



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Físico-Química

PRISCYLA DANIELY MARCATO GASPARI

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO E
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO
ESTREPTOMICINA**

Orientador: PROF. DR. NELSON E. DURÁN CABALLERO

**CAMPINAS
2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Gaspari, Priscyla Daniely Marcato.
G213p Preparação e caracterização de micro e
nanopartículas poliméricas contendo estreptomicina /
Priscyla Daniely Marcato Gaspari. -- Campinas, SP:
[s.n], 2006.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Dissertação – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Polímeros biodegradáveis. 2. Micropartículas.
3. Estreptomicina. 4. Tuberculose. I. Durán Caballero,
Nelson Eduardo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Preparation and characterization of the micro and nanoparticles with streptomycin

Palavras-chaves em inglês: Biodegradable polymers, Microparticles, Streptomycin, Tuberculosis

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na Área de Físico-Química

Banca examinadora: Nelson Eduardo Durán Caballero (Orientador), Ljubica Tasic, Maria Inés Ré

Data de defesa: 03/03/2006

Dedicatória

A conclusão desta dissertação de Mestrado foi uma grande vitória para mim, a qual dedico as pessoas mais importantes na minha vida:

A **Deus**, em quem deposito toda a minha confiança. Obrigada por me presentear com uma família maravilhosa a qual amo muito.

“Não temas, que eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te esforço, e te ajudo e te sustento com a destra da minha justiça.” Isaías 41:10

Aos meus pais **Nelcio** e **Yolanda**, os quais sempre me apoiaram e incentivaram nas realizações dos meus projetos. Agradeço por todo carinho e amor que sempre me dedicaram e, principalmente, por acreditarem em mim. Obrigada por me ensinarem a sempre ser correta e nunca desistir, a enfrentar desafios e acreditar nos meus sonhos.

“Entrega o teu caminho ao Senhor confia nele, e ele tudo fará” Salmos 37:5.

As minhas irmãs **Alessandra** e **Andréia** e ao meu cunhado **Flávio**, por todo apoio e amizade. Agradeço por sempre torcerem por mim e pelos bons conselhos que sempre me deram.

Ao meu grande **Amor Alexandre**, por sempre me apoiar e acreditar em mim. Agradeço por toda paciência nos momentos difíceis, por me fazer rir mesmo quando estava chorando e por sempre me apoiar nos meus sonhos. Obrigada por tornar a minha vida mais bela.

“Põe-me como selo sobre o teu coração, como selo sobre o teu braço, porque o amor é forte como a morte, e duro como a sepultura o ciúmes; as suas brasas são brasas de fogo, labareda do Senhor.

As muitas águas não poderiam apagar esse amor nem os rios afogá-lo; ainda que alguém desse toda a fazenda de sua casa por este amor, certamente a desprezariam” Cantares de Salomão 8:6-7

AGRADECIMENTOS

Para o desenvolvimento desta dissertação, a participação e o apoio de muitas pessoas foram fundamentais. Por isto gostaria de agradecer:

Ao Prof. **Nelson Duran**, por me apoiar e me ensinar o que é ser uma pesquisadora. Obrigada por acreditar em mim e por me proporcionar muitas oportunidades que contribuíram para a minha vida profissional.

Aos amigos do laboratório, **Ana Paula, Chico, Camila, Edna, Márcia, Marcelo, Natália, Priscila, Sandra e Zaine** pela amizade, apoio e incentivo. Obrigada, pelas contribuições de cada um tanto para a minha dissertação quanto para a minha vida. Muitas pessoas passam pela nossa vida, mas só algumas fazem diferença, deixando uma marca. Vocês são estas pessoas.

À **Lívia**, pelos ensaios de atividade antimicrobiana, pela amizade e pelos bons conselhos que sempre me deu. Obrigada pelas palavras amigas nos momentos difíceis e alegres.

À **Patrícia e Maruska**, pela grande amizade que nasceu entre nós, pelas longas e valiosas conversas que sempre tivemos, pelas risadas e choros que juntas passamos por estes dois anos. Agradeço por todo apoio e incentivo que sempre me deram. Vocês são amigas muito valiosas para mim.

Aos meus alunos **Carolina e Wellington**, pelas valiosas contribuições para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e pelos momentos alegres. Vocês foram muito importantes para mim durante este trabalho.

À **Patrícia, Maristela, Neto e Daniel**, por todo apoio nos testes biológicos, pela amizade e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Profa Maria Inês Ré e seus alunos Natália e Pierre**, do Instituto de Pesquisa e Tecnologia da Universidade Estadual de São Paulo, pelas análises de Potencial Zeta e Tamanho de Partículas. Agradeço o grande apoio de vocês na realização destas análises e pelo carinho com que sempre me acolherem.

À **Profa. Astréa e Prof. Fernando**, da Universidade de Mogi das Cruzes, pela realização das análises de Eletroforese Capilar. O apoio de vocês foi fundamental para a realização desta dissertação.

Às **Profas. Silvia e Adriana**, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me acolherem em seus laboratórios me possibilitando a aumentar os meus conhecimentos e a realização de experimentos.

À **Todas as Alunas do laboratório das Profas. Silvia e Adriana**, por todo apoio, paciência e ensinamento que todas me dedicaram. Além de aprender muitas coisas com vocês, ganhei novas amigas que nunca mais esquecerei.

Aos funcionários **Cláudia e Daniel**, pela paciência e ajuda na realização de muitas análises. O apoio e a amizade de vocês contribuíram muito.

A todos os **funcionários**, que sempre me atenderam com muito respeito e me ajudaram no decorrer deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

PRISCYLA DANIELY MARCATO GASPARI

e-mail: pmarcato@gmail.com

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP)

- Bacharelado e Licenciatura em Química.
Conclusão: Dez/2003

2. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

2.1. Resumos de trabalhos apresentados em congressos

1. Marcato, P.D.; Candido, C.B.; Melo, P.S.; Haun, M.; Durán, N. (2005). "Polymeric microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) in the streptomycin encapsulation". International Macromolecular Colloquium, 10-13 de Abril, Gramado – Brasil. **Apresentação oral.**
2. Durán, N.; Lemes, A.P.; Marcato, P.M.; Soto-Oviedo, M.A.; Alvarenga, M.A.; Buffo, C.; Mei, L.H.I.; Melo, P.S. (2005). "Preparation and characterization of composite scaffolds and of controlled drugs release devices based on PHBV". 8º Congresso Brasileiro de Polímeros – Abpol, 6 a 10 de novembro, Águas de Lindóia – Brasil. **Apresentação oral.**
3. Mansilla, H.D.; Pincheira, C.; Mora, A.; Freer, J.; Durán, N.; Marcato, P.M.; Fernández, J. (2005). "Destruction of flumequine on TiO₂ coated on sintered glass". The 10th International Conference on TiO₂ Photocatalysis: Fundamentals & Applications, 23-27 de outubro, Chicago – EUA. **Proceeding e Painel.**
4. Marcato, P.D.; De Souza, G.I.; Espósito, E.; Durán, N. (2005). "Biosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum* strain, its antibacterial activity and its effluents treatment". IV Encontro da Rede de Nanobiotecnologia CNPq/MCT, 30-01 de outubro, Campinas - Brasil. **Apresentação Oral.**
5. Candido, C.B.; Marcato, P.D., Durán, N. (2005). "Preparation and characterization of polymeric microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) in the streptomycin encapsulation". IV Encontro da Rede de Nanobiotecnologia CNPq/MCT, 30-01 de outubro, Campinas - Brasil. **Apresentação Oral.**
6. Cordi, L.; Marcato, P.D.; Mansilla, H.; Durán, N. (2005). "Catalytic Ozonation: Characterization and Application of Immobilized TiO₂ Nanoparticles on Methylene Blue Decolorization". IV Encontro da Rede de Nanobiotecnologia CNPq/MCT, 30-01 de outubro, Campinas - Brasil. **Apresentação Oral.**

7. Marcato, P.D.; Candido, C.B.; Melo, P.S.; Haun, M.; Durán, N. (2005) "Investigation of the cytotoxicity of streptomycin free and encapsulated in poly(hydroxybutirate-co-valerate) microparticles in V79 cells". III Encontro da Rede de Nanobiotecnologia CNPq/MCT, 8-11 de março, São Pedro - Brasil. **Proceeding e Painei.**
8. Marcato, P.D., Durán, N. (2004). "Polymeric microparticles of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) in the antimicrobial drug encapsulation". XXXIII Reunião Anual da SBBq, 15 a 18 de maio, Caxambu – Brasil. **Painei.**
9. Durán,N.; De Oliveira, F.M.; Marcato, P.D.; Alves, O.L.Esposito, E. (2004). "Biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains". XXXIII Reunião Anual da SBBq, 15 a 18 de maio, Caxambu – Brasil. **Painei.**

2.2 Publicação

2.2.A. Artigo Publicado

- Durán, N.; Marcato, P.D.; Alves, O.L.; De Souza, G.I.H.; Esposito, E. (2005). "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains". Journal of Nanobiotechnology 3:8 DOI:10.1186/1477-3155-3-8.

2.2.B. Artigo no Prelo

- Durán, N.; Marcato, P.D.; Buffo, C.M. S.; De Azevedo, M.M.M.; Espósito, E. (2006). "Poly(ϵ -caprolactone) propolis extract microencapsulation and its antibacterial activity evaluated". Pharmazie.

2.2.C. Artigo Submetido

- Durán, N.; Marcato, P.D.; De Souza, G.I.H.; Alves, O.L.; Esposito, E. (2006). "Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textiles fabrics and their effluent treatment". Journal of Biomedical Nanotechnology.

2.2.D. Patente

- Durán, N., Marcato, P.D., De Souza, G.I.H., Alves, O.L. e Espósito, E. (2005). "Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de tecidos estéreis e o tratamento dos efluentes produzidos" PIBr.

3. Cursos Científicos

- II Encontro de Usuários de SPM - Treinamento em Microscopia de Força Atômica - Carga horária: 16 horas
Período: 04-05 de outubro de 2005 - Maceió-AL.

RESUMO

O projeto consistiu na preparação e caracterização de sistemas de liberação sustentada veiculando a estreptomicina, um agente antimicrobiano. A estreptomicina (STM) foi encapsulada em micropartículas poliméricas preparadas a partir do polímero biodegradável poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e do copolímero biodegradável poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV), pela técnica de emulsificação seguida da evaporação do solvente. Estas partículas foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio e distribuição de tamanho, morfologia, Potencial Zeta e eficiência de encapsulamento. Micropartículas de PCL e PHBV foram obtidas pelo método de dupla emulsão e evaporação de solvente com diferentes morfologias, sendo que as partículas de PCL apresentaram superfície mais lisa do que as de PHBV. Além disso, a adição do co-solvente acetona na fase orgânica, provocou a formação de micropartículas de PHBV maiores e mais porosas. Alterações em parâmetros da preparação como, aumento da concentração do tensoativo, evaporação de solvente a baixa pressão e uso de polímero com menor massa molar foram fatores que reduziram o diâmetro das partículas. A eficiência de encapsulamento nas micropartículas de PHBV, medida por eletroforese capilar, foi de 43 ± 4 %. No ensaio biológico *in vitro* em células V-79 (células de fibroblastos de pulmão derivadas de hamsters chineses), hepatócitos e Vero (células do rim de macaco) foi verificada baixa toxicidade do antibiótico estreptomicina nos alvos celulares avaliados (captura do corante vermelho neutro, conteúdo de ácidos nucleicos e redução do corante metiltiazoletetrazolium). Entretanto, as micropartículas de PHBV com e sem fármaco apresentaram alteração no lisossoma, que pode ter sido causada pela presença de PVA na superfície das partículas. A atividade antimicrobiana da estreptomicina livre e encapsulada frente à *Escherichia coli* foi verificada, obtendo menor eficiência do fármaco encapsulado em relação ao fármaco livre. Entretanto, nos testes frente à *Streptococcus lentus*, foi verificada maior eficiência quando o fármaco estava encapsulado.

ABSTRACT

This research was related to the preparation and characterization of a sustained release system with streptomycin, an antimycobacterial agent. The streptomycin (STM) was encapsulated in polymeric micro and nanopartículas from the biodegradable polymers, poli(ϵ -caprolactona) (PCL) and of the biodegradable copolymers, poli(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), by double emulsion and solvent evaporation method. These particles were characterized in function of the size and size distribution, morphology, Potential Zeta and encapsulation efficiency. PCL and PHBV microparticles that were obtained by described methods, PCL presented surface smoother than the PHBV microparticles. Moreover, the addition of the co-solvent acetone in the organic phase provoked the formation of PHBV microparticles larger and more porous than in PCL. Alterations in preparation parameters such as increase of the surfactant concentration, solvent evaporation in low pressure and a decrease molar mass were factors that reduced the particle sizes. The encapsulation efficiency in microparticles of PHBV, measured by capillary electrophoresis, it was $43 \pm 4.4\%$. In the *in vitro* biological assay in V-79 cells (permanent lung fibroblasts cell line derived from Chinese hamsters), hepatocytes and Vero cells (from monkey kidney) was verified low toxicity of the streptomycin in the endpoints targets (neutral red uptake, nucleic acid content and tetrazolium reduction). However, microparticles of PHBV with and without drug demonstrated an alteration in the lysosome that it could have been caused by the presence of poly vinylic alcohol (PVA) in the particles surfaces. The antimicrobial activity of free and encapsulated streptomycin against *Escherichia coli* was demonstrated. A smaller efficiency of encapsulated drug than the free one was found. However, in the tests against *Streptococcus lentus* was verified larger efficiency of the free drug than the encapsulated one.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de Potencial Zeta de micropartículas de PHB-9,8% HV e PCL. 37

Tabela 2: Diâmetro médio e polidispersidade das micropartículas de PHB-9,8% HV e PCL..... 38

Tabela 3: Medidas do halo de inibição nos testes frente às cepas *E. coli* e *S. lentus* da STM livre e encapsulada em micropartículas e PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹). 50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Concentração plasmática efetiva de fármacos em função do tempo em: sistemas Convencionais (curva em preto) e sistemas de Liberação sustentada (curva cheia em vermelho) (Durán e De Azevedo, 2002-Modificado)..... 7
- Figura 2:** Estrutura do antibiótico sulfato de estreptomicina. 10
- Figura 3:** Micrografias de partículas de PCL preparadas com Span 80 e poliacrilamida (método 3.1.A.): A) x 1000; B) x 20000..... 22
- Figura 4:** Micrografia referente à preparação 3.1.A. usando agitação magnética no lugar da agitação mecânica x 500 23
- Figura 5:** Estrutura da poliacrilamida: A) utilizada por Lu e col. (1999); B) utilizado neste trabalho. 24
- Figura 6:** Micrografias de partículas de PCL preparadas com os tensoativos Span 80 e Pluronic (F68) (método 3.1.A.): A) x 600; B) x 1200. 24
- Figura 7:** Micrografias de partículas de PCL (método 5.1.A): A) preparação com 2 % de Pluronic e 1 % de Span 80 x 1900; B) preparação com 10 % de Pluronic e 1 % de Span 80 x 2000..... 25
- Figura 8:** Micrografias de micropartículas (método 3.1.B.): A) PCL x 4500; B) PHB-9,8% HV (MM 23.000 g.mol⁻¹) x 4300..... 26
- Figura 9:** Micrografias de micropartículas de PHBV de diferentes massas molares obtidas pelo método 3.1.B. : A) MM 420.000 g.mol⁻¹ (7,9 %HV) x 3300; B) MM 273.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 6000; C) MM 130.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 3500; D) MM 92.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 5500; E) MM 88.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 4500; F) MM 23.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 5000..... 27
- Figura 10:** Micrografia de micropartículas de PHBV-9,8 %HV (MM 130.000 28
- Figura 11:** Micrografia de micropartículas de PHBV-9,8% HV (MM 23.000 g.mol⁻¹): A) após 3 lavagens x 2000; B) após 3 lavagens x 4300; C) após secagem x 230; D) após secagem x 6000..... 29
- Figura 12:** Micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) obtidas com detector de elétrons retro-espalhados: A) sem fármaco x 3500; B) com fármaco x 3500. 29
- Figura 13:** Micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 273.000 g.mol⁻¹) (método 3.1.B.): A) lavadas 2 vezes x 500; B) lavadas 2 vezes x 850; C) lavadas 3 vezes x 750..... 31

Figura 14: Micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 23.000 g.mol ⁻¹): A) agitação por sonicação por sonda x 500; B) agitação em ultra turrax (11000 rpm) x 500.	32
Figura 15: Micrografias, obtidas com detector de elétrons retro-espalhados, de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 23.000 g.mol ⁻¹) obtidas pelo método 3.1.B. com adição do co-solvente acetona na fase orgânica: A) x 500; B) x 5000.....	33
Figura 16: Micrografias de micropartículas de PHBV-9,8% HV (MM 88.000 g.mol ⁻¹) obtidas pelo método 3.1.B. sob agitação em ultra turrax (11000 rpm): A) evaporação de solvente por 12 horas sob agitação mecânica (640 rpm) x 1200; B) evaporação do solvente em rotaevaporador x 4000.	34
Figura 17: Micrografias de micropartículas de PCL (MM 65.000 g.mol ⁻¹) obtidas pelo método 3.1.B. sob agitação em ultra turrax (11000 rpm): A) evaporação de solvente por 12 horas sob agitação mecânica (640 rpm) x 1000; B) evaporação do solvente em rotaevaporador x 5000.....	34
Figura 18: Micrografias obtidas com detector de elétrons retro-espalhados de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol ⁻¹): A) antes da incubação em tampão fosfato x 3500; após 15 dias de incubação em tampão fosfato: B) x 1500; C) x 4500; D) x 3000.....	36
Figura 19: Micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV de diferentes massas molares obtidas pelo método 3.1.B. : A) MM 130.000 g.mol ⁻¹ kDa x 370; B) MM 92.000 g.mol ⁻¹ x 400; C) MM 88.000 g.mol ⁻¹ x 500; D) MM 23.000 g.mol ⁻¹ x 400; E) PCL 65.000 g.mol ⁻¹ x 500.	39
Figura 20: Termogramas da estreptomicina (STM), do estabilizante PVA e do polímero PHBV-9,8% HV (MM 92.000 g.mol ⁻¹ kDa).	40
Figura 21: Termogramas do polímero da estreptomicina (STM), das micropartículas de PHBV-9,8% HV (MM 92.000 g.mol ⁻¹) com e sem fármaco e da mistura física. .	41
Figura 22: A) Imagem do halo de inibição quando a bactéria <i>S. aureus</i> foi exposta a uma concentração de 25 µg.mL ⁻¹ de estreptomicina; B) Curva analítica para a determinação de estreptomicina pelo método do halo de inibição.....	42
Figura 23: Curva analítica para a determinação de estreptomicina pelo método polarimétrico	43
Figura 24: A) Eletroferograma do padrão de estreptomicina 850 mg.mL ⁻¹ e B) curva analítica para a determinação da estreptomicina pelo método de eletroforese capilar.	43
Figura 26: Eletroferogramas da estreptomicina: A) após 14 h de liberação e B) Padrões de estreptomicina na concentração de 55 a 550 mg.L ⁻¹ e de 10 h de liberação.	45

Figura 27: Eletroferograma obtido para a amostra de 48 h de liberação da estreptomicina (curva em preto) com a adição de padrão de 1100 mg.L ⁻¹ de estreptomicina (curva em vermelho).....	46
Figura 28: Viabilidade das células V-79 na análise dos alvos celulares MTT, VN e DNA para STM livre.	47
Figura 29: Imagem de Microscopia óptica das células V-79: A) Controle; B) Ampliação da parte circulada do Controle (A); C) com micropartículas de PHBV-9,8% HV (MM 92.000 g.mol ⁻¹) sem STM.	48
Figura 30: Gráfico comparativo da viabilidade das células V-79 na presença de STM encapsulada em micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol ⁻¹) na concentração de 500 µmol.L ⁻¹ e na presença de micropartículas de PHBV-9,8 % HV (MM 92.000 g.mol ⁻¹) sem STM.	49

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tuberculose e micobactérias	1
1.2. Sistemas de encapsulação de fármacos.....	3
1.3. Microscopia eletrônica de varredura	6
1.4. Sistemas de liberação sustentada de fármacos.....	6
1.5. Biodegradabilidade do PCL e do PHBV.....	7
1.6. Agente antimicobacteriano Estreptomina (STM)	10
1.7. Aspectos relacionados com a STM e seu encapsulamento.....	11
1.8. Citotoxicidade	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. Geral	13
2.2. Específico	13
3. METODOLOGIA	13
3.1. Preparação das Partículas.....	13
3.1.A. Método de emulsão inversa (água/óleo) e evaporação do solvente (Lu e col., 1999)	13
3.1.B. Método de dupla emulsão (água/óleo/água) e evaporação do solvente (Baran e col., 2002)	14
3.2. Teste de degradação (Chen e col, 2000).....	15
3.3. Caracterização das Partículas	15
3.3.A. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	15
3.3.B. Análise do Potencial Zeta das partículas (Maia e col., 2004)	15
3.3.C Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas (Maia e col., 2004).....	15
3.3.D. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) (Maia e col., 2004).....	16
3.4. Curva Analítica.....	16
3.4.A. Método Colorimétrico (United States Pharmacopoeia Convention, 1960)	16

3.4.B. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Wakopak, 2005)	16
3.4.C. Halo de Inibição (Pranoto e col., 2005)	17
3.4.D. Polarímetro (Lu e col., 1999)	17
3.4.E. Eletroforese Capilar (Li e col., 2000)	17
3.5. Eficiência de encapsulamento	18
3.6. Liberação Sustentada	18
3.7. Citotoxicidade	19
3.7.A. Preparo das Culturas de células (Corrêa e col. 2005)	19
3.7.B. Tratamento das células	19
3.7.C. Captura do corante Vermelho Neutro (VN) (análise da integridade lisossomal) (Borefreund and Puerner, 1984)	20
3.7.D. Redução do corante metiltiazoletetrazolium (MTT) (análise da integridade mitocondrial) (Denizot & Lang, 1986)	20
3.7.E. Conteúdo de Ácidos Nucleicos (AN) (Cingi e col., 1991)	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Preparação das partículas poliméricas	21
4.1.1. Método de emulsão inversa (água em óleo) e evaporação do solvente .	21
4.1.1.1. Otimização da metodologia emulsão inversa e evaporação do solvente	22
4.1.1.1.A. Influência do solvente de lavagem	22
4.1.1.1.B. Efeito da agitação na formação das partículas	23
4.1.1.1.C. Estudo de tensoativos na preparação das partículas	23
4.1.1.1.D. Concentração do Tensoativo Pluronic (F68)	24
4.1.2. Método de dupla emulsão (água em óleo em água) e evaporação do solvente	25
4.1.2.1. Morfologia das Micropartículas de PHBV	26
4.1.2.2. Otimização da metodologia de dupla emulsão (água em óleo em água) e evaporação do solvente	30
4.1.2.2.A. Remoção do estabilizante PVA Residual	30
4.1.2.2.B. Influência da Agitação	31
4.1.2.2.C. Adição de co-solvente	32

4.1.2.2.D. Influência da evaporação do solvente orgânico	33
4.2. Teste de degradação das partículas	35
4.3. Potencial Zeta	36
4.4. Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas	37
4.5. Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	39
4.6. Eficiência de Encapsulamento	41
4.6.A. Curva analítica.....	41
4.6.B. Determinação da Eficiência de Encapsulamento	43
4.7. Liberação Sustentada	44
4.8. Estudo citotóxicos	46
4.8.A. Estreptomicina livre	46
4.8.B. Micropartículas com e sem Estreptomicina	47
4.9. Estudo da atividade antimicrobiana	49
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose e micobactérias

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas, sendo conhecida pela humanidade desde o antigo Egito. A TB é uma doença crônica, infecto-contagiosa, ocasionada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, isolada pelo cientista alemão Robert Koch; em sua homenagem, o bacilo da tuberculose ficou conhecido como bacilo de Koch. Através da história a TB tem sido uma das doenças que causa epidemias mais graves. Porém, somente em 1993, a Organização Mundial da Saúde declarou que a tuberculose é emergência global, lançando um esforço conjunto para mobilizar recursos para lutar contra a epidemia (Ministério da Saúde - secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2001).

A tuberculose pode atingir todos os grupos etários, embora cerca de 85% dos casos ocorram em adultos. Desde casos, 90% ocorrem na sua forma pulmonar da doença que pode atingir também a pele, ossos, rins, meninges e nódulos linfáticos. A TB também pode assumir a forma de uma septicemia envolvendo um ou mais órgãos, ou ainda, pode aparecer como uma simples bronquite. A principal via de transmissão da TB é a via aérea sendo que medidas que ajudam a reduzir a transmissão são: aumentar a ventilação do ambiente e cobrir a boca e o nariz ao tossir ou espirrar.

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), dois bilhões de pessoas correspondendo a um terço da população mundial, está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Destes, 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrerão a cada ano (Ministério da Saúde - secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2001).

O Brasil ocupa o 13º lugar no ranking dos 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose do mundo (Souza e Vasoncelos, 2005). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS), são notificados anualmente 85 mil casos novos (correspondendo a um coeficiente de incidência de 47/100.000 habitantes) no Brasil (Ministério da Saúde - secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2001). Especificamente no estado de São Paulo ocorrem 1500

mortes/ano. Quando associada com doenças como a AIDS e/ou diabetes, o problema se agrava levando a 5000 óbitos/ano (Centro de Vigilância Epidemiológica de SP, 1998). A cura natural é diminuta. Não há, atualmente, vacina curativa ou preventiva de uso geral e eficiente para a tuberculose exceto a BCG que é utilizada para prevenção de formas graves em crianças, principalmente a meningite tuberculosa e a TB miliar.

O diagnóstico da TB é por baciloscopia de escarro. A radiografia do tórax não confirma nem descarta o diagnóstico, apenas indica a extensão das lesões. O tratamento é realizado mediante a quimioterapia na qual, diversos medicamentos podem ser utilizados como, por exemplo, isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomicina e etambutol. Estes podem ser utilizados sozinhos ou combinados (Coll, 2003). Os problemas do tratamento da tuberculose é o longo período de tratamento (cerca de 6 meses) que faz com que muitos pacientes o abandone antes do término e a multidrogressistência em que o *M. tuberculosis*, não é mais suscetível à ação de um ou vários fármacos anti-tuberculose. Considera-se TB como multidrogressistência (MR) quando esta resistência ocorre, no mínimo, na ação da isoniazida e da rifampicina. Chama-se de MR primária quando o paciente nunca recebeu nenhum tratamento anterior de TB e já apresenta resistência (resistência em casos novos). Normalmente foi contaminado por outro MR. Na resistência secundária ou adquirida se evidencia que os pacientes receberam no mínimo um tratamento anterior com mais de 1 mês de duração. (Ministério da Saúde - secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2001).

Quando o bacilo de Koch implanta-se, este se localiza principalmente no interior de monócitos, sendo esta localização intracelular um dos fatores agravantes para o tratamento favorecendo a persistência microbiana. Esta resistência ao tratamento quimioterápico pode estar ligado à inabilidade de alguns fármacos em penetrar no interior da célula, ou então, por exibirem menor atividade antimicrobiana no pH ácido dos lisossomos. Além disto, esta resistência está ligada à administração irregular e principalmente pelo abandono do tratamento sendo que, o aparecimento de cepas resistentes complicou extraordinariamente o combate à doença, elevando em até 200 vezes o custo da terapia e aumentando o índice de mortalidade (Coll, 2003; Centers of Diseases Control, 1999).

Uma estratégia para solucionar este problema, seria reduzir o abandono através do desenvolvimento de novos medicamentos ou associações terapêuticas que reduzissem o tempo de tratamento, o número de doses necessárias e fundamentalmente, apresentassem menor toxicidade, o que poderia ser obtido através da tecnologia de liberação sustentada de fármacos.

1.2. Sistemas de encapsulação de fármacos

A intensidade da resposta farmacológica está diretamente relacionada com a concentração do fármaco no sítio alvo. A distribuição de um fármaco pelo organismo depende das propriedades físico-químicas que, não necessariamente são compatíveis com a área afetada. Desta forma, grandes quantidades de fármaco são administradas para obter-se o efeito farmacológico desejado, podendo gerar toxicidade frente a outros tecidos. Uma alternativa para minimizar este problema é a modificação na estrutura química do fármaco, visando o aumento da afinidade pelo tecido alvo. Outra alternativa seria associar o fármaco a um sistema que permita a alteração/adequação de suas propriedades físico-químicas sem alterar a estrutura química do fármaco. Isto é possível através do sistema de encapsulação de fármacos. Este sistema envolve sistemas coloidais como lipossomas, micro/nanopartículas (micro/nanoesferas, micro/nanocapsulas) e emulsões (Couvreux e col., 1995).

O termo nanopartícula é usado de acordo com o tamanho da partícula a que está se referindo. Partículas com tamanho menor que 1000 nm são consideradas nanopartículas, enquanto que as partículas maiores são denominadas micropartículas (De Oliveira e André Filho, 1999). Além disto, micro e nanopartículas podem se apresentar em duas estruturas diferentes: a micro/nanoesfera e a micro/nanocápsula. Denominam-se micro/nanoesferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homoganeamente disperso no interior da matriz polimérica. Dessa forma, obtém-se um sistema monolítico onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Micro/Nanocápsulas, ao contrário, constituem sistemas do tipo reservatório onde é possível identificar um núcleo diferenciado que, pode ser líquido ou sólido. Neste caso, a substância ativa

encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo, em estudos do tipo caroço-casaca (Durán e De Azevedo, 2002).

Os materiais-suportes para a produção de micro ou nanopartículas podem ser compostos não-poliméricos como lipídeos e cera de carnaúba, poliméricos sintéticos como copolímeros de poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poliacrilatos (PA) e poli(ϵ -caprolactonas) (PCL) ou poliméricos naturais como polihidroxialcanoatos (PHA's), gelatina e quitosana (Panyam e Labhasetwar, 2003, Qurrat-ul-Ain e col., 2003).

Vários métodos de preparação de micro e nanopartículas poliméricas são descritos na literatura. Estes métodos podem ser classificados em duas principais categorias: a que requer uma reação de polimerização ou aquelas em que se utiliza diretamente uma macromolécula ou um polímero pré-formado (Couvreur e col., 1995) Os métodos encontrados na literatura são emulsificação e evaporação de solvente, emulsificação/difusão de solvente, nanoprecipitação, salting-out e polimerização interfacial *in situ*. Nos métodos de emulsificação e evaporação de solvente, podem ser obtidas emulsões água em óleo ou óleo em água dependendo, principalmente, do tipo de tensoativo utilizado. O tensoativo além de estabilizar a emulsão evita, se escolhido corretamente, a adesão capilar e a coalescência das partículas. Os tensoativos que favorecem a formação de emulsões água em óleo são os que apresentam balanço hidrofílico e lipofílico (HLB) entre 3-6 e os que favorecem a formação de emulsões óleo em água são os que têm HLB entre 7-9. Este balanço é calculado pela equação (Sjoblom, 1996):

$$\text{HLB} = 20 (1 - S/A) \quad (\text{equação 1})$$

, onde S é o índice de saponificação do éster e A é o índice de acidez ácido do ácido graxo empregado. No caso de tensoativos em que a porção hidrófila consiste apenas de óxido de eteno a equação pode ser simplificada para:

$$\text{HLB} = E/5 \quad (\text{equação 2})$$

, sendo E o peso percentual de óxido de eteno.

Os fármacos, quando encapsulados no interior de matrizes poliméricas, não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico como quando em solução. Assim, o polímero tem que degradar para que o fármaco possa ser liberado, ou

então o fármaco tem que se difundir para o exterior da matriz. Em sistemas *in vivo*, os polímeros podem ser degradados enzimaticamente, por erosão de polímeros solúveis em água como gelatina e poliacrilamidas ou por erosão de polímeros inicialmente insolúveis em água, mas que começam a se solubilizar por hidrólise, ionização ou protonação como copolímeros de éter metil vinílico e anidrido maleico (PVM / MA). Neste último caso, a ionização da função ácido carboxílico gera íons hidrogênio que causam uma diminuição do pH da superfície da matriz, acarretando em uma maior solubilidade do polímero em água. Polímeros insolúveis em água como PCL e PLGA são biodegradados por hidrólise formando pequenas moléculas solúveis, facilmente eliminadas pelo corpo como, por exemplo, na hidrólise do PCL na qual ocorre a clivagem da ligação éster gerando o ácido ϵ -hidroxicapróico (Merkli e col., 1998; Chen e col., 2000).

A liberação do fármaco das micro ou nanopartículas pode ser em alguns dias, meses ou até anos, dependendo da natureza do princípio ativo encapsulado como sua hidrofobicidade/hidrofilicidade, das propriedades físico-químicas do excipiente polimérico utilizado e da estrutura das micro ou nanopartículas. Princípios ativos hidrofílicos como proteínas e peptídeos encapsulados em polímeros hidrofóbicos (insolúveis em água) como PLGA ou PCL, irão se difundir através dos poros gerados na degradação do polímero ao invés de se difundirem pelo mesmo já que são insolúveis na matriz polimérica. Logo, a liberação ocorre pela erosão do polímero gerando poros na matriz. Neste caso, quanto maior a velocidade de degradação do polímero - que está relacionada principalmente com sua composição e sua massa molar - mais rápido será a liberação do princípio ativo. Se for necessária uma liberação lenta do fármaco como no caso de implantes de contraceptivos utilizam-se polímeros que possuem baixa velocidade de degradação (Picos e col., 2000; Wu e col., 2003). A liberação do fármaco para o meio fisiológico estendida a um tempo muito maior, quando comparada ao fármaco na sua forma livre, é um dos principais fatores para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas nanoparticulados (Edlund e Albertsson, 2002; De Oliveira e Andreo Filho, 1999).

1.3. Microscopia eletrônica de varredura

Uma das técnicas muito importante para a caracterização de micro e nanopartículas é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Esta técnica se baseia na interação de elétrons primários provenientes de um filamento que, em geral é de tungstênio, e amostra. Os elétrons provenientes do filamento são acelerados em direção à amostra colidindo com esta. Nesta colisão são geradas diferentes interações que, de forma genérica, podem ser divididas em duas categorias: a) interações elásticas que afetam a trajetória dos elétrons no feixe sem alterar significativamente sua energia e b) interações inelásticas, que resultam na transferência parcial ou total da energia dos elétrons para o sólido. O sólido no estado excitado pode então emitir elétrons secundários e raios X, dentre outros. No caso de interações elásticas, ou espalhamento elástico, a colisão de um elétron com o átomo causa uma mudança na direção de seu movimento, sem alterar sua energia cinética. O ângulo de deflexão dos elétrons que atingem a superfície do sólido varia de 0 a 180°. A maioria dos elétrons que colidirem inelásticamente com os átomos da superfície em estudo acabará por perder sua energia e permanecerão no sólido, mas os elétrons que colidirem elasticamente com os átomos da superfície podem sofrer várias colisões e sair novamente da superfície, sendo então chamados de elétrons retro-espalhados (back scattered electrons). São estes elétrons, juntamente com os elétrons secundários, que são responsáveis pelas imagens observadas ao microscópio eletrônico. As amostras analisadas no MEV devem ser condutoras ou serem previamente recobertas com um material condutor como ouro, ou ouro/paládio ou carbono (Goldstein e col., 1992).

1.4. Sistemas de liberação sustentada de fármacos

Significativos esforços têm sido dedicados recentemente no desenvolvimento de tecnologia para sistema de liberação sustentada. Espécies coloidais como lipossomas, micro e nanopartículas têm sido extensivamente estudados para este sistema que, em geral, pode ser utilizado para melhorar a

biodisponibilidade oral, manter o efeito da droga no tecido alvo, solubilizar drogas, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (Youan e col., 2003).

No sistema de liberação sustentada, o princípio ativo é encapsulado em uma matriz que deve apresentar as seguintes características: permitir a modelagem para a forma desejada e liberação da substância ativa por mecanismos adequados, ter estabilidade adequada e possuir baixa toxicidade incluindo qualquer produto de degradação (Panyam e Labhassetwar, 2003; Miyazaki e col., 2003). Através deste sistema é possível manter a concentração do fármaco no plasma na faixa terapêutica por um tempo prolongado, utilizando-se de um menor número de doses. Isto é uma vantagem em relação às formas convencionais de administrações (spray, injeção, pílulas) nas quais, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta, atinge um pico máximo e então declina. Uma vez que cada droga possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual é tóxica e abaixo da qual é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas, fato que pode ser problemático se a dose efetiva da droga estiver próxima da dose tóxica (Figura 1). (Qurrat-ul-Ain e col., 2003; Picos e col.,2000).

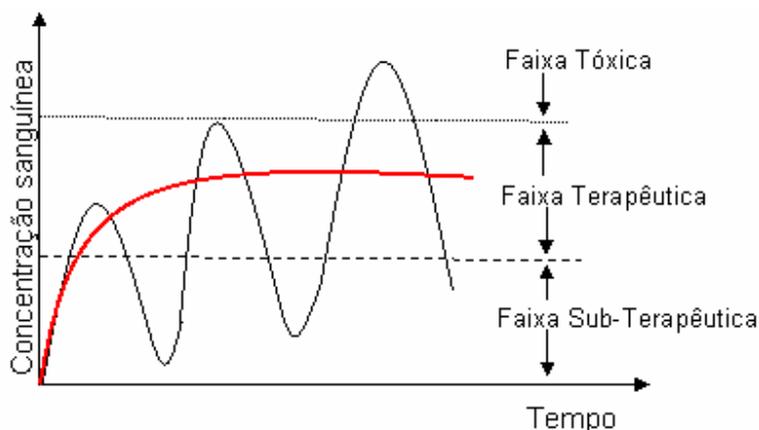


Figura 1: Concentração plasmática efetiva de fármacos em função do tempo em: sistemas Convencionais (curva em preto) e sistemas de Liberação sustentada (curva cheia em vermelho) (Durán e De Azevedo, 2002-Modificado).

1.5. Biodegradabilidade do PCL e do PHBV

A degradação dos polímeros biodegradáveis utilizados na preparação de micro e nanopartículas como PCL e PHBV depende de alguns fatores como a massa molar do polímero e o grau de cristalinidade do mesmo. Neste último caso, quanto maior a presença de domínios amorfos no polímero, maior a capacidade de degradação (Chen e col., 2000). Devido à biocompatibilidade, fácil reabsorção e propriedades não tóxicas, os polímeros poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) têm sido utilizados na preparação de micro e nanopartículas em sistemas de liberação sustentada (Rossi e col., 2004; Chen e col., 2000).

O PCL é um polímero semicristalino e sua hidrólise *in vivo* é mais lenta do que a dos polímeros PLGA e poli ácido láctico (PLA) (Merkli e col., 1998). Entretanto, os polímeros poli ácido láctico e poli ácido glicólico (PGA) geram resíduos ácidos durante a degradação enquanto o PCL não. A baixa velocidade de bioerosão do PCL pode ser substancialmente acelerada por copolimerização com outros monômeros como ácido láctico (Ramesh e col., 2002). De acordo com Merkli e col. (1998), a vantagem de nanopartículas de PCL no encapsulamento de fármacos, como no caso de ativos para uso ocular, é a capacidade de atingir uma boa resposta terapêutica com pequena dose do fármaco, suficiente para evitar efeitos colaterais. Além disto, demonstraram que a velocidade de liberação do agente terapêutico está relacionada em menor dependência à cobertura polimérica e é primariamente dependente da partição entre o polímero e o meio aquoso. Além disto, a alta hidrofobicidade do PCL permite uma captura maior destas partículas pelos macrófagos em relação a outros polímeros menos hidrofóbicos como PLGA (Murillo e col., 2002). Armani e Liu (2000) relataram que fragmentos de PCL são absorvidos intracelularmente por macrófagos. Este aspecto torna importante o encapsulamento de fármacos anti-tuberculose em PCL que permitirá maior ação sobre os macrófagos, local onde *M. tuberculosis* se multiplica.

Poli(hidroxi-butirato) (PHB) e poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) são poliésteres produzidos biologicamente por vários microorganismos na natureza como material de reserva, na forma de grânulos intracelulares (Steinbuchel, 1996). Eles foram descobertos no início do século XX e têm emergido como possíveis polímeros de cobertura em sistemas de liberação sustentada

devido às seguintes vantagens: serem facilmente processados, completamente degradados biologicamente, não serem sintetizados quimicamente e, portanto, apresentarem menos problemas toxicológicos nos produtos farmacêuticos, apresentarem propriedades físicas reprodutíveis devido à especificidade das enzimas microbianas (responsáveis por tornarem os polímeros regulares do ponto de vista estereoquímico) e, além disto, por serem compatíveis com o tecido animal (Kim e col., 2000; Arshady, 1991). Estes polímeros são isotáticos e altamente cristalinos (55-80%) o que diminui a velocidade de degradação frente aos homopolímeros lactatos (PLA) e glicolatos (PGA) (Sudesh e col., 2000). De acordo com Conway e col. (1997), as partículas de PHB e PHBV têm maior hidrofobicidade do que partículas de PLA e por causa disto, teriam maior afinidade com mucosas e seriam mais facilmente fagocitadas por macrófagos. Também concluíram que PHB com 9% de hidroxivalerato (HV) produz um ótimo efeito plastificante por aumentar o volume livre do polímero, reduzindo a cristalinidade do mesmo. A vantagem da plastificação do polímero é o aumento da velocidade de liberação do fármaco devido a uma menor resistência de difusão dentro da micropartícula. Em estudos similares feitos por Gangrade e Price (1991) sobre o encapsulamento de progesterona em PHB e PHBV (9-24% de HV), também concluíram que quanto maior o teor de HV, menor a cristalinidade do polímero por quebra da regularidade inter-cadeia tornando a partícula mais porosa e aumentando a velocidade de liberação do princípio ativo. Além disto, o PHB possui baixa velocidade de degradação por hidrólise *in vivo* quando comparado aos PLA e PHBV que degradam mais facilmente (Pouton e Akhtar, 1996).

Baran e col. (2002) utilizando o método de dupla emulsão (A/O/A) seguida da evaporação do solvente, encapsularam enzimas como, por exemplo, a catalase e a L-asparaginase, em nanocápsulas de PHBV com diferentes massas molares (297.000 a 21.000 g.mol⁻¹). Os autores concluíram que PHBV é indicado no preparo de nanocápsulas biodegradáveis e biocompatíveis utilizadas no encapsulamento de fármacos hidrofílicos, como proteínas.

1.6. Agente antimicrobacteriano Estreptomicina (STM)

Em 1944 foi descoberto o primeiro antibiótico para a tuberculose, a estreptomicina (N-metil-L-glicosaminidostreptosido-streptidina) (Figura 2) que durante alguns anos foi utilizada em regime de monoterapia e em 1952 empregada no tratamento tríplice (estreptomicina, ácido para-aminosalicílico e isoniazida) (Iseman, 2002).

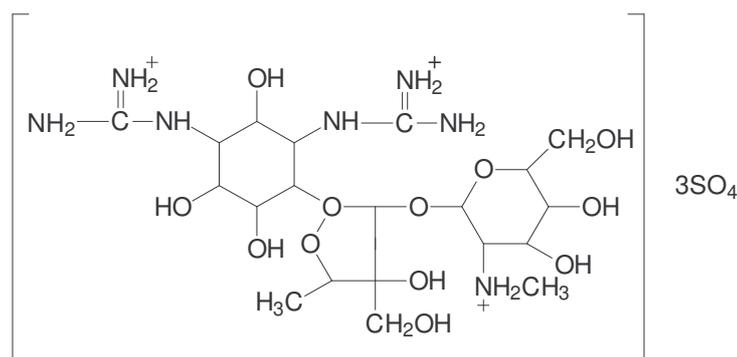


Figura 2: Estrutura do antibiótico sulfato de estreptomicina.

A estreptomicina é um aminoglicosídeo solúvel em água derivado da *Streptomyces griseus*. Este aminoglicosídeo é bactericida e bacteriostática (Yamori e col., 1992) e atua na inibição da síntese de proteínas translacionais no ribossomo da micobactéria (Ruiz e col., 2002).

As formas de administrações da estreptomicina são: via oral e via intramuscular na concentração de 400 mg.mL⁻¹. Este fármaco é efetivo, de baixo custo, mas não é facilmente absorvido quando administrado por via oral. Tal característica deve-se primeiramente ao fato de ser altamente hidrofílica e carregada positivamente, tendo dificuldade de passar através de membranas hidrofóbicas e, em segundo lugar, ao fato de ser um substrato da p-glicoproteína, transportador de efluxo multidroga que previne a absorção de seus substratos através da membrana apical do intestino por mediação do efluxo ativo de seus substratos (Lu e col., 2003). Além disto, a estreptomicina é nefro e ototóxica (Mingeot-Leclercq e Tulkens, 1999).

O interesse em estudar a estreptomicina, composto que já vem sendo utilizado no tratamento da tuberculose, envolve dentre outros aspectos, enfrentar

novos desafios técnicos no que se refere à encapsulação do fármaco, dada a sua solubilidade em água, aumentar a sua absorção na administração via oral e diminuir a sua nefro e ototoxicidade.

1.7. Aspectos relacionados com a STM e seu encapsulamento

Embora a STM tenha sido anteriormente encapsulada em lipossomas para tratamentos com *Micobacterium avium* com resultados positivos do aumento de sua eficácia terapêutica quando comparada ao fármaco livre, sua estabilidade foi um pouco prejudicada (Ganhadharan e col. 1991), diferentemente da STM encapsulada em micro e nanopartículas. Kumar e col. (1994) encapsularam sulfato de STM em microesferas de albumina para uso em tuberculose, demonstrando que seu mecanismo de liberação foi por difusão através da matriz. Entretanto, microesferas de albumina *in vivo* podem ser prejudicadas devido à degradação enzimática (Hincal e Kas, 1988). Conclusões similares foram apresentadas quando se utilizou gelatina na formação de microesferas de STM (Gurkan e col., 1987). Microesferas de gelatina acumulam a STM principalmente nos tecidos do pulmão (Wei e col. 1990; Zhang e col. 1995), demonstrando efeitos antituberculose quando administradas em macrófagos murinos J774 infectados com *M. tuberculosis* H37Rv (Yang e col., 1998).

A STM foi encapsulada com sucesso em nanopartículas de quitosana com alta eficiência de incorporação diminuindo as unidades formadoras de colônias (UFC) aos 21 dias de infecção (Lu e col., 2003). Além disto, uma combinação de poli-(ϵ -caprolactona) com um derivado de poliacrilamida resultou numa preparação eficiente de microcápsulas contendo STM, liberando 80% do fármaco em aproximadamente 24 horas (Wang e col. 1998, Lu e col. 1999).

Microcápsulas de PLGA com revestimento de partículas micronizadas de triamcinolona acetonideo permitiram encapsular 99% do fármaco e após 24 h liberaram cerca de 90% do mesmo (Talton e col., 2000).

Estudos recentes *in vivo* mostraram que drogas usadas no tratamento de tuberculose (isoniazida, rifampicina e estreptomicina) encapsuladas em

nanopartículas pelo polímero poli-n-butilcianoacrilato e polibutilcianocrilato, resultaram em uma liberação controlada da droga e diminuição das unidades formadoras de colônias (UFC) aos 8 dias de infecção, quando injetadas em uma única dose. No caso da estreptomicina e da isoniazida, a quimioterapia utilizando-se nanopartículas de poli-n-butilcianoacrilato e polibutilcianocrilato apresentou um resultado melhor quando comparado com a administração diária das drogas livres diferentemente da rifampicina, que não apresentou um aumento da atividade microbiana e apenas uma substancial acumulação das nanopartículas (Anisimova e col., 2000).

1.8. Citotoxicidade

A citotoxicidade pode ser definida como a propriedade de ativação dos mecanismos de morte celular por um composto químico ou biológico, ou por uma célula mediadora como, por exemplo, os macrófagos e as células T citotóxicas (Krähenbühl e Tschopp, 1991). Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis na determinação da citotoxicidade basal, assim como no estabelecimento da faixa de concentração na qual o composto apresenta atividade. Detalhes importantes sobre os parâmetros citotóxicos envolvidos, como genotoxicidade, indução de mutações ou morte celular programada também podem ser determinados neste tipo de teste. O estabelecimento da concentração onde 50% de células são afetadas (IC_{50}) permite comparar quantitativamente a resposta de um mesmo composto em diferentes sistemas, ou de vários compostos em um único sistema (Eisenbrand e col., 2002).

Os alvos celulares (“endpoints”) dos testes de citotoxicidade são baseados, principalmente, na perda seletiva da permeabilidade celular, na redução da função mitocondrial e nas mudanças na morfologia e replicação celular. Cada tipo celular responde por meio de diversos mecanismos bioquímicos à presença de diferentes compostos, porém algumas dessas respostas são comuns e podem ser utilizadas como marcadores precoces de citotoxicidade (Eisenbrand e col., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas coloidais, contendo estreptomicina, preparados através do método de emulsificação e evaporação de solvente com polímeros biodegradáveis.

2.2. Específico

- Preparar micro e/ou nanopartículas com o polímero biodegradável PHBV com diferentes porcentagens de hidroxivalerato e diferentes massas molares e com o polímero PCL pelo método de emulsificação seguida da evaporação do solvente.
- Encapsular o fármaco hidrofílico estreptomicina nas partículas de PCL e PHBV;
- Caracterizar as partículas quanto ao diâmetro, morfologia, teste de biodegradação e eficiência de encapsulamento do fármaco;
- Avaliação da citotoxicidade em diferentes culturas de célula;
- Avaliação da atividade antimicrobiana frente às cepas *Streptococcus lentus* e *Escherichia coli*.

3. METODOLOGIA

3.1. Preparação das Partículas

3.1.A. Método de emulsão inversa (água/óleo) e evaporação do solvente (Lu e col., 1999)

Para a preparação de micro e nanopartículas utilizou-se a técnica de emulsificação e evaporação do solvente, sob agitação mecânica. Para isto, uma fase aquosa constituída por 10 mL de solução 0,25% de poliacrilamida (MM 10.000 g.mol⁻¹ – Aldrich) com 5 mg de estreptomicina (Sigma) foi gotejada em 50 mL de clorofórmio (Lafan) com 160 mg de poli(ε-caprolactona) (PCL - MM 65.000 g.mol⁻¹ -

Aldrich) e 1% de monooleato de sorbitan (Span 80 – Aldrich) sob agitação mecânica de 460 rpm. Após a evaporação do solvente, as nano e/ou micropartículas foram lavada três vezes com água/etanol (80:20), centrifugadas à 10000 rpm, congeladas em nitrogênio líquido e secas em um liofilizador LB 3000 TT (Terroni-Fauvel). Testou-se também a utilização de Pluronic F68 (MM 8400 g.mol⁻¹ - Aldrich) no lugar da poliacrilamida na preparação citada acima. Para isto, preparou-se um solução de 10 mL de Pluronic F68 na concentração de 2% e 10% com 5 mg de estreptomicina e gotejou-se esta fase na fase orgânica (50 mL de clorofórmio com 160 mg de PCL e 1% de Span 80) e seguiu-se o procedimento descrito acima.

3.1.B. Método de dupla emulsão (água/óleo/água) e evaporação do solvente (Baran e col., 2002)

As micropartículas foram preparadas através do método de dupla emulsão (água/óleo/água) seguida da evaporação do solvente. Uma solução de 5 mg.mL⁻¹ de estreptomicina foi adicionada em uma solução de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV) (PHB Industrial) ou poli-(ε-caprolactona) (PCL) (Aldrich) em clorofórmio (5mg.mL⁻¹) sob sonicação por sonda (Unique) por 60 s formando uma emulsão água/óleo. Em seguida esta emulsão foi gotejada, através de uma bomba peristáltica em uma solução de polivinil álcool (PVA-0,1%) sob agitação magnética por 1 hora formando a dupla emulsão (água/óleo/água). Após este período, a dupla emulsão foi vertida em uma solução aquosa de PVA (0,03%) sob agitação mecânica e o solvente evaporado por 12 horas a temperatura de 28 °C e em rotaevaporador. Em seguida as micropartículas foram centrifugadas, lavadas com água destilada, congeladas em nitrogênio líquido e, secas em um liofilizador LB 3000 TT (Terroni-Fauvel).

Nestes experimentos foram utilizados os polímeros PHB-7,9% HV (MM 420.000 g.mol⁻¹), PHB-9,8% HV (MM 273.000, 13.0000, 92.000, 88.000 e 23.000 g.mol⁻¹) e PCL (MM 65.000 g.mol⁻¹) e o estabilizante PVA (MM 30-70.000 g.mol⁻¹).

3.2. Teste de degradação (Chen e col, 2000)

Em tubos falcon, 30 mg de micropartículas de PHBV ($MM\ 92.000\ g.mol^{-1}$) foram redispersos em uma solução tampão fosfato $50\ mmol.L^{-1}$ (pH 7,4). Estas amostras foram mantidas sob agitação de 120 rpm e a $36,5 \pm 0,1^{\circ}C$ por 15 dias em incubadora Orbital (Modelo MA 830/A). Após este período, estas amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, lavadas 2 vezes com água destilada e analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

3.3. Caracterização das Partículas

3.3.A. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

As partículas foram caracterizadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma pequena quantidade de micropartículas foi adicionada a uma fita de carbono fixada em um porta-amostra de latão. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au/Pd pelo processo de *Sputtering* (evaporação do metal e deposição de uma fina camada – 10nm - sobre a amostra) utilizando-se um metalizador BAL-TEC. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6360LV, utilizando-se uma tensão de aceleração de 20 kV e detectores de elétrons secundários e elétrons retro-espalhados.

3.3.B. Análise do Potencial Zeta das partículas (Maia e col., 2004)

A carga superficial das partículas foi analisada por um Malvern Zetasizer. As partículas foram re-suspensas em solução de $1\ mmol.L^{-1}$ de NaCl e cada amostra foi medida 5 vezes.

3.3.C Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas (Maia e col., 2004)

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada no aparelho LS Particle Size Analyzer/ 230 (Beckman Coulter), que opera pelo princípio de difração de raios laser. Uma pequena quantidade de partículas foi dispersa em Tween 80 (Sigma) e água destilada e, em seguida, analisada. A polidispersidade foi calculada pelo índice span através da equação $D_{0,9} - D_{0,1}/D_{0,5}$, onde $D_{0,1}$; $D_{0,5}$ e $D_{0,9}$ são respectivamente os diâmetros de partículas referentes a 10, 50 e 90% da distribuição acumulada.

3.3.D. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) (Maia e col., 2004)

Os termogramas de DSC foram obtidos por um Calorímetro Diferencial de Varredura DSC-Q10 (TA instruments) usando um porta-amostra padrão de alumínio selado. As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio, a um fluxo de 50 mL.min⁻¹, na faixa de temperatura de -40 a +250 °C na taxa de aquecimento de 10 °C/min.

3.4. Curva Analítica

Para a determinação do fármaco encapsulado e da liberação sustentada foram testados diferentes métodos:

3.4.A. Método Colorimétrico (United States Pharmacopoeia Convention, 1960): 5 mL de solução de estreptomicina (1 mg.mL⁻¹) foram adicionados em 5 mL de solução de 0,2 mol.L⁻¹ de NaOH sob banho-maria por 10 minutos. Após este período, foram adicionados 3 mL de solução (1,5 % m/v) de sulfato de ferro (III) amoniacal em ácido sulfúrico (0,25 mol.L⁻¹) a esta solução sob banho de gelo. O volume da solução foi completado com água destilada até 25 mL. A solução foi mantida em repouso por 20 minutos e a absorbância foi lida no comprimento de onda de 525 nm no espectrofotômetro Hitachi (U-2000).

3.4.B. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Wakopak, 2005): As condições para esta análise foram: coluna C-18 (4,6 mm x 150 mm) (Shimadzu),

fase móvel constituída por 50 mmol.L⁻¹ NH₄PF₆ (Aldrich), H₃PO₄ (pH 3,5)/CH₃CN (85/15 v/v) sob o fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A temperatura do forno foi de 40 °C e o volume de injeção foi de 20 µL. Neste experimento foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu com detector de UV-Vis no comprimento de onda de 210 nm. As amostras de estreptomicina foram preparadas em água e a concentração máxima utilizada foi de 100 µg.mL⁻¹.

3.4.C. Halo de Inibição (Pranoto e col., 2005): A atividade da estreptomicina foi avaliada em meio sólido em cepas de *Staphilococcus aureus* (ATCC 6538). As vidrarias utilizadas e o meio de cultura de Agar nutriente foram esterilizadas a 121 °C por 30 minutos. Após o resfriamento do meio, adicionou-se o marcador respirométrico TTC (2,3,5-trifenil-2H-cloreto de tetrazolium) na concentração de 25 mg.L⁻¹. Em capela de fluxo laminar foram preparadas as placas, vertendo os meios e inoculando 0,1 mL da bactéria. Após a solidificação do Agar, foi feito um poço por placa no meio da placa de cultura utilizando uma pipeta invertida. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas por diluição sucessiva e plaqueamento. As amostras foram feitas em triplicata. Adicionou-se em cada poço 100 µL de solução do fármaco nas concentrações de 0, 25, 50, 100, 200 e 300 µg.mL⁻¹. Após a adição do fármaco, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h. Após este período, mediu-se o halo de inibição com uma régua milimétrica.

3.4.D. Polarímetro (Lu e col., 1999): Soluções aquosas de estreptomicina de concentrações iguais a 0,25 a 1,45 mg.mL⁻¹ foram medidas em um Polarímetro da Perkin Elmer.

3.4.E. Eletroforese Capilar (Li e col., 2000): Esta análise foi realizada no laboratório do Prof. Fernando de Oliveira da Universidade de Mogi das Cruzes (Núcleo de Ciências Ambientais) em um aparelho de Eletroforese Capilar da Beckman-Coulter (P/ACEMDQ). Inicialmente, o tubo capilar de 75 cm foi lavado com água por 2 min, NaOH 0,1 mol.L⁻¹ por 2 min, água por 2 min e eletrólito de

trabalho Na_2HPO_4 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4) por 10 min e pressão de 20 psi. As amostras de concentrações entre 55 a 850 mg.L^{-1} preparadas em tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4) foram injetadas por 10 s com pressão de 0,5 psi. O método de separação foi realizado com corrente constante de $82,5 \mu\text{A}$ (para manter a voltagem em torno de 15 kV); temperatura de 20°C (capilar); tempo de corrida de 15 minutos e pressão de 20 psi e detecção a 195 nm. Entre uma corrida e outra, o capilar foi lavado por 2 min com Na_2HPO_4 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4).

3.5. Eficiência de encapsulamento

Para a determinação da eficiência de encapsulamento foi utilizada a técnica de Eletroforese Capilar. Para isto, foram dissolvidos 21 mg de micropartículas de PHB-9,8% HV ($\text{MM } 92.000 \text{ g.mol}^{-1}$) com estreptomicina ($m_{\text{teórica}} = 1,7 \text{ mg}$) em 2 mL de clorofórmio. Após a dissolução das partículas, 2 mL de tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4) foram adicionados e, agitou-se o sistema para que o fármaco migrasse para a fase aquosa. O sistema foi centrifugado à 4000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 1 ml da fase aquosa foi retirada e foi analisada por eletroforese capilar nas mesmas condições da curva de calibração do item 3.4.E.

3.6. Liberação Sustentada

Para um estudo preliminar de liberação sustentada, 60 mg de micropartículas de PHB-9,8% HV ($\text{MM } 92.000 \text{ g.mol}^{-1}$) (massa de estreptomicina = 2,16 mg) foram adicionados em 5 mL de tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4) em tubos falcon. Os tubos foram mantidos em uma incubadora Orbital (modelo MA 83/A) termostatizados a $36,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sob agitação de 120 rpm. Em determinados intervalos de tempo, uma alíquota de 1 mL da suspensão foi coletada e centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante, separado para análise. O mesmo volume de alíquota retirado foi repostado com tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} (pH 7,4). A estreptomicina liberada foi determinada por eletroforese capilar como descrito no item 3.4.E.

3.7. Citotoxicidade

3.7.A. Preparo das Culturas de células (Corrêa e col. 2005)

Os fibroblastos V79, hepatócitos e as células Vero (de rim de macaco) foram mantidos em cultura contínua através de repiques periódicos, até atingirem a densidade de confluência. Este cultivo foi realizado em meio DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium) contendo 100 U.mL^{-1} de penicilina e 100 mg.mL^{-1} de estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram descoladas usando solução de ATV (tripsina versene-tripsina a 0,1% e versene a 0,016%). O número de células viáveis para o cultivo e plaqueamento foi determinado homogenizando-se uma alíquota da suspensão celular com a quantidade equivalente de solução de Azul de Tripán a 0,1%, contando as células em câmara de Neubauer e excluindo as células que incorporam o corante. O cultivo foi realizado em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A incubação foi feita em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO_2 . Para os três diferentes ensaios de citotoxicidade, descritos a seguir, o plaqueamento foi realizado inoculando $3 \times 10^4 \text{ células.mL}^{-1}$ em cada poço da placa (24 cavidades) e incubando a 37°C por 48 h.

3.7.B. Tratamento das células

Inicialmente realizaram-se experimentos com o fármaco livre para determinar o IC_{50} . Fármaco livre: As células foram tratadas com soluções de estreptomicina em meio DMEM nas concentrações de 0 a $2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Em cada poço da placa foram adicionados $100 \mu\text{l}$ de solução do fármaco.

Micropartículas de PHB-9,8% HV ($\text{MM } 92.000 \text{ g.mol}^{-1}$) com fármaco e sem fármaco encapsulado: Para estes experimentos, a concentração de fármaco encapsulado foi de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ que foi a máxima solubilização das micropartículas obtidas. Para isto, 101 mg de micropartículas foram solubilizados em 5 mL de meio DMEM. Em cada poço da placa foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da suspensão.

3.7.C. Captura do corante Vermelho Neutro (VN) (análise da integridade lisossomal) (Borefreund and Puerner, 1984)

O meio de cultura com fármaco ou com micropartículas foi removido e trocado por outro contendo $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (segundo padronização) do corante VN, pré-incubado durante 12 h a 37°C e filtrado, em membrana Millipore ($0,22 \mu\text{m}$), antes do uso. Após 4 horas de incubação a 37°C , as células foram lavadas com PBS- Ca^{2+} (pH 7,4) para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomas. Em cada cavidade foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de solução aquosa contendo ácido acético glacial (1%) e etanol (49%) para fixar as células e extrair o corante VN incorporado nos lisossomas. As placas foram agitadas por 5 min em um agitador de placas e a absorbância das soluções foram lidas em um Microplate reader (Cambridge technology –IMC) a 540 nm.

3.7.D. Redução do corante metiltiazoletetrazolium (MTT) (análise da integridade mitocondrial) (Denizot & Lang, 1986)

O meio de cultura com fármaco ou com micropartículas foi removido e trocado por outro sem soro contendo o corante MTT (1 mg.mL^{-1}), e as células foram incubadas durante 4h, tempo necessário para a redução acontecer. O meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 5 min em um agitador de placas e a absorbância das soluções foram lidas em um Microplate reader (Cambridge technology –IMC) a 570 nm.

3.7.E. Conteúdo de Ácidos Nucleicos (AN) (Cingi e col., 1991)

Após a leitura da placa com corante Vermelho neutro, as soluções de cada cavidade da placa foram removidas. A placa foi deixada ao ar livre para secar e, em seguida, as células foram lisadas com NaOH $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ($150 \mu\text{L}$ por cavidade, 1 hora a 37°C) e a absorbância lida no espectrofotômetro Beckman (Du-640B) a 260 nm.

3.8. Estudo da atividade antimicrobiana

O estudo da atividade antimicrobiana da estreptomicina foi avaliada pelo método do halo de inibição (Pranoto e col., 2005) em meio sólido frente as cepas de *Streptococcus lentus* (isolada e identificada molecularmente de um reator de lodo ativado para tratamento de efluente papeleiro) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). A metodologia utilizada foi igual a descrita na seção 3.4.C. Em cada poço, feito no meio solidificado nas placas de Petri, foram adicionados 100 µL de solução do fármaco livre e encapsulado em micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) na concentração de 280 µg.mL⁻¹ para *S. Lentus* e 150 µg.mL⁻¹ para *E. coli*. Após a adição do fármaco e das micropartículas, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h. Após este período, o halo de inibição foi medido com uma régua milimétrica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparação das partículas poliméricas

4.1.1. Método de emulsão inversa (água em óleo) e evaporação do solvente

O primeiro método utilizado para a preparação de partículas foi o de emulsão inversa água em óleo e evaporação de solvente (método 3.1.A.). Através deste método, foram obtidas nanopartículas, porém estas se apresentaram aglomeradas em estruturas maiores com diâmetro de 28,9 µm como mostram as micrografias das figuras 3A e 3B. Na figura 3A observa-se grandes aglomerados, entretanto ao realizar um aumento de 20000 vezes nesta mesma região da figura 3A, observa-se que estes aglomerados são formados por nanopartículas com diâmetro médio, calculado pelo software Image Tool, de 320 nm (Figura 3B).

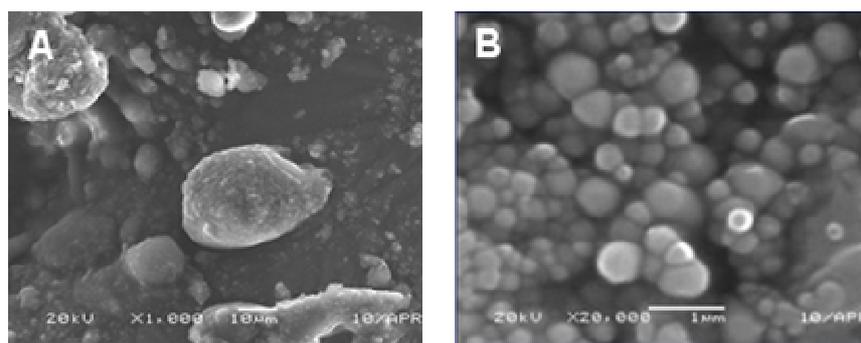


Figura 3: Micrografias de partículas de PCL preparadas com Span 80 e poliacrilamida (método 3.1.A.): A) x 1000; B) x 20000.

4.1.1.1. Otimização da metodologia emulsão inversa e evaporação do solvente

4.1.1.1.A. Influência do solvente de lavagem

Para avaliar o melhor solvente de lavagem, as partículas foram lavadas com dois diferentes solventes: água e água:etanol (80:20). Quando as partículas foram lavadas apenas com água destilada e em seguida liofilizadas, obteve-se apenas um resíduo viscoso de cor amarela, similar ao tensoativo Span 80. Este resultado indica que o tensoativo residual Span 80 não foi totalmente removido devido à baixa solubilidade deste tensoativo em água. Entretanto, quando as partículas foram lavadas com o solvente água:etanol (80:20) e liofilizadas em seguida, um pó branco foi obtido, demonstrando uma maior eficiência na remoção dos tensoativos. Por este motivo, o solvente água:etanol (80:20) foi mantido como solvente de lavagem nas demais preparações.

A etapa de lavagem é uma etapa importante no processo de preparação de partículas, pois remove o excesso de tensoativo residual existente sobre a partícula. A escolha do solvente de lavagem está diretamente relacionada às características do tensoativo utilizado.

4.1.1.1.B. Efeito da agitação na formação das partículas

Um estudo do efeito da agitação na formação das partículas foi realizado alterando a agitação mecânica por agitação magnética. O uso da agitação magnética na preparação das partículas, usando os tensoativos Span 80 e poliacrilamida e mantendo as mesmas condições descritas no método 3.1.A., ocasionou o coalescimento das partículas formando apenas grandes aglomerados como mostra a figura 4. Sendo assim, a agitação mecânica foi mantida nas demais preparações.

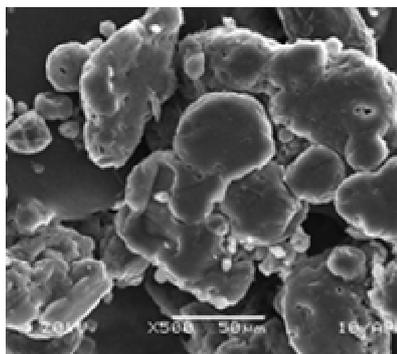
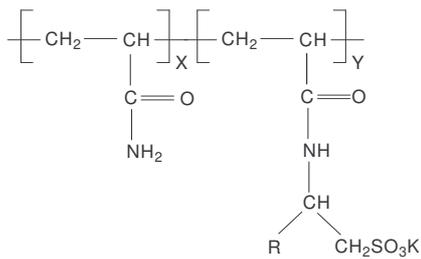


Figura 4: Micrografia referente à preparação 3.1.A. usando agitação magnética no lugar da agitação mecânica x 500.

4.1.1.1.C. Estudo de tensoativos na preparação das partículas

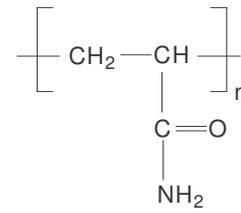
Inicialmente o tensoativo Span 80 foi utilizado por ter um HLB igual 4,3 que favorece a formação de emulsões água em óleo. Juntamente com o tensoativo Span 80 foi utilizada poliacrilamida com a finalidade de conferir estabilidade estérica às partículas como descrito por Lu e col. (1999). De acordo com estes autores, um derivado de poliacrilamida (figura 5A) confere às partículas uma estabilização deste tipo. Entretanto neste estudo foi utilizada uma poliacrilamida diferente (figura 5B) de massa molar 100 vezes menor que acabou não conferindo às partículas tal estabilidade obtendo apenas grandes aglomerados de nanopartículas como descrito no item 4.1.1.



$$\text{R} = (\text{CH}_2)_n \text{CH}_3$$

$$\text{MM} = 1,8 \times 10^6$$

A



$$\text{MM} = 1,0 \times 10^4$$

B

Figura 5: Estrutura da poliacrilamida: A) utilizada por Lu e col. (1999); B) utilizado neste trabalho.

Por este motivo, utilizou-se um outro tensoativo no lugar da poliacrilamida. O tensoativo escolhido foi o Pluronic (F68). A utilização dos tensoativos Span 80 em conjunto com o Pluronic (F68) reduziu a formação de aglomerados e melhorou a redispersão das partículas secas em água. Entretanto houve um aumento no diâmetro das partículas para 25,9 μm (calculado pelo software Image Tool) como mostram as figura 6A e 6B.

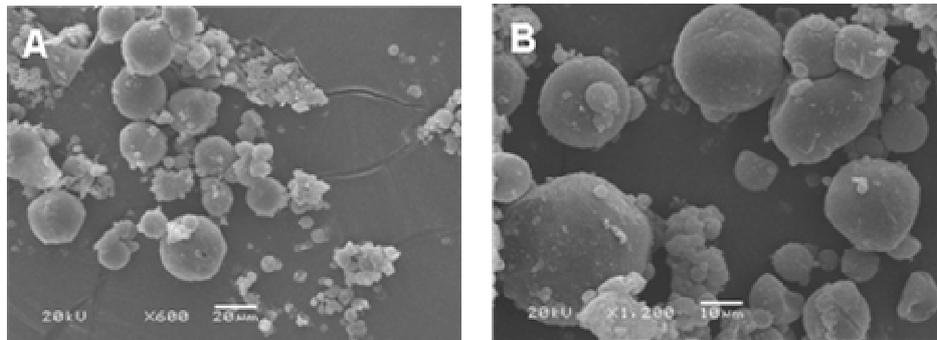


Figura 6: Micrografias de partículas de PCL preparadas com os tensoativos Span 80 e Pluronic (F68) (método 3.1.A.): A) x 600; B) x 1200.

4.1.1.1.D. Concentração do Tensoativo Pluronic (F68)

Neste estudo duas concentrações de Pluronic F68 foram utilizadas (2 e 10% m/v). Quando 2% de Pluronic F68 foram utilizados, obteve-se micropartículas de diâmetro, calculado pelo software Image Tool, de 25,9 μm (figura 7 A) e, quando 10% de Pluronic F68 foram utilizados, reduziu-se o diâmetro médio das partículas para 1,42 μm (calculado pelo software Image Tool). Esta redução no diâmetro das partículas está de acordo com Ferdous e col. (1998) que verificaram que o aumento da concentração do estabilizante PVA reduz o diâmetro das partículas. Entretanto, a adição em excesso de Pluronic (F68) não foi vantajosa, visto que as nanopartículas formadas encontravam-se presas em uma provável camada de tensoativo que não foi removida mesmo após seis lavagens (figura 7 B).

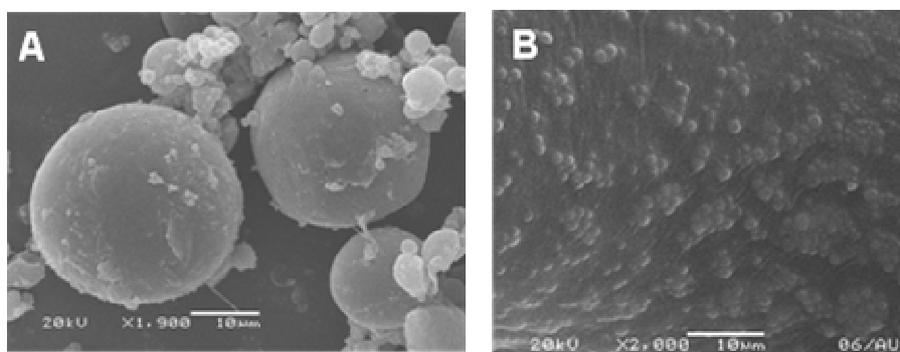


Figura 7: Micrografias de partículas de PCL (método 5.1.A): A) preparação com 2 % de Pluronic e 1 % de Span 80 x 1900; B) preparação com 10 % de Pluronic e 1 % de Span 80 x 2000.

Apesar da formação tanto de micro quanto de nanopartículas de PCL utilizando o método de emulsão inversa água em óleo e evaporação de solvente, este método não foi reprodutível, pois resultados diferentes com esta mesma metodologia foram obtidos como tamanhos diferentes de partículas, não formação de partículas entre outras alterações. Por este motivo, passou-se a utilizar o método de dupla emulsão água em óleo em água e evaporação de solvente, obtendo micropartículas de PCL e PHBV.

4.1.2. Método de dupla emulsão (água em óleo em água) e evaporação do solvente

Através deste método foram obtidas micropartículas de PCL e PHBV com diferentes morfologias. As micropartículas de PCL apresentaram superfície mais lisa do que as micropartículas de PHBV como mostra a figura 8. Esta diferença foi independente da massa molar do polímero PHBV e da porcentagem de hidroxivalerato (HV) sendo, portanto, uma característica do polímero utilizado. As micropartículas de PCL apresentaram diâmetro médio de 17,6 μm , enquanto que, o diâmetro médio das micropartículas de PHBV foi variável, mudando de acordo com a massa molar do polímero como será descrito no item 4.4.

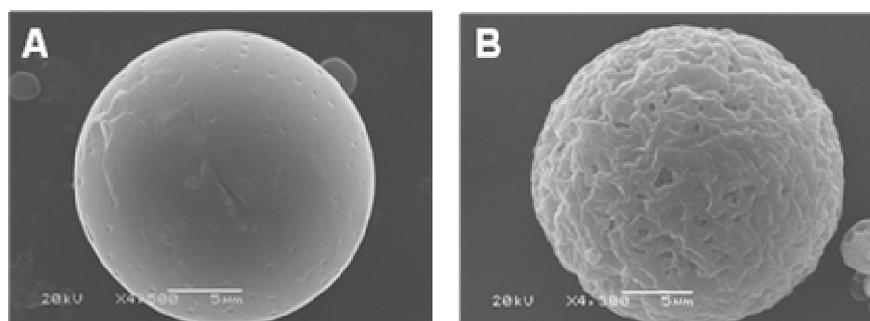


Figura 8: Micrografias de micropartículas (método 3.1.B.): A) PCL x 4500; B) PHB-9,8% HV ($\text{MM } 23.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) x 4300.

4.1.2.1. Morfologia das Micropartículas de PHBV

A morfologia praticamente não foi alterada com a variação da massa molar do polímero PHBV. A figura 9 mostra micropartículas obtidas utilizando o polímero PHBV com as massas molares de 420.000, 273.000, 130.000, 92.000, 88.000 e 23.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Em todos os casos as micropartículas apresentaram uma superfície rugosa e forma esférica.

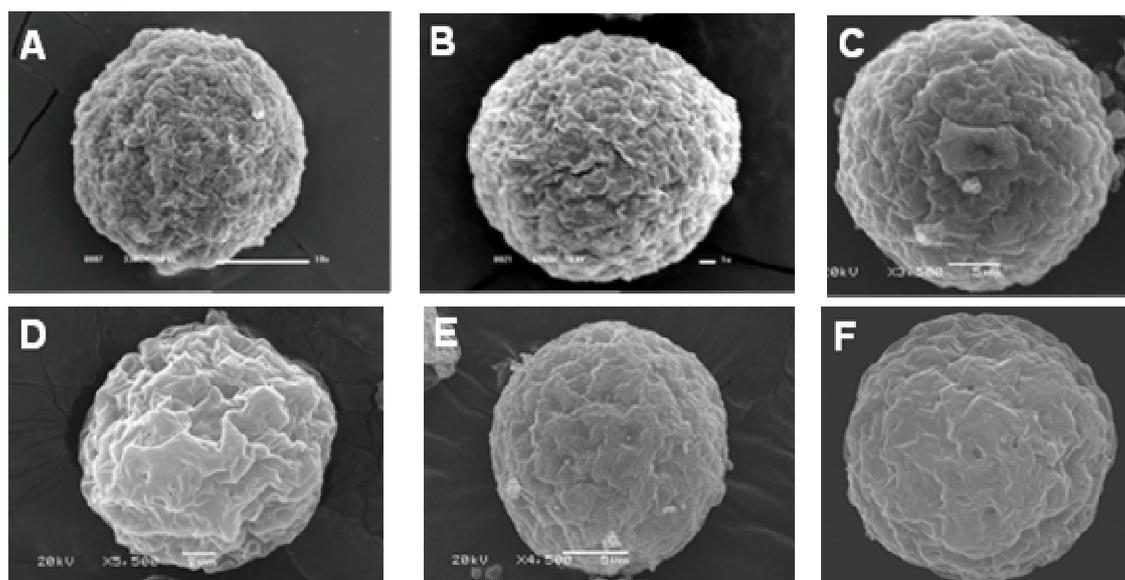


Figura 9: Micrografias de micropartículas de PHBV de diferentes massas molares obtidas pelo método 3.1.B. : A) MM 420.000 g.mol⁻¹ (7,9 %HV) x 3300; B) MM 273.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 6000; C) MM 130.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 3500; D) MM 92.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 5500; E) MM 88.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 4500; F) MM 23.000 g.mol⁻¹ (9,8 %HV) x 5000.

Em alguns experimentos foi observada uma camada de nanopartículas sobre micropartículas de PHBV. Na figura 10A observa-se um conjunto de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 130.000 g.mol⁻¹). Ao realizar um aumento de 10000 e 60000 vezes nesta mesma região da figura 10 A, observa-se uma camada de nanopartículas sobre estas micropartículas, conforme mostram as figuras 10 B e C. Resultado similar foi obtido por Rosca e col. (2004) utilizando o polímero PLGA. De acordo com estes autores a formação de uma camada de nanopartículas sobre micropartículas é uma consequência direta do mecanismo de formação das partículas. Eles concluíram que quando o polímero precipita na interface das gotas de água, este tende a formar uma crosta contínua em torno destas gotas. Ao mesmo tempo, a partícula está encolhendo devido à perda de solvente, deste modo, a crosta de polímero vai continuamente se fragmentando gerando nanopartículas.

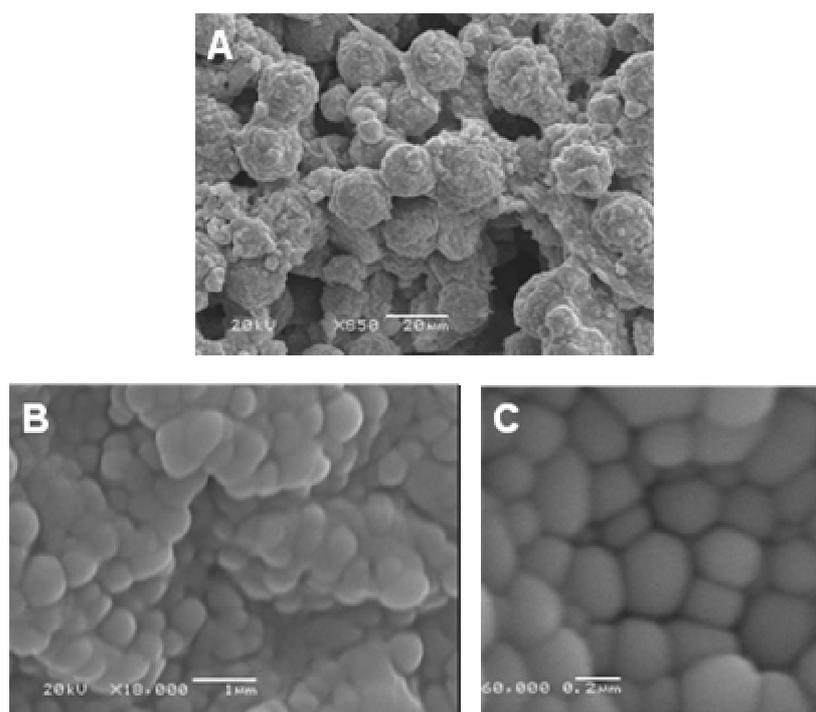


Figura 10: Micrografia de micropartículas de PHBV-9,8 %HV ($MM\ 130.000\ g.mol^{-1}$): A) x 850; B) x 10000; C) x 60000.

Fenômeno similar foi observado antes da liofilização das partículas. As figuras 11 A e B mostram micrografias de partículas de PHB-9,8% HV ($MM\ 23.000\ g.mol^{-1}$) antes da liofilização. Nestas micrografias observam-se partículas com diâmetro médio, calculado pelo software Image Tool, de $1,6\ \mu m$ aglomeradas. Estes aglomerados têm um diâmetro médio de $27,9\ \mu m$ (calculado pelo software Image Tool). Após a secagem destas partículas pelo processo de liofilização, foi observado apenas micropartículas com diâmetro igual a $18,5\ \mu m$ (calculado pelo software Image Tool) (figura 11 C e D). Possivelmente, nas etapas de lavagem e liofilização, as partículas com diâmetros menores podem estar coalescendo, formando micropartículas.

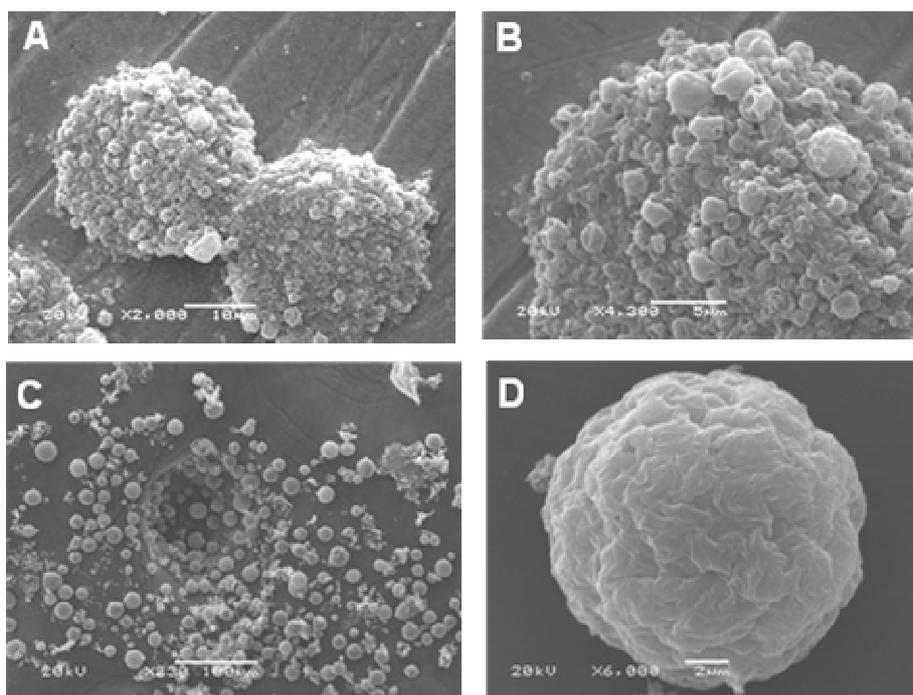


Figura 11: Micrografia de micropartículas de PHBV-9,8% HV ($MM\ 23.000\ g.mol^{-1}$): A) após 3 lavagens x 2000; B) após 3 lavagens x 4300; C) após secagem x 230; D) após secagem x 6000.

Observou-se uma diferença morfológica nas partículas ao encapsular o fármaco estreptomicina como mostram as micrografias da figura 12, obtidas com detector de elétrons retro-espalhados. Quando se encapsula o fármaco, a superfície da micropartícula apresenta-se mais porosa.

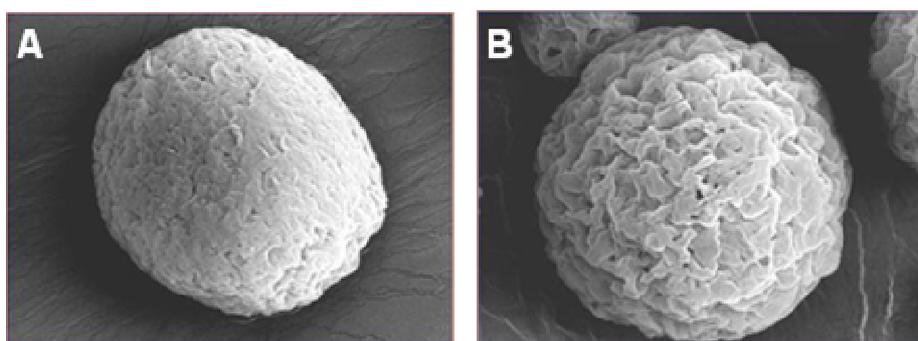


Figura 12: Micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV ($MM\ 92.000\ g.mol^{-1}$) obtidas com detector de elétrons retro-espalhados: A) sem fármaco x 3500; B) com fármaco x 3500.

4.1.2.2. Otimização da metodologia de dupla emulsão (água em óleo em água) e evaporação do solvente

4.1.2.2.A. Remoção do estabilizante PVA Residual

Para avaliar o número de lavagens suficientes para a remoção do PVA residual das partículas, estas foram lavadas duas, três ou quatro vezes com água destilada. As micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 273.000 g.mol⁻¹) lavadas duas vezes e em seguida liofilizadas, apresentaram resíduo de tensoativo entre as partículas que as uniam como mostram as figuras 13A e 13B. Entretanto, quando as micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 273.000 g.mol⁻¹) foram lavadas três vezes com água destilada e em seguida liofilizadas, não foi observado resíduo entre as partículas como mostra a figura 13C. Resultado similar foi obtido com quatro lavagens, sendo portanto, necessárias, no mínimo, três lavagens para a remoção do tensoativo residual. Esta conclusão está de acordo com Lee e col. (1999) que verificaram que três lavagens são suficientes para remover o tensoativo residual ficando apenas uma monocamada de PVA nas partículas. Esta monocamada, independente do número de lavagens, não é removida devido ao fato da existência de uma ligação irreversível do PVA com a camada de polímero da interface.

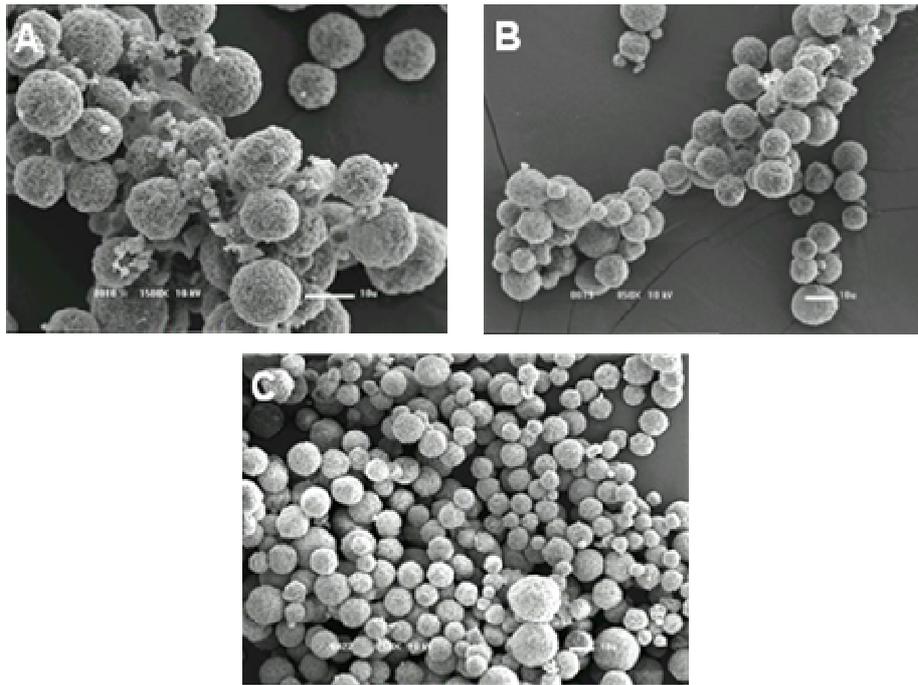


Figura 13: Micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV ($MM\ 273.000\ g.mol^{-1}$) (método 3.1.B.): A) lavadas 2 vezes x 500; B) lavadas 2 vezes x 850; C) lavadas 3 vezes x 750.

4.1.2.2.B. Influência da Agitação

Para o estudo da influência da agitação (Ferdous e col., 1998) foi utilizada no lugar da agitação por sonicação por sonda a agitação em ultra turrax (11000 rpm) na formação da primeira emulsão água em óleo. A alteração da agitação de sonicação por ultra turrax ocasionou o aumento do diâmetro e uma deformação das micropartículas como mostram as micrografias da figura 14.

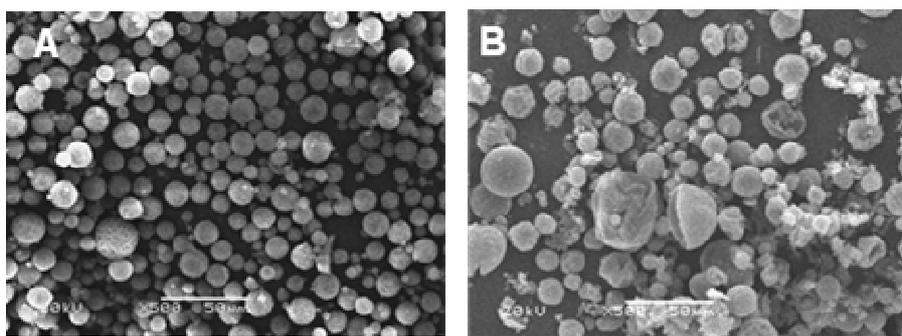


Figura 14: Micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 23.000 g.mol⁻¹): A) agitação por sonicação por sonda x 500; B) agitação em ultra turrax (11000 rpm) x 500.

4.1.2.2.C. Adição de co-solvente

Outro parâmetro alterado no método de dupla emulsão e evaporação de solvente (método 3.1.B.) foi a adição de um co-solvente na fase orgânica. O co-solvente utilizado foi a acetona na concentração de 20% (v/v). Com a adição do co-solvente, foram obtidas micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 23.000 g.mol⁻¹) mais porosas do que as micropartículas obtidas sem a adição de um co-solvente como mostram as micrografias da figura 15 obtidas com detector de elétrons retro-espalhados. Além disto, o diâmetro das partículas aumentou de 7,5 μm que corresponde ao diâmetro das micropartículas preparadas sem a adição de acetona, para 11,5 μm , que corresponde ao diâmetro das micropartículas preparadas com a adição de acetona. O aumento da porosidade das partículas está relacionado com o fato da acetona ser um não solvente para o polímero PHBV, ocasionando um aumento na velocidade de solidificação do polímero gerando, desta forma, poros na matriz polimérica. Já o aumento no diâmetro das partículas pode estar relacionado com uma redução de eficiência de agitação, resultada do aumento da viscosidade da fase orgânica devido à redução da solubilidade do PHBV na mistura clorofórmio/acetona (Yoon e Park, 2004). Este resultado está de acordo com Youan e col. (1999) que verificaram que a adição do co-solvente acetona na fase orgânica ocasionou a formação de partículas com diâmetro e porosidade maiores, além de aumentar a eficiência de encapsulamento do ativo soro albumina bovina (BSA). Este aumento da porosidade na partícula altera a velocidade de liberação do

ativo como descrito Conway e col. (1997), o que demonstra a possibilidade de controle na taxa de liberação.

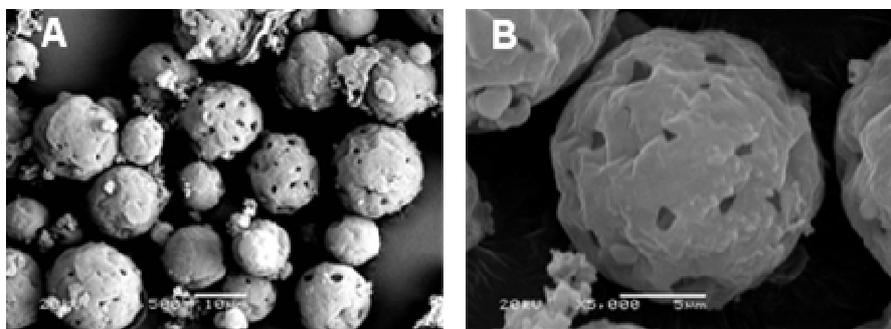


Figura 15: Micrografias, obtidas com detector de elétrons retro-espalhados, de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 23.000 g.mol⁻¹) obtidas pelo método 3.1.B. com adição do co-solvente acetona na fase orgânica: A) x 500; B) x 5000.

4.1.2.2.D. Influência da evaporação do solvente orgânico

Utilizando a metodologia de dupla emulsão e evaporação de solvente (metodologia 3.1.B.) com agitação em ultra turrax na formação da emulsão água em óleo, o solvente foi evaporado de duas maneiras não concomitantes: à temperatura ambiente (28 °C) sob agitação mecânica (640 rpm) por 12 h e à baixa pressão em rotaevaporador sob temperatura de 30 °C. Micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 88.000 g.mol⁻¹) com diâmetro médio de 28,1 µm (calculado pelo software Image Tool) foram obtidas quando o solvente foi evaporado por 12 horas sob agitação mecânica (figura 16 A). Entretanto, quando se utilizou evaporação do solvente à baixa pressão (rotaevaporador), o diâmetro médio das micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 88.000 g.mol⁻¹) foi de 5,8 µm (figura 16 B). Esta redução no diâmetro das partículas deve-se possivelmente a uma maior velocidade de difusão do solvente orgânico para a fase aquosa, quando o sistema está sob baixa pressão. Este resultado está em concordância com Chung e col. (2002) que obtiveram micropartículas de poli(L-láctico) (PLLA) e poli(D-láctico) (PDLLA) com diâmetros menores quando o solvente foi evaporado à baixa pressão (160 mmHg) do que quando o solvente foi evaporado a pressão ambiente (760 mmHg). Esta

redução no diâmetro das partículas pode ser explicada pela equação de Laplace, expressa como:

$$dP = 2\gamma / r \quad (\text{equação 3})$$

,onde dP é a diferença de pressão fora e dentro do filme líquido de uma gota, γ é a tensão superficial do líquido e r é o raio de uma gota esférica (Atinks, 1998).

A diferença de pressão (dP) no processo de evaporação de solvente a baixa pressão é maior do que no processo de evaporação de solvente a pressão ambiente. Desta forma, pela equação de Laplace, o raio da gota será menor o que justifica a redução do diâmetro das partículas.

Resultado similar foi obtido com o polímero PCL, reduzindo o diâmetro médio das micropartículas de 17,6 μm para 2,4 μm (figura 17).

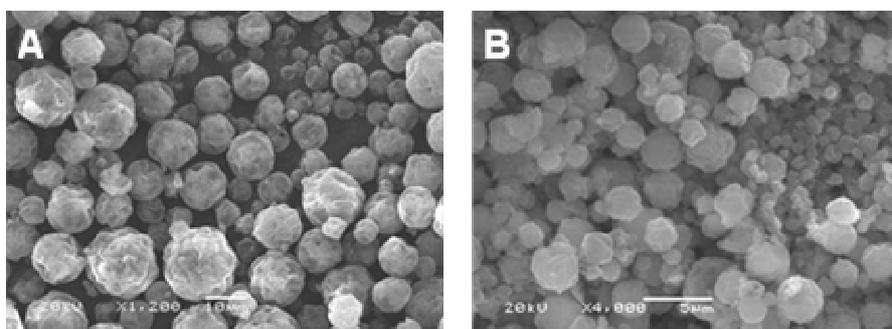


Figura 16: Micrografias de micropartículas de PHBV-9,8% HV ($\text{MM } 88.000 \text{ g.mol}^{-1}$) obtidas pelo método 3.1.B. sob agitação em ultra turrax (11000 rpm): A) evaporação de solvente por 12 horas sob agitação mecânica (640 rpm) x 1200; B) evaporação do solvente em rotaevaporador x 4000.

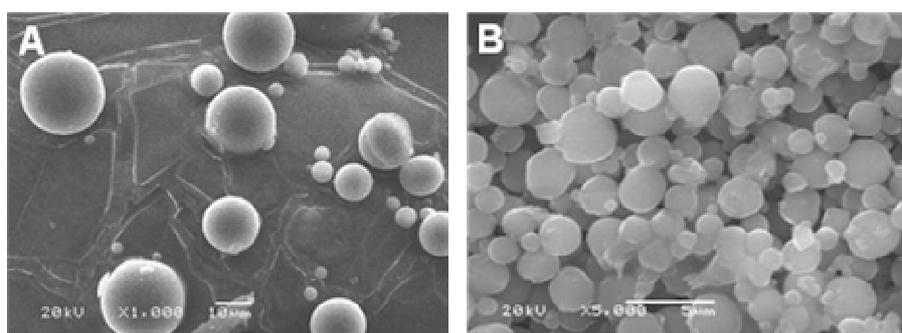


Figura 17: Micrografias de micropartículas de PCL ($\text{MM } 65.000 \text{ g.mol}^{-1}$) obtidas pelo método 3.1.B. sob agitação em ultra turrax (11000 rpm): A) evaporação de solvente por 12 horas sob agitação mecânica (640 rpm) x 1000; B) evaporação do solvente em rotaevaporador x 5000.

4.2. Teste de degradação das partículas

Foi realizado um estudo de degradação em tampão fosfato 50 mmol. L⁻¹ (pH 7,4) das micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) por 15 dias. A figura 18A mostra a imagem de MEV com detector de elétrons retro-espalhados de micropartícula de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) com o fármaco antes da incubação em tampão fosfato. As figuras 18B e 18C mostram imagens de MEV com detector de elétrons retro-espalhados da micropartícula de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) com o fármaco após a incubação em tampão fosfato por 15 dias. Nestas micrografias observa-se que após 15 dias de incubação, as micropartículas ficaram mais rugosas. Além disto, observa-se na figura 18C uma conexão entre partículas vizinhas que, possivelmente, foi originada por coalescência das partículas e/ou por sua descamação. A baixa velocidade de hidrólise do PHBV (Sudesh e col., 2000) pode contribuir para a presença destes dois fenômenos.

Em algumas partículas foi observada erosão como mostra a imagem de MEV da figura 18D obtida com detector de elétrons retro-espalhados. De acordo com Wu e col. (2003), fármacos hidrofílicos encapsulados em matrizes poliméricas hidrofóbicas, como o PHBV, irão ser liberados para o meio externo, principalmente, através dos poros gerados na degradação do polímero (processo de erosão), sendo a difusão, através da matriz polimérica, dificultada devido a baixa solubilidade do princípio ativo nesta matriz.

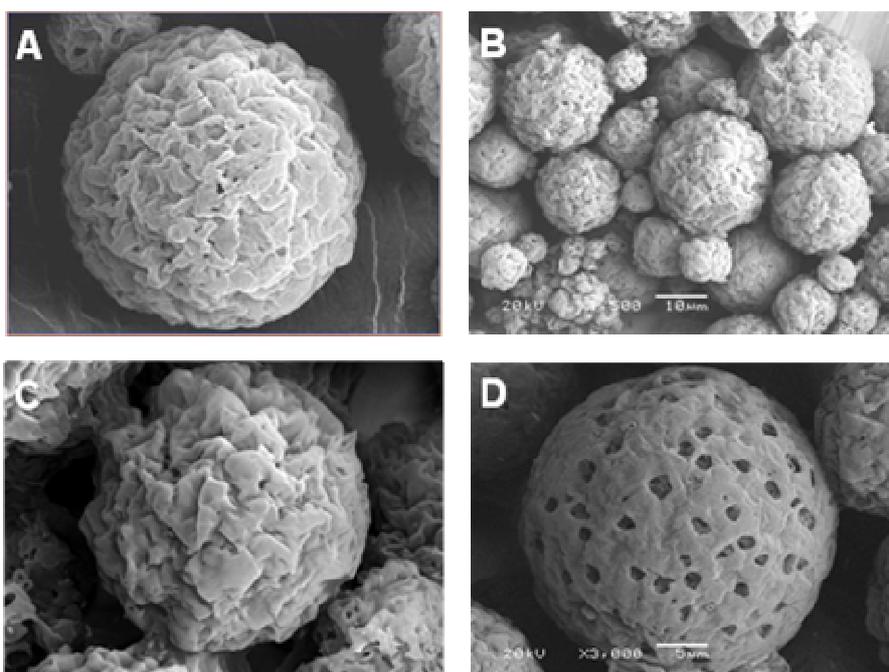


Figura 18: Micrografias obtidas com detector de elétrons retro-espalhados de micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹): A) antes da incubação em tampão fosfato x 3500; após 15 dias de incubação em tampão fosfato: B) x 1500; C) x 4500; D) x 3000.

4.3. Potencial Zeta

Na análise de potencial Zeta, verificou-se que as partículas têm carga superficial negativa e que a carga superficial das micropartículas de PHBV-9,8% HV (MM 23.000, 88.000 e 92.000 g.mol⁻¹) e PCL (MM 65.000 g.mol⁻¹) não variou significativamente ao encapsular o fármaco estreptomicina (STM) como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Valores de Potencial Zeta de micropartículas de PHB-9,8% HV e PCL.

Polímero	Micropartícula sem STM (mV)	Micropartícula com STM (mV)
PHBV 23 KDa	-5,0 ± 0,9	-5,1 ± 0,9
PHBV 88 KDa	-5,7 ± 0,6	-6,0 ± 0,7
PHBV 92 kDa	-5,4 ± 0,4	-5,5 ± 0,8
PHBV 130 kDa	-6,0 ± 0,6	-6,3 ± 0,4
PHBV 287 kDa	Não medido	-7,7 ± 1,5
PHBV 420 kDa	Não medido	-8,6 ± 1,4
PCL 65 kDa	-5,0 ± 0,4	-4,1 ± 0,8

4.4. Tamanho médio e distribuição de tamanho das partículas

A tabela 2 mostra as medidas do diâmetro das micropartículas de PHBV e PCL obtidas pelo método de dupla emulsão e evaporação de solvente (método 3.1.B.). Nesta tabela observa-se que o diâmetro das partículas está diretamente relacionado com a massa molar do polímero, como descrito por Ferdous e col. (1998). Nas mesmas condições de preparação, quanto menor a massa molar do polímero PHBV menor foi o diâmetro médio das partículas, variando de 28,7 μm quando foi utilizado PHB-9,8% HV de massa molar de 130.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ até 6,7 μm para a massa molar de 23.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (9,8% HV). O diâmetro médio das micropartículas de PCL com e sem fármaco não teve uma diferença significativa.

Tabela 2: Diâmetro médio e polidispersidade das micropartículas de PHB-9,8% HV e PCL.

Micropartícula	Diâmetro (D)			Índice de Span
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	
PHBV 23kDa sem STM	1,7	7,6	20,1	2,4
PHBV 23kDa com STM	1,8	9,3	22,5	2,2
PHBV 88kDa sem STM	4,3	21,0	61,2	2,7
PHBV 88kDa com STM	3,2	18,4	34,9	1,7
PHBV 92kDa sem STM	3,8	18,4	29,4	1,4
PHBV 92kDa com STM	5,6	22,6	35,3	1,3
PHBV 130kDa sem STM	5,6	28,7	53,7	1,7
PHBV 130kDa com STM	-	Não medido	-	-
PCL sem STM	3,4	17,6	29,8	1,5
PCL com STM	8,1	16,4	29,0	1,3

A figura 19 mostra micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV de diferentes massas molares e de PCL. Nestas micrografias pode ser observada a distribuição média das partículas.

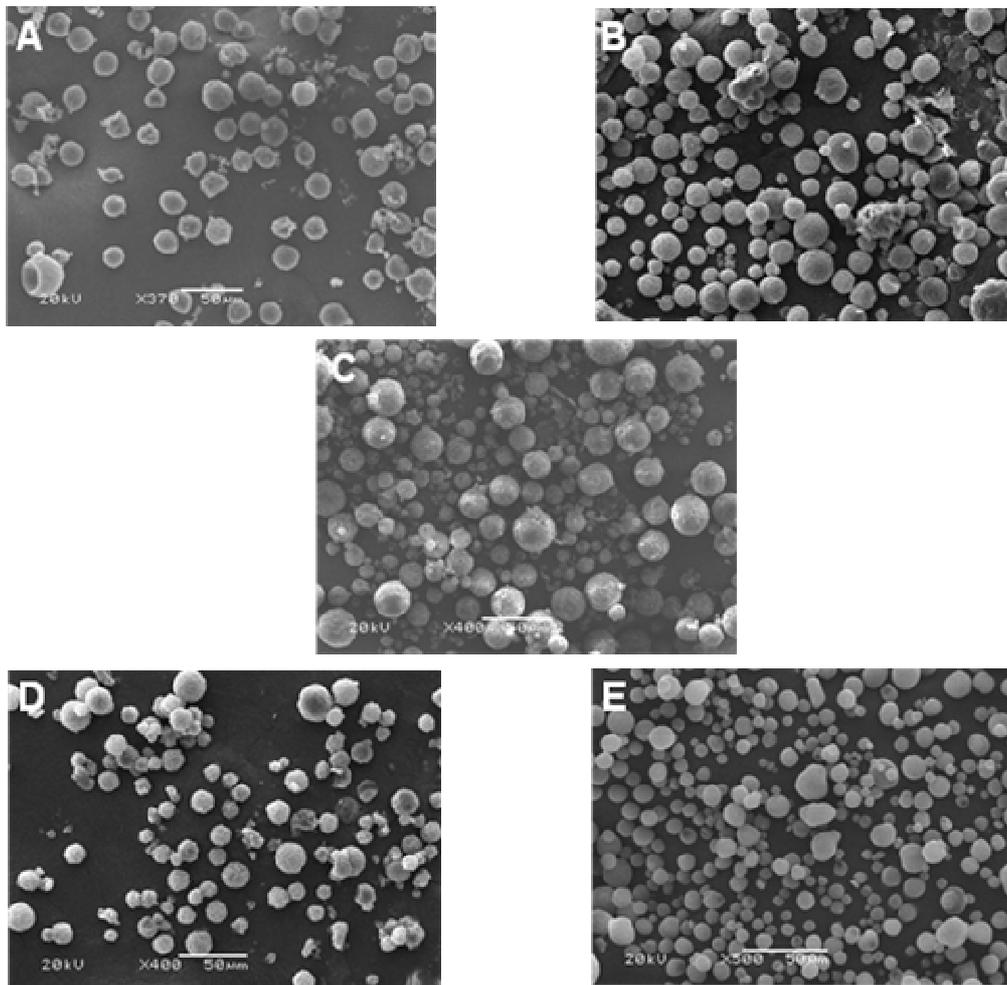


Figura 19: Micrografias de micropartículas de PHB-9,8% HV de diferentes massas molares obtidas pelo método 3.1.B. : A) MM 130.000 g.mol⁻¹ kDa x 370; B) MM 92.000 g.mol⁻¹ x 400; C) MM 88.000 g.mol⁻¹ x 500; D) MM 23.000 g.mol⁻¹ x 400; E) PCL 65.000 g.mol⁻¹ x 500.

4.5. Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A figura 20 mostra os termogramas da estreptomicina (STM), do estabilizante PVA, e do polímero PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹). Observa-se no termograma do PVA a presença de 3 picos endotérmicos em 105, 189 e 325 °C. No termograma do polímero PHBV, observam-se 2 picos endotérmicos em 170 e 288 °C e, no termograma da STM, observa-se um pico exotérmico em 214 °C. A

figura 21 mostra os termogramas da STM, das micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) sem STM e com STM e da mistura física dos componentes. No termograma das micropartículas de PHBV sem STM, observam-se 2 picos endotérmicos, em 289 e 167 °C, referentes ao polímero PHBV. No termograma da mistura física, observam-se 3 picos, sendo 2 endotérmicos, em 190 e 305 °C, e um exotérmico, em 229 °C. Esses três picos referem-se ao PVA, ao PHBV e a STM, respectivamente. Já no termograma da micropartícula de PHBV com STM, não observa-se o pico exotérmico referente ao fármaco. A ausência deste pico indica que, provavelmente, não há uma interação entre o fármaco e o polímero, mas este está disperso na matriz polimérica, sendo que, o polímero mantém suas características na micropartícula preparada (Dhanaraju e col., 2003).

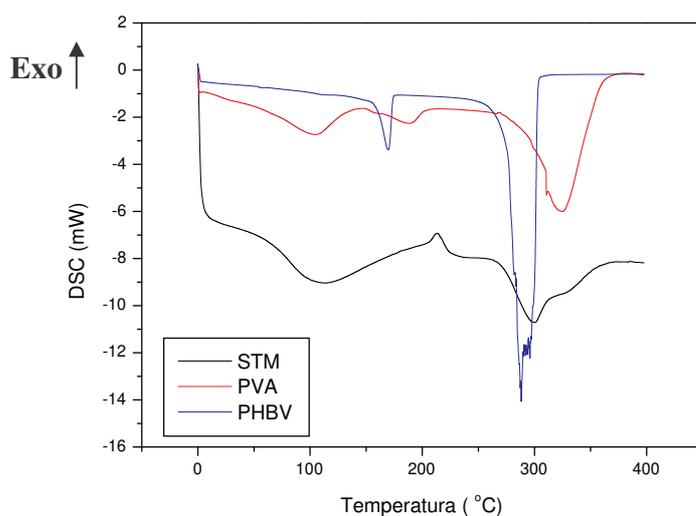


Figura 20: Termogramas da estreptomicina (STM), do estabilizante PVA e do polímero PHBV-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹ kDa).

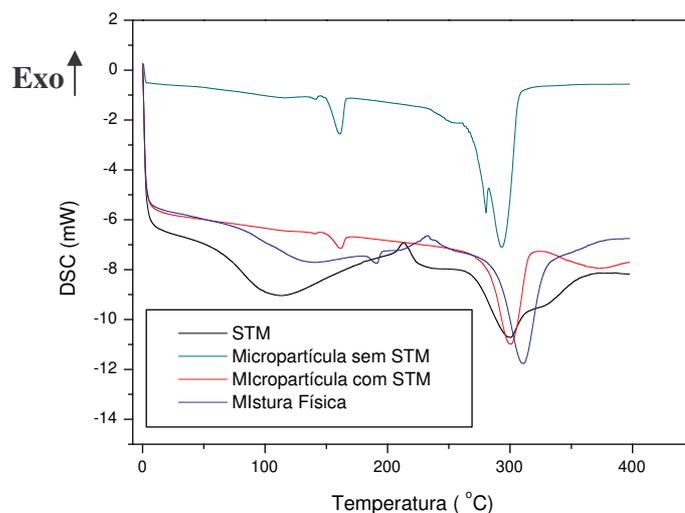


Figura 21: Termogramas do polímero da estreptomicina (STM), das micropartículas de PHBV-9,8% HV ($MM\ 92.000\ g.mol^{-1}$) com e sem fármaco e da mistura física.

4.6. Eficiência de Encapsulamento

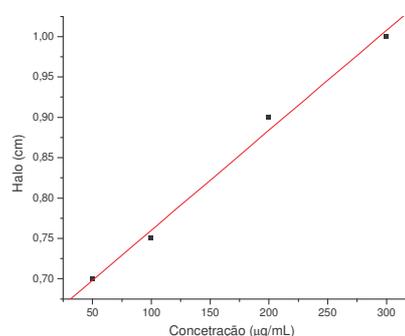
4.6.A. Curva analítica

Para o cálculo da eficiência de encapsulamento e da liberação sustentada foi necessária a construção de uma curva analítica de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2003). De acordo com a Anvisa, a curva analítica deve apresentar coeficiente de correlação $r = 0,99$ e precisão $\leq 2\%$. Além disto, o método escolhido deve ter baixo limite de quantificação, já que nos experimentos de liberação sustentada o fármaco é liberado gradualmente. Em vista disso, foram testados diferentes métodos analíticos, a começar pelo colorimétrico. O método colorimétrico não teve reprodutibilidade provavelmente, pela baixa eficiência na complexação da estreptomicina com o ferro, não sendo possível medir a absorbância em vários experimentos. Dessa forma, testou-se o método de CLAE que também não se mostrou eficiente. Isto porque, o pico referente à estreptomicina ($t_{migrac\tilde{a}o} = 7$ minutos) apresentou baixa intensidade e a linha base não estabilizou. Por estes motivos, os métodos de colorimetria e CLAE não foram utilizados para a construção da curva de calibração.

O terceiro método analítico testado foi o método do halo de inibição. As figuras 22A e 22B mostram o halo de inibição medido quando o meio sólido com *S. aureus* foi exposto a uma concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina e a curva analítica para a determinação da estreptomicina, respectivamente. A equação da reta obtida foi $y = 0,6 + 0,001x$ e o coeficiente de correlação (r) igual a 0,99. Apesar do coeficiente de correlação estar dentro das recomendações da Anvisa, este método mostrou-se inviável para o objetivo de quantificar a estreptomicina no estudo de liberação sustentada, uma vez que, requer um tempo muito longo e apresenta erros nas medidas dos halos.



A



B

Figura 22: A) Imagem do halo de inibição quando a bactéria *S. aureus* foi exposta a uma concentração de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina; B) Curva analítica para a determinação de estreptomicina pelo método do halo de inibição.

O quarto método analítico testado foi o polarimétrico. A curva analítica obtida por este método está apresentada abaixo na figura 23. A equação da reta foi $y = -0,0007 + 0,007x$ e o coeficiente de correlação (r) foi 0,99. Apesar do coeficiente de correlação estar dentro das recomendações da Anvisa, o limite de quantificação foi alto ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sendo, portanto, necessárias grandes quantidades de micropartículas nos experimentos de liberação sustentada. Desta forma, partiu-se para uma outra técnica, a eletroforese capilar.

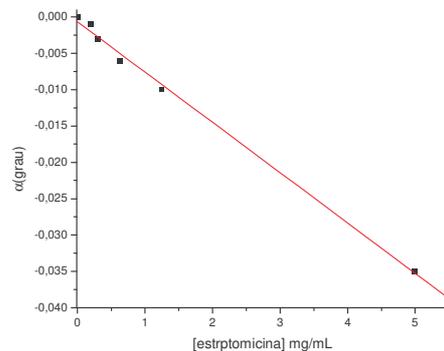


Figura 23: Curva analítica para a determinação de estreptomicina pelo método polarimétrico.

A curva analítica para o método de Eletroforese Capilar foi construída na faixa de concentração de 55 a 850 mg.L⁻¹ de estreptomicina em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4). A figura 24A mostra um exemplo de eletroferograma de um padrão de estreptomicina na concentração de 850 mg.L⁻¹ e a figura 24B mostra a curva analítica obtida por esta técnica. A equação da reta obtida foi $y = -1574 + 105,3x$ e o coeficiente de correlação (r) foi de 0,99, portanto dentro das recomendações da Anvisa.

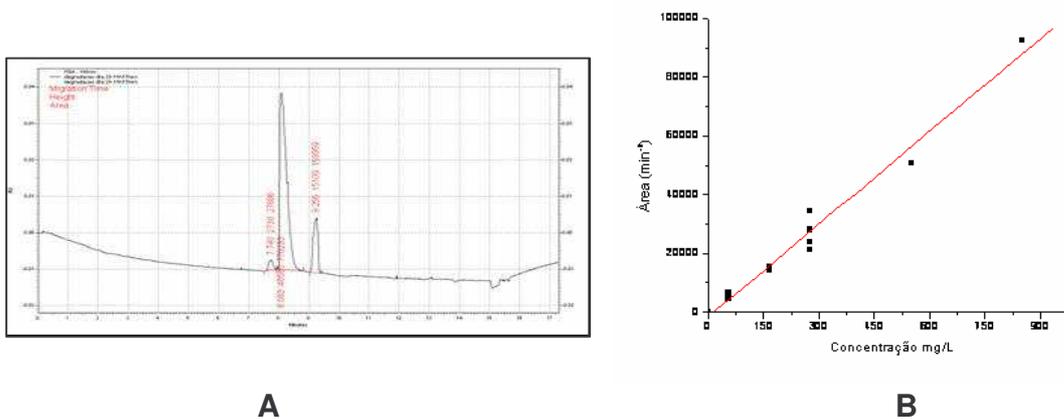


Figura 24: A) Eletroferograma do padrão de estreptomicina 850 mg.mL⁻¹ e B) curva analítica para a determinação da estreptomicina pelo método de eletroforese capilar.

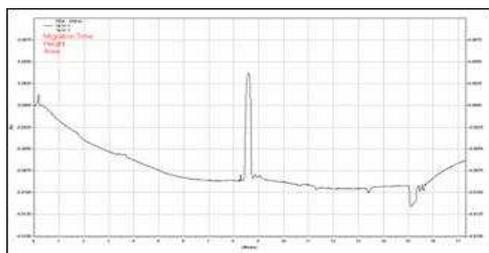
4.6.B. Determinação da Eficiência de Encapsulamento

A partir da curva analítica obtida por eletroforese capilar, calculou-se a eficiência de encapsulamento das micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) obtendo o valor de 43 ± 4%. Entretanto, para as demais preparações com PHBV de diferentes massas molares não foi possível verificar a eficiência de encapsulamento devido a baixa robustez do método como descrito no item 4.7.

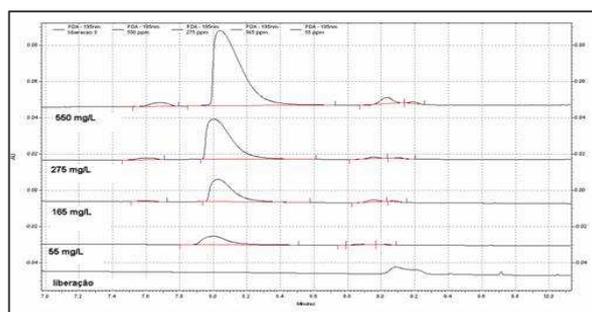
4.7. Liberação Sustentada

Para quantificar o fármaco liberado em função do tempo, foi utilizada a técnica de eletroforese capilar. Entretanto, não se obteve sucesso, provavelmente pela baixa robustez do método utilizado. Isto porque a técnica de Eletroforese Capilar tem baixa resistência a variações nos parâmetros analíticos como, por exemplo, o pH, a temperatura, a corrente e a matriz.

As alíquotas retiradas, em determinados intervalos de tempo, no experimento de liberação sustentada continham outras substâncias diferentes da estreptomicina, como monômeros do polímero e/ou do tensoativo residual hidrolisados, tensoativo residual solubilizado, além de uma possível interação entre a estreptomicina e essas outras moléculas presentes no meio. Em visto disso, os eletroferogramas obtidos apresentaram um pico com tempo de migração ($t_{\text{médio}} = 8,6 \text{ min}^{-1}$) diferente do tempo de migração da estreptomicina da curva de calibração ($t_{\text{médio}} = 7,9 \text{ min}^{-1}$). A figura 26A mostra um exemplo de eletroferograma referente ao tempo de liberação de 14 h e a figura 26B refere-se a uma ampliação de eletroferogramas na região de 7 a 10 minutos dos padrões de estreptomicina na faixa de concentração de 55 a 550 mg.L⁻¹ e também, de uma amostra referente a 10 h de liberação.



A



B

Figura 26: Eletroferogramas da estreptomicina: A) após 14 h de liberação e B) Padrões de estreptomicina na concentração de 55 a 550 mg.L⁻¹ e de 10 h de liberação.

Para investigar se o pico no tempo de migração de 8,6 min⁻¹ correspondia a estreptomicina, foram adicionados 50 µL de um padrão de estreptomicina (1100 mg.L⁻¹) em 500 µL de uma amostra referente a 48 h de liberação, obtendo o eletroferograma da figura 27. A curva preta refere-se à amostra de 48 h de liberação sem a adição de padrão de estreptomicina e a curva vermelha refere-se à amostra de 48 h de liberação com a adição de padrão de estreptomicina (1100 mg.L⁻¹). Na curva vermelha, observam-se dois picos: um deles no tempo de migração de 7,86 min⁻¹, referente à estreptomicina adicionada e o outro em 8,63 min⁻¹, presente nas amostras de liberação sustentada sem adição de padrão de estreptomicina. Portanto, com este eletroferograma não é possível concluir que o pico em 8,63 min⁻¹ refere-se à estreptomicina, sendo necessário um estudo mais aprofundado das possíveis interações entre o fármaco e outras moléculas do meio, modificando a mobilidade eletroforética da estreptomicina.

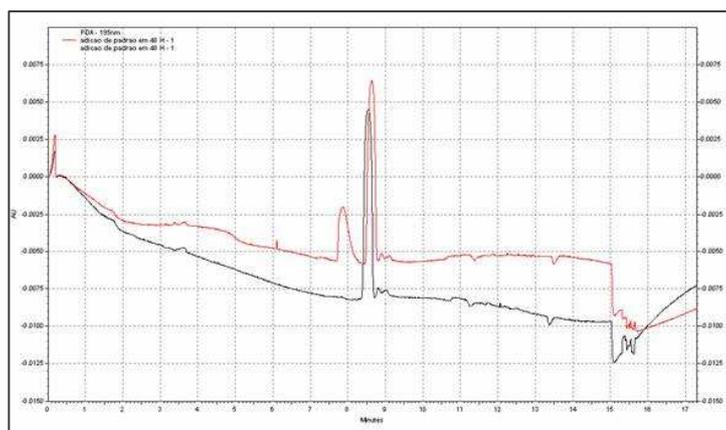


Figura 27: Eletroferograma obtido para a amostra de 48 h de liberação da estreptomicina (curva em preto) com a adição de padrão de 1100 mg.L⁻¹ de estreptomicina (curva em vermelho).

4.8. Estudo citotóxicos

4.8.A. Estreptomicina livre

Nos estudos citotóxicos da estreptomicina (STM) livre foi observado que a STM apresentou baixa toxicidade nos alvos celulares analisados (VN, MTT e AN) em culturas de células V-79, não atingindo o IC₅₀ até a concentração estudada (de 2000 μmol.L⁻¹) (Figura 28). Resultados similares também foram obtidos para as células Vero e hepatócitos.

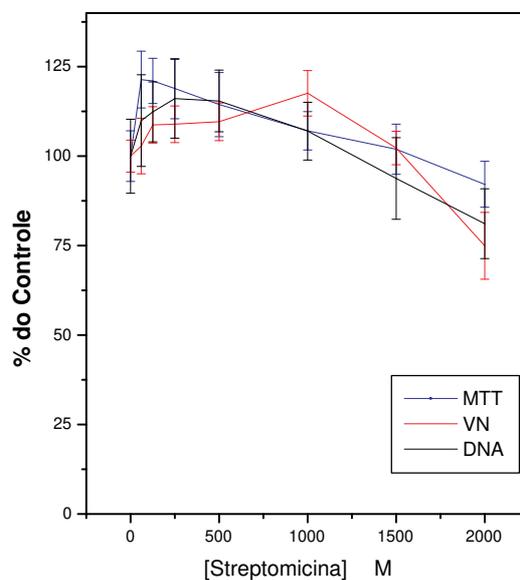


Figura 28: Viabilidade das células V-79 na análise dos alvos celulares MTT, VN e DNA para STM livre.

4.8.B. Micropartículas com e sem Estreptomicina

As micropartículas com e sem fármaco foram testadas em cultura de células V79. Neste experimento, foi observada uma alteração no lisossoma quando a célula foi exposta às micropartículas com e sem fármaco (figura 29). A figura 29A mostra uma fotografia de células V-79 mantidas por 24 h em meio DMEM seguidas de 4 h em contato com o corante VN. A figura 29B refere-se a ampliação da parte circulada da figura 29A. Comparando a fotografia da figura 29B com a fotografia da figura 29C que refere-se a células V-79 mantidas por 24 h em meio DMEM com micropartículas de PHBV-9,8% HV ($92.000 \text{ g.mol}^{-1}$) por 24 h seguidas de 4 h com corante VN (figura 29C), observa-se um aumento no lisossoma evidenciado por um aumento na captura do corante VN pelas células. Esta diferença também foi verificada quantitativamente como mostra a figura 30. Nesta figura, observa-se um aumento de cerca de 5 vezes, em relação ao controle, na captura do corante VN pelas células em contato com micropartículas com e sem estreptomicina em

relação ao controle. O aumento na captura deste corante pode estar relacionado com a presença de resíduos de estabilizante PVA na superfície da partícula. De acordo com Renzi e col. (1993), tensoativos tem a habilidade de solubilizar a membrana fosfolipídica, facilitando a entrada do corante VN para o lisossoma. Já na análise de redução do MTT, não foi observada alteração na mitocôndria das células, uma vez que, não houve variação nos valores percentuais de absorção do corante em relação ao controle (figura 30).

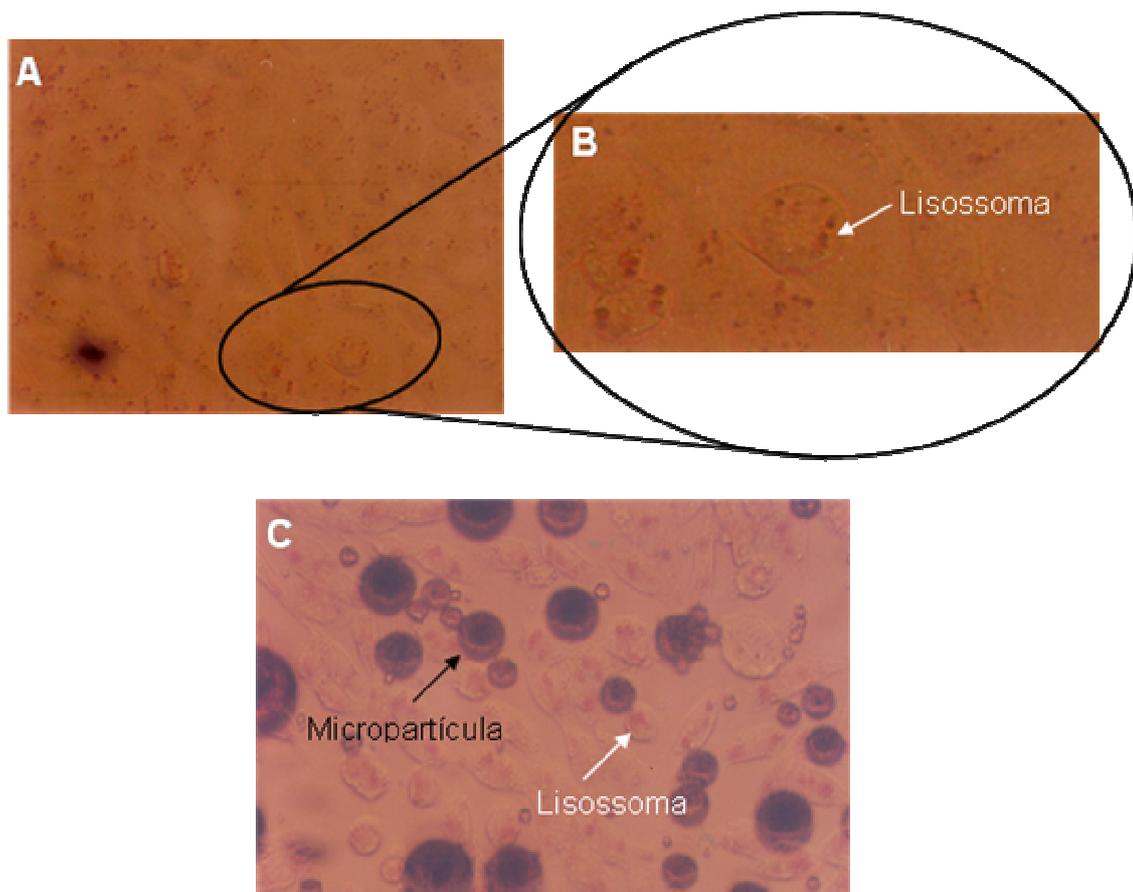


Figura 29: Imagem de Microscopia óptica das células V-79: A) Controle; B) Ampliação da parte circulado do Controle (A); C) com micropartículas de PHBV-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) sem STM.

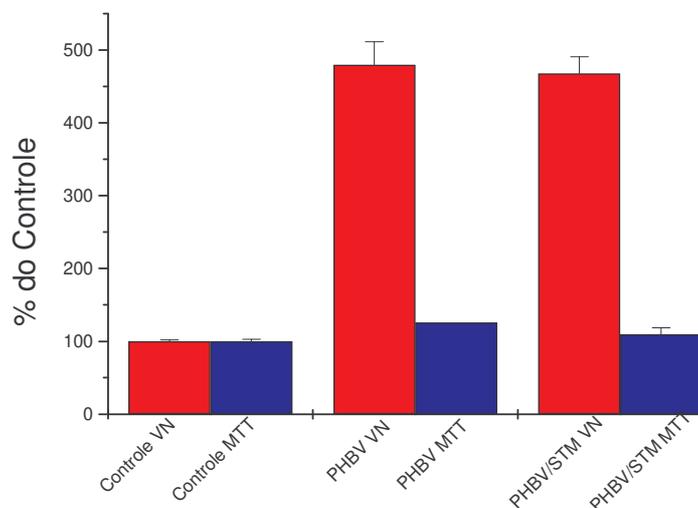


Figura 30: Gráfico comparativo da viabilidade das células V-79 na presença de STM encapsulada em micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) na concentração de 500 µmol.L⁻¹ e na presença de micropartículas de PHBV-9,8 % HV (MM 92.000 g.mol⁻¹) sem STM.

4.9. Estudo da atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados frente a duas cepas de bactérias: *S. lentus* e *E. coli* nas concentrações de 280 e 150 µg.mL⁻¹, respectivamente. Nestes testes, foram comparadas as eficiências da estreptomicina livre e encapsulada em micropartículas de PHB-9,8% HV (MM 92.000 g.mol⁻¹). A estreptomicina encapsulada apresentou menor eficiência em relação a estreptomicina livre no teste com a bactéria *E. coli*. Entretanto, no teste com a cepa *S. lentus*, a estreptomicina encapsulada demonstrou maior eficiência em relação a estreptomicina livre, como mostram os dados da tabela 3.

Tabela 3: Medidas do halo de inibição nos testes frente às cepas *E. coli* e *S. lentus* da STM livre e encapsulada em micropartículas e PHB-9,8% HV ($MM\ 92.000\ g.mol^{-1}$).

Cepa bacteriana	Concentração	Halo (cm)
<i>E. coli</i>	STM livre ($150\ \mu g.mL^{-1}$)	1,8
	STM em micropartículas de PHBV ($150\ \mu g.mL^{-1}$)	1,0
<i>S. lentus</i>	STM livre ($280\ \mu g.mL^{-1}$)	2,0
	STM em micropartículas de PHBV ($280\ \mu g.mL^{-1}$)	3,0

5. CONCLUSÕES

Dentre os dois métodos de preparação de partículas estudados, observou-se que o método mais eficiente foi o de dupla emulsão e evaporação de solvente. Com este método, foram obtidas micropartículas de PCL e de PHBV de diferentes massas molares e porcentagem de HV. Observou-se que a massa molar é um fator que altera o diâmetro médio das partículas, sendo que, menores valores de massa molar, reduzem o diâmetro das partículas de PHBV. Outro fator que contribuiu para a diminuição do diâmetro médio das partículas de PHBV e PCL foi a realização da evaporação do solvente à baixa pressão. Além disto, verificou-se que alterações no método, como a adição de um co-solvente na fase orgânica, alteram a morfologia das partículas de PHBV tornando-as maiores e mais porosas. No estudo de degradação das micropartículas de PHBV durante 15 dias, foi observado que estas coalescem e podem estar perdendo camadas, além de sofrerem erosão, podendo ser esta uma das vias de liberação do fármaco para o meio externo.

A eficiência de encapsulamento da estreptomicina em micropartículas de PHB-9,8% HV ($92.000\ g.mol^{-1}$), quantificada por eletroforese capilar, foi de $43 \pm 4\%$. Pode-se ainda utilizar outra técnica analítica com maior robustez para quantificar a estreptomicina encapsulada.

Nos estudos de citotoxicidade da estreptomicina livre em culturas de células V-79, hepatócitos e Vero foi verificada baixa toxicidade nos alvos celulares

(“endpoints”) estudados (VN, MTT e AN), sendo necessário analisar outros alvos celulares, como o swelling mitocondrial ou testes *in vivo*.

Nos estudos da atividade antimicrobiana pelo método do halo de inibição frente à cepa *E. coli* foi verificada menor eficiência da estreptomicina encapsulada em relação à estreptomicina livre. Entretanto, nos testes com *S. lentus*, a estreptomicina encapsulada mostrou maior eficiência do que a estreptomicina livre.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram um promissor método de obtenção de micropartículas com diâmetro, morfologia e porosidade controladas, utilizando os polímeros biodegradáveis PHBV e PCL, e a utilização destas partículas no encapsulamento de fármacos hidrofílicos para sistemas de liberação sustentada.

6. REFERÊNCIAS

- Armani, D.K.; Liu, C. (2000). Microfabrication technology for polycaprolactone, a biodegradable polymer. *J. Micromech. Microeng.* 10, 80-84.
- Anisimova, Y.V.; Gelperina, S.I.; Peloquim, C.A.; Heifets, L.B. (2000). Nanoparticles as antituberculosis drugs carriers: effect on activity against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocyte-derived macrophages. *J. Nanoparticle Res.* 2, 165-171.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução nº 899, 2003, 1-13.
- Arshady, R. (1991). Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: Polylactides and related polyesters. *J. Control. Release* 17, 1-22.
- Atkins, P. W., 1998, *Physical Chemistry*, Chapter 6, 6th edn (Oxford: Oxford University Press).
- Baran, E.T.; Ozer, N.; Hasirci, V. (2002). Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an *in vitro* study. *J. Microencapsul.* 19, 363-376.
- Borefreund, E.; Puerner, J.A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (Htd/NR 90). *J. Tiss. Cult. Methods* 9, 7-9.
- Chen, D.R.; Bei, J.Z.; Wang, S.G. (2000). Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* 67, 455-459.
- Centers of Diseases Control (1999). Primary mult-drug-resistant tuberculosis-Ivanovo Oblast, Russia. *Morb. Mortal Weekly Rep.* 48, 661-663.
- Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (1998). Prof. Alexandra Uranjac.
- Chung, T.W.; Huang, Y.Y.; Tsai, Y.L.; Liu, Y.Z. (2002). Effects of solvent evaporation rate on the properties of protein-loaded PLLA and PDLLA

- microspheres fabricated by emulsion-solvent evaporation process. *J. microencapsul.* 19, 463-471.
- Cingi, M.R., De Angelis, I., Fortunati, E., Reggiani, D., Bianchi, V., Tiozzo, R. and Zucco, F. (1991). Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. *Toxicol. In Vitro* 5, 119–125.
- Coll, P. (2003). Drugs whit activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infermedades infecc. Microbiol. Clin.* 21, 299-308. Chem. Abstr. 16, 1676.
- Conway, B.R.; Eyles, J. E.; Alpar, H.O. (1997). A comparative study on the imune responses to antigens in PLA and PHB microspheres. *J. Control. Release* 49, 1-9.
- Corrêa, D. H. A.; Melo, P. S.; Carvalho, C. A. A. de.; Azevedo, M. B. M. de.; Durán, N.; hauN, M. (2005). Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 510, 17-24.
- Couvreur, P.; Dubernet, C. Puisieux, F. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles : current possibilities and future trends. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy*, 41, 2-13.
- De Oliveira, A. G.; Andreo Filho, N. (1999). Sistemas de Micro/Nanoencapsulação de Fármacos. *Infarma* 9, 18-19.
- Denizot, F.; Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271–277.
- Dhanaraju, M.D.; Vema, K.; Jayakumar, R.; Vamsadhara, C. (2003). Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones. *Int. J. Pharm.* 268, 23-29.
- Durán, N.; De Azevedo, M.M.M. (2002). Rede de pesquisa em nanobiotecnologia. Disponível em <www.comciencia.br>, 1-7. Acesso em: 20 de outubro 2005.
- Edlund, U.; Albertsson, A.C. (2002). Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. *Adv. Polym. Sci.* 157, 67-112. Chem. Abstr. (2003) 42, 249.
- Eisenbrand, G.; Pool-Zobel, B.; Baker, V.; Balls, M.; Blaauboer, B.J.; Boobis, A.; Carere, A.; Kevekordes, S.; Lhuguenot, J.C.; Pieters, R., Kleiner, J. (2002). Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 40, 193-236.
- Ferdous, A.J.; Stenbridge, N.Y.; Singh, M. (1998). Role of monesion PLGA polymer nanoparticles and liposomes as potentiator of ricin A immunotoxins *in vitro*. *J. Control. Release* 50, 71-78.
- Gangrade, N.; Price, J.C. (1991). Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties. *J. Microencapsul.* 8, 185-202.
- Ganhadharan, P.R.J.; Ashtekar, D.A.; Ghor, N.; Goldstein, J.A.M.; Debs, R.J.; Duzgunes, N. (1991). Chemotherapeutic potential of free and pilosome encapsulated streptomycin against experimental *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *J. Antomicrob. Chemother.* 28, 425-435.
- Goldstein, J.I.; Newbury, D.E.; Echlin, P.; Joy, D.C.; Romig, A.D.; Lyman, C.E.; Fiori, C.; Lifshin, E. (1992). Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis, 2^o Edição, New York, NY, Plenium Press, 10-80.

- Gurkan, H.; Yalabik-Kas, H.S.; Sumnu, M.; Hincal, A.A. (1987). Streptomycin sulfate microspheres: Dissolution rate studies and release kinetics-I. *J. Microencapsul.* 4, 39-46.
- Hincal, A.A.; Kas, H.S. (1988). Targeting of immobilized drugs. NATO ASI Ser. Ser. C. 226. *Anal. Immobilized Biol. Compd. Detect. Med. Ind. Uses* 95-113.
- Iseman, M. D. (2002). Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur. Respiratory J.* 20(suppl.36), 87S-94S.
- Krähenbühl, O.; Tschopp, J. (1991). Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today.* 12, 399-402.
- Kim, G.J.; Bang, K.H.; Kim, Y.B.; Rhee, Y.H. (2000). Preparation and characterization of native poly(3-hydroxybutyrate) microspheres from *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol. Lett.* 22, 1487-1492.
- Kumar, M.V.; Jayaswal, S.B.; Gupta, V.K. (1994). Preparation and *in vitro* evaluation of streptomycin sulfate loaded albumin microspheres for lung targeting. *Pharmazie* 49, 691-692.
- Lee, S.C.; Oh, J.T., Jang, M.H.; Chung, S.I. (1999). Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D,L - lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration. *J. Control. Release* 59, 123-132.
- Li, Y.M.; Debremaeker, D.; Van Schepdael, A.; Roets, E.; Hoogmartens, J. (2000). Simultaneous analysis of streptomycin, dihydrostreptomycin and their related substances by capillary zone electrophoresis. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 23, 2979-2990.
- Lu, E.; Onyuksel, H.; Franzblau, S.; Zhang, F.; Wang, Y.; Popescu, C. (2003). Characterization and oral efficacy of streptomycin loaded chitosan nanoparticles. In *30th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*, Glasgow, UK, 19-23 de julho, Abstract 282.
- Lu, Z.; Bei, J. Z.; Wang, S. G. (1999). A new stabilize used in microencapsulation. *J. Microencapsul.* 16, 523-529.
- Maia, J.L.; Santana, H.A.; Ré, M.I. (2004). The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Braz. J. Chem. Eng.* 21, 1-12.
- Merkli, A.; Tabatabay, C.; Gurny, R.; Heller, J. (1998). Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Prog. Polym. Sci.* 23, 563-580.
- Miyazaki, S.; Takahashi, A.; Kubo, W. (2003). Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as a carrier for NSAIDs: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. *J. Pharmaceut. Sci.* 6, 240-245.
- Ministério da saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) (2001). Tuberculose, http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/Tuberculose/tuberculose_00.htm, acessado em 28/01/2006.
- Mingeot-Leclercq, M.P.; Tulkens, P.M. (1999). Aminoglycosides: nephrotoxicity. *J. Antimicrob. agents Chemother.* 43, 1003-11012.
- Murillo, M.; Gamazo, C.; Goñi, M.M.; Irache, J.M.; Blanco-Preito, M.J. (2002). Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. *Inter. J. Pharm.* 242, 341-344.

- Panyam, J.; Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.* 55, 329-347.
- Pranoto, Yudi; Salokhe, V.M.; Rakshit, S.K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Res. Int.* 38, 267-272.
- Picos, D.R.; Carril, M.G.; Mana, D.F.; Fuente, L. N. (2000). Microspheres biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Rev. Cubana Farm.* 34, 70-77.
- Pouton, C.W.; Akhtar, S. (1996). Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 18, 133-162.
- Qurrat-ul-Ain; Sharma, S.; Khuller, G.K.; Garg, S.K. (2003). Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 931-938.
- Ramesh, D.V.; Medlicott, N.; Razzak, M.; Tucker, I.G. (2002). Microencapsulation of fitc-BSA into poly(ϵ -caprolactone) by a water-in-oil-in-oil solvent evaporation technique. *Trends Biomater. Artif. Organs.* 15, 31-36.
- Renzi, D.; Valtolina, M.; Forster, R. (1993). The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA-Altern. Lab. Anim.* 21, 89-96.
- Rosca, I. D.; Watari, F.; Uo, M. (2004). "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation". *J. Control. Release* 99, 271-280.
- Rossi, S.; Azghani, A. O.; Omri, A. (2004). Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid)controlled release system. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 1013-1018.
- Ruiz, P.; Rodriguez-Cano, F.; Zerolo, F. J.; Casal, M. (2002). Investigation of the *in vitro* activity of streptomycin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb. Drug Resist.-Mechan. Epidemiol. Dis.* 8, 147-149.
- Souza, M. V. N.; Vasconcelos, T. R. A. (2005). Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Quim. Nova* 28, 678-682.
- Sjoblom, J. (1996). Emulsions and emulsion stability. N.Y., M Dekker, v 8, 902-923.
- Sudesh, K.; Abe, K.; Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progr. Polym. Sci.* 25, 1503-1555.
- Steinbuchel, A. (1996). PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In.: Rehm, H.J.; Reed, G.; Roehr, M. (eds). *Products of primary metabolism*, 2 ed., Wiley: John & Sons, v. 6, 405-464.
- Talton, J.D.; Hochhaus, G.; Singh, R.K.; Fitz-Gerald, J.M. (2000). Medicaments useful for treating respiratory or pulmonary infections in humans, comprise coated drug particle of e.g. budesonide with first layer of polymeric coating particle of e.g. polylactic acid. WO200028969-A2. Derwent Number 2000-399635 [34].
- United States Pharmacopoeia Convention. The pharmacopoeia of the United States of America, Inc., meeting at Washington, D.C., March 29 and 30, 1960; prepared by the Committee of Revision and Published by the Board of Trustees, 635-637.
- Zhang, Z.; Lu, B.; Shu, G.; Xie, H.; Yi, Q.; He, Y.; Wang, J. (1995). Study on the lung targeting gelatin microspheres of streptomycin sulfate. *Hiayi Yike Daxue Xuebao* 26, 167-171. Chem. Abstr. 124, 211771.

- Yamori, S.; Ichiyama, S.; Tsukamuram, M. (1992). Bacteriostatic and bactericidal activity of antituberculosis drugs against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium-avium*, *Mycobacterium-intracellulare* complex and *Mycobacterium-KansasII* in different growth phases. *Microbiol. Immunol.* 36, 361-368.
- Yang, Y.; Bao, D.; Zeng, Z.; He, X.; Lu, B. (1998). Pharmacological study on the streptomycin sulfate gelatin microspheres lung targeting delivery system. *Zhongguo Kangshengsu Zazhi*, 23, 205-208. Chem. Abstr. (1998). 129, 325764.
- Yoon, Y.; Park, K. (2004). Control of Encapsulation Efficiency and Initial Burst in Polymeric Microparticle Systems. *Arch. Pharm. Res.* 27, 1-12.
- Youan, B.B.C.; Benoit, M.A.; Baras, B.; Gillard, J. (1999). Protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles. I. Optimization of the preparation by (water-in -oil)-in water emulsion solvent evaporation. *J. Microencapsul.* 16, 587-599.
- Youan, B.B.C.; Hussain, A.; Nguyen, N. (2003). Evaluation of Sucrose as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method. *AAPS Pharm. Sci.* 5, 1-9.
- Wang, S.; Lu, Z.; Bei, J. (1998). Method for preparation of polymer microcapsules of insulin, 5-Fu and streptomycin. Farming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1229646-A. Chem. Abstr. 133, 168423.
- Wakopak, HPLC application. Disponível em <http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/info/chromato/pdf_app/Drug/02.htm#20010214-2>. Acesso em 01 de setembro de 2005.
- Wei, S.L.; Gao, Z.H.; He, S.P.; Liu, H.J. (1990). Studies on streptomycin albumin microspheres for injection. *Yaoxue Xuebao* 25, 284-288. Chem. Abstr. 113, 103281.
- Wu, X.S.; He, W.H.; Li, L.J. (2003). Effect of Polymer Composition on Progesterone Release from poly(lactic-co-Glycolic Acid) microspheres. In. *30th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society*, Glasgow, UK, 19-23 de julho, Abstract 339.