



UNICAMP

PRISCILA SOARES COSTA SACCHETIN

**“PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS POR
TECNOLOGIA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS PARA APLICAÇÃO
COMO VEÍCULO NA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 17 α -
METILTESTOSTERONA PARA TILÁPIAS DO NILO”**

Campinas

2012



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

PRISCILA SOARES COSTA SACCHETIN

**“PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS POR
TECNOLOGIA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS PARA APLICAÇÃO
COMO VEÍCULO NA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 17 α -
METILTESTOSTERONA PARA TILÁPIAS DO NILO”**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA PRISCILA SOARES COSTA SACCHETIN
E ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a ÂNGELA MARIA MORAES**

Assinatura da Orientadora:

Campinas

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

Sa14p Sacchetin, Priscila Soares Costa
Produção de micropartículas poliméricas por tecnologia de fluidos supercríticos para aplicação como veículo na administração oral de 17α -metiltestosterona para tilápias do nilo / Priscila Soares Costa Sacchetin. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Coorientador: Paulo de Tarso Vieira e Rosa.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fluido supercrítico. 2. Tecnologia de liberação controlada. 3. Tilápia do Nilo. 4. Polímeros. I. Moraes, Ângela Maria, 1966-. II. Rosa, Paulo de Tarso Vieira e, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Production of polymeric microparticles by supercritical fluid technology for application as vehicle for oral administration of 17α -methyltestosterone to Nile tilapia

Palavras-chave em Inglês: Supercritical fluids, Controlled release technology, Nile tilapia, Polymers

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Ângela Maria Moraes, Ana Rita Morales, Flávio Faria de Moraes, Julian Martínez, Silvia Helena Prado Bettini

Data da defesa: 13-11-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

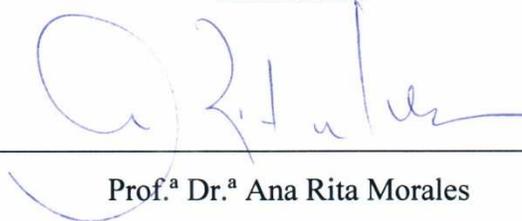
Folha de Aprovação

Tese de Doutorado defendida por Priscila Soares Costa Sacchetin e aprovada em 13 de novembro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.ª Dr.ª Ângela Maria Moraes

Orientadora



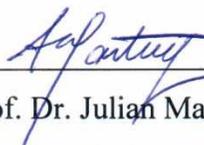
Prof.ª Dr.ª Ana Rita Morales

Titular



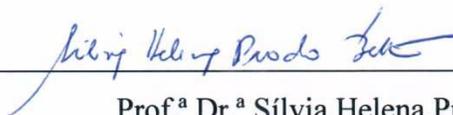
Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes

Titular



Prof. Dr. Julian Martínez

Titular



Prof.ª Dr.ª Sílvia Helena Prado Bettini

Titular

Ao meu amado esposo.

“Sex is the queen of problems in evolutionary biology. Perhaps no other natural phenomenon has aroused so much interest; certainly none has sowed as much confusion.”

The Masterpiece of Nature

Graham Bell 1982

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora Prof. Dra. Ângela Maria Moraes que foi grande responsável por desenvolver o meu interesse científico e por colaborar grandemente para meu crescimento profissional nestes últimos anos. Também gostaria de agradecer ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa que prontamente se disponibilizou a ajudar a desenvolver o projeto que levou à tese de doutorado, sempre fornecendo ricas observações e auxílio nos momentos mais críticos.

Ao Instituto de Química que permitiu que o projeto fosse desenvolvido em suas instalações, fornecendo parte da estrutura física e material usado durante a formação de partículas. À todos os membros da equipe do laboratório LTS do Instituto de Química, que sempre partilharam suas observações, ajuda e torcida quanto ao desenvolvimento do trabalho. Agradecimentos especiais à Izumi Minguini que é certamente um dos melhores investimentos atuais do laboratório. Às companheiras de bancada Fernanda Barbosa, Mara Fukunaga e Julie Katherine Rodríguez. À Rafaela Setti pela importante colaboração no trabalho. À toda equipe da responsável pelos ensaios instrumentais realizados no Instituto de Química da Unicamp, em especial Cláudia Martelli, Fabiana Favaretto, Raquel Miller, Rita Souza e Daniel Razzo e Ricardo Pereira. Ao Lourival Pimpim, que sempre prontamente providenciou os gases usados no decorrer do trabalho.

Aos colegas e amigos dos laboratórios LEBC, LIMbio e LEBp da Faculdade de Engenharia Química, por todo apoio, colaboração e amizade. Especial agradecimento à Prof. Dra. Sônia Maria Alves Bueno, ao Prof. Dr. Everson Alves Miranda, à Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana que gentilmente cederam suas instalações e equipamentos, que mostraram-se essenciais durante todo o percurso do trabalho. Ao Gilson Maia Júnior pela importante ajuda dispensada. Agradecimentos especiais aos Prof. Dr. Arthur Francesconi que gentilmente cedeu as instalações de seu laboratório. Tal gesto possibilitou grande parte da realização deste trabalho. À toda equipe do LRAC da FEQ, pela atenção e cuidado dispensado na realização das análises constantes deste trabalho.

Aos meus amados pais, por todo amor e todas as oportunidades que me forneceram na vida. Às minhas irmãs, por toda compreensão. À minha tia Jane Costa, por todo incentivo. À minha avó Nina, por todas as orações. Ao meu querido esposo Marcelo Sacchetin que me apoiou nesta caminhada, sem soltar minha mão um segundo sequer.

À Deus por permitir que mais esta etapa na minha vida profissional e pessoal fosse cumprida e, por se mostrar fiel em todos os momentos, me abençoando, de modo que pudesse ter o imenso privilégio de ver e conhecer coisas novas.

Por fim, à FAPESP pelo incentivo na forma da bolsa de doutorado e respectiva reserva técnica e ao CNPq e CAPES pelo importante apoio financeiro, indispensáveis à realização deste trabalho.

RESUMO

No presente trabalho propôs-se a formação de carreadores orais compostos pelos polímeros sintéticos PLA (poli(L-ácido láctico)), PLGA (poli(50/50 DL-ácido láctico-co-glicólico)) e PCL (policaprolactona) para a construção de sistemas de liberação controlada de 17α -metiltestosterona (MT) pelo método de precipitação das soluções pelo uso de CO_2 supercrítico como antisolvente. A influência da pressão, da concentração hormonal, dos polímeros e da vazão da solução polimérica foi analisada. Partículas de PLA com diâmetros entre 5,4 a 20,5 μm foram eficientemente produzidas, observando-se que o aumento na concentração da solução polimérica foi capaz de produzir partículas menores e que o aumento da vazão de solução polimérica resultou em aumento no tamanho das partículas produzidas. Não foram observados efeitos sobre a morfologia e distribuição de tamanhos das partículas com a variação da pressão. Notaram-se também nas partículas de PLA mudanças nas características mecânicas e físicas do polímero, como a redução da temperatura de transição vítrea do polímero. A produção de partículas de PLA na presença de MT resultou em aumento no tamanho médio e alterações nas características morfológicas superficiais das partículas. Praticamente não se observaram alterações na temperatura de transição vítrea e de fusão das partículas quando estas foram produzidas na presença de MT. As análises de potencial zeta das partículas mostraram que estas possuem forte tendência à floculação. Obtiveram-se também partículas de PLA/PCL a partir da mistura destes polímeros a razões de 1/9 a 1/1 m/m. Altas concentrações de PCL provocaram aumento no diâmetro médio das partículas, que se mostraram mais agregadas e rugosas. A eficiência de incorporação de MT nestas partículas variou de 25,6 a 64%. Verificou-se a alteração do comportamento térmico das partículas quando altas concentrações de MT foram empregadas, notando-se a formação de estruturas mais amorfas. As partículas de PLA/PLC não se mostraram estáveis quando submetidas aos ensaios de potencial zeta. Partículas de PLA/PLGA foram também produzidas, apresentando diâmetros médios que variaram de 23 a 98 μm . A eficiência de incorporação de MT foi igualmente ampla, entre 41 a 90%. A cristalinidade das partículas foi afetada pelo processo, sendo que a presença de MT levou à formação de estruturas mais amorfas e porosas. A cinética de liberação da MT foi analisada *in vitro* pela exposição das partículas a soluções com diferentes valores de pH. As menores taxas de liberação foram obtidas para as partículas de PLA, enquanto as partículas de PLA/PCL e PLA/PLGA produziram comportamentos similares entre si. Observou-se que a quantidade de partículas teoricamente necessárias durante o tratamento de reversão sexual de tilápias do Nilo variou conforme a composição dos dispositivos, sendo estes valores entre 34 a 88 g de partículas/kg de ração.

Palavras-chave: PLA, PCL, PLGA, 17α -metiltestosterona, tilápia do Nilo, micropartículas, liberação controlada, CO_2 , fluido supercrítico, SAS.

ABSTRACT

In this work, the aim was to produce oral carriers consisting of the synthetic polymers PLA (poly(L-lactic acid)), PLGA (poly(50/50 DL-lactide-co-glycolide)) and PCL (polycaprolactone) by the precipitation of the polymer solutions using supercritical CO₂ as an antisolvent for the controlled release of 17 α -methyltestosterone (MT). The influence of pressure, hormone and polymers concentration, as well as of the flow rate of the polymer solution on the formation of these devices was analyzed. PLA particles with diameters between 5.4 to 20.5 μ m were efficiently produced; increases in the concentration of the polymer solution resulted in smaller particles, while increasing the flow rate of polymer solution caused an increase in particle mean diameter. No significant effects on morphology and size distribution of the particles were observed with pressure variation. Changes in the mechanical and physical characteristics of the PLA particles were also noticed, as reduction in the glass transition temperature of the polymer. PLA particles prepared in the presence of MT showed larger average diameters and changes in surface morphology. The presence of MT did not result in changes of the glass transition and fusion temperatures of the particles. Zeta potential analyzes showed that the particles have a strong tendency to flocculate when exposed to aqueous solutions. PLA/PCL particles were obtained from the mixture of these polymers at ratios from 1/9 to 1/1 w/w. High concentrations of PCL caused increased formation of particles with greater mean diameters, which were rougher and had a higher tendency to aggregate. The incorporation efficiency of MT ranged from 25.6 to 64%, accompanied by an increase in mean diameter. Changes in the thermal behavior of the particles were observed when high concentrations of MT were used, which led to the formation of more amorphous structures. PLA/PLC particles were not stable when subjected to tests of zeta potential. PLA/PLGA particles were also produced, with mean diameters ranging from 23 to 98 μ m. The incorporation efficiency of MT was also broad, varying from 41 to 90%. The process affected the crystallinity of the particles, and the presence of MT led to more amorphous and porous structures. The behavior of the PLA, PLA/PCL and PLA/PLGA particles regarding the *in vitro* release kinetics of MT was analyzed through exposure of the obtained systems to different pH conditions. The lowest release rates were observed for PLA particles, while the PLA/PCL and PLA/PLGA particles showed similar performances. It was observed that the theoretical amount of particles needed for the sex reversal treatment of tilapia varied according to the composition of the devices (polymer type and ratio, as well the quantity of MT). Depending on the device, the daily required amounts of particles can vary between 34-88 g particles/kg of fish feed.

Keywords: PLA, PCL, PLGA, 17 α -methyltestosterone, Nile tilapia, microparticles, controlled release, CO₂, supercritical fluid, SAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	1
1.2. OBJETIVO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA DE TILÁPIAS DO NILO EM CATIVEIRO.....	5
2.2. DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DE PEIXES POR ADMINISTRAÇÃO DE HORMÔNIOS	8
2.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE AGENTES ATIVOS.....	14
2.3.1. <i>Emprego de dispositivos particulados poliméricos na liberação de agentes ativos</i>	16
2.3.2. <i>Poli(ácido lático)</i>	24
2.3.3. <i>Poli(ácido lático-co-glicólico)</i>	30
2.3.4. <i>Poli(ϵ-caprolactona)</i>	35
2.4. METODOLOGIAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE DISPOSITIVOS PARTICULADOS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE AGENTES ATIVOS	40
2.4.1.1. Uso do fluido supercrítico como solvente.....	48
2.4.1.2. Uso do fluido supercrítico como soluto	52
2.4.1.3. Uso do fluido supercrítico como anti-solvente	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1. MATERIAIS.....	65
3.2. MÉTODOS.....	65
3.2.1. <i>Preparação das Partículas</i>	67
3.2.2. <i>Ensaio para estudo do efeito das condições operacionais na formação de partículas</i>	69
3.2.3. <i>Formação de partículas de PLA</i>	69
3.2.3.1. Análise da influência das diferentes variáveis de processo sobre a formação, morfologia distribuição de tamanhos e diâmetro médio das partículas de PLA	70
3.2.3.2. Incorporação de 17 α -metiltestosterona em partículas de PLA	71

3.2.4. Formação de partículas de PLA/PCL.....	71
3.2.4.1. Obtenção de partículas de PLA/PCL livres de MT.....	71
3.2.4.2. Incorporação de 17 α -metiltestosterona nas partículas de PLA/PCL.....	71
3.2.5. Formação de partículas de PLA/PLGA contendo ou não 17 α -metiltestosterona	
72	
3.2.6. Caracterização das Partículas.....	73
3.2.6.1. Morfologia.....	73
3.2.6.2. Determinação da distribuição de tamanhos e dos diâmetros médios das partículas	74
3.2.6.3. Comportamento térmico das partículas.....	74
3.2.6.4. Avaliação da cristalinidade por difratometria de raios X.....	75
3.2.6.5. Propriedades de carga superficiais das partículas	75
3.2.6.6. Determinação da presença de solvente residual nas partículas	76
3.2.6.7. Eficiência de incorporação dos hormônios	77
3.2.6.8. Estudos de liberação do hormônio <i>in vitro</i>	77
3.2.6.9. Estimativa da quantidade de partículas requeridas para o tratamento de tilápias do Nilo com MT	80
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.1. ENSAIOS PRELIMINARES DE FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS VIA SAS	83
4.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS DE PLA.....	89
4.2.1. Influência das variáveis de processo sobre a morfologia, diâmetro médio e quantidade residual de DCM nas partículas de PLA	90
4.2.2. Influência da incorporação de 17 α -metiltestosterona nas características das partículas de PLA.....	98
4.2.3. Comportamento térmico das partículas de PLA.....	102
4.2.4. Análises de DRX das partículas de PLA.....	106
4.2.5. Análise de potencial zeta das partículas de PLA.....	108
4.3. OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS DE PLA/PCL.....	110
4.3.1. Efeito da variação da proporção de PLA e PCL na solução polimérica sobre a formação, morfologia e diâmetro das partículas.....	110

4.3.2. Estudo de incorporação de 17α -metiltestosterona nas características das partículas de PLA/PCL.....	115
4.3.3. Comportamento térmico das partículas de PLA/PCL.....	121
4.3.4. Análise de DRX das partículas de PLA/PCL.....	126
4.3.5. Análise do potencial zeta das partículas de PLA/PCL.....	129
4.4. OBTENÇÃO DE PARTÍCULAS DE PLA/PLGA	131
4.4.1. Efeito da variação da proporção de PLA e PLGA e da massa inicial de 17α -metiltestosterona sobre a formação, morfologia e diâmetro das partículas	131
4.4.2. Comportamento térmico das partículas de PLA/PLGA.....	137
4.4.3. Análise de DRX das partículas de PLA/PLGA	140
4.4.4. Análise do potencial zeta das partículas de PLA/PLGA.....	143
4.5. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DE 17α -METILTESTOSTERONA DAS PARTÍCULAS DE PLA, PLA/PCL E PLA/PLGA EM CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL DAS TILÁPIAS DO NILO	144
4.6. ESTIMATIVA DA MASSA MÉDIA DE PARTÍCULAS CONTENDO MT REQUERIDAS POR TILÁPIA NILO DURANTE O PERÍODO DE TRATAMENTO	160
4.7. CUIDADOS NECESSÁRIOS NO DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PARTICULADOS EMPREGANDO-SE TECNOLOGIA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	162
5. CONCLUSÕES.....	165
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	169

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura química da 17α -metiltestosterona (adaptado de LÀGANA *et al.*, 2001; BARRY *et al.*, 2007). A seta indica o grupo metil no carbono de posição 17..... 9
- Figura 2: Mecanismo de atuação celular da 17α -metiltestosterona. RC: receptores citoplasmáticos para o hormônio; MT: 17α -metiltestosterona; CHR: complexo hormônio-receptor (adaptado de DRUMMOND, 2007). 11
- Figura 3: Mecanismos de erosão comuns em sistemas poliméricos (adaptado de WINZENBURG *et al.*, 2004). 20
- Figura 4: Mecanismos de liberação controlada de agentes ativos incorporados em partículas poliméricas biodegradáveis em que (A) ocorre o mecanismo de difusão, (B) intumescimento acoplado à difusão, (C) mecanismo de biodegradação ou erosão (adaptado de COMMANDEUR *et al.*, 2006). 21
- Figura 5: Estrutura química do PLA (adaptado de WINZENBURG *et al.*, 2004). 25
- Figura 6: Estrutura química do PLGA (adaptado de WINZENBURG *et al.*, 2004). 30
- Figura 7: Estrutura química da ϵ -policaprolactona (adaptado de WINZENBURG *et al.*, 2004). 36
- Figura 8: Clivagem das cadeias poliméricas da PCL a diferentes temperaturas (adaptado de LABET e THIELEMANS, 2009). 38
- Figura 9: Número de publicações nos últimos 20 anos que fazem uso de tecnologias supercríticas, em que SFE: Extração com Fluido Supercrítico; PF: Formação de Partículas via Fluido Supercrítico; SFC: Cromatografia Supercrítica; SFCR: Reações Químicas em Ambiente Supercrítico; SFP: Purificação em Fluido Supercrítico e SFI+D: Impregnação e Deposição via Fluido Supercrítico (dados extraídos de pesquisa realizada na WEB OF KNOWLEDGE, 2012 até o mês de agosto de 2012). 43
- Figura 10: Diagrama de fases de temperatura versus pressão de um composto puro com indicação da região supercrítica (adaptado de MAYO e KOMPELLA, 2007). 44
- Figura 11: Equipamento típico de RESS (adaptada de KOMPELLA e KOUSHIK, 2001; VEMAVARAPU *et al.*, 2005; BYRAPPA *et al.*, 2008; MISHIMA, 2008). 49

Figura 12: Conceito do equipamento típico de PGSS (adaptado de VEMAVARAPU <i>et al.</i> , 2005; BYRAPPA <i>et al.</i> , 2008; MISHIMA, 2008).	52
Figura 13: Equipamento típico de SAS (adaptado de CHEN <i>et al.</i> , 2007; BYRAPPA <i>et al.</i> , 2008; KANG <i>et al.</i> , 2008).	56
Figura 14: Fluxograma de estruturação dos ensaios realizados durante o estudo de formação de partículas via tecnologia de fluidos supercríticos	66
Figura 15: Representação esquemática do sistema de formação de partículas através da metodologia de SAS.	67
Figura 16: Aspecto morfológico típico obtido por microscopia eletrônica de varredura do filme produzido nos ensaios P1, P2 e P3, mostrando detalhe do filtro usado no sistema (A), ensaio P4 (B), ensaio P5 (C), ensaio P6, com detalhe para o filtro recoberto pelas partículas (D), ensaio P7 (E), ensaios P8 (F), com detalhe para as fibras que também foram obtidas nestas condições operacionais.	84
Figura 17: Aspecto típico das partículas de PLA produzidas por SAS, em que (A) indica as partículas formadas ao fim do processo, depositadas na superfície interna do vaso de precipitação e (B) as partículas coletadas e armazenadas em frascos de vidro para posterior análise.	85
Figura 18: Dilfratograma dos polímeros puros PLA (A), PLGA (B) e PCL (C).	87
Figura 19: Análise de DSC dos polímeros PLA (A), PLGA (B) e PCL (C).	88
Figura 20: Aspecto morfológico típico em microscópio eletrônico de varredura das partículas produzidas nos ensaios A1 a A11.	91
Figura 21: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas nos ensaios A1 a A11.	92
Figura 22: Aspecto morfológico típico em microscópio eletrônico de varredura das partículas produzidas nos ensaios A21 a A24.	99
Figura 23: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas nos ensaios A21 a A24.	100
Figura 24: Curvas de DSC típicas para o PLA, para as partículas de PLA não contendo hormônio (A) e para a MT e partículas de PLA contendo hormônio (B).	105

Figura 25: Difratoograma do PLA e da MT isolados (A), das partículas produzidas no planejamento fatorial (B) e das partículas de PLA produzidas na presença de MT (C).	107
Figura 26: Aspecto morfológico típico analisado por microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas nos ensaios B1 a B5.	112
Figura 27: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas nos ensaios B1 a B5..	113
Figura 28: Aspecto morfológico típico analisado por microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas nos ensaios B11 a B17.	117
Figura 29: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas nos ensaios B11 a B17.	118
Figura 30: Curvas de DSC típicas para o PLA, PCL e as partículas de PLA/PCL não contendo hormônio (A) e para a MT e partículas de PLA/PCL contendo hormônio (B).	122
Figura 31: Difratoograma do PLA, PCL e da MT isolados (A), das partículas de PLA/PCL produzidas no estudo de variação da composição da proporção entre os polímeros na solução polimérica (B) e das partículas produzidas no planejamento fatorial contendo 17 α -metiltestosterona (C).....	128
Figura 32: Aspecto morfológico típico da 17 α -metiltestosterona analisado através de microscopia eletrônica de varredura para amostras puras (A) e depois de precipitadas usando solução de diclorometano em presença de CO ₂ supercrítico, nas mesmas condições de processo empregadas nos ensaios de formação de partículas (B).	129
Figura 33: Aspecto morfológico típico analisado por microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas nos ensaios C1 a C7.	133
Figura 34: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas nos ensaios C1 a C7	134
Figura 35: Curvas de DSC típicas para o PLA, PLGA e 17 α -metiltestosterona (A) e as partículas de PLA/PLGA obtidas nos ensaios do planejamento fatorial.....	139
Figura 36: Difratoograma do PLA, da MT e do PLGA isolados (A) e das partículas produzidas no planejamento fatorial (B).	142

- Figura 37: Cinética de liberação de 17α -metiltestosterona das partículas de PLA incubadas em condições simuladas ao trato gastrointestinal de tilápias do Nilo e ajuste dos dados aos modelos de 1ª ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull. 146
- Figura 38: Cinética de liberação de 17α -metiltestosterona das partículas de PLA/PCL incubadas em condições simuladas ao trato gastrointestinal de tilápias do Nilo e ajuste dos dados aos modelos de 1ª ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull. 150
- Figura 39: Cinética de liberação de 17α -metiltestosterona das partículas de PLA/PLGA incubadas em condições simuladas ao trato gastrointestinal de tilápias do Nilo e ajuste dos dados aos modelos de 1ª ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull. 154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da 17 α -metiltestosterona (adaptado de SCHARDEIN e MACINA, 2006).....	10
Tabela 2: Materiais mais amplamente usados na formação de sistemas particulados para liberação controlada de drogas (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).....	23
Tabela 3: Características dos diferentes polímeros à base de poli(ácido lático) (adaptado de LU e CHEN, 2004; e PURAC, 2008).....	26
Tabela 4: Agentes ativos incorporados em partículas poliméricas biodegradáveis de PLA formadas por diferentes métodos para serem usadas na liberação controlada (adaptado de KUMARI <i>et al.</i> , 2010).....	29
Tabela 5: Características dos polímeros de PLGA com diferentes composições de ácido lático/glicólico, sendo a proporção de 50:50 de ácido lático:glicólico para PLGA50 e 85:15 de ácido lático:glicólico para PLGA85 (adaptado de PURAC, 2008).	31
Tabela 6: Diferentes compostos incorporados em partículas poliméricas biodegradáveis de PLGA produzidas por métodos distintos (adaptado de KUMARI <i>et al.</i> , 2010).....	34
Tabela 7: Características do polímero PCL e da blenda poli(L-ácido lático/ ϵ -caprolactona) 70/30 (adaptado de LU e CHEN, 2004; SINHA <i>et al.</i> , 2004; PURAC, 2008; LABET e THIELEMANS, 2009).	37
Tabela 8: Compostos diversos incorporados em partículas poliméricas biodegradáveis de PCL produzidas por diversos métodos (adaptado de SINHA <i>et al.</i> , 2004; KUMARI <i>et al.</i> , 2010).....	39
Tabela 9: Características físico-químicas típicas de fluidos supercríticos quando comparados com substâncias puras na fase líquida e gasosa (adaptado de BRUNNER, 2005).....	46
Tabela 10: Parâmetros críticos de moléculas usadas como fluidos supercríticos (adaptado de CAUDELL, 1999; ARAI <i>et al.</i> , 2002; PASQUALI <i>et al.</i> , 2008).....	46
Tabela 11: Características de processamento usando diferentes metodologias de produção de partículas via tecnologia de fluidos supercríticos (adaptado de YEO e KIRAN, 2005).....	48

Tabela 12: Sistemas microparticulados produzidos por tecnologia de fluidos supercríticos incorporando ou não agentes ativos.....	57
Tabela 13: Condições operacionais utilizadas nos ensaios preliminares de formação de partículas via tecnologia de fluidos supercríticos.....	69
Tabela 14: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da variação da pressão, concentração e vazão da solução de PLA à 40 °C.	70
Tabela 15: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da variação da razão polimérica PCL/PLA e razão mássica entre hormônio e os polímeros.	72
Tabela 16: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da variação da razão polimérica PLGA/PLA e razão mássica entre hormônio e os polímeros.	73
Tabela 17: Resultados dos ensaios preliminares de formação de partículas em diferentes condições operacionais.	83
Tabela 18: Resultados do planejamento fatorial usado para estudar os efeitos da pressão, concentração e vazão da solução polimérica sobre os diâmetros médios das partículas de PLA e sobre os níveis de DCM residual.....	90
Tabela 19: Análise estatística dos resultados do planejamento fatorial 2 ³ usado para estudar os efeitos da pressão, concentração e vazão da solução polimérica sobre os diâmetros médios das partículas de PLA.	93
Tabela 20: Características das partículas obtidas na presença de diferentes quantidades de 17 α -metiltestosterona.	98
Tabela 21: Resultados de DSC para as diferentes partículas de PLA obtidas, incorporando ou não MT, além dos resultados correspondentes à análise de DSC do PLA e MT isolados.	103
Tabela 22: Valores de potencial zeta das partículas de PLA contendo ou não 17 α -metiltestosterona.	109
Tabela 23: Características das partículas de PLA/PCL formadas com proporções variáveis dos polímeros, a uma pressão de 8 MPa e concentração e vazão de solução polimérica de 1% (m/v) e 0,5 mL/min, respectivamente.....	111

Tabela 24: Eficiência da incorporação de hormônio no diâmetro médio das partículas formadas por PLA e PCL produzidas a 8 MPa, concentração de solução polimérica de 1,0% (m/v) e vazão de solução polimérica de 0,5 mL/min.	115
Tabela 25: Análise estatística do planejamento fatorial 2^2 usado para estudar os efeitos da proporção entre PLA e PCL e as concentrações iniciais de MT na solução polimérica sobre os diâmetros médios das partículas de PLA/PCL, a um intervalo de confiança de 95%.	116
Tabela 26: Resultados da análise de DSC para as diferentes partículas de PLA/PCL obtidas.	123
Tabela 27: Valores de potencial zeta das partículas de PLA/PCL contendo ou não 17α -metiltestosterona.	130
Tabela 28: Eficiência de incorporação de hormônio e diâmetro médio das partículas formadas por PLA e PLGA produzidas a 8 MPa, concentração de solução polimérica de 1,5% (m/v) e vazão de solução polimérica de 0,5 mL/min.	132
Tabela 29: Análise estatística do planejamento fatorial 2^2 usado para estudar os efeitos da proporção entre PLA e PLGA e as concentrações iniciais de MT na solução polimérica sobre os diâmetros médios das partículas de PLA/PLGA, a um intervalo de confiança de 95%.	135
Tabela 30: Resultados obtidos de DSC para as diferentes partículas de PLA/PLGA obtidas no planejamento fatorial, além dos valores correspondentes ao PLA, PLGA e MT..	137
Tabela 31: Valores de potencial zeta das partículas de PLA/PLGA contendo ou não 17α -metiltestosterona.	143
Tabela 32: Análise dos parâmetros obtidos através do ajuste dos dados de liberação de 17α -metiltestosterona a partir das partículas de PLA usando os diversos modelos propostos.	147
Tabela 33: Análise dos parâmetros obtidos através do ajuste dos dados de liberação de 17α -metiltestosterona a partir das partículas de PLA/PCL usando os diversos modelos propostos.	151
Tabela 34: Parâmetros obtidos através do ajuste dos dados de liberação de 17α -metiltestosterona a partir das partículas de PLA/PLGA usando os diversos modelos matemáticos propostos.	155

Tabela 35: Quantidade de MT liberada obtida nos ensaios de cinética de liberação para as diferentes partículas produzidas, considerando-se a quantidade liberada no tempo de passagem pelo trato gástrico e intestinal e durante 120 horas.....	157
Tabela 36: Cálculo dos parâmetros relevantes à administração de partículas de PLA/PLGA usadas na reversão sexual de tilápias do Nilo.....	161

LISTA DE ABREVIACÕES

$\Delta H_{0,n}$: calor de fusão teórico do composto n ;

$\Delta H_{cc,n}$: entalpia de cristalização do composto n no aquecimento;

$\Delta H_{m,n}$: entalpia de fusão do composto n ;

K_{H_1} e K_{H_2} : constante cinética de Higuchi, [$h^{-0,5}$];

$f_{t\text{máx}}$: máxima fração da droga liberada durante o processo;

$M_{partículas}$: massa das partículas;

R_{Pol}^{MT} : razão mássica de 17 α metiltestosterona por polímero em cada partícula;

T_i : tempo de latência do processo;

f_t : fração cumulativa da droga liberada no tempo t ;

k_1 : constante cinética de 1^a ordem;

a : parâmetro referente à dependência do tempo;

AC: acetona;

AE: acetato de etila;

AHB: ácido 4-hidroxibenzóico;

ASES: sistema de extração do solvente por aerossol;

b : parâmetro referente ao tipo de curva.

C: concentração da solução polimérica;

CHR: complexo hormônio-receptor;

CO₂: dióxido de carbono;

DCM: diclorometano;

DMSO: dimetilsulfóxido;

DRX: difração de raios X;

DSC: calorimetria diferencial de varredura;

ET: etanol;

FSC: fluido supercrítico;

GAS: gás como anti-solvente;

HC: hidrocortisona;

HX: hexano;

I: isopropanol;

m: massa;

v: volume;

mPEG: metoxipolietilenoglicol;

MT: 17 α -metiltestosterona;

ME: metanol;

NM: não mencionado;

NR: não realizado e/ou usado;

P: pressão;

PCA: precipitação a partir do anti-solvente comprimido;

PCL: poli(ϵ -caprolactona);

Pcr: pressão crítica;

PDLA: poli(D-ácido láctico);

PDLLA: poli(D,L-ácido láctico);

PEG: polietilenoglicol;

PF: formação de partículas via fluido supercrítico;

PGSS: precipitação de soluções saturadas de gás;

PHB: polihidroxibutirato;

PLA: poli(L-ácido láctico);

PLGA: poli(50/50 DL-ácido láctico-co-glicólico);

PMMA: polimetilmetacrilato;

QMT: quantidade de 17 α -metiltestosterona por quilograma de ração;

QP: quantidade de partículas;

Q_{PLA}: vazão da solução polimérica por minuto;

QR: quantidade de ração;

RC: receptores citoplasmáticos para hormônio;

RESOLV: expansão rápida de solução supercrítica em solventes líquidos;

RESS: expansão rápida da solução supercrítica;

SAS: precipitação pelo anti-solvente supercrítico;

SEDS: dispersão da solução expandida pelo fluido supercrítico;

SFC: cromatografia supercrítica;SFCR: reações químicas em ambiente supercrítico;

SFE: extração com fluido supercrítico;

SFEE: extração de emulsões por fluidos supercríticos;

SFI+D: impregnação e deposição via fluido supercrítico;

SFP: purificação em fluido supercrítico;

Tc: temperatura de cristalização;

Tcr: temperatura crítica;

Tg: temperatura de transição vítrea;

THF: tetrahidrofurano;

Tm: temperatura de fusão;

V: vazão da solução polimérica;

W_n : fração mássica do composto n na amostra;

χ : cristalinidade;

a : constante relacionada à incorporação estrutural e à forma geométrica do dispositivo, $[h^{-1}]$;

n : expoente que indica o mecanismo de liberação da droga;

t : tempo;

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa e Relevância

O declínio dos estoques pesqueiros promoveu, nos últimos anos, o rápido crescimento da aquicultura, sendo que em menos de uma década a produção mundial de peixes em cativeiro mais que dobrou. Este crescimento é, acima de tudo, fruto da contínua expansão da população mundial, e das crescentes necessidades por novas fontes protéicas. Atualmente, mais de 200 espécies são produzidas por esta atividade, entre peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas, que já atendem, segundo dados da FAO (2008), mais de 30% do consumo alimentar humano de base protéica.

A aquicultura caracteriza-se pela criação racional de peixes em um sistema prático e seguro, sob condições controladas, que permitam ao peixe crescer e reproduzir-se, sendo que a intervenção sobre o ciclo de vida do animal bem como a ausência de predadores naturais, a restrição e o controle de agentes competidores permitem o melhoramento no suprimento de alimentos, com provisão da maioria, senão de todos, os requisitos nutricionais humanos (NAYLOR *et al.*, 2000). No entanto, apesar da criação de peixes em cativeiro ser uma atividade com grande potencial socioeconômico, ela é acompanhada do aumento da densidade populacional de peixes, que implica em preocupações com relação à implantação de sistemas de criação mais racionais e produtivos, de modo a possibilitar a exploração de sistemas de criação em larga escala. Além disto, cuidados relacionados ao manejo dos peixes, controle de doenças e infecções provocadas por vírus, fungos, bacterianas e parasitas e a geração de produtos residuais oriundos desta atividade devem também ser considerados.

Aliado a isso, aspectos como o controle da reprodução e do crescimento das espécies em cativeiro devem ser considerados. O primeiro aspecto é responsável pelo controle da maturação precoce e pela reprodução descontrolada, que podem levar ao superpovoamento dos tanques, implicando em competição por espaço e alimento,

ocasionando baixo crescimento e heterogeneidade no tamanho (MAINARDES-PINTO *et al.*, 2000). Já o segundo aspecto é importante visando garantir a elevação da conversão alimentar, que é evidenciado pelo aumento na eficiência na produção de filés e pela aceleração do crescimento dos peixes. A longo prazo, o controle do crescimento animal reduziriam os custos com manejo, e tornariam mais rápida a disponibilização de alimento ao mercado consumidor. Assim, pesquisas têm sido focadas no desenvolvimento de veículos para a administração de hormônios, drogas e vacinas para estes animais, além de para os seres humanos, já que estes propiciariam a exploração do sistema de criação em larga escala de peixes mais saudáveis, com maior potencial de crescimento controlado e com alta conversão alimentar.

Como o manejo destes animais é a parte mais crítica com relação à administração de agentes ativos, a obtenção de carreadores orais de drogas, que poderiam ser facilmente incorporados à ração, parece ser bastante atraente. Assim, no presente trabalho propõe-se o estudo da produção de tais dispositivos para a liberação controlada de um hormônio comumente empregado na piscicultura, a 17α -metiltestosterona (MT). A MT é um hormônio masculinizante, capaz de promover a inversão sexual dos peixes. Esta abordagem é bastante interessante uma vez que permitiria a formação de populações monossexo, evitando-se assim, problemas relacionados ao superpovoamento dos tanques, às desovas assíncronas e o crescimento não uniforme dos peixes. Neste contexto, os polímeros sintéticos biocompatíveis poli(ácido láctico), poli(ácido láctico co-glicólico) e poli(caprolactona) mostram-se bastante interessantes do ponto de vista da formação de partículas capazes de encapsular este hormônio, conforme se observa na literatura atual. Para a obtenção de tais dispositivos, tecnologias baseadas no uso de fluidos supercríticos têm se mostrado muito atraentes, visto que são capazes de produzir tais dispositivos com altas taxas de incorporação de agentes ativos. Dentre os fluidos supercríticos usados na formação de partículas, destaca-se o dióxido de carbono que, além de ambientalmente seguro, possibilita a formação de dispositivos de variadas formas e tamanhos a partir de diferentes matrizes poliméricas. Aliado a isso, destaca-se a grande versatilidade das técnicas baseadas no uso de fluidos supercríticos, que permitem, através de pequenos ajustes nas condições operacionais empregadas, a manipulação das características finais dos

dispositivos e mesmo das quantidades e localização dos agentes bioativos incorporados. Até o presente momento, não foram localizadas na literatura consultada, referências a este tema de estudo em particular, o que caracteriza o caráter inédito do presente trabalho.

1.2. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho foi produzir carreadores de hormônios para a administração por via oral em peixes do tipo tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma das espécies mais cultivadas em cativeiro no Brasil, enfocando especificamente a 17 α -metiltestosterona, usando-se a tecnologia de fluidos supercríticos.

Na etapa de desenvolvimento dos carreadores hormonais, foram empregados na formulação das micropartículas os polímeros biocompatíveis PLLA (poli(L-ácido láctico)), PDLGA (poli(50/50 DL-ácido láctico-co-glicólico)) e PCL (policaprolactona), tendo-se as seguintes metas e objetivos específicos:

- Obtenção de partículas de PLA, PLGA e PCL e de blendas de PLA/PLGA e PLA/PCL, pelo uso de tecnologia supercrítica, capazes de encapsular e proteger o hormônio de reversão sexual das condições adversas do trato gastrointestinal dos peixes;
- Determinação da influência de variáveis operacionais como temperatura e pressão na formação das micropartículas por CO₂ supercrítico, assim como da razão mássica CO₂ supercrítico/solução polimérica, da variação da concentração hormonal e dos polímeros durante a formação das partículas nas características finais do material produzido, tais como tamanho, morfologia, comportamento térmico e cristalinidade do material, eficiência de incorporação do agente ativo e distribuição de cargas na estrutura da matriz polimérica;

- Estudo da estabilidade química e morfológica das partículas e de sua capacidade de liberação controlada dos agentes ativos *in vitro*, assim como o ajuste dos dados obtidos a diferentes modelos cinéticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são abordados aspectos relevantes à produção de tilápias do Nilo em cativeiro, bem como a reversão sexual destes peixes através da administração de 17 α -metiltestosterona. São considerados também temas como à incorporação de agentes ativos em dispositivos de liberação controlada, as matrizes poliméricas comumente usadas e as tecnologias atualmente disponíveis para tal.

2.1. Produção em larga escala de tilápias do Nilo em cativeiro

De acordo com DRUMMOND (2007), o cultivo de tilápias teve início primeiramente em 1924, no Quênia, sendo posteriormente implantado no Congo. Na década de 1950 foram encontrados relatos da ampla disseminação da tilapicultura por diversas partes do mundo, sendo esta usada, em especial, para garantir a subsistência alimentar em países em desenvolvimento. Devido às suas características e ao fácil manejo em tanques de criação, as tilápias são, atualmente, o segundo maior grupo de peixes criados em cativeiro (depois das carpas), com uma produção mundial anual de cerca de 2,3 milhões de toneladas (segundo dados da FAO, 2008 e BOSTOCK *et al.*, 2010), apresentando o maior crescimento percentual entre os principais grupos de peixes cultivados na aquicultura mundial (DRUMMOND, 2007).

Dentre as diversas espécies de tilápias, a *Oreochromis niloticus*, ou tilápia do Nilo, tem amplo destaque devido ao seu grande potencial na aquicultura. Essa espécie foi primeiramente implantada no Brasil na década de 70, sendo oriunda do oeste africano (BOSCOLO *et al.*, 2001). No ano de 2008, a produção de tilápias do Nilo em cativeiro no Brasil chegou a 95.000 toneladas, sendo que este valor representa cerca de 45% de todo pescado produzido no Brasil por esta atividade (FAO, 2008). Deve-se salientar também que, similarmente ao que vem acontecendo no resto do mundo, no Brasil, a produção de

tilápias tem aumentado significativamente ao longo dos últimos 15 anos, com um crescimento médio de 18,5% ao ano (FAO, 2008) . Ainda de acordo com dados da FAO (2008), esta seria a principal razão pela qual se observa, no Brasil, o crescente surgimento de fazendas destinadas ao cultivo desta espécie, devido especialmente à grande demanda e rentabilidade da atividade, que somente no ano de 2008, gerou cerca de 206 milhões de dólares com os lucros oriundos do cultivo desta espécie em particular.

Além disso, observa-se que a alta adaptabilidade da tilápia ao clima tropical brasileiro é bastante favorável à atividade, visto que é possível criar este tipo de peixe desde a região amazônica até o estado do Rio Grande do Sul. Apesar de ser uma espécie de clima predominantemente quente, tolerando temperaturas que variam de 20 a 30 °C, as tilápias também são capazes de suportar temperaturas mais baixas, de cerca de 12 °C (DRUMMOND, 2007).

O grande potencial da espécie para a criação em confinamento se deve a várias características, como sua rusticidade (BORGES *et al.*, 2005) e suas altas taxas de crescimento (CHAKRABORTY e BANERJEE, 2009), de modo que atingem o peso comercial em um curto intervalo de tempo (DRUMMOND, 2007). Sua alta adaptabilidade em confinamento (BOSCOLO *et al.*, 2001) é também um de seus principais atrativos.

As tilápias são bastante resistentes ao superpovoamento (DRUMMOND, 2007), apresentando fácil desova, contando também com alta tolerância a condições ambientais adversas (CHAKRABORTY e BANERJEE, 2009), tais como mudanças na salinidade, temperatura e concentrações de oxigênio (BOSCOLO *et al.*, 2001) e amônio (DIAS-KOBERSTEIN, 2007). As tilápias do Nilo possuem maior resistência à doenças quando comparadas a outras espécies de peixes (CHAKRABORTY e BANERJEE, 2009), sejam elas virais, bacterianas e/ou parasitárias (DRUMMOND, 2007), o que as torna ainda mais atraentes do ponto de vista comercial.

A tilápia do Nilo possui hábito alimentar onívoro, respondendo com a mesma eficiência à ingestão de proteínas de origem tanto vegetal quanto animal (DRUMMOND, 2007). Esta espécie também aceita rações artificiais desde a fase larval (DIAS-KOBERSTEIN, 2007) até a fase de terminação (BOSCOLO *et al.*, 2001).

Além disso, a tilápia possui conversão alimentar eficiente, o que propicia um alto rendimento em filés (MAINARDES-PINTO *et al.*, 2000; BORGES *et al.*, 2005), com carne de ótima qualidade tanto nutricional quanto sensorial, apresentando coloração clara (DRUMMOND, 2007). A sua alta aceitação no mercado consumidor (BORGES *et al.*, 2005; CHAKRABORTY e BANERJEE, 2009) deve-se especialmente à ausência de espinhos musculares em “Y” e às características organolépticas de seus filés (DIAS-KOBERSTEIN, 2007), que apresentam ainda baixo teor de gordura e de calorias (DRUMMOND, 2007).

Apesar de todas essas características que tornam atraente a produção de tilápias visando à industrialização de sua carne, existem algumas desvantagens e obstáculos que ainda precisam ser superados, como as desovas parceladas e a baixa fecundidade. Destaca-se, entretanto, que a baixa fecundidade acaba sendo compensada pelas desovas assíncronas, com altas taxas de sobrevivência dos alevinos (DRUMMOND, 2007). Outro problema está relacionado à excessiva reprodução da espécie (CHAKRABORTY e BANERJEE, 2009), atribuída à maturidade sexual precoce (BORGES *et al.*, 2005), que pode levar ao excesso populacional nos viveiros (DIAS-KOBERSTEIN, 2007), propiciando a competição dos peixes por espaço e alimento, o que, por sua vez, pode resultar em variações na taxa de crescimento entre os animais, culminando no aumento da heterogeneidade de tamanho (MAINARDES-PINTO *et al.*, 2000).

Os altos gastos energéticos com a cópula e/ou desova frequentes também são relatados como um dos inconvenientes na produção em cativeiro (BORGES *et al.*, 2005; DIAS-KOBERSTEIN, 2007). As fêmeas frequentemente desviam parte da energia que seria comumente gasta no crescimento para a reprodução. Assim, durante este período, elas tendem a praticamente não se alimentar (devido ao tempo gasto com a incubação bucal dos ovos e/ou larvas), levando a uma sensível perda de peso, que acaba resultando na redução da qualidade da carne e na maior susceptibilidade a doenças infecciosas (DRUMMOND, 2007).

É frequente se observar o crescimento diferenciado entre fêmeas e machos, sendo que os últimos apresentam melhor conversão alimentar quando cultivados em população

monossexuada (BAROILLER *et al.*, 2009), devido especialmente aos efeitos anabólicos dos andrógenos e ao direcionamento energéticos das fêmeas para a reprodução (DRUMMOND, 2007).

Desta forma, como medida paliativa aos inconvenientes oriundos da produção de tilápias em populações mistas, têm se buscado alternativas para o controle reprodutivo das espécies (DIAS-KOBERSTEIN, 2007) por diversas técnicas. A estratégia mais comum, prática, efetiva e viável economicamente é a inversão sexual pelo uso de homônios masculinizantes, que possibilita orientar a produção de peixes com fenótipos de machos. A descrição desta técnica e de suas implicações são apresentadas mais detalhadamente a seguir.

2.2. Diferenciação sexual de peixes por administração de hormônios

Como mencionado anteriormente, a técnica mais comum para a produção de populações monossexuadas é a indução da reversão sexual pela administração de hormônios esteróides (GALE *et al.*, 1999). Sendo assim, o conceito de manipulação da diferenciação sexual de peixes pela administração de esteróides exógenos tem sido amplamente utilizado para alterar o fenótipo de peixes ornamentais, principalmente como alternativa rotineira à produção de populações monossexuadas de tilápias do Nilo (BEARDMORE *et al.*, 2001).

Segundo BEARDMORE *et al.* (2001), existem mais de 16 tipos de andrógenos naturais ou sintéticos que têm sido usados na reversão de peixes, sendo que o mais comumente aplicado é a 17 α -metiltestosterona. Este composto pode ser administrado por imersão ou por via oral (pela suplementação da dieta alimentar dos peixes) (WASSERMANN e AFONSO, 2003; ARSLAN e PHELPS, 2004), sendo esta última forma preferencial, devido especialmente ao seu caráter não-invasivo (GALE *et al.*, 1999). O mecanismo de ação deste hormônio esteróide na indução da reversão sexual de peixes ainda não é completamente esclarecido, sendo que a sua forma de atuação mais provável é

consequência de sua ação direta sobre a pituitária de teleósteos (LI *et al.*, 2006), por elevação do nível de hormônio gonadotrófico de machos e fêmeas ainda não diferenciados sexualmente (CARRASCO *et al.*, 1999). A estrutura química da 17α -metiltestosterona é mostrada na Figura 1.

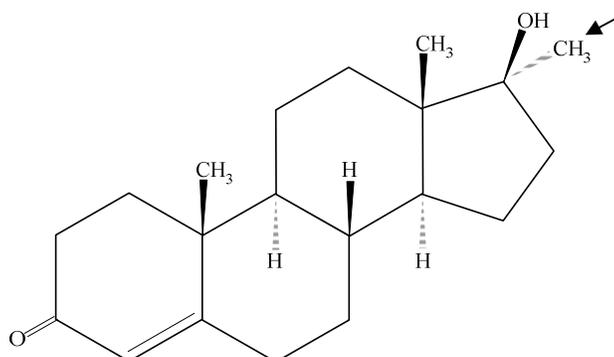


Figura 1: Estrutura química da 17α -metiltestosterona (adaptado de LÁGANA *et al.*, 2001; BARRY *et al.*, 2007). A seta indica o grupo metil no carbono de posição 17.

A metiltestosterona é uma molécula hidrofóbica de tamanho relativamente elevado (SCHARDEIN e MACINA, 2006), sendo capaz de participar de interações do tipo ligação de hidrogênio com outros compostos, sendo que o = O pode participar como receptor de H e o OH como doador de H. Algumas propriedades físico-químicas relevantes deste hormônio são mostradas na Tabela 1.

Usualmente, a 17α -metiltestosterona tende a ser mais potente e resistente ao metabolismo que a testosterona, efeito este resultante da presença do grupo metil acoplado ao carbono 17, que acaba por tornar mais difícil a excreção deste hormônio (DONALDSON, 1996). De acordo com DRUMMOND (2007), a 17α -metiltestosterona tem a capacidade de passar facilmente através da membrana celular, atuando junto a receptores intracelulares específicos. O hormônio sofre ação da 5α -redutase, de forma que se complexa com os receptores citosólicos, sendo ativado e transportado para o núcleo celular. Dentro do núcleo da célula, o hormônio une-se ao sítio receptor do DNA, dando

início à transcrição dos genes da diferenciação sexual comum em machos. Desta forma, observa-se o aumento da atividade da RNA polimerase, com formação de RNA mensageiro, tendo-se como consequência a síntese de proteínas que propiciam a diferenciação celular característica de machos, resultando na formação de testículos. A forma de atuação celular da 17α -metiltestosterona está esquematizada mais detalhadamente na Figura 2.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da 17α -metiltestosterona (adaptado de SCHARDEIN e MACINA, 2006).

Propriedade	Valor
Massa molar	302,457 g/mol
Volume molar	303,37 Å ³
Densidade	0,942 g/cm ³
Área superficial	376,56 Å ²
Parâmetro de solubilidade	21,268 J ^(0.5) /cm ^(1.5)
Dispersão	18,888 J ^(0.5) /cm ^(1.5)
Momento dipolar	3,578 debye
Polaridade	3,482 J ^(0.5) /cm ^(1.5)
Log (coeficiente de partição)	4.268
Log (solubilidade em água)	-2,442 log (mol/M ³)
Ligações de hidrogênio	9,134 J ^(0.5) /cm ^(1.5)
Número de pontos receptores de ligações de H	2
Número de pontos doadores de ligações de H	1
Área de superfície polar	40,46 Å ²
Área de superfície hidrofílica	46,78 Å ²
Porcentagem de superfície hidrofílica	12,42
Número de centro quirais	6
Soma de cargas parciais	0
Soma de cargas totais	0

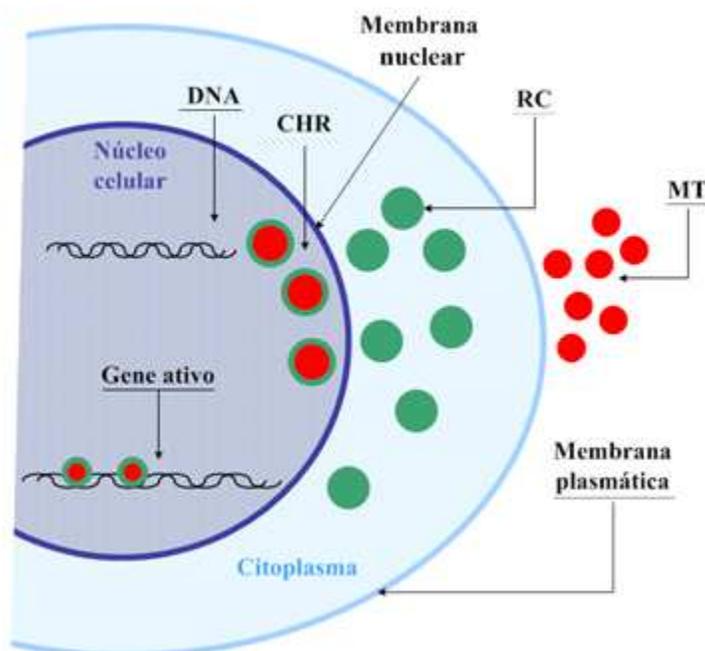


Figura 2: Mecanismo de atuação celular da 17α -metiltestosterona. RC: receptores citoplasmáticos para o hormônio; MT: 17α -metiltestosterona; CHR: complexo hormônio-receptor (adaptado de DRUMMOND, 2007).

Segundo DRUMMOND (2007), quando administrados oralmente, os agentes anabólicos têm a tendência de serem metabolizados, produzindo metabólitos que são transportados livremente, sem estarem biologicamente ativos. Estes são posteriormente convertidos lentamente, através do fígado, em compostos mais solúveis em água. Posteriormente, estes metabólitos são digeridos pela bile, e assim, acabam finalmente sendo excretados através das fezes e/ou urina.

Para que o procedimento de inversão sexual através da administração oral de hormônios seja eficiente, é necessário que os peixes sejam submetidos ao tratamento antes que se inicie a primeira diferenciação do tecido gonadal em ovariano, o que, em média, ocorre a partir do quinto dia após a eclosão das larvas, se estendendo até a quarta semana de crescimento (DRUMMOND, 2007). Assim, para a efetividade do tratamento, nos primeiros dias dos estágios de diferenciação sexual (7^o ao 12^o dia), os peixes (que, nesta fase,

usualmente possuem cerca de 9 a 11 mm de comprimento e entre 10 a 15 mg em peso) são alimentados com uma dieta contendo de 40 a 60 mg de 17α -metiltestosterona por quilograma de ração, durante cerca de 28 dias. A quantidade de ração varia ao longo do tempo em virtude do ganho de peso do peixe, mantendo-se uma relação diária de 15 a 20% do peso corpóreo do animal (BARRY *et al.*, 2007), com redução semanal de 5% da concentração de hormônio até chegar ao término do tratamento. A ração contendo hormônios deve ser administrada entre 5 a 6 vezes ao dia, quantidade esta que também pode variar em função do consumo de ração, que é, em geral, determinado pela temperatura da água bem como pelo estágio de crescimento dos peixes (PANDIAN e SHEELA, 1995; NEUMANN *et al.*, 2009). Assim, para que o tratamento seja efetivo, é preciso aliar, de forma muito criteriosa, os fatores dose e tempo de exposição ao tratamento hormonal (NAKAMURA *et al.*, 1998).

Apesar de diversos estudos comprovarem as altas taxas de reversão sexual alcançadas por esta técnica (BEARDMORE *et al.*, 2001) e a forte tendência dos peixes tratados a crescerem entre 2 a 3 vezes mais quando comparados aos não revertidos (RON *et al.*, 1995) devido ao estímulo na secreção de hormônio de crescimento (CANOSA *et al.*, 2007), existem, ainda hoje, muitas preocupações tanto das autoridades quanto dos consumidores, de uma maneira geral, sobre o uso de hormônios na reversão sexual de peixes.

Essas preocupações são baseadas especialmente em fatores como o descontrole sobre a dosagem e tempo de administração hormonal, que pode acarretar em redução do crescimento gonadal, intersexualidade gonadal, processo de feminização (em decorrência da inibição da biosíntese de andrógenos endógenos em machos) (LI *et al.*, 2006) e desenvolvimento gonadal anormal, caracterizado pelo aparecimento de fibrose, necrose e até mesmo esterilidade. Outros problemas incluem alterações na espermatogênese, como inibição da espermição, baixa fertilidade e performance reprodutiva (CARRASCO *et al.*, 1999).

Falhas na uniformidade de distribuição do hormônio na ração e hierarquias estabelecidas entre os peixes (pelo maior consumo de alimento entre os peixes dominantes

e/ou maiores em detrimento dos demais) também são motivos de preocupação, pois podem levar a uma significativa variabilidade de dosagem nos indivíduos tratados, causando assim, dificuldade na estimativa da quantidade certa ingerida por cada animal (BEARDMORE *et al.*, 2001).

A contaminação dos lençóis d'água com hormônio residual oriundo do processo de reversão, também é bastante problemática. Alguns estudos constataram a reversão de tilápias quando expostas a águas poluídas com 17α -metiltestosterona, ainda que inicialmente estas estivessem mantidas em sistemas aquáticos fechados (HULAK *et al.*, 2008). Isto sugere que a 17α -metiltestosterona e seus metabólitos podem persistir na água em concentrações capazes de causar o processo não controlado de reversão sexual dos peixes.

Aliadas a isso, existem as preocupações relacionadas à contínua exposição e ao excesso de manipulação do hormônio por parte dos trabalhadores, que podem conduzir ao processo de aromatização do hormônio. Este processo se caracteriza pela transformação de andrógenos sintéticos em estrogênicos feminilizantes, que a longo prazo, podem comprometer todo o processo de reversão sexual (GALE *et al.*, 1999). Deve-se destacar também os riscos ocupacionais inerentes à manipulação prolongada das soluções hormonais para veiculação do esteróide na ração, realizada por trabalhadores diversas vezes ao dia durante várias semanas. Tal grau de manipulação representa um risco adicional ao trabalhador, que se expõe aos efeitos tumorigênicos e teratogênicos destes esteróides androgênicos anabolizantes (LEWIS e SWEET, 1993).

Por fim, existem preocupações por parte dos consumidores quanto à possibilidade de acumulação hormonal na carne do peixe, motivo de maior resistência do mercado consumidor quanto à aceitação do uso da técnica para produção de tilápias em cativeiro. Apesar disso, ao se comparar as concentrações hormonais plasmáticas de peixes não revertidos com as de peixes tratados com 17α -metiltestosterona, não foram detectados valores muito diferentes. Isto se deve, especialmente, à curta meia vida do hormônio no peixe, que é de 2,5 a 3,5 horas (DRUMMOND, 2007), característica esta que garante a segurança da técnica. Além disso, após o tratamento, normalmente os peixes são

alimentados com ração sem adição de MT por períodos entre 120 a 150 dias, o que assegura o uso da técnica, visto a taxa de declínio de resíduo de MT ser muito rápida.

Desta forma, uma alternativa que se mostra bastante atraente é o desenvolvimento de carreadores capazes de liberar o hormônio de forma controlada, que possibilitem maior segurança do manipulador, ao mesmo tempo em que minimizem os riscos de degradação do composto. Este assunto é abordado mais detalhadamente na seção 2.3.

2.3. Sistemas de liberação controlada de agentes ativos

O desenvolvimento de drogas e agentes bioativos encapsulados em dispositivos micro e nano estruturados tem crescido enormemente nas últimas décadas. Sistemas de liberação à base de hidrogéis e micro e nano partículas, cerâmica e nanopartículas magnéticas, bem como lipossomas, ciclodextrinas e micelas poliméricas produzidos por diversos métodos são destinados a uma ampla variedade de aplicações nas áreas cosméticas, de medicina diagnóstica, imagem e terapêuticas, conforme revisado por LIMA *et al.* (2012), KRISHNAMACHARI *et al.* (2011) e PARVEEN *et al.* (2012).

Segundo PASQUALI *et al.* (2006), nas últimas duas décadas, tem-se notado o aumento do interesse por produtos farmacêuticos no estado sólido, que podem apresentar características químicas e físicas adequadas aos sistemas de liberação de drogas, sendo portanto, fator chave no desenvolvimento dos mais variados produtos farmacêuticos disponíveis no mercado. Desta forma, uma das estratégias comumente adotadas é propiciar a maximização da biodisponibilidade destas drogas, aliada à minimização da dosagem administrada, através da associação com dispositivos de liberação controlada.

Especial atenção tem sido dada aos polímeros biodegradáveis, devido às possibilidades de aplicação na área farmacêutica, médica e engenharia biomédica, seja na constituição de dispositivos médicos e curativos, bem como para a fabricação de estruturas porosas úteis na engenharia de tecidos (SHI *et al.*, 1996). Esta mesma abordagem tem sido usada no desenvolvimento de dispositivos de liberação de drogas, peptídeos e proteínas que

necessitem de controle quanto a sua taxa de liberação, bem como sobre seu sítio de atuação (KUMAR *et al.*, 2001).

De acordo com BARRAT (2003) e LINCE *et al.* (2008), os sistemas de liberação controlada de agentes bioativos podem ser classificados conforme suas propriedades funcionais, sendo subdivididos em sistemas de liberação controlada de primeira, segunda e terceira geração. No primeiro caso, estes sistemas são capazes de liberar determinadas substâncias ativas no tecido ou célula-alvo. No entanto, não são considerados carreadores verdadeiros, pois eles devem ser implantados o mais próximos possível do sítio de interesse. Já os sistemas de segunda geração são considerados carreadores verdadeiros, uma vez que são administrados via uma rota específica, liberando depois de um determinado período a droga em questão no organismo e especialmente nos sítios-alvo. Nos sistemas de liberação controlada de terceira geração, observa-se o mesmo comportamento dos sistemas de segunda geração, contando-se, entretanto, com maior especificidade de reconhecimento do tecido-alvo, o que permite alcançar altas taxas de absorção da droga.

Desta forma, a encapsulação de agentes ativos em sistemas particulados possui diversas vantagens e benefícios sobre as formulações terapêuticas tradicionais, visto que estes sistemas permitem a liberação controlada do agente, e evitam que este seja degradado prematuramente pelo metabolismo do organismo no qual foi administrado (CHAMPION *et al.*, 2007). Assim, pode-se projetar sistemas através dos quais os agentes terapêuticos sejam liberados em níveis constantes, por longos períodos, podendo-se estabelecer intervalos de liberação de horas, dias, meses e até mesmo anos, dependendo do perfil de liberação desejado para cada caso (LU e CHEN, 2004). Além disso, estes sistemas de liberação controlada permitem uma redução na frequência de administração da droga, o que propicia uma maior aceitação do paciente/receptor, devido ao menor desconforto e lesões oriundas da administração medicamentosa. Uma ampla variedade de materiais pode ser usada para a produção de dispositivos de liberação controlada, tais como polímeros sintetizados quimicamente, polissacarídeos, proteínas, metais, silicatos, lipídeos, dentre outros. Neste contexto, partículas formadas a base de polímeros têm recebido grande atenção para esta finalidade, uma vez que possuem grande versatilidade, podendo ser usadas como veículos

na liberação de drogas por diferentes rotas, sejam elas intravascular, subcutânea, pulmonar ou oral (CHAMPION *et al.*, 2007).

2.3.1. Emprego de dispositivos particulados poliméricos na liberação de agentes ativos

Materiais poliméricos são usualmente utilizados para a formação de sistemas de liberação controlada, porém existe somente um limitado número de polímeros úteis na constituição de partículas para incorporação de drogas. De acordo com VAUTHIER e BOUCHEMAL (2009), para este tipo de aplicação os materiais poliméricos devem possuir características específicas, como as descritas a seguir.

Os polímeros devem ser biocompatíveis e preferencialmente biodegradáveis, ou ao menos serem totalmente elimináveis pelo organismo em curtos períodos, de modo a permitir consecutivas administrações do agente ativo, sem que haja o risco de ocorrer uma acumulação não controlada do material. Além disso, devem ser seguros (UEDA e TABATA, 2003), ou seja, não tóxicos e não imunogênicos, e os produtos de sua degradação, se existentes, também não devem ser tóxicos e imunogênicos. Adicionalmente, devem ser formulados de modo que as partículas formadas possuam propriedades que permitam a liberação do agente ativo no sítio ativo desejado.

A escolha do tipo de polímero a ser usado como carreador, segundo CHAMPION *et al.* (2007), é afetada fortemente pelo tipo de agente ativo a ser encapsulado, pelos perfis de degradação e liberação desejados para o mesmo e pelas propriedades físicas e de compatibilidade entre o carreador e o agente ativo. Adicionalmente, deve-se realizar o controle de parâmetros básicos dos carreadores, tais como a eficiência de encapsulação e polidispersidade, bem como a porosidade e a compartimentalização do agente ativo.

Especial atenção deve ser dada às dimensões da partícula, já que estas afetam as interações entre as partículas e as células e tecidos do corpo. O tamanho da partícula, na maioria das vezes, altera significativamente sua taxa de degradação, propriedades de fluxo

do dispositivo, liberação do agente ativo e o mecanismo de absorção no organismo (STONIK *et al.*, 1995; CHAMPION *et al.*, 2007). Desta forma, como observado por DUNNE *et al.* (2000) e PANYAM e LABHASETWAR (2003), partículas maiores têm menor área superficial disponível para a penetração da água, ao mesmo tempo que também apresentam maior lentidão na liberação de produtos de degradação oriundos da partícula. Além disso, o diâmetro das partículas, independentemente da forma como forem administradas, seja nos vasos sanguíneos, vias respiratórias ou no trato gastrointestinal ditam a taxa de locomoção, difusão e adesão das partículas na parede do tecido-alvo (LAMPRECHT *et al.*, 2001; PATIL *et al.*, 2001). Sabe-se que esta não somente está associada à área superficial disponível para a adesão, como também está intimamente relacionada à curvatura local, afetando não somente a adesão, mas também fatores como a absorção, a longevidade de ligação entre o tecido alvo e a partícula e, por fim, a capacidade de transporte e seletividade das partículas dentro das células. Assim, no caso da administração oral para peixes, por exemplo, quando se deseja apenas a proteção do agente ativo da acidez gástrica e da digestão enzimática, supõe-se que partículas com diâmetros de 5 a 50 μm seriam eficazes para a administração por via oral (RODRIGUES *et al.*, 2006; SACCHETIN *et al.*, 2010). Caso se deseje adicionalmente que as mesmas atravessem a parede do intestino, as partículas devem ter preferencialmente diâmetros de cerca de 10 μm , com base no trabalho de JOOSTEN *et al.* (1997).

Destaca-se ainda, que não somente o diâmetro médio, mas também a distribuição de tamanhos tem relevância quando da aplicação biológica final, pois esta característica pode interferir no perfil de liberação da droga. Para partículas não-esféricas, observa-se a presença de duas ou mais escalas de comprimento diferentes, sendo que, dependendo da orientação da partícula, uma escala de comprimento pode dominar as demais, influenciando, assim, a deposição no sítio-alvo, bem como a taxa de degradação e consequente liberação do agente ativo (CHAMPION *et al.*, 2007). Apesar do movimento de partículas esféricas ser mais fácil de se prever, devido a sua simetria já bem conhecida e estudada, partículas não-esféricas possuem a tendência, por exemplo, de se alinhar mais facilmente quando expostas a algum tipo de fluxo. Isso explicaria, segundo MOGHIMI *et al.* (2001), o fato de partículas não-esféricas, como as hemácias, da ordem de micrômetros e

que possuem naturalmente alta tendência à deformabilidade, serem rotineiramente capazes de passar através de fendas assimétricas de órgãos como o baço (que habitualmente somente deixam filtrar partículas de poucos nanômetros). Desta forma, pode-se notar que a orientação e a rigidez mecânica seriam importantes no transporte das partículas, visto que isso poderia ser aplicado também às partículas que se locomovem dentro dos caminhos tortuosos do fígado ou dos espaços extracelulares dos tecidos (CHAMPION *et al.*, 2007).

Segundo KHUTORYANSKIY (2011), as propriedades de mucoadesividade dos polímeros são também igualmente importantes, ainda que pouco esclarecidas. Tais propriedades podem definir as interações na interface entre o dispositivo e a membrana da mucosa que levam à liberação da droga no tecido. Diversas teorias têm sido usadas para explicar o comportamento dos dispositivos quando em contato com diferentes tipos de mucosas. Dentre elas destacam-se a teoria eletrônica, que define que um polímero é mucoadesivo quando este e a mucosa possuem diferentes características eletrônicas. Assim, a transferência de elétrons ocorre como um resultado da formação de uma dupla camada elétrica, levando à atração eletrostática entre superfícies de cargas opostas. Além disso, existem teorias que consideram a atração entre os dispositivos e as mucosas como resultado da formação de interações específicas, como as ligações de hidrogênio e de van der Waals. Efeitos hidrofóbicos também podem ser considerados quando os polímeros empregados na formação dos carreadores possuem natureza anfifílica. Além disso, efeitos relativos à quimissorção também podem ser observados quando fortes pontes covalentes são formadas entre o tecido-alvo e o carreador. As propriedades mucoadesivas de um polímero também são dependentes da possibilidade de penetração de macromoléculas mucoadesivas no gel do muco, levando à difusão das mucinas solúveis nos carreadores, resultando assim, na formação de uma camada de interpenetração. Tal processo é conduzido pelo gradiente de concentração e é dependente da massa molar das macromoléculas adesivas, tamanho hidrodinâmico, mobilidade, coeficiente de difusão e tempo de contato. Adicionalmente, deve-se considerar o efeito da rugosidade da superfície, que pode favorecer a adesão, pelo aumento da área de contato. Tal contribuição fica mais evidenciada especialmente em materiais altamente porosos e rugosos. Como nenhum destes mecanismos pode ser considerado isoladamente para garantir a mucoadesividade dos materiais poliméricos, os

pesquisadores têm preferido dividir o processo de adesão em fases sequenciais, sendo cada qual associada a um mecanismo. Desta forma, os polímeros primeiramente se intumesceriam e a seguir ocorreria ligação física (não-covalente) entre a interface polímero/muco. Posteriormente, seria observada a interpenetração das cadeias das proteínas e do polímero, seguida do entrelaçamento destas, formando estruturas de pontes covalentes e não covalentes entre estes materiais.

A taxa de degradação do material polimérico também é um fator bastante importante no planejamento dos sistemas de liberação controlada de agentes ativos, especialmente no que diz respeito ao uso de polímeros biodegradáveis. Sabe-se que estes materiais estão disponíveis comercialmente em diferentes composições e massas molares, o que afeta e possibilita o controle do perfil de degradação do sistema microparticulado em questão. A degradação frequentemente se dá através do processo de clivagem das cadeias poliméricas, levando à redução do tamanho da cadeia, o que acaba por induzir subsequentemente, segundo WINZENBURG *et al.* (2004), a erosão do material, devido à perda de massa do mesmo. Segundo LI *et al.* (1995), no caso de polímeros degradáveis, são propostos dois tipos de mecanismos erosivos, sendo um baseado na degradação estrutural e o outro, na superficial. No primeiro caso, a degradação se dá através da erosão de toda a secção transversal do material, devido à penetração da água, que ocorre de forma mais rápida que a própria degradação do material polimérico. Na segunda situação, a degradação do polímero é mais rápida que a penetração da água na estrutura do material. Como consequência, este tipo de estrutura acaba por ser degradada, principalmente, na sua região mais superficial. Deve-se no entanto, destacar que também ocorre uma degradação no centro do material, na presença de água, devido ao efeito catalítico de compostos como o ácido lático, gerados a partir da própria degradação do material. A Figura 3 ilustra os mecanismos de erosão descritos anteriormente. Deve-se salientar que, em geral, a maioria dos materiais poliméricos sofre a ação dos dois tipos de degradação e não somente de um tipo isolado.

Segundo COMMANDEUR *et al.* (2006), outros fatores podem também afetar o comportamento de biodegradação do polímero, tais como a sua estrutura e composição química e as condições de processamento do material polimérico. Os pós-tratamentos

(como é o caso dos processos de esterilização, que podem atuar na modificação da cristalinidade do polímero, inteferindo assim, na taxa de degradação do mesmo), além das condições e forma de acoplamento ao sítio de atuação também devem ser consideradas. Tais fatores, aliados à estrutura do material, podem levar a uma degradação diferenciada em função das condições do meio biológico em que foi implatado.

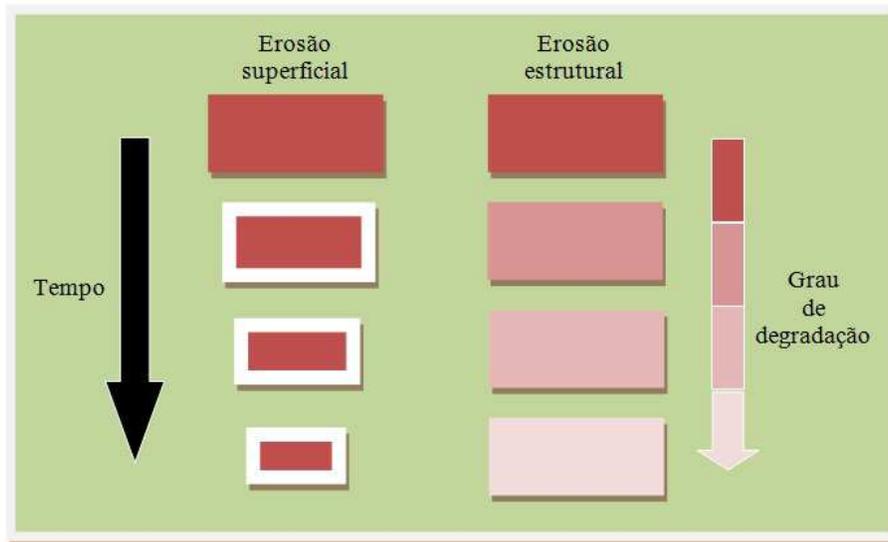


Figura 3: Mecanismos de erosão comuns em sistemas poliméricos (adaptado de WINZENBURG *et al.*, 2004).

Os dispositivos de liberação controlada à base de polímeros biodegradáveis liberam o agente ativo através de três mecanismos simultâneos, sendo estes classificados como: difusão, intumescimento seguido de posterior difusão e, por fim, erosão controlada ou degradação. O mecanismo mais rápido será responsável por controlar primordialmente a velocidade de liberação do agente ativo em questão (WINZENBURG *et al.*, 2004; COMMANDEUR *et al.*, 2006), como se pode observar na Figura 4.

Segundo COMMANDEUR *et al.* (2006), o mecanismo de difusão pode ocorrer através dos poros da matriz polimérica ou em nível molecular pela transferência de massa que ocorre pela passagem do agente ativo entre as cadeias dos polímeros. Os sistemas que

liberam o agente ativo através do intumescimento controlado estão inicialmente secos, absorvendo posteriormente água ou mesmo outros fluidos corpóreos do local de implantação, o que resulta no intumescimento da estrutura. Este tipo de processo acaba por aumentar a quantidade de solução aquosa dentro do dispositivo, o que leva a um gradual aumento dos espaços existentes na rede polimérica, fazendo com que o agente ativo se difunda para o ambiente externo através da rede polimérica intumescida.

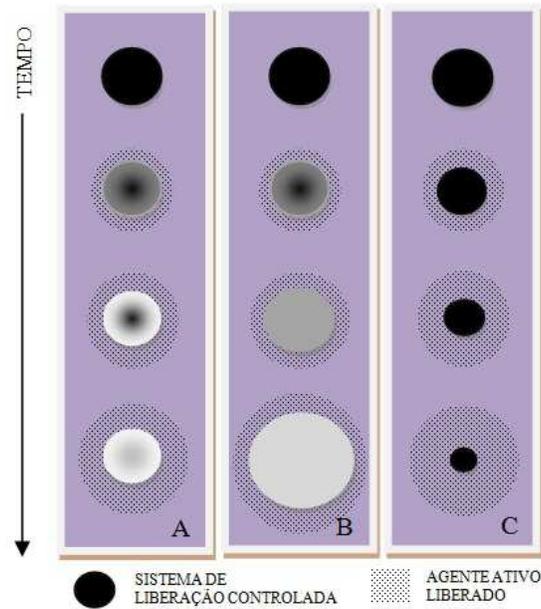


Figura 4: Mecanismos de liberação controlada de agentes ativos incorporados em partículas poliméricas biodegradáveis em que (A) ocorre o mecanismo de difusão, (B) intumescimento acoplado à difusão, (C) mecanismo de biodegradação ou erosão (adaptado de *COMMANDEUR et al.*, 2006).

No processo de biodegradação ou erosão, o processo de liberação de agente ativo se dá através do uso de dispositivos capazes de se degradarem, como resultado do processo de hidrólise das cadeias poliméricas em compostos menores e biocompatíveis, sendo que a quantidade de agente ativo liberada é proporcional à taxa de degradação do dispositivo. Tal degradação pode também ocorrer por via enzimática ou através de processos oxidativos.

Ainda de acordo com WINZENBURG *et al.* (2004), no caso de dispositivos de liberação controlada formados a partir de poli(α -hidroxiésteres) como o poli(ácido lático), poli(ácido lático-co-glicólico) e a poli(ϵ -caprolactona), a degradação se inicia após a penetração da água dentro dos dispositivos, uma vez que a quebra das pontes éster ocorre aleatoriamente via clivagem hidrolítica, levando à erosão do dispositivo. A taxa de hidrólise é controlada pela massa molar do polímero, pela proporção dos copolímeros, pela polidispersidade das cadeias dos polímeros e, por fim, pela cristalinidade da matriz. Desta forma, partindo-se do princípio que as partículas não serão removidas rapidamente do organismo em decorrência de interação com seu sistema imunológico, a degradação do material pode levar de poucas semanas a até mesmo anos. O longo tempo de degradação pode dificultar a predição do comportamento destes dispositivos à base de poli(α -hidroxiésteres), uma vez que, por estarem suscetíveis à degradação estrutural, e por sofrerem alterações na estrutura da matriz, haveria constante alteração do perfil de liberação do agente ativo ao longo do tempo.

Neste contexto, partículas formadas à base de polímeros têm recebido grande atenção para esta finalidade, uma vez que possuem grande versatilidade, podendo ser usadas como veículos na liberação de drogas por diferentes rotas, sejam elas intravascular, subcutânea, pulmonar ou oral (CHAMPION *et al.*, 2007). Dentre os materiais poliméricos frequentemente usados se destacam as formulações produzidas à base de poli(amidas), poli(aminoácidos), poli(ésteres), poli(ortoésteres), poli(uretanos) ou poli(acrilamidas) (LIMA *et al.*, 2012). Atualmente, poucos materiais poliméricos são permitidos pelas autoridades de saúde na administração de drogas para o uso parenteral. Alguns compostos receberam permissão para serem usados somente por administração oral ou tópica, ou para serem usados na indústria de alimentos (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009). A Tabela 2 contém uma lista com os polímeros mais amplamente usados na formação de carreadores empregados na liberação controlada de agentes ativos.

Dentre os compostos poliméricos, observa-se o crescente uso de polímeros biodegradáveis sintéticos, mais conhecidos como pertencentes à família dos polihidroxicanoatos, ou mais genericamente chamados de poli(α -hidroxiésteres) (PAN e INOUE, 2009). Estes compostos têm recebido especial atenção, uma vez que permitem o

desenvolvimento de diversos produtos que apresentam melhor desempenho na área de biomateriais, sendo usados nas mais variadas aplicações, como na engenharia de tecidos, suturas cirúrgicas, terapia gênica e como dispositivos de liberação controlada de agentes ativos.

Tabela 2: Materiais mais amplamente usados na formação de sistemas particulados para liberação controlada de drogas (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009).

Origem	Material
Polímeros naturais	Albumina
	Alginato
	Gelatina
	Quitosana
Homopolímeros sintéticos	Poli(ácido lático)
	Poli(ϵ -caprolactona)
	Poli(isobutilcianoacrilato)
	Poli(isohexilcianoacrilato)
	Poli(η -butilcianoacrilato)
	Poli(acrilato) e poli(metacrilato)
Copolímeros	Poli(ácido lático)-poli(etileno gicol)
	Poli(ácido lático-co-glicólico)-poli(etileno gicol)
	Poli(ácido lático-co-glicólico)
	Poli(episolon-caprolactona)-poli(etileno gicol)
	Poli(hexadecilcianoacrilato-co-poli(etileno gicol) cianoacrilato)
Estabilizadores coloidais	Dextrana
	Poli(vinil álcool)

De acordo com UEDA e TABATA (2003), os poli(α -hidroxiésteres) são produzidos por síntese intracelular por diversas bactérias ou via síntese química (DOI, 1990; LENZ e MARCHESSAULT, 2005). No caso da obtenção por via bacteriana, seus

monômeros podem ser manipulados pela alteração tanto nas fontes de carbono usadas no processo quanto por mudanças nas condições de fermentação (PAN e INOUE, 2009). Em geral, estes materiais são produzidos mais comumente através da polimerização por condensação dos α -hidroxiácidos alifáticos saturados, sendo que a primeira tentativa de uso destes compostos na área médica foi realizada em 1966 por KULKARNI *et al.* (1971), que utilizaram o poli(ácido lático) como biomaterial em próteses ósseas.

Existem atualmente mais de 100 diferentes tipos de poliésteres descritos, sendo que entre os mais usados como constituintes de sistemas de liberação controlada de drogas destacam-se o poli(ácido lático), o poli(ácido lático-co-glicólico) e por fim, a policaprolactona. Estes são os principais poliésteres que atualmente são permitidos para aplicação na área médica (PAN e INOUE, 2009), devido especialmente ao seu perfil de biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa ou inexistente toxicidade. Estes polímeros, suas características e aplicações serão abordados detalhadamente nos itens 2.3.2. a 2.3.4.

2.3.2. Poli(ácido lático)

Os primeiros polímeros à base de ácido lático foram produzidos em 1932, sendo posteriormente desenvolvidos pelas empresas Dupont e Ethicon (empresa do grupo Johnson & Johnson). No entanto, o desenvolvimento destes materiais ficou durante muito tempo restrito ao campo médico, devido aos altos custos de produção, sendo que, somente após a década de 80, observou-se o surgimento de produtos derivados destes materiais para aplicação em outras áreas (GROSS e KALRA, 2002). Dentre os principais produtores de PLA (do inglês, *poly(lactic acid)*), destacam-se a NaturalWorks, a PURAC Biomaterials, a Boehringer Ingelheim e, secundariamente, diversos produtores chineses.

O poli(ácido lático), um polímero bioabsorvível, sintetizado quimicamente pela polimerização por condensação dos isômeros L- e D-ácido lático, ou ainda por polimerização por adição do lactato, que pode ser facilmente produzido por fermentação, oriundo de fontes renováveis como amido e açúcar (PAN e INOUE, 2009). A polimerização dos monômeros opticamente puros leva à formação dos polímeros poli(L-

ácido láctico) ou PLLA e poli(D-ácido láctico) ou PDLA, e a polimerização do ácido láctico racêmico ou meso-lactato leva à formação do polímero amorfo poli(D,L-ácido láctico) ou PDLLA. A quiralidade das unidades de ácido láctico é o que permite produzir, por ajuste na fabricação do material polimérico, materiais com diferentes taxas de degradação e propriedades físicas e mecânicas distintas (DONG *et al.*, 2009). Na Figura 5 pode-se observar a estrutura básica do PLA.

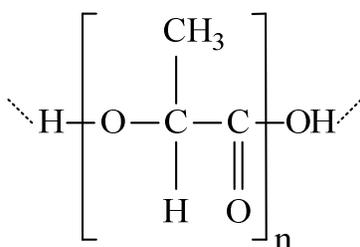


Figura 5: Estrutura química do PLA (adaptado de WINZENBURG *et al.*, 2004).

Assim, tanto o PLLA quanto o PDLA são polímeros estereorregulares semicristalinos, com temperatura de fusão (T_m) entre 173 a 178 °C, temperatura de transição vítrea (T_g) aproximada de 60 °C (PAN e INOUE, 2009) e cristalinidade variando entre 37 a 72% (DONG *et al.*, 2009). Por outro lado, o PDLLA é um polímero amorfo, devido especialmente à distribuição aleatória das unidades de L- e D-ácido láctico, o que proporciona uma taxa de degradação mais rápida que a de seus homólogos estereorregulares, sendo usado, portanto, principalmente na formação de veículos de liberação de drogas e na construção de matrizes tridimensionais usadas como suporte para o crescimento celular na área de regeneração de tecidos (DONG *et al.*, 2009; PAN e INOUE, 2009).

Desta maneira, a ampla faixa de propriedades físicas como biodegradabilidade e propriedades mecânicas do poli(ácido láctico) podem ser manipuladas pelas mudanças na estereorregularidade, por exemplo, alterando a proporção de unidades L e D-ácido láctico ao longo da cadeia. Nas últimas décadas, de acordo com PAN e INOUE (2009) e TSUJI

(2005), tem se observado, tanto do ponto de vista acadêmico quanto prático, o crescente uso dos estereocomplexos PLLA/PDLA devido à sua maior estabilidade térmica e propriedades mecânicas, quando comparados aos polímeros PLLA ou PDLA usados isoladamente. A Tabela 3 expõe as características destes polímeros.

Tabela 3: Características dos diferentes polímeros à base de poli(ácido lático) (adaptado de LU e CHEN, 2004; e PURAC, 2008).

Características	Polímero		
	Poli(L-ácido lático)	Poli(D,L-ácido lático)	
T_m (°C)	173 a 178	Amorfo	
T_g (°C)	60 a 65	55 a 60	
Módulo de elasticidade (GPa)	3,1 a 3,7	3,1 a 3,7	
Resistência à tração (MPa)	60 a 70	45 a 55	
Alongamento de ruptura (%)	2 a 6	2 a 6	
Tempo de degradação (meses) ^a	> 24	12 a 16	
Solubilidade ^b	<i>Tetrahidrofurano</i>	Não solúvel	Solúvel
	<i>Diclorometano</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Clorofórmio</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Acetato de etila</i>	Não solúvel	Solúvel
	<i>Hexafluoroisopropanol</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Acetona</i>	Não solúvel	Solúvel

^a Tempo necessário para completa perda de massa, que depende do método de processamento, da geometria do dispositivo e também do sítio de implantação

^b O limite de solubilidade é dependente da temperatura.

SÖDERGÅRD e STOLT (2002) discorreram sobre algumas das características físico-químicas do PLA. A solubilidade do PLA é altamente dependente de sua massa molar e do grau de cristalinidade. PLAs puros enantiomericamente são solúveis em solventes orgânicos fluorados e clorados, e nas dioxanas, dioxolanos e furanos, sendo

insolúveis em água, álcoois (metanol, etanol, propileno glicol) e em hidrocarbonetos não-substituídos (hexano, heptano). Quanto à miscibilidade com outros polímeros, o PLA possui a capacidade de formar blendas na presença de outros polímeros, característica esta bastante importante, uma vez que possibilita a mudança, por exemplo, nas taxas de degradação, nas características de permeabilidade, no perfil de liberação da droga e nas propriedades térmicas e mecânicas. Atualmente, muitas blendas de PLA estudadas são imiscíveis ou parcialmente miscíveis, necessitando utilizar agentes compatibilizadores para torná-las miscíveis, como é o caso das blendas de PLA e policaprolactona, que normalmente são imiscíveis, e na presença de agentes de acoplamento como o fosfato trifênil, tornam-se miscíveis.

As propriedades mecânicas do PLA podem variar de modo a produzir materiais macios e elásticos ou até mesmo materiais bastante rígidos e com alta resistência mecânica. Em casos em que altas propriedades mecânicas são desejadas, o PLA semicristalino é essencialmente preferível aos PLAs amorfos. A massa molar do polímero e o grau de cristalinidade também desempenham importante papel nas propriedades mecânicas do material. ENGELBERG e KOHN (1991) verificaram, por exemplo, que a resistência à tração do PLLA aumenta por um fator de dois quando a massa molar média aumenta de 50 para 100 kDa.

A estabilidade térmica é, em geral, bastante limitada, principalmente em elevadas temperaturas, acima de 200°C. GUPTA e DESHMUKH (1982) sugerem que a cinética de degradação do PLA deve ser considerada como de primeira ordem, sendo que as reações que estão envolvidas na degradação térmica são principalmente a termohidrólise e termoxidação. Os poliésteres aromáticos são suscetíveis à termohidrólise, devido à sua capacidade de absorver umidade. Os PLAs amorfos são altamente higroscópicos, enquanto que os PLAs semicristalinos tendem a apenas aumentar a sua massa pela absorção de pequenas quantidades de água.

A hidrólise das cadeias poliméricas, que leva à fragmentação molecular, pode ser afetada por diversos fatores tais como: a estrutura química, a massa molar e sua distribuição, pureza, morfologia, forma e histórico térmico e cristalinidade inicial do

polímero, bem como as condições em que ocorre a hidrólise (VERT *et al.*, 1991). A hidrólise do PLA é um fenômeno indesejado em certas circunstâncias, como no caso de estocagem e processamento do material, mas bastante importante em outras aplicações, como no desenvolvimento de dispositivos biodegradáveis ou em embalagens compostáveis. Em geral, as partes amorfas do polímero sofrem primeiramente o processo de hidrólise, ao passo que as regiões cristalinas demoram mais para passar por este processo, devido às mais baixas taxas de absorção de água na cadeia. Sabe-se que a temperatura também pode controlar o processo de hidrólise, uma vez que em temperaturas mais elevadas a taxa de hidrólise é aumentada, resultando também em maior flexibilidade das cadeias poliméricas, especialmente quando o processo se dá em temperaturas superiores à de transição vítrea do material (GILDING e REED, 1979). Já no estágio de degradação hidrolítica das regiões cristalinas, observa-se um aumento na taxa de perda de massa, levando assim, à completa absorção do mesmo (LI *et al.*, 1990) devido ao efeito autocatalítico ativado pelo aumento na quantidade de compostos contendo grupos carboxílicos terminais. O processo de lise gradual do material mediado por atividade biológica específica pode ser iniciado e mantido por enzimas e microorganismos (WILLIAMS, 1981), incluindo reações como hidrólise e/ou oxidação, levando à fragmentação das moléculas poliméricas. Diferentes enzimas, como a pronase, a proteinase K e a bromelina têm significativo efeito na taxa de hidrólise das cadeias poliméricas de PLLA (TOKIWA e JARERAT, 2004).

Devido às características descritas anteriormente, observa-se que o PLA tem recebido grande destaque no desenvolvimento de implantes ortopédicos bioabsorvíveis, como descrito no trabalho de AMBROSE e CLANTON (2004), e especialmente na obtenção de nanodispositivos de liberação controlada de drogas, usados principalmente na administração intravenosa, visto que estes materiais possuem alta estabilidade, podendo ser funcionais por longos períodos. Na Tabela 4 são descritos alguns destes dispositivos.

Tabela 4: Agentes ativos incorporados em partículas poliméricas biodegradáveis de PLA formadas por diferentes métodos para serem usadas na liberação controlada (adaptado de KUMARI *et al.*, 2010).

Agente encapsulado	Eficiência de encapsulação (%)	Diâmetro médio (nm)	Metodologia de formação dos dispositivos	Melhoria terapêutica	Mecanismo de liberação	Referência
Hemoglobina	87,9	164	Evaporação do solvente	Menor absorção por macrófagos	Difusão	SHENG <i>et al.</i> , 2009
Dexametasona	6,0	230	<i>Spray drying</i>	Lenta liberação da droga em até 50 horas	Difusão	GÓMEZ-GAETE <i>et al.</i> , 2008
Ácido elágico	50,0	120	Método de evaporação-difusão-emulsão	Melhoria da absorção oral	Difusão e degradação	SONAJE <i>et al.</i> , 2007
Proteína C	86,3	205	Método de emulsão	Melhoria na liberação da proteína C devido ao caráter hidrofóbico do PLA	NM	ZAMBAUX <i>et al.</i> , 1999
Zidovudina	55,0	374	Método de dupla emulsão por evaporação do solvente	Menor fagocitose	NM	MAINARDES <i>et al.</i> , 2009
Albumina de soro bovino	75,6	132	Polimerização interfacial	Maior tempo de circulação sanguínea do fármaco livre	Difusão e polidegradação	MIYAZAKI <i>et al.</i> , 2003
Oridonina	91,9	107-195	Emulsão modificada pela difusão espontânea do solvente	Liberação da droga em até 72 horas	Difusão	XING <i>et al.</i> , 2007
Neurotoxina I	35,5	65	Método de dupla emulsão por evaporação do solvente	Maior liberação do agente ativo no cérebro	Difusão	CHENG <i>et al.</i> , 2008
Savoxepina	95,0	NM	<i>Salting-out</i>	Liberação controlada da droga em até uma semana	Difusão	ALLÉMAN <i>et al.</i> , 1993
Budesonida	79,4	1300	Precipitação por fluido supercrítico	NM	Difusão	MARTIN <i>et al.</i> , 2002
Progesterona	70,0	193	Evaporação do solvente	NM	Difusão	MATSUMOTO <i>et al.</i> , 1999

NM: não mencionado

2.3.3. Poli(ácido lático-co-glicólico)

Outro composto que tem sido bastante estudado nos últimos anos é o poli(ácido lático-co-glicólico) ou PLGA (do inglês, *poly(lactic-co-glycolic acid)*), um copolímero formado a partir de mais de três diferentes monômeros de hidroxiácidos (JIANG *et al.*, 2005). O PLGA é um dos polímeros sintéticos mais populares, especialmente na área de engenharia de tecidos e no desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada, no caso, micro e nanopartículas, devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, e vem sendo empregado com sucesso em humanos (VAJDY e O'HAGAN, 2001; DONG *et al.*, 2009). Além disso, este composto é capaz de sofrer hidrólise quando submetido a condições corpóreas, produzindo como produto de degradação metabólitos monoméricos biodegradáveis, no caso, o ácido lático e o ácido glicólico, que possuem mínima toxicidade associada quando usados na constituição de biomateriais, sendo removidos do corpo através do ciclo do ácido cítrico (PANYAM e LABHASETWAR, 2003).

O PLGA é um copolímero de estrutura amorfa, visto que seus constituintes, no caso o poli(ácido lático) e poli(ácido glicólico), não são naturalmente capazes de se empacotar em uma estrutura regular (DONG *et al.*, 2009). A estrutura química do PLGA pode ser observada na Figura 6.

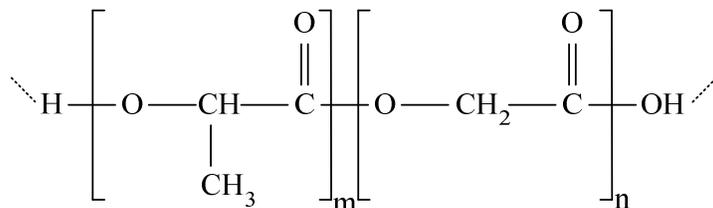


Figura 6: Estrutura química do PLGA (adaptado de WINZENBURG *et al.*, 2004).

De acordo com MUNDARGI *et al.* (2008), existem disponíveis no mercado quatro principais fornecedores de PLGA: PURAC Biomaterials; Absorbable Polymers

International, subsidiária internacional da Durect Corporation; Akermes e Boehringer Ingelheim. As formulações mais amplamente usadas são as composições de PLGA 50:50 D,L-ácido lático/glicólico, que possuem maior taxa de degradação dos polímeros (50 a 60 dias), mas também outras combinações têm sido usadas, como as de 65:35, 75:25, 80:20 e 85:15, que possuem maior tempo de vida *in vivo*. Algumas das características de dois diferentes tipos de PLGA estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Características dos polímeros de PLGA com diferentes composições de ácido lático/glicólico, sendo a proporção de 50:50 de ácido lático:glicólico para PLGA50 e 85:15 de ácido lático:glicólico para PLGA85 (adaptado de PURAC, 2008).

Características	Polímero		
	PLGA 50	PLGA 85	
T_m (°C)	Amorfo	140 a 150	
T_g (°C)	45 a 50	55 a 60	
Módulo de elasticidade (GPa)	3,4 a 3,8	3,3 a 3,5	
Resistência à tração (MPa)	40 a 50	60 a 70	
Alongamento de ruptura (%)	1 a 4	2 a 6	
Tempo de degradação (meses) ^a	1 a 2	12 a 18	
Solubilidade ^b	<i>Tetrahidrofurano</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Diclorometano</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Clorofórmio</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Acetato de etila</i>	Solúvel	Não solúvel
	<i>Hexafluoroisopropanol</i>	Solúvel	Não solúvel
	<i>Acetona</i>	Solúvel	Não solúvel

^a Tempo necessário para completa perda de massa, o que depende do método de processamento, da geometria do dispositivo e também do sítio de implantação

^b O limite de solubilidade é dependente da temperatura.

O PLGA é muito atrativo em aplicações biomédicas, sendo empregado em substituição traqueal (MENDAK *et al.*, 1984), na reconstrução de ligamentos (BERCOVY *et al.*, 1985), no reparos de fraturas (RUDOLF *et al.*, 1987), em curativos cirúrgicos (BREKKE *et al.*, 1986) e em suturas multifilamentosas (UEDA e TABATA, 2003). Além disso, especial atenção tem sido dada ao uso deste polímero na formação de sistemas particulados a serem usados na liberação controlada de agentes ativos. Algumas destas formulações já estão disponíveis comercialmente (O'HAGAN *et al.*, 1998), como é o caso do Zoladex da empresa AstraZeneca (que contém o hormônio análogo do hormônio de liberação luteinizante), Decapeptyl da empresa Ipsen Biotech (que contém o acetato de triptorelina, um análogo da gonadorelina) e Frostap SRTM da Lederle (que contém acetato de leuprolerina, outro análogo da gonadorelina), licenciadas para uso humano nos Estados Unidos, e o Pamorelin LA (que contém triptorelina) e Sanvar SR (que contém acetato de vapreotide), ambos da empresa Debiopharm, licenciados para uso na União Européia (DEBIOPHARM, 2004). De acordo com KUMARI *et al.* (2010), partículas de PLGA têm sido usadas como sistema de liberação controlada de proteínas, genes e peptídeos, sendo amplamente estudadas na nanomedicina, observando-se a aplicação destes materiais como carreadores de fatores de crescimento, nano-antígenos e vacinas. Este último tipo de aplicação tem sido bastante usado, como descrito no trabalho de ELDRIDGE *et al.* (1991), que demonstravam a fácil possibilidade de formação de partículas de PLGA menores que 10 µm, sendo estas partículas eficientemente fagocitadas pelos macrófagos. Estes resultados mostraram-se bastante interessantes, uma vez que partículas maiores, usualmente produzidas a partir de outros materiais poliméricos, têm a tendência de sofrer ruptura antes de serem fagocitadas, o que compromete a eficiência da absorção do agente ativo em questão.

Diversos são os exemplos de vacinas produzidas com partículas à base de PLGA, sendo que estas têm sido usadas com sucesso especialmente na vacinação veterinária (WINZENBURG *et al.*, 2004) contra os mais diversos patógenos, sendo eles: *Staphylococcus* (ELDRIDGE *et al.*, 1991), vírus da encefalite equina venezuelana (GREENWAY *et al.*, 1995), vírus da Parainfluenza-3 (BARR *et al.*, 1993), *Salmonella enteritidis* (HAZRATI *et al.*, 1993), *Facioloa gigantea* (ESTUNIGSIH *et al.*, 1997),

Rabies virus (ERTL e XIANG., 1996), *Salmonella thyphimurium* (ALLAOUI-ATTARKI *et al.*, 1997) e *Tetanus toxoid* (MEN *et al.*, 1995). FOSTER *et al.* (1997) prepararam com sucesso partículas de PLGA contendo um análogo do fator de liberação de hormônio de crescimento que foram administradas para gado bovino, sendo que se observou um aumento na concentração de somatotropina no soro por mais de duas semanas. No entanto, estudos complementares são necessários para determinar qual seria a concentração ideal para promover o crescimento nestes animais. Outros pesquisadores também efetuaram a encapsulação de fatores de crescimento em partículas de PLGA (DE ROSA *et al.*, 2003), e do fator de crescimento semelhante à insulina ou IGF-1 (CARRACOSA *et al.*, 2004). Alguns outros exemplos de agentes ativos que têm sido incorporados com sucesso em partículas de PLGA são mostradas na Tabela 6.

Vários fatores podem influenciar o perfil de liberação de agentes ativos quando estes são incorporados em partículas à base de PLGA (KUMARI *et al.*, 2010). Dentre estes fatores destacam-se: modificações na superfície do polímero, o método de encapsulação usado, o tamanho da partícula, sua porosidade (O'HAGAN *et al.*, 1998), aditivos adicionados durante a formulação, o tamanho do agente ativo e por fim, a proporção entre as unidades de meros de ácido lático e glicólico. Além disso, deve-se levar em consideração que a maioria dos dispositivos de PLGA raramente possui cinética de liberação de ordem zero, tendo como principal característica a liberação de drogas em três estágios (BALA *et al.*, 2004).

De acordo com MUNDARGI *et al.* (2008), o PLGA tem sido usado extensivamente no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas macromoleculares, apesar deste polímero ter um efeito negativo sobre a estabilidade de proteínas, e não ser tão adequado para drogas e moléculas bioativas, seja durante a preparação ou mesmo durante o processo de estocagem, devido a sua degradação de natureza ácido-catalítica. O processo de degradação leva à acumulação de monômeros ácidos, no caso, ácido lático e glicólico, que acabam por reduzir o pH do meio, levando a possíveis processos de desnaturação. Além disso, as condições de processamento das micropartículas podem acarretar alterações na estrutura secundária das proteínas.

Tabela 6: Diferentes compostos incorporados em partículas poliméricas biodegradáveis de PLGA produzidas por métodos distintos (adaptado de KUMARI *et al.*, 2010).

Agente Encapsulado	Eficiência de encapsulação (%)	Diâmetro médio (nm)	Metodologia de formação das partículas	Melhoria Terapêutica	Mecanismo de liberação	Referência
Taxol	100	370	Extração-evaporação do solvente de uma emulsão simples	Baixa liberação da droga em até 20 dias	Difusão, intumescimento e erosão da matriz	MU e FENG (2003)
Paclitaxel	>90	117-160	Deposição polimérica interfacial	Maior eficiência antitumoral comparada à da droga livre	Dissolução e difusão	FONSECA <i>et al.</i> (2002)
Taxol	70	190	Emulsão simples	Maior inibição do crescimento de tumores	Difusão	DANHIER <i>et al.</i> (2009)
Estradiol	48-75	116-279	Método de evaporação-difusão-emulsão	Aumento da biodisponibilidade	Difusão e degradação da matriz	SAHANA <i>et al.</i> (2007)
9-Nitrocampotecina	33	207	Nano-precipitação	Liberação controlada em até 160 horas	Difusão	DERAKHSHANDEH <i>et al.</i> (2007)
Xantonas	77	154-164	Substituição do solvente	Lenta liberação da droga em até 4 horas	Partição entre meio aquoso externo e núcleo oleoso	TEIXEIRA <i>et al.</i> (2005)
Docetaxol	87	200	Método de evaporação-difusão-emulsão	Maior absorção celular sem modificação das partículas	Difusão e erosão da matriz	ESMAEILI <i>et al.</i> (2008)
Deslorelina	62,5	13800	Precipitação em fluido supercrítico	NM	NM	KOUSHIK e KOMPELLA (2004)
Timopentina	31	145-239	Evaporação do solvente	Aumento da bioadesão intestinal	NM	YIN <i>et al.</i> (2007)
Dexametasona	6	185-276	Evaporação do solvente	Lenta liberação da droga em até 50 horas	Difusão	GÓMEZ-GAETE <i>et al.</i> (2007)
SR-2508 (Etanidazol)	20	90-190	Evaporação do solvente	Droga manteve sua bioatividade e sensibilizou células tumorais à radiação	Mecanismo de ruptura	JIN <i>et al.</i> (2008)

NM: não mencionado

Desta forma, para superar os problemas associados com a degradação antecipada e encapsulação da proteína, diversas modificações têm sido efetuadas, tais como o recobrimento do agente ativo com outros materiais como alginato, quitosana (ZHENG, 2004), pectina (LIU *et al.*, 2004), gelatina (MARTÍNEZ-SANCHO e HERRERO-VANRELL, 2004) e poli(vinilálcool) (PATIL, 2004), entre outros.

2.3.4. Poli(ϵ -caprolactona)

A poli(caprolactona) ou PCL (do inglês, *poly(ϵ -caprolactone*)) também tem se destacado quanto às suas possibilidades de uso na área de biomateriais (LU e CHEN, 2004; DUARTE *et al.*, 2010). Este composto é um poliéster alifático, formado por unidades repetidas de hexanoato (LABET e THIELEMANS, 2009), ou seja, é um polímero linear (GORRASI *et al.*, 2010), que contém um grupamento éster polar e cinco grupamentos metileno não-polares (WEI *et al.*, 2009). Constitui-se de um polímero semi-cristalino que, de acordo com GORRASI *et al.* (2010), possui como principais limitações a sua alta cristalinidade, entre 45 a 69% (DONG *et al.*, 2009), e baixa temperatura de fusão (T_m), sendo que suas propriedades físicas, mecânicas e também térmicas são extremamente dependentes de sua massa molar e do grau de cristalinidade (LABET e THIELEMANS, 2009).

Existem, atualmente, três métodos de preparação de PCL, sendo eles o método de condensação do ácido 6-hidroxicapróico (GORRASI *et al.*, 2010), o método de polimerização por abertura do anel de ϵ -caprolactona (SINHA *et al.*, 2004) e através da polimerização enzimática usando meio supercrítico (COMIM *et al.*, 2012). Segundo LABET e THIELEMANS (2009), poucos trabalhos descrevem o primeiro método em detalhes, sendo mais usual a produção de PCL via abertura de anel, pois esta abordagem proporciona a formação de polímeros com alta massa molar e baixa polidispersidade. A estrutura química da PCL é mostrada na Figura 7.

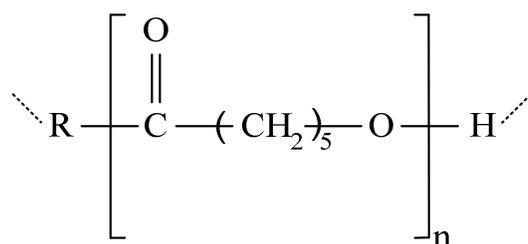


Figura 7: Estrutura química da ϵ -policaprolactona (adaptado de WINZENBURG et al., 2004).

De acordo com SINHA *et al.* (2004), a PCL foi primeiramente identificada e caracterizada quanto às suas propriedades de biodegradabilidade em 1973, sendo que a principal característica deste polímero é o fato de que, quando comparado a outros compostos da mesma categoria, este apresenta perfil adequado no emprego como carreador de drogas que necessitem ser liberadas por longos períodos.

As blendas poliméricas formadas pela associação destes materiais podem ser divididas em três tipos, miscíveis, mecanicamente compatíveis e não miscíveis. As blendas miscíveis apresentam somente uma temperatura de transição vítrea. As mecanicamente compatíveis, por outro lado, mantêm os valores de Tg de cada polímero isolado, apresentando assim, em algumas situações, propriedades mecânicas superiores às das demais blendas. Por fim, há as blendas do tipo não miscíveis, que em geral apresentam melhores propriedades de reforço mecânico. As propriedades mecânicas das blendas podem ser controlada através das proporções de cada um dos polímeros usados, o que pode ser empregado como um recurso prático no controle da permeabilidade dos sistemas de liberação de agentes ativos. As propriedades da PCL e de sua blenda com PLA na proporção 70/30 são mostradas, mais detalhadamente, na Tabela 7.

Tabela 7: Características do polímero PCL e da blenda poli(L-ácido lático/ ϵ -caprolactona) 70/30 (adaptado de LU e CHEN, 2004; SINHA *et al.*, 2004; PURAC, 2008; LABET e THIELEMANS, 2009).

Características	Polímero		
	PCL	PLA/PCL 70/30	
T_m (°C)	58 a 63	110 a 120	
T_g (°C)	-65 a 60	15 a 25	
Módulo de elasticidade (GPa)	0,21 a 0,44	0,02 a 0,04	
Resistência à tração (MPa)	0,4	18 a 22	
Alongamento de ruptura (%)	20 a 1000	>100	
Tempo de degradação (meses) ^a	>24	12 a 24	
Solubilidade ^b	<i>Tetrahidrofurano</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Diclorometano</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Clorofórmio</i>	Solúvel	Solúvel
	<i>Acetato de etila</i>	Pouco solúvel	Solúvel
	<i>Hexafluoroisopropanol</i>	Não solúvel	Solúvel
	<i>Acetona</i>	Pouco solúvel	Não solúvel

^a Tempo necessário para completa perda de massa, o que depende do método de processamento, da geometria do dispositivo e também do sítio de implantação

^b O limite de solubilidade é dependente da temperatura.

A degradação do PCL em comparação com o poli(ácido glicólico) e outros polímeros é lenta (SINHA *et al.*, 2004), tornando-o um material mais adequado a dispositivos que necessitem ser degradados por períodos de mais um ano. No entanto, a biodegradação deste polímero pode ser melhorada quando associada a outros copolímeros (WAN *et al.*, 2009), como o poli(ácido lático) e o poli(ácido glicólico). Devido à presença de grupos éster instáveis na sua estrutura, a PCL pode ser degradada quando submetida a condições fisiológicas (WEI *et al.*, 2009). Segundo SINHA *et al.* (2004) e WEI *et al.* (2009), este processo pode ser dividido em três etapas. A primeira delas é a degradação da

fase amorfa, que leva ao aumento da fração cristalina do polímero. Na segunda fase, ocorre a clivagem das pontes éster, o que resulta na perda de massa do polímero, uma vez que, como resultado da cisão das cadeias de baixa massa molar (LABET e THIELEMANS, 2009), são produzidos fragmentos menores, que se difundem para fora do polímero, aumentando assim, a probabilidade de serem eficientemente fagocitados. De acordo com JOSHI e MADRAS (2008), na terceira fase usualmente observa-se a clivagem das cadeias terminais em condições de altas temperaturas (325-375°C), e a cisão aleatória, em mais baixas temperaturas (250 a 300°C), como pode ser observado na Figura 8. Por fim, o produto de biodegradação da PCL, quando se usa este polímero em condições fisiológicas (LINCE *et al.*, 2008), é o ácido 6-hidroxicapróico, pode ser absorvido ou mesmo removido, através do ciclo do ácido tricarboxílico (WAN *et al.*, 2009).

De acordo com AGARWAL e SPEYERER (2010), há muitas aplicações da PCL, sendo que o campo de atuação deste polímero não se restringe apenas à área de formação de dispositivos de liberação controlada de drogas, ainda que a maior parte dos trabalhos se restrinja a este campo de investigação, como mostrado mais detalhadamente na Tabela 8.

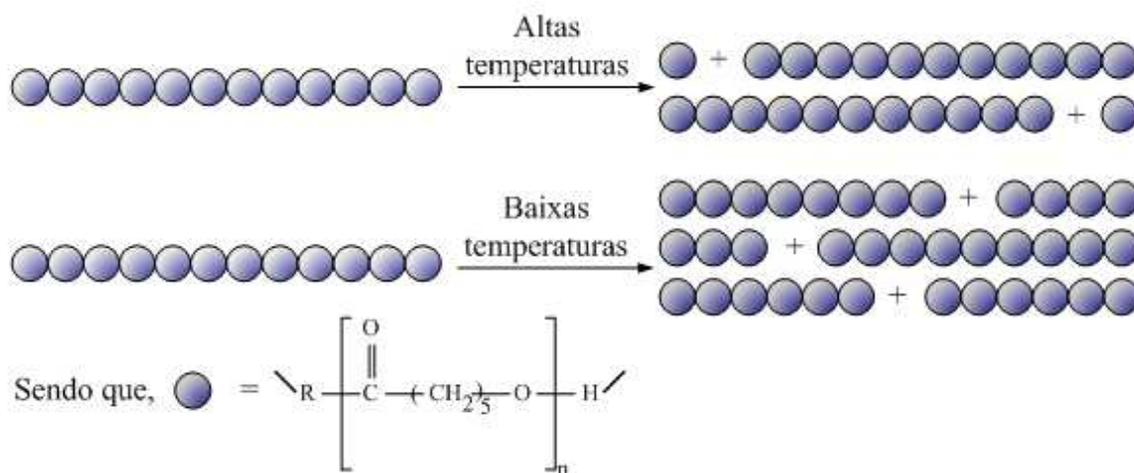


Figura 8: Clivagem das cadeias poliméricas da PCL a diferentes temperaturas (adaptado de LABET e THIELEMANS, 2009).

Tabela 8: Compostos diversos incorporados em partículas poliméricas biodegradáveis de PCL produzidas por diversos métodos (adaptado de SINHA *et al.*, 2004; KUMARI *et al.*, 2010).

Agente encapsulado	Eficiência de encapsulação (%)	Diâmetro médio (nm)	Metodologia de formação das partículas	Melhoria Terapêutica	Mecanismo de liberação	Referência
Tamoxifen	90	150-250	Substituição do solvente	Tumor tornou-se alvo preferencial da droga	NM	SHENOY e AMIJI (2005)
Clonazepam	73-95	45-210	Evaporação do solvente	Perfil de liberação da droga pode ser modulado pela introdução de polímeros termosensíveis	Difusão	CHOI <i>et al.</i> (2006)
Saquinavir	60	200	Substituição do solvente	Altas concentrações intracelulares da droga	Difusão	SHAH e AMIJI (2006)
Taxol	21	54-130	NM	Alta liberação da droga	NM	KIM e LEE (2001)
Insulina	96	358	Emulsão	Preservação da atividade biológica da insulina	Difusão	DAMGE <i>et al.</i> (2007)
Docetaxel	90	100	NM	Alto efeito antitumorigênico	Difusão	ZHENG <i>et al.</i> (2010)
Vinblastina	48	213-227	Evaporação do solvente	Lenta liberação da droga em até 20 dias	Difusão	PRABU <i>et al.</i> (2009)
Cetoprofen	NM	30000	NM	Rápida liberação da droga	Difusão	GUZMAN <i>et al.</i> (1996)
Ciclosporina	98	2500	Evaporação do solvente	Alta estabilidade das partículas oferece possibilidade do uso de outras rotas de administração	NM	ABERTURAS <i>et al.</i> , (2002)
L-metadona	13-16	NM	Evaporação do solvente	Mais lenta liberação da droga	Difusão	CHA e PITT (1988)
β -estradiol	20	5000-150000	Precipitação	Lenta liberação da droga em longos períodos de tempo	NM	BUNTNER <i>et al.</i> (1998)

NM: não mencionado

Também se observa o seu uso na agricultura, aplicações na medicina (por exemplo, como implantes), nas áreas farmacêutica (BALMAYOR *et al.*, 2009) e ambiental, na formação de materiais com características mais adequadas para a indústria de alimentos, ou mesmo na produção de embalagens (GROSS e KALRA, 2002), devido a suas características de cristalinidade e a sua transparência (AGARWAL e SPEYERER, 2010). No entanto, o maior uso da PCL é ainda na formação de carreadores de drogas, visto que, como descrito por SINHA *et al.* (2004), este polímero é capaz de formar estruturas que permitem alta permeação de drogas de pequeno tamanho, devido à sua capacidade de, quando degradado, não gerar acidificação do ambiente (quando comparado aos produtos de degradação tanto do PLA quanto do PLGA), e por fim, à sua habilidade de formar blendas.

2.4. Metodologias utilizadas na produção de dispositivos particulados para a liberação controlada de agentes ativos

Diversos métodos são usados na formação de partículas a base de polímeros sintéticos para uso como dispositivos de liberação controlada. Dentre estes, pode-se citar o método de *Spray Drying*. Este método consiste em dispersar o agente ativo em uma solução polimérica que é posteriormente aspergida com simultânea evaporação do solvente em alta velocidade, levando à formação das partículas. Esta técnica, apesar de bastante eficiente, pode levar à degradação do agente ativo a ser incorporado, devido às forças mecânicas e altas temperaturas de secagem empregadas, sendo esta, portanto, a principal limitação da técnica (THAKKAR *et al.*, 2009).

A outra abordagem usada na formação de partículas se dá através do método de emulsão com evaporação ou separação em duas fases do solvente. Faz-se inicialmente a solubilização do material polimérico e do agente ativo em um solvente orgânico (SILVA *et al.*, 2003). Posteriormente, a mistura é dispersa em uma solução aquosa, seguida de agitação intensa para formação da emulsão. Ao fim, realiza-se a separação da fase aquosa, que leva à formação das partículas poliméricas. Apesar desta técnica ser bastante usual e

ser relativamente simples, tanto a agitação intensa, quanto o contato do agente ativo com o solvente orgânico, que pode ser tóxico, além das dificuldades de se remover completamente o solvente residual, bem como a temperatura de evaporação do solvente, podem vir a ser bastante problemáticas. Possível desnaturação do agente a ser incorporado poderia ocorrer, o que, do ponto de vista da aplicação final, comprometeria as características físico-químicas da droga. Uma alternativa a este tipo de metodologia é a extração de emulsões via fluido supercrítico. Este método é capaz de reduzir a quantidade de resíduos do processo, minimizando os custos, além de combinar a flexibilidade da formação de partículas usando diferentes sistemas à base de emulsões com a eficiência da larga escala à capacidade da extração contínua oriunda dos fluidos supercríticos (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2006).

O método de extrusão também tem sido bastante empregado na formação de partículas (SILVA *et al.*, 2003). Este método consiste da produção de partículas através da injeção do material do núcleo (que pode estar na forma líquida, fundido ou em solução) através de uma seringa ou capilar, de modo a formar pequenas gotículas, sendo o tamanho destas dependente do diâmetro do orifício, da velocidade de saída do material e da tensão interfacial entre solvente, líquido receptor, etc. A solidificação do material, neste caso, se dá através da evaporação ou difusão do solvente, ou mesmo através de reação química.

O método conhecido como *Hot-melt*, oriundo da indústria do plástico, também tem sido bastante usado na formação de formulações farmacêuticas, pois permite a formação de carreadores de drogas sem que seja necessário o uso de solventes orgânicos. Neste caso, as partículas são obtidas através do arrefecimento de gotas fundidas, que podem ser obtidas por emulsificação (SILVA *et al.*, 2003). A dissolução dos agentes bioativos sólidos é dependente das características físico-químicas dos carreadores usados, dentre os quais destacam-se o polietileno glicol e polivinilpirrolidona (usados especialmente para drogas que demandem perfil de liberação imediato) e copolímero de ácido metacrílico, etilcelulose ou policaprolactona para os casos em que se deseja a liberação controlada da droga (KALIVODA *et al.*, 2012). No entanto, esta técnica tem sua aplicação limitada ao uso de materiais poliméricos e substâncias ativas que sejam preferencialmente termoestáveis, já que as altas temperaturas poderiam vir a degradar os agentes ativos a serem incorporados nas micropartículas (THAKKAR *et al.*, 2009).

Para transpor estes problemas, a metodologia de formação de partículas via tecnologia de fluidos supercríticos tem se mostrado uma alternativa atraente, sendo as suas características e implicações descritas mais detalhadamente no item 2.4.1.

2.4.1. Formação de dispositivos de liberação controlada através de tecnologia de fluidos supercríticos

A tecnologia de fluidos supercríticos já é conhecida desde o século XIX, visto que era usada como ferramenta para estudar os processos de mineralização natural. No entanto, o uso acentuado desta tecnologia ganhou maior força a partir do começo dos anos 80 do século XX (BYRAPPA *et al.*, 2008).

As primeiras observações quanto às potencialidades do uso dos fluidos supercríticos foram constatadas por ZOSEL (1971), que notou que a cafeína poderia ser facilmente extraída, em um tempo relativamente curto, de grãos de café verdes, utilizando para isso temperaturas moderadas e tendo como uma vantagem adicional o uso do CO₂ supercrítico como solvente do processo.

As características dos fluidos supercríticos têm sido estudadas ao longo de mais de cem anos, mas somente a partir da década de 70 os solventes supercríticos têm sido abordados, de forma mais ativa, na área de pesquisa (MCHUGH e KRUKONIS, 1994). Assim, com o advento da *Química Verde*, no início dos anos 90, a tecnologia de fluidos supercríticos de fato se popularizou, pois é uma tecnologia ambientalmente mais aceitável em comparação àquelas que envolvem solventes orgânicos, até então mais amplamente usadas nas indústrias químicas, apesar de seus efeitos adversos e já bem conhecidos (BYRAPPA *et al.*, 2008).

Desta forma, deu-se início ao uso desta tecnologia nos mais variados campos de aplicações industriais, tais como: produção de cerâmicas, síntese de moléculas orgânicas complexas, fracionamento de compostos quimicamente similares, produção de aerogéis e

espumas, processamento de polímeros e de sistemas e materiais micro e nanoestruturados (PASQUALI *et al.*, 2006), gerenciamento de resíduos (KANG *et al.*, 2008), adsorção, cristalização (YEO e KIRAN, 2005), produção de pigmentos, nutracêuticos e na indústria petrolífera (YASUJI *et al.*, 2008). O grande interesse do uso da tecnologia de fluidos supercríticos pode ser facilmente constatado pela crescente quantidade de artigos científicos e de patentes que têm surgido a cada ano, como pode ser observado através da Figura 9.

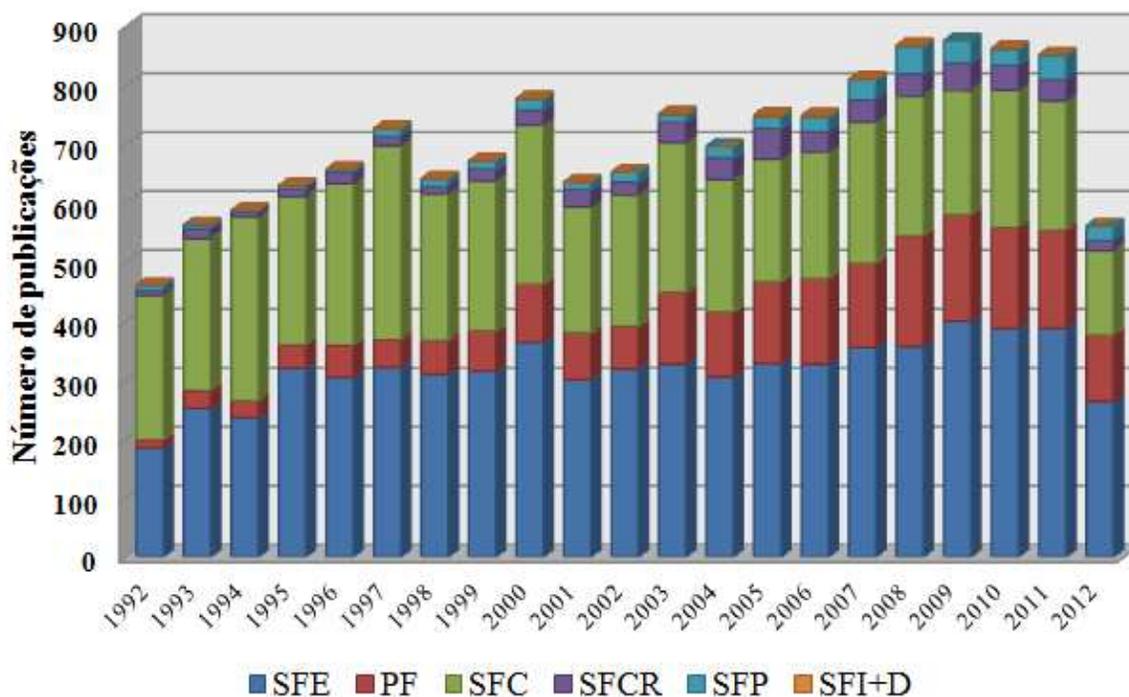


Figura 9: Número de publicações nos últimos 20 anos que fazem uso de tecnologias supercríticas, em que SFE: Extração com Fluido Supercrítico; PF: Formação de Partículas via Fluido Supercrítico; SFC: Cromatografia Supercrítica; SFCR: Reações Químicas em Ambiente Supercrítico; SFP: Purificação em Fluido Supercrítico e SFI+D: Impregnação e Deposição via Fluido Supercrítico (dados extraídos de pesquisa realizada na WEB OF KNOWLEDGE, 2012 até o mês de agosto de 2012).

A tecnologia de fluidos supercríticos está fundamentada no fato de que toda substância pura possui um valor específico de pressão crítica (P_{cr}) e temperatura crítica

(T_{cr}). Assim, por definição, o fluido em que a temperatura e pressão estão simultaneamente maiores que o ponto crítico é conhecido de Fluido Supercrítico (FSC). As propriedades físico-químicas do fluido supercrítico estão compreendidas entre as de um líquido e as de um gás, o que possibilita, por exemplo, que estes sejam capazes de espalhar-se facilmente em uma dada superfície, em consequência da sua reduzida tensão superficial. Ao mesmo tempo, FSCs são capazes de agir como solvente, ao contrário do que acontece com os gases. Na Figura 10 pode-se observar o diagrama de fases de um componente puro na região supercrítica.

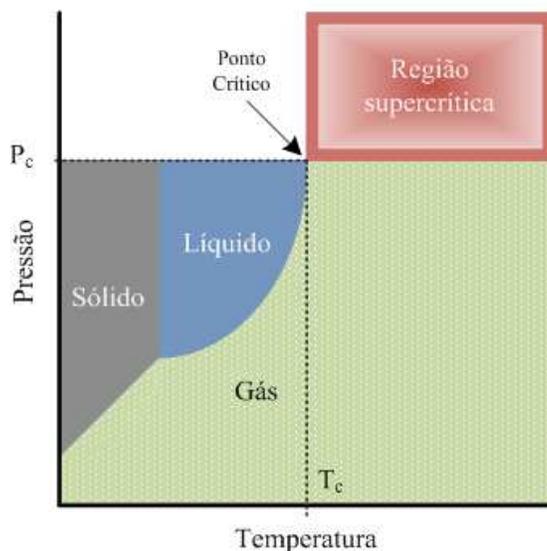


Figura 10: Diagrama de fases de temperatura versus pressão de um composto puro com indicação da região supercrítica (adaptado de MAYO e KOMPELLA, 2007).

De acordo com BRUNNER (2005), na fase supercrítica, observa-se que a pressão do sistema é suficiente para evitar que a substância se torne vapor, mas a alta temperatura permite que haja grande mobilidade molecular. A temperatura também atua como agente de controle para que a substância não se torne líquida, ao mesmo tempo que a pressão limita o grau de mobilidade molecular. De modo geral, a substância na região supercrítica pode se comportar tanto como um líquido como um gás, mas na verdade, não é nenhum dos dois. O

poder de dissolução do fluido supercrítico será dependente da pressão e temperatura, visto que à medida em que aumenta a pressão, maior é o poder de dissolução, que é bastante semelhante ao poder de dissolução de um líquido. Nesta situação, o fluido apresenta maior difusividade e menor viscosidade que os líquidos. Além disso, os fluidos supercríticos tendem a apresentar significativa característica de solvente quando comprimidos à densidades próximas de líquidos. Isso é bastante interessante, uma vez que intuitivamente sabe-se que os gases tipicamente não são considerados solventes. O ajuste operacional (pressão e temperatura) na região supercrítica pode ser usado para regular a densidade do fluido, que por consequência modifica a força do solvente. Adicionalmente às suas características de solubilidade bastante particulares, os fluidos supercríticos possuem outras características físicoquímicas bastante atrativas, tais como a sua baixa tensão superficial que permite uma fácil penetração em materiais microporosos (McHUGH e KRUKONIS, 1994). De acordo com BRUNNER (2005), no estado supercrítico, as densidades são próximas às dos líquidos, enquanto que a viscosidade é similar à de gases normais e a difusividade tem magnitude de cerca de duas vezes maior do que a de líquidos típicos, como pode ser observado através da Tabela 9.

A seleção cuidadosa do fluido supercrítico a ser usado em uma determinada aplicação pode contribuir para reduções significativas do tempo de processo, bem como na melhoria da eficiência do mesmo (MAYO e KOMPELLA, 2007). Há diversos compostos que podem ser usados como fluidos supercríticos no processamento de substâncias com aplicação nas mais diferentes áreas. Apesar dos constantes esforços no estudo desta tecnologia, poucos compostos são efetivamente usados como fluidos supercríticos. A maioria destes compostos, como a água, têm temperaturas críticas muito elevadas, o que seria incompatível com várias moléculas de interesse, como por exemplo as farmacêuticas (PASQUALI *et al.*, 2008). A Tabela 10 mostra as propriedades críticas de alguns compostos costumeiramente usados como FSC.

Tabela 9: Características físico-químicas típicas de fluidos supercríticos quando comparados com substâncias puras na fase líquida e gasosa (adaptado de BRUNNER, 2005).

Estado da substância		Densidade (g/cm ³)	Difusividade (cm ² /s)	Viscosidade (g/cm.s)
Gás				
P = 1 atm	T = 15-30 ° C	(0,6 – 2,0) x 10 ⁻³	0,1 – 0,4	(0,6 – 2,0) x 10 ⁻⁴
Líquido				
P = 1 atm	T = 15-30 ° C	0,6 – 1,6	(0,2 – 2,0) x 10 ⁻⁵	(0,2 – 3,0) x 10 ⁻²
Fluido supercrítico				
P = P _{cr}	T ≈ T _{cr}	0,2 – 0,5	0,7 x 10 ⁻³	(1 – 3) x 10 ⁻⁴
P = 4P _{cr}	T ≈ T _{cr}	0,4 – 0,9	0,2 x 10 ⁻³	(3 – 9) x 10 ⁻⁴

Tabela 10: Parâmetros críticos de moléculas usadas como fluidos supercríticos (adaptado de CAUDELL, 1999; ARAI *et al.*, 2002; PASQUALI *et al.*, 2008).

Composto	T _{cr} (K)	P _{cr} (bar)
Ar	151	49
CHF ₃	300	47
CO ₂	304	73
C ₂ H ₆	305	48
C ₃ H ₈	369	42
H ₂ O	647	218
N ₂ O	309	41
NH ₃	406	111
SF ₆	318	38
Xe	290	58

O CO₂ é atualmente o solvente mais usado em aplicações supercríticas. Este composto possui baixo custo (KANG *et al.*, 2008), ao contrário de substâncias como o argônio (usado na extração de hidrocarbonetos de petróleo do solo, de acordo com LIANG e TILOTTA, 1998) e xenônio (usado como fase móvel na cromatografia supercrítica capilar, de acordo com RAYNOR *et al.*, 1989, e como solvente para dispersões coloidais estáveis, de acordo com KRUKONIS *et al.*, 1984), que são onerosos e necessitam de maior refrigeração para alcançarem o ponto crítico, de modo a apresentar densidades consideráveis. É quimicamente inerte (MAYO e KOMPELLA, 2007) e não inflamável, o que o torna mais atraente que substâncias como o etano (que é inflamável). O dióxido de carbono também é conhecido por possuir baixa toxicidade (CHEN *et al.*, 2007; YASUJI *et al.*, 2008), quando comparado com amônia, trifluorometano, óxido nitroso e hexafluoreto de enxofre, que são bastante tóxicos. O CO₂ é abundante (MAYO e KOMPELLA, 2007), além de ser ambientalmente aceitável e seguro (BAHRAMI e RANJBARIAN, 2007). Além das características citadas anteriormente, o CO₂ possui como vantagem adicional o fato de sua polaridade poder ser facilmente manipulada, através da adição de pequenas quantidades de solventes como álcoois, ésteres e cetonas (MAYO e KOMPELLA, 2007).

Nos últimos vinte anos de uso da tecnologia de fluidos supercríticos, com o emprego de CO₂ como fluido supercrítico, destaca-se o crescente número de trabalhos que fazem uso desta técnica e os processos de nucleação e crescimento para a obtenção de partículas que são comumente usadas como dispositivos de liberação controlada de agentes ativos, destinados especialmente para a indústria farmacêutica (YEO e KIRAN, 2005).

Os métodos de produção de partículas via tecnologia de fluido supercrítico sofreram, ao longo do tempo, modificações e compreendem três principais categorias (PASQUALI *et al.*, 2008), que são o uso do fluido supercrítico como um solvente, como um anti-solvente ou como um soluto no processo. A Tabela 11 sumariza brevemente as características e as variações de cada um destes tipos de processos, que são mais detalhadamente discutidos a seguir.

Tabela 11: Características de processamento usando diferentes metodologias de produção de partículas via tecnologia de fluidos supercríticos (adaptado de YEO e KIRAN, 2005).

Forma de atuação do fluido supercrítico	Processo	Forma de atuação do solvente orgânico	Forma de indução da separação de fases
Anti-solvente	ASES	Solvente	Solvente
	PCA	Solvente	Solvente
	SAS	Solvente	Solvente
	GAS	Solvente	Solvente
	SEDS	Solvente/não-solvente	Solvente
	SFEE	Solvente	Solvente
Soluto	PGSS	-	Solvente/Temperatura/Pressão
Solvente	RESS	Co-solvente*	Temperatura/Pressão

ASES: Sistema de extração do solvente por aerossol; PCA: precipitação a partir do anti-solvente comprimido; SAS: precipitação pelo anti-solvente supercrítico; GAS: gás como anti-solvente; SEDS: dispersão da solução expandida pelo fluido supercrítico; SFEE: Extração de emulsões por fluidos supercríticos; PGSS: precipitação de soluções saturadas de gás e RESS: expansão rápida da solução supercrítica. * pode ser ou não utilizado.

2.4.1.1. Uso do fluido supercrítico como solvente

Dentre os métodos usados na formação de partículas destaca-se o processo conhecido como expansão rápida da solução supercrítica ou simplesmente pela abreviação RESS (do inglês, *rapid expansion of supercritical solutions*), que foi primeiramente patentado, nos Estados Unidos, no ano de 1986 (SMITH, 1986). Desde que foi proposto, este método tem sido usado nas mais variadas aplicações, especialmente no que diz respeito à formação de filmes poliméricos, fibras e micropartículas (KOMPELLA e KOU SHIK, 2001). Esta técnica é também especialmente usada em casos em que os materiais poliméricos empregados e os solutos possuem algum grau de solubilidade no fluido supercrítico (YEO e KIRAN, 2005).

O equipamento típico usado no processo de formação de partículas via RESS é mostrado na Figura 11, consistindo basicamente da unidade de alimentação de CO₂, da unidade de extração (onde ocorre a dissolução do soluto no fluido supercrítico) e da unidade de precipitação (responsável pela formação das micropartículas em consequência da rápida supersaturação do sistema) (MISHIMA, 2008).

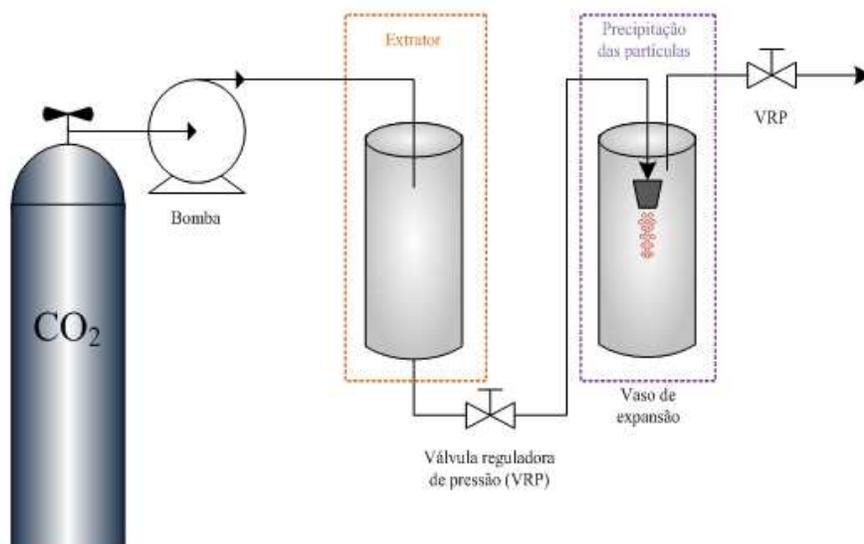


Figura 11: Equipamento típico de RESS (adaptada de KOMPELLA e KOUSHIK, 2001; VEMAVARAPU *et al.*, 2005; BYRAPPA *et al.*, 2008; MISHIMA, 2008).

O processo consiste primeiramente no aquecimento e pressurização do gás, que é então injetado na unidade de extração, podendo ocorrer a saturação do mesmo com o substrato de interesse (PASQUALI *et al.*, 2008). Em seguida, de acordo com MARTÍN e COCERO (2008), promove-se uma repentina despressurização pelo uso de um bico injetor ou de um capilar, com diâmetro interno típico de 25 a 150 μm (KOMPELLA e KOUSHIK, 2001; MAYO e KOMPELLA, 2007), que provoca a rápida expansão da solução supercrítica, produzindo, assim, uma grande diminuição na densidade do fluido (PASQUALI *et al.*, 2008), bem como em sua temperatura. Isto causa a precipitação do soluto, através da nucleação do substrato na forma de pequenas partículas que são posteriormente coletadas (BYRAPPA *et al.*, 2008).

De acordo com KOMPELLA e KOUSHIK (2001), o processo de RESS pode produzir partículas com uma faixa de tamanho de poucos micrômetros até centenas de micrômetros, sendo que a morfologia das mesmas, bem como o seu grau de cristalinidade, são consequência da estrutura molecular do material (BYRAPPA *et al.*, 2008) e dos parâmetros usados no processo. Segundo PASQUALI *et al.* (2006) e PASQUALI *et al.* (2008), os parâmetros de processo podem ser divididos conforme às fases de pré e pós-expansão. Os primeiros são função da temperatura e pressão do vaso de extração, que influenciam a cinética de nucleação, alterando a densidade do fluido supercrítico, e conseqüentemente, a concentração na pré-expansão. No entanto, deve-se salientar que a concentração de pré-expansão é dependente do fluido supercrítico, bem como da natureza do soluto (que pode ser cristalino ou amorfo, na forma de compósito ou mesmo puro), e por fim, da existência ou não de co-solventes no sistema. Desta forma, segundo PHILLIPS e STELLA (1993), quanto mais longa a fase de pré-expansão, mais estreito será o perfil de distribuição das partículas formadas. Já as condições de pós-expansão referem-se à temperatura, tamanho, distância e geometria do bico injetor, do ângulo de impacto da superfície do jato produzido e da polidispersidade da massa molar do polímero, quando este é usado (BYRAPPA *et al.*, 2008; PASQUALI *et al.*, 2008). Quando o processo de despressurização é realizado em um vaso em que o solvente encontra-se na fase líquida, o método é então denominado como RESOLV (do inglês, *rapid expansion of a supercritical solution into a liquid solvent*).

Dentre as principais vantagens do uso do fluido supercrítico como solvente do processo para a formação de partículas destaca-se a possibilidade de se produzir partículas poliméricas que apresentam diferentes densidades e rugosidades pela alteração na cinética de evaporação do fluido supercrítico, sendo portanto, capazes de encapsular proteínas, especialmente em casos em que não se faz uso de co-solventes orgânicos (TANDYA *et al.*, 2007). Em alguns casos, ainda segundo TANDYA *et al.* (2007), este método pode mostrar-se como o mais vantajoso processo de obtenção de partículas via fluido supercrítico, por oferecer simultaneamente tanto a redução do tamanho das partículas como altas taxas de incorporação da substância ativa, sem que se tenha preocupações quanto à possibilidade da presença de solventes orgânicos residuais. Além disso, é possível neste processo o uso de

temperaturas moderadas (MARTÍN e COCERO, 2008), tipicamente inferiores a 80 °C. Por fim, há como vantagem adicional a simples e relativa facilidade de implantação do processo em pequenas escalas, quando se faz uso de um único injetor (PASQUALI *et al.*, 2006). No entanto, segundo PASQUALI *et al.* (2006), sua extrapolação para maiores escalas, com o uso de múltiplos bicos injetores pode ser bastante problemática, ainda que, segundo estes autores, existam trabalhos que demonstram sucesso na ampliação de escala do processo.

Já entre as principais desvantagens do uso deste tipo de processo para a formação de partículas destaca-se a baixa solubilidade de produtos farmacêuticos em CO₂ supercrítico (PASQUALI *et al.*, 2006; BYRAPPA *et al.*, 2008; YASUJI *et al.*, 2008), além da dificuldade em se obter solubilidade moderada para ambos os materiais (matriz e droga) em uma única fase quando na presença do fluido supercrítico (TANDYA *et al.*, 2007). Esta abordagem pode ser aplicada com mais sucesso para compostos não-polares ou compostos polares voláteis como álcoois ou ésteres, não devendo ser usada quando se tratar de compostos não solúveis no fluido supercrítico, como ácidos ou sais (MARTÍN e COCERO, 2008). No entanto, a baixa solubilidade pode ser, em alguns casos, superada pelo uso apropriado de alguns tipos de co-solventes e através do ajuste da densidade do fluido supercrítico (COCERO *et al.*, 2009). Como consequência, é necessária a cuidadosa manipulação dos parâmetros operacionais durante o estágio de formação das partículas, de modo a evitar a precipitação segregada da matriz polimérica da droga de interesse.

Uma outra limitação do uso da técnica está associada ao controle ineficiente do tamanho e da morfologia das partículas formadas (mostrando-se não raramente finas e porosas), devido à alta supersaturação do sistema, em consequência da elevada taxa de transferência de massa do processo (BAHRAMI e RANJBARIAN, 2007). Além dos problemas citados anteriormente, tem-se a dificuldade recorrente de ampliação de escala do processo por causa da intensa agregação das partículas e do entupimento frequente do bico injetor, devido especialmente ao resfriamento do sistema (PASQUALI *et al.*, 2008).

2.4.1.2. Uso do fluido supercrítico como soluto

O método de formação de partículas conhecido como precipitação de soluções saturadas em gás, ou PGSS (do inglês, *particles from gas-saturated solutions*), foi primeiramente testado e desenvolvido por WEIDNER *et al.* (1996). Esta abordagem se caracteriza pela dissolução do fluido supercrítico na matriz do soluto, de modo que ocorra a redução da viscosidade e conseqüentemente, a redução do ponto de fusão do soluto (TANDYA *et al.*, 2007). Desta forma, com o aumento da pressão, observa-se também, o aumento da concentração do fluido no soluto fundido (MORIBE *et al.*, 2008), que ao ser despressurizado pela passagem no bico injetor (YEO e KIRAN, 2005), leva à formação das partículas, através da precipitação do soluto. A Figura 12 representa esquematicamente o conceito do equipamento usado na obtenção de partículas pelo método de PGSS.

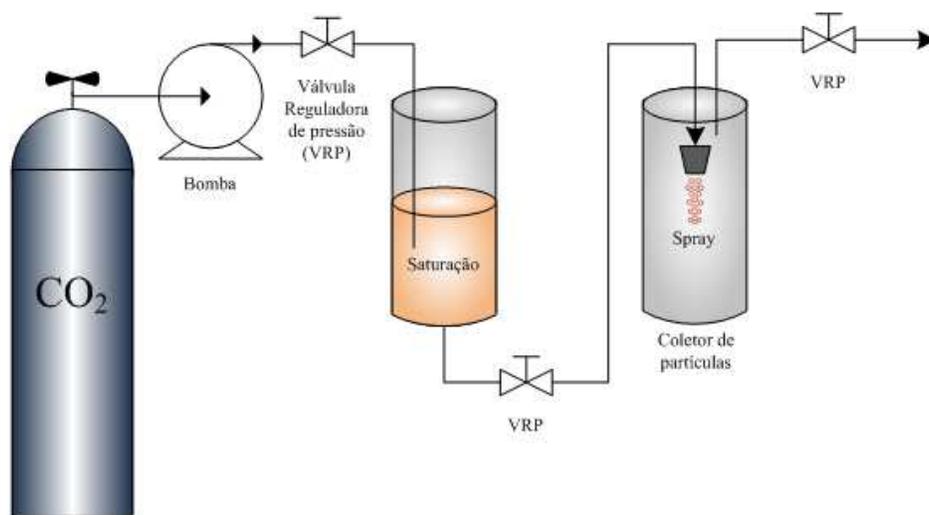


Figura 12: Conceito do equipamento típico de PGSS (adaptado de VEMAVARAPU *et al.*, 2005; BYRAPPA *et al.*, 2008; MISHIMA, 2008).

De acordo com MARTÍN e COCERO (2008), o processo de PGSS é especialmente adequado para uso na formação de partículas à base de polímeros nos quais o

CO₂ presente alta solubilidade. Segundo COCERO *et al.* (2009), a eficiência de incorporação será dependente da relação entre a cinética de solidificação do carreador e a cinética de difusão e evaporação do líquido a ser encapsulado. Aliado a isso, o método de PGSS oferece a possibilidade de controlar características das partículas, tais como morfologia, tamanho, distribuição de tamanhos e cristalinidade das mesmas (TANDYA *et al.*, 2007) através de ajustes nos parâmetros de processo como concentração e composição do soluto, temperatura e pressão de pré-expansão e expansão, e geometria e diâmetro interno do bico injetor (MISHIMA, 2008).

Dentre as principais vantagens do uso do método PGSS na formação de partículas destaca-se o menor consumo de CO₂ quando comparado a métodos como o RESS (BAHRAMI e RANJBARIAN, 2007; MISHIMA, 2008). O uso de baixas pressões (MISHIMA, 2008) e a não necessidade de uso de solventes orgânicos, quando comparado aos demais métodos que empregam o fluido supercrítico como anti-solvente (BAHRAMI e RANJBARIAN, 2007; MISHIMA, 2008) também são vantagens adicionais ao emprego deste método. Há ainda, segundo TANDYA *et al.* (2007), a possibilidade de se controlar tanto a macro quanto a micro-porosidade das partículas formadas. Além das características citadas anteriormente, tem-se como uma vantagem adicional o fato do processo ser relativamente simples, o que possibilita a formação de uma ampla faixa de produtos (BYRAPPA *et al.*, 2008), especialmente os de alto valor agregado, a custos relativamente baixos. De acordo com BYRAPPA *et al.* (2008), a principal desvantagem do processo é a dificuldade de controle do tamanho das partículas formadas, o que pode ser bastante problemático, dependendo da aplicação final das mesmas.

2.4.1.3. Uso do fluido supercrítico como anti-solvente

De acordo com BAHRAMI e RANJBARIAN (2007), os métodos que fazem uso do fluido supercrítico como anti-solvente têm como principal característica a rápida transferência de massa entre o fluido supercrítico e a solução, o que resulta na expansão da mesma, levando a uma redução na diluição, conseqüentemente produzindo uma solução supersaturada. Diversos métodos e suas variações fazem uso deste princípio para a

formação de partículas, sendo que somente será abordado o método SAS, visto que os demais métodos são modificações deste.

No método SAS (do inglês *supercritical anti-solvent method*), o fluido supercrítico e a solução polimérica são alimentadas em separado, continuamente, dentro do vaso de precipitação através de um bico injetor (COCERO *et al.*, 2009). O método de SAS é também caracterizado por ser um processo semi-contínuo, em que as partículas precipitadas são coletadas ao fim da operação (BAHARAMI e RANJABARIAN, 2007). Em geral, para obter uma boa mistura entre o fluido supercrítico e a solução, sem que haja necessidade de se usar dispositivos mecânicos, opta-se por empregar maiores pressões (entre 9 a 15 MPa), quando comparado a outros métodos que empregam fluidos supercríticos como anti-solventes (MARTÍN e COCERO, 2008). Assim, para que se tenha sucesso na formação de partículas, o anti-solvente (no caso, o fluido supercrítico), deve possuir baixa afinidade pelo soluto e ao menos miscibilidade parcial com a fase orgânica. Desta forma, o mecanismo de nucleação e crescimento dos cristais será orientado pela difusão do anti-solvente dentro da fase orgânica e a consequente evaporação do solvente orgânico quando em contato com o antisolvente. O bico injetor deste sistema consiste basicamente de dois tubos terminais onde se injeta a mistura, de modo a ser lançada no vaso de precipitação (BAHRAMI e RANJABARIAN, 2007). A geometria característica do injetor é responsável por produzir altos valores de número de Reynolds (o que facilita o processo de mistura) e baixos valores de Weber (que controlam o tamanho das gotas formadas).

Assim, de acordo com PASQUALI *et al.* (2008), a expansão do volume, causada pela difusão do antisolvente, acaba por reduzir a solubilidade do soluto, em função da redução da densidade. Por outro lado, a evaporação do solvente no fluido supercrítico leva a um aumento da concentração, com supersaturação, nucleação e formação das partículas. A alta velocidade de injeção de fluido supercrítico leva à formação de gotas de tamanhos muito pequenos, ao mesmo tempo que a mistura do solvente com o fluido supercrítico, dentro da câmara de mistura, possibilita o aumento da transferência de massa do fluido supercrítico para o solvente, e vice-versa (PASQUALI *et al.*, 2006). Dependendo da viscosidade e densidade tanto da solução quanto do fluido supercrítico, da velocidade do jato, do diâmetro e do comprimento do tubo capilar, observa-se o rompimento do jato, que

a princípio, pode ocorrer de quatro formas distintas: o regime Rayleigh, primeiro jato induzido, segundo jato induzido e o regime de atomização (LIN e REITZ, 1998). No regime Rayleigh observa-se a formação de gotas maiores que o diâmetro interno do capilar. Já no regime de primeiro jato induzido, observa-se a quebra do jato que ocorre distante da saída do capilar, resultando em gotas com tamanhos próximos aos diâmetro do capilar. No regime de segundo jato induzido, por outro lado, pequenas gotas são produzidas próximas à saída do capilar, enquanto que no regime de atomização as gotas são formadas somente depois de saírem do tubo capilar, sendo portanto, muito menores que o diâmetro do capilar. Os dois primeiros regimes são caracterizados por poderem ser facilmente observados quando se empregam relativas baixas velocidades, enquanto que os dois últimos somente poderão ser observados quando a velocidades empregadas forem bastante altas. Como parte final do processo, habitualmente se observa a importância da injeção contínua de fluido supercrítico no sistema, visto que isto aumenta a probabilidade de extração e total remoção dos solventes orgânicos das partículas formadas (BYRAPPA *et al.*, 2008). A Figura 13 apresenta esquematicamente, o conceito do equipamento típico usado na formação de partículas via SAS.

O crescente uso da técnica de SAS na formação de partículas tem sido observado, visto que esta metodologia apresenta algumas vantagens adicionais às demais técnicas de formação de partículas. Dentre essas vantagens podem-se destacar o maior controle sobre a reprodutibilidade da técnica (PASQUALI *et al.*, 2006) e a possibilidade de se produzir partículas à base de compostos solúveis em água como proteínas e açúcares (YEO e KIRAN, 2005). Além disso, o processo é facilmente escalonável e passível de atender aos requisitos de boas práticas de fabricação (YORK *et al.*, 1998).

Na Tabela 12 apresentam-se dados de partículas produzidas a partir dos polímeros enfocados neste trabalho (PLLA, PLGA e PCL) produzidos por diferentes metodologias fundamentadas em fluidos supercríticos e incorporando distintos compostos bioativos.

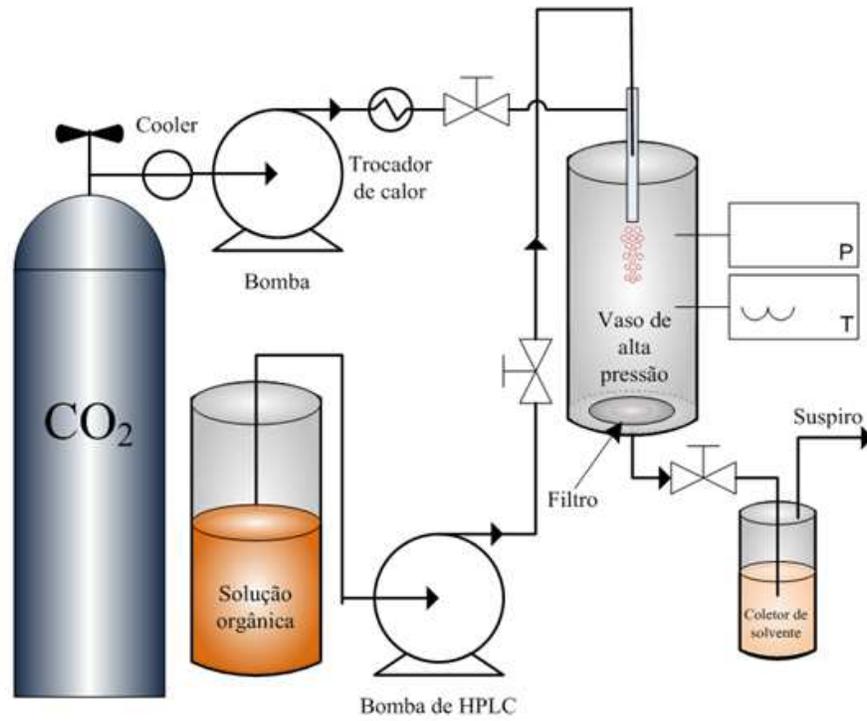


Figura 13: Equipamento típico de SAS (adaptado de CHEN *et al.*, 2007; BYRAPPA *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2008).

Tabela 12: Sistemas microparticulados produzidos por tecnologia de fluidos supercríticos incorporando ou não agentes ativos.

Composição da matriz	Método	Solvente	Condições operacionais	Agente ativo	Eficiência de incorporação	Diâmetro	Referência
	SAS	DCM	Pressão: 8-10 MPa, Temperatura: 308 K Vazão de CO ₂ : 40 g/h	diuron	NR	1-5 µm	TAKI <i>et al.</i> (2001)
	SAS	DCM	Pressão: 8-17 MPa, Temperatura: 304-333 K Vazão de CO ₂ : 11-14 g/min	NR	NR	4-14 µm	RANTAKYLA <i>et al.</i> (2002)
	ASES	DCM, ME	Pressão: 7,6 MPa, Temperatura: 298 K Vazão de CO ₂ : 1-2 mL/min	AHB e lisozima	5,7-9,2%	1,2-2 µm	TU <i>et al.</i> (2002)
	SAS	DCM	Pressão: 10 -14,5 MPa, Temperatura: 308 K Vazão de CO ₂ : 40 g/h	herbicida	NM	1-5 µm	BOUTIN <i>et al.</i> (2004)
PLA	PCA	DCM	Pressão: 10,1 MPa, Temperatura: 36 °C Vazão de CO ₂ : 10-15 mL/min	NR	NR	0,45-1,6 µm	SARKARI <i>et al.</i> (2004)
	PCA	DCM	Pressão: 6-12 MPa, Temperatura: 293-308 K Vazão de CO ₂ : 180 g/min	NR	NR	0,1-50 µm	DIEGO <i>et al.</i> (2005)
	RESS	ET	Pressão: 10-20 MPa Temperatura: 313 K Vazão de CO ₂ : NM	NR	NR	2-5 µm	MATSUYAMA <i>et al.</i> (2005)
	SAS	DCM	Pressão: 8.38–9,43 MPa, Temperatura: 313-323 K Vazão de CO ₂ : NM	NR	NR	0,2-5,5 µm	OBRZUT <i>et al.</i> (2007)
	SAS	DCM	Pressão: 6,5-16 MPa, Temperatura: 309–333 K Vazão de CO ₂ : 67 mL/min	teofilina	NM	5-95 µm	ROY <i>et al.</i> (2007)

Tabela 12 (continuação): Sistemas microparticulados produzidos por tecnologia de fluidos supercríticos incorporando ou não agentes ativos.

Composição da matriz	Método	Solvente	Condições operacionais	Agente ativo	Eficiência de incorporação	Diâmetro	Referência
PLA	RESS	THF	Pressão: 34,6 MPa, Temperatura: 305–366 K Vazão de CO ₂ : NM	NR	NR	30-100 nm	SANE e THIES (2007)
	SAS	DCM	Pressão: 6,5-9 MPa, Temperatura: 308–318 K Vazão de CO ₂ : 2,1-4,8 kg/h	luteína	NR	1-5 µm	MIGUEL <i>et al.</i> (2008)
	SAS	DCM	Pressão: 13,8; 17,2 e 20,7 MPa Temperatura: 306, 313 e 323 K Vazão de CO ₂ : 1,5 g/min	rifampicina	33,4–91,7%	5 µm	PATOMCHAIVIWAT <i>et al.</i> (2008)
	SEDS	DCM	Pressão: 12 MPa, Temperatura: 306 K Vazão de CO ₂ : 16 NL/h	Fe ₃ O ₄	NM	803 nm	CHEN <i>et al.</i> (2009a)
	SEDS	DCM e ET	Pressão: 12 MPa, Temperatura: 306 K Vazão de CO ₂ : 25 NL/h	puerarin	23,6 %	675 nm	CHEN <i>et al.</i> (2009b)
	RESOLV	NP	Pressão: 34 MPa, Temperatura: 373 K Vazão de CO ₂ : NM	retinil palmitato	0,9-6,2% em massa	30-160 nm	SANE e LIMTRAKUL (2009)
	SEDS	DCM	Pressão: 10,13 MPa, Temperatura: 273 K Vazão de CO ₂ : 45 mL/min	caroteno	NM	30 µm	HE <i>et al.</i> (2010)
	RESS	DCM e ME	Pressão: 38 MPa Temperatura: 333 K Vazão de CO ₂ : NM	NR	NR	270-730 nm	UL-HAQ <i>et al.</i> (2010)

Tabela 12 (continuação): Sistemas microparticulados produzidos por tecnologia de fluidos supercríticos incorporando ou não agentes ativos.

Composição da matriz	Método	Solvente	Condições operacionais	Agente ativo	Eficiência de incorporação	Diâmetro	Referência
PLA	PGSS	NR	Pressão: 7,5 MPa, Temperatura: 305 K Vazão de CO ₂ : NM	toxóide tetânico	78,1%	22,8 µm	BAXENDALE <i>et al.</i> (2011)
	SEDS	DCM e ET	Pressão: 12 MPa, Temperatura: 306 K Vazão de CO ₂ : 300 mL/min	morfina	4,73 %	2,45 µm	ZHANG <i>et al.</i> (2012)
PLGA	SAS	AC	Pressão: 8,96 e 11,03 MPa, Temperatura: 306; 311 e 315 K Vazão de CO ₂ : 0,8 a 2,8mL/min	NR	NR	4,6-24,8 µm	WANG <i>et al.</i> (2005)
	SAS	DCM	Pressão: 8,96 MPa, Temperatura: 306 K Vazão de CO ₂ : 1,5 L/min	HC	5,4 – 25,2%	30 µm	WANG <i>et al.</i> (2006)
	RESS	ET	Pressão: 25 MPa, Temperatura: 313 e 423 k Vazão de CO ₂ : NM	SiO ₂ e TiO ₂	NR	10 to 100 nm	KONGSOMBUT <i>et al.</i> (2009)
	NR	AE	Pressão: 8 MPa, Temperatura: 318 K Vazão de CO ₂ : 0,4 mL/h	pDNA	2 – 20%	149-322 nm	MAYO <i>et al.</i> (2010)
	SEE	AE	Pressão: 8 MPa, Temperatura: 311 K Vazão de CO ₂ : 0,3 kg/h	NR	NR	1-3,5 µm	PORTA <i>et al.</i> (2011)
PCL	PGSS	NR	Pressão: 6-11 e 15 MPa, Temperatura: 323 e 343 K Vazão de CO ₂ : NM	β-caroteno	340 ppm	270–650 µm	PAZ <i>et al.</i> (2012)
	SAS	DCM	Pressão: 30 MPa, Temperatura: 313 K Vazão de CO ₂ : 20 g/min	Extrato de <i>Rosmarinus officinalis</i>	62,2-82,8%	254,5-617,5 nm	YESIL-CELIKTAS e CETIN-UYANIKGIL (2012)

Tabela 12 (continuação): Sistemas microparticulados produzidos por tecnologia de fluidos supercríticos incorporando ou não agentes ativos.

Composição da matriz	Método	Solvente	Condições operacionais	Agente ativo	Eficiência de incorporação	Diâmetro	Referência
PLA/PLGA	SEDS	DCM	Pressão: 12 MPa, Temperatura: 306 K Vazão de CO ₂ : 18 L/h	indometacina	2,8%	1,65-2,35 µm	KANG <i>et al.</i> (2008a)
	SEDS	DCM	Pressão: 12 MPa, Temperatura: 306 K Vazão de CO ₂ : 300 mL/min	paclitaxel	14,71- 16,33%	1,36- 8,55 µm	KANG <i>et al.</i> (2008b)
	PGSS	NR	Pressão: 7.6 MPa, Temperatura: 305 K Vazão de CO ₂ : NM	hGH	5,5 – 6,4%	56 a 104 µm	JORDAN <i>et al.</i> (2010)
PLA e PHB	ASES	DCM	Pressão: 15 MPa, Temperatura: 309 K Vazão de CO ₂ : 5 mL/min	NR	NR	3,57-162 µm	BREITENBACH <i>et al.</i> (2000)
PLA/PEG	GAS	DCM	Pressão: 10-15 MPa, Temperatura: 278-303 K Vazão de CO ₂ : 900-1800 NL/h	insulina	84,6%	360-720 nm	CALICETI <i>et al.</i> (2004)
PLA e PMMA	RESOLV	ET	Pressão: 20 MPa Temperatura: 353 K Vazão de CO ₂ : NM	NR	NR	100 nm	MEZIANI <i>et al.</i> (2006)
PMMA/ PCL	NR	DCM	Pressão: 11 MPa, Temperatura: 315 K Vazão de CO ₂ : 6,6 a 102 mL/min	colesterol	30%	0,25-15 µm	VEGA-GONZÁLEZ <i>et al.</i> (2004)
PMMA/ PCL	SAS	DCM	Pressão: 11 MPa, Temperatura: 313 K Vazão de CO ₂ : 100 mL/min	NR	NR	> 1-3 µm	VEGA-GONZÁLEZ <i>et al.</i> (2008)
PLGA, PLA, e PCL	SEDS	DCM, I AC, AE, HX	Pressão: 13 e 16 MPa, Temperatura: 308 ou 313 K Vazão de CO ₂ : 21 mL/min	HC	22%	5,6-83 µm	GHADERI <i>et al.</i> (2000)

Tabela 12 (continuação): Sistemas microparticulados produzidos por tecnologia de fluidos supercríticos incorporando ou não agentes ativos.

Composição da matriz	Método	Solvente	Condições operacionais	Agente ativo	Eficiência de incorporação	Diâmetro	Referência
PLA/PEG/PLA	SEDS	DCM	Pressão: 12 MPa, Temperatura: 306 K Vazão de CO ₂ : NM	paclitaxel	5,1 – 7,1 %	712-4800 nm	OUYANG <i>et al.</i> (2009)
PLA/PEG/PLA	RESS	DCM	Pressão: 12 MPa, Temperatura: 306 K Vazão de CO ₂ : NM	NR	NR	2,2 µm	CHEN <i>et al.</i> (2011)
PLGA/ quitosana/ mPEG	PGSS	NR	Pressão: 7,5 MPa, Temperatura: 305 K Vazão de CO ₂ : NM	NR	NR	45,3- 97,1µm	CASETTARI <i>et al.</i> (2011)

PLA: poli(ácido lático); PLGA: poli(ácido lático-co-glicólico); PCL: policaprolactona; PHB: polihidroxibutirato; PEG: polietilenoglicol; PMMA: polimetilmetacrilato; mPEG: metoxipolietilenoglicol; SAS: precipitação pelo anti-solvente supercrítico; ASES: sistema de extração de solvente a partir de aerosol; PCA: precipitação usando um antisolvente comprimido; RESS: expansão rápida da solução supercrítica; SEDS: dispersão da solução expandida pelo fluido supercrítico; RESOLV: expansão rápida de solução supercrítica em solventes líquidos; PGSS: partículas de solução saturadas de gás; SEE: extração por emulsão supercrítica; NR: não realizado e/ou usado; NM: não mencionado; AHB: ácido 4-hidroxibenzóico; HC: hidrocortisona; DCM: diclorometano; AC: acetona; AE: acetato de etila; ET: etanol; HX: hexano; I: isopropanol; ME: metanol; THF: tetrahydrofurano; NL/h: litros padrão por hora.

Pode-se observar que a tecnologia de fluidos supercríticos é muito versátil e capaz de produzir partículas com uma grande variedade de tamanhos, como mostrado na Tabela 12. Apesar disso, a maioria das partículas formadas a partir de poli(hidroxiésteres) usando esta tecnologia possui uma ampla faixa de tamanhos, que pode variar de poucos nanômetros até muitos micrômetros. Partículas da ordem de nanômetros são eficientemente produzidas quando se faz uso das técnicas de RESS, RESOLV e SFEE, pelo ajuste das condições operacionais. Quando se deseja a produção de partículas maiores, a técnica que tem se mostrado mais interessante é o PGSS. Com relação à eficiência de incorporação do agente ativo, observa-se que há uma ampla faixa de variação, que compreende entre 2 até 92%.

Neste contexto, o método SAS é atualmente o mais empregado para tal aplicação, sendo o diclorometano o solvente mais amplamente usado na solubilização dos polímeros ou mesmo para aumentar a solubilidade destes quando em contato com o fluido supercrítico. O sucesso e o crescente uso da metodologia de SAS na formação de partículas à base de materiais poliméricos sintéticos biodegradáveis como PLA, PLGA e PCL fica evidente quando se observa os estudos de TAKI *et al.* (2001), BOUTIN *et al.* (2004), ROY *et al.* (2007), MIGUEL *et al.* (2008) e PATOMCHAIVIWAT *et al.* (2008) que obtiveram partículas de PLA com diâmetros médios que variaram entre 0,2 a 95 μm , incorporando eficientemente diuron, herbicida, teofilina, luteína e rifampicina, respectivamente. O mesmo é observado para a formação de partículas PLGA contendo hidrocortisona com diâmetros médios de 30 μm (WANG *et al.*, 2006). Partículas de PCL também foram obtidas com sucesso por YESIL-CELIKTAS e CETIN-UYANIKGIL (2012), pelo uso de elevadas pressões (30 MPa), sendo possível a produção de partículas com alta eficiência de incorporação de *Rosmarinus officinalis* (até 83%), sendo estas da ordem de poucos nanômetros.

Desta forma, no presente trabalho, optou-se por utilizar esta metodologia na formação de dispositivos de liberação controlada orais contendo 17 α -metiltestosterona para a administração em tilápias do Nilo. Esta abordagem foi selecionada pois possibilita o escalonamento do processo, permitindo a produção de materiais a custos competitivos e que sigam às recomendações das boas práticas de fabricação (BPF) exigidas na indústria

farmacêutica. Além disso, observa-se que esta técnica possibilita a formação de partículas com adequados tamanhos médios mesmo em condições onde são incorporados agentes ativos nas mesmas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Reagentes: poli(L-ácido láctico) Purasorb PL 18 (massa molar de 221 kDa) e poli(50/50 DL-ácido láctico-co-glicólico) Purasorb PDLG 5002 (massa molar de 17 kDa) da Purac Biomaterials e policaprolactona (massa molar de 65 kDa) da Sigma Aldrich foram usados na formação das matrizes poliméricas; 17 α -metilttestosterona da MP Biomedicals foi empregada como agente ativo do processo; diclorometano da Synth e da J.T. Baker e acetato de etila da Synth e da Mallinckrodt foram usados como solvente dos polímeros e do agente ativo; metanol e acetonitrila grau HPLC da J.T. Baker foram usados nas análises de HPLC; dióxido de carbono industrial (99,5% de pureza) da White Martins foi empregado como antisolvente do processo de formação de partículas, mono-oleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80) da Sigma-Aldrich foi usado para a simulação de compostos tensoativos provenientes de fluidos corpóreos; dimetilsufóxido e sulfato de sódio anidro da Sigma-Aldrich foram empregados nos ensaios de detecção de solvente residual; 2-propanol e etanol da Synth foram usados como agentes dispersantes nos ensaios de determinação de tamanho das partículas e água deionizada em sistema Milli-Q Académic Quantum EX da Millipore foi empregada como solvente usado na formação das soluções tampões testadas.

3.2. Métodos

A forma de estruturação dos ensaios experimentais utilizada é descrita de forma sintética na Figura 14 e os métodos de formação e caracterização das partículas são apresentados em detalhes na sequência.

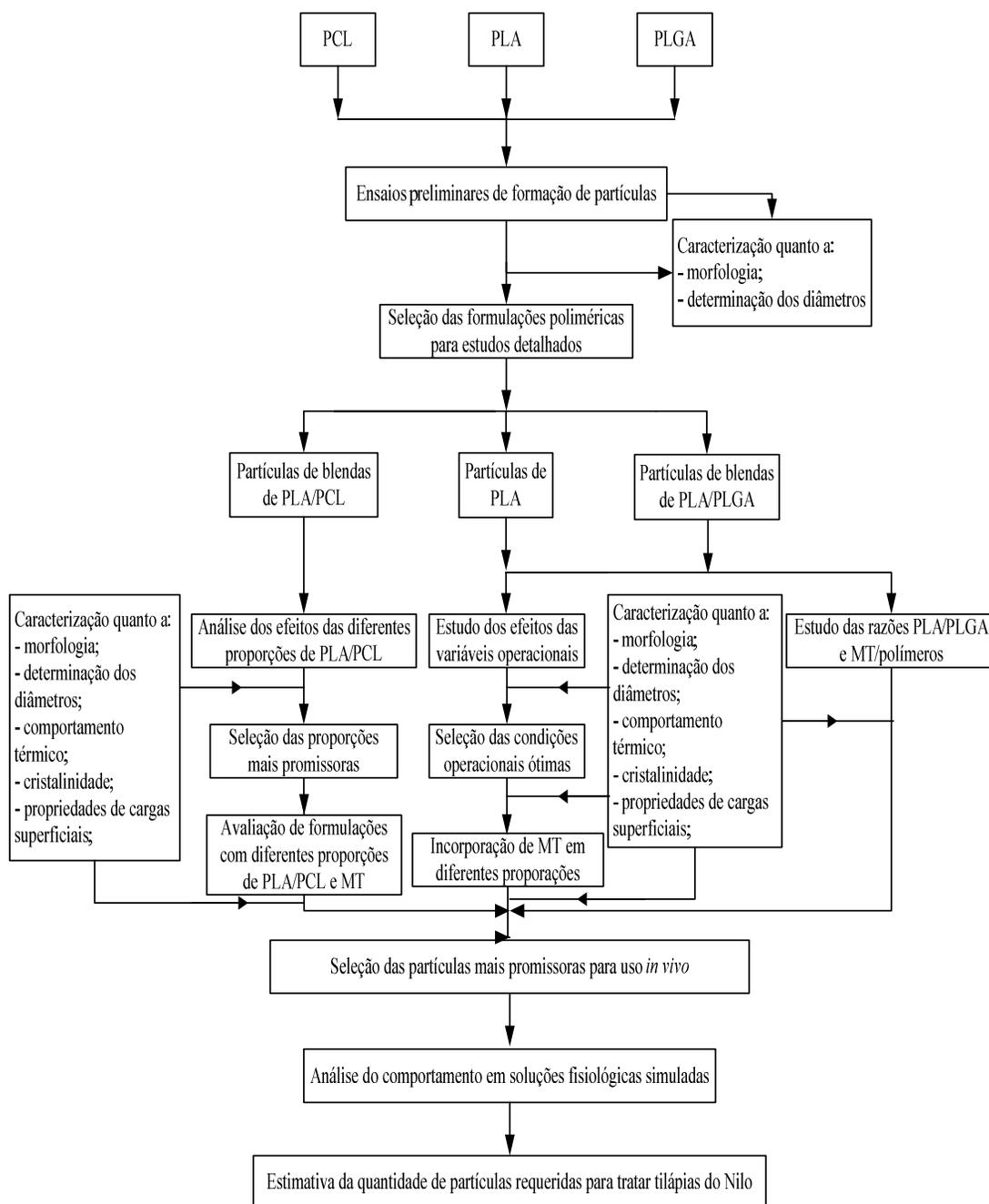


Figura 14: Fluxograma de estruturação dos ensaios realizados durante o estudo de formação de partículas via tecnologia de fluidos supercríticos

3.2.1. Preparação das Partículas

Diferentes soluções poliméricas foram testadas para a formação das partículas e as condições operacionais foram definidas e otimizadas durante o estudo. As partículas foram obtidas empregando soluções a variadas concentrações de PLA e a mistura deste com PCL ou PLGA em diclorometano contendo ou não 17 α -metiltestosterona. As partículas foram produzidas com base em tecnologia empregando CO₂ supercrítico pelo método SAS. O aparato experimental consiste em três componentes principais: o sistema de suprimento de CO₂, o sistema de injeção da solução orgânica polimérica e a coluna de precipitação, como pode ser observado na Figura 15.

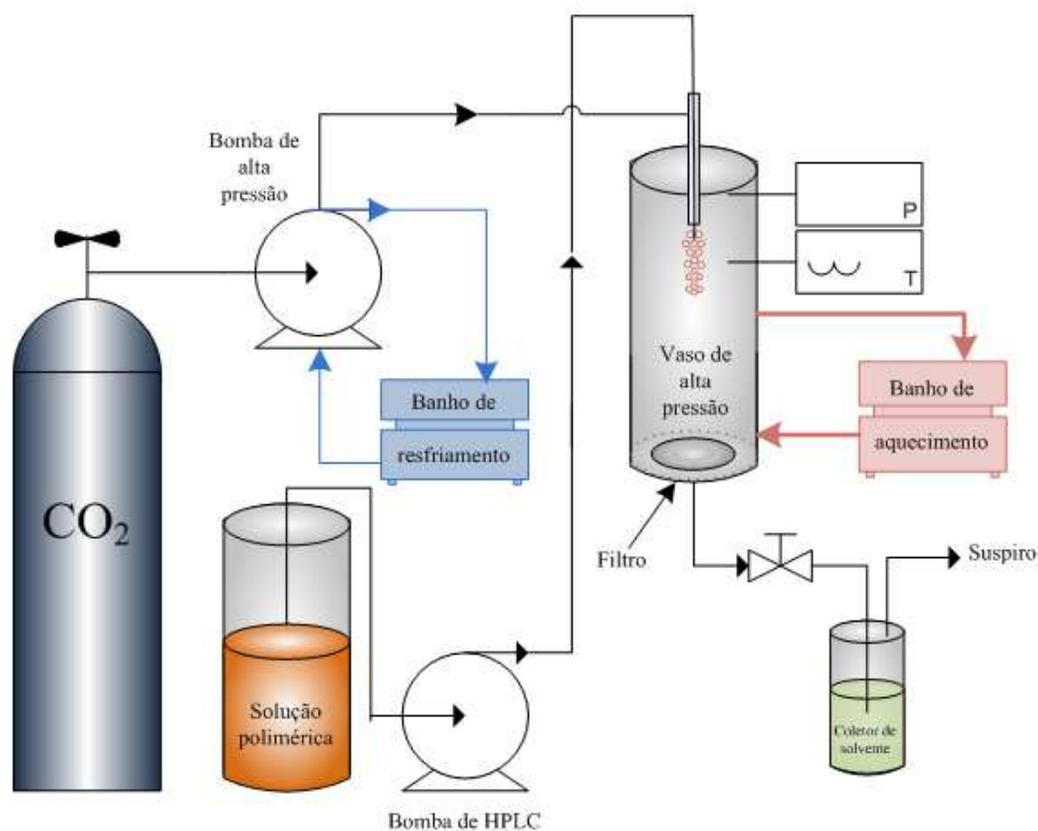


Figura 15: Representação esquemática do sistema de formação de partículas através da metodologia de SAS.

Dióxido de carbono líquido foi coletado do cilindro através de um tubo pescador. Uma bomba de alta pressão (modelo P50 TharSFC, Waters) foi acoplada ao sistema de modo a garantir a injeção constante do CO₂, sendo este resfriado abaixo de 0 °C utilizando de um banho ultratermostático (modelo Q214M, Quimis), de modo a assegurar que somente CO₂ líquido fosse bombeado. Assim, o CO₂ foi injetado na coluna de aço inoxidável (500 mL de diâmetro interno) através de um tubo de diâmetro interno de 5 mm, a uma vazão de 18 g/min (determinada pelo rotâmetro), sendo esta vazão controlada manualmente com a ajuda de uma válvula micrométrica acoplada ao rotâmetro. A temperatura interna da coluna foi mantida a 40 °C (temperatura amena, mas o suficiente para garantir que o dióxido de carbono estivesse na condição supercrítica) pelo uso de um banho termostático (modelo MQBTC99-20, Microquímica) e o sistema foi operado a diferentes pressões, na faixa de 8 a 16 MPa. Após a estabilização da temperatura e pressão interna da coluna, cerca de 100 mL de solução polimérica foi introduzida dentro da coluna de precipitação, pelo uso de uma bomba de HPLC (modelo SP930D, Allcrom) operando a diferentes vazões (de 0,5 a 2,5 mL/min) através de um capilar de aço inox de 1/16" de diâmetro externo e com diâmetro interno igual a 120 µm posicionado de forma coaxial interna em relação ao tubo de alimentação de CO₂, e estendendo-se cerca de 2 mm além do ponto de finalização do tubo de entrada de CO₂. A precipitação dos polímeros resultou na formação de partículas finas que se depositaram na superfície interna do vaso de alta pressão e no filtro de aço inoxidável sinterizado com diâmetro de corte de 1 µm localizado no fundo da coluna.

Após a injeção do volume desejado de solução polimérica, o sistema foi mantido sob as mesmas condições de temperatura e pressão por 30 minutos, com fluxo contínuo de CO₂ no sistema, de modo a remover o solvente residual orgânico das partículas. Em seguida, a coluna foi lentamente despressurizada e então as partículas foram coletadas e armazenadas em frascos de vidro, que foram selados e estocados sob refrigeração (a aproximadamente 5 °C).

3.2.2. Ensaios para estudo do efeito das condições operacionais na formação de partículas

Foram realizados ensaios preliminares, visando definir quais seriam as condições operacionais mais adequadas para os estudos posteriores detalhados de formação de partículas de diferentes composições. As condições operacionais usadas nessa fase do estudo estão apresentadas na Tabela 13, sendo que as amostras foram produzidas em duplicata, conforme descrito na seção 3.2.1.

Tabela 13: Condições operacionais utilizadas nos ensaios preliminares de formação de partículas via tecnologia de fluidos supercríticos.

Ensaio	Tipo de polímero	Concentração da solução polimérica (% m/v)	Vazão da solução polimérica (mL/min)	Pressão do sistema (MPa)
P1	PCL	0,5	0,5	12
P2	PLGA			
P3		8,5		
P4	PLGA/PLA (razão 1:1 m/m)	0,5	1,0	
P5	PLA			
P6		8		
P7		16		
P8		3,0		12

3.2.3. Formação de partículas de PLA

Com base nos resultados do estudo preliminar realizado na seção 3.2.2, procedeu-se com o estudo de formação de partículas de PLA incorporando ou não MT.

3.2.3.1. Análise da influência das diferentes variáveis de processo sobre a formação, morfologia distribuição de tamanhos e diâmetro médio das partículas de PLA

Com o intuito de avaliar a influência da variação das condições operacionais, tais como pressão, concentração e vazão da solução polimérica no diâmetro, distribuição de tamanhos e na morfologia das partículas formadas, um planejamento estatístico do tipo 2^3 composto de 11 ensaios (oito pontos experimentais e 3 pontos centrais) foi realizado segundo a Tabela 14. Nestes ensaios não foi empregada a 17α -metiltestosterona.

Tabela 14: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da variação da pressão, concentração e vazão da solução de PLA à 40 °C.

Ensaio	Pressão (MPa)	Concentração da solução de PLA (%)	Vazão da solução de PLA (mL/min)
A1	8	0,5	0,5
A2	8	0,5	2,5
A3	16	0,5	0,5
A4	16	0,5	2,5
A5	8	1,5	0,5
A6	8	1,5	2,5
A7	16	1,5	0,5
A8	16	1,5	2,5
A9	12	1,0	1,5
A10	12	1,0	1,5
A11	12	1,0	1,5

3.2.3.2. Incorporação de 17 α -metiltestosterona em partículas de PLA

Seguindo-se as condições ótimas definidas no ensaio descrito na seção 3.2.3.1, incorporou-se à solução de PLA alíquotas de 17 α -metiltestosterona, em concentrações finais ajustadas a uma razão de 12,5 a 75,0% em relação à massa de PLA na solução polimérica. Todas as amostras foram produzidas em duplicata.

3.2.4. Formação de partículas de PLA/PCL

As condições usadas no estudo de formação de partículas de PLA/PCL contendo ou não 17 α -metiltestosterona são apresentadas a seguir.

3.2.4.1. Obtenção de partículas de PLA/PCL livres de MT

Com base nos ensaios descritos nas seções 3.2.1 e 3.2.2, realizou-se o estudo de formação de partículas de PLA/PCL, observando-se a influência da variação da concentração de PCL na solução polimérica sobre a morfologia, distribuição de tamanhos e demais características das partículas produzidas. As condições operacionais utilizadas foram pressão de 8 MPa, concentração da solução polimérica de 1,0% (m/v) com razões variáveis de PCL/PLA de 1:9 até 1:1 (m/m) e vazão de injeção da solução polimérica de 0,5 mL/min. Todas as amostras foram produzidas em duplicata, sendo designadas como amostras dos ensaios B1 a B5.

3.2.4.2. Incorporação de 17 α -metiltestosterona nas partículas de PLA/PCL

Com o intuito de avaliar a influência da variação da proporção entre os polímeros PLA e PCL e a concentração inicial de 17 α -metiltestosterona na formação das partículas, um planejamento estatístico 2² composto de 7 ensaios (4 pontos experimentais e 3 pontos centrais) foi realizado. Para tal, utilizou-se o mesmo protocolo de formação de partículas

descrito no item 3.2.1., com as seguintes condições experimentais: pressão de 8 MPa, vazão de injeção polimérica de 0,5 mL/min e concentração de solução polimérica de 1,0% (m/v) com razões variáveis de PLA/PCL na presença de diferentes concentrações de MT, como indicado na Tabela 15.

Tabela 15: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da variação da razão polimérica PCL/PLA e razão mássica entre hormônio e os polímeros.

Ensaio	Razão polimérica PCL/PLA na solução (m/m)	Razão mássica de MT/polímeros na solução (m/m)
B11	1/9	0,125
B12	2/8	0,125
B13	1/9	0,750
B14	2/8	0,750
B15	13/72	0,438
B16	13/72	0,438
B17	13/72	0,438

3.2.5. Formação de partículas de PLA/PLGA contendo ou não 17 α -metiltestosterona

Com base nos resultados obtidos nos resultados preliminares, indicados na seção 3.2.2, realizaram-se os estudos de formação de partículas de PLA/PLGA. A influência da variação da proporção entre os polímeros PLA e PLGA e a concentração inicial de 17 α -metiltestosterona na formação das partículas foram avaliadas em um planejamento estatístico 2² composto de 7 ensaios (sendo 4 pontos experimentais e 3 pontos centrais).

Para tal, utilizou-se o mesmo protocolo de formação de partículas descrito no item 3.2.1, com as seguintes condições experimentais: pressão de 8 MPa, vazão de injeção polimérica de 0,5 mL/min e concentração de solução polimérica de 1,5% (m/v) com razões

variáveis de PLA/PLGA na presença de diferentes concentrações de MT, como indicado na Tabela 16.

Tabela 16: Condições experimentais utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito da variação da razão polimérica PLGA/PLA e razão mássica entre hormônio e os polímeros.

Ensaio	Razão polimérica PLGA/PLA na solução (m/m)	Razão mássica de MT/polímeros na solução (m/m)
C1	1/9	0,000
C2	1/1	0,000
C3	1/9	0,750
C4	1/1	0,750
C5	5/9	0,375
C6	5/9	0,375
C7	5/9	0,375

3.2.6. Caracterização das Partículas

As partículas foram caracterizadas quanto à morfologia, ao diâmetro, à distribuição de tamanhos, à porosidade, ao grau de cristalinidade, à carga superficial, à presença de solvente residual, bem como à eficiência de incorporação do hormônio, à liberação em meios que simulam o sangue e as condições gastrintestinais dos peixes, conforme descrito a seguir.

3.2.6.1. Morfologia

As partículas foram avaliadas quanto à forma, características morfológicas superficiais tais como presença de poros, agregação e rugosidade, através de microscopia eletrônica de varredura (modelos Leica LEO 440i e JSM-6360LV, JEOL) (GHADERI *et*

al., 1999). Antes da análise por microscopia eletrônica de varredura as amostras foram recobertas com ouro e paládio usando um evaporador a vácuo.

3.2.6.2. Determinação da distribuição de tamanhos e dos diâmetros médios das partículas

O diâmetro das partículas e sua distribuição de tamanhos foram determinados por difratometria à laser (modelo Mastersizer 2000, Malvern), acoplado à unidade de dispersão hydro S (Malvern) (RODRIGUES *et al.*, 2006; KANG *et al.*, 2008), empregando 2-propanol como dispersante.

3.2.6.3. Comportamento térmico das partículas

As partículas, os polímeros isolados e a 17 α -metiltestosterona foram avaliadas quanto ao comportamento térmico analisando-se assim, variações na temperatura de transição vítrea, na temperatura de fusão e de cristalização através de calorimetria diferencial de varredura (modelo DSC2910, TA Instruments) (GHADERI *et al.*, 1999; KANG *et al.*, 2008). Aproximadamente 5 mg de amostra foram pré-condicionados em argônio e então aquecidos em uma cápsula de alumínio selada contendo nitrogênio. As amostras foram aquecidas de 25 a 220 °C. Posteriormente, as amostras foram resfriadas até 0 °C e então aquecidas novamente até 220 °C. A taxa de aquecimento e resfriamento para ambas as curvas foi de 10 °C/min. A temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c) e as respectivas temperaturas de fusão (T_m) das amostras contendo partículas foram determinadas através da primeira curva de aquecimento. Já para os polímeros puros, estes foram determinados através da segunda curva de aquecimento. A cristalinidade (χ) do PLA e das partículas à base deste polímero foi calculada pela equação 1:

$$\chi_{\text{PLA}}(\%) = \left[\frac{\Delta H_{\text{m,PLA}} - \Delta H_{\text{cc,PLA}}}{\Delta H_{0,\text{PLA}} W_{\text{PLA}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

onde $\Delta H_{0,PLA}$ é o calor de fusão teórico de PLA 100% cristalino (BODMEIER *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 2006) com um valor de 93 J/g (MIGLIARESI *et al.*, 1991), W_{PLA} é a fração mássica do PLA na amostra, sendo a entalpia de cristalização no aquecimento $\Delta H_{cc,PLA}$ e a entalpia de fusão $\Delta H_{m,PLA}$ determinadas.

Já nos casos nos quais blendas de PLA/PCL e PLA/PLGA foram produzidas, a cristalinidade foi calculada mediante as equações 2 e 3, respectivamente:

$$\chi_{PCL}(\%) = \left[\frac{\Delta H_{m,PCL}}{\Delta H_{0,PCL} W_{PCL}} \right] \times 100 \quad (2)$$

$$\chi_{PLGA}(\%) = \left[\frac{\Delta H_{m,PLGA}}{\Delta H_{0,PLGA} W_{PLGA}} \right] \times 100 \quad (3)$$

em que $\Delta H_{0,PCL}$ é o calor de fusão teórico do PCL 100% cristalino, com valor de 156,8 J/g (SIMÕES *et al.*, 2009). Para de amostras contendo PLGA, o $\Delta H_{0,PLGA}$ pode ser aproximado pelo uso do calor de fusão do PLLA cristalino (KOEGLER e GRIFFITH, 2004), no caso 93 J/g. A fração mássica da PCL e do PLGA na blenda é representada por W_{PCL} e W_{PLGA} , respectivamente.

3.2.6.4. Avaliação da cristalinidade por difratometria de raios X

As partículas, os polímeros isolados e a 17 α -metiltestosterona foram analisadas quanto a sua estrutura cristalina, que serve como indicativo de degradação do polímero, incorporação e comportamento de liberação do hormônio encapsulado (KANG *et al.*, 2008a). Esta análise foi realizada por um difratômetro de raios X (XDR7000, Shimadzu), em uma faixa de 10 a 40° com passos de 0,02° em 2 θ .

3.2.6.5. Propriedades de carga superficiais das partículas

O potencial zeta pode ser um indicativo das propriedades de carga superficiais das partículas, o que afeta a estabilidade das mesmas em diferentes meios (KANG *et al.*,

2008a). Valores absolutos elevados de potencial zeta (acima de 40 mV) podem indicar a ocorrência de forte repulsão entre as partículas. A presença de cargas superficiais foi determinada pela suspensão das partículas em uma solução de água deionizada/etanol a 1:1 (v/v). As amostras foram acondicionadas em células eletroforéticas e uma diferença de potencial foi aplicada na solução em que as partículas foram dispersadas. As partículas foram então atraídas ao eletrodo de polaridade oposta, juntamente com a camada fixa e parte da dupla camada difusa das mesmas. A medida do potencial zeta se deu através da determinação do potencial elétrico da área interna da camada difusa das partículas, sendo este valor expresso em milivolts, no equipamento zetasizer (modelo Nano S90, Malvern) acoplado ao *software* Zetasizer Series (v. 6,32)

3.2.6.6. Determinação da presença de solvente residual nas partículas

A análise de diclorometano (DCM) residual foi realizada basicamente como descrito pela UNITED STATES PHARMACOPEIA (2007a) através de um cromatógrafo à gás GC/MS (modelo Saturn 2100D, Varian) equipado com um detector *ion-trap*, sendo acoplado ao *software* Saturn GC/MSworkstation (v. 5,52), usando para tal análise o método de *headspace* estático.

Cerca de 100 mg de partículas foram pesadas e transferidas para um frasco de 25 mL, contendo 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 g de sulfato de sódio anidro, usado para manter o equilíbrio vapor-líquido do DCM na solução aquosa. Os frascos foram selados e aquecidos a 80 °C por 1 hora e os *headspaces* subsequentemente analisados pelo uso de uma coluna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm CP-Sil 8 CB-MS (low bleed), sendo o hélio usado como fase móvel a 35 cm/s. A temperatura foi ajustada a 40 °C por 4 minutos, aumentando-se rapidamente para 200 °C e mantendo-se esta temperatura por 4 minutos. O detector foi mantido a 260 °C. A curva de calibração foi obtida similarmente, usando-se soluções de DCM a diferentes concentrações em 5 mL de DMSO contendo 1 g de sulfato de sódio anidro.

3.2.6.7. Eficiência de incorporação dos hormônios

A eficiência de incorporação do hormônio foi expressa pela razão entre as quantidades de material encapsulado e iniciais empregadas na formação das partículas, sendo determinada por cromatografia líquida de alta resolução (modelo 1525, Waters) acoplado a um detector de UV-visível (modelo 2487, Waters) e *software* Breeze (v. 3,2), após dissolução das partículas segundo procedimentos adaptados da UNITED STATES PHARMACOPEIA (2007b,c) e de GIUNCHEDI *et al.* (1998), respectivamente.

Amostras de 5 a 15 mg de partículas contendo 17α -metiltestosterona foram dissolvidas em 5 mL de diclorometano e subsequentemente misturadas com 10 mL de metanol. As amostras foram então centrifugadas por 20 minutos a 8000 rpm a 15 °C. O sobrenadante foi separado do material polimérico precipitado, sendo então filtrado através de um filtro com poros de diâmetro de 0,45 μ m (Cromafil, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) e, quando necessário, estocado em frascos âmbar sob refrigeração até posterior análise. A análise cromatográfica de 20 μ L das amostras foi realizada pelo uso de um cromatógrafo líquido equipado com uma coluna C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm x 5 μ m) e um detector de UV-visível. A fase móvel consistiu de uma mistura de solução degaseificada de água deionizada e acetonitrila (45:55 v/v) usada no modo isocrático a uma vazão constante de 1,0 mL/min, e a detecção foi realizada a 241 nm.

3.2.6.8. Estudos de liberação do hormônio *in vitro*

A análise da cinética de liberação do hormônio foi conduzida por 120 horas, a diferentes condições de pH. Aproximadamente 10 a 25 mg de partículas contendo 17α -metiltestosterona foram armazenadas em sacos de diálise (Inlab, com tamanho de corte de 14000, previamente hidratados com água deionizada) e imersas em cerca de 200 a 215 mL de soluções tampão a 0,1 M com diferentes valores de pH, cada uma contendo Tween 80 a 0,0015 mg/mL, usado para simular a presença de moléculas com atividade superficial proveniente de fluidos corpóreos (de acordo com WISCHKE e SCHWENDEMAN, 2008).

Para o preparo da solução tampão de pH 2,2 foram combinados 25 mL de solução de glicina a 0,2 M e 22 mL de HCl, sendo esta mistura posteriormente diluída em 100 mL. Para o tampão de pH 5,0 utilizou-se cerca de 59 mL de ácido acético 0,1 N e 141 mL de solução de acetato de sódio 0,1 N. Para a preparação do tampão de pH 7,4 (PBS), foram utilizados 2 g de KCl, 80 g de NaCl, 17,8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 2,4 g de KH_2PO_4 que foram diluídos em 900 mL de água. Posteriormente o pH foi ajustado à 7,4 com KOH e o volume completado até obter-se 1 litro. A solução foi então diluída em 1:9, para obter-se a concentração de 1 M. A solução resultante foi mais uma vez diluída até que se obteve uma solução de 0,1 M. O tampão de pH 8,8 foi preparado pela mistura de 25 mL de solução de glicina a 0,2 M e 3 mL de solução de NaOH a 0,2 M, sendo esta mistura diluída posteriormente em 100 mL.

Alíquotas de 1 mL de cada solução foram então periodicamente coletadas e misturadas a 4 mL de metanol, sendo estocadas sob refrigeração até posterior análise por HPLC, como descrito na sessão 3.2.6.7. Os dados obtidos da cinética de liberação foram ajustados segundo quatro modelos matemáticos: a cinética de 1ª ordem, modelo de Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull (HIGUCHI, 1963, KORSMEYER *et al.*, 1986, COSTA e LOBO, 2001, COSTA, 2002, Balcerzak e MURCHA, 2010, DASH *et al.*, 2010).

Na cinética de 1ª ordem tem-se que:

$$f_t = f_{t_{\text{máx}}} (1 - e^{-k_1 t}) \quad (4)$$

onde f_t é a fração cumulativa da droga liberada no tempo t ; $f_{t_{\text{máx}}}$ é a máxima fração da droga liberada durante o processo e k_1 é a constante cinética de 1ª ordem, [h^{-1}]. Este modelo é muito empregado para descrever a absorção e/ou liberação de alguns fármacos, ainda que seja difícil conceituar este mecanismo em bases teóricas. Os dispositivos que seguem este perfil de liberação tendem a liberar uma quantidade de fármaco proporcional à quantidade restante no seu interior, por unidade de tempo.

No modelo de Higuchi, tem-se que:

$$f_t = K_{H_1} t^{1/2} - K_{H_2} t \quad (5)$$

onde f_t é a fração cumulativa da droga liberada no tempo t , K_H é a constante cinética de Higuchi, $[h^{-1/2}]$. O modelo de Higuchi descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo, levando em consideração que a quantidade de droga na matriz é muito maior que a sua solubilidade. A difusão da droga ocorre somente em uma dimensão e as partículas da droga dispersa na matriz são muito menores que a espessura do sistema. O intumescimento da matriz e sua dissolução são considerados desprezíveis e a difusividade da droga no dispositivo é assumida como constante e independente da posição. Neste modelo, para esferas, considera-se que:

$$f_t = \left(\frac{18Dc_s t}{r_0^2 c_0} \right)^{1/2} \quad (6)$$

sendo que:

$$f_t = \frac{4}{3} \pi c_0 r_0^3 \quad (7)$$

Visto que a área superficial de uma esfera é dada por:

$$A = 4\pi r_0^2 \quad (8)$$

tem-se que:

$$f_t = A(Dc_s 2(c_0 - c_s)t)^{1/2} - \frac{4}{9} c c_s \frac{3c_0 - 2c_s}{2c_0 - c_s} Dt \quad (9)$$

onde D é a difusividade da droga, c_0 é a quantidade inicial da droga dispersa na matriz, c_s é a solubilidade da droga na matriz, r_0 é o raio da esfera e $c = 8\pi r$. Por aproximação, chega-se na forma simplificada da equação de Higuchi, como demonstrado na equação 5.

Já o modelo de Korsmeyer-Peppas é dado por:

$$f_t = at^n \quad (10)$$

em que f_t é a fração cumulativa da droga liberada no tempo t ; a é a constante relacionada à incorporação estrutural e à forma geométrica do dispositivo $[h^{-1}]$ e n é o expoente que indica o mecanismo de liberação. No caso de esferas, observa-se que quando $n = 0,45$ o modelo Fickiano (difusão) é predominante e, quando $0,45 < n < 0,89$ considera-se que a transferência de massa ocorre segundo um modelo não-Fickiano. Este modelo é usado quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando mais de um mecanismo possa estar envolvido. Quando há a possibilidade de uma liberação inicial rápida (“*burst effect*”), o termo b é inserido na equação, e esta se transforma em:

$$f_t = at^n + b \quad (11)$$

No modelo de Weibull tem-se que:

$$f_t = 1 - e^{-\frac{(t-T_i)^b}{a}} \quad (12)$$

onde, f_t é a fração cumulativa da droga liberada no tempo t , T_i é o tempo de latência do processo, a é um parâmetro referente à dependência do processo com o tempo e b é um parâmetro que caracteriza o tipo da curva. Valores de $b < 1$ denotam uma curva parabólica, com uma inclinação inicial constante; $b = 1$ caracteriza curva do tipo exponencial e valores de $b > 1$ referem-se a curvas do tipo sigmoidais, em forma de S com curvatura para cima, seguida de um ponto de viragem. Tipicamente, os valores de b tendem a ficar entre 0,69 a 0,75. Nos casos em que estes valores sejam menores, pode-se supor que ocorreu uma redução dos processos difusivos em um meio desordenado. O modelo de Weibull tende a descrever bem as cinéticas de liberação que são consequência da criação de um gradiente de concentração próximo dos limites de liberação da matriz.

Todos os dados foram ajustados usando o *software* Origin 8, usando o algoritmo de Levenberg-Marquardt, através do ajuste de valores de parâmetros no processo iterativo. Este algoritmo combina o método de Gauss-Newton e o método de regressão mais acentuado, obtendo-se assim, o mínimo global da função.

3.2.6.9. Estimativa da quantidade de partículas requeridas para o tratamento de tilápias do Nilo com MT

O cálculo da quantidade de partículas contendo MT usadas no tratamento de tilápias do Nilo foi realizado através da escolha das partículas que se mostraram mais apropriadas para o fim proposto. Para tal, foram considerados aspectos como morfologia, distribuição de tamanhos, eficiência de incorporação e cinética de liberação de MT em condições simuladas do trato gastrointestinal dos peixes analisadas para as formulações produzidas que foram consideradas como mais adequadas. A determinação da quantidade de partículas necessárias para o tratamento foi efetuada levando-se em consideração que as pós-larvas sejam alimentadas com ração contendo MT segundo o padrão proposto por DRUMMOND (2007): a quantidade de ração (QR) usada na primeira semana de tratamento

deve corresponder a 30% do peso do peixe; nas demais semanas foram consideradas reduções constantes de 5% na quantidade de ração administrada, sendo que ao fim da quarta semana de tratamento a quantidade de ração usada corresponde a 15% do peso do peixe. Para tal cálculo foi considerado que rações contendo cerca de 40 mg de MT por kilograma de ração (QMT) já seriam suficientes para provocar reversão sexual das tilápias do Nilo (DRUMMOND, 2007), sendo realizados seis arrojamentos diários com ração suplementada com as partículas contendo MT. Desta forma, foram consideradas as quantidades de ração administradas durante a primeira e quarta semana de tratamento, visto que estes são os pontos máximos e mínimos referentes à quantidade de MT incorporada à ração. Considerou-se que os pesos médios do peixe na 1ª e na 4ª semana de tratamento seriam de 0,008 e 0,270 g (DRUMMOND, 2007). A quantidade de MT requerida diariamente foi determinada pela equação 4:

$$\text{Total de MT/dia} = (\text{QR}) \times (\text{QMT}) \times (\text{n}^\circ \text{ de arrojamentos/dia}) \quad (13)$$

em que a quantidade de ração é dada por:

$$\text{QR} = n \times \text{peso}_{\text{peixe}} \quad (14)$$

onde n corresponde à fração de MT misturada à ração conforme o estágio de crescimento dos peixes.

A quantidade de partículas (QP) usadas por dia durante cada uma das semanas de tratamento foi calculada como sendo:

$$\text{QP} = \text{Total de MT/dia} \times \left(\frac{M_{\text{partícula}}}{R_{\text{Pol}}^{\text{MT}}} \right) \quad (15)$$

em que $R_{\text{Pol}}^{\text{MT}}$ é a razão mássica de MT por polímero em cada partícula e $M_{\text{partículas}}$ corresponde à massa das partículas, que é dada por:

$$M_{\text{partículas}} = M_{\text{polímero}} + M_{\text{MT}} \quad (16)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaios preliminares de formação de partículas via SAS

Como indicado na seção 3.2.2, foram realizados ensaios preliminares de formação de partículas utilizando a metodologia SAS. Estes ensaios foram fundamentais, pois foi a primeira vez que se realizou a concepção e montagem de tal sistema de formação de partículas nos laboratórios de Engenharia de Biorreações e Colóides (LEBC/FEQ) e de Tecnologias Supercríticas (LTS/IQ). Além disso, tais ensaios possibilitaram estabelecer quais seriam os sistemas poliméricos e as condições operacionais iniciais que deveriam ser estudados, tomando por base trabalhos descritos na literatura. Os resultados qualitativos obtidos nesta fase inicial do estudo são resumidos na Tabela 17 e ilustrados na Figura 16.

Tabela 17: Resultados dos ensaios preliminares de formação de partículas em diferentes condições operacionais.

Ensaio	Condições operacionais				
	Tipo de polímero	Concentração da solução polimérica (% m/v)	Vazão da solução polimérica (mL/min)	Pressão do sistema (MPa)	Aspecto morfológico do material obtido
P1	PCL	0,5	0,5	12	Filme polimérico transparente
P2	PLGA				
P3		8,5			
P4	PLGA/PLA (razão 1:1 m/m)	0,5	1,0		Partículas agregadas
P5	PLA			8	Partículas
P6					
P7					
P8		3,0		12	Partículas e fibras

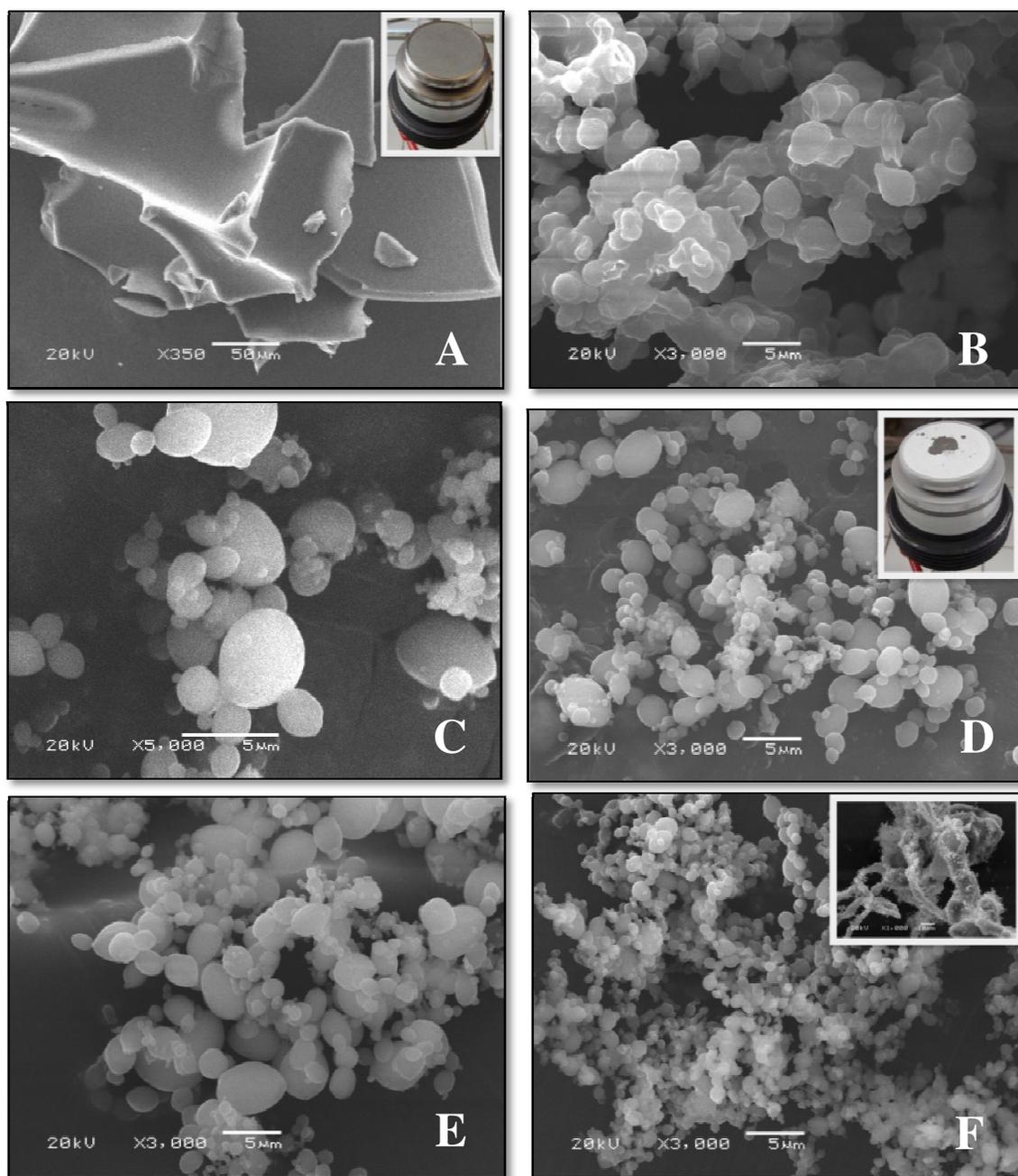


Figura 16: Aspecto morfológico típico obtido por microscopia eletrônica de varredura do filme produzido nos ensaios P1, P2 e P3, mostrando detalhe do filtro usado no sistema (A), ensaio P4 (B), ensaio P5 (C), ensaio P6, com detalhe para o filtro recoberto pelas partículas (D), ensaio P7 (E), ensaios P8 (F), com detalhe para as fibras que também foram obtidas nestas condições operacionais.

É importante notar que nesta fase dos estudos observou-se somente se o sistema era capaz ou não de formar partículas, não se analisando, portanto, as características em si das partículas formadas.

Foram realizados estudos de formação de partículas utilizando-se somente PLA, com base em condições indicadas na literatura. Em todos os ensaios realizados observou-se a formação de partículas discretas e com formato regular, no caso, oval, do tipo “*free flowing*”, resultado similar ao encontrado por KANG *et al.* (2008a). O aspecto típico destas partículas a olho nu é mostrado na Figura 17. A variação da pressão do sistema não produziu partículas com diferenças morfológicas aparentes (ensaios P5 ao P7). Isso é muito importante, pois demonstra a grande estabilidade do sistema, que pode trabalhar tanto em pressões mais altas quanto mais amenas. Essa estabilidade é bastante relevante, uma vez que, como não se tem dados relatados da solubilidade do agente ativo no CO₂ supercrítico, isso permitiria explorar uma faixa ampla de condições de formação de partículas.

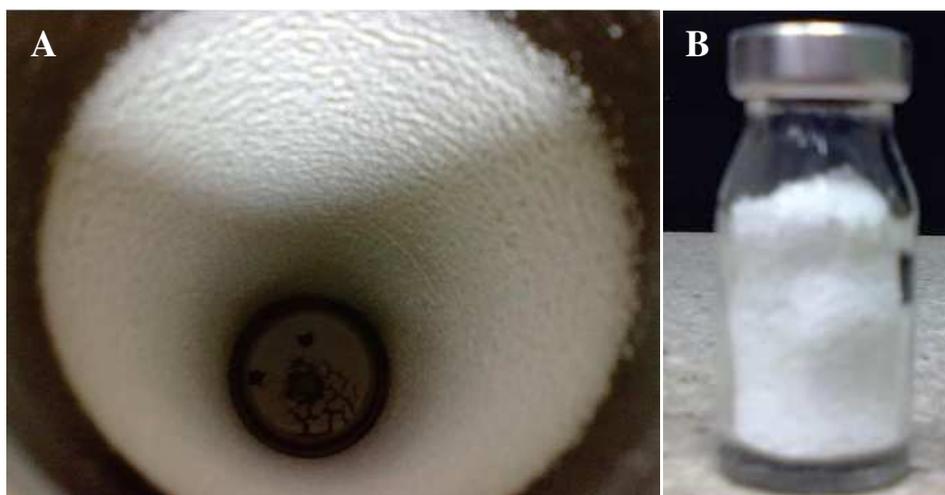


Figura 17: Aspecto típico das partículas de PLA produzidas por SAS, em que (A) indica as partículas formadas ao fim do processo, depositadas na superfície interna do vaso de precipitação e (B) as partículas coletadas e armazenadas em frascos de vidro para posterior análise.

No ensaio P8, estudou-se a influência que um aumento de 6 vezes na concentração do polímero em solução produziria na formação de partículas, além de verificar a capacidade do sistema nestas condições. Aparentemente, as partículas formadas neste ensaio não apresentaram características morfológicas muito distintas das produzidas nos ensaios P5 a P7. No entanto, notou-se também a formação de fibras, o que deve ser consequência da baixa capacidade de nucleação e da alta taxa de crescimento dos agregados no sistema submetido à concentração elevada de polímero na solução devido à provável insuficiente vazão de CO₂ dentro do vaso de precipitação. Este tipo de condição levou à formação de uma solução muito viscosa, o que dificultou o bombeamento da mesma para dentro do vaso de precipitação, acarretando constantes episódios de entupimento e elevação da pressão interna da bomba de HPLC e em frequente interrupção na injeção durante o processo. Este ensaio mostrou-se bastante importante, pois além de indicar que soluções concentradas possuem capacidade de formação de partículas, o que reduziria o tempo de processo para produzir uma determinada quantidade de partículas, também acabou por definir a máxima capacidade de bombeamento da bomba de HPLC. Desta forma, optou-se por realizar os demais ensaios em condições em que a solução polimérica não estivesse em concentrações que ultrapassassem 50% do valor usado no ensaio P8.

Como se pode observar na Figura 16(A), não foi possível formar partículas nos ensaios em que foram utilizadas soluções poliméricas puras de PCL e PLGA, notando-se a formação de uma fina camada de filme polimérico. No caso do sistema em que se empregou PCL (ensaio P1), a formação de filme polimérico foi atribuída às características térmicas da PCL, já que esta apresenta baixa temperatura de transição vítrea. Assim, na presença de CO₂ supercrítico, a PCL deve sofrer um processo de intumescimento, favorecendo a formação de filme, o que já foi observado em outros trabalhos (GHADERI *et al.*, 1999). Apesar de utilizar nestes ensaios pressões mais reduzidas e concentrações de diclorometano mais altas em comparação aos trabalhos descritos na literatura, a formação de partículas e a minimização da formação de filme não foram verificadas.

Nota-se comportamento semelhante nos ensaios realizados com PLGA em diferentes condições operacionais quando comparado aos ensaios obtidos com a PCL. No sistema descrito no ensaio P2, utilizou-se condições muito similares às descritas na literatura, não se obtendo, no entanto, êxito na formação de partículas. Como a concentração da solução polimérica poderia ser um limitador do processo de nucleação, optou-se por realizar o Ensaio P3 aumentando-se em 17 vezes a concentração do polímero na solução. Ainda assim, não se observou formação de partículas neste sistema. Desta forma, pode-se concluir que o reduzido grau de cristalinidade do material polimérico e a baixa massa molar, neste caso, foram fatores limitantes na formação de partículas, como observado por YEO e KIRAN (2005). Tal suposição foi confirmada pela análise dos dados da Figura 18, notando-se que a cristalinidade do PLGA é muito baixa quando comparada à dos demais polímeros usados no presente trabalho. Na curva de DSC deste polímero (Figura 18) nota-se a sua característica amorfa, fato constatado pela ausência dos pontos referentes à T_c e T_m .

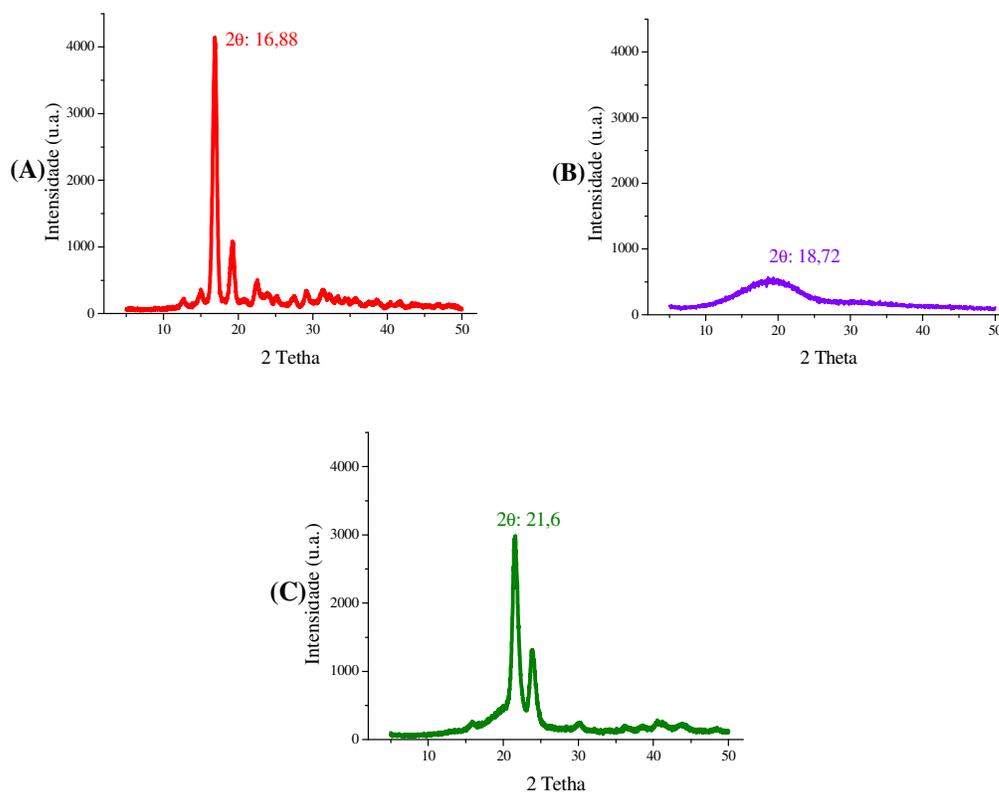


Figura 18: Difratograma dos polímeros puros PLA (A), PLGA (B) e PCL (C).

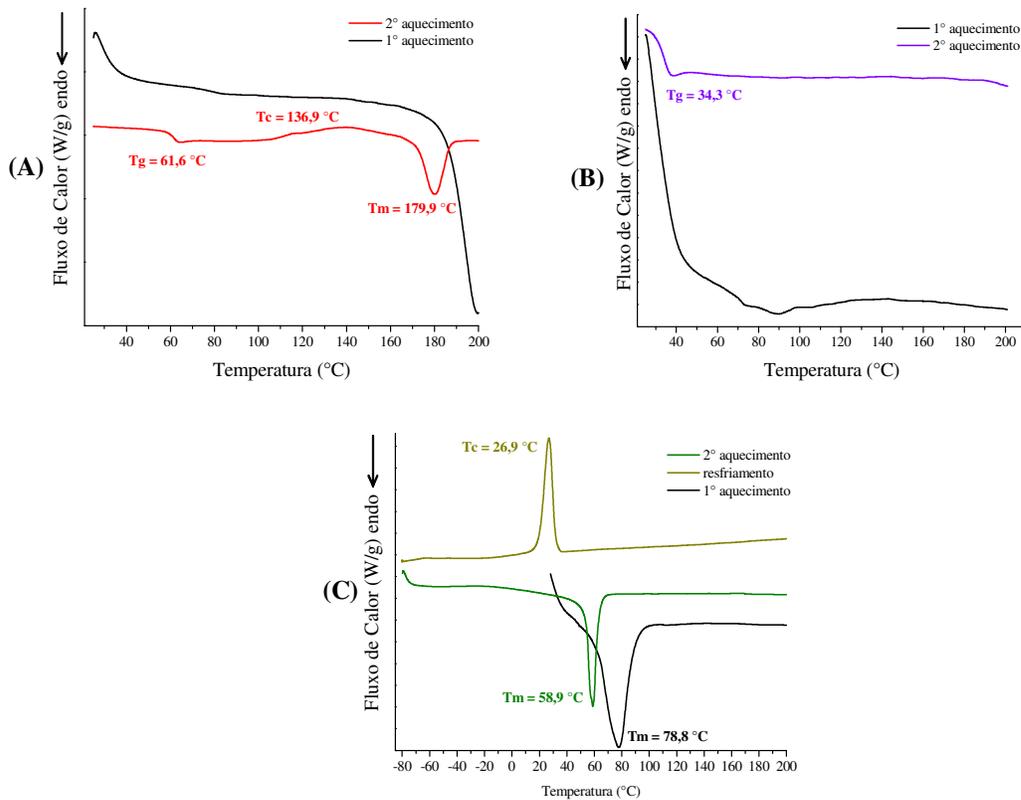


Figura 19: Análise de DSC dos polímeros PLA (A), PLGA (B) e PCL (C).

É importante ressaltar que os dados resultantes da análise por DSC dos polímeros puros (Figura 19) do presente trabalho são condizentes com os descritos tanto pelos fabricantes quanto pela literatura (LU e CHEN, 2004; SINHA *et al.*, 2004; PURAC, 2008; PAN e INOUE, 2009), não se observando desvios muito grandes dos valores das propriedades analisadas. No primeiro aquecimento, para todos os polímeros, não foram observados os picos referentes à temperatura de cristalização, o que deve estar relacionado à cinética de cristalização à frio dos materiais, sendo portanto, necessário realizar o segundo aquecimento para constatar tais pontos. O maior contato dos polímeros fundidos com a cápsula de armazenamento deve ter favorecido a leitura dos dados referentes à temperatura de cristalização destes materiais.

Uma alternativa para minimizar o efeito da baixa cristalinidade do PLGA na formação de partículas foi a associação deste polímero com um polímero de alta cristalinidade, no caso, o PLA, como se pode observar na Figura 16. Os efeitos dessa associação na formação de partículas (ensaio P4) podem ser observados na Figura 16(B). Nota-se que a associação de ambos foi capaz de formar partículas, ainda que as mesmas tenham se mostrado aglomeradas. Como observado por COCERO *et al.* (2009), o CO₂ supercrítico tem a tendência de reduzir a temperatura de transição vítrea de polímeros amorfos (como o PLGA) de 4 a 30 °C para o aumento de cada unidade de pressão aplicada no sistema (em MPa), devido às interações moleculares entre o polímero e o CO₂ dissolvido que atua, desta forma, como um plastificante. Assim, seria observada uma remoção menos eficiente do solvente do sistema devido a estas interações, aliada a uma maior dificuldade na formação de núcleos, o que impediria a formação de partículas discretas com forma regular. Apesar deste resultado, seria possível usar esta abordagem da associação de PCL e PLGA com PLA para produzir partículas, pois a formação de partículas oriundas de sistemas poliméricos puros de alguns destes compostos seria bastante problemática. Assim, nas próximas etapas do estudo, buscou-se condições operacionais que favorecessem a formação de sistemas particulados com perfil adequado de distribuição de tamanhos, com morfologia regular, pelo uso isolado do PLA ou mesmo pela associação deste material com os demais polímeros. Com base nestes ensaios preliminares, realizou-se o estudo detalhado da influência das variáveis de processo sobre a formação e morfologia das partículas, utilizando-se para tal, o PLA, uma vez que este foi o polímero que propiciou formação de partículas com morfologia mais regular e menos agregadas.

4.2. Obtenção e caracterização de partículas de PLA

Realizou-se o estudo de formação de partículas de PLA, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.3. As variáveis operacionais que mostraram maior efeito sobre a formação de partículas, e as que foram capazes de produzir partículas com aspecto morfológico mais adequado, foram selecionadas para a realização do estudo detalhado.

4.2.1. Influência das variáveis de processo sobre a morfologia, diâmetro médio e quantidade residual de DCM nas partículas de PLA

Os diâmetros médios das partículas de PLA produzidas nestes ensaios (condições experimentais indicadas no item 3.2.4.1.) e a concentração residual de diclorometano (DCM) nas mesmas são mostradas na Tabela 18. A análise estatística dos diâmetros médios é apresentada na Tabela 19 e nas Figuras 20 e 21 observam-se as características morfológicas típicas das partículas obtidas e seus perfis de distribuição de tamanho.

Tabela 18: Resultados do planejamento fatorial usado para estudar os efeitos da pressão, concentração e vazão da solução polimérica sobre os diâmetros médios das partículas de PLA e sobre os níveis de DCM residual.

Ensaio	Concentração da solução de PLA (%)	Pressão (MPa)	Vazão da solução de PLA (mL/min)	Diâmetro médio (μm)	Faixa de distribuição de tamanho das partículas (μm)	DCM residual (ppm)
A1	0,5	8,0	0,5	6 ± 1	0,4 a 20,0	790
A2			2,5	21 ± 1	0,6 a 208,9	1130
A3		16,0	0,5	5 ± 0	0,6 a 22,9	1280
A4			2,5	18 ± 0	0,7 a 239,9	6490
A5	1,5	8,0	0,5	7 ± 0	0,6 a 52,5	< 600
A6			2,5	12 ± 0	0,7 a 79,4	5980
A7		16,0	0,5	7 ± 0	0,6 a 158,5	2040
A8			2,5	11 ± 0	0,8 a 79,4	2630
A9	1,0	12,0	1,5	10 ± 0	0,7 a 45,7	3400
A10			1,5	6 ± 0	0,6 a 30,2	4160
A11			1,5	9 ± 0	0,7 a 39,8	4670

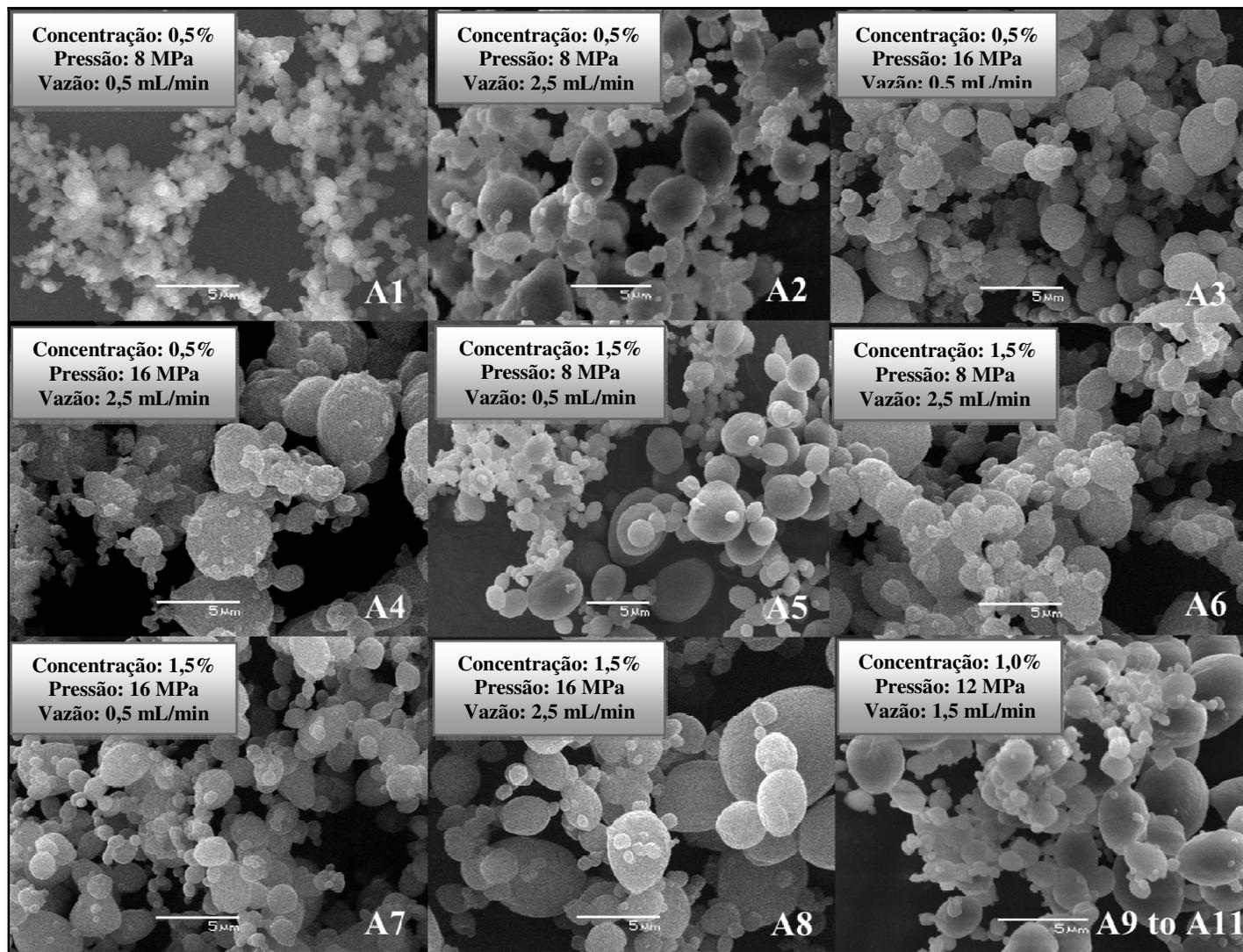


Figura 20: Aspecto morfológico típico em microscópio eletrônico de varredura das partículas produzidas nos ensaios A1 a A11.

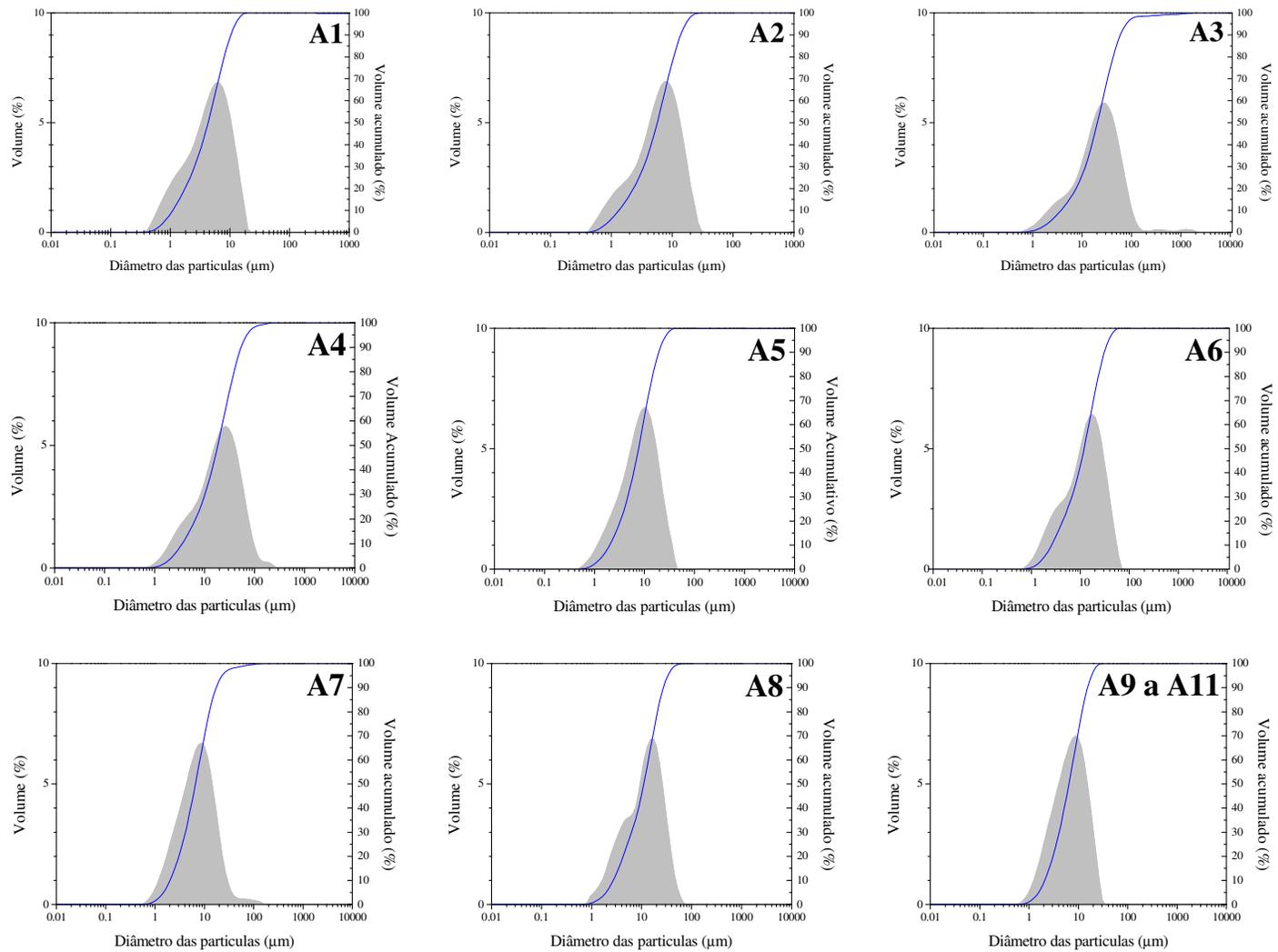


Figura 21: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas nos ensaios A1 a A11.

Tabela 19: Análise estatística dos resultados do planejamento fatorial 2^3 usado para estudar os efeitos da pressão, concentração e vazão da solução polimérica sobre os diâmetros médios das partículas de PLA.

Fator	Efeito	Erro padrão	$t_{\text{calc}(4)}$	p
Média	10,24300	0,662824	15,45358	0,000102
Vazão da solução polimérica (V)*	9,22350	1,554460	5,93357	0,004044
Pressão (P)	-0,96050	1,554460	-0,61790	0,570085
Concentração da solução polimérica (C)	-3,22950	1,554460	-2,07757	0,106315
V x P	-0,44100	1,554460	-0,28370	0,790719
V x C*	-4,66500	1,554460	-3,00104	0,039901
P x C	0,17400	1,554460	0,11194	0,916266

* Variáveis com efeito significativo para $p < 0,05$.

Como se pode observar, o planejamento experimental 2^3 realizado resultou em partículas com diâmetros médios que variaram de 5,4 a 20,5 μm e quantidade residual de DCM máxima de 6490 ppm. Na Figura 20 observa-se que, para todas as condições testadas, obteve-se com êxito formação de partículas de PLA. As partículas obtidas apresentaram-se em sua grande maioria esféricas ou com morfologia oval, contando com superfície predominantemente lisa. As partículas obtidas no ensaio A4, no entanto, apresentaram aspecto menos regular, notando-se também, uma forte tendência de agregação. Nesta condição experimental, a concentração polimérica empregada foi a menor de todas, sendo a pressão e vazão da solução as mais elevadas. A combinação destas variáveis muito provavelmente contribuiu para uma remoção ineficiente do solvente orgânico pelo fluido supercrítico, o que possibilitou o aumento da concentração de DCM na coluna, impedindo o processo normal de nucleação e crescimento de partículas.

As partículas obtidas nos ensaios apresentaram tamanhos que variaram entre 0,4 a 240 μm (como pode se observar na Figura 21), devendo-se ressaltar que a distribuição de tamanhos é dada em termos de porcentagem de volume, o que indica que poucas partículas

grandes foram formadas no sistema. Nota-se que a faixa de diâmetros foi mais estreita nos casos das partículas obtidas nas condições experimentais dos ensaios A1, A5 e A9 a A11 e que os diâmetros médios obtidos por MEV e por espalhamento de luz apresentaram diferenças consideráveis. Analisando-se somente as microscopias (abordagem comumente usada em boa parte dos trabalhos disponíveis na literatura), nota-se, para todas as condições, que os diâmetros médios são menores que 5 μm e que, de forma geral, os valores são inferiores aos determinados por espalhamento de luz. Provavelmente a intensa agregação das partículas afetou a medida do tamanho das partículas por espalhamento de luz, levando a valores médios muito maiores que os observados via MEV.

A análise estatística dos efeitos dos parâmetros sobre os diâmetros médios mostrou que as variáveis que apresentaram influência significativa sobre as características das partículas formadas são a vazão de solução polimérica e sua interação com a concentração da solução de PLA. Enquanto o aumento na vazão da solução polimérica de PLA aumenta o diâmetro médio das partículas, o efeito da interação entre vazão de solução polimérica e concentração resulta em redução no tamanho das partículas. No casos em que se utilizam altas vazões de solução polimérica, observa-se que o tempo de processo para produzir uma determinada quantidade fixa de partículas é menor, o que propicia uma remoção menos eficiente de DCM. Esta condição é agravada nos casos em que se usam baixas concentrações de polímero, como observado nos ensaios A2 e A4. Desta forma, nota-se uma intensificação da agregação das partículas, particularmente nos casos em que grandes quantidades de solvente residual permanecem no sistema. Além disso, o aumento na vazão da solução polimérica quando se mantém constante a vazão de fluido supercrítico ou nos casos em que se aumenta proporcionalmente com a vazão da solução polimérica irá se observar comumente um prejuízo no processo de atomização da solução no vaso de precipitação, levando ao consequente aumento do diâmetro médio das partículas formadas (BOUCHARD *et al.* 2008, GOKHALE *et al.*, 2007 e MIGUEL *et al.*, 2008). Por outro lado, se a vazão da solução polimérica é aumentada mantendo-se baixos os valores de vazão de fluido supercrítico, o solvente presente no vaso de precipitação irá aumentar, produzindo, desta forma, maior agregação das partículas formadas (MARTÍN e COCERO, 2004 e CARRETIER *et al.*, 2003). REVERCHON e DE MARCO (2011) observaram que

partículas da ordem de nanômetros podem ser eficientemente obtidas quando as condições internas do vaso de precipitação são mantidas acima das indicadas para o ponto crítico de mistura do antisolvente e da solução orgânica. Se uma fase líquida ou a mistura de duas fases (gás e líquida) é mantida no vaso de precipitação, a mistura de nano e micropartículas é comumente observada. Nos casos em que uma mistura gasosa é observada, nota-se a formação de micropartículas expandidas, ou seja, que possuem um núcleo vazio. Essas diferentes fases são obtidas, portanto, pela apropriada seleção da pressão, temperatura, vazão do fluido supercrítico e da solução orgânica empregadas.

A efetiva remoção do DCM durante o processo de produção de partículas é muito importante, uma vez que existem preocupações com relação aos níveis residuais aceitáveis, por conta de sua inerente toxicidade. De acordo com a UNITED STATES PHARMACOPEIA (2008a) (USP), a concentração residual máxima de diclorometano permitida em produtos farmacêuticos é igual a 600 ppm, sendo que quantidades iguais ou inferiores são desejadas. A única condição de processo que resultou em níveis residuais permitidos pela USP foram as empregadas no ensaio A5. Pressões menores, como as usadas neste experimento, propiciaram melhor eficiência na remoção do solvente orgânico, já que a densidade do CO₂ supercrítico tende a diminuir linearmente com a pressão, o que leva, conseqüentemente, a uma melhora na eficiência na transferência de massa do processo, apesar do menor efeito solvatante do CO₂. O uso de vazões de solução polimérica mais elevadas (como demonstrado nos casos A2 e A6) teve, por outro lado, um efeito negativo na remoção do DCM. Como observado por MARTÍN *et al.* (2002), o uso de vazões maiores tende a diminuir a força motriz para a transferência de massa do DCM no CO₂ supercrítico, elevando, assim, os níveis de solvente residual presentes nas partículas. Uma alternativa para melhorar a remoção de DCM seria realizar um aquecimento das partículas em estufa à vácuo a 46 °C por 4 horas ou em uma estufa comum por 24 horas. Tal procedimento foi testado neste trabalho e mostrou ser bastante eficaz, sendo capaz de reduzir a quantidade de DCM das partículas produzidas a níveis inferiores a 600 ppm, independentemente da quantidade de DCM inicial.

No caso do ensaio A6, observou-se um aumento no diâmetro médio, como consequência do aumento da vazão de solução polimérica injetada no sistema. Isto levou a distribuições de tamanhos mais largas, com partículas de diâmetros médios maiores que 11 μm . O aumento na pressão para 16 MPa, mantendo fixas as condições de concentração e vazão da solução polimérica (ou seja, iguais às do ensaio A6), por outro lado, não foi capaz de compensar o efeito da interação vazão-concentração, de modo a reduzir o diâmetro médio das partículas. Este comportamento fica mais claro quando se observa o resultado obtido no ensaio A7, em que uma redução na vazão da solução polimérica em cerca de 5 vezes levou a uma redução de 59% no diâmetro médio das partículas. Estes dados corroboram os resultados da análise do planejamento fatorial que mostraram que, em um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), somente a vazão da solução polimérica e sua interação com a concentração da solução polimérica são capazes de produzir efeitos significativos no diâmetro das partículas (Tabela 19). Por outro lado, pressão e concentração da solução polimérica, bem como a interação entre vazão de solução polimérica e pressão do sistema e a interação entre pressão e concentração da solução polimérica não tiveram efeitos significativos sobre o diâmetro das partículas de PLA produzidas. Esperar-se-ia que o aumento da pressão no vaso de precipitação tivesse um efeito sobre o diâmetro das partículas, uma vez que a solubilidade do solvente orgânico no fluido supercrítico aumenta enquanto que o seu coeficiente de difusão diminui, acompanhado pelo aumento da viscosidade do meio. No entanto, deve-se destacar que os efeitos do aumento da pressão, neste caso, seriam dependentes do balanço destes fatores ou da mistura de fases dentro do vaso de precipitação. Desta forma, seria observada a ocorrência tanto do aumento do diâmetro das partículas produzidas (REVERCHON *et al.*, 2008, MIGUEL *et al.*, 2008, DE MARCO e REVERCHON, 2011, ROSSMANN *et al.*, 2012,) como também a produção de partículas menores (MARTÍN e COCERO, 2004 e GOKHALE *et al.*, 2007). O aumento das partículas seria um efeito relativo ao aumento da aglomeração das partículas pelo aumento da pressão, devido à relação estabelecida entre pressão e o parâmetro de solubilidade do CO_2 . De acordo com HERBERGER *et al.* (2003), tais observações seriam similares ao previsto pela interação entre polímero e solvente, ou

neste caso, o comportamento plastificante do dióxido de carbono, comumente indicadas por Florry-Huggins.

Desta forma, para obter partículas pequenas, não agregadas e com baixas quantidades de diclorometano residual, o sistema deveria ser operado com baixas vazões de solução polimérica e preferencialmente usando-se soluções poliméricas mais concentradas. Como observado por PALAKODATY e YORK (1999), este fenômeno poderia ser explicado pelo fato de que a taxa de nucleação é, em tais casos, dependente dos níveis de saturação de CO₂ resultantes da taxa de transferência de massa do fluido supercrítico nas gotas formadas. Além disso, esta seria uma função do coeficiente de difusão do fluido supercrítico na fase solvente. Assim, quando se utilizam soluções mais concentradas, nota-se um aumento gradual da concentração do soluto nas gotas, o que leva a maiores taxas de nucleação e conseqüentemente, menor aglomeração das partículas, devido à menor quantidade de solvente presente nas mesmas. ROSSMANN *et al.* (2012) observaram, no entanto, que o aumento da concentração polimérica teve um efeito distinto no tamanho das partículas, dependendo do material usado no processamento. Esta seria uma das razões para o constante emprego de diferentes solventes usados na formação de partículas via SAS.

Levando isso em consideração, as condições de processamento usadas no experimento A5 demonstram ser as mais apropriadas para a produção de partículas de PLA que possuam características mais adequadas. Deve-se ressaltar que não há dados na literatura consultada relativos ao tamanho de partículas adequados para administração oral de agentes ativos para tilápias, supondo-se assim, que a faixa de 5 a 50 µm, indicada para mamíferos, seja também apropriada ao uso em peixes. Assim, nos estudos subsequentes de incorporação de hormônio, as condições descritas no ensaio A5 foram utilizadas.

4.2.2. Influência da incorporação de 17 α -metiltestosterona nas características das partículas de PLA

A adição de diferentes concentrações de 17 α -metiltestosterona durante a produção das partículas de PLA foi estudada, utilizando para tal a condição experimental do ensaio A5. Assim, a pressão usada foi de 8 MPa, enquanto a concentração de solução polimérica e a vazão da mesma foram fixadas a 1,5% (m/v) e 0,5 mL/min, respectivamente. Observou-se mudanças significativas na morfologia das partículas formadas, como pode se verificar na Figura 22. Diferenças no diâmetro médio das partículas e na eficiência de incorporação estão apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20: Características das partículas obtidas na presença de diferentes quantidades de 17 α -metiltestosterona.

Ensaio	Razão inicial de MT/polímero (m/m)	Razão final de MT/polímero (m/m)	Eficiência de incorporação de MT (%)	Diâmetro médio (μm)	Faixa de distribuição de tamanhos das partículas (μm)
A21	0,125	0,028	22 \pm 2	15 \pm 1	0,6 a 91,2
A22	0,250	0,051	20 \pm 1	14 \pm 2	0,5 a 104,7
A23	0,500	0,166	33 \pm 10	25 \pm 0	0,5 a 363,1
A24	0,750	0,400	53 \pm 10	21 \pm 3	0,6 a 724,4

Em todos os casos, como esperado, os níveis de diclorometano residual ficaram abaixo dos 600 ppm, o que demonstra que, apesar da suposta alta partição do agente ativo no solvente, o mesmo foi capaz de contribuir positivamente, de modo a melhorar o acesso do CO₂, ao interior das partículas formadas, uma vez que este aumentou, possivelmente, os espaços intercadeias do polímero. O diâmetro médio das partículas variou entre 14 a 25 μm (Tabela 20), sendo esta variação mais evidente nos casos em que se compara com as partículas produzidas sob as mesmas condições experimentais (ensaio A5), no entanto, sem adição de homônio (diâmetro de 7,4 μm). Deve-se enfatizar que todas as curvas de

distribuição de tamanhos parecem ter sofrido alargamento (Figura 23), uma vez que as partículas produzidas são maiores e também porque se nota uma quantidade maior de agregados no sistema.

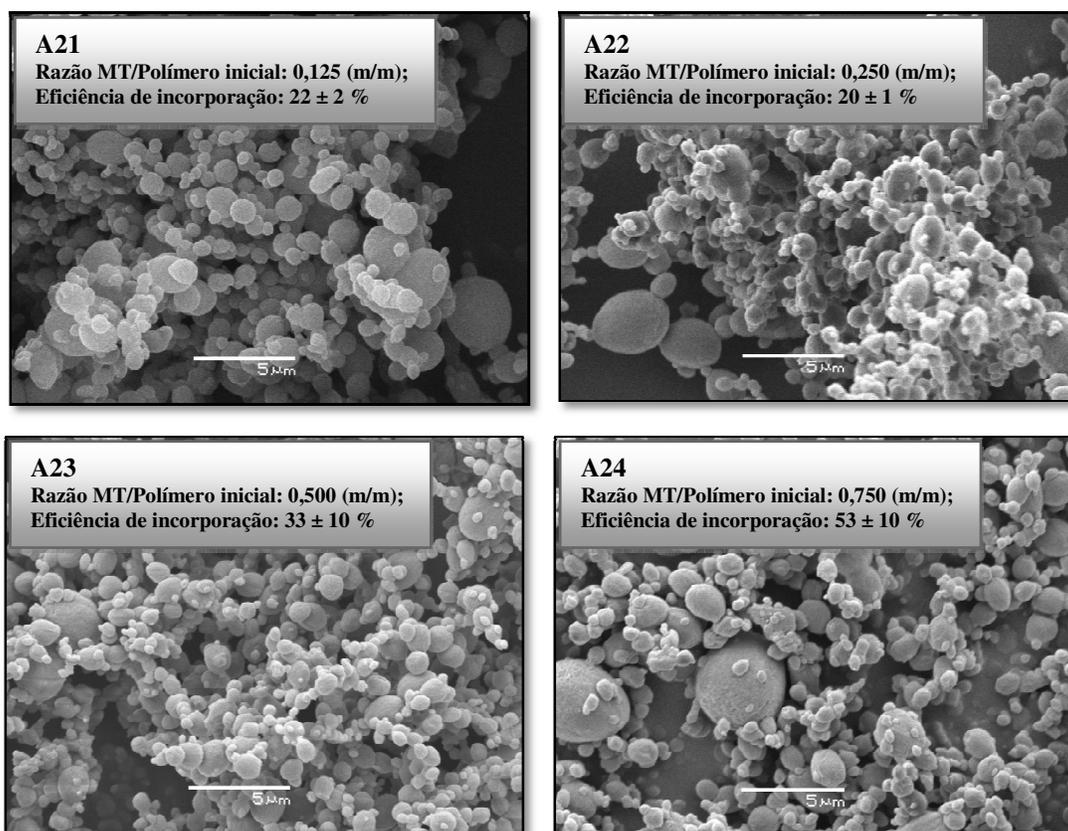


Figura 22: Aspecto morfológico típico em microscópio eletrônico de varredura das partículas produzidas nos ensaios A21 a A24.

Como observado por KIM *et al.* (2007), as variações na distribuição de tamanhos obtidas podem ser explicadas em termos da nucleação das partículas através dos processos de supersaturação e precipitação, seguido pelo processo de crescimento dos núcleos, durante a expansão das gotas de solução polimérica. Assim, nos casos em que se usam baixas concentrações de droga, o processo de nucleação torna-se o mecanismo dominante de formação de partículas, propiciando assim, a obtenção de partículas pequenas. Quando, por outro lado, faz-se uso de soluções com altas concentrações de agente ativo, o processo

de precipitação torna-se predominante sobre os demais, durante o processo de expansão das gotas, levando simultaneamente ao processo de nucleação e crescimento das partículas, devido à maior dificuldade de interação das cadeias poliméricas. Desta forma, nessas condições, partículas maiores seriam produzidas. Ainda de acordo com KIM *et al.* (2007), o aparecimento de populações de partículas adicionais na curva de distribuição de tamanhos seria resultado da possível competição entre os processos de crescimento e nucleação durante a formação das partículas. Dito isso, pode-se supor que o aumento na concentração de agente ativo pode afetar positivamente o tamanho das partículas através do aumento da nucleação, como mostrado no ensaio A24 (razão mássica de 0,4 de MT/polímero), ou negativamente, pelo aumento do processo de crescimento das partículas secundárias (como mostrado nos casos A21 a A23), de acordo com REVERCHON (1999).

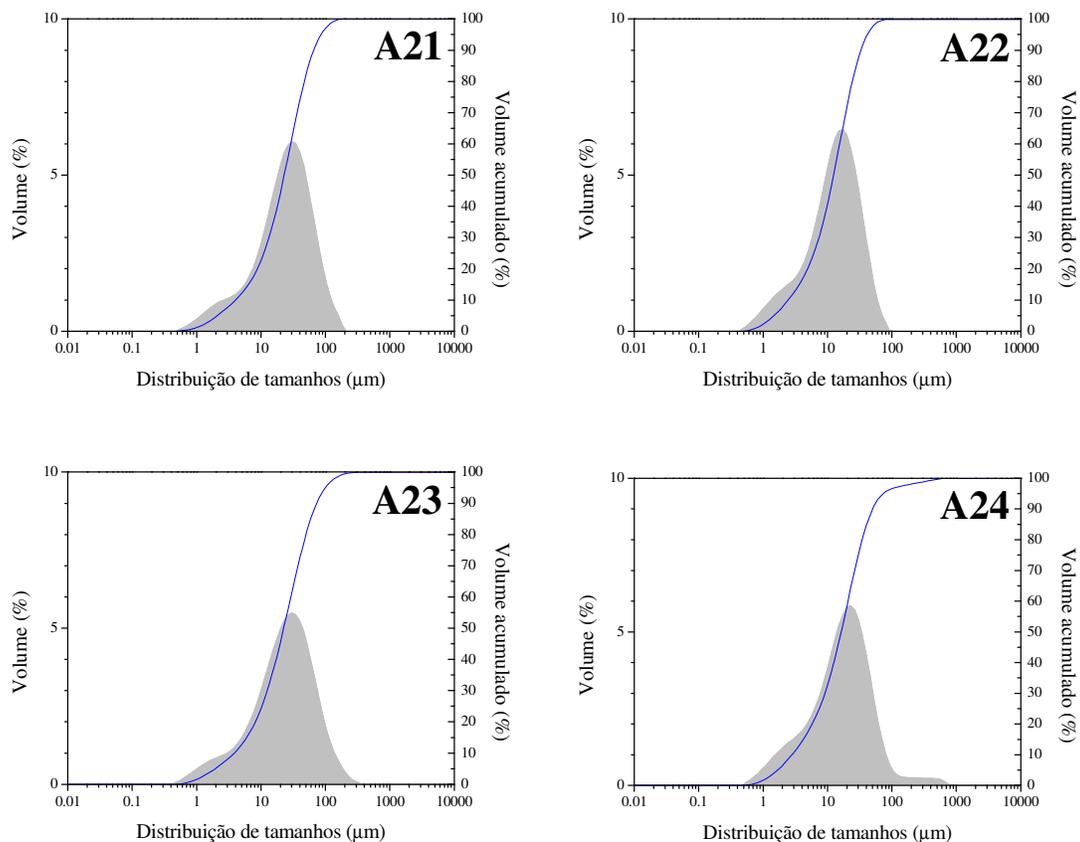


Figura 23: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas nos ensaios A21 a A24.

Enquanto as partículas produzidas na ausência de MT apresentaram forma oval (Figura 20, ensaio A5), as partículas de PLA produzidas a partir de soluções contendo hormônios apresentaram formato mais esférico (Figura 22). Além disso, quando MT foi adicionada à solução polimérica, a aparência da superfície das partículas foi alterada, verificando-se que a rugosidade aumentou consideravelmente. Estas mudanças nas características superficiais das partículas podem provavelmente ser atribuídas a um possível aumento na microporosidade, já que o aumento na proporção de hormônio na solução polimérica poderia agir como uma barreira na interação entre as cadeias de PLA. Assim, a produção de partículas com superfícies mais lisas seria bastante comprometida. Supõe-se, desta maneira, que zonas interfásicas possam ter se formado, resultando em distribuição relativamente heterogênea do agente ativo nas partículas de PLA. Não se deve, entretanto, excluir a hipótese de o próprio processo de secagem ter favorecido a formação de tais estruturas.

As eficiências de incorporação de droga nas partículas obtidas foram relativamente baixas, entre 22 a 54%, porém bastante satisfatórias em comparação a dados de outros estudos baseados no uso de tecnologia de fluidos supercríticos, como previamente ilustrado na revisão bibliográfica. Os resultados de incorporação podem ser explicados em termos da provável alta solubilidade ou partição da droga no fluido supercrítico. Supõe-se que a sua solubilidade tenha aumentado devido à presença de DCM, o que pode ter levado à extração parcial da droga durante o processo de formação de partículas, ocorrendo com maior intensidade durante o passo de secagem das mesmas. MEYER *et al.* (1998) obtiveram resultados semelhantes para a incorporação de gentamicina em partículas de PLA. Apesar da baixa eficiência de incorporação da droga, as partículas obtidas no presente trabalho parecem ser apropriadas para o uso ao qual se destinam, uma vez que baixas quantidades diárias de MT já seriam suficientes para garantir a inversão sexual das tilápias do Nilo. Adicionalmente, espera-se que não seja necessário o uso de partículas contendo altas quantidades de hormônio, uma vez que o efeito da ação do meio gastrointestinal seria supostamente suficiente para se sobrepor ao efeito da cinética de liberação da droga por difusão por longos períodos. Além disso, o hormônio não incorporado nas partículas poderia ser empregado posteriormente nas próximas bateladas, devido ao fácil reciclo no

sistema. Desta forma, altas eficiências globais de utilização do hormônio poderiam ser alcançadas.

4.2.3. Comportamento térmico das partículas de PLA

A habilidade do CO₂ supercrítico em produzir mudanças nas características mecânicas e físicas de materiais poliméricos amorfos e semicristalinos é bem conhecida. A redução na temperatura de transição vítrea destes materiais pode ser efetivamente observada pela atuação do CO₂ como um plastificante de materiais poliméricos (VERRECK *et al.*, 2005). Além disso, de acordo com COCERO *et al.* (2009), reduções nas temperaturas de fusão e de transição vítrea são frequentemente observadas quando as partículas são mantidas em contato com CO₂ pressurizado por tempos prolongados. Dessa forma, mudanças nas propriedades dessas partículas são esperadas e relatadas. Outra característica afetada pelo CO₂ pressurizado é a morfologia da matriz e a consequente difusividade dos agentes ativos na matriz polimérica. Dependendo das condições de processo, o contato de polímeros semicristalinos como o PLA com o CO₂ supercrítico pode aumentar a mobilidade das cadeias poliméricas, permitindo assim, um rearranjo mais fácil em configurações cineticamente mais favoráveis, o que, a longo prazo, também facilitaria o processo de cristalização (REVERCHON, 1999; KAZARIAN, 2000; TAKADA *et al.*, 2004 e ZHAI *et al.*, 2009). Este efeito é melhorado pelas interações promovidas pelos grupos carbonil presentes na cadeia de PLLA e o CO₂ supercrítico (LIAO *et al.*, 2012). O aumento da difusividade do agente ativo na matriz polimérica, devido à maior mobilidade do polímero, é também frequentemente observado. Este aumento na difusividade é atribuído ao aumento do distanciamento intercadeias do polímero, bem como ao aumento do volume livre da matriz e à consequente redução das interações e emaranhamento entre as cadeias do polímero. Tal efeito seria bastante importante na etapa de secagem das partículas e na entrada de MT no interior da matriz.

Partículas de PLA contendo ou não hormônio foram analisadas por DSC, para verificar as possíveis mudanças na temperatura de transição vítrea e subsequentes

mudanças na cristalização da matriz polimérica. Os resultados dessa análise são sumarizados na Tabela 21 e na Figura 24

Tabela 21: Resultados de DSC para as diferentes partículas de PLA obtidas, incorporando ou não MT, além dos resultados correspondentes à análise de DSC do PLA e MT isolados.

Ensaio	[PLA] (%)	P (MPa)	Q _{PLA} (mL/min)	Razão MT/PLA (m/m)	T _g (°C)	T _c (°C)	T _m (°C)	χ (%)
PLA	-	-	-	-	61,6	136,9	179,9	15,2
MT	-	-	-	-	-	90,0	162,0	-
A1	0,5	8	0,5	-	61,7	114,3	181,6	12,1
A2			2,5	-	63,0	110,1	181,4	15,8
A3		16	0,5	-	67,5	115,0	182,3	9,2
A4			2,5	-	65,9	114,7	181,3	11,7
A5	1,5	8	0,5	-	67,2	117,0	182,2	15,5
A6			2,5	-	66,1	112,7	181,6	13,5
A7		16	0,5	-	67,1	118,1	181,6	12,9
A8			2,5	-	65,3	113,9	182,2	14,3
A9	1,0	12	1,5	-	66,3	116,4	181,6	11,7
A10				-	69,2	116,9	181,4	11,2
A11				-	67,1	113,8	182,3	10,9
A21	1,5	8	0,5	0,028	63,8	111,1	179,6	14,9
A22				0,051	62,7	111,8	178,2	12,6
A23				0,166	62,2	112,6	174,3	7,4
A24				0,400	62,9	112,2	166,5	1,2

O aumento na pressão tende a promover a mobilidade das cadeias poliméricas, pelo aumento do efeito plastificante do CO₂ no polímero, reduzindo a temperatura de transição vítrea (T_g) da matriz (FALK e RANDOLPH, 1998). No entanto, durante a

produção de partículas sob diferentes condições de pressão (8, 12 e 16 MPa), este efeito não foi observado, já que o aumento na pressão resultou em uma mudança pouco significativa na T_g das partículas (7,6 °C). Possivelmente nestas condições a estrutura cristalina compactada do polímero tenha restringido a solubilidade do CO₂ na região cristalina. Desta forma, o efeito da pressão do CO₂ na cristalização do PLA foi reduzido (ZHAI *et al.*, 2009). Apesar da absorção de CO₂ na matriz polimérica ser muito limitada, com valores entre 0,04% (m/m) a 30 MPa (KIRAN, 2010), esta pode ter sido responsável pelo aumento na fração de volume livre da matriz. Como consequência, um intumescimento significativo do PLA pela plastificação da fase amorfa é observado e, conseqüentemente, uma indução da cristalização por reorganização das cadeias é iniciada a temperaturas mais baixas (LIAO *et al.*, 2012). Resultados similares foram obtidos por ZHAI *et al.* (2009), quando estes usaram pressões entre 3 a 15 MPa.

No entanto, praticamente não se observou alterações na temperatura de fusão (T_m) das partículas não contendo agente ativo. Já variações no grau de cristalinidade e na T_g foram observadas, como mostrado na Tabela 21, e redução na temperatura de cristalização também foi verificada, resultado semelhante ao obtido por LIAO *et al.* (2012). Percebe-se que o aumento na vazão e da concentração de solução polimérica provavelmente facilitaram a transformação da fase amorfa do polímero em uma estrutura cristalina de menor energia livre. Os maiores valores de cristalinidade (15,8 e 15,5%) foram observados para os ensaios A2 e A5, respectivamente. Nestas condições experimentais, a mais eficiente remoção de DCM deve ter prevenido o efeito adverso do solvente na cristalinidade do PLA (SONG *et al.*, 2002). Além disso, o uso de plastificantes, como é o caso do CO₂, foi responsável pelo efeito sinérgico sobre a cristalização do PLA (MIHAI *et al.*, 2009). Como demonstrado por ZHAI *et al.* (2009), em processos onde se utiliza CO₂ comprimido, o processo de nucleação ocorre em consequência da supersaturação do gás, seguido do mecanismo de crescimento. Assim, a relativa baixa taxa de cristalização do PLA (devido a alta rigidez de sua cadeia) (MIHAI *et al.*, 2009) sofre modificação. Isso ocorre especialmente devido ao papel positivo do CO₂ na aceleração da cristalização do PLA e conseqüente discreto aumento da cristalinidade do mesmo (ZHAI *et al.*, 2009).

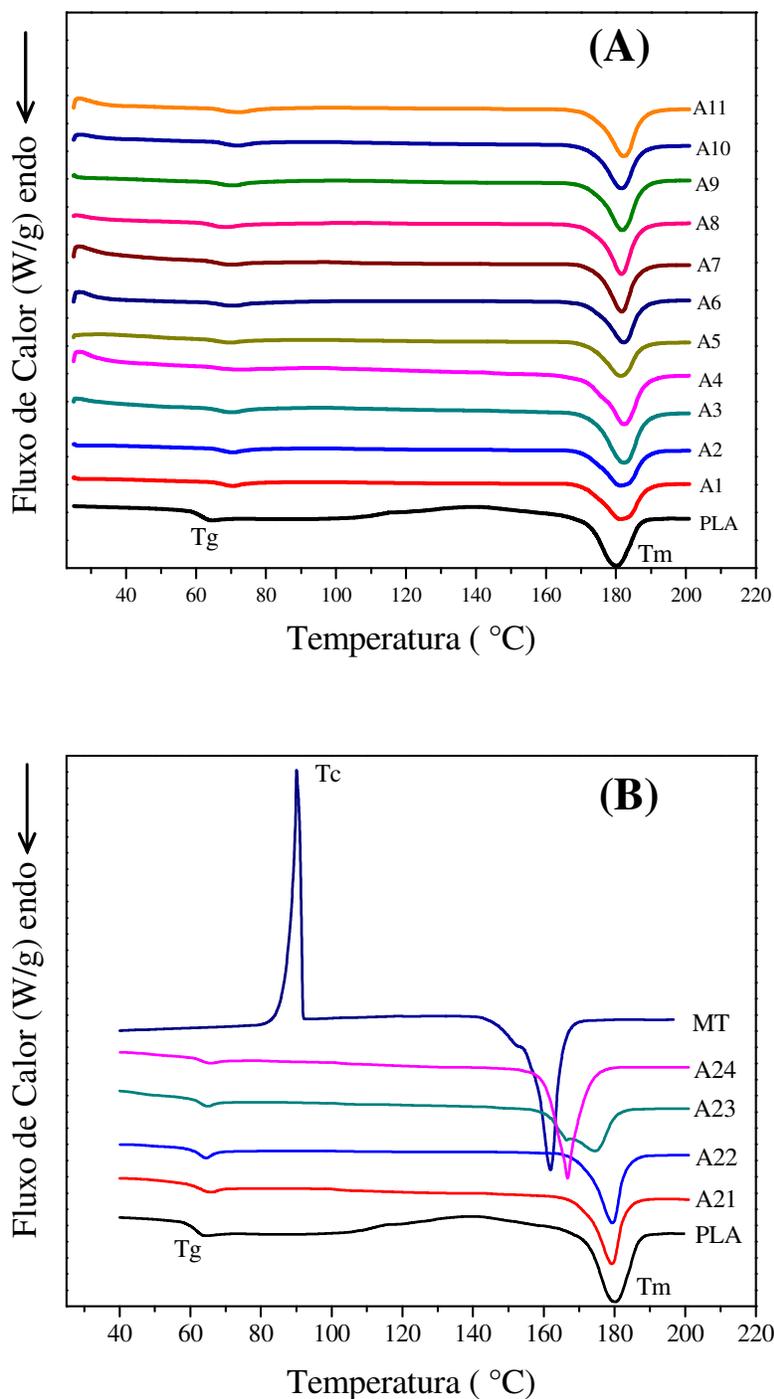


Figura 24: Curvas de DSC típicas para o PLA, para as partículas de PLA não contendo hormônio (A) e para a MT e partículas de PLA contendo hormônio (B).

Quando comparadas à amostra A5, as partículas preparadas na presença de hormônio (ensaio A21 a A24) mostraram uma redução significativa na cristalização (χ), de 15,8% para 1,2% conforme efetuou-se o aumento na proporção de MT nas partículas. Provavelmente, o aumento na quantidade de hormônio na solução polimérica tenha comprometido as interações intercadeias do PLA durante os processos de nucleação e crescimento das partículas. Isso impediu a formação de estruturas mais rígidas e compactas, o que causou a redução expressiva da cristalinidade da matriz. Como já mencionado anteriormente, estas partículas parecem ser mais porosas, com muitas regiões amorfas, que podem facilitar a liberação do agente ativo quando em condições gastrointestinais. Esta é uma característica bastante importante, uma vez que poder-se-ia esperar que a liberação do hormônio no meio gastrointestinal acontecesse de forma mais rápida, apesar do longo tempo de degradação esperado (maior que 1 ano), a princípio, para partículas constituídas de tal material.

4.2.4. Análises de DRX das partículas de PLA

Considerando o padrão de cristalização das partículas produzidas no planejamento fatorial (Figura 25), nota-se que para todas as amostras o principal pico de cristalização está localizado em 2θ à $16,66^\circ$ e $19,02^\circ$, respectivamente, em conformidade com os resultados obtidos por PURNAMA e KIM (2010), que obtiveram os principais picos de cristalização para o PLA em 2θ à $16,52^\circ$ e $19,08^\circ$. Estes resultados mostram que a variação das condições experimentais não afetou a forma de cristalização do polímero e os padrões de difração de raios-X das partículas são coincidentes com os principais picos obtidos para o PLA isolado ($16,68^\circ$ e $18,96^\circ$). A porção amorfa das partículas é um resultado das mudanças conformacionais que ocorreram durante o processo de cristalização do PLA, como demonstrado por HONG e LIANG (2007). Similarmente, os perfis de cristalização das amostras contendo hormônios foram analisados, e o pico característico padrão também foi notado para estas amostras. O pico mais intenso teve valores entre $16,38^\circ$ a $16,68^\circ$ e o segundo com valores entre $18,78^\circ$ a $20,12^\circ$.

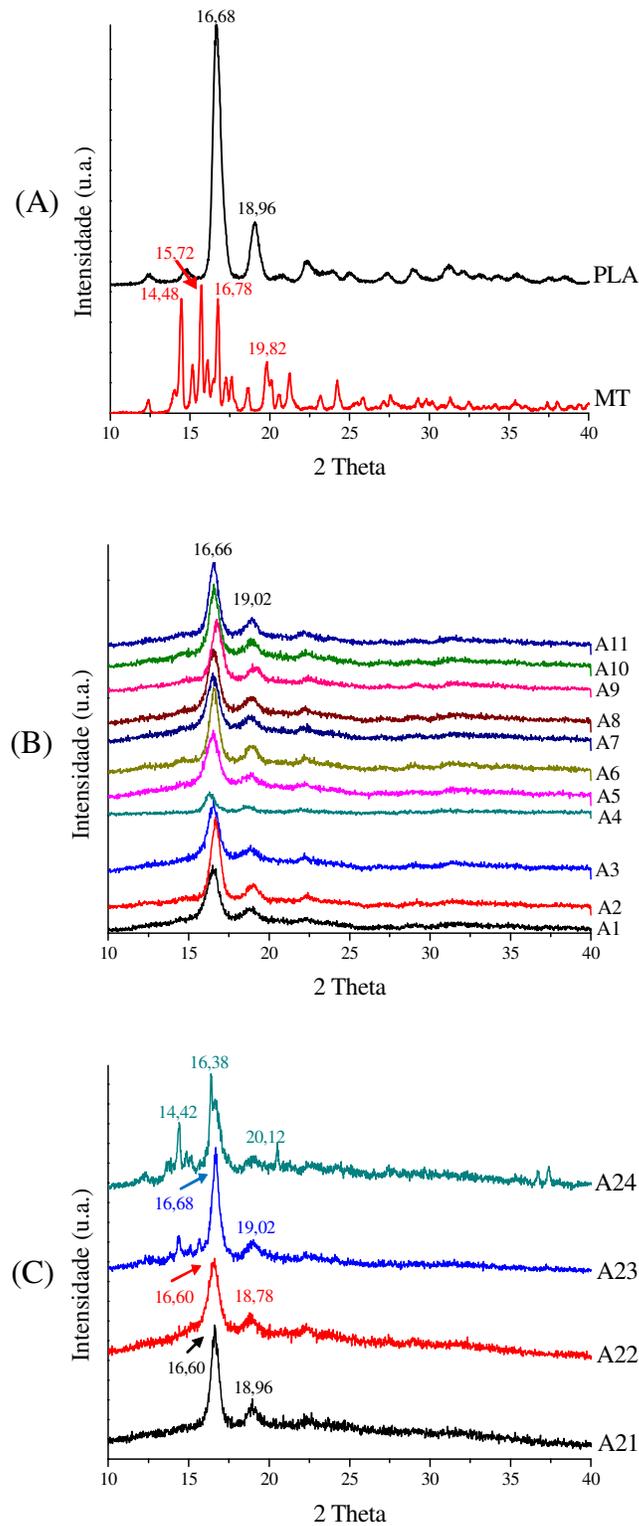


Figura 25: Difratoograma do PLA e da MT isolados (A), das partículas produzidas no planejamento fatorial (B) e das partículas de PLA produzidas na presença de MT (C).

Este resultado indica que a MT pode ter sido incorporada na matriz polimérica, uma vez que os picos cristalinos característicos do agente ativo isolado (14,48, 15,72 e 16,78) não foram observados para as amostras A21 e A22. A presença destes seria um indicativo da superposição de cada substância (polímero e MT), que neste caso, equivaleria a uma mistura física das partículas de ambos os materiais (COCERO *et al.*, 2009). No entanto, deve-se salientar que em baixa concentração no sistema, a MT pode não ter cristalizado (ficando precipitada no interior da matriz, na forma cristalizada), dificultando assim, prever a visualização deste composto através da DRX. Já nos casos em que altas quantidades de MT foram incorporadas, observa-se a presença de picos correspondentes à MT. Isso fica evidente nos picos observados para as amostras dos ensaios A23 e A24. Em tais condições, parte da MT não deve ter sido completamente incorporada às partículas, ou este composto pode ter ficado parcialmente exposto nas partículas produzidas. Apesar disso, tal hipótese não pode ser completamente corroborada visto que, através das análises morfológicas não foi verificada a presença de cristais de MT ou partículas deformadas pela presença de tais cristais. Somente os dados de liberação de MT à partir destas partículas poderia corroborar tal hipótese. Para estes casos espera-se que, já nas primeiras horas da cinética, uma grande quantidade de MT seja detectada nas amostras coletadas. A análise da mistura física do polímero e da MT (não realizada neste trabalho) poderia prover mais dados a respeito do comportamento destes materiais processados, já que, isoladamente, as curvas não forneceram indícios suficientes.

4.2.5. Análise de potencial zeta das partículas de PLA

A determinação do potencial zeta (ζ) é muito importante no estudo da formação de partículas. Tal medida serve como indicativo da repulsão ou atração eletrostática entre as partículas através da determinação das cargas existentes no plano do cisalhamento hidrodinâmico, de acordo com DUNCANSON *et al.* (2007). Além disso, tal avaliação fornece indicação da estabilidade e da capacidade dispersiva das partículas (MORA-HUERTAS *et al.*, 2011). Em solução iônica, as partículas de PLA têm valores de potencial zeta por volta de 40 a 50 mV (VILA *et al.*, 2004), com superfície de cargas

predominantemente negativas devido à presença de grupos terminais carboxil (DUNCANSON *et al.*, 2007). Os resultados do presente estudo de potencial zeta das partículas de PLA produzidas pelo método de SAS estão sumarizados na Tabela 22.

Tabela 22: Valores de potencial zeta das partículas de PLA contendo ou não 17 α -metiltestosterona.

Ensaio	Potencial zeta (\pm mV)
A1 a A11	< 5,0
A21	20,0
A22	39,8
A23	67,7
A24	13,9

Observou-se que as partículas sem hormônio apresentaram valores de potencial zeta menores e/ou iguais a 5 mV em solução água/etanol (50:50 v/v). Estes resultados demonstram que as forças repulsivas das partículas, quando elas se aproximam, são muito pequenas e insuficientes para mantê-las longe uma das outras, levando a uma inadequada dispersão das partículas quando em meio aquoso. Assim, como as forças repulsivas são muito fracas, as partículas tendem a se manter aglomeradas, resultando em formação de uma suspensão instável. Porém, o aumento gradual no potencial zeta das partículas, e conseqüentemente, o aumento de sua estabilidade, foi observado para partículas contendo concentrações iniciais de até 0,05 mg de MT/mg de PLA. As partículas contendo agente ativo neste limite de concentração apresentaram maior dispersibilidade em soluções aquosas, comparadas às partículas de PLA vazias. Isso deve ter ocorrido devido ao desdobramento das cadeias de PLA mais facilitado na presença de MT. A presença de agente ativo deve ter aumentado a exposição dos grupos terminais carboxílicos, que resultaram em um aumento do número de cargas expostas na superfície da cadeia.

4.3. Obtenção de partículas de PLA/PCL

Com o objetivo de obter partículas com apropriadas características morfológicas, com perfil de distribuição de tamanhos adequados e que possam ser capazes de incorporar e liberar eficientemente o hormônio de crescimento, aliado ao baixo custo da PCL quando comparado ao PLA, foram realizados ensaios de produção de partículas formadas pela associação deste polímero com PLA. Os resultados deste estudo estão sumarizados na seção 4.3.1.

4.3.1. Efeito da variação da proporção de PLA e PCL na solução polimérica sobre a formação, morfologia e diâmetro das partículas

Os resultados do estudo de variação da proporção de PLA e PCL na solução polimérica encontram-se sumarizados na Tabela 23, sendo que as características morfológicas e as respectivas distribuições de tamanhos de partículas de cada uma das amostras estão dispostas nas Figuras 26 e 27.

Observa-se que foi possível formar partículas em todas as condições testadas, ao contrário do que aconteceu quando se testou a formação de partículas a partir de soluções contendo somente a PCL como constituinte da matriz polimérica (ensaio P1).

Nota-se, através das Figuras 26 e 27, que o aumento da concentração de PCL levou também a um aumento do diâmetro médio das partículas produzidas, o que deve ser consequência da intensa agregação do sistema. Nos ensaios B1 e B2 observa-se um aumento na variabilidade de tamanhos que vem acompanhada pela alteração da rugosidade na superfície das partículas, bem como da tendência de agregação das mesmas. À medida que se aumentou ainda mais a concentração de PCL, observa-se uma redução na rugosidade das partículas. No entanto, nota-se a formação de grandes agregados, que são fruto da intensa agregação superficial das partículas, que muito provavelmente ocorreu durante o processo de extração do solvente orgânico pelo CO₂ supercrítico. Em nenhuma das

condições testadas foi possível produzir partículas com um perfil de distribuição de tamanhos estreito (ao contrário do que se obteve para as partículas de PLA), observando-se a formação de domínios de diferentes tamanhos, sendo estes abaixo ou acima do diâmetro médio das partículas.

Tabela 23: Características das partículas de PLA/PCL formadas com proporções variáveis dos polímeros, a uma pressão de 8 MPa e concentração e vazão de solução polimérica de 1% (m/v) e 0,5 mL/min, respectivamente.

Ensaio	% de PCL na mistura (m/m)	Aspecto morfológico das partículas	Diâmetro médio (μm)	Distribuição de tamanhos das partículas (μm)
B1	10	Pequena variabilidade de tamanhos, superfície rugosa, formato oval	19 ± 4	0,5 a 631,0
B2	20	Grande variabilidade de tamanhos, superfície bastante rugosa e formato esférico e irregular	27 ± 5	0,6 a 316,2
B3	30	Pequena variabilidade de tamanhos, superfície rugosa, formato irregular formados de agregados	32 ± 5	0,5 a 208,9
B4	40	Grande variabilidade de tamanhos, superfície menos rugosa, predominância de grandes agregados	36 ± 5	0,5 a 208,9
B5	50	Média variabilidade de tamanhos, superfície menos rugosa, predominância de grandes agregados de formato irregular	53 ± 1	0,6 a 2187,8

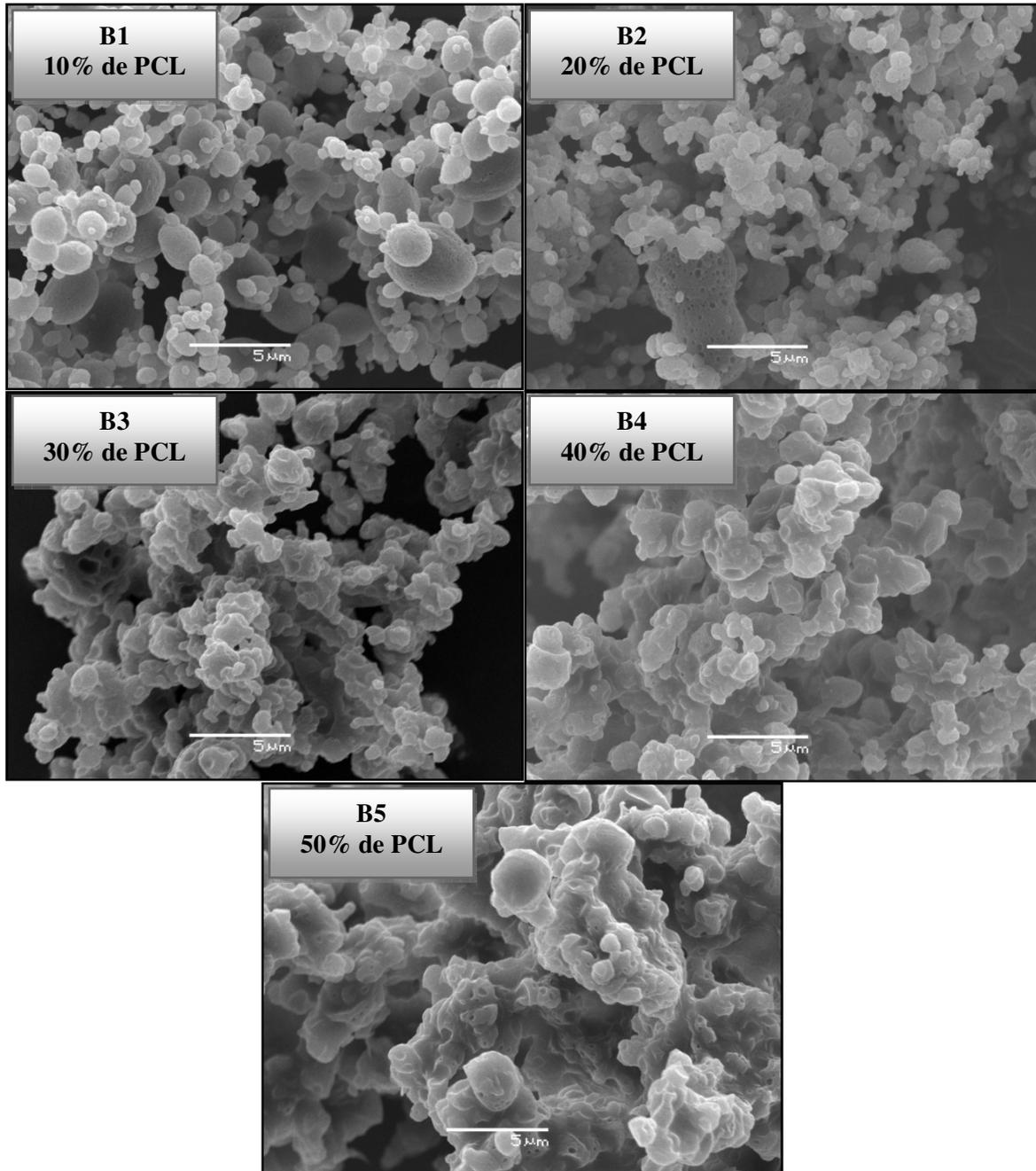


Figura 26: Aspecto morfológico típico analisado por microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas nos ensaios B1 a B5.

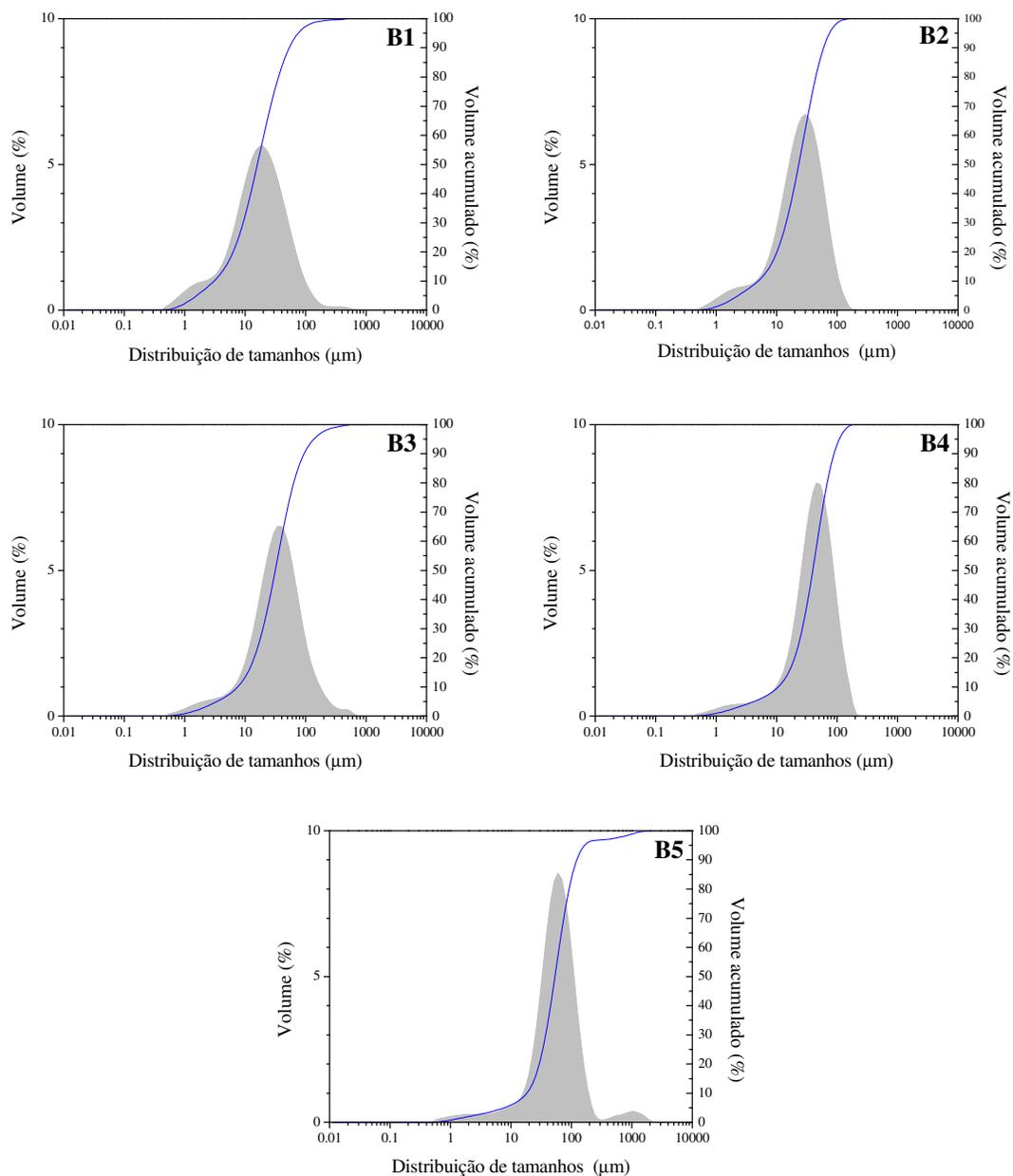


Figura 27: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas nos ensaios B1 a B5.

Nos ensaios usando altas proporções de PCL na solução polimérica (B3 a B5), nota-se a formação de partículas e de grandes agregados formados a partir destas. Este efeito é consequência direta da tendência da PCL, quando submetida a altas pressões, de

formar filme. A grande tendência de agregação se reflete, de forma bastante clara, sobre o perfil de distribuição de tamanhos das partículas obtidas, podendo-se facilmente observar a formação de agregados com mais de 1000 μm de tamanho.

Levando em consideração os resultados obtidos, pode-se supor que as partículas produzidas nas condições do ensaio B1 demonstram ser as mais adequadas à incorporação de agentes ativos, devido especialmente às suas características morfológicas. No entanto, não se deve descartar completamente as condições experimentais testadas no ensaio B2, já que apesar das partículas apresentarem um tamanho superior ao esperado (no caso, maior que 10 μm), estas poderiam ser também testadas como dispositivos de liberação controlada, visto que apresentaram um perfil de distribuição de tamanhos mais estreito quando comparado ao ensaio B1 (Figura 27). Além disso, deve-se destacar que sua aparente agregação poderia, em alguns casos, ser muito benéfica. Isso ocorre pois, segundo WISCHKE e SCHWENDEMAN (2008), partículas bastante agregadas (com potencial zeta $< \pm 5$ mV), quando *in vivo*, poderiam aumentar a retenção de produtos ácidos oriundos da sua degradação, e assim, acelerar a cisão autocatalítica das cadeias de PLA e da PCL, promovendo perfis de liberação controlada ainda mais rápidos. Isso seria bastante interessante, uma vez que inicialmente, a taxa de degradação da PCL é muito lenta, o que poderia comprometer a liberação do hormônio e, portanto, pôr em risco a reversão sexual dos peixes. Isso poderia tornar o uso dessas condições experimentais ainda mais interessante, uma vez que, considerando-se que para as partículas predominantemente densas, não ocorreriam, em princípio, grandes alterações na taxa de liberação do hormônio. Dessa forma, para os estudos de incorporação de 17α -metiltestosterona nas partículas de PLA/PCL, optou-se pelo uso de soluções poliméricas contendo até 20% de PCL na mistura PLA/PCL, como apresentado na seção 4.3.2.

4.3.2. Estudo de incorporação de 17 α -metiltestosterona nas características das partículas de PLA/PCL

No estudo de incorporação de 17 α -metiltestosterona nas partículas de PLA/PCL via SAS, empregou-se um planejamento estatístico do tipo 2², onde analisou-se os efeitos das variáveis independentes concentração de PCL e concentração inicial de MT na solução polimérica. Os perfis de incorporação do hormônio e os diâmetros médios obtidos estão sumarizados na Tabela 24. O aspecto morfológico das partículas e o perfil de distribuição de tamanhos destas estão apresentados nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

Tabela 24: Eficiência da incorporação de hormônio no diâmetro médio das partículas formadas por PLA e PCL produzidas a 8 MPa, concentração de solução polimérica de 1,0% (m/v) e vazão de solução polimérica de 0,5 mL/min.

Ensaio	Razão PCL/PLA (m/m)	Razão inicial MT/Pol (m/m)	Razão final MT/Pol (m/m)	Eficiência de incorporação (%)	Diâmetro médio (μ m)	Faixa de distribuição de tamanhos (μ m)
B11	1/9	0,125	0,029	25,6	23 \pm 1	3,8 a 316,2
B12	2/8		0,042	36,3	28 \pm 3	3,8 a 208,9
B13	1/9	0,750	0,378	64,1	43 \pm 7	4,4 a 316,2
B14	2/8		0,309	55,0	54 \pm 0	3,8 a 549,5
B15	13/72	0,438	0,113	38,6	32 \pm 2	3,8 a 208,9
B16			0,089	26,8	27 \pm 1	3,8 a 631,0
B17			0,150	42,8	23 \pm 1	3,8 a 416,9

Tabela 25: Análise estatística do planejamento fatorial 2^2 usado para estudar os efeitos da proporção entre PLA e PCL e as concentrações iniciais de MT na solução polimérica sobre os diâmetros médios das partículas de PLA/PCL, a um intervalo de confiança de 95%.

Fator	Efeito	Erro padrão	$t_{Calc(3)}$	p
Média	32,65714	3,135337	10,41583	0,001889
Concentração de PCL na solução (% m/v) (% PCL)	8,20000	8,295323	0,98851	0,395781
Concentração inicial de MT na solução polimérica (% m/v) (MT)	22,60000	8,295323	2,72443	0,072279
% PCL x MT	3,00000	8,295323	0,36165	0,741585

É possível observar que a incorporação de 17α -metiltestosterona nas partículas de PLA/PCL produziu um aumento no diâmetro médio das partículas, de valores iniciais de $19\ \mu\text{m}$ (ensaio B1) para $22\ \mu\text{m}$ (ensaio B11) e $42\ \mu\text{m}$ (ensaio B13), nos casos em que se utilizou baixas e altas concentrações iniciais de hormônio na solução polimérica contendo 10% de PCL, respectivamente. O mesmo ocorreu nos casos em que se empregaram maiores concentrações de PCL (20%), produzindo-se um aumento para $28\ \mu\text{m}$ (ensaio B12) e $53\ \mu\text{m}$ (ensaio B14), nos casos em que se utilizou respectivamente menores e maiores quantidades de hormônio na solução polimérica em comparação às partículas produzidas sem adição de agente ativo (como demonstrado nos estudos prévios, descritos no ensaio B2).

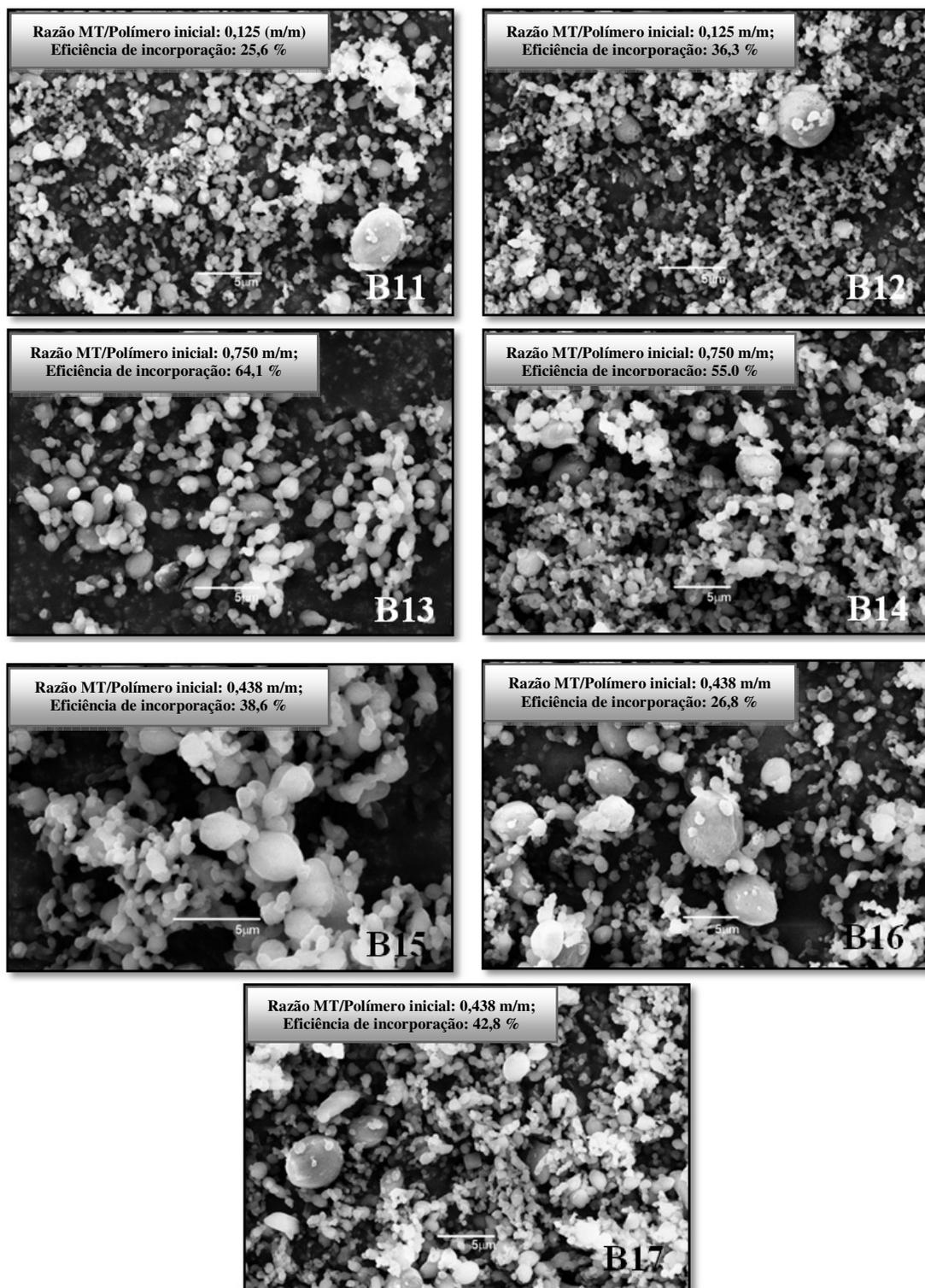


Figura 28: Aspecto morfológico típico analisado por microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas nos ensaios B11 a B17.

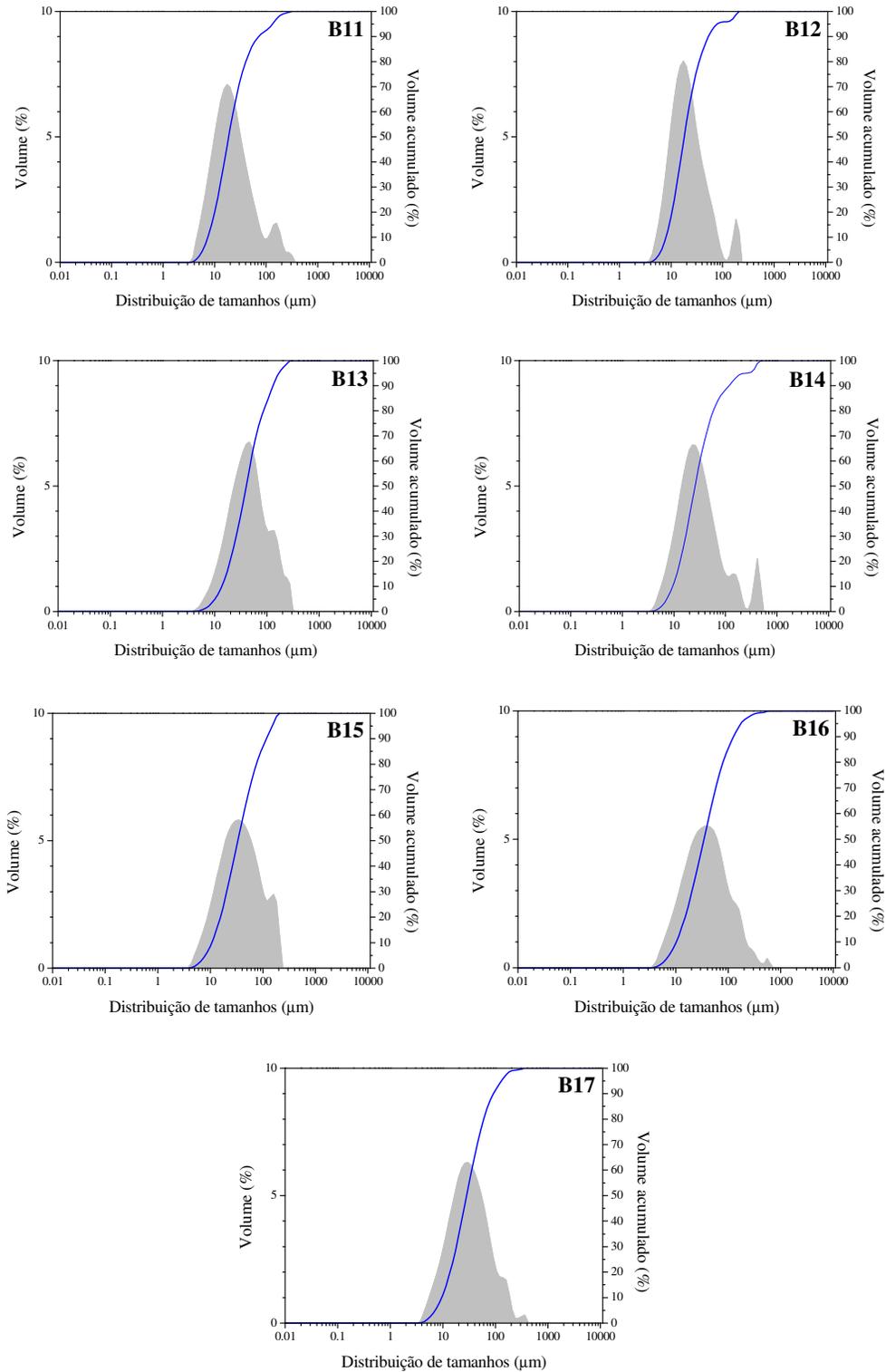


Figura 29: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas nos ensaios B11 a B17.

Esse aumento no diâmetro médio foi um reflexo do perfil de distribuição de tamanhos das partículas. Em todos os casos a incorporação de hormônio às partículas resultou em formação de curvas de distribuição menos estreitas, quando comparadas aos ensaios iniciais (B1 e B2), sendo perceptível a formação de partículas maiores, o que levou à formação de distintas populações de partículas (Figura 29). Quando se aumentou a concentração inicial de MT na solução de 12,5 para 75,0%, seja para soluções contendo menores (10%) ou maiores (20%) proporções de PCL, observou-se um deslocamento da curva de distribuição de tamanhos para a direita, ficando mais pronunciada a visualização das demais populações de partículas. As partículas produzidas nas condições do ponto central, ou seja, nos valores intermediários tanto de hormônio quanto de PCL, apresentaram um comportamento um pouco diferente. Apesar de não possuírem estreita distribuição de tamanhos e não apresentarem diâmetros médios maiores que os obtidos nos demais ensaios, nestes casos foi possível constatar uma maior tendência de formação de partículas com única curva de distribuição de tamanhos, sendo estas, portanto, mais homogêneas quanto às características de tamanho e morfologia. A menor variabilidade de tamanho de partículas deve ser considerada no desenvolvimento de sistemas particulados, uma vez que esta característica permite prever de forma mais precisa o comportamento de degradação, difusão e, portanto, liberação do agente ativo. Morfologicamente, as partículas produzidas em todos os ensaios não apresentaram características muito distintas entre si. Na sua maioria, elas se apresentaram ovais, com tendência à aglomeração, como se pode notar na Figura 28, sendo que as menores rugosidades são observadas para as partículas produzidas nos ensaios B15 a B17. Além disso, tais características podem ser consequência da menor hidrofobicidade e menor densidade do PCL (TANG *et al.*, 2007), que levam à mais rápida cristalização da sua estrutura, quando comparada ao PLA. Posteriormente, essa estrutura acaba sendo alterada, pela presença de solvente oriunda da fase rica em PLA. Isso deve levar a uma alteração superficial das partículas, produzindo matrizes mais rugosas, aglomeradas e, inclusive, sendo possível detectar em alguns casos o aparecimento de uma camada de filme que pode recobrir as partículas formadas.

Com relação à incorporação de MT nas partículas de PLA/PCL, deve-se observar que soluções contendo baixas concentrações iniciais de MT (ensaios B11 e B12) tiveram as

menores incorporações de hormônio às partículas formadas. À medida que se aumentou as concentrações iniciais, observou-se um aumento (entre 1,5 a 2,5 vezes) na quantidade de MT incorporada (ensaios B13 e B14), comportamento semelhante ao observado para as partículas de PLA contendo MT. Em geral, a quantidade de PCL na solução parece não ter tido efeito sobre a incorporação de agente ativo. Uma pequena tendência de aumento da quantidade incorporada foi observada quando se partiu de concentrações iniciais de MT menores. Isso deve ter ocorrido, uma vez que o aumento da concentração de PCL deve ter levado a um aumento dos espaços inter-cadeias, permitindo uma melhor acomodação da MT, e portanto, levando a um aumento da quantidade incorporada. Já quando se eleva a quantidade inicial de MT na solução a valores acima de 12,5%, observa-se que os espaços intercadeias promovidos pela PCL praticamente não exercem qualquer efeito sobre a incorporação. Isso ocorre porque, para estes casos, o CO₂ supercrítico tende a extrair considerável quantidade de MT das partículas, devido à sua maior afinidade com este, ainda que maiores quantidades iniciais de MT tenham sido empregadas. A maior porosidade das partículas, aliada ao maior volume livre das cadeias oriundo da fraca associação dos polímeros permite, nos primeiros estágios da formação das partículas, uma maior eficiência de incorporação que, com o tempo, sofre o efeito negativo do contato prolongado com o fluido supercrítico, extraindo dessa forma, a 17 α -metiltestosterona possivelmente incorporada à matriz polimérica.

A análise do planejamento fatorial proposto não apresentou efeitos estatisticamente significativos, a um intervalo de 95% de confiança, como pode ser observado através da Tabela 25. No entanto, em um intervalo de confiança de 93%, observa-se que a concentração inicial de MT na solução polimérica exerce efeito sobre o diâmetro médio das partículas ($p=0,072$). Nota-se que a reprodutibilidade dos ensaios foi muito baixa nos pontos centrais, devido especialmente a problemas relacionados ao difícil controle sobre as variações na temperatura da válvula micrométrica, aos constantes entupimentos, variações na vazão de saída, devido ao congelamento da válvula de saída e obstrução com resíduos de MT. Além disso, observou-se flutuação na pressão do vaso de precipitação, devido às diferenças de pressão apresentadas pelos cilindros de CO₂ acoplados ao sistema.

Concentrações maiores de agente ativo devem produzir partículas maiores tanto pelo fato destas dificultarem a interação intercadeias de PLA quanto por preencherem a estrutura da partícula, formando assim estruturas menos compactas, com presença de macroporos e mais amorfas. O efeito da concentração de agente ativo na solução polimérica pode ser minimizado pelo uso de baixas e médias razões de MT/polímero, de modo a garantir que as partículas possuam características mais próximas às das partículas de PLA/PCL produzidas na ausência de MT. Dessa forma, tomando-se por base os resultados obtidos no planejamento fatorial, e levando-se em conta os resultados da eficiência de incorporação, os posteriores estudos de liberação de MT foram realizados seguindo o protocolo de formação de partículas de PLA/PCL descritos no ponto central, ou seja, dos ensaios B15 a B17.

4.3.3. Comportamento térmico das partículas de PLA/PCL

A análise térmica das partículas de PLA/PCL contendo ou não hormônios foi realizada através de DSC, sendo que os termogramas oriundos dessa análise estão dispostos na Figura 30. As temperaturas de transição vítrea (T_g), cristalização (T_c), fusão (T_m) e a cristalinidade (χ) das partículas produzidas encontram-se na Tabela 26.

Nota-se que, para as partículas produzidas sem adição de hormônio (ensaios B1 a B5), nas curvas de DSC (Figura 30) não foi possível detectar a T_g correspondente ao PLA, independentemente da proporção deste polímero na formação da matriz. Isso ocorreu porque a T_g do PLA se sobrepôs à T_m da PCL, de modo a tornar muito difícil a identificação direta da T_g isolada do PLA nos termogramas obtidos. Não se observaram mudanças na T_m correspondente ao PLA dessas partículas. Detectou-se uma redução de até 9 °C na T_c correspondente ao PLA, com leve deslocamento da curva para a esquerda, quando comparada à curva de PLA puro à medida que se efetuou a redução de até 40% da fração mássica de PLA nas partículas. A partir de 50%, observa-se que a T_c é semelhante à das partículas produzidas com proporções maiores de PLA na matriz. Resultados semelhantes foram também observados por KIM *et al.* (1999).

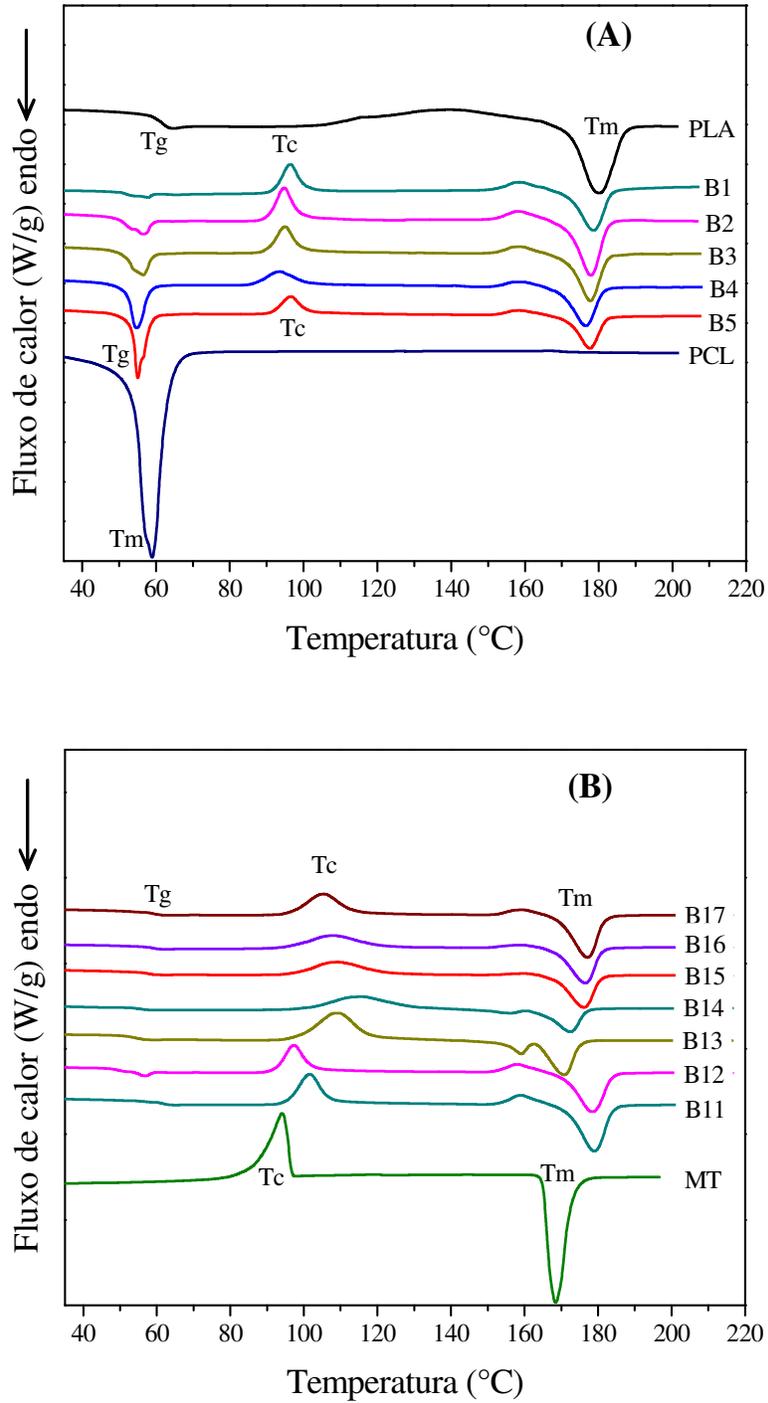


Figura 30: Curvas de DSC típicas para o PLA, PCL e as partículas de PLA/PCL não contendo hormônio (A) e para a MT e partículas de PLA/PCL contendo hormônio (B).

Tabela 26: Resultados da análise de DSC para as diferentes partículas de PLA/PCL obtidas.

Amostra	Tm PCL (°C)	Tg PLA (°C)	Tc PLA (°C)	Tm PLA (°C)	χPLA (%)	χPCL (%)
PLA	-	61,6	136,9	179,9	15,2	-
PCL	78,8	-	-	-	-	48,1
B1	53,7	-	96,3	178,3	54,1	28,9
B2	56,1	-	94,8	177,7	40,4	45,8
B3	56,5	-	94,9	177,7	46,6	45,2
B4	54,5	-	93,4	176,5	44,2	50,7
B5	55,1	-	96,5	177,4	42,8	47,7
B11	-	57,3	101,5	178,9	39,5	-
B12	-	49,6	97,3	178,1	45,9	-
B13	-	54,1	109,1	170,8	-	-
B14	-	54,2	115,5	172,5	-	-
B15	-	57,3	109,0	176,1	10,8	-
B16	-	58,5	107,7	176,5	19,1	-
B17	-	59,7	105,1	176,9	25,9	-

A alteração na Tc com relação ao polímero puro, apresentando leve mudança na posição dos picos, deve ser, neste caso, um indicativo de que a cristalização do PLA pode ser facilmente induzida pela adição de 10% (m/v) de PCL na blenda, não sendo, portanto, significativamente alterada por maiores quantidades de PCL. YANG *et al.* (1997) indicaram que esta explicação deve estar ligada ao fato de que, nos casos em que PLA é miscível com PCL acima da faixa de composição investigada (maior que 50% de PCL na mistura), a presença de PCL com menores valores de Tg pode aumentar a mobilidade do PLA, de modo a promover a recristalização do mesmo na blenda. Desta forma, esperar-se-ia que a recristalização do PLA fosse facilitada pelo aumento de PCL na blenda. Já nos casos em que os polímeros fossem parcialmente miscíveis, somente uma limitada quantidade de PCL seria observada no domínio rico em PLA. Neste caso, a quantidade de

PCL nos domínios ricos em PLA seria independente da adição de quantidades superiores deste polímero na matriz. Desta forma, a recristalização do PLA na blenda seria relativamente independente da quantidade do outro composto. Nota-se também para estes ensaios que é possível detectar, na curva de DSC, as T_m correspondentes à PCL. Estas T_m não foram, no entanto, muito diferentes da obtida nas amostras de PCL puras.

Quanto à cristalinidade do PLA e da PCL, nota-se alteração para ambos os compostos, independentemente da fração mássica de cada um deles nas partículas produzidas. A cristalinidade dos polímeros também foi afetada pelo processamento. No caso do PLA, observa-se que o processamento das blendas de PLA via SAS tende, de forma geral, a aumentar a cristalinidade do material. No entanto, essa cristalinidade parece ser função da fração mássica do composto na blenda, uma vez que a cristalinidade sofre redução quando se diminui a proporção de PLA na matriz. A típica faixa de valores para o grau de cristalinidade da PCL é de cerca de 40 a 50%, dependendo das condições de cristalização (JENKINS *et al.*, 2006). Quando submetida a condições supercríticas, a PCL tem a tendência de aumentar a sua cristalinidade, fenômeno que pode ser explicado em termos do aumento da mobilidade segmentar da cadeia de PCL, que está associada ao efeito plastificante do CO_2 supercrítico (KAZARIAN, 2000). Segundo JENKINS *et al.* (2006), o aumento na mobilidade das cadeias permite que o processo de cristalização continue além dos limites impostos pela cristalização por fusão. Dessa forma, é possível confirmar, através dos resultados obtidos para o ensaio B4, que a cristalização da PCL é aumentada em condições supercríticas, sendo no entanto, limitada pela fração mássica deste composto na matriz. Nos demais ensaios, praticamente não houve alteração da porcentagem de cristalinidade, com exceção do ensaio B1, onde altas concentrações de PLA levaram a uma redução da cristalinidade das partículas. Assim, por extrapolação dos pontos, pode-se supor que, caso a matriz fosse formada por 100% de PCL, o grau de cristalinidade do polímero chegaria a aproximadamente 72%, ou seja, um aumento de 50%.

Ao contrário do que ocorreu com as partículas de PLA/PCL preparadas na ausência de MT, observou-se para os ensaios B11 a B17 a detecção da T_g correspondente ao PLA, não se observando, portanto, a T_m correspondente à PCL. A T_g do PLA foi

reduzida com o processamento em até 20%, sendo que a concentração de PLA na matriz e a adição de MT tiveram impacto sobre essa mudança de comportamento. Verificou-se que a mudança nos valores de T_g segue uma relação diretamente proporcional à quantidade de PLA na matriz, sendo inversamente proporcional à quantidade de MT incorporada. Observou-se que a T_c destas partículas sofreu redução, ainda que muito menor a observada para partículas produzidas na ausência de MT. Desta forma, a MT dificulta a cristalização do PLA, que é restrita pela presença de PCL na matriz. Por outro lado, a T_m das partículas praticamente não sofreu alteração quando quantidades de MT baixas (0,029 mg de MT/mg de polímero) e médias (0,0150 mg de MT/mg de polímero) foram adicionadas na solução polimérica. Assim, somente observou-se alteração significativa na T_m do PLA quando maiores quantidades de MT foram empregadas, produzindo assim uma redução da mesma.

O efeito negativo da MT sobre a cristalização do PLA pode ser mais facilmente observado através dos valores de cristalinidade do mesmo. Nota-se que o aumento da quantidade de MT compromete a cristalinidade do PLA, uma vez que em baixas concentrações (ensaio B11) a cristalinidade é reduzida em até 27%. Já quando aumenta em 50% na quantidade de MT incorporada, essa redução é ainda mais pronunciada, ficando na casa de 60%. No entanto, essa redução da cristalinidade é muito menor, quando comparada à obtida para partículas de PLA puras. Em elevadas concentrações de MT, como é o caso das amostras B13 e B14, a redução da cristalinidade é mais evidente, alcançando até 100% no PLA das partículas. Isso fica evidenciado pelo fato de que a MT deve saturar os domínios ricos em PLA, de modo a impedir a interação entre as cadeias deste polímero, formando estruturas mais amorfas. Desta forma, como as depressões correspondentes à T_m da PCL não foram identificadas, não seria possível prever a cristalinidade desse material devido aos limites de detecção do equipamento usado nos ensaios. No entanto, pode-se supor que a cristalinidade da estrutura da matriz, para esses casos, seja dependente da PCL, apesar de seu cálculo não ser possível através dos termogramas.

Assim, devido à baixa cristalinidade do PLA nas partículas de PLA/PCL contendo hormônio, supõe-se que o mecanismo de liberação do agente ativo, para estas partículas, seria orientado pela degradação da PCL. Já a absorção de água e os consequentes processos

difusivos seriam orientados pelo PLA, devido à sua baixa cristalinidade e portanto, à sua contribuição para a formação de grande quantidade de regiões amorfas na matriz polimérica.

4.3.4. Análise de DRX das partículas de PLA/PCL

Os difratogramas dos polímeros, da 17 α -metiltestosterona e das partículas formadas pela blenda de PLA com PCL contendo ou não agente ativo são apresentados na Figura 31, com indicação dos picos principais obtidos a 2θ .

Através do difratograma, nota-se que os picos principais (16,5 e 18° em 2θ) das partículas produzidas a baixas proporções de PCL (ensaio B1 e B2) coincidem com os picos obtidos para as amostras analisadas contendo PLA puro (Figura 31-a). Isso demonstra que a porção cristalina e o grau de cristalinidade das partículas, nestas condições, são dependentes quase que exclusivamente do PLA. Quando se adicionou MT em baixas quantidades (ensaios B11 e B12), o comportamento de cristalinidade das partículas praticamente não foi afetado, não se notando picos relacionados aos tipicamente encontrados para a MT. Isso indica que, através do processo empregado, toda a MT incorporada foi encapsulada na matriz, não ficando portanto, qualquer resíduo oriundo deste agente ativo disperso fora do dispositivo de liberação controlada. Em condições gastrointestinais, esperar-se-ia que em processos onde a difusão seja o mecanismo dominante, a liberação do agente ativo ocorreria em decorrência da região amorfa composta especialmente pela PCL. Já nos casos em que o processo de degradação da partícula é o principal mecanismo de liberação, espera-se que o controle do processo se dê através do PLA, devido à sua alta cristalinidade, com valores correspondentes aos obtidos para amostras de polímero puro e sem processamento via SAS. À medida que se aumenta a proporção de PCL na composição da matriz, observa-se que as partículas apresentam os picos correspondentes ao PLA, além do aparecimento dos picos correspondentes aos obtidos para a PCL pura (21,3 e 24,53° em 2θ). Estes valores são condizentes com os obtidos por CIARDELLI *et al.* (2005), que obtiveram valores correspondentes em 2θ iguais

a 21,8 e 23,5°, respectivamente. Para estes ensaios (B3 a B5), a cristalinidade, a absorção de água e o processo de degradação são possivelmente controlados tanto pelo PLA quanto pela PCL. A fase de PCL é mais móvel (ou seja, com Tg mais baixa), proporcionando facilitação da difusão. Quando o polímero é cristalizado, a fase amorfa contínua facilita a mobilidade da droga, no entanto, o aumento da cristalinidade, ainda que reduzido, tende a dificultar parcialmente a permeação da MT.

A proporção de PCL a valores intermediários aos obtidos no ensaio B1 e B2 e a adição de MT à solução polimérica também não produziu efeitos sobre a cristalinidade das partículas (ensaios B15 a B17). Isso demonstra que esta condição experimental poderia ser usada na formação das partículas, uma vez que outros picos correspondentes à MT não foram observados. Similarmente ao que ocorreu nos ensaios B1 e B2, as partículas somente apresentaram picos principais de intensidade semelhantes aos obtidos para o PLA puro. Dessa forma, como é esperado que o PLA tenha uma degradação tipicamente lenta, pode-se supor que o mecanismo de difusão do agente ativo seja dominante. Assim, as regiões amorfas do PLA e da PCL seriam as principais responsáveis pelo controle deste mecanismo. Em casos em que se desejasse que a difusão ocorresse mais lentamente, dever-se-ia empregar partículas com baixas quantidades de PCL em relação às blendas.

Nos casos em que se adicionaram altas concentrações de hormônio à solução polimérica, observou-se a produção de matrizes com perfis de cristalinidade bastante distintos dos descritos anteriormente. Como pode se observar na Figura 31(c), as partículas produzidas nestas condições apresentaram picos principais correspondentes ao PLA. No entanto, nota-se claramente a presença de picos secundários que são típicos da MT. Muito provavelmente, parte do hormônio não foi completamente incorporado à matriz polimérica. Pode-se afirmar que altas quantidades de hormônio devem agir de forma a produzir partículas mais amorfas, o que permite a exposição parcial da MT, ou ainda que parte do hormônio foi somente precipitado e não incorporado à matriz. Não se notou nas micrografias das partículas a presença de cristais típicos da MT, como demonstrado na Figura 32. No entanto, a hipótese de incorporação parcial do agente ativo não deve ser descartada, ainda que visualmente isso não possa ser confirmado.

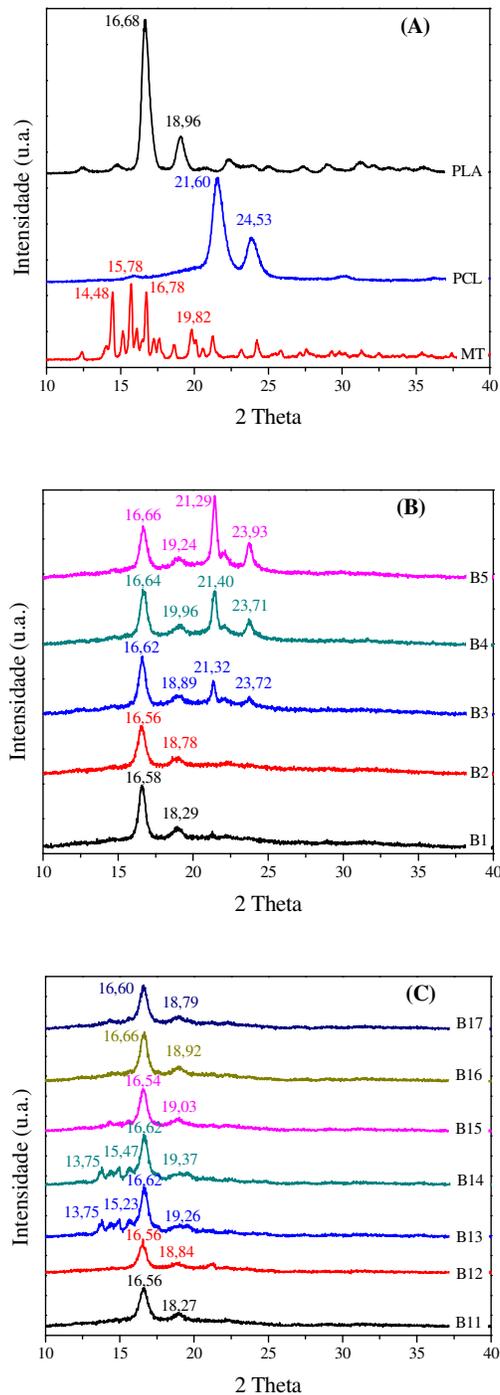


Figura 31: Difratoograma do PLA, PCL e da MT isolados (A), das partículas de PLA/PCL produzidas no estudo de variação da composição da proporção entre os polímeros na solução polimérica (B) e das partículas produzidas no planejamento fatorial contendo 17 α -metiltestosterona (C).

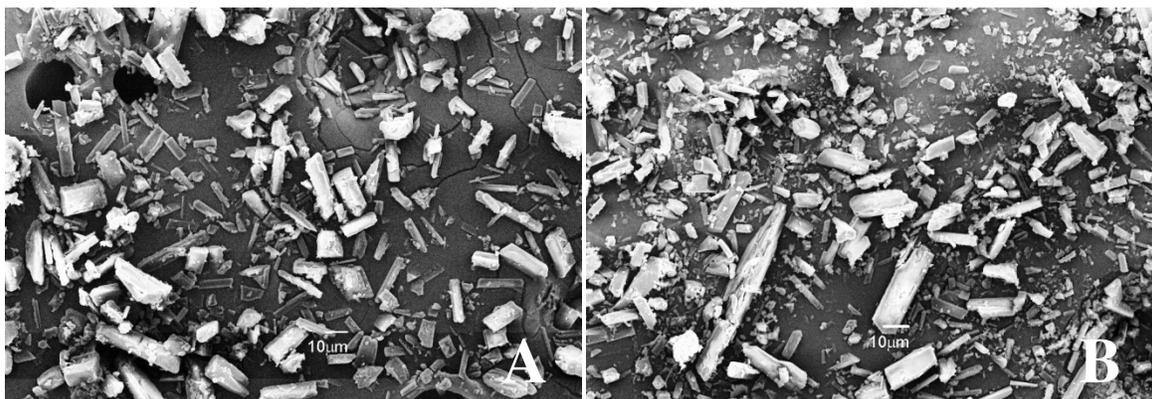


Figura 32: Aspecto morfológico típico da 17α -metiltestosterona analisado através de microscopia eletrônica de varredura para amostras puras (A) e depois de precipitadas usando solução de diclorometano em presença de CO_2 supercrítico, nas mesmas condições de processo empregadas nos ensaios de formação de partículas (B).

Desta forma, para se transpor problemas associados à possível encapsulação ineficiente ou mesmo à exposição antecipada do hormônio, ainda que parcialmente, às condições do trato gastrointestinal, optou-se por não utilizar em ensaios posteriores as partículas obtidas nos ensaios B13 e B14.

4.3.5. Análise do potencial zeta das partículas de PLA/PCL

Confirmando os resultados obtidos por microscopia e por espalhamento de luz, as partículas produzidas nos ensaios B1 a B5 apresentaram baixos valores de potencial zeta ($< \pm 5$ mV), tendo portanto forte tendência de agregação, sendo consideradas bastante instáveis em presença de soluções aquosas, como pode se observar na Tabela 27.

Estes resultados apontam que o uso de proporções maiores de PCL não afetaram significativamente a estabilidade das partículas, já que as partículas compostas à base de PLA somente também não apresentaram valores superiores aos destes ensaios. À medida que se incorporou MT observou-se, de forma geral, um aumento do potencial zeta. No entanto, este aumento não atingiu valores próximos dos que caracterizam estabilidade e

portanto, que corresponderem a uma maior dispersibilidade das partículas em meio aquoso. Os maiores valores de potencial zeta foram obtidos para a amostra B11 e B12, mas não foram expressivos.

Tabela 27: Valores de potencial zeta das partículas de PLA/PCL contendo ou não 17 α -metiltestosterona.

Ensaio	Potencial zeta (\pm mV)
B1	< 5,0
B2	< 5,0
B3	< 5,0
B4	< 5,0
B5	< 5,0
B11	20,0
B12	15,0
B13	8,0
B14	7,1
B15	11,0
B16	5,0
B17	10,0

A forte tendência de agregação das partículas e consequente menor dispersibilidade em meios aquosos podem ser decorrentes da maior hidrofobicidade tanto da MT quanto dos polímeros. Por conta disso, seria de se esperar que estes apresentassem maior dificuldade em aumentar a dispersão das partículas produzidas em meio aquoso. No entanto, este comportamento não seria tão problemático, considerando que isto poderia prevenir a exposição das partículas quando em meio ácido, ao mesmo tempo que funcionaria como um sistema autocatalítico da degradação das partículas, quando estas fossem submetidas a condições de pH mais básicos.

Observando os dados obtidos, tanto de potencial zeta quanto das demais análises, acredita-se que as partículas preparadas nas condições do ponto central seriam as mais adequadas para ter seu comportamento avaliado em meios que simulam condições gastrointestinais e, quanto à cinética de liberação do agente ativo.

As partículas oriundas desses ensaios foram capazes de incorporar eficientemente o agente ativo. Além disso, as maiores quantidades de MT incorporadas, quando comparadas às dos ensaios B11 e B12, propiciariam a redução do número de vezes em que as partículas deveriam ser administradas aos peixes, facilitando, portanto, o processo de inversão sexual.

4.4. Obtenção de partículas de PLA/PLGA

A presente seção apresenta o estudo de formação de partículas de PLA/PLGA via tecnologia de fluidos supercríticos em que foram avaliados os efeitos da variação da proporção dos polímeros e da adição inicial de hormônio à solução polimérica. Para tal estudo, utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 , que contou com três repetições no ponto central como demonstrado na seção 4.4.1.

4.4.1. Efeito da variação da proporção de PLA e PLGA e da massa inicial de 17α -metiltestosterona sobre a formação, morfologia e diâmetro das partículas

Na Tabela 28 encontram-se os dados referentes ao estudo de formação de partículas de PLA/PLGA realizado de acordo com o planejamento fatorial proposto. O aspecto morfológico e os perfis de distribuição de tamanhos das partículas obtidas são apresentados nas Figuras 33 e 34, respectivamente. Já a análise estatística dos efeitos pode ser verificada na Tabela 29.

Tabela 28: Eficiência de incorporação de hormônio e diâmetro médio das partículas formadas por PLA e PLGA produzidas a 8 MPa, concentração de solução polimérica de 1,5% (m/v) e vazão de solução polimérica de 0,5 mL/min.

Ensaio	Razão PLGA/PLA (m/m)	Razão inicial MT/Pol (m/m)	Razão final MT/Pol (m/m)	Eficiência de incorporação (%)	Diâmetro médio (μm)	Faixa de distribuição de tamanhos (μm)
C1	1/9	0,000	-	-	22 \pm 2	3,3 a 239,9
C2	1/1		-	-	29 \pm 3	3,8 a 138,0
C3	1/9	0,750	0,571	84,8	98 \pm 10	4,4 a 724,4
C4	1/1		0,624	89,6	54 \pm 5	4,4 a 416,9
C5	5/9	0,375	0,187	57,8	59 \pm 6	3,8 a 955,0
C6			0,159	50,2	26 \pm 3	3,3 a 158,5
C7			0,125	40,9	22 \pm 2	3,8 a 138,0

Observando-se os dados apresentados na Tabela 28, nota-se que foi possível obter partículas com diâmetro médio variando de 22 a 98 μm . A análise estatística da proporção entre PLA/PLGA e da concentração inicial de MT a um intervalo de confiança de 95% não apresentou efeitos significativos sobre o diâmetro médio das partículas (Tabela 29). No entanto, quando o intervalo de confiança é alterado para 92%, aproximadamente, verifica-se que as concentrações iniciais de MT parecem exercer efeito sobre o tamanho destas partículas. Isso fica mais evidente quando se observa os dados relativos aos ensaios C3 e C4, em que altas concentrações iniciais de MT foram empregadas. De acordo com COCERO *et al.* (2009), tais efeitos podem ser verificados, pois a baixa incorporação da droga no estado amorfo dentro da matriz polimérica leva a um aumento no tamanho das partículas produzidas. Por outro lado, caso essa incorporação da droga na fase amorfa ocorresse eficientemente, seria possível notar a redução do tamanho das partículas precipitadas sob as mesmas condições experimentais.

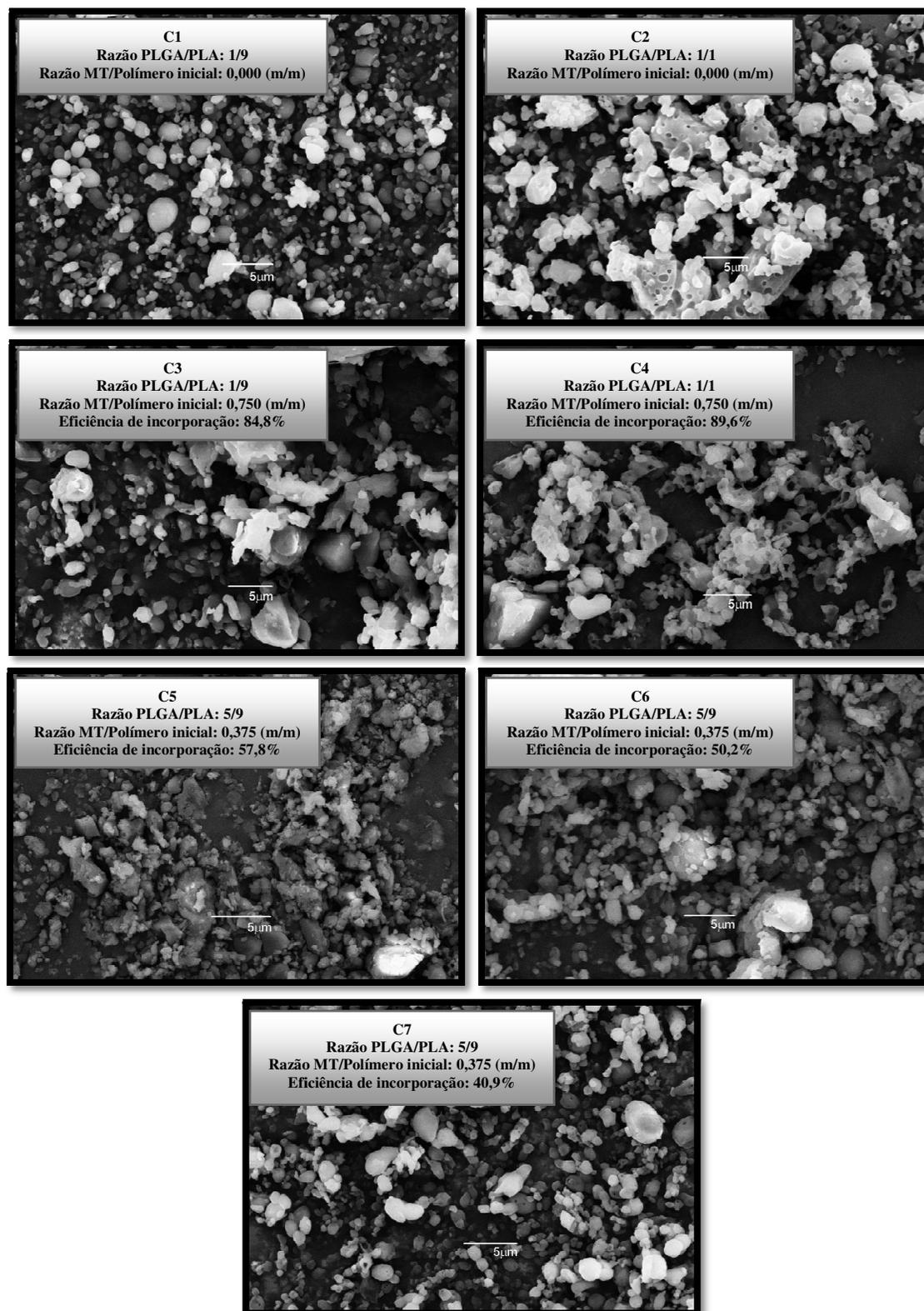


Figura 33: Aspecto morfológico típico analisado por microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas nos ensaios C1 a C7.

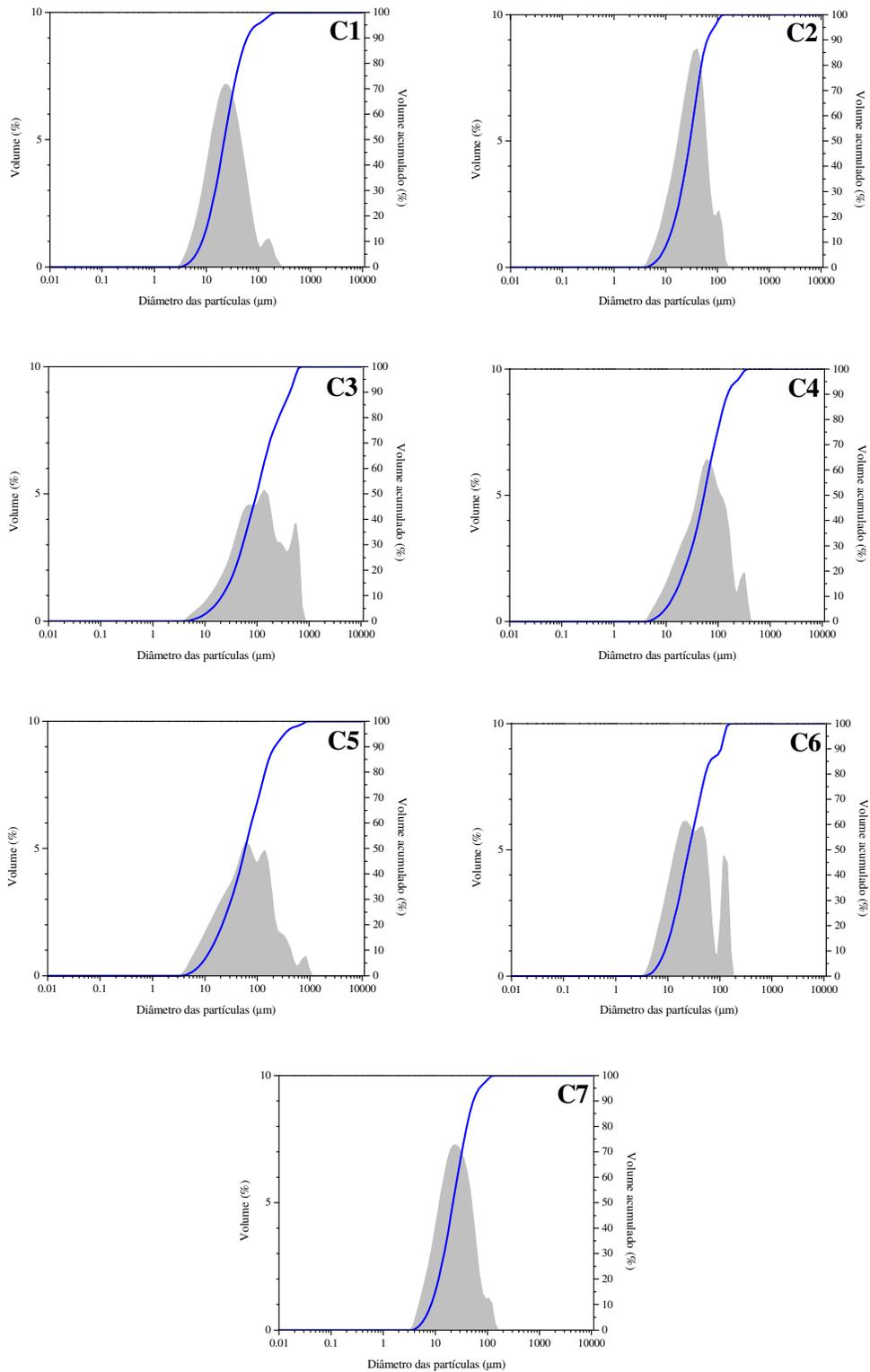


Figura 34: Perfil típico de distribuição de tamanhos das partículas produzidas nos ensaios C1 a C7

Tabela 29: Análise estatística do planejamento fatorial 2^2 usado para estudar os efeitos da proporção entre PLA e PLGA e as concentrações iniciais de MT na solução polimérica sobre os diâmetros médios das partículas de PLA/PLGA, a um intervalo de confiança de 95%.

Fator	Efeito	Erro padrão	t_{Calc(3)}	p
Média	44,2857	7,60538	5,82294	0,010087
Concentração de PLGA na solução (% , m/v) (PLGA)	-18,5000	20,12195	-0,91939	0,425693
Concentração inicial de MT na solução polimérica (% , m/v) (MT)	50,5000	20,12195	2,50970	0,086961
PLGA x MT	-25,5000	20,12195	-1,26727	0,294491

Nota-se que as partículas formadas apresentaram grande heterogeneidade de tamanhos e aspectos morfológicos bastantes distintos em cada um dos ensaios. Na Figura 33, observa-se que partículas produzidas a baixas concentrações de PLGA (ensaio C1) e na ausência de MT apresentaram tendência de serem mais ovais, com superfície menos rugosa e com perfil de distribuição de tamanhos mais estreito (Figura 34). Já quando se aumenta a concentração de PLGA na mistura polimérica, observa-se a formação de partículas menos uniformes, mais rugosas e que apresentam poros. Tais poros devem ser consequência da limitada compatibilidade entre os polímeros, que não permitiu maior interação entre as cadeias, levando à formação de estruturas mais amorfas e à provável segregação de parte das cadeias de PLGA para a superfície externa da matriz. Assim, formou-se um fino recobrimento das partículas por porções variáveis de PLGA. A heterogeneidade morfológica e de tamanhos ficam ainda mais evidentes quando se comparam os dados obtidos a altas concentrações de MT e com variações nas proporções dos polímeros.

As partículas obtidas nos ensaios C3 e C4 mostram uma grande variabilidade de tamanhos e a formação de partículas que não obedecem a uma forma característica única. No ensaio C4 notam-se os mesmos problemas associados à formação de poros inerentes à fraca associação dos polímeros. Para estes casos, fica evidente que uma separação de fases dos polímeros deve ter ocorrido, o que pode ser confirmado pelas análises de DSC. Além

disso, não se deve descartar o efeito do processo de atomização das gotas da ruptura do jato causado pela expansão do CO₂ (JORDAN *et al.*, 2010).

Nos ensaios relativos ao ponto central (C5 a C7), observou-se que as partículas apresentaram-se menos rugosas e morfologicamente mais semelhantes às obtidas sem adição de MT. Isso causou uma distribuição de tamanhos mais estreita. A formação de distintas populações foi observada devido especialmente à tendência de aglomeração das partículas menores e da forte interação eletrostática verificada durante o processo de coleta e armazenagem das partículas. A eficiência de incorporação de MT, nestes ensaios, variou de 41 a 58%, valores bem inferiores aos obtidos para os ensaios produzidos nas máximas concentrações iniciais testadas (85 a 90%). Estes dados indicam que, no caso da formação de partículas de PLA/PLGA, a MT não somente age de forma a modificar os rearranjos estruturais e as interações entre os polímeros e na distribuição de tamanhos das partículas, como também na quantidade de droga incorporada. Isso deve ter ocorrido pois a MT parece exercer, dependendo do tempo de processo, funções antagônicas sobre a eficiência de incorporação. Ao mesmo tempo que altas quantidades iniciais de MT aumentam os espaços intercadeias, que permitem maior acesso do fluido supercrítico ao interior da matriz, levando a também uma maior redução da quantidade de MT incorporada, devido à sua provável maior afinidade com o CO₂, desempenho contrário também pode ser observado. Isso ocorre pois o aumento nas quantidades iniciais de MT na solução polimérica também podem aumentar a taxa de solidificação das gotas, através do aumento do acesso do fluido supercrítico ao interior da matriz, o que tende, em processos de curto período, elevar as taxas de incorporação da droga (VAY *et al.*, 2012). Desta forma, destaca-se a importância do manejo das variáveis tempo e quantidade inicial de droga usadas durante o processo. Assim, em processos onde se deseje disponibilizar mais rapidamente a liberação *in vitro* da MT, altas concentrações de MT devem ser empregadas, para a formação de sistemas mais amorfos e de dispositivos que não necessitem entrar na corrente sanguínea via rota oral.

4.4.2. Comportamento térmico das partículas de PLA/PLGA

Similarmente às partículas de PLA e PLA/PCL, ensaios de DSC foram realizados para as partículas formadas a partir da blenda de PLA/PLGA. Os dados referentes à temperatura de transição vítrea (T_g), de fusão (T_m), cristalização (T_c) e às curvas de aquecimento estão na Tabela 30 e na Figura 35, respectivamente.

Tabela 30: Resultados obtidos de DSC para as diferentes partículas de PLA/PLGA obtidas no planejamento fatorial, além dos valores correspondentes ao PLA, PLGA e MT.

Amostra	Razão PLGA/PLA (m/m)	Razão MT/Polímero (m/m)	T_{gPLGA} (°C)	T_{gPLA} (°C)	T_{cPLA} (°C)	T_{mPLA} (°C)	χ_{PLA} (%)
PLA	-	-	-	62	137	180	15,2
PLGA	-	-	34	-	-	-	-
C1	1/9	0,000	-	61	114	180	16,2
C2	1/1	0,000	40	58	108	177	59,1
C3	1/9	0,750	44	51	105	164	3,5
C4	1/1	0,750	44	49	101	163	14,1
C5	5/9	0,375	39	48	109	170	44,9
C6	5/9	0,375	41	54	99	174	47,3
C7	5/9	0,375	39	54	103	175	39,3

De acordo com VAY *et al.* (2012), durante a formação de partículas, a estruturação da matriz polimérica é um resultado do arranjo entre as cadeias dos polímeros, sendo, desta forma, fortemente determinada pela mobilidade das cadeias antes de se tornarem fixas. Este estágio é alcançado quando a T_g é usualmente menor que a temperatura usada durante o processo e as mudanças do polímero se dão a partir de uma estrutura elástica para um estado cristalino. Observando os dados relativos ao comportamento térmico das partículas de PLA/PLGA, nota-se que a adição de 10% de

PLGA à matriz (ensaio C1) possibilitou a formação de uma estrutura bastante compacta, onde somente uma Tg foi detectada, neste caso, a do PLA, que praticamente não foi alterada. No entanto, a presença de PLGA modificou o perfil de cristalização, com possível alteração da estrutura cristalina, quando se observa a redução da Tc referente ao PLA. Tais hipóteses só podem ser confirmadas através da observação dos dados obtidos pela análise de difração de raios-X. A temperatura de fusão, no entanto, não foi alterada neste caso. Leve tendência de aumento foi detectada com relação à cristalinidade das partículas (de 15,2 para 16,2%). Tais dados indicam que o processo deve ter sido o principal responsável por levar à formação de partículas mais cristalinas, pois o CO₂ supercrítico propiciou maior mobilidade das cadeias poliméricas, permitindo a formação de estruturas mais rígidas. Conforme os dados obtidos, praticamente não houve contribuição do PLGA para tal alteração. Quando se aumenta ainda mais a quantidade de PLGA na matriz (de 10 para 50%), nota-se, na curva de aquecimento, o aparecimento da Tg relativa ao PLGA, com ΔT igual a 6°C com relação aos dados originais da análise de PLGA puro. Observou-se também uma ligeira redução no valor do Tg do PLA, sendo esta acompanhada por reduções na Tc e Tm. Neste caso particular, a adição do PLGA contribuiu para um aumento de 3,7 vezes na cristalinidade das partículas. Similarmente ao que ocorreu com as partículas de PLA/PCL, quando se utilizou altas concentrações de PLGA na formação da matriz, observou-se um aumento da mobilidade das cadeias, que permitiu que o processo de cristalização continuasse por um tempo prolongado.

Alterações nas curvas de aquecimento também foram notadas quando altas concentrações iniciais de MT foram adicionadas à solução polimérica. A adição do hormônio levou a reduções na Tg, Tc e Tm relativos ao PLA, acompanhadas pela detecção e aumento da Tg do PLGA. A cristalinidade destes materiais foi bastante comprometida, uma vez que foram observados valores inferiores aos obtidos para o PLA puro, e nos casos em que baixas concentrações de PLGA foram usadas, estes valores foram ainda menores (3,5%). Desta forma, a adição de MT, em altas concentrações, deve ter impedido o processo eficiente de cristalização das partículas, pois as regiões cristalinas dos polímeros devem ter ficado menos orientadas e compactadas quando comparadas às partículas produzidas na ausência de MT.

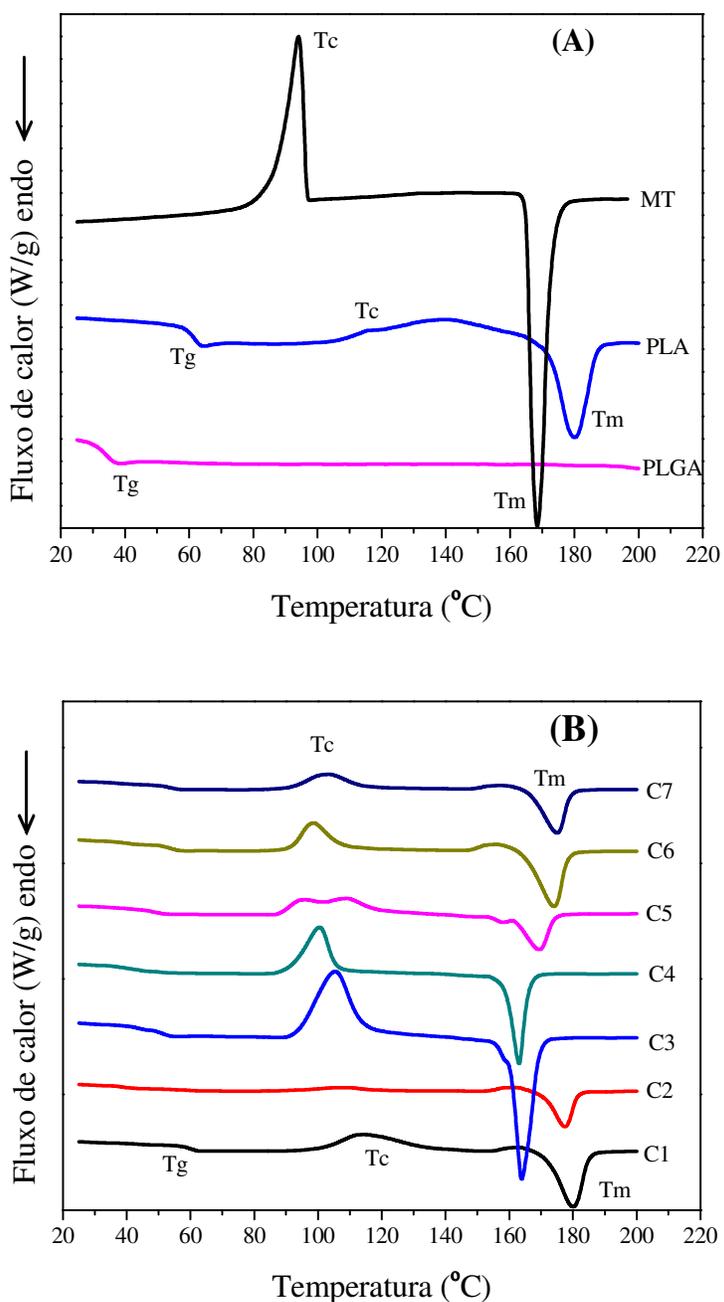


Figura 35: Curvas de DSC típicas para o PLA, PLGA e 17 α -metiltestosterona (A) e as partículas de PLA/PLGA obtidas nos ensaios do planejamento fatorial.

Já nos ensaios relativos às partículas produzidas no ponto central do planejamento fatorial, observa-se a detecção da Tg do PLGA e PLA, sendo estes valores próximos aos obtidos para as partículas formadas a altas concentrações de MT. Similarmente, observa-se uma redução na Tm das partículas, onde a cristalinidade alcança valores intermediários aos obtidos nos pontos extremos do planejamento. Assim, o processo de cristalização das partículas formadas à base de PLA/PLGA seria função da presença concomitante de PLGA e MT na blenda. O PLGA tende a favorecer a cristalização das partículas a partir de quantidades superiores a 10% (m/m) do polímero. Por outro lado, a adição de MT tende a reduzir a interação intercadeias dos polímeros, dificultando o processo de cristalização. Isso leva à formação de estruturas mais amorfas e mais facilmente degradáveis, permitindo a liberação precoce do agente ativo. Assim, nos casos em que se deseje uma cinética de liberação de hormônios mais rápida, partículas constituídas à partir de baixas frações de PLGA e altas concentrações de MT devem ser consideradas. Nestes casos, constatou-se que o processo teve pouca influência sobre a cristalinidade das partículas, sendo esta prioritariamente definida pela proporção dos constituintes da matriz.

4.4.3. Análise de DRX das partículas de PLA/PLGA

Análises de difração de raios X foram realizadas para verificar o padrão de cristalização das partículas, além de observar se ocorreu mudança na estrutura cristalina do material produzido nas diferentes condições de processo.

Observa-se através da Figura 36 que o padrão de difração do PLGA puro é condizente com o de materiais amorfos, já que não foi possível observar a presença de um pico principal, notando-se a formação de um halo amorfo, com maior intensidade de detecção em 2θ à $18,62^\circ$. Desta forma, supõe-se que a estrutura cristalina das partículas será dominada e direcionada pela cristalinidade do PLA e da MT. Observando os dados obtidos da análise de difração de raios X das partículas formadas no planejamento fatorial, nota-se que a variação na proporção dos polímeros (ensaios C1 e C2) não alterou a estrutura cristalina das partículas, pois os picos principais são condizentes com os

encontrados para o PLA puro (Figura 36 A). Isso mostra que a redução de 10 a 50% da quantidade do PLA não interferiu na formação das partículas, permitindo o desenvolvimento de uma estrutura rígida e bastante cristalina devido especialmente à grande compatibilidade dos polímeros. Quando se estudou a formação de partículas mantendo as proporções dos polímeros similares às obtidas no ensaios descritos anteriormente, mas com a adição de altas concentrações de hormônio (ensaios C3 e C4), com emprego de até 0,75 de MT na razão mássica, observou-se comportamento um pouco diferente. Nota-se que o pico principal é correspondente à estrutura cristalina do PLA, em 2θ à $16,64^\circ$. Os demais picos secundários são compatíveis aos obtidos para a MT pura, em 2θ à $14,0$, $15,7$ e $19,7^\circ$. Estes resultados são característicos de materiais onde a estrutura cristalina é dominada tanto pelo polímero, no caso o PLA, quanto pelo agente ativo incorporado. Isso indica que altas concentrações de MT interferem na formação da rede cristalina, pois podem impedir o contato das cadeias poliméricas, contribuindo assim para formação de uma estrutura rígida, mas menos cristalina. Além disso, similarmente ao que ocorreu com as partículas obtidas nos ensaios das blendas de PLA/PCL, supõe-se que o agente ativo pode estar parcialmente exposto, ou ainda que tenha sido precipitado e portanto, não totalmente incorporado à matriz polimérica. Tais suposições devem ser levadas em consideração, pois partículas produzidas nestas condições experimentais podem levar a uma liberação prematura do agente ativo, devido à sua característica mais amorfa.

Nos ensaios do ponto central, em que a formação de partículas foi realizada em razões intermediárias de MT e de PLGA, as partículas formadas apresentaram picos característicos predominantes do PLA. No entanto, para o ensaio C5, nota-se o surgimento de pico secundário bastante consistente aos obtidos para a MT pura, em 2θ à $15,7$. A presença de tal pico deve ser consequência da maior incorporação de MT à partículas (57,8%) quando comparado aos dados obtidos para os demais ensaios do planejamento fatorial, no caso 50,2 e 40,9% para as partículas produzidas nos ensaios C6 e C7, respectivamente. Tais resultados mostram que os ensaios do ponto central constituem o limite de máxima incorporação de MT sem que isto afete a estrutura cristalina das partículas, garantindo assim, o processo de liberação controlada do agente ativo.

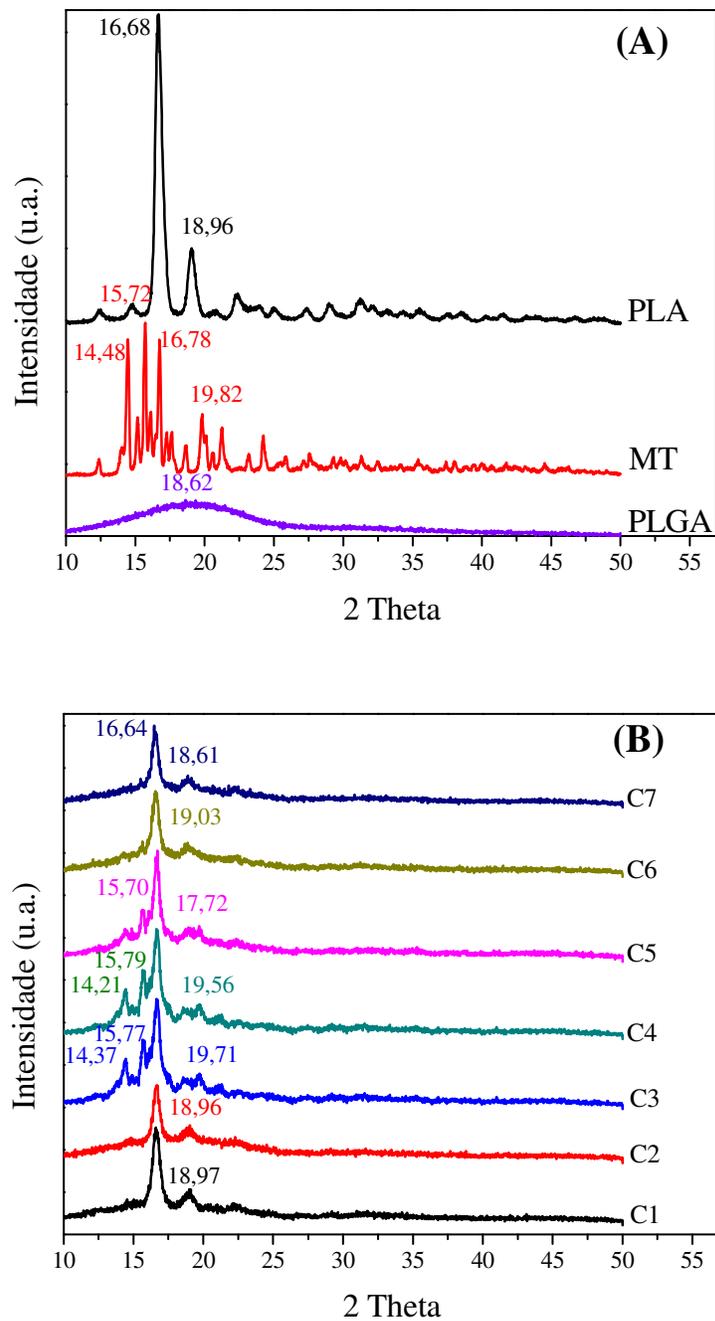


Figura 36: Difratoograma do PLA, da MT e do PLGA isolados (A) e das partículas produzidas no planejamento fatorial (B).

4.4.4. Análise do potencial zeta das partículas de PLA/PLGA

A análise do potencial zeta foi realizada para fornecer dados referentes à estabilidade do sistema particulado testado em solução aquosa. Para todos os ensaios, os valores obtidos de potencial zeta foram negativos, o que indica a exposição de grupos carboxílicos terminais nas cadeias dos polímeros, como sumarizado na Tabela 31.

Tabela 31: Valores de potencial zeta das partículas de PLA/PLGA contendo ou não 17 α -metiltestosterona.

Ensaio	Potencial zeta (mV)
C1	- 4,0
C2	- 6,6
C3	- 2,2
C4	- 0,1
C5	- 1,9
C6	- 1,4
C7	- 2,5

Observou-se pelos dados obtidos que as partículas produzidas na ausência de MT (ensaios C1 e C2) com razões de 10 e 50% de PLGA na composição da matriz, respectivamente, foram capazes de fornecer sistemas muito pouco estáveis, com forte tendência à floculação e/ou precipitação. O mesmo foi observado quando altas concentrações de MT foram incorporadas à matriz polimérica das partículas (ensaios C3 e C4), não se obtendo valores superiores a - 2 mV. Nos ensaios do ponto central observou-se que os valores de potencial zeta foram intermediários, de 1,4 a -2,5 mV. Tais valores não são suficientes para garantir a formação de uma barreira de alta energia que estabilize as partículas quando em suspensão. MULLER (1991) definiu que tal barreira seria formada a partir de valores próximos de 25 mV.

O aumento das proporções de PLGA na formação da matriz, de forma geral, tende a aumentar os valores de potencial zeta, uma vez que, este polímero possui uma maior quantidade de grupos carboxílicos em sua estrutura (MUSUMECI *et al.*, 2006). No entanto, tal efeito é minimizado quando altas concentrações de agente ativo são empregadas na formação do dispositivo. Supõe-se que a MT seja responsável por reduzir os valores de potencial zeta, pois parte da droga presente na região superficial das partículas pode minimizar o efeito dos grupos carboxílicos do polímero. Dados similares foram obtidos por MUSUMECI *et al.* (2006), que verificaram a influência da distribuição de grupos carboxílicos dos polímeros PLA e PLGA quando estes foram empregados na formação de nanopartículas contendo docetaxel.

4.5. Estudos de liberação de 17 α -metiltestosterona das partículas de PLA, PLA/PCL e PLA/PLGA em condições simuladas do trato gastrointestinal das tilápias do Nilo

De acordo com DASH *et al.* (2010), os perfis de liberação podem ser divididos nos que apresentam taxas de liberação baixas, no caso de zero ou primeira ordem, e dos que resultam em uma liberação inicial alta, seguida de uma liberação contínua do tipo zero ou primeira ordem. É importante que inicialmente parte da droga seja liberada e que sua liberação se prolongue seguindo uma cinética que obedeça a um comportamento bem estabelecido, mantendo a concentração da droga em níveis constantes no sangue pelo período desejado. Diversos modelos matemáticos têm sido propostos para explicar os mecanismos que regem a liberação das drogas, assim como para possibilitar prever tal liberação quando os dispositivos sejam usados *in vivo*. Tal ferramenta é importante também para permitir a estimativa de parâmetros físicos e químicos, como o coeficiente de difusão da droga (DASH *et al.*, 2010). Dentre os modelos que existem atualmente para descrever o perfil de liberação das drogas de dispositivos de incorporação pode-se destacar os de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull (DASH *et al.*, 2010). Assim,

para caracterizar o mecanismo de liberação de 17α -metiltestosterona, optou-se por selecionar as partículas que apresentaram melhores características quanto ao aspecto morfológico, distribuição de tamanhos, diâmetro médio, eficiência de incorporação da MT, assim como características adequadas de cristalinidade e distribuição de cargas superficiais para serem expostas a diferentes condições de pH simulando o ambiente *in vivo* do sistema gastrointestinal das tilápias. Os dados obtidos a partir da liberação de hormônio em condições simuladas, usando-se em tal estudo as amostras produzidas nos ensaios A24, B17 e C7, foram ajustados a diferentes modelos matemáticos, neste caso, os modelos de primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e de Weibull.

Observando-se os dados obtidos da cinética de liberação de 17α -metiltestosterona a partir de partículas de PLA (Figura 37), nota-se que a liberação do hormônio foi limitada, já em 120 horas, a liberação de MT em diferentes condições de pH variou entre 60 a 100%. Considerando-se que a passagem das partículas pelo trato gastrointestinal das tilápias duraria cerca de 12 horas, sendo 2 horas relativas à região gástrica e as demais 10 horas na região intestinal, pode-se indicar que esta liberação não foi tão eficiente. Quando as partículas foram submetidas a pH que simularam a região gástrica, a liberação da droga não passou de 26% (pH 5,0), praticamente não se observando liberação quando o pH chegou a 2,2. Isso pode ser interessante, visto que as partículas de PLA funcionaram como um dispositivo capaz de proteger integralmente a MT do ambiente tipicamente ácido característico da região do estômago das tilápias. Condições de pH similares às da região intestinal também não forneceram valores superiores a 10% (pH 8,8). Nos casos em que se considera que uma fração das partículas venham a adentrar a corrente sanguínea intactas, somente 10% da droga incorporada viria a ser efetivamente liberada. Os dados de liberação em pH 7,4 se ajustaram melhor ao perfil de liberação de drogas descrito por Korsmeyer-Peppas (para os pH 5,0 e 7,4) e ao de primeira ordem (para os pH 2,2 e 8,8), como se pode notar através dos R^2 ajustados de cada um dos modelos, disponibilizados na Tabela 32. Como o modelo de Korsmeyer-Peppas forneceu maiores valores de R^2 para os pH 5,0 e 7,4 e valores próximos aos obtidos pelo modelo de 1ª ordem nos pH 2,2 e 8,8, tal modelo foi considerado o que apresentou melhor ajuste aos dados.

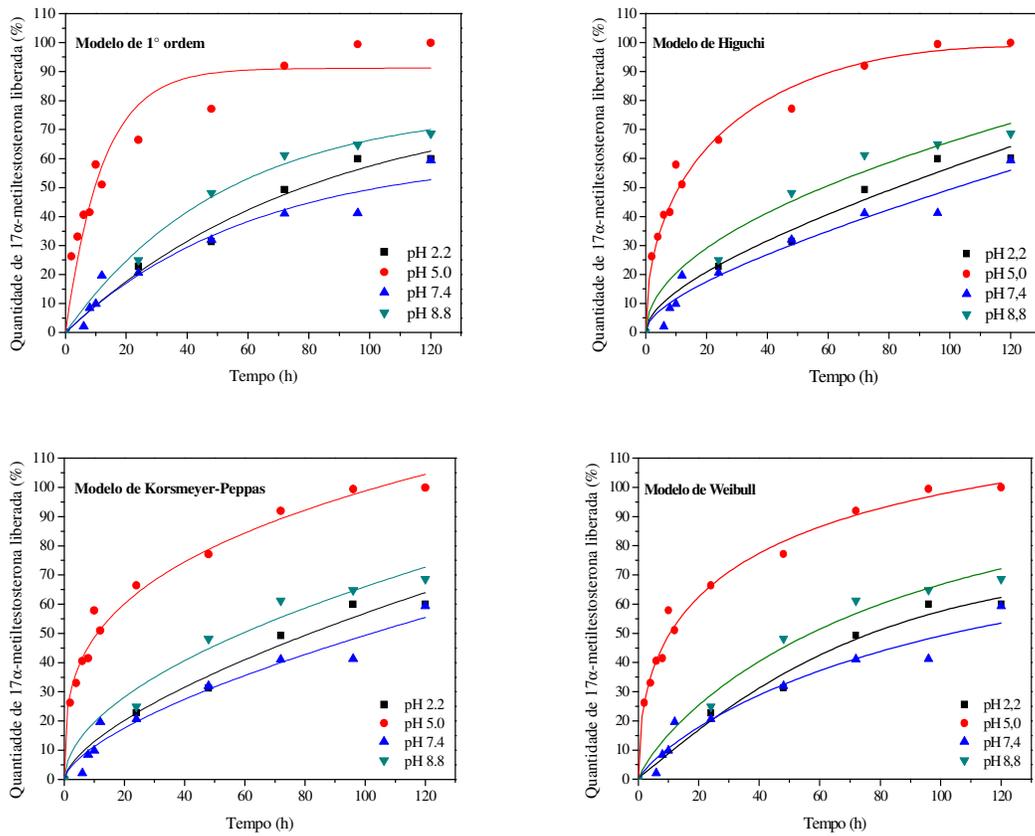


Figura 37: Cinética de liberação de 17 α -metiltestosterona das partículas de PLA incubadas em condições simuladas ao trato gastrointestinal de tilápias do Nilo e ajuste dos dados aos modelos de 1^a ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull.

Tabela 32: Análise dos parâmetros obtidos através do ajuste dos dados de liberação de 17 α -metiltestosterona a partir das partículas de PLA usando os diversos modelos propostos.

Modelos							
pH	1 ordem			Higuchi			
	$f_t = f_{t_{\text{máx}}}(1 - e^{-k_1 t})$			$f_t = K_{H1} t^{1/2} - K_{H2} t$			
	$f_{t_{\text{máx}}}$	K	R ² ajustado	K _{H1}	K _{H2}	R ² ajustado	
2,2	81,317	0,012	0,978	3,830	-0,185	0,970	
5,0	91,167	0,082	0,921	17,761	0,801	0,982	
7,4	61,355	0,016	0,937	3,076	-0,186	0,948	
8,8	77,853	0,019	0,991	6,425	-0,015	0,966	
pH	Korsmeyer-Peppas			Weibull			
	$f_t = at^n$			$f_t = 1 - e^{-\frac{(t-T_i)^b}{a}}$			
	a	n	R ² ajustado	a	Ti	b	R ² ajustado
2,2	2,936	0,644	0,972	0,014	-0,934	1,113	0,959
5,0	23,843	0,309	0,984	0,019	-8,323 x 10 ⁻³⁷	0,461	0,983
7,4	2,568	0,642	0,950	0,009	-2,401 x 10 ⁻⁹	0,824	0,929
8,8	5,780	0,529	0,967	0,011	-1,166 x 10 ⁻¹¹	0,819	0,961

Observando os dados do ajuste, nota-se que os valores do expoente n , que indica o tipo de mecanismo de liberação, variaram de 0,31 a 0,65. Isso mostra que as partículas formadas tendem a ser muito sensíveis à mudanças no pH do meio. Caso contrário, o perfil de liberação seria muito similar, independentemente do pH a que as partículas fossem expostas. Isso ocorre em grande parte devido à presença de grupos carboxílicos na matriz. Além disso, o inchamento da matriz à base de polímeros cristalinos, como o PLA, tende a ser acompanhado pela mobilidade das cadeias poliméricas, que determina o mecanismo de liberação. Dessa forma, de acordo com BRANNON-PEPPAS e PEPPAS (1989), o pH do meio tende a afetar a flexibilidade das cadeias da matriz, levando ao intumescimento da amostra, o que modifica o perfil de liberação da droga incorporada. Os expoentes relativos ao pH 2,2, 7,4 e 8,8 indicaram um comportamento não-Fickiano, onde a mobilidade das cadeias é um importante fator ligado à liberação da droga. Nestes casos, observa-se que tanto a difusão da droga quanto a mobilidade das cadeias são igualmente importantes. Supõe-se para estes casos que o mecanismo de absorção de água em pH alcalino é predominantemente não-Fickiano (KORSMEYER e PEPPAS, 1981), ou seja, controlado pela relativa mobilidade das cadeias do PLA, sendo considerado, portanto, como transporte de drogas anômalo. Assim, observa-se comumente uma combinação da liberação da droga por difusão quanto pelo transporte tipo II, descrito por KORSMEYER e PEPPAS (1981), em que a dissolução da droga é a fase predominante, sendo portanto, caracterizada por uma dependência linear com o tempo para a liberação da droga (ARIFIN *et al.*, 2006).

Já quando se reduz o pH do meio para 5,0, o mecanismo Fickiano tende a se tornar predominante durante o processo de liberação, limitando-se aos processos difusivos da droga no interior da matriz. Tais resultados confirmam a natureza cristalina das partículas de PLA obtidas. Isso demonstra que, caso se deseje aumentar a taxa de liberação da droga a partir destes dispositivos, especialmente na região intestinal, deve-se optar por desenvolver dispositivos mais amorfos. Tal característica seria facilmente alcançada utilizando sistemas com altas concentrações de MT na solução polimérica, pois esta condição experimental provocou redução da cristalinidade da matriz. Este efeito foi verificado pela baixa cristalinidade das partículas. Além disso, o uso combinado deste polímero com outros que

possuam características mais amorfas ou com altas taxas de degradação tenderiam a favorecer tal liberação.

Similarmente, partículas de PLA/PCL foram incubadas em soluções tampão a diferentes pH, sendo os dados de liberação de MT apresentados na Figura 38. A quantidade máxima de hormônio liberado variou entre 52 a 98% em 120 horas, para os meios ajustados a pH 2,2 e 5,0, respectivamente. Já em pH alcalino, obteve-se valores máximos de liberação de cerca de 78%, sendo que em pH 7,4, estes valores não ultrapassaram os 55%. A liberação de MT a partir de partículas de PLA/PCL, considerando o trânsito na região gástrica média de 2 horas, atingiu somente 8% em pH 2,2. Quando o pH do meio foi alterado para 5,0, observou-se uma elevação da taxa de liberação que alcançou valores próximos de 63%. Já em pH intestinal (8,8), a quantidade acumulada de MT liberada foi de 60%, aproximadamente. Considerando-se uma combinação da quantidade de droga liberada em condições simuladas de pH gástrico e intestinal, supõe-se que 100% de liberação da droga seriam alcançados em 6 horas, a partir do momento da administração, caso o pH da região gástrica se mantivesse próximo de 5,0. Nos casos em que o pH na região gástrica da tilápias seja mais próximo de 2,2, a liberação da droga seria mais lenta, de modo que se alcançaria até 68% de liberação no trato gastrointestinal. Para estes casos, supõe-se que o restante da droga seria liberado na corrente sanguínea, caso estas partículas conseguissem transpor as barreiras existentes à absorção de drogas. Neste caso seria necessário garantir a transposição da camada simples de células colunares do estômago e as microvilosidades do intestino. Assim, cerca de 10 horas na corrente sanguínea seriam necessárias para a completa liberação da MT. Desta forma, seriam requeridas 2 administrações diárias de ração enriquecidas com partículas de PLA/PCL contendo MT.

Os dados obtidos da cinética de liberação de MT em diferentes condições de pH simuladas foram igualmente ajustados a diversos modelos matemáticos. Os dados sumarizados destes ajustes são apresentados na Tabela 33.

Como se pode observar, o modelo que forneceu melhor ajuste em todos os pH foi o modelo de 1ª ordem, com coeficientes de ajustes variando entre 0,89 a 0,96, seguido de perto pelo modelo de Weibull. Deve-se ressaltar, no entanto, que o resultado do ajuste do

modelo de Higuchi não apresenta qualquer sentido ou indicativo de comportamento real visto que, neste caso, não representa um fenômeno físico possível (as curvas tendem a subir a um patamar máximo e a decair com o tempo, não alcançando a estabilidade, como o esperado). Assim, para os casos em que, hipoteticamente, o R^2 dos ajustes fornecidos pelo modelo de Higuchi forem melhores, não se recomendaria, no entanto, que os mesmos fossem adotados para a descrição do comportamento do sistema.

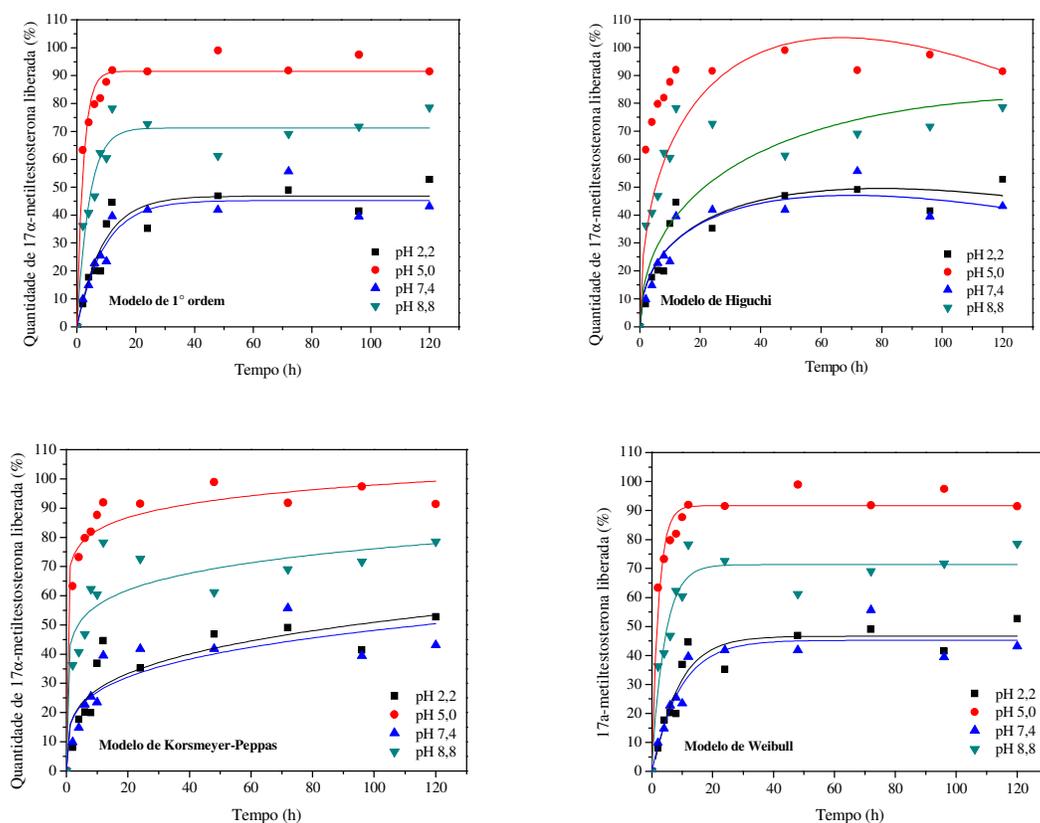


Figura 38: Cinética de liberação de 17 α -metiltestosterona das partículas de PLA/PCL incubadas em condições simuladas ao trato gastrointestinal de tilápias do Nilo e ajuste dos dados aos modelos de 1ª ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull.

Tabela 33: Análise dos parâmetros obtidos através do ajuste dos dados de liberação de 17 α -metiltestosterona a partir das partículas de PLA/PCL usando os diversos modelos propostos.

		Modelos					
pH	1 ordem			Higuchi			
	$f_t = f_{t_{m\acute{a}x}}(1 - e^{-k_1t})$			$f_t = K_{H1}t^{1/2} - K_{H2}t$			
	f_{t_{máx}}	K	R² ajustado	K_{H1}	K_{H2}	R² ajustado	
2,2	46,831	0,112	0,888	11,074	0,620	0,849	
5,0	91,531	0,462	0,963	25,300	1,547	0,469	
7,4	45,263	0,108	0,907	11,225	0,670	0,892	
8,8	71,251	0,241	0,911	13,270	0,533	0,227	
pH	Korsmeyer-Peppas			Weibull			
	$f_t = at^n$			$f_t = 1 - e^{-\frac{(t-T_i)^b}{a}}$			
	a	n	R² ajustado	a	Ti	B	R² ajustado
2,2	15,207	0,262	0,798	0,409	0,119	1,010	0,874
5,0	69,315	0,075	0,954	- 0,052	0,449	1,000	0,959
7,4	42,209	0,128	0,827	- 0,018	0,108	1,000	0,897
8,8	15,175	0,251	0,786	- 0,151	0,233	1,000	0,903

Assim, levando-se em consideração que o melhor ajuste foi fornecido pelo modelo de 1ª ordem, pode-se concluir que a liberação da droga, para estas partículas, foi dependente e/ou diretamente proporcional à quantidade de droga que restou incorporada na matriz polimérica. Desta forma, a taxa de liberação tende a aumentar linearmente com o aumento da concentração da droga. É comum que este modelo seja mais usado para explicar a dissolução de drogas solúveis em água. No entanto, tal modelo também se aplica a matrizes porosas, como as partículas de PLA/PCL empregadas neste estudo. MU e FENG (2011), observaram resultados semelhantes quanto ao comportamento de liberação de paclitaxel à partir de nanoesferas de PLGA. Tais estudos mostraram que a porcentagem de liberação acumulada da droga diminuía proporcionalmente à redução da quantidade de droga inicialmente incorporada à matriz. Estas observações são consistentes com as obtidas por outros estudos, como os de POLAKOVIC *et al.* (1999) e GREF *et al.* (1994). Possivelmente a droga pode estar encapsulada como uma fase molecularmente dispersa na matriz polimérica, quando baixas concentrações de droga são empregadas. Assim, quando altas concentrações iniciais são usadas, a incorporação da droga pode exceder a sua solubilidade na matriz polimérica, de modo que pequenos cristais da droga serão integrados heterogeneamente na matriz. Desta forma, a liberação da droga será muito menor que a indicada através dos modelos difusivos (ARIFIN *et al.*, 2006). No entanto, deve-se salientar que este efeito pode estar sendo suprimido pela atuação do Tween 80, um agente que tende simular a atuação de moléculas com atividade superficial proveniente de fluidos corpóreos.

Além disso, a porosidade das partículas de PLA/PCL deve contribuir para a cinética de liberação da MT, pois a liberação inicial rápida deve ter sido acompanhada por uma liberação linear relativamente controlada. Segundo FREIBERG e ZHU (2004), isto pode ser atribuído à lixiviação que ocorre na parede externa das partículas, quando estas se tornam hidratadas. Deve-se salientar que, apesar da cinética de liberação de MT a partir de partículas de PLA/PCL ser de 1ª ordem, a mesma tende a ser proporcional à quantidade de droga restante dentro das partículas, o que ao longo do tempo tende a se reduzir gradualmente. Acredita-se que isto seja resultado do aumento da resistência difusional, aliada à redução da área de difusão penetrante (LEE, 1986).

Assim, uma forma de reduzir a liberação de MT, caso conveniente, seria adicionar menos quantidade de droga à solução polimérica. Tal medida seria suficiente para controlar tanto o efeito associado da liberação condicionada à quantidade inicial de droga, quanto à formação de estruturas mais cristalinas e menos porosas. A variação das proporções dos polímeros e ao maior controle dos parâmetros operacionais poderiam minimizar a formação de partículas porosas, o que teria impacto direto sobre a liberação de MT. Tal porosidade, especialmente em casos em que o pH gástrico atinja valores próximos à 5,0, pode ser muito problemática. Isso porque o aumento da porosidade das partículas não somente aumentou o acesso da água no interior da matriz, como também permitiu o intumescimento do dispositivo, o que levou a uma maior mobilidade das cadeias, resultando em aceleração dos processos difusivos no interior da partícula. O manejo de tais características é bastante importante, pois permite decidir qual dispositivo é mais conveniente à aplicação a que se destina.

As cinéticas de liberação para as partículas de PLA/PLGA forneceram dados muitos próximos aos obtidos para as partículas de PLA/PCL (Figura 39). A quantidade máxima de MT liberada em 120 horas foi de 45 e 91% para as condições gástricas, no caso pH 2,2 e 5,0, respectivamente. Já em condição intestinal, a quantidade liberada foi menor, cerca de 88%. Em pH neutro, a quantidade liberada não passou de 67%. Considerando o tempo de passagem pelo trato gastrointestinal das tilápias, observou-se que em 2 horas, ocorreu liberação de MT entre uma faixa de valores de 14 a 63% quando se aumentou o pH gástrico para 5,0. Nas 10 horas referentes à passagem pelo trato intestinal, observou-se uma liberação de até 59%. Similarmente ao que ocorreu com as partículas de PLA/PCL, as partículas não se mostraram muito resistentes à mudanças no pH gástrico, o que levou ao aumento da taxa de liberação de MT. Apesar das partículas de PLA/PLGA serem mais porosas e amorfas quando comparadas às partículas de PLA/PCL, não se nota um aumento acentuado da quantidade de MT liberada. Isso deve ser um indicativo que, para estas partículas, a cinética de liberação deve ser influenciada especialmente pelos mecanismos difusivos da MT, e não pela maior susceptibilidade de erosão da matriz polimérica. Os dados referentes à modelagem matemática da cinética de liberação das partículas estão na Tabela 34.

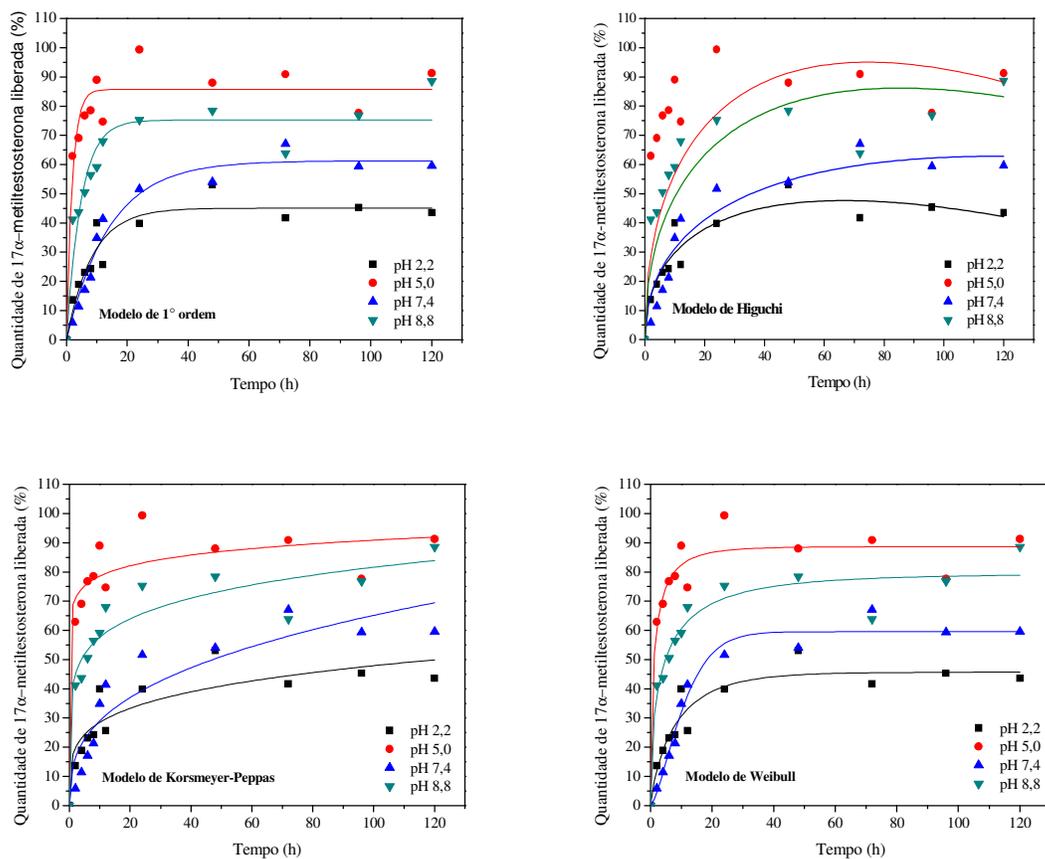


Figura 39: Cinética de liberação de 17 α -metiltestosterona das partículas de PLA/PLGA incubadas em condições simuladas ao trato gastrointestinal de tilápias do Nilo e ajuste dos dados aos modelos de 1 $^{\text{a}}$ ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Weibull.

Similarmente ao que ocorreu para as partículas de PLA/PCL, observou-se que, os ajustes efetuados usando-se especialmente o modelo de Higuchi também não forneceram resultados que representassem um comportamento físico provável para a liberação da MT das partículas. Isso fica mais evidente quando se observa que os modelos usados para realizar os ajustes não são considerados fenomenológico, visto que não se baseiam em equações que descrevem fenômenos reais, como por exemplo, o transporte de massa por difusão, a dissolução da droga e/ou das partículas ou mesmo a transição do polímero de um estado cristalino para o estado elástico, dentre outros (SIEPMAN e SIEPMAN, 2008).

Tabela 34: Parâmetros obtidos através do ajuste dos dados de liberação de 17 α -metiltestosterona a partir das partículas de PLA/PLGA usando os diversos modelos matemáticos propostos.

Modelos							
pH	1 ordem			Higuchi			
	$f_t = f_{t_{m\acute{a}x}}(1 - e^{-k_1t})$			$f_t = K_{H1}t^{1/2} - K_{H2}t$			
	$f_{t_{m\acute{a}x}}$	K	R ² ajustado	K _{H1}	K _{H2}	R ² ajustado	
2,2	45,060	0,119	0,891	11,659	0,713	0,903	
5,0	85,710	0,523	0,910	22,000	1,273	0,217	
7,4	61,250	0,070	0,965	11,541	0,530	0,909	
8,8	75,231	0,209	0,884	18,657	1,010	0,728	
pH	Korsmeyer-Peppas			Weibull			
	$f_t = at^n$			$f_t = 1 - e^{-\frac{(t-T_i)^b}{a}}$			
	A	n	R ² ajustado	a	Ti	B	R ² ajustado
2,2	16,919	0,226	0,814	0,114	-0,014	0,801	0,875
5,0	67,932	0,063	0,898	0,660	-0,021	0,518	0,921
7,4	12,886	0,352	0,856	0,083	0,000	1,418	0,967
8,8	40,623	0,152	0,910	0,207	0,000	0,506	0,914

Considerando-se os modelos usados para ajuste, observa-se que o modelo que forneceu melhor ajuste às curvas de liberação foi o modelo proposto por Weibull, exceto para os dados relativos ao pH 2,2 (Higuchi). Neste modelo, considera-se que o mecanismo de liberação é tipicamente Fickiano. Além disso, altos valores de b , como é o caso da cinética de liberação em pH 7,4, seriam consequência de um mecanismo adicional de liberação ligado à erosão do dispositivo e à penetração de água no interior da matriz. Desta forma, o coeficiente b está mais ligado à interação da droga e à sua habilidade de se mover dentro da matriz. Isso deixa clara a fraca dependência de b com a concentração inicial de droga na matriz, ao contrário do que foi observado para os casos em que as cinéticas se ajustam melhor ao modelo de 1ª ordem (partículas de PLA/PCL). Em pH gástrico e intestinal, observa-se que os valores de b são menores, quando comparados ao de pH 7,4, o que indica a predominância do mecanismo difusivo na liberação de MT. Devido à baixa solubilidade da MT no meio aquoso, as constantes de solubilidade tendem a ser menores. Como o mecanismo de dissolução tem pouco ou nenhum efeito sobre a liberação, observa-se que a solubilidade e a taxa de dissolução constante são igualmente pequenas comparadas à taxa de difusão. O principal mecanismo de liberação, nestes casos, seria a difusão que ocorre no interior das partículas.

A cinética de liberação de MT nas partículas produzidas forneceu dados importantes quanto à biodisponibilidade esperada do hormônio em condições simuladas do trato gastrointestinal das tilápias do Nilo. Tais dados podem ser usados como base em estudos de administração *in vivo* destes dispositivos. Não somente a compreensão dos mecanismos que regem a liberação do hormônio são importantes como também a indicação dos sistemas mais promissores à liberação controlada de MT. Na Tabela 35 estão indicadas as quantidades liberadas de MT nos ensaios *in vitro*.

Com base nos resultados obtidos, pode-se supor que as partículas de PLA foram as mais resistentes à ação do pH ácido, o que levou a baixas liberações de MT, durante a passagem das partículas pelas condições de pH 2,2 por um período de aproximadamente 2 horas. Similarmente, baixas quantidades de MT também foram verificadas ao longo de 2 horas quando o pH foi elevado para cerca de 5,0. Em condições similares ao pH

intestinal, em um período de 2 horas, as partículas de PLA também não forneceram resultados satisfatórios, já que não se alcançaram valores acima de 10% de liberação para pH 7,4, não sendo registrada liberação em pH mais alcalino. Do ponto de vista da reversão sexual, isso pode ser bastante problemático, pois o desejável seria ter apenas a proteção da MT das condições gástricas e sua liberação integral no intestino, considerando que o tempo de percurso no trato gastrointestinal das tilápias não seja muito superior a 12 horas. Entretanto, se se desejasse primordialmente a liberação na corrente sanguínea, este sistema seria muito efetivo e poderia liberar a MT por vários dias, sem a necessidade de nova administração, o que do ponto de vista econômico, seria muito interessante.

Tabela 35: Quantidade de MT liberada obtida nos ensaios de cinética de liberação para as diferentes partículas produzidas, considerando-se a quantidade liberada no tempo de passagem pelo trato gástrico e intestinal e durante 120 horas.

pH	Tempo (h)	Quantidade de MT liberada (%)		
		Partículas de PLA	Partículas de PLA/PCL	Partículas de PLA/PLGA
2,2	2	0,00	8,11	13,63
	10	0,00	36,90	39,94
	120	60,00	52,71	43,53
5,0	2	26,23	63,33	62,91
	10	57,87	87,65	88,98
	120	99,92	91,41	91,22
7,4	2	9,91	9,83	5,80
	10	9,92	23,44	34,81
	120	59,34	43,14	59,62
8,8	2	0,00	36,22	41,11
	10	0,00	60,42	59,14
	120	68,61	78,56	88,59

Quando se utilizam partículas à base de PLA/PCL e PLA/PLGA, comumente se observa uma maior liberação de MT no pH ácido, de 8 a 63% e 14 a 63%, respectivamente. Sabe-se que valores na faixa de 60% de liberação na região gástrica poderiam ser preocupantes. No entanto, deve-se destacar que, normalmente, a máxima taxa de digestão na região gástrica das tilápias ocorre na faixa de pH entre 2 e 2,2 (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1983), e nesta faixa de valores, a MT liberada não ultrapassou os 8% e 14%, para as partículas de PLA/PCL e PLA/PLGA, respectivamente. Além disso, a redução da produção de secreção gástrica e consequente aumento do pH para uma faixa entre 5 a 7 ocorre somente ao final do dia de alimentação, pois tilápias geralmente se alimentam ativamente durante o dia, mas muito pouco no período da noite. Desta forma, as partículas a partir das blendas são apropriadas quanto ao potencial de proteção da MT da ação do suco gástrico das tilápias. Na região intestinal, ambas as partículas mostraram-se igualmente promissoras, já que em ambos os casos, a faixa máxima de liberação de MT em 10 horas de incubação foi de 60%. Assumindo que o pH sanguíneo das tilápias seja próximo a 7,4, assim como nos vertebrados (WURTS e DURBOROW, 1992), parte da MT poderia vir a ser liberada na corrente sanguínea caso as partículas atravessassem a parede intestinal, transpondo as microvilosidades existentes nesta região. Entretanto, tal liberação não seria sustentada por vários dias, como no caso das partículas de PLA.

Considerando que todo o hormônio liberado na região gástrica chegue íntegro à região intestinal, é possível supor que no caso das partículas de PLA/PCL observar-se-ia uma liberação de cerca de 50% da droga no período de 12 horas. Isso ocorreu pois, como demonstrado através do modelo matemático de ajuste de 1ª ordem, o mecanismo de liberação para estas partículas é função de uma taxa relativa à quantidade de MT remanescente dentro do dispositivo. Assim, a liberação seria ainda menor, pois parte da droga teria sido liberada precocemente na região gástrica. O restante da MT necessária para realizar a reversão sexual eficiente deveria ser biodisponibilizada na corrente sanguínea. Esperar-se-ia que, caso as partículas alcançassem a corrente sanguínea, a liberação do restante da MT ocorreria em aproximadamente 120 horas, como pode ser observado através das cinéticas de liberação para as partículas neste pH. Um problema associado a este dispositivo seria um possível descontrole na quantidade de MT presente na corrente

sanguínea, pois, apesar de ser liberada em função das quantidades remanescentes no interior da partícula. Em alguns períodos, a concentração de MT na corrente sanguínea poderia exceder às concentrações indicadas, além de que o período de término de tratamento deveria ser alterado para contrabalancear estes picos de MT. Desta forma, deve-se optar por sistemas em que a maior parte da MT seja liberada na região intestinal, não dependendo assim, de ajustes necessários, devido à mais lenta liberação do hormônio encapsulado na corrente sanguínea.

No caso das partículas de PLA/PLGA, levando em consideração que toda a MT liberada na região gástrica esteja biodisponível no trato intestinal, verifica-se que ao fim de 12 horas cerca de 74% da droga terá sido liberada. Isso acontece pois, diferentemente do que ocorre com as partículas de PLA/PCL, a MT incorporada nas partículas de PLA/PLGA obedece a um mecanismo de liberação primordialmente difusivo. Isso faz com que a quantidade de hormônio liberada não seja limitada pela concentração remanescente no interior do dispositivo. Assim, a liberação do hormônio se mantém em taxas constantes, o que permite alcançar, ao fim do período de 12 horas, valores muito maiores de liberação de MT. Desta forma, a maior parte da droga seria biodisponibilizada no trato gastrointestinal da tilápia em 12 horas. Além disso, parte da liberação da MT pode ocorrer diretamente na corrente sanguínea. Em 20 horas seria possível alcançar cerca de 100% de liberação de droga, sendo que 26% da MT seria liberada diretamente no sangue em 8 horas.

Destaca-se que, para se atingir a ação biológica desejada, é fundamental que as partículas sejam eficientemente incorporadas à ração, seja pela mistura eficiente destas com a ração, seja por métodos alternativos de extrusão e recobrimento com outros materiais poliméricos da mistura partículas/ração. Isso garantiria que as partículas não venham a permanecer na água dos tanques, o que levaria a um descontrole do processo de inversão sexual das tilápias. Além disso, o método de inversão sexual de tilápias conta com o fato adicional que praticamente toda a ração administrada é consumida em poucos segundos pelos peixes, devido ao sistema de controle de demanda/saciedade dos peixes comumente adotado.

É igualmente importante salientar que nos estudos de liberação de partículas em condições de pH similares aos do trato gastrointestinal das tilápias não se levou em consideração efeitos tanto de outros componentes do suco gástrico, tais como enzimas, assim como o efeito da própria ração sobre a degradação e liberação da MT. Supõe-se que tais efeitos possam alterar a taxa de liberação do hormônio, levando a maiores valores iniciais. No entanto, deve-se salientar que parte da ração também pode vir a agir protegendo parte das partículas da ação do pH gastrointestinal, o que também poderia restringir a taxa de liberação da MT. Supostamente, a adição de Tween 80 às soluções tampões pode ter compensado alguns destes efeitos, levando a valores de liberação próximos dos obtidos em ensaios *in vivo*.

4.6. Estimativa da massa média de partículas contendo MT requeridas por tilápia Nilo durante o período de tratamento

Considerando-se que as pós-larvas sejam alimentadas com ração contendo MT durante 28 dias, pôde-se estimar a quantidade de partículas necessária para fornecer os valores diários recomendados para a inversão sexual das tilápias do Nilo. Assim, seguindo as equações descritas na seção 3.2.7.9., tem-se na Tabela 36 as quantidades iniciais e finais de MT requeridas diariamente e a quantidade de partículas usadas no tratamento.

Como se pode notar, para que se forneça as quantidades recomendadas no tratamento com MT, deve-se inicialmente tratar os peixes com cerca de 5,18 g de partículas para cada quilograma de ração administrada durante o primeiro estágio de tratamento. A quantidade máxima de partículas usadas deve variar entre 34 a 88 g para cada quilograma de ração, como pode ser constatado na Tabela 36. Isso mostra que a administração das partículas pode ser viável, uma vez que, em escala de bancada (com vaso de precipitação de 500 mL) foi possível, em 3 horas, obter-se até 2,25 g de partículas, usando-se o sistema em batelada. Considerando a operação em escala industrial, com uso de grandes vasos de precipitação, ou mesmo o uso de um sistema semi-contínuo, altas concentrações de

partículas poderiam ser facilmente obtidas. No entanto, deve-se ressaltar que o cálculo de viabilidade econômica não foi efetuado, de modo que o retorno do investimento inicial não pode ser, neste caso, considerado. Apesar disso, deve-se considerar que, como indicado na revisão bibliográfica, há uma grande demanda de fornecimento de alimentos de origem protéica, além da intensificação pela busca de maior controle do crescimento de animais criados em confinamento. Tais fatos, já seriam, portanto, argumentos suficientes para afirmar o potencial de mercado existente demonstrado no presente trabalho.

Tabela 36: Cálculo dos parâmetros relevantes à administração de partículas de PLA/PLGA usadas na reversão sexual de tilápias do Nilo

Parâmetros	Semana de tratamento	PLA	PLA/PCL	PLA/PLGA
Fração de MT misturada à ração (n)	1 ^a	0,300	0,300	0,300
	4 ^a	0,150	0,150	0,150
Peso vivo do peixe ($\text{peso}_{\text{peixe}}$) (g)	1 ^a	0,008	0,008	0,008
	4 ^a	0,270	0,270	0,270
Quantidade de ração/ peixe (QR) (g)	1 ^a	2,4	2,4	2,4
	4 ^a	40,5	40,5	40,5
Dose de MT (QMT) $\left(\frac{mg\ MT}{kg\ de\ ração}\right)$	1 ^a	40	40	40
	4 ^a			
Número de arrojamentos diários	1 ^a	6	6	6
	4 ^a			
Quantidade de MT requerida/dia (mg)	1 ^a	576	576	576
	4 ^a	9720	9720	9720
Razão mássica de MT/polímero	1 ^a	0,400	0,150	0,125
	4 ^a			
Massa de partículas (mg)	1 ^a	1,400	1,150	1,125
	4 ^a			
Quantidade de partículas $\left(\frac{g\ de\ partículas}{kg\ de\ ração.dia}\right)$	1 ^a	2,02	4,42	5,18
	4 ^a	34,02	74,52	87,48

4.7. Cuidados necessários no desenvolvimento de sistemas particulados empregando-se tecnologia de fluidos supercríticos

A formação de partículas por tecnologia de fluidos supercríticos, apesar de ser bem difundida, carece de informações suplementares quanto à concepção de todo o aparato e dos procedimentos que devem ser adotados para garantir a formação eficiente dos dispositivos e os cuidados necessários para garantir a segurança do operador. Alguns pontos devem ser ressaltados, levando-se em conta a experiência adquirida durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Em primeiro lugar, deve-se destacar os cuidados relativos à construção de sistemas de produção de partículas empregando-se fluidos supercríticos. A escolha do material empregado na fabricação do vaso de precipitação deve ser considerada, uma vez que se deve projetar um sistema que preferencialmente possa suportar altas variações de pressão e temperatura. Além disso, deve-se dar preferência a tubulações flexíveis, para facilitar o manejo, permitindo assim, o fácil ajuste e isolamento térmico requerido. O diâmetro da tubulação empregada é também de grande importância, visto que diâmetros menores que 100 μm podem dificultar o fluxo de soluções poliméricas viscosas, quando altas concentrações de polímero são empregadas. Destaca-se também a necessidade de construir sistemas que possuam válvulas de segurança, ou que permitam a fácil descompressão e manutenção de partes segmentadas do sistema. Isso facilita muito o manejo pelo operador, uma vez que permite que alterações no sistema, troca de peças, suprimento de CO_2 , renovação de soluções poliméricas ou até mesmo vazamentos sejam rapidamente reparados, sem que isso prejudique o processo como um todo. Apesar dos sistemas de fluido supercrítico geralmente empregarem CO_2 como solvente dos processos, deve-se salientar a importância do acondicionamento do sistema em uma capela de segurança química que possua ventilação e exaustão controladas, onde a exaustão seja realizada através de filtro absoluto e de carvão ativo. Isso é importante, uma vez que, rotineiramente, nos estudos realizados muitas drogas podem ocasionar sérios danos ou efeitos tóxicos colaterais, devido ao aerossol ou poeira química gerados durante a rotina de manipulação de compostos oncogênicos, mutagênicos, antibióticos, hormônios e esteróides. Além disso,

muitos polímeros empregados na formação das matrizes usam solventes carcinogênicos e/ou tóxicos. Similarmente, existem problemas associados à contínua exposição do operador à elevação concentrações de CO₂. Quando o sistema nervoso de tais operadores é exposto a concentrações de CO₂ superiores a 50000 ppm, pode-se observar um aumento acentuado da acidez do sangue, o que leva a um aumento na taxa de respiração, conduzindo ao surgimento de dores de cabeça, tonturas, problemas visuais, problemas cardiovasculares e até mesmo à desmineralização óssea (CARMO e PRADO, 1999).

Deve-se salientar também a importância do uso de equipamentos de proteção individual (EPI). Proteção respiratória (tais como máscaras com filtro de ar e pó), proteção visual e facial (óculos), cabeça (toucas descartáveis), mãos e braços (luvas e mangotes) e corpo (avental) são igualmente importantes. Estes EPI são necessários especialmente na fase preparativa do sistema das soluções e na fase final, no caso durante o processo de coleta das partículas e limpeza do aparato experimental. As partículas produzidas tendem a ser muito finas e leves, portanto, fáceis de serem aspiradas ou mesmo incorporadas pela pele do operador. Assim, tais equipamentos garantiriam a segurança durante toda a fase de produção. Além disso, deve-se destacar que o processo de produção de partículas, é relativamente lento, que demanda muito cuidado, paciência e de difícil limpeza do equipamento. As partículas tendem a ficar agregadas à parede do vaso de precipitação, o que demanda o uso de luvas e mangotes para a coleta das mesmas. Além disso, no processo de limpeza, comumente se usam solventes orgânicos para garantir a remoção dos polímeros e das partículas residuais. O processo de limpeza deve ser realizado sistematicamente e o solvente orgânico deve ser injetado através da tubulação por pelo menos 30 minutos, usando um gradiente de injeção em que a vazão inicial deve ser preferencialmente 1/10 da vazão usada durante o processo. O processo de injeção lenta ajuda a remover mais eficientemente os polímeros e agentes ativos que possam ter ficado retidos na tubulação, garantindo assim, a adequação do sistema para uso futuro.

Em geral, processos envolvendo a solubilização de polímeros sintéticos, como os usados no presente trabalho, demandam paciência. Tais polímeros tendem a se solubilizar muito lentamente em solventes orgânicos. No entanto, deve-se salientar, por observações

realizadas durante o processo de formação de partículas, que o uso de sonicação para reduzir o tempo de solubilização não se mostrou muito apropriado. O efeito mais evidente da exposição da solução polimérica ao ultrassom é a diminuição de sua viscosidade e a redução da massa molar (MAGALHÃES e FEITOSA, 1999). Tal efeito mostrou ter impacto sobre a formação de partículas, uma vez que, mesmo com polímeros de alta massa molar, como o PLA empregado, quando exposto à sonicação, as partículas formadas apresentaram forte tendência à agregação e a formação de uma fina camada de filme no vaso de precipitação.

Assim, pela disponibilização de tais informações, espera-se ter contribuído para o desenvolvimento de sistemas particulados via fluidos supercríticos, pois tais detalhes, em geral, não são fornecidas na literatura atual consultada.

5. CONCLUSÕES

O sistema de produção de partículas utilizando fluido supercrítico foi capaz de formar eficientemente partículas à base de PLA, PLA/PCL e PLA/PLGA. No caso das partículas formadas a partir de PLA, observou-se que o aumento da concentração de PLA diminuiu o tamanho das partículas e reduziu a quantidade de DCM residual presente nas partículas ao fim do processo. Por outro lado, o aumento da vazão de solução polimérica elevou o tamanho das partículas formadas, o que dificultou o processo de remoção do solvente orgânico. Estas duas variáveis operacionais devem, portanto, ser cuidadosamente selecionadas para produzir partículas com fins de incorporação e posterior administração de agentes ativos. O efeito destas variáveis também foram observados na morfologia e nos diâmetros médios das partículas, que variaram de 5,4 a 20,5 μm . Já quando a adição de MT foi realizada, um aumento no diâmetro médio para até 53,4 μm foi observado quando altas concentrações de agente ativo foram empregadas. A cristalinidade das partículas de PLA foi pouco afetada pelo processo, no entanto, observou-se redução na cristalinidade quando se efetuou a incorporação do agente ativo às partículas.

Em formulações compostas de PLA e PCL, a proporção de PCL na formação da matriz aumentou a distribuição de tamanhos e o diâmetro médio das partículas. O aumento da quantidade de PCL propiciou a formação de partículas mais agregadas e porosas, sendo que em altas concentrações de PCL verificou-se inclusive a formação de filmes finos. Assim, o uso de PCL em proporções menores seria o mais indicado para a aplicação final. Partículas de PLA/PCL produzidas na presença de altas quantidades de MT mostraram-se mais rugosas, agregadas, além de terem comportamentos térmicos diferentes dos obtidos para os polímeros isolados. Isso indicou que parte da droga deve estar na superfície externa ou mesmo não ter sido incorporada pela matriz polimérica. Desta forma, concluiu-se que partículas de PLA/PCL produzidas com quantidades intermediárias de MT e PCL seriam as mais adequadas à administração oral.

O planejamento fatorial proposto para o estudo de formação de partículas de PLA/PLGA resultou em sistemas particulados com diâmetros médios compreendidos entre 22 a 98 μm . Não se observou efeitos significativos no diâmetro médio das partículas quando se alterou a proporção entre PLA/PLGA e a concentração inicial de MT. No entanto, as partículas formadas apresentaram grande heterogeneidade de tamanhos e aspectos morfológicos bastantes distintos. Maior formação de poros na estrutura foi observada, sendo que esta deve ser consequência da fraca compatibilidade entre o PLA e PLGA, que levou a uma menor interação entre as cadeias, permitindo o desenvolvimento de estruturas mais amorfas. Análises térmicas indicaram que o processamento deve ter sido o principal responsável pela alteração na estrutura cristalina dos polímeros na ausência de hormônio. O CO_2 supercrítico permitiu uma maior mobilidade das cadeias poliméricas, o que levou à formação de estruturas mais compactas. O PLGA teve pouca ou nenhuma contribuição na formação cristalina da matriz para estes casos. Já a adição do hormônio levou a reduções na Tg, Tc e Tm, além de se observar um comprometimento quanto à cristalinidade destes materiais.

As eficiências de incorporação de MT nas partículas ficaram entre 20 a 85%, dependendo da condição experimental usada. Isso indica que o sistema possui grande versatilidade. A eficiência de incorporação também foi acompanhada por alterações na morfologia, distribuição de tamanhos e cristalinidade das partículas. Ensaio de liberação de MT em condições gastrointestinais simuladas mostraram que, em geral, as partículas foram bastante resistentes. As partículas de PLA apresentaram maior resistência à alteração de pH, o que levou à baixa liberação de MT em 120 horas. Já as partículas formadas a partir das blendas de PLA/PCL e PLA/PLGA mostraram-se mais apropriadas, pois permitiram maior liberação do hormônio em 12 horas (tempo de passagem pelo trato gastrointestinal).

Os ensaios *in vitro* de liberação da MT incorporada nas partículas mostraram que a formulação à base de PLA mostrou-se bastante eficiente na proteção do agente ativo das condições do trato gastrointestinal, e que viabilizaria a liberação da MT na corrente sanguínea por um tempo prolongado. A quantidade de partículas de PLA contendo MT necessária para a reversão sexual de tilápias do Nilo durante 28 dias de tratamento não

ultrapassou 34 g/kg de ração. Isso é bastante interessante, pois viabilizaria o uso deste dispositivo na liberação controlada de MT, já que baixas quantidades de partículas seriam empregadas durante o processo. As partículas de PLA/PCL, por outro lado, foram bastante eficientes na liberação da droga em um curto tempo (até 10 horas). A liberação de MT seria afetada especialmente pela variação do pH gástrico. No entanto, seriam necessárias até 74 g de partículas para permitir a reversão sexual das tilápias do Nilo, mais que o dobro do requerido para as partículas de PLA. Apesar disso, espera-se que este sistema seja mais eficiente, devido à sua liberação mais rápida. Já as partículas de PLA/PLGA mostraram-se mais apropriadas quando se requer uma maior liberação da MT na região intestinal, não se necessitando contar exclusivamente com o desempenho dessas partículas na corrente sanguínea para alcançar o melhor perfil de liberação de MT. Verificou-se também que a quantidade de partículas de PLA/PLGA contendo MT necessárias para administração oral não excedeu 90 g/kg de ração. Apesar de bastante eficiente, este tipo de dispositivo tem como maior obstáculo a grande quantidade de partículas requeridas durante o processo. Tal característica pode inviabilizar o uso de tal dispositivo, uma vez que encareceria o tratamento. Assim, as partículas de PLA/PCL seriam mais interessantes para o uso proposto, por apresentarem uma cinética de liberação mais adequada e também por serem baseadas em um polímero mais economicamente acessível. Além disso, quantidades moderadas de partículas já seriam suficientes para garantir a inversão sexual de tilápias do Nilo.

Assim, conclui-se que a formação de partículas via tecnologia de fluidos supercríticos é eficiente para a produção de dispositivos poliméricos de PLA, PLA/PCL e PLA/PLGA destinados à administração oral de MT. Isso se deve especialmente à alta versatilidade destes sistemas quanto à morfologia, distribuição de tamanhos e cristalinidade, às suas altas taxas de incorporação, perfil adequado de liberação do agente ativo e possibilidade de produção em escala industrial, ainda que somente comprovado em escala de bancada. Ensaios de liberação de MT *in vivo* são necessários para corroborar o comportamento previsto dos dados obtidos *in vitro*.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Propõe-se como sugestão para trabalhos futuros o estudo do uso de diferentes solventes, bem como a combinação destes. Entre eles, pode-se destacar a acetona, o acetato de etila e o etanol. Acredita-se que o uso combinado destes com proporções variadas de diclorometano poderia beneficiar o processo de nucleação, reduzindo assim o tamanho das partículas e melhorando a segurança do processo de produção de partículas via fluidos supercríticos.

O estudo do aumento da concentração polimérica final, no caso das blendas de PLA/PLGA também é bastante interessante, uma vez que, como o PLGA usado no presente trabalho possuía baixa massa molar, e portanto menor viscosidade, acredita-se que o aumento da concentração polimérica não seria problemático do ponto de vista de entupimento do sistema. Isso poderia contribuir para o aumento do rendimento do processo e também na redução do tamanho das partículas.

A máxima capacidade de produção de partículas também é um dado bastante interessante para ser estudado. Isso permitiria indicar qual seria o comportamento do sistema quando extrapolado para escala industrial. O estudo de viabilidade econômica também é importante, pois possibilitaria a análise do retorno do investimento projetado para a produção dos dispositivos de liberação oral.

O uso combinado dos polímeros usados no presente estudo com outros, ou mesmo a combinação dos três polímeros é relevante, além do estudo do uso de PLGA de mais altas massas molares. Isso seria interessante, permitiria a produção de partículas puras de PLGA, não obtidas no presente estudo. A combinação de PLGA com PCL também é bastante promissora, pois poderia beneficiar ainda mais a cinética de liberação de hormônios. Similarmente, o estudo do uso de PLA com menores massas molares poderia também adequar a cinética de liberação ao tempo de passagem pelo trato gastrointestinal.

Estudos de cinética de liberação sequenciais poderiam também ser realizados. As partículas poderiam ser, desta forma, expostas em diferentes condições de pH do estômago, intestino e do sangue, de modo a observar possíveis modificações nos mecanismos de liberação da MT.

Outras técnicas, tais como a DMTA, poderiam ser usadas para a caracterização dos sistemas obtidos, particularmente quanto à miscibilidade da MT e dos polímeros utilizados (análise de misturas na forma de filmes). Além disso, estudos de solubilidade do hormônio em células de equilíbrio de fases, na presença ou ausência de solventes orgânicos, seriam bastante interessantes, visto que permitiriam prever seu comportamento no vaso de precipitação, além de restringir e/ou aumentar a faixa de estudo de variação de pressão e temperatura do sistema. Além disso, ajudariam a reduzir a quantidade de ensaios preliminares, independentemente do agente ativo a ser empregado.

Por fim, seria recomendável a realização de estudos do comportamento das partículas em condições reais de alimentação dos peixes, para detectar a possível ocorrência de fenômenos não previstos nas condições simuladas de liberação do hormônio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERTURAS, M. R., MOLPECERES, J., GUZMAN, M., & GARCIA, F. (2002). Development of a new cyclosporine formulation based on poly(caprolactone) microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 19, pp. 61-72.
- AGARWAL, S., & SPEYERER, C. (2010). Degradable blends of semi-crystalline and amorphous branched poly(caprolactone): Effect of microstructure on blend properties. *Polymer*, 51, pp. 1024-1032.
- ALLAOUI-ATTARKI, K., PECQUET, S., FATTAL, E., TROLLE, S., CHACHATY, E., CONVREUR, P., et al. (1997). Protective immunity against Salmonella thyohimurium elicited in mice by oral vaccination with phosphocholine encapsulated in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infection and Immunity*, 65, 853-857.
- ALLÉMAN, E., LEROUX, J. C., GURNY, R., & DOEKLER, E. (1993). In vitro extended release properties of drug-loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles produced by salting-out procedure. *Pharmaceutical Research*, 10, 1732-1737.
- AMBROSE, C. G., & CLANTON, T. O. (2004). Bioabsorbable implants: Review of clinical experience in orthopedic surgery. *Annals of Biomedical Engineering*, 32 (1), pp. 171-177.
- ARAI, Y., SAKO, T., & TAKEBAYASHI, Y. (Eds.). (2002). *Supercritical Fluids: Molecular Interactions, Physical Properties and New Applications*. Hardcover.
- ARIFIN, D. Y., LEE, L. Y., & WANG, C. H. (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, pp. 1274-1325.

- ARSLAN, T., & PHELPS, R. P. (2004). Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion. *Aquaculture*, 234, pp. 561-573.
- BAHRAMI, M., & RANJBARIAN, S. (2007). Production of micro- and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 40, pp. 263-283.
- BALA, T., HARIHARAN, S., & RAVI KUMAR, M. N. (2004). PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21, pp. 387-422.
- BALCERZAK, J., & MURCHA, M. (2010). Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of Polylactide-Chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivates*, 15, pp. 117-126.
- BALMAYOR, E. R., TUZLAKOGLU, K., AZEVEDO, H. S., & REIS, R. L. (2009). Preparations and characterization of starch-poly- ϵ -caprolactone microparticles incorporating bioactive agents for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 5, pp. 1035-1045.
- BAROILLER, J. F., D'COTTA, H., BEZAULT, E., WESSELS, S., & HOERSTGEN-SCHWARK, G. (2009). Tilapia sex determination: where temperature and genetics meet. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A*, 153, pp. 30-38.
- BARR, I., KLEINING, M., & THIEL, W. (1993). A singledose vaccination system of inactivated veterinary vaccine. *International Congress on the Regulation of Leukocyte Production and Immune Function*. Sydney.
- BARRAT, G. (2003). Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60 (1), pp. 21-37.

- BARRY, T. P., MARWAH, A., & MARWAH, P. (2007). Stability of 17 α -methyltestosterone in fish feed. *Aquaculture*, 271, pp. 523-529.
- BAXENDALE, A. J., VAN HOOFF, P., DURRANT, L. G., SPENDLOVE, I., HOWDLE, S. M., WOODS, H. M., et al. (2011). Single shot tetanus vaccine manufactured by a supercritical fluid encapsulation technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 413, pp. 147–154.
- BEARDMORE, J. A., MAIR, G. C., & LEWIS, R. I. (2001). Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, 197, pp. 283-301.
- BERCOVY, M., GOUTALLIER, D., VOISIN, M. C., GEIGER, D., BLANQUAERT, D., GAUDICHET, A., et al. (1985). Carbon-PGLA prostheses for ligament reconstruction. Experimental basis and short-term results in man. *Clin Orthop Relat Res*, 196, 159-168.
- BODMEIER, R., WANG, H., DIXON, D. J., MAWSON, S., & JOHNSTON, K. P. (1995). Polymeric microspheres prepared by spraying into compressed carbon dioxide. *Pharmaceutical Research*, 12, 1211-1217.
- BORGES, A. M., MORETTI, J. O., McMANUS, C., & MARIANTE, A. S. (2005). Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (2), 153-159.
- BOSCOLO, W. R., HAYASHI, C., SOARES, C. M., FURUYA, W. M., & MEURER, F. (2001). Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30 (5), pp. 1391-1396.
- BOSTOCK, J., McANDREW, B., RICHARDS, R., JAUNCEY, K., TELFER, T., LORENZEN, K., et al. (2010). Aquaculture: Global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B*, 365, pp. 2897–2912.

- BOUCHARD, A., JOVANOVIĆ, N., de BOER, A. H., MARTÍN, A., JISKOOT, W., CROMMELIN, D. J., et al. (2008). Effect of the spraying conditions and nozzle design on the shape and size distribution of particles obtained with supercritical fluid drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, pp. 389–401.
- BOUTIN, O., BADENS, E., CARRETIER, E., & CHARBIT, G. (n.d.). Co-precipitation of a herbicide and biodegradable materials by the supercritical anti-solvent technique. *The Journal of Supercritical Fluids*, 31, pp. 89–99.
- BRANNON-PEPPAS, L., & PEPPAS, N. A. (1989). Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IX. The mechanisms of drug release from pH-sensitive swelling-controlled systems. *Journal of Controlled Release*, 8, pp. 267-274.
- BREITENBACH, A., MOHR, D., & KISSEL, T. (2000). Biodegradable semi-crystalline comb polyesters influence the microsphere production by means of a supercritical fluid extraction technique (ASES). *Journal of Controlled Release*, 63, pp. 53–68.
- BREKKE, J. H., BRENSE, M., & PEILMAN, M. J. (1986). Polylactic acid surgical dressing material post-operative therapy for dental extraction wounds. *Journal of the Canadian Dental Association*, 52 (7), pp. 599-602.
- BRUNNER, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, pp. 21-33.
- BUNTNER, B., NOWAK, M., KASPEREZYK, U. J., RYBA, M., GRIEB, P., WALSKI, M., et al. (1998). The application of microspheres from the copolymers of lactide and caprolactone to the controlled release of steroids. *Journal of Controlled Release*, 56, pp. 110-116.
- BYRAPPA, K., OHARA, S., & ADSCHIRI, T. (2008). Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology - towards biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp. 299-327.

- CALICETI, P., SALMASO, S., ELVASSORE, N., & BERTUCCO, A. (2004). Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques. *Journal of Controlled Release*, 94, pp. 195–205.
- CANOSA, L. F., CHANG, J. P., & PETER, R. E. (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 151, pp. 1-26.
- CARMO, A. T., & PRADO, R. T. (1999). *Qualidade do Ar Interno*. São Paulo: EPUSP.
- CARRACOSA, C., TORRES-ALEMAN, T., LOPEZ-LOPEZ, C., CARRO, E., ESPEJO, L., TORRADO, S., et al. (2004). Microspheres containing insulin-like growth factor I for treatment of chronic neurodegeneration. *Biomaterials*, 25, pp. 707-714.
- CARRASCO, L. A., PENMAN, D. J., VILLALOBOS, S. A., & BROMAGE, N. (1999). The effects of oral administration with 17 α -methyltestosterone on chromosomal synapsis in *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Mutation Research*, 430, pp. 87-98.
- CARRETIER, E., BADENS, E., GUICHARDON, P., BOUTIN, O., & CHARBIT, G. (2003). Hydrodynamics of Supercritical Antisolvent Precipitation: Characterization and Influence on Particle Morphology. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42, pp. 331–338.
- CASETTARI, L., CASTAGNINO, E., STOLNIK, S., LEWIS, A., HOWDLE, S. M., & ILLUM, L. (2011). Surface Characterisation of Bioadhesive PLGA/Chitosan Microparticles Produced by Supercritical Fluid Technology. *PHARMACEUTICAL RESEARCH*, 28, pp. 1668-1682.
- CAUDELL, T. (1999). *Practical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. CRC Press.

- CHA, Y., & PITT, C. G. (1988). A one week subdermal delivery system for L-metadone based on biodegradable microcapsules. *Journal of Controlled Release*, 7, pp. 69-78.
- CHAKRABORTY, S. B., & BANERJEE, S. (2009). Culture of monosex Nile tilapia under different traditional and non-traditional methods in India. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1 (3), pp. 212-217.
- CHAMPION, J. A., KATARE, Y. K., & MITRAGOTRI, S. (2007). Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release*, 121, pp. 3-9.
- CHATTOPADHYAY, P., HUFF, R., & SHEKUNOV, B. Y. (2006). Drug Encapsulation Using Supercritical Fluid Extraction of Emulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95, pp. 667-679.
- CHEN, A., KANG, Y., PUA, X., YIN, G., LI, Y., & HUB, J. (2009a). Development of Fe₃O₄-poly(l-lactide) magnetic microparticles in supercritical CO₂. *Journal of Colloid and Interface Science*, 330, pp. 317–322.
- CHEN, A., LI, Y., CHAU, F., LAU, T., HUA, J., ZHAO, Z., et al. (2009b). Microencapsulation of puerarin nanoparticles by poly(l-lactide) in a supercritical CO₂ process. *Acta Biomaterialia*, 5, pp. 2913–2919.
- CHEN, A., PU, X., KANG, Y., LIAO, L., YAO, Y., & YIN, G. (2007). Study of poly(L-lactide) microparticles based on supercritical CO₂. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, pp. 2339-2345.
- CHEN, A., ZHAO, Z., WANG, S., LI, Y., ZHAO, C., & LIU, Y. (2011). A continuous RESS process to prepare PLA–PEG–PLA microparticles. *The Journal of Supercritical Fluids*, 59, pp. 92–97.

- CHENG, Q., FENG, J., CHENG, J., ZHU, X., & LI, F. (2008). Brain transport of neurotoxin-I with PLA nanoparticles through intranasal administration in rats: a microdialysis study. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 29 (8), pp. 431-439.
- CHOI, C., CHAE, S. Y., & JAE-WON, N. (2006). Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for efficient drug delivery system. *Polymer*, 47 (13), pp. 4571-4580.
- CIARDELLI, G., CHIONO, V., VOZZI, G., PRACELL, M., AHLUWALIA, A., BARBANI, N., et al. (2005). Blends of poly(ϵ -caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, 6, 1961-1976.
- COCERO, M. J., MARTÍN, Á., MATTEA, F., & VARONA, S. (2009). Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47, pp. 545-555.
- COMIM, S. R., BIANCHIN, E., OLIVEIRA, D., & VLADIMIR, J. (2012). Enzymatic Synthesis of Poly(ϵ -caprolactone) in Supercritical Carbon Dioxide. *10th International Symposium on Supercritical Fluids*. San Francisco.
- COMMANDEUR, S., VAN BEUSEKOM, H. M., & VAN DER GIESSEN, W. J. (2006). Polymers, drug release, and drug-eluting stents. *Journal of Interventional Cardiology*, 19 (6), pp. 500-506.
- COSTA, P. J. (2002). Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38, pp. 141-153.
- COSTA, P., & LOBO, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, pp. 123-133.

- DAMGE, C., MAINCENT, P., & UBRICH, N. (2007). Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetics rats. *Journal of Controlled Release*, 117 (2), pp. 163-170.
- DANHIER, F., LECOUTURIER, N., VROMANA, B., JÉRÔME, C., MARCHAND-BRYNAERT, J., FERON, O., et al. (2009). Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 133 (1), pp. 11-17.
- DASH, S., MURTHY, P. N., NATH, L., & CHOWDHURY, P. (2010). Kinetic Modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67, pp. 217-223.
- DE MARCO, I., & REVERCHON, E. (2011). Influence of pressure, temperature and concentration on the mechanisms of particle precipitation in supercritical antisolvent micronization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 58, pp. 295–302.
- DE ROSA, C., BOCHOT, A., QUAGLIA, F., BESNARD, M., & FATTAL, E. A. (2003). A new delivery system for antisense therapy: PLGA microspheres encapsulating oligonucleotide/polyethyleneimine solid complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 254 (1), pp. 89-93.
- DEBIOPHARM. (2004). *PRESS RELEASES*. Retrieved maio 27, 2010, from DebioPharm Group: <http://www.debiopharm.com/press-releases/triptorelin-trelstar-decapeptyl-pamorelin/debiopharm-s-pamorelin-long-acting-formulated-usi.html>
- DERAKHSHANDEH, K., ERFAN, M., & DADASHZADEH, S. (2007). Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66 (1), pp. 34-41.

- DIAS-KOBERSTEIN, T. C., GABRIEL NETO, A., de STÉFANI, M. V., MALHEIROS, E. B., ZANARDI, M. F., & SANTOS, M. A. (2007). Reversão sexual de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de banhos de imersão em diferentes dosagens hormonais. *Revista Acadêmica*, 5 (4), pp. 391-395.
- DIEGO, Y. P., PELLIKAAN, H. C., WUBBOLTS, F. E., WITKAMP, G. J., & JANSSENS, P. J. (2005). Operating regimes and mechanism of particle formation during the precipitation of polymers using the PCA process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 35, pp. 147–156.
- DOI, Y. (1990). *Microbial Polyesters*. New York: VCH publisher.
- DONALDSON, E. M. (1996). Manipulation of reproduction in farmed fish. *Animal Reproduction Science*, 42, pp. 381-392.
- DONG, Y., LIAO, S., NGIAM, M., CHAN, C. K., & RAMAKRISHNA, S. (2009). Degradation behaviours of electrospun resorbable polyester nanofibers. *Tissue Engineering, Part B*, 15 (3), pp. 335-351.
- DRUMMOND, C. D. (2007). Níveis de 17α -metiltestosterona em diferentes temperaturas na inversão sexual de tilápias. *Tese de Doutorado*. Lavras, Minas Gerais, Brasil.
- DUARTE, A. R., MANO, J. F., & REIS, R. L. (2010). Supercritical phase inversion of starch-poly(ϵ -caprolactone) for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, pp. 533-540.
- DUNCANSON, W. J., FIGA, M. A., HALLOCK, K., ZALIPSKY, S., HAMILTON, J. A., & WONG, J. Y. (2007). Targeted binding of PLA microparticles with lipid-PEG-tethered ligands. *Biomaterials*, 28, 4991–4999.

- DUNNE, M., CORRIGAN, O. I., & RAMTESOLA, Z. (2000). Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 21 (16), pp. 1659-1668.
- ELDRIDGE, J. H., STAAS, J. K., MEULBROEK, J. A., MCGHEE, J. R., TICE, T. R., & GILLEY, R. M. (1991). Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Molecular Immunology*, 28 (3), pp. 287-294.
- ENGELBERG, I., & KOHN, J. (1991). Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. *Biomaterials*, 12, pp. 292-304.
- ERTL, H. C., & XIANG, Z. (1996). Novel vaccine approaches. *The Journal of Immunology*, 156, 3579-3582.
- ESMAEILI, F., GHAREMANI, M. H., OSTAD, S. N., ATYABI, F., SEYEDABADI, M., MALEKSHAHI, M. R., et al. (2008). Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *Journal of Drug Targeting*, 16 (5), pp. 415-423.
- ESTUNIGSIH, S., SMOOKER, P., WIEDOSARI, E., WIDJAJANTI, S., VAIANO, S., PARTOUTOMO, S., et al. (1997). Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccine against tropical fasciolosis in cattle. *International Journal of Parasitology*, 27, 1419-1428.
- FALK, R. F., & RANDOLPH, T. W. (1998). Process Variable Implications for Residual Solvent Removal and Polymer Morphology in the Formation of Gentamycin-Loaded Poly (L-lactide) Microparticles. *PHARMACEUTICAL RESEARCH*, 15, pp. 1233-1237.
- FAO . (2008). *Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service*.

- FONSECA, C., SIMÕES, S., & GASPAR, R. (2002). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*, 83 (2), pp. 273-286.
- FOSTER, T., MOSELEY, M., CAPUTO, J., ALANIZ, G., LEATHERMAN, M., YU, X., et al. (1997). Sustained elevated serum somatotropin concentrations in Holstein steers following subcutaneous delivery of a growth hormone releasing factor analog dispersed in water, oil or microspheres. *Journal of Controlled Release*, 47, pp. 91-99.
- FREIBERG, S., & ZHU, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282, pp. 1-18.
- GALE, W. L., FITZPATRICK, M. S., LUCERO, M., CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M., & SCHRECK, C. B. (1999). Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. *Aquaculture*, 178, pp. 349-357.
- GHADERI, R., ARTURSSON, P., & CARLFORS, J. (2000). A new method for preparing biodegradable microparticles and entrapment of hydrocortisone in DL-PLG microparticles using supercritical fluid. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, pp. 1-9.
- GHADERI, R., ARTURSSON, P., & CARLFORS, J. (1999). Preparation of Biodegradable Microparticles Using Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS). *Pharmaceutical Research*, 16 (5), pp. 676-681.
- GILDING, D. K., & REED, A. M. (1979). Biodegradable polymers for use in surgery - polyglycolic/poly(lactic acid) homo- and copolymers: 1. *Polymer*, 20, pp. 1459-1464.
- GIUNCHEDI, P., ALPAR, H. O., & CONTE, U. (1998). PDLA microspheres containing steroids: spray-drying, o/w and w/o/w emulsifications as preparation methods. *Journal of Microencapsulation*, 15, pp. 185-195.

- GOKHALE, A., KHUSID, B., DAVE, R. N., & PFEFFER, R. (2007). Effect of solvent strength and operating pressure on the formation of submicrometer polymer particles in supercritical microjets. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43, pp. 341–356.
- GÓMEZ-GAETE, C., FATTAL, E., SILVA, L., BESNARD, M., & TSAPIS, N. (2008). Dexamethasone acetate encapsulation into Trojan particles. *Journal of Controlled Release*, 128 (1), pp. 41-49.
- GÓMEZ-GAETE, C., TSAPIS, N., BESNARD, M., BOCHOT, A., & FATTAL, E. (2007). Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 331 (2), pp. 153-159.
- GORRASI, G., VERTUCCIO, L., ANNUNZIATA, L., PELLECCIA, C., & PAPPALARDO, D. (2010). Correlations between microstructural characterization and thermal properties of well defined poly(ϵ -caprolactone) samples by ring opening polymerization with neutral and cationic bis(2,4,6-triisopropylphenyl)tin(IV) compounds. *Reactive and Funcional Polymers*, 70, pp. 151-158.
- GREENWAY, T. E., ELDRIDGE, J. H., LUDWIG, G., STAAS, J. K., SMITH, J. F., GILLEY, R. M., et al. (1995). Enhancement of protective immune response to Venezuelan equine encephalities (VEE) virus with microencapsulated vaccine. *Vaccine*, 13 (15), pp. 1411-1420.
- GRAF, R., MINAMITAKI, Y., PERACCHIA, M. T., TRUBETSKOY, V., TORCHILIN, V., & LARGER, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Sciences*, 263, pp. 1600–1603.
- GROSS, R. A., & KALRA, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 297, pp. 803-807.

- GUPTA, M. C., & DESHMUKH, V. G. (1982). Thermal oxidative degradation of polylactic acid. Part I: Activation energy of thermal degradation in air. *Colloid Polymer Science*, 260, pp. 308-311.
- GUZMAN, M., MOLPECERES, J., GARCIA, F., & ABERTURAS, M. R. (1996). Preparation, characterization and in vitro drug release of poly-epsilon-caprolactone and hydroxylpropyl methylcellulose phthalate ketoprofen loaded microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 13, pp. 25-39.
- HAZRATI, A., LEWIS, D., ATKINS, T., STOHRER, R., McPHILLIPS, C., & LITTLE, J. (1993). Salmonella enteritidis vaccine utilizing biodegradable microspheres., (pp. 101-102). Washington DC.
- HE, W., JIANG, Z., SUO, Q., & LI, G. (2010). Mechanism of dispersing an active component into a polymeric carrier by the SEDS-PA process. *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE*, 45, pp. 467-474.
- HERBERGER, J., MURPHY, K., MUNYAKAZI, L., CORDIA, J., & WESTHAUS, E. (2003). Carbon dioxide extraction of residual solvents in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Journal of Controlled Release*, 90, pp. 181–195.
- HIGUCHI, T. (1963). Mechanism of sustained action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, pp. 1145–1149.
- HONG, H., & LIANG, G. (2007). Concentration dependence of solution crystallization for poly(L-lactide) in p-xylene. *Materials Letters*, 61, 1384–1387.
- HULAK, M., PAROULEK, M., SIMEK, P., KACOUR, M., GELA, D., RODINA, M., et al. (2008). Water polluted by 17 α -methyltestosterone provides successful male sex inversion of common carp (*Cyprinus carpio* L.) from gynogenetic offspring. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, pp. 707-710.

- JENKINS, M. J., HARRISON, K. L., SILVA, M. M., WHITAKER, M. J., SHAKESHEFF, K. M., & HOWDLE, S. M. (2006). Characterisation of microcellular foams produced from semi-crystalline PCL using supercritical carbon dioxide. *European Polymer Journal*, *42*, 3145–3151.
- JIANG, W., GUPTA, R. K., DESHPANDE, M. C., & SCHWENDEMAN, S. P. (2005). Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable of vaccine antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*, pp. 391-410.
- JIN, C., BAI, L., WU, H., TENG, Z., GUO, G., & CHEN, J. (2008). Cellular uptake and radiosensitization of SR-2508 loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, *10* (6), pp. 1045-1052.
- JOOSTEN, P. H., TIEMERSMA, E., THREELS, A., & CAUMARTIN-DHIEUX, C. (1997). Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish and Shellfish Immunology*, *7*, pp. 471-485.
- JORDAN, NAYLOR, A., KELLY, C. A., HOWDLE, S. M., LEWIS, A., & ILLUM, L. (2010). Sustained release hGH microsphere formulation produced by a novel supercritical fluid technology: In vivo studies. *Journal of Controlled Release*, *141*, pp. 153–160.
- JOSHI, P., & MADRAS, G. (2008). Degradation of polycaprolactone in supercritical fluids. *Polymer Degradation and Stability*, *93* (10), pp. 1901-1908.
- KALIVODA, A., FISCHBACH, M., & KLEINEBUDDE, P. (2012). Application of mixtures of polymeric carriers for dissolution enhancement of fenofibrate using hot-melt extrusion. *International Journal of Pharmaceutics*, *429*, pp. 58– 68.
- KANG, Y., WUA, J., YIN, G., HUANG, Z., YAO, Y., LIAO, X., et al. (2008a). Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of indomethacin-loaded

- PLLA/PLGA microparticles using supercritical CO₂ technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, pp. 85–97.
- KANG, Y., YIN, G., OUYANG, P., HUANG, Z., YAO, Y., LIAO, X., et al. (2008b). Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). *Journal of Colloid and Interface Science*, 322, pp. 87–94.
- KAZARIAN, S. G. (2000). Polymer Processing with Supercritical Fluids. *Polymer Science, Ser. C*, 42, 78–101.
- KHUTORYANSKIY, V. V. (2011). Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromolecular bioscience*, 11, pp. 748–764.
- KIM, C. H., CHO, K. Y., CHOI, E. J., & PARK, J. K. (1999). effect of P(ILA-co-eCL) on the compatibility and crystallization behavior of PCL/PLLA blends. *Journal of Applied Polymer Science*, 77, 226-231.
- KIM, M. S., LEE, S., PARK, J. S., WOO, J. S., & HWANG, S. J. (2007). Micronization of cilostazol using supercritical antisolvent (SAS) process: Effect of process parameters. *Powder Technology*, 177, 64–70.
- KIM, S. Y., & LEE, Y. M. (2001). Taxol-load block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(epsilon-caprolactone) as novel anticancer drug carriers. *Biomaterials*, 22 (13), pp. 1697-1704.
- KIRAN, E. (2010). Foaming strategies for bioabsorbable polymers in supercritical fluid mixtures. Part I. Miscibility and foaming of poly(l-lactic acid) in carbon dioxide + acetone binary fluid mixtures. *Journal of Supercritical Fluids*, 54, 296–307.
- KOEGLER, W. S., & GRIFFITH, L. G. (2004). Osteoblast response to PLGA tissue engineering scaffolds with PEO modified surface chemistries and demonstration of patterned cell response. *Biomaterials*, 25, pp. 2819–2830.

- KOMPELLA, U. B., & KOUSHIK, K. (2001). Preparation of drug delivery systems using Supercritical Fluid Technology. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 18 (2), pp. 173-199.
- KONGSOMBUT, B., TSUTSUMI, A., SUANKAEW, N., & CHARINPANITKUL, T. (2009). Encapsulation of SiO₂ and TiO₂ Fine Powders with Poly(dl-lactic-co-glycolic acid) by Rapid Expansion of Supercritical CO₂ Incorporated with Ethanol Cosolvent. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, pp. 11230–11235.
- KORSMEYE, R. W., & PEPPAS, N. A. (1981). Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. *Journal of membrane science*, 9, pp. 211-227.
- KORSMEYER, R. W., LUSTIG, R. S., & PEPPAS, N. A. (1986). Solute and pentrant diffusion in swellable polymers. I. Mathematical modeling. *Journal of Polymer Science. Polymer Physics*, 24, pp. 395–408.
- KOUSHIK, K., & KOMPELLA, U. B. (2004). Preparation of large porous deslorelin-PLGA microparticles with reduced residual solvent and cellular uptake using a supercritical carbon dioxide process. *Pharmaceutical Research*, 21, pp. 524-535.
- KRISHNAMACHARI, Y., GEARY, S. M., LEMKE, C. D., & SALEM, A. K. (2011). Nanoparticle Delivery Systems in Cancer Vaccines. *Pharmaceutical Research*, 28, pp. 215-236.
- KRUKONIS, V. J., McHUGH, M. A., & SECKNER, A. J. (1984). Xenon as a Supercritical Solvent. *The Journal of Physical Chemistry*, 88, pp. 2687-2689.
- KULKARNI, R. K., MOORE, E. G., HEGYELI, A. F., & LEONARD, F. (1971). Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 5 (3), pp. 169 - 181.

- KUMAR, N., RAVIKUMAR, M. N., & DOMB, A. J. (2001). Biodegradable block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, pp. 23-44.
- KUMARI, A., YADAV, S. K., & YADAV, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, pp. 1-18.
- LABET, M., & THIELEMANS, W. (2009). Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews*, 38, pp. 3484-3504.
- LÀGANA, A., FAGO, G., MARINO, A., & SANTARELLI, D. (2001). Liquid chromatography tandem mass spectrometry applied to the analysis of natural and synthetic steroids in environmental waters. *Analytical Letters*, 36 (6), pp. 913-926.
- LAMPRECHT, A., SCHAFER, U., & LEHR, C. M. (2001). Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticles: theory to practice. *Pharmaceutical Research*, 53 (2), pp. 788-793.
- LEE, P. (1986). Initial concentration distribution as a mechanism for regulating drug release from diffusion controlled and surface erosion controlled matrix systems. *Journal of Controlled Release*, 4, pp. 1-7.
- LENZ, R. W., & MARCHESSAULT, R. H. (2005). Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6, pp. 1-8.
- LEWIS, R. J., & SWEET, D. V. (1993). *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*. Cincinnati, OH, USA: US Department Health and Human Services, Public Services, Centers for Disease Control, National Institutes Occupational Safety and Health.
- LI, G., LIU, X., & LIN, H. (2006). Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32, pp. 25-33.

- LI, S. M., GARREAU, H., & VERT, M. (1990). Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 1. Poly(D,L-lactic acid). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1, pp. 123-130.
- LI, S., VERT, M., SCOTT, G., & GILLEAD, D. (1995). *Degradable polymers - Principles and applications*. London: Chapman and Hall.
- LIANG, S., & TILOTTA, D. C. (1998). Extraction of Petroleum Hydrocarbons from Soil Using Supercritical Argon. *Analytical Chemistry*, 70, pp. 616-622.
- LIAO, X., NAWABY, A. V., & WHITFIELD, P. S. (2010). Carbon dioxide-induced crystallization in poly(L-lactic acid) and its effect on foam morphologies. *Polymer International*, 59, 1709–1718.
- LIMA, A. C., SHER, P., & MANO, J. F. (2012). Production methodologies of polymeric and hydrogel particles for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9, pp. 231-248.
- LIN, S. P., & REITZ, R. D. (1998). Drop and spray formation from a liquid jet. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 30, pp. 85-105.
- LINCE, F., MARCHISIO, D. L., & BARRESI, A. A. (2008). Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 322, pp. 505-515.
- LIU, L. S., WON, Y. J., COOKE, P. H., COFFIN, D. R., FISHMAN, M. L., HICKS, K. B., et al. (2004). Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications. *Biomaterials*, 25, pp. 3201–3210.
- LU, Y., & CHEN, S. C. (2004). Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, pp. 1621-1633.

- MAGALHÃES, A. S., & FEITOSA, J. P. (1999). Degradação Ultra-Sônica da Borracha Natural de Seringueira (*Hevea Brasiliensis*) em Solução Toluêmica: Estudo por GPC. *Polímeros*, 9, pp. 65-70.
- MAINARDES, M. R., GREMIAO, M. P., BRUNETTI, I. L., DA FONSECA, L. M., & KHALIL, M. N. (2009). Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (1), pp. 257-267.
- MAINARDES-PINTO, C. S., FENERICH-VERANI, N., CAMPOS, B. E., & SILVA, A. L. (2000). Masculinização da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 α -metiltestosterona. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29 (3), pp. 654-659.
- MARTÍN, A., & COCERO, M. J. (2008). *Micronization process with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms*, 60, pp. 339-350.
- MARTÍN, A., & COCERO, M. J. (2004). Numerical modeling of jet hydrodynamics, mass transfer, and crystallization kinetics in the supercritical antisolvent (SAS) process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 32, pp. 203–219.
- MARTIN, T. M., BANDI, N., SHULZ, R., ROBERTS, C. B., & KOMPELLA, U. B. (2002). Preparation of Budesonide and Budesonide-PLA microparticles using supercritical fluid precipitation technology. *AAPS PharmSciTech*, 3, pp. 1-11.
- MARTÍNEZ-SANCHO, R., & HERRERO-VANRELL, S. (2004). Optimisation of aciclovir poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study. *International Journal of Pharmaceutics*, 273, pp. 45–56.
- MATSUMOTO, J., NAKADA, Y., SAKURAI, K., NAKAMURA, T., & TAKAHASHI, Y. (1999). Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)–poly(ethylene

glycol)–poly(L-lactide) and their evaluation in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 185 (1), pp. 93-101.

MATSUYAMA, K., DONGHUIB, Z., URABEA, T., & MISHIMA, K. (2005). Formation of l-poly(lactic acid) microspheres by rapid expansion of CO₂ saturated polymer suspensions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 33, pp. 275–281.

MAYO, A. S., & KOMPELLA, U. B. (2007). Supercritical Fluid Technology in Pharmaceutical Research. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (pp. 3568-3581). USA: Informa Healthcare USA, Inc.

MAYO, A. S., AMBATIC, B. K., & KOMPELLA, U. B. (2010). Gene delivery nanoparticles fabricated by supercritical fluid extraction of emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 387, pp. 278–285.

McHUGH, M. A., & KRUKONIS, V. J. (1994). *Supercritical Fluid Extraction* (2^a Edição ed.). Elsevier.

MEN, Y., THOMASIN, C., MERKLE, H., GANDER, B., & CORRANDIN, A. (1995). A single administration of tetanus toxoid biodegradable microspheres elicit T cells and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminium hydroxide. *Vaccine*, 13, 68-89.

MENDAK, S. H., JENSIK, R. J., HAKLIN, M. F., & ROSEMAN, D. L. (1984). The evaluation of various bioabsorbable materials on titanium fiber metal tracheal prosthesis. *The Annals of Thoracic Surgery*, 38, pp. 488-493.

MEYER, J. D., FALK, R. F., KELLY, R. M., SHIVELY, J. E., WITHROW, S. J., DERNELL, W. S., et al. (1998). Preparation and in Vitro Characterization of Gentamycin-Impregnated Biodegradable Beads Suitable for Treatment of Osteomyelitis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, pp. 1149-1154.

- MEZIANI, M. J., PATHAK, P., DESAI, T., & SUN, Y. (2006). Supercritical Fluid Processing of Nanoscale Particles from Biodegradable and Biocompatible Polymers. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, pp. 3420-3424.
- MIGLIARESI, C. D., COHN, D., DE LOLLIS, A., & FAMBRI, L. (1991). Dynamic mechanical and calorimetric analysis of compression molded PLLA of different molecular weights: effect of the thermal treatments. *Journal of Applied Polymer Science*, 43, 83-95.
- MIGUEL, F., MARTIN, A., MATTEA, F., & COCERO, M. J. (2008). Precipitation of lutein and co-precipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47, pp. 1594–1602.
- MIHAI, M., HUNEALT, M. A., & FAVIS, B. D. (2009). Crystallinity development in cellular poly(lactic acid) in the presence of supercritical carbon dioxide. *Journal of applied polymer science*, 113, 2920–2932.
- MISHIMA, K. (2008). Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp. 411-432.
- MIYAZAKI, A. T., WATARU, K., BACHYNSKY, J., & LOBENBERG, R. (2003). Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: in vitro release and in vivo skin penetration. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 6 (2).
- MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C., & MURRAY, J. C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmaceutical Reviews*, 53 (2), pp. 283-318.
- MORA-HUERTAS, C. E., FESSI, H., & ELAISSARI, A. (2011). Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement

and emulsification–diffusion methods Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science*, 163, 90–122.

MORIBE, K., TOZUKA, Y., & YAMAMOTO, K. (2008). Supercritical carbon dioxide processing of active pharmaceutical ingredients for polymorphic control and for complex formation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp. 328-338.

MU, L., & FENG, S. S. (2003). A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release*, 86 (1), pp. 33-48.

MU, L., & FENG, S. S. (2001). Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol®) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. *Journal of Controlled Release*, 76, pp. 239–254.

MULLER, R. H. (1991). Charge determinations. In R. H. MULLER, *Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting Modification. Characterization and In Vivo* (pp. 57-97). Boca Raton: CRC Press.

MUNDARGI, R. C., BABU, V. R., RANGASWAMY, V., PATEL, P., & AMINABHAVI, T. M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125, pp. 193-209.

MUSUMECI, T., VENTURA, C. A., GIANNONE, I., RUOZI, B., MONTENEGRO, L., PIGNATELLO, R., et al. (2006). PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 325, pp. 172–179.

NAKAMURA, M., KOBAYASHI, T., CHANG, X., & NAGAHAMA, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *The Journal of Experimental Zoology*, 281, pp. 362-372.

- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. (1983). *Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes*. Washington: National Academy Press.
- NAYLOR, R. L., GOLDBURG, R. J., PRIMAVERA, J. H., KAUTSKY, N., BEVERIDGE, M. C., CLAY, J., et al. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405, pp. 1017-1024.
- NEUMANN, E., DIAS-KOBERSTEIN, T. C., & BRAGA, F. M. (2009). Desempenho de três linhagens de tilápia submetidas ao tratamento com 17 α -metiltestosterona em condições ambientais não controladas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38 (6), pp. 973-979.
- OBRZUT, D. L., BELL, P. W., ROBERTS, C. B., & DUKE, S. R. (2007). Effect of process conditions on the spray characteristics of a PLA + methylene chloride solution in the supercritical antisolvent precipitation process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 42, pp. 299–309.
- O'HAGAN, D. T., SINGH, M., & GUPTA, R. K. (1998). Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32, pp. 225-246.
- OUYANG, P., KANG, Y., YIN, G., HUANG, Z., YAO, Y., & LIAO, X. (2009). Fabrication of hydrophilic paclitaxel-loaded PLA-PEG-PLA microparticles via SEDS process. *FRONTIERS OF MATERIALS SCIENCE IN CHINA*, 3, pp. 15-24.
- PALAKODATY, S., & YORK, P. (1999). Phase behavioral effects on particle formation processes using supercritical fluids. *Pharmaceutical Research*, 16 (7), pp. 976-985.
- PAN, P., & INOUE, Y. (2009). Polymorphism and isomorphism in biodegradable polyesters. *Progress in Polymer Science*, 34, pp. 605-640.

- PANDIAN, T. J., & SHEELA, S. G. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 138, pp. 1-22.
- PANYAM, J., & LABHASETWAR, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, pp. 329-347.
- PARVEEN, S., MISRA, R., & SAHOO, S. K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8, pp. 147–166.
- PASQUALI, I., BETTINI, R., & GIORDANO, F. (2006). Soli-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, pp. 299-310.
- PASQUALI, I., BETTINI, R., & GIORDANO, F. (2008). Supercritical fluid technologies: An innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp. 399-410.
- PATIL, S. D. (2004). Dexamethasone-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres/poly(vinyl alcohol) hydrogel composite coatings for inflammation control. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 6, pp. 887–897.
- PATIL, V. R., CAMPBELL, C. J., YUN, Y. H., SLACK, S. M., & GOETZ, D. J. (2001). Particle diameter influences adhesion under flow. *Biophysical Journal*, 80 (4), pp. 1733-1743.
- PATOMCHAIWIWAT, V., PAERATAKUL, O., & KULVANICH, P. (2008). Formation of Inhalable Rifampicin–Poly(l -lactide) Microparticles by Supercritical Anti-solvent Process. *AAPS PHARMSCITECH*, 9, pp. 1119-1129.

- PAZ, E., MARTÍN, A., DUARTE, C. M., & COCERO, M. J. (2012). Formulation of β -carotene with poly-(ϵ -caprolactones) by PGSS process. *Powder Technology*, 217, pp. 77–83.
- PHILLIPS, E. M., & STELLA, V. J. (1993). Rapid expansion from supercritical solutions: application to pharmaceutical processes. *International Journal of Pharmaceutics*, 94, pp. 1-10.
- POLAKOVIC, M., GORNER, T., GREF, R., & DELLACHERIE, E. (1999). Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modelling of drug release. *Journal of Controlled Release*, 60, pp. 169–177.
- PORTA, G. D., FALCO, N., & REVERCHON, E. (2011). Continuous supercritical emulsions extraction: A new technology for biopolymer microparticles production. *Biotechnology and Bioengineering*, 108, pp. 676–686.
- PRABU, P., DHARMARAL, A. A., KHIL, M. S., PARK, S. Y., & KIM, H. Y. (2009). Preparation, characterization, in-vitro drug release and cellular uptake of poly(caprolactone) grafted dextran copolymeric nanoparticles loaded anticancer drug. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 90 (4), pp. 1128-1136.
- PURAC. (2008, November 26). *PURAC BIOMATERIALS*. Retrieved March 25, 2010, from PURAC Biomaterials; resorbable polymers for medical devices and drug delivery: <http://www.puracbiomaterials.com/>
- PURNAMA, P., & KIM, S. H. (2010). Stereocomplex formation of high-molecular-weight polylactide using supercritical fluid. *Macromolecules*, 43, 1137–1142.
- RANTAKYLA, M., JANTTI, M., AALTONEN, O., & HURME, M. (2002). The effect of initial drop size on particle size in the supercritical antisolvent precipitation (SAS) technique. *The Journal of Supercritical Fluids*, 24, pp. 251–263.

- RAYNOR, M. W., SHILLSTONE, G. F., BARTLE, K. D., CLIFFORD, A. A., CLEARY, M., & COOK, B. W. (1989). Use of xenon as a mobile phase for on-line capillary supercritical fluid chromatography-fourier transform infrared spectrometry. *Journal of High Resolution Chromatography*, *12*, pp. 300–302.
- REVERCHON, E. (1999). Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nanoparticles. *Journal of Supercritical Fluids*, *15*, 1–21.
- REVERCHON, E., & DE MARCO, I. (2011). Mechanisms controlling supercritical antisolvent precipitate morphology. *Chemical Engineering Journal*, *169*, pp. 358–370.
- REVERCHON, E., ADAMI, R., CAPUTO, G., & DE MARCO, I. (2008). Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: Interpretation of results. *The Journal of Supercritical Fluids*, *47*, pp. 70-84.
- RODRIGUES, A. P., HIRSCH, D., FIGUEIREDO, H. C., LOGATO, P. V., & MORAES, A. M. (2006). Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. *Process Biochemistry*, *41*, p. 638643.
- RON, B., SHIMODA, S. K., IWAMA, G. K., & GRAU, E. G. (1995). Relationships among ratio, salinity, 17 α -methyltestosterone and growth in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, *135*, pp. 185-193.
- ROSSMANN, M., BRAEUER, A., DOWY, S., GALLINGER, T. G., LEIPERTZ, A., & SCHLUECKER, E. (2012). Solute solubility as criterion for the appearance of amorphous particle precipitation or crystallization in the supercritical antisolvent (SAS) process. *The Journal of Supercritical Fluids*, *66*, pp. 350–358.
- ROY, C., VEGA-GONZALEZ, A., & SUBRA-PATERNAULT, P. (2007). Theophylline formulation by supercritical antisolvents. *International Journal of Pharmaceutics*, *343*, pp. 79–89.

- RUDOLF, R. M., BOERING, G., ROSEMAN, F., & LEENSLAY, J. (1987). Resorbable poly(L-lactide) plates and screws for fixation of zygomatic fracture. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45, pp. 751-753.
- SACCHETIN, P. S., MORAES, A. M., LEAL, C. A., & FIGUEIREDO, H. C. (2010). Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. *Química Nova*, 33 (2), pp. 263-268.
- SAHANA, D. K., MITTAL, G., BHARDWAJ, V., & KUMAR, M. N. (2007). PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: Influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior In Vitro and In Vivo using estradiol as a model drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (4), pp. 1530 - 1542.
- SANE, A., & LIMTRAKUL, J. (2009). Formation of retinyl palmitate-loaded poly(l-lactide) nanoparticles using rapid expansion of supercritical solutions into liquid solvents (RESOLV). *The Journal of Supercritical Fluids*, 51, pp. 230–237.
- SANE, A., & THIES, M. C. (2007). Effect of material properties and processing conditions on RESS of poly(l-lactide). *The Journal of Supercritical Fluids*, 40, pp. 134–143.
- SARKARI, M., DARRAT, I., & KNUTSON, B. L. (2000). Generation of microparticles using CO₂ and CO₂-philic antisolvents. *AIChE Journal*, 46, pp. 1850–1859.
- SCHARDEIN, J. L., & MACINA, O. T. (2006). Methyltestosterone. In *Human Developmental Toxicants: Aspects of Toxicology and Chemistry* (pp. 213–216).
- SHAH, L. K., & AMIJI, M. M. (2006). Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS. *Pharmaceutical Research*, 23 (11), pp. 2638-2645.

- SHENG, Y., YUAN, Y., LIU, C., TAO, X., SHAN, X., & XU, F. (2009). In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 20 (9), pp. 1881-1891.
- SHENOY, D. B., & AMIJI, M. M. (2005). Poly(ethylene oxide) -modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 293 (1-2), pp. 261-270.
- SHI, F., GROSS, R. A., & RUTHERFORD, D. R. (1996). Microbial Polyester Synthesis: Effects of Poly(ethylene glycol) on Product Composition, Repeat Unit Sequence, and End Group Structure. *Macromolecules*, 29, pp. 10-17.
- SIEPMANN, J., & SIEPMANN, F. (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, pp. 328–343.
- SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., & VEIGA, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39, pp. 1-20.
- SIMÕES, C. L., VIANA, J. C., & CUNHA, A. M. (2009). Mechanical properties of poly(caprolactone) and poly(lactic acid) blends. *Journal of Applied Polymer Science*, 112, 345-352.
- SINHA, V. R., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., & TREHAN, A. (2004). Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278, pp. 1-23.
- SMITH, R. D. (1986). *Patente N° 4582731*. United States of America.
- SÖDERGÅRD, A., & STOLT, M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, 27, pp. 1123-1163.

- SOLÓRZANO, G. I. (2004). Supercritical fluid technology: computational and experimental equilibrium studies and design of supercritical extraction processes. *Tese de doutorado*, 295 p. University of Notre Dame.
- SONAJE, K., ITALIA, J. L., SHARMA, G., BHARDWAJ, V., TIKOO, K., & KUMAR, M. N. (2007). Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmaceutical Research*, 24 (5), pp. 899-908.
- SONG, K. H., LEE, C. H., LIM, J. S., & LEE, Y. W. (2002). Preparation of L-PLA Submicron Particles by a Continuous Supercritical Antisolvent Precipitation Process. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 19, 139-145.
- STONIK, S., ILUM, L., & DAVIS, S. S. (1995). Long circulating microparticulate drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, pp. 195-214.
- TAKADA, M., HASEGAWA, S., & OHSHIMA, M. (2004). Crystallization Kinetics of Poly(L-lactide) in Contact With Pressurized CO₂. *Polymer engineering and science*, 44, 186-196.
- TAKI, S., BADENS, E., & CHARBIT, G. (2001). Controlled release system formed by supercritical anti-solvent coprecipitation of a herbicide and a biodegradable polymer. *The Journal of Supercritical Fluids*, 21, pp. 61–70.
- TANDYA, A., MAMMUCARI, R., DEHGHANI, F., & FOSTER, N. R. (2007). Dense gas processing of polymeric controlled release formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 328, pp. 1-11.
- TANG, G. Z., RHODES, N. P., & HUNT, J. A. (2007). Control of the domain microstructures of PLGA and PCL binary systems: Importance of Morphology in Controlled Drug Release. *Trans IChemE, Parte A, Chemical Engineering Research and Design*, 85, pp. 1044–1050.

- TEIXEIRA, M., ALONSO, M. J., PINTO, M. M., & BARBOSA, C. M. (2005). Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59 (3), pp. 491-500.
- THAKKAR, F. M., SONI, T. G., GOHEL, M. C., & GANDHI, T. R. (2009). Supercritical fluid technology: A promising approach to enhance the drug solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, pp. 1-14.
- TOKIWA, Y., & JARERAT, A. (2004). Biodegradation of poly(L-lactide). *Biotechnology Letters*, 26, pp. 771-777.
- TSUJI, H. (2005). Poly(lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation, and applications. *Macromolecular Bioscience*, 5, pp. 569-597.
- TU, L. S., DEHGHANI, F., & FOSTER, N. R. (2002). Micronisation and microencapsulation of pharmaceuticals using a carbon dioxide antisolvent. *Powder Technology*, 126, pp. 134–149.
- UEDA, H., & TABATA, Y. (2003). Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, pp. 501-518.
- UL-HAQ, M. I., ACOSTA-RAMÍREZ, A., MEHRKHODAVANDI, P., & SIGNORELL, R. (2010). Influence of polydispersity of poly(lactic acid) on particle formation by rapid expansion of supercritical CO₂ solutions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51, pp. 376–383.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. (2007a). 467 - Residual Solvents - Chemical Tests. In *USP30*.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. (2007b). Chromatography 612. In *USP30*.

- UNITED STATES PHARMACOPEIA. (2007c). Reference standards 11. In *USP 30*.
- VAJDY, M., & O'HAGAN, D. T. (2001). Microparticles for intranasal immunization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 51, pp. 127-141.
- VAUTHIER, C., & BOUCHEMAL, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26 (5), pp. 1025-1058.
- VAY, K., FRIEß, W., & SCHELER, S. (2012). A detailed view of microparticle formation by in-process monitoring of the glass transition temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81, pp. 399–408.
- VEGA-GONZALEZ, A., DOMINGO, C., ELVIRA, C., & SUBRA, P. (2004). Precipitation of PMMA/PCL blends using supercritical carbon dioxide. *Journal of Applied Polymer Science*, 91, pp. 2422–2426.
- VEGA-GONZÁLEZ, A., SUBRA-PATERNAULT, P., LÓPEZ-PERIAGO, A. M., GARCÍA-GONZÁLEZ, C. A., & DOMINGO, C. (2008). Supercritical CO₂ antisolvent precipitation of polymer networks of l-PLA, PMMA and PMMA/PCL blends for biomedical applications. *European Polymer Journal*, 44, pp. 1081–1094.
- VEMAVARAPU, C., MOLLAN, M. J., LODAYA, M., & NEEDHAM, T. E. (2005). Design and process aspects of laboratory scale SCF particle formation systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 292, pp. 1-16.
- VERRECK, G., DECORTE, A., HEYMANS, K., ADRIAENSEN, J., CLEEREN, D., JACOBS, A., et al. (2005). The effect of pressurized carbon dioxide as a temporary plasticizer and foaming agent on the hot stage extrusion process and extrudate properties of solid dispersions of itraconazole with PVP-VA 64. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, 349–358.

- VERT, M., LI, S., & GARREAU, H. (1991). More about the degradation of LA/GA-derived matrices in aqueous media. *Journal of Controlled Release*, *16*, pp. 15-26.
- VILA, A., GILL, H., McCALLION, O., & ALONSO, M. J. (2004). Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *Journal of Controlled Release*, *98*, 231–244.
- WAN, Y., XIAO, B., DALAI, S., CAO, X., & WU, Q. (2009). Development of polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *20*, pp. 719-724.
- WANG, Y., PFEFFER, R., DAVE, R., & ENICK, R. (2005). Polymer Encapsulation of Fine Particles by a Supercritical Antisolvent Process. *AIChE Journal*, *51*, pp. 440-455.
- WANG, Y., WANG, Y., YANG, J., PFEFFER, R., DAVE, R., & MICHNIAK, B. (2006). The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. *Powder Technology*, *164*, pp. 94–102.
- WASSERMANN, G. J., & AFONSO, L. O. (2003). Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) by androgen immersion. *Aquaculture Research*, *34*, pp. 65-71.
- WEB OF KNOWLEDGE. (2012). *Web of Knowledge*. Obtido em 27 de agosto de 2012, a partir de www.webofknowledge.com
- WEI, X., GONG, C., GOU, M., FU, S., GUO, Q., SHI, S., et al. (2009). Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, *381*, pp. 1-18.
- WEIDNER, E., STEINER, R., & KNEZ, Z. (1996). Power generation from polyethyleneglycol with compressible fluids. In *High Pressure Chemical Engineering* (pp. 223-228). Amsterdam: Elsevier.

- WILLIAMS, D. F. (1981). Enzymic hydrolysis of polylactic acid. *Engineering in Medicine*, 10 (1), pp. 5-7.
- WINZENBURG, G., SCHMIDT, C., FUCHS, S., & KISSEL, T. (2004). Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, pp. 1453-1466.
- WISCHKE, C., & SCHWENDEMAN, S. P. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, pp. 298-327.
- WURTS, W. A., & DURBOROW, R. M. (1992). Interactions of pH, Carbon Dioxide, Alkalinity and Hardness in Fish Ponds. *SRAC Publication*, 464, 1-4.
- XING, J., ZHANG, D., & TAN, T. (2007). Studies on the oridonin-loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40 (2), pp. 153-158.
- YANG, J. M., CHEN, H. L., YOU, J. W., & HWANG, J. C. (1997). Miscibility and Crystallization of Poly(L-lactide)/Poly(ethylene glycol) and Poly(L-lactide)/Poly(ϵ -caprolactone) Blends. *Polymer journal*, 29, 657-662.
- YASUJI, T., TAKEUCHI, H., & KAWASHIMA, Y. (2008). Particle design of poorly water-soluble drug substances using supercritical fluid technologies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp. 388-398.
- YEO, S. D., & KIRAN, E. (2005). Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *The Journal of Supercritical Fluids*, 34, pp. 287-308.
- YESIL-CELIKTAS, O., & CETIN-UYANIKGIL, E. O. (2012). In vitro release kinetics of polycaprolactone encapsulated plant extract fabricated by supercritical antisolvent

process and solvent evaporation method. *The Journal of Supercritical Fluids*, 62, pp. 219–225.

YIN, Y., CHEN, D., QIAO, M., WEI, X., & HU, H. (2007). Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. *Journal of Controlled Release*, 123 (1), pp. 27-38.

YORK, P., HANNA, M., SHEKUNOV, B. Y., & HUMPHREYS, G. O. (1998). Microfine particle formation by SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids): scale up by design. *Respiratory Drug Delivery*, VI, pp. 169-175.

ZAMBAUX, M. F., BONNEAUX, F., GREF, R., DELLACHERIE, E., & VIGNERON, C. (1999). Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 60 (2-3), pp. 179-188.

ZHAI, W., KO, Y., ZHU, W., WONG, A., & PARK, C. B. (2009). A Study of the Crystallization, Melting, and Foaming Behaviors of Polylactic Acid in Compressed CO₂. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 5381-5397.

ZHANG, Y., LIAO, X., YIN, G., YUAN, P., HUANG, Z., GU, J., et al. (2012). Preparation of water soluble drugs-loaded microparticles using modified solution enhanced dispersion by supercritical CO₂. *Powder Technology*, 221, pp. 343–350.

ZHENG, C. H. (2004). A protein delivery system: biodegradable alginate–chitosanpoly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323, pp. 1321–1327.

ZHENG, D., LI, D., LU, X., & FENG, Z. (2010). Enhanced antitumor efficiency of docetaxel-loaded nanoparticles in a human ovarian xenograft model with lower systemic toxicities by intratumoral delivery. *Oncology reports*, 23, pp. 717-724.

ZHOU, H., GREEN, T. B., & JOO, Y. L. (2006). The thermal effects on electrospinning of polylactic acid melts. *Polymer*, 47, 7497-7505.

ZOSEL, K. (1971). *Patent No. 2.079.261*. França.