada a fixação com etanol e, posterior coloração com brometo de etídeo (20 µg/mL). O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA que emite a fluorescência quando exposto à radiação UV.

Efetuuou-se a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus BX 40), com filtro de excitação 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, com aumento de 400x.

Os cometas foram classificados visualmente, conforme a classificação proposta por Kobayashi *et al.* (1995), que os classificou em cinco categorias (Figura 1): classe I, sem cauda; classe II, cometas com pequenas caudas (comprimento da cauda menor que 25% do diâmetro da cabeça); classe III, cometas com caudas médias (comprimento de cauda entre 25 e 100) do diâmetro da cabeça); classe IV, cometas com caudas longas (comprimento da cauda maior do que o diâmetro da cabeça); e classe V, cometas mal definidos ou com cabeças pequenas (SILVA *et al.* 2002).

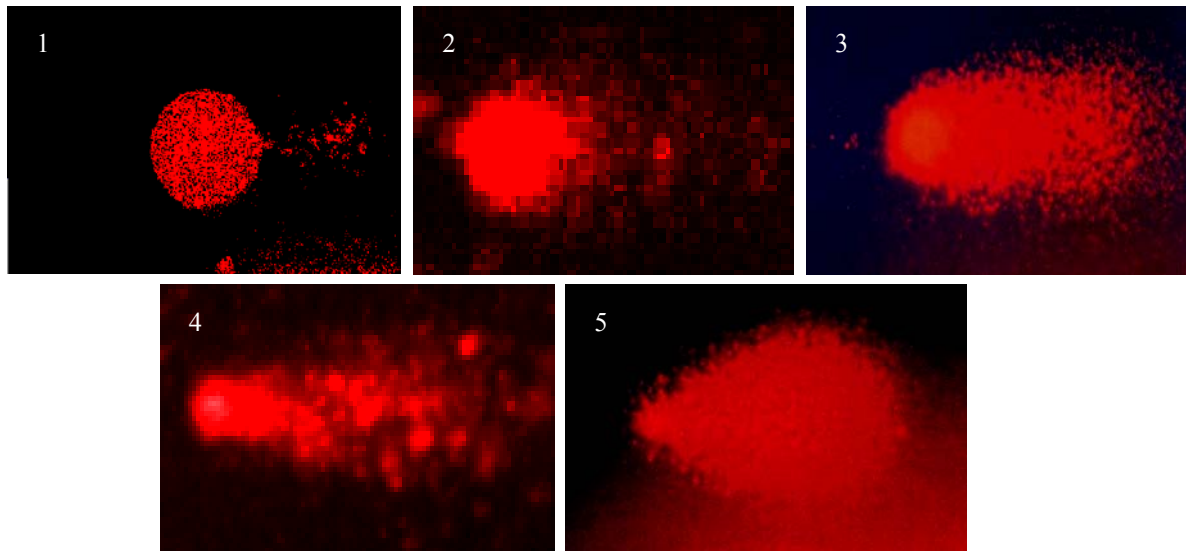


Figura 1: As classes de cometas, segundo a classificação de SILVA *et al.* (2002). 1 - Representação de cometa de classe I; 2 - Cometa de classe II; 3 - Cometa de classe III; 4 - Cometa de classe IV; 5 - Cometa de classe V.

Cinquenta células foram analisadas, ao acaso, na região central de cada lâmina e classificadas visualmente nas cinco classes, utilizando-se um escore, onde foram atribuídos valores de 0-4 para as classes I, II, III, IV e V, respectivamente (SILVA *et al.* 2002). Desta forma, o escore total variou de zero (núcleos intactos) a 200 (núcleos totalmente danificados). Os cometas localizados nas bordas da lâmina não foram quantificados a fim de evitar resultados falso-positivos.

Cada experimento foi realizado em triplicata e para cada tratamento foram feitas duas lâminas, tendo sido avaliadas, aleatoriamente, 50 células por lâmina.

As diferenças, estatisticamente significativas ou não dos tratamentos, com relação aos controles negativos, foram avaliadas através do teste de Dunnett.

3.7 Delineamento experimental e análise estatística

Nos experimentos, foi utilizado o delineamento de blocos completamente causalizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos, onde cada cavidade constituiu uma unidade experimental (placas de 96 cavidades) e os tratamentos foram as diferentes concentrações das formulações (F6, F7, F11, F12), frente a diferentes linhagens celulares, no caso da cito- ou genotoxicidade. Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades e as repetições (três) ficaram em placas diferentes, garantindo a casualização. Cada

placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

O estudo de qualquer atividade biológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras. Um erro grave que, normalmente, é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de microtitulação, é acreditar que, colocando-se as mesmas concentrações de um material em teste, em duas ou três colunas na placa, se estaria fazendo uma duplicata ou replicata. Estatisticamente, esse procedimento é considerado apenas uma réplica de um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levado em consideração (SOKAL; ROHLF, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da autoclavagem como método de esterilização

Após a esterilização, efetuou-se a análise granulométrica para avaliar a ocorrência de alterações físicas consideráveis. Na formulação F6, houve uma variação do diâmetro médio de 300 para 270 nm. Para a formulação F7, a variação foi de 150 para 140 nm, após a esterilização. O teste com o tioglicolato apresentou-se como negativo para ambas as amostras. Desta forma, manteve-se a integridade física da amostra, tornando-a de grande representatividade. Um estudo realizado por Hoffmann *et al.* (1997), que utilizava a autoclavagem como procedimento de esterilização para nanopartículas, também demonstrou que não ocorreram alterações no tamanho das partículas.

4.2 Avaliação da citotoxicidade de micro e nanopartículas intactas e quando submetidas à degradação (F11 e F12)

As formulações F11 e F12 tiveram sua citotoxicidade testada quando as partículas se encontravam intactas, e no momento em que sofreram degradação.

Para a avaliação da citotoxicidade, efetuou-se a avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares e viabilidade celular através do ensaio do MTT.

Nenhuma formulação apresentou citotoxicidade, nas concentrações testadas (500 a 0,98 µg/mL), para ambas as linhagens celulares (VERO e MA 104), quando intactas e quando submetidas ao processo de degradação. Também não foram observadas alterações morfológicas celulares evidenciáveis nas células tratadas com esses materiais-testes.

Assim, pode-se inferir que a citotoxicidade das nanopartículas intactas e em degradação (7, 14 e 30 dias) foi superior a 500 µg/mL. Desta forma, os estudos de genotoxicidade foram conduzidos com concentrações não citotóxicas ($\leq CC_{50}$) desses materiais-teste.

4.3 Avaliação da citotoxicidade dos constituintes individuais de nanopartículas intactas (F6 e F7)

As formulações F6 e F7, bem como seus constituintes individuais, com exceção do MDI, também foram testadas com relação à sua citotoxicidade, através da análise microscópica das alterações morfológicas celulares, e da viabilidade celular pelo ensaio do MTT. Estas formulações não foram submetidas à degradação. O MDI não foi testado em função da indisponibilidade da amostra. Os constituintes individuais testados foram o poliol, hexadecano, Tween 80 e dodecil sulfato de sódio (SDS).

Com relação aos componentes individuais, prepararam-se soluções individuais dos mesmos, atentando-se para que a concentração destas soluções tivesse uma certa equivalência com a concentração dos mesmos quando incorporados nas nanopartículas.

Considerando-se os valores de CC_{50} (Tabela 3) para a avaliação da citotoxicidade, segundo o ensaio colorimétrico do MTT, observou-se que apenas F7 apresentou uma diferença estatística significativa, quando os valores de CC_{50} , referente aos diferentes tratamentos, foram comparados entre si, considerando-se as duas linhagens celulares testadas. Não foi possível calcular a CC_{50} para o hexadecano e poliol, visto que os mesmos não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas.

Tabela 3: Resultados da avaliação da citotoxicidade pelo ensaio do MTT frente a diferentes linhagens celulares (MA104 e VERO).

| | CC_{50} (µg/mL)* | |
|------------|--------------------|---------------------|
| | VERO | MA104 |
| F6 | 11,49 ± 1,83 a | 11,59 ± 0,84 a |
| F7 | 495,96 ± 54,58 b | 330,94 ± 32,78 b, c |
| Tween80 | 326,44 ± 27,12 c | 267,61 ± 68,82 c |
| SDS | 47,95 ± 3,37 a | 45,15 ± 7,74 a |
| Poliol | - | - |
| Hexadecano | - | - |

*Concentração citotóxica a 50%; valores representados pela média de três experimentos independentes \pm desvio-padrão da média. Utilizou-se os testes de ANOVA e Tukey quando necessário, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias. Estes testes estatísticos exibem uma comparação dos valores de CC_{50} para os diferentes tratamentos.

O perfil da citotoxicidade das preparações F6 e F7, assim como de seus constituintes isolados, frente as diferentes linhagens celulares, VERO ou MA 104, pode ser visualizado na figura 2. A % de viabilidade celular, na grande maioria dos tratamentos, foi maior em baixas concentrações dos materiais-teste.

A citotoxicidade, avaliada segundo as alterações morfológicas celulares, representou um ensaio confirmatório, na maioria dos casos, para os resultados encontrados com o ensaio colorimétrico do MTT, mediante comparação com os valores obtidos de CC_{50} (dados não mostrados). Não foi observada uma diferença considerável, na maioria dos tratamentos, entre os dois ensaios, quando se comparou os valores de CC_{50} . Nos casos em que ocorreram divergências em relação aos valores de CC_{50} , optou-se por utilizar o valor de CC_{50} obtido com o ensaio do MTT, pelo fato de representar um ensaio com maior aceitabilidade, em estudos de citotoxicidade, e por não se tratar de um ensaio subjetivo. Cabe lembrar, que esta subjetividade, encontra-se incrustada em estudos de análise visual, como aquele em que se analisam as alterações morfológicas celulares por microscopia.

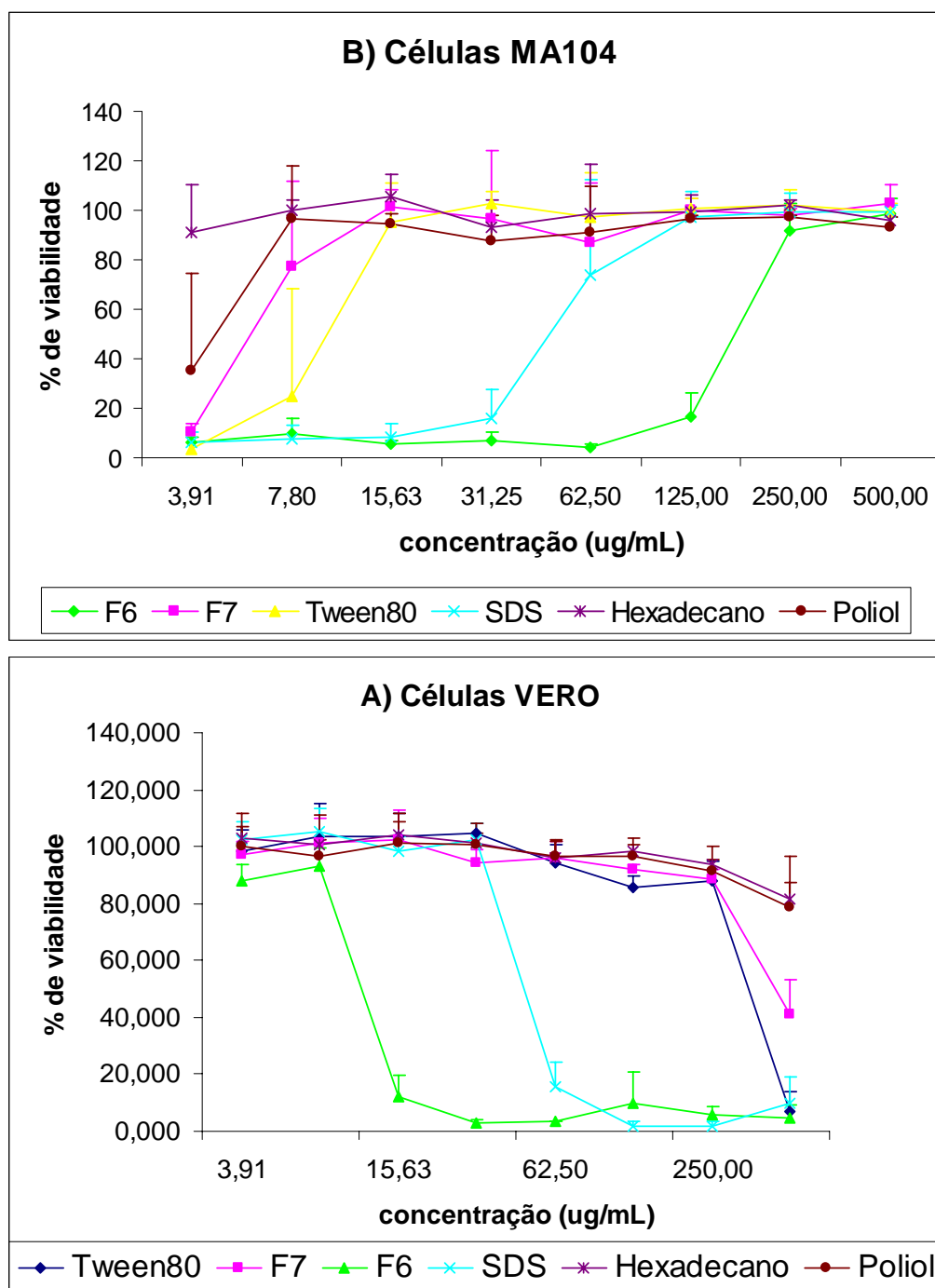


Figura 2: Resultados da avaliação do perfil de citotoxicidade, das formulações F6 e F7, bem como de seus constituintes isolados, frente às células VERO (A) e MA104 (B), através do ensaio colorimétrico do MTT. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes \pm desvio-padrão da média. As concentrações testadas (representadas pelo eixo x) variaram de 3,91 a 500 $\mu\text{g/mL}$, seguindo-se uma razão de 1:2 na diluição.

Um aspecto importante analisado nesse estudo foi à influência dos surfactantes sobre a citotoxicidade, por serem os prováveis responsáveis pela citotoxicidade das nanopartículas

F6 e F7. O Tween 80 apresentou a mesma citotoxicidade frente às células VERO e MA 104. A mesma análise pode ser feita para o SDS. No entanto, o Tween 80 e o SDS apresentaram uma diferença significativa entre si ($p < 0,001$). O SDS, individualizado ou conjugado na nanopartícula, apresentou a mesma citotoxicidade, o que não foi evidenciado para o Tween 80, quando analisado desta forma. Um estudo realizado por Yin, Too e Chow (2005), mostrou que o Tween80 pode exibir comportamentos diferenciados sobre as células, quando individualizado ou incorporado nas nanopartículas, devido a mudanças conformacionais e de interação química. Além disso, foi relatado que aspectos podem influenciar a toxicidade celular dos surfactantes, como a concentração, a possibilidade de formação de micelas e a alteração de polaridade (com exposição de grupamentos químicos diferentes).

Estudos realizados por Araki *et al.* (2003) e Muller *et al.* (1996) demonstraram que nanopartículas com ácidos biliares e lipídeos sólidos, devido a seus grupamentos hidrofóbicos, são mais acessíveis para as células e podem, então, causar uma maior interação entre as mesmas e as nanopartículas. Logo, uma superfície hidrofílica exibe menor toxicidade que uma superfície hidrofóbica, partindo-se deste princípio. Outra possível explicação, para uma maior toxicidade das partículas hidrofóbicas, poderia residir na maior penetrabilidade celular dessas partículas, devido às características das membranas celulares, o que aumentaria as interações e interferências nos mecanismos celulares.

Quando as formulações F6 e F7 foram analisadas, observou-se que a formulação F6 apresentou maior citotoxicidade, com uma diferença estatisticamente significativa em relação a F7. Considerando-se os resultados obtidos, acredita-se que esses efeitos de citotoxicidade, em ambas as formulações, esteja correlacionado com a ação superficial dos surfactantes. No entanto, não foi realizado nenhum teste para a comprovação da localização superficial do surfactante. A formulação F6 apresentou maior citotoxicidade, provavelmente, pela ação do SDS, que foi mais citotóxico que o Tween80, quando testado individualmente, e por ser um surfactante de caráter aniônico (EECKMAN; MÖES; AMIGHI, 2003) poderia contribuir para uma maior desestabilização da membrana, por um provável efeito eletrostático. Este suposto efeito não seria observado para o Tween 80, que é um surfactante não-iônico (O'SULLIVAN; WOODS; O'BRIEN, 2004), o que poderia ter contribuído para o menor efeito tóxico observado.

4.4 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do Cometa

Todos os passos metodológicos desse ensaio são importantes para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis. Para a seleção das concentrações a serem testadas, é

útil determinar a citotoxicidade em ensaios preliminares (TICE *et al.* 2000). É importante realizar os testes com concentrações não citotóxicas do material em teste, uma vez que a literatura indica que a concentração máxima a ser testada deve produzir uma viabilidade celular maior que 75%, a fim de evitar resultados falso-positivos, devido a citotoxicidade (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998; HENDERSON *et al.*, 1998; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002).

Após a determinação das concentrações citotóxicas, avaliou-se a genotoxicidade das partículas intactas e daquelas submetidas à degradação (formulações F11 e F12), bem como das formulações F6 e F7, através do Ensaio do Cometa, somente nas células VERO (Fig. 3). O escore de danos ao DNA foi obtido após a avaliação das diferentes classes de cometa, obtidas pelo tratamento destas células com os materiais-testes. Essa classificação foi proposta por Kobayashi *et al.* (1995), com algumas modificações de Miyamae *et al.* (1998).

A avaliação da viabilidade celular foi confirmada pelo teste de exclusão do corante azul de Trypan, após a exposição das células aos materiais-testes, ao peróxido de hidrogênio (controle positivo) e ao meio (controle negativo), a fim de se evitar o uso de concentrações que resultassem em citotoxicidade excessiva. A migração do DNA de células mortas também é detectada pelo Ensaio do Cometa, podendo influenciar na estimativa dos danos provocados (TICE *et al.*, 2000) e, também, porque os efeitos genotóxicos são mais expressivos se ocorrerem em células capazes de sobreviver ao tratamento (HARTMANN *et al.*, 2001). A viabilidade celular foi medida após os tratamentos e foi sempre superior a 70%, conforme recomendado pelo *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE *et al.*, 2000).

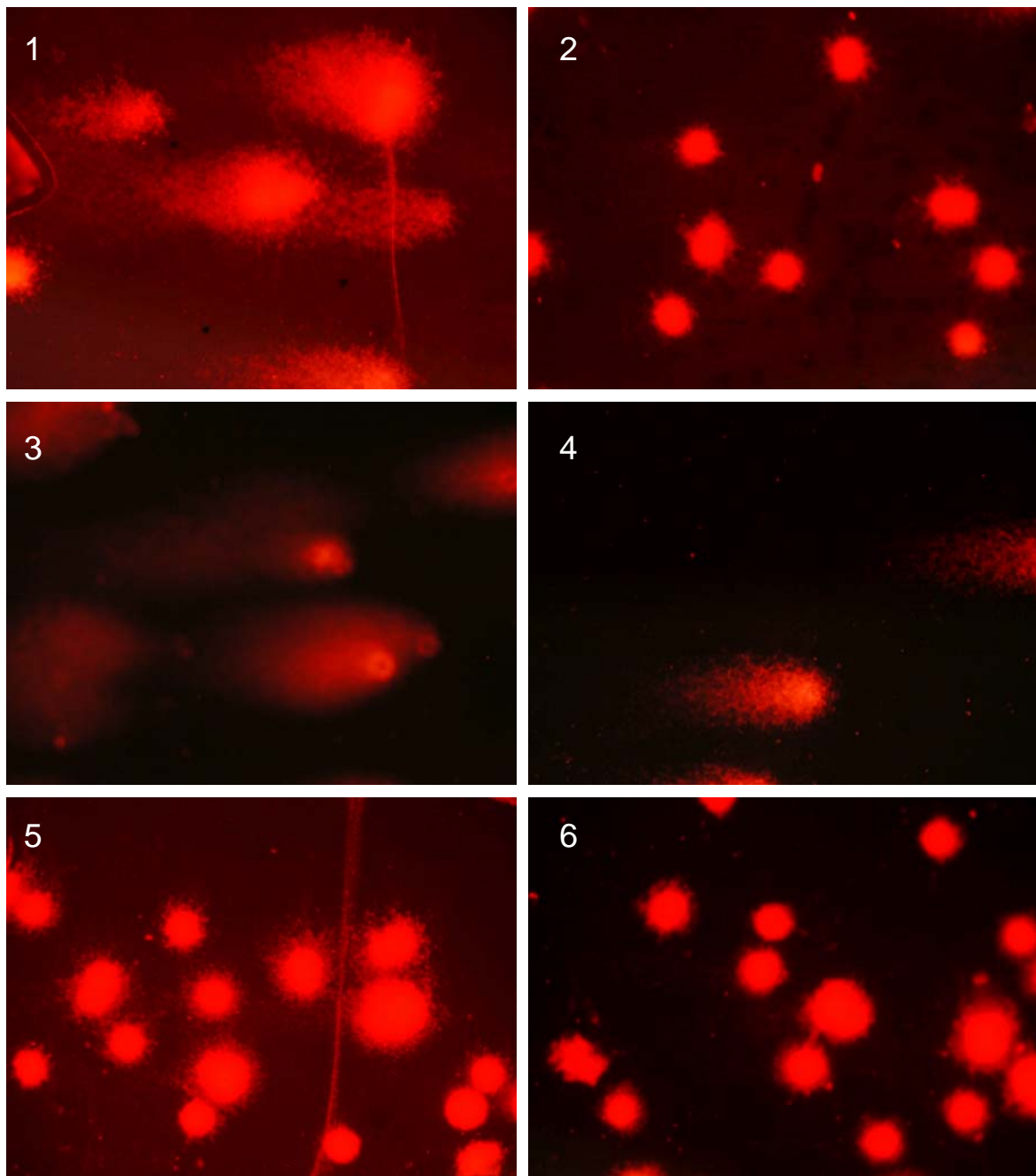


Figura 3: Diferentes classes de cometa obtidas pelo tratamento de células VERO com peróxido de hidrogênio 100 μ M - controle (+) (1), meio de crescimento - controle (-) (2), F6 (3), F7 (4), F11 (5), F12 (6). Os cometas foram classificados conforme SILVA *et al.*, 2002; esquema exposto na figura 1.

A avaliação dos danos causados ao DNA foi realizada através da análise visual, em microscópio de fluorescência. Outra alternativa seria o uso de um programa computadorizado analisador de imagens. Uma comparação entre esses dois métodos de

análise comprovou que, embora o programa analisador de imagens seja uma ferramenta interessante, o escore visual também fornece informações confiáveis e úteis para a análise estatística dos experimentos (COLLINS; AI-GUO; DUTHIE, 1995; COLLINS et al., 1997; COLLINS, 2002).

Visto que esta técnica de avaliação de genotoxicidade pode apresentar certa variabilidade, alguns aspectos (ALBERTINI *et al.*, 2000) foram considerados durante os experimentos. Entre eles, pode-se citar a uniformidade no preparo dos reagentes/soluções e das lâminas com agarose, a desespiralização alcalina e a eletroforese, e o controle da temperatura. Além disso, a avaliação dos cometas foi realizada por um único avaliador.

A figura 4 mostra que os danos causados às células VERO, quando tratadas com F6 e F7, foram significativamente maiores do que os causados às células do controle negativo ($p < 0,01$). Os outros tratamentos, com exceção do controle positivo, não diferiram estatisticamente do controle negativo ($p > 0,05$), o que permitiu afirmar que as formulações F11 e F12 não causaram danos significativos no DNA, nas concentrações testadas ($\leq CC_{50}$). Todos os materiais-testes, bem como o controle negativo, apresentaram uma diferença estatística significativa quando comparados ao controle positivo. A comparação entre os tratamentos foi feita estatisticamente, segundo o teste de comparações múltiplas de Dunnett.

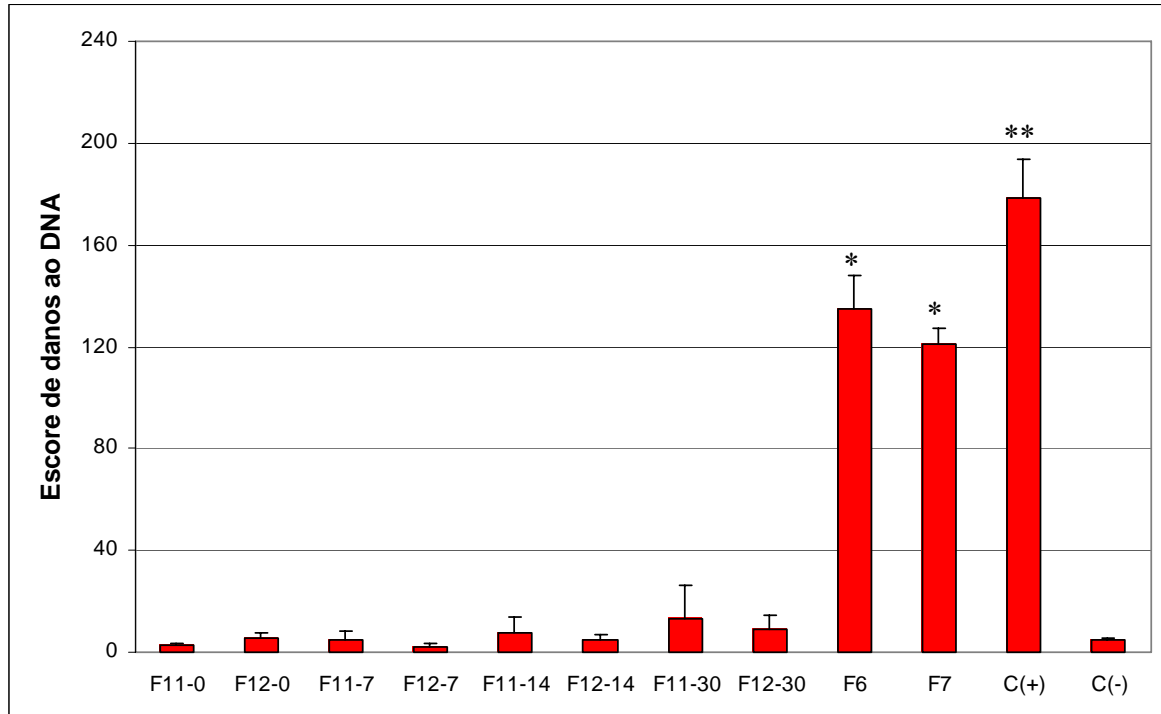


Figura 4: Resultados da avaliação da genotoxicidade das formulações F6, F7, e F11, F12 (íntactas e nos estágios de degradação de 7, 14 e 30 dias) frente às células VERO, tratadas com concentrações não citotóxicas das mesmas ($\leq CC_{50}$). No controle negativo, C(-), as células foram tratadas apenas com

meio, MEM, enquanto que no controle positivo, C(+), as mesmas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 100 μ M. Os resultados representam a média de três experimentos independentes \pm erro padrão da média.

Uma provável explicação para a maior genotoxicidade das nanopartículas das formulações F6 e F7 pode estar na diferença de tamanho quando comparada as demais formulações (F11 e F12). O menor tamanho das partículas das suspensões F6 e F7 poderia contribuir para que as mesmas atravessassem a bicamada lipídica, atingindo o citossol, e então interagissem com o material genético podendo provocar maiores danos no DNA, detectados pelo ensaio do Cometa. Contudo, não é necessária a penetração das partículas nas células para a observação de uma genotoxicidade significativa, pois mecanismos intensos de sinalização celular também podem desencadear danos no DNA. O estudo da localização das partículas, após o tratamento das células, poderia auxiliar na elucidação do mecanismo de interação com as células.

5. CONCLUSÕES

- O processo de autoclavagem foi adequado como método de esterilização, manteve a integridade física da amostra e permitiu a utilização de materiais não contaminados.
- As suspensões F11 e F12 não demonstraram citotoxicidade e genotoxicidade nas concentrações testadas ($\leq 500 \mu\text{g/mL}$).
- As concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) da suspensão F6, obtidas pelo ensaio colorimétrico do MTT, para as diferentes linhagens celulares, foram: $11,49 \pm 1,83 \mu\text{g/mL}$ (células VERO) e $11,59 \pm 0,84 \mu\text{g/mL}$ (células MA104). Para a suspensão F7, os valores de CC_{50} foram: $495,96 \pm 54,58 \mu\text{g/mL}$ (células VERO) e $330,94 \pm 32,78 \mu\text{g/mL}$ (células MA104).
- O Tween 80, como constituinte das nanopartículas da formulação F7, teve um comportamento citotóxico diferenciado de quando testado isoladamente, para células MA 104. Essa diferença não foi observada quando esse mesmo tratamento foi feito com células VERO. O Tween 80 apresentou concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) de $326,44 \pm 27,12 \mu\text{g/mL}$ (células VERO) e $267,61 \pm 68,82 \mu\text{g/mL}$ (células MA104), quando testado isoladamente.

- O SDS, como constituinte da nanopartícula, teve um comportamento citotóxico semelhante de quando testado isoladamente, tanto para células MA104 quanto para células VERO. O SDS apresentou concentrações citotóxicas a 50% (CC₅₀) de $47,95 \pm 3,37$ µg/mL (células VERO) e $45,15 \pm 7,74$ µg/mL (células MA), quando testado isoladamente.
- O poliol e o hexadecano não foram citotóxicos nas concentrações testadas (≤ 500 µg/mL).
- As suspensões F6 e F7 apresentaram ação genotóxica, avaliada através do Ensaio do Cometa, para as células VERO, nas concentrações equivalentes aos seus valores de CC₅₀.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E. G.; TICE, R.; WATER, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.
- ARAKI, Y.; ANDOH, A.; BAMBIA, H.; YOSHIKAWA, K.; DIO, H.; KOMAI, Y. HIGUCHI, A.; FUJIYAMA, Y. The cytotoxicity of hydrofobic bile acids in ameliorated by more hydrofilic bile acids in intestinal cell lines IEC-6 and Caco-2. **Oncology Reports**, v. 10, p. 1931-1936, 2003.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. **Applied & Environmental Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 2101-2103, 1991.
- BARILE, F. A. **Introduction to In Vitro Cytotoxicology: Mechanisms and Methods**. Florida: CRC, 1994. p. 48-57; 222.
- COLLINS, A. R.; AI-GO, M.; DUTCHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v. 336, p. 69-77, 1995.
- COLLINS, A. R.; DUSINSKA, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKA, M.; PETROVSKA, H. Comet assay in human biomonitoring studies: reability, validation, and applications. **Environmental and Mutagenesis**, v. 30, p. 139-146, 1997.
- COLLINS, A. R. The Comet Assay: Principles, Applications, and Limitations. In: DIDENKO, V. V. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, v. 203, 2002. p. 163-177.
- COMBES, R. D. Genotoxcity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24, p. 950-954, 1992.
- EECKMAN, F.; MÖES, A. J.; AMIGHI, K. Surfactant induced drug delivery based on the use of thermosensitive polymers. **Journal of Contolled Release**, v. 88, p. 105-116, 2003.
- EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.
- GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. Pratical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, v. 455, p. 21-28, 2000.
- GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (eds.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 247-279.

HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 703-710, 2004.

HARTMANN, A.; ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, R.; MARTUS, H. J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline Comet assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843-858, 2001.

HOFFMANN, F., CINATL, J. Jr.; KABICKOVÁ, H.; CINATL, J.; KREUTER, J.; STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, p. 189-198, 1997.

HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v. 11, n. 5-6, p. 217-232, 1989.

KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-wells plates. **Mutagenesis**, v. 17, p. 37-43, 2002.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, v. 3, n. 2, p. 103-15, 1995.

MCGREGOR, J. T.; CASCIANO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**, v. 455, p. 3-20, 2000.

MYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization that isolates nuclein for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (Comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mutation Reserach**, v. 418, p. 131-140, 1998a.

MULLER, R. H.; MAASEN, S.; WEYHERS, H.; MEHNERT, W. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and polomaxer 407. **Journal of Drug Target**, v. 4, p. 161-170, 1996.

NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Ed). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. p. 471-495.

OLIVE, P. L. The Comet Assay: An Overview of Techniques. In: DIDENKO, V. V. (Ed). **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, v. 203, 2002. p. 179-193.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n.123, p. 291-298, 1984.

O'SULLIVAN, S. M.; WOODS, J. A.; O'BRIEN, N. M. Use of Tween 40 and Tween 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (CaCo2) monolayers. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 757-764, 2004.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel eletrophoresis: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.

SILVA, J; HERRMANN, S. M.; HEUSER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZALES-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 941-947, 2002.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, p. 151-169, 2001.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3. ed. New York: Freeman, 1995, p. 850.

STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infection. **Advanced Cell Culture**, v. 1, p. 67-90, 1981.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 61-71, 1991.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel /Comet assay: guidelines for *in vitro* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (eds.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 247-279.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J. R. W. **Animal Cell Culture**. 3 ed. Oxford University, 2000. p. 175-219.

YIN, H.; TOO, H. P.; CHOW, G. M. The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. **Biomaterials**, v. 26, p. 5818-5826, 2005.

Use of Natural Monomer in the Synthesis of Nano- and Microparticles of Polyurethane by Suspension-Polyaddition Technique

Betina Zanetti-Ramos,^{*1} Valdir Soldi,¹ Elenara Lemos-Senna,² Redouane Borsali³

Summary: Polyurethane nano- and microparticles were synthesized by suspension-polyaddition technique, using aqueous polymerization medium. Castor oil, a vegetable triglyceride possessing hydroxyl groups was used as natural polyol and methylene diphenyl diisocyanate (MDI) as isocyanate. The levofloxacin, an antibacterial drug was used as model drug to measure the particles encapsulation efficiency. The effect of the addition of a second polyol, the poly(ethylene glycol) (PEG), and the stirring rate on the mean diameter and morphology of particles was also investigated. The poly(ethylene glycol) has an important effect in the reduction of particles size and their porosity. On the other hand, the poly(ethylene glycol) reduced the yield of encapsulation from 70% for the formulation without PEG to 20% for formulations with PEG. FTIR analysis confirmed the polyurethane formation. Dynamic light scattering study, transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) were used to determine the nanoparticles size and shape. Spectrofluorimetric analysis was used to detect the levofloxacin.

Keywords: castor oil; microparticles; poly(ethylene glycol); polyurethanes; suspension-polyaddition

Introduction

Many techniques for the micro- and nanoparticles preparation involve synthetic polymers such as poly(ethylene oxide), poly(lactic acid), chitosan using several methods of preparation. In this paper we use the technique of suspension-polyaddition to synthesize polyurethane's micro- and nanoparticles. Polyurethanes (PU) are present in many aspects of modern life. They represent a class of polymers that have found a widespread use

in medical, automotive and industrial fields.^[1] This polymer has been employed as biomaterials due to its excellent physical properties and relatively good biocompatibility. Polyurethanes are obtained from the polycondensation or polyaddition of diisocyanates (hard segments with $-N=C=O$ groups) and di- or polyols (soft segments with $-OH$ groups).^[2]

Efforts have been made to replace the expensive polyols with low cost natural vegetable oils or others derivatives in the production of urethane products. In this work, a natural vegetable oil, castor oil (CO), was used in the synthesis of polyurethane nano- and microparticles. Castor oil, a vegetable triglyceride possessing hydroxyl groups, extracted from *Ricinus communis* L. beans, appears to be a good polyol for the urethane synthesis. This oil contains 87–90% of ricinoleic acid (cis-12-hydroxyoctadec-9-enoic acid), the only common fatty acid bearing an OH group.

¹ Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (POLIMAT), Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química
E-mail: betina@ativanet.com.br

² Laboratório de Farmacotécnica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

³ Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO), UMR5629 CNRS/ENSCP. Université Bordeaux 1, 33607 Pessac, France

CO is thus one of the few almost pure natural glycerides. The other minor non-hydroxylated fatty acids include: linoleic (9,12-octadecanoic ~4%) oleic (9-octadecenoic ~3%), stearic (octadecanoic ~1%) and linolenic (9,12,15-octadecatrienoic ~0,3%) acids. The triol group is responsible for the crosslinking in the tridimensional polyaddition of CO with diisocyanates.^[3]

Degradability problems have incited researchers to investigate possible modification or production of chemically degradable polyurethanes. The results have shown that variations in the degradation patterns of polyurethanes are the results of the different properties of these polymers such as their topology and chemical composition.^[1] The polyurethane used in this study is interesting because it was synthesized with a natural monomer and its potentiality to degradation aspects will be examined.

In suspension polyaddition, the monomer phase (which contains the monomers) is suspended in an immiscible polymerization medium in the form of small droplets. The polymerization medium may be an aqueous or organic liquid, and may contain the stabilizer. Following the formation of the desired droplet suspension, the polyaddition reaction is allowed to proceed and the monomer droplets are directly converted to the corresponding polymer particles.^[4] In our case, the polymerization medium was water and it is a great advantage because it excludes the use of organic solvents. Polymerization in water is better for the environment, is more safe for many applications and the cost is low. The average size of particles produced by suspension polyaddition is controlled by stirring rate, type and concentration of stabilizer, volume ratio of the monomer to suspension medium and type of mixing.^[4] In this work, we have also observed an important effect in the reduction particles size when the poly(ethylene glycol) was added as second polyol in the reaction. This will be also discussed in this contribution.

Materials

The monomers, methylene diphenyl diisocyanate (MDI) was obtained from BAYER (Germany), castor oil (Kehl Ind. LTDA, Brazil), poly(ethylene glycol) (PEG 400, Vetec LTDA, Brazil), DABCO 120 Catalyst (Air Products, USA). Levofloxacin, the model drug, was obtained from Henrifarma LTDA, Brazil. The surfactants sorbitan monooleate (Span 80) and poly(oxyethylene)(20)-sorbitane monooleate (Tween 80) were obtained from Beraca LTDA, Brazil. The solvents were distilled and ultra-pure water (Milli Q filter systems – Millipore, USA).

Methods

Synthesis of Polyurethane Particles

Polyurethane nano- and microparticles were synthesized by suspension-polyaddition technique in two steps (Figure 1): in the first step, a monomer phase was constituted by methylene diphenyl diisocyanate (4 g), a natural polyol, castor oil (6 g), a catalyzer organo-metalic (0.1 g) and Span 80 (1 g) as a lipophilic surfactant. When levofloxacin was encapsulated, it was added in the monomer phase (500 mg). The polymerization medium was the same for all formulations and it was constituted by 200 mL of distilled water containing Tween 80 (1 g), a hydrophilic surfactant. We used two surfactants, a lipophilic in the monomer phase and other hydrophilic in the polymerization medium to guarantee the emulsion stability. One notes that Tween 80 and Span 80 are approved for use in specific food products and are generally recognized as safe. They are well tolerated upon oral administration and are practically non-irritating, possessing very low potential toxicity. The use of two surfactants in the synthesis of polyurethane nanocapsules by interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification was described by Bouchemal and collaborators.^[2]

In the second step, the monomer phase was suspended in the polymerization med-

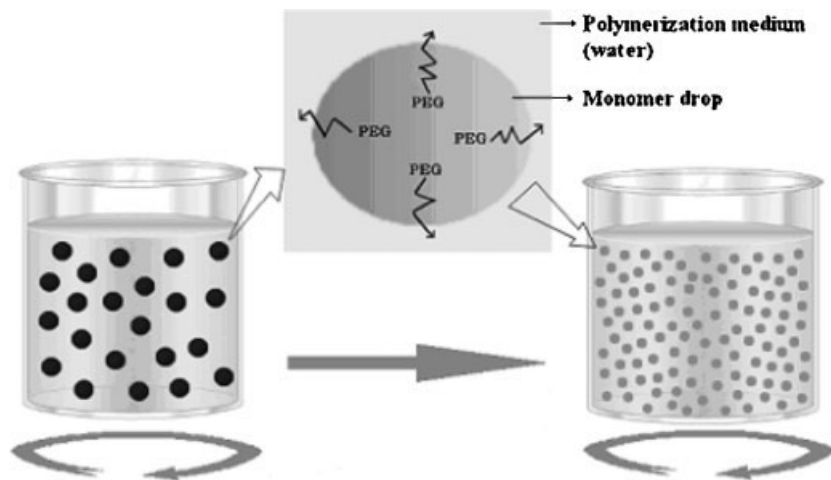


Figure 1.

Mechanism of particles preparation. Effect of poly(ethylene glycol) in the reduction of particles size.

ium under stirring at 1000 rpm (magnetic stirring), 12 000, 16 000 or 20 000 rpm (Dispensor Extratur[®]-Mod. Q252, Quimis, Brazil). The magnetic stirring of 1000 rpm was maintained during 3 h at room temperature in order to ensure the particles stability and formation.

The whole monomer concentration in the polymerization medium was 5% for all the tested formulation (about 10 g), MDI/Polyol (4:6). Also, the MDI to polyol ratio was

unchanged, but PEG 400 ($M_w = 400$) was added as a second polyol in suspension varying from 0 to 30% (w/w), in concentration.

After suspension, the polymerization was followed for 3 h at room temperature under stirring. The stirring rate used during the preparation of particles was 1000 rpm (magnetic stirring), 12 000, 16 000 and 20 000 rpm (Dispensor Extratur[®] stirring, for 5 min). The obtained formulations are listed in Table 1.

Table 1.

Composition, formulations parameters and yields of polyurethane particles.

| Formulation | Monomeric phase | Polymerization medium | PEG | Stirring rate | Yield |
|-------------|------------------------|-----------------------|-----|---------------|-------|
| | | | % | | % |
| F1 | MDI:Polyol (4:6) | Water + Tween 80 | 0 | 1000 | 94 |
| F2 | MDI:Polyol:PEG (4:5:1) | Water + Tween 80 | 10 | 1000 | 96 |
| F3 | MDI:Polyol:PEG (4:4:2) | Water + Tween 80 | 20 | 1000 | 95 |
| F4 | MDI:Polyol:PEG (4:3:3) | Water + Tween 80 | 30 | 1000 | 90 |
| F5 | MDI:Polyol (4:6) | Water + Tween 80 | 0 | 12 000 | 93 |
| F6 | MDI:Polyol:PEG (4:5:1) | Water + Tween 80 | 10 | 12 000 | 97 |
| F7 | MDI:Polyol:PEG (4:4:2) | Water + Tween 80 | 20 | 12 000 | 96 |
| F8 | MDI:Polyol:PEG (4:3:3) | Water + Tween 80 | 30 | 12 000 | 98 |
| F9 | MDI:Polyol (4:6) | Water + Tween 80 | 0 | 16 000 | 90 |
| F10 | MDI:Polyol:PEG (4:5:1) | Water + Tween 80 | 10 | 16 000 | 92 |
| F11 | MDI:Polyol:PEG (4:4:2) | Water + Tween 80 | 20 | 16 000 | 97 |
| F12 | MDI:Polyol:PEG (4:3:3) | Water + Tween 80 | 30 | 16 000 | 98 |
| F13 | MDI:Polyol (4:6) | Water + Tween 80 | 0 | 20 000 | 95 |
| F14 | MDI:Polyol:PEG (4:5:1) | Water + Tween 80 | 10 | 20 000 | 94 |
| F15 | MDI:Polyol:PEG (4:4:2) | Water + Tween 80 | 20 | 20 000 | 93 |
| F16 | MDI:Polyol:PEG (4:3:3) | Water + Tween 80 | 30 | 20 000 | 98 |

Characterization

Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR)

The polymer structure was confirmed by using Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) in the attenuated total reflection (ATR) mode. The suspension of particles was deposited on an ATR crystal to form film and spectra were recorded using a Bruker – Tensor 27 spectrometer.

Particle Size

The particle size distribution of the obtained particles was measured by laser granulometry in a CILAS 1064 Liquid equipment. The accessible range of size of this technique is from 0.04 to 500 μm . The nanoparticles fraction of formulation was measured in an aqueous suspension by Zetasizer 1000/3000 (Malvern) and by dynamic laser light scattering (ALV-5000).

Dynamic Light Scattering

The samples solutions were prepared at high dilution of formulation (generally 40 times) in Millipore water. To eliminate dust and other large particles, all samples were further filtered on 0.2 μm cellulose filters prior to measurements.

The scattering measurements were performed at the temperature of 25 ± 0.1 °C using an ALV apparatus equipped with an automatic goniometric table, a digital rate-meter and a temperature controlled sample cell. The scattered light was measured at different angles in the range of 60° at 120° corresponding to $1.96 \times 10^{-3} < q$ (\AA^{-1}) $< 3.3 \times 10^{-3}$ where $q = (4\pi n/\lambda_0)\sin(\theta/2)$; θ is the scattering angle, and n is the refractive index of the medium ($n = 1.33$). The full homodyne autocorrelation functions of the scattered intensity were obtained using the ALV-5000 autocorrelator. The intermediate dynamic scattering function $I(q, t)$ is related to the measured homodyne intensity-intensity time correlation function by the Siegert relation:^[5]

$$G^2(q, t) = B[1 + \alpha|I(q, t)|^2]$$

where B is the baseline and α is the spatial coherence factor, which depends on the geometry of the detection and the ratio of the intensity, scattered by the particle to that scattered by the solvent. For a Brownian motion, the autocorrelation function is generally described by a single relaxation, i.e., $I(q, t) \sim e^{-\Gamma t}$. Γ is the relaxation frequency ($1/\tau$) and is related to the diffusion coefficient D by the relation $\Gamma = Dq^2$. The autocorrelation function of the scattered intensity was analyzed by means of the cumulant method and CONTIN analysis to yield the effective diffusion coefficient and the corresponding size $R = (k_B T/6\pi\eta D)$ where $k_B T$ is the Boltzmann energy and η is the viscosity of the medium.

Particles Morphology

The shape, morphology and internal structure of microparticles were investigated by scanning electron microscopy (SEM) with a Philips XL 30 Microscopy at an accelerating voltage of 20 kV. The microparticles were fixed on a double stick tape in aluminum stubs and coated with gold.

The shape and the morphology of the nanoparticles fraction were also visualized by transmission electron microscopy (TEM) in a Jeol–JEM–2000FX equipment, 200 kV. The samples were prepared by placing a drop of preparation on a collodion support on copper grids.^[6]

Encapsulation Efficiency

In an attempt to determinate the encapsulation capacity of this systems, four formulations (F10, F11, F12 and F13) were chosen to encapsulate the levofloxacin, an antibacterial drug fluorescent, used as a model in this study. In solid form, levofloxacin is an odorless, white to yellow, crystallized powder with a melting point of 228.6 °C.^[7] For encapsulation, the levofloxacin was added in the monomeric phase during the polyurethane particles synthesis.

The yield encapsulation was considered as the difference between the amount added in the formulation and the amount found in the supernatant after ultra centrifugation at 50 000 rpm for 2 h at 20 °C in a

Beckman–Optima™ TLX. The yield of encapsulation (Y) was calculated as follow:

$$Y = 100 - \left(\frac{C_s}{C_t} \times 100 \right)$$

where C_s is the levofloxacin concentration found in supernatant after ultracentrifugation and C_t is the levofloxacin concentration added in the formulation.

Spectrofluorimetric Analysis

High-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection has been used for the analysis of levofloxacin in pharmaceutical applications. However, in this study, we have chosen the spectrofluorimetric detection because it is less complex, faster, organic solvents free and have good accuracy in the detection.^[7]

Fluorescence intensity was measured using a Safas Monaco spectrometer. All the measurements took place in a plastic cell with 10 nm bandwidths for the emission and excitation monochromators.

The levofloxacin did not show the linear correlation between concentration and fluorescence intensity for all concentrations and therefore it was very important to determinate the linear range of concentration for the calibration curve.

Stock standard solution of $400 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ was prepared dissolving levofloxacin in a mixture of high pure water and ethanol (97:3). A sample of $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ was prepared by dilution of stock standard solution with high pure water. The calibration graph of fluorescence intensity vs levofloxacin concentration expressed in $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ was found to be linear in the range 0.1–10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, at pH=7 and 25 °C. The fluorescence was measured at 450 nm using an excitation wavelength of 350 nm against a blank solution. The pH was measured on a Metiler Toledo MP120 pH-meter.

Results and Discussion

Suspension-Polyaddition Reaction and Particle Characterization

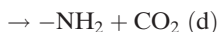
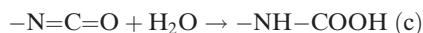
PU aqueous suspension was prepared in two steps by the suspension-polyaddition

technique. The polymerization reaction can be briefly described as follows.^[8] In the first reaction (1), isocyanate groups (a) react with hydroxyl groups of castor oil or PEG 400 (b) to form the PU chains. In a secondary reaction (2), isocyanate groups can react with water by diisocyanate diffusion to the aqueous phase forming an amino acid group (c), which is unstable and dissociates into a chain with amine end-group and carbon dioxide (d). The carbon dioxide formation in this reaction contributes significantly to the porosity of microspheres.^[8]

Polymerization reaction by polyurethane formation (1)



Secondary Reaction, Isocyanate Groups React with Water (2)



The completion of polyaddition reaction between MDI and polyol or MDI and polyol/PEG400 was confirmed by ATR-FTIR analysis. ATR-FTIR spectra of polyurethane particles are presented in Figure 2. A strong absorption band with peak location at 2272 cm^{-1} , due to $\text{N}=\text{C}=\text{O}$ stretching vibration of the isocyanate groups, was used to identify MDI. A comparison of IR spectra of the reactants and the resulting products shows the disappearance the isocyanate group after the reaction (peak at 2272 cm^{-1}). The amide vibration at 3300 cm^{-1} , the carbonyl vibration at 1729 cm^{-1} and the C–N vibration at 1534 cm^{-1} are strong evidence

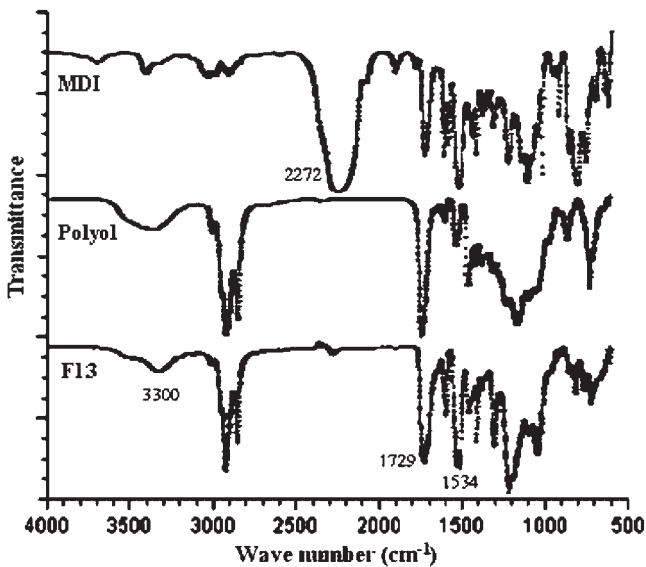


Figure 2.

ATR-FTIR absorption spectra of the MDI, polyol (castor oil) and polyurethane particles (F13) prepared by suspension-polyaddition technique.

for the formation of a polyurethane particles.

Particle Size Distribution

Analysis by Laser Granulometry

The formulations were analyzed by laser granulometry and the results are listed on Table 2.

Formulations F1, F5 and F9, that do not contain PEG, showed particles with size

larger than 500 μm , and were not analyzed by this technique.

This table shows that the particles of polyurethane prepared by suspension-polyaddition technique have a large size distribution. There are micro- and nano-particles in the same formulation.

The average size of the polyurethane particles produced by suspension-polyaddition technique can be controlled by, among other factors, the type and concentration of

Table 2.

Laser granulometry results.

| Formulation | Diameter at 50% | Diameter at 90% | Average diameter | Size range |
|-------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------|
| | μm | μm | μm | μm |
| F2 | 45.4 | 142.1 | 64 | 0.07–400 |
| F3 | 96.6 | 228.6 | 110 | 0.04–400 |
| F4 | 83.0 | 227.8 | 103.9 | 0.04–400 |
| F6 | 77.8 | 142.1 | 79.5 | 0.04–240 |
| F7 | 45.1 | 89.2 | 48.4 | 0.20–140 |
| F8 | 22.3 | 79.2 | 32.7 | 0.04–140 |
| F10 | 16.5 | 40.0 | 19.3 | 0.04–71 |
| F11 | 2.6 | 13.7 | 5.4 | 0.04–45 |
| F12 | 3.5 | 14.4 | 5.3 | 0.04–36 |
| F13 | 27.8 | 138.5 | 52.4 | 0.07–300 |
| F14 | 51.7 | 108.3 | 55.7 | 0.07–180 |
| F15 | 26.4 | 77.6 | 34.4 | 0.04–140 |
| F16 | 12.3 | 60.0 | 22.9 | 0.04–112 |

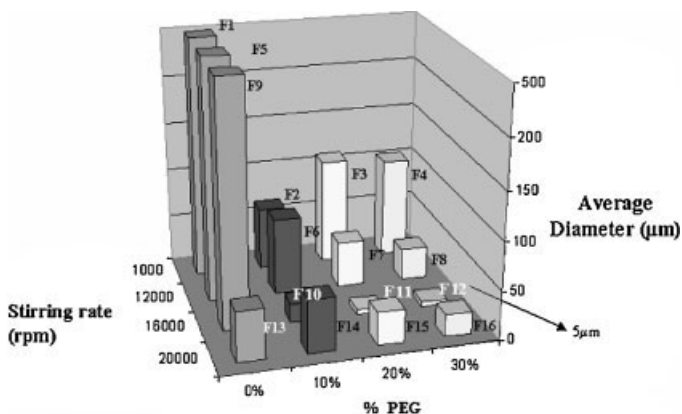


Figure 3. Effect of stirring rate and addition of poly(ethylene glycol) on the average diameter of polyurethane particles.

stabilizer, volume ratio of the monomer to polymerization medium, and the stirring rate.^[4]

In this work, we will show that the particle size can be also modulated by the addition of PEG in the monomer phase. The addition of increasing amounts of PEG reduced significantly the mean diameter of particles from 400 to 5 μm (Figure 3). It is also shown that the increasing of stirring rate contributes to particle size reduction. However, when PEG was not added to the formulations, a stirring rate of 20 000 rpm was needed to obtain particles presenting sizes around 50 μm .

This effect is related to the nature of PEG. The PEG is a hydrophilic polymer and it has a tendency to diffuse in aqueous phase (polymerization medium) breaking the monomer drops and therefore reducing the size of the particles.

The best formulations, those with smaller size particles, were chosen for the next studies.

These formulations are: (i) F10 made with 10% of PEG 400 and 16 000 rpm stirring rate, (ii) F11 made with 20% of PEG and 16 000 rpm, (iii) F12 made with 30% of PEG and (iv) 16 000 rpm and F13 made without addition of PEG and 20 000 rpm.

The stirring rate of 16 000 rpm was the more efficient in the production of nanoparticles. When the PEG was not added in to formulation, a stirring rate equal to 20 000 rpm was needed to reduce the particles size. The stirring rate is as important parameter in the microparticles preparations using several techniques and normally, the size particle is reduced with the increase of stirring rate.^[9]

Light Scattering Technique

A sample of F10, F11, F12 and F13 with and without levofloxacin was diluted 40 times and filtered using membrane filters with 0.22 μm of porous. Table 3 shows the mean diameter of nanoparticles and polydispers-

Table 3. Mean diameter and polydispersity index of particles using Zetasizer.

| Formulation | Without levofloxacin | | With levofloxacin | |
|------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| | Average diameter | Polydispersity index | Average diameter | Polydispersity index |
| | nm | | nm | |
| F10 (MDI:P:PEG, 4:5:1) | 93.4 \pm 2.40 | 0.430 \pm 0.06 | 106.5 \pm 0.7 | 0.447 \pm 0.01 |
| F11 (MDI:P:PEG, 4:4:2) | 84.9 \pm 0.60 | 0.441 \pm 0.02 | 110.5 \pm 0.20 | 0.368 \pm 0.02 |
| F12 (MDI:P:PEG, 4:3:3) | 123.8 \pm 1.20 | 0.258 \pm 0.03 | 115.1 \pm 1.00 | 0.272 \pm 0.09 |
| F13 (MDI:P, 4:6) | 130.3 \pm 0.60 | 0.278 \pm 0.03 | 109.5 \pm 2.10 | 0.354 \pm 0.02 |

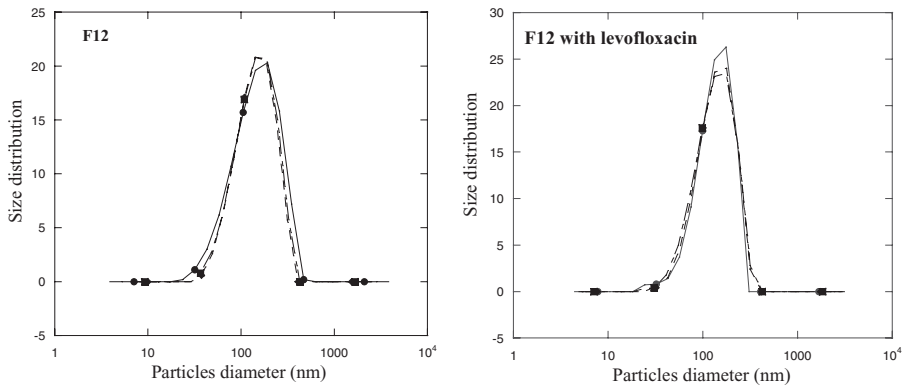


Figure 4.
Particles diameter of F12 nanoparticles with and without levofloxacin.

sity index of the formulations obtained using Zetasizer at 90° .

The addition of levofloxacin appears not to affect the particle sizes. Figure 4 shows the F12 and F12 with levofloxacin obtained using Malvern. All measures were made three times.

To go further in the analysis we have chosen the formulation prepared from 30% of PEG and stirring rate of 16 000 rpm to carry out dynamic light scattering at different scattering angles. The particle suspension was filtered through a $0.22\ \mu\text{m}$ cellulose membrane. Measurements were

carried out at angles of 60° and above, to minimize the possible influence of dust particles that may have survived the filtration process.

The filtered suspension showed hydrodynamic radii around 12 and 70 nm, which confirm the presence of a fraction of nanoparticles in the formulation (Figure 5). These results are in very good agreement with these obtained using Zetasizer.

A typical autocorrelation function obtained at scattering angle $\theta = 60^\circ$, 90° and 120° is displayed in Figure 6. The dots

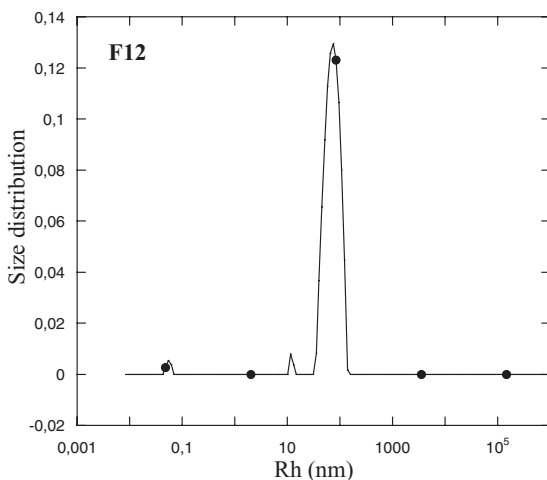


Figure 5.
Hydrodynamic radius (nm) of polyurethane nanoparticles.

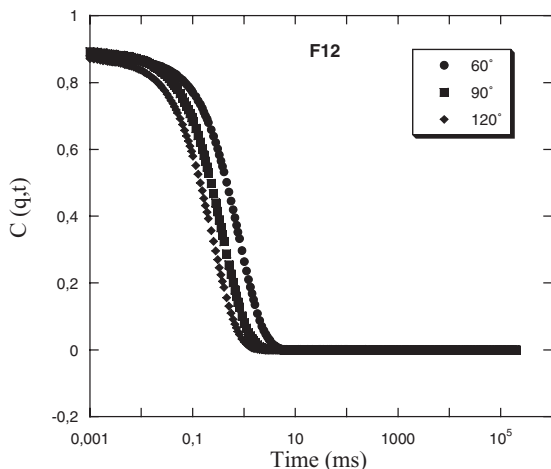


Figure 6.

Typical autocorrelation function measured at 25 °C at $\theta = 60^\circ$, 90° and 120° .

represent the experimental data. This Figure shows that the autocorrelations functions are essentially represented by a single exponential decay.

The angular variation of these frequencies $\Gamma = 1/\tau_c$ measured shows a q^2 behavior indicating a diffusive motion.^[10] Figure 7 illustrates this linear behavior where it is plotted Γ vs q^2 .

Morphology Analysis

Microparticles Morphology

The shape, morphology and internal structure of PU microspheres were investigated

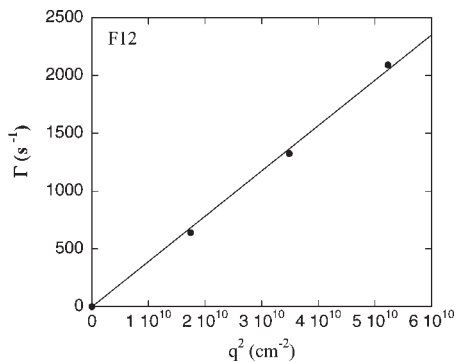


Figure 7.

Γ vs q^2 for F12 formulation.

using SEM. The micrographs obtained by SEM from polyurethane microparticles prepared from 0 and 10% of PEG 400 are visualized in Figure 8(a) and (b), respectively. Spherical particles were obtained in both formulations, and the porosity of particles is increased as the PEG is added in the monomer phase. Poly-(ethylene glycol) acts as porous former in the polymeric matrix. This has an important effect in controlling the release rate of active agents encapsulated in the particles.^[13] The porous formation in PU microparticles can be attributed the CO_2 formation during PU synthesis reaction.^[8] However, in our study, the formulation F13, prepared without PEG addition did not show any porosity and this can be a strong evidence that the PEG is responsible for porous particles. In the literature, the formation of carbon dioxide in the PU synthesis by the reaction between isocyanate and water contributes significantly to the porosity of microspheres.^[8] In this work, the absence of porosity in PU particles prepared without PEG (F13) did not show any evidence of secondary reaction between isocyanate and water [see Figure 8(a)].

Figure 9 shows the F12 formulation, prepared with 30% PEG 400, stirring rate

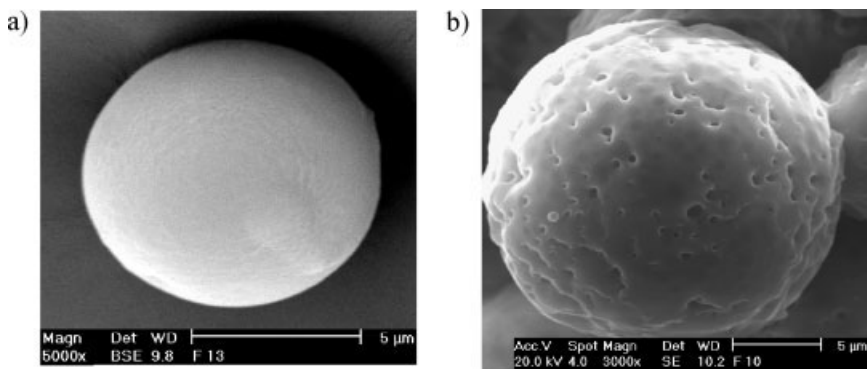


Figure 8.

Scanning electronic micrographs of polyurethane microparticles obtained with (a) 0% PEG and stirring rate of 20 000 rpm and (b) 10% PEG and stirring rate of 16 000 rpm.

16 000 rpm and levofloxacin. The microparticles were transversally sectioned and the internal structure reveals the levofloxacin crystals encapsulated into the particles.

Nanoparticles Morphology

The supernatant of formulations was diluted and analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The samples were prepared as described in 3.3.3. Figure 10 shows the TEM micrograph of the F12 formulation.

The TEM micrographs reveal that nanoparticles fraction of F12 formulation is also constituted by spherical particles (a). Figure 10(b) shows that polydispersity. This observation is in agreement in the size with

laser granulometry results that showed that the formulations of polyurethane prepared by suspension-polyaddition technique have a large size distribution.

Encapsulation Efficiency

The better formulations F10, F11, F12 and F13 were also chosen to encapsulate levofloxacin. The levofloxacin was added in the monomer phase during the synthesis procedure.

The evaluation of drug loading in the particles needed to examine particles with and without levofloxacin. The separation technique most widely used by researchers is ultracentrifugation.^[11,12] The formulations containing levofloxacin was ultracentrifuged and the levofloxacin non-encapsulated into the particles was studied by fluorescence spectroscopy as described in 3.3.4 and 3.3.5.

The calibration graph of fluorescence intensity (Y) vs levofloxacin concentration (X) expressed in $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ is shown in Figure 11.

Table 4 shows the encapsulation efficiency of PU particles synthesized by suspension-polyaddition.

Table 4 shows the interesting effect of the encapsulation efficiency reduction as a function of poly(ethylene glycol) addition. The formulation F13 constituted by MDI and polyol (castor oil) showed yield of encapsulation near 70%. When the PEG

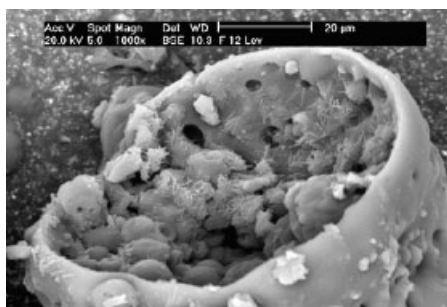


Figure 9.

SEM micrograph of a microsphere prepared with 30% PEG 400, stirring rate of 16 000 rpm (F12) containing levofloxacin. Magnification of 1 000 \times .

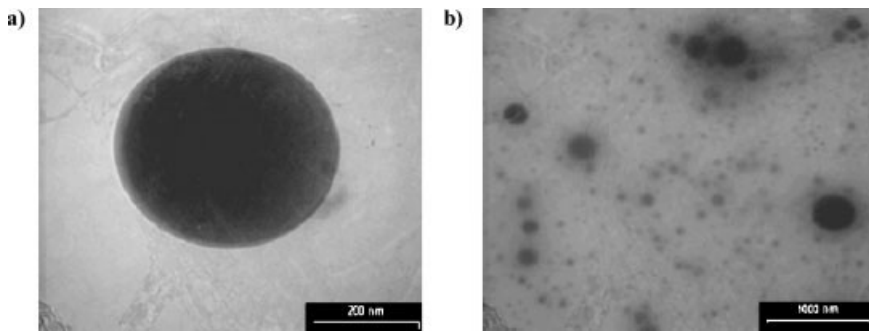


Figure 10.

TEM micrographs of F12 formulation. (a) scale corresponds to 200 nm, (b) scale corresponds to 1000 nm.

400 was added as second polyol in the formulation F10, F11 and F12, the yield of encapsulation was reduced to 20%.

This phenomena was observed in our other study^[13] and can be explained by the fact that poly(ethylene glycol) can act as co-solvent that increases the solubility of levofloxacin and contributes for its partition in aqueous phase (polymerization medium) and consequently reducing the encapsulation efficiency.

Conclusion

Micro- and nanoparticles of polyurethane based on natural polyol, castor oil, were synthesized by suspension polyaddition technique, using poly(ethylene glycol) as second polyol, Tween 80 and Span 80 as

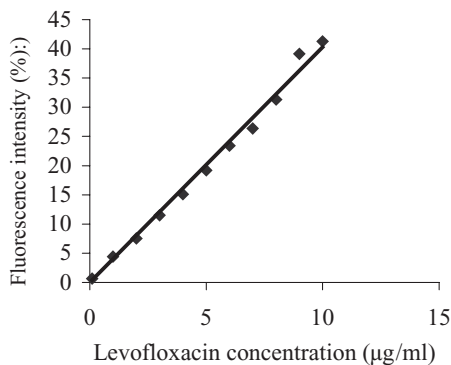


Figure 11.

Calibration graph of levofloxacin.

Table 4.

Encapsulation efficiency of polyurethane particles.

| Formulation | Levofloxacin in supernatant | Encapsulation efficiency |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| | % | % |
| F13 (MDI:P, 4:6) | 31.16 | 68.84 |
| F10 (MDI:P:PEG, 4:5:1) | 80.56 | 19.44 |
| F11 (MDI:P:PEG, 4:4:2) | 78.64 | 21.36 |
| F12 (MDI:P:PEG, 4:3:3) | 79.36 | 20.64 |

surfactants and water as polymerization medium. The advantage of this method was the not-use of organic solvents and the use of castor oil as polyol.

The nanoparticles formation was confirmed by ATR-FTIR analysis. The absence of isocyanate absorption band at 2300 cm^{-1} confirms that isocyanate groups reacted. Microscopy analysis shows spherical and porous microparticles (SEM) also observed by TEM and quantified in solution using dynamic light scattering.

Important effects were associated with PEG addition. We observed that poly(ethylene glycol) reduces the particles size and increases the porosity of the particles. This effect is related with its hydrophilic nature and tendency to migrate to aqueous phase. However, the PEG addition is responsible also for the reduction in the particles encapsulation efficiency. PEG acts as co-solvent for the levofloxacin, contributing for its partition in aqueous phase (polymerization medium) and consequently reducing the encapsulation efficiency of the particles.

Studies of enzymatic degradation of these formulations are in progress and the potentiality for degradation will be described in a forthcoming paper.

Acknowledgements: This work was supported by the Alban Program, the European Union Program of High Level Scholarships for Latin America, n. E04D044566B, CAPES/Brasil and Rede Nanobiotec/CNPq/Brasil.

- [1] G. T. Howard, *Int. Biodet. Biodegrad.* **2002**, 49, 245.
- [2] K. Bouchemal, S. Briançon, E. Perrier, H. Fessi, I. Bonnet, N. Zydowicz, *Int. J. Pharm.* **2004**, 269, 89.
- [3] N. B. Trãn, J. Vialle, Q. T. Pham, *Polymer* **1997**, 38, 2467.
- [4] R. Arshady, M. H. George, *Polymer Eng. Sci.* **1993**, 33(14), 865.
- [5] B. Chu, “*Laser Light Scattering. Basic Principles and Practice*”, 2nd edition, Academic Press, San Diego 1991.
- [6] A. Malaiya, S. P. Vyas, *J. Microencapsul.* **1998**, 5, 243.
- [7] J. A. O. Gonzalez, M. C. Mochon, F. J. B. Rosa, *Talanta* **2000**, 52, 1149.
- [8] E. Jabbari, M. Khakpour, *Biomaterials* **2000**, 21, 2073.
- [9] P. J. Watts, M. C. Davies, C. D. Melia, *Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* **1990**, 7(3), 235.
- [10] R. Pecora, “*Dynamic Light Scattering*”, Plenum Press, New York 1985.
- [11] M. J. Alonso, C. Losa, P. Calvo, J. L. Vila Jato, *Int. J. Pharm.* **1991**, 68, 69.
- [12] E. Fattal, M. Youssef, P. Couvreur, N. Ammoury, S. Benita, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, 33, 1540.
- [13] B. G. Zanetti, V. Soldi, E. Lemos-Senna, *Brazilian J. Pharmaceut. Sci.* **2002**, 38(2), 229.