



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**LILLIAN MARIA UCHÔA DUTRA**

**SISTEMAS MICELARES DE F127<sup>®</sup>, P123<sup>®</sup> E SUAS MISTURAS COMO  
NANOCARREADORES DOS FÁRMACOS GRISEOFULVINA E MANGIFERINA**

**FORTALEZA**

**2012**

LILLIAN MARIA UCHÔA DUTRA

SISTEMAS MICELARES DE F127<sup>®</sup>, P123<sup>®</sup> E SUAS MISTURAS COMO  
NANOCARREADORES DOS FÁRMACOS GRISEOFULVINA E MANGIFERINA

Dissertação Submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.  
Área de concentração: Química

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes  
Silva Ricardo

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Elenir Nobre  
Pinho Ribeiro

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- D975s Dutra, Lillian Maria Uchôa.  
Sistemas micelares de F127®, P123® e suas misturas como nanocarreadores dos fármacos griseofulvina e mangiferina / Lillian Maria Uchôa Dutra. – 2012.  
55 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação(mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2012.  
Orientação: Profa. Ph.D. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.  
Coorientação: Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.  
Área de concentração: Química.
1. Medicamentos. 2. Copolímeros. I. Título.

Esta dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração em Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se a disposição dos interessados.

*Lillian Maria Uchôa Dutra*

Lillian Maria Uchôa Dutra

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/10/2012

BANCA EXAMINADORA

*Nágila Maria Pontes Silva Ricardo*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo  
Universidade Federal do Ceará – UFC

*Pierre Basílio Almeida Fachine*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fachine  
Universidade Federal do Ceará – UFC

*Ma Elenir N. P. Ribeiro*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do  
Norte – IFRN

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a oportunidade de concluir mais uma etapa da minha vida com sucesso.

Ao meu pai Milton Júnior Dutra por orientar o meu caminho, feito de lutas e incertezas, mas também de muitas esperanças e sonhos.

A minha mãe Aceânia Loncarovici pelo apoio, por ser a voz que me acalma, meu porto seguro, pela preocupação e por querer o melhor para mim.

Aos meus irmãos Lucas Pinheiro e Neto Dutra pelo companheirismo de todos os dias, momentos que me fizeram esquecer as dificuldades.

A minha família por terem sido base, estando presente em minha vida nos nas horas que mais precisei.

Aos meus amigos que tornaram mais doce e prazerosa a vida, que são apoio nos dias de dificuldade e com quem posso compartilhar minhas alegrias e tristezas.

A Professora Dra Nagila Ricardo por acreditar e confiar na minha capacidade como pesquisadora.

A Professora Dra Elenir Ribeiro por ter se dedicado de maneira indispensável ao nosso trabalho.

As alunas de iniciação Luana Semião, Raquel Freitas e Débora Hellen pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais por tornarem os dias de trabalho mais agradáveis.

A UFC, minha segunda casa, meu incomensurável orgulho pelo formidável auxílio no desenvolvimento de pesquisa.

A FUNCAP, sem cujo investimento a execução deste trabalho não teria sido possível.

A banca examinadora pelas palavras de contribuição para o melhor desempenho deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente participaram desse momento, deixo aqui meu obrigado, de verdade.

## RESUMO

O estudo sobre a utilização de copolímeros na dissolução de fármacos pouco solúveis em água vem sendo cada vez mais praticado, devido, principalmente, à baixa toxicidade desses carreadores e da sua alta eficiência no processo de dissolução. Com o uso de copolímeros surfactantes, que formam micelas em solução, é possível aumentar a solubilidade e controlar o tempo e/ou atuar na liberação de fármacos hidrofóbicos no organismo. Os copolímeros triblocos anfifílicos denominados  $E_mP_nE_m$  (Pluronic®), P123 ( $E_{21}P_{69}E_{21}$ ) e F127 ( $E_{98}P_{69}E_{98}$ ), onde E representa o monômero óxido de etileno  $[-(OCH_2CH_2)-]$ , P, o monômero óxido de propileno  $[-OCH_2CH(CH_3)-]$ , e os subscritos  $m$  e  $n$  denotam o comprimento do bloco, estão sendo alvos desta pesquisa devido as suas propriedades de formação de gel a temperatura ambiente (termorresponsividade), possibilitando a aplicação subcutânea, e sua capacidade de solubilização de ativos lipofílicos no núcleo micelar de polioxipropileno (Pn). Misturas binárias de Pluronic® de hidrofobicidades semelhantes, em sua grande maioria, apresentam capacidade de solubilização maior que para os Pluronic® sozinhos. Assim, visando potencializar a solubilização dos fármacos griseofulvina, fármaco modelo utilizado em vários trabalhos, e mangiferina, ativo antioxidante, e promover a maior biodisponibilidade desses fármacos no organismo, sistemas de micelas mistas compostas por F127 e P123 será o foco dessa pesquisa, com finalidade de unir suas propriedades geleificantes e de biocompatibilidade para aplicação subcutânea.

**Palavras-chave:** Nanocarreadores, Griseofulvina, Mangiferina.

## ABSTRACT

The use of copolymers in the dissolution of poorly soluble drugs in water is being increasingly practiced, principally, due to the low toxicity of these carriers and their high efficiency in the dissolution process. Using copolymer surfactants, which form micelles in solution, can enhance the solubility and control the time and act in the release of hydrophobic drugs in the body. The amphiphilic triblock copolymers known  $E_mP_nE_m$  (Pluronic®), P123 ( $E_{21}P_{67}E_{21}$ ) and F127 ( $E_{98}P_{67}E_{98}$ ), where E is the ethylene oxide monomer  $[-(OCH_2CH_2)-]$  and P, propylene oxide monomer  $[-OCH_2CH(CH_3)-]$ , and the subscripts,  $n$  and  $m$ , denote the block length, being targets of this research due to their gelling properties at room temperature, enabling the application subcutaneous, and its ability to solubilise the active lipophilic in the micellar core. Binary mixtures of Pluronics® of similar hydrophobicities, mostly, show greater solubilisation capacity for Pluronics® alone. Thus, in order to enhance the solubilisation of griseofulvin drugs, drug model used in several works, and mangiferin, active antioxidant, and promote greater bioavailability of these drugs in the body systems of mixed micelles composed of F127 and P123 will be the focus of this research, in order to unite their gelling properties and biocompatibility for subcutaneous administration.

**Keywords:** Nanocarriers. Griseofulvin. Mangiferin.

## SUMÁRIO

<b><u>1. INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b>8</b>
1.1. COPOLÍMEROS EM BLOCO.....	8
1.2. MICELIZAÇÃO .....	11
1.3. SURFACTANTES .....	12
1.3.1. BALANÇO HIDROFÍLICO-LIPOFÍLICO (HLB) .....	13
1.3.2. PLURONICS .....	14
1.4. APLICAÇÃO DOS COPOLÍMEROS NA ADMINISTRAÇÃO DOS FÁRMACOS.....	16
1.4.1. ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS .....	16
1.4.2. CINÉTICA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA .....	17
1.4.3. SISTEMAS MICELARES COMO CARREADORES DE FÁRMACOS .....	18
1.4.4. $E_N P_M E_N$ .....	18
1.4.5. SOLUBILIZAÇÃO DE FÁRMACOS EM SISTEMAS MICELARES .....	19
1.5. FÁRMACOS AROMÁTICOS UTILIZADOS NA PESQUISA .....	20
<b><u>2. JUSTIFICATIVA DA PESQUISA</u></b> .....	<b>22</b>
<b><u>3. OBJETIVOS</u></b> .....	<b>23</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b><u>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</u></b> .....	<b>24</b>
4.1. MATERIAIS .....	24
4.2. MISTURAS BINÁRIAS DOS COPOLÍMEROS.....	24
4.3. CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) .....	24
4.4. SOLUBILIZAÇÃO DOS FÁRMACOS .....	25
4.5. TAMANHO DE PARTÍCULA .....	2
4.6. LIBERAÇÃO IN VITRO.....	2
<b><u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b> .....	<b>30</b>
5.1. CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA .....	30
5.2. SOLUBILIZAÇÃO DOS FÁRMACOS .....	35
5.3. TAMANHO DE PARTÍCULA .....	41
5.4. LIBERAÇÃO IN VITRO.....	45
<b><u>6. CONCLUSÃO</u></b> .....	<b>51</b>
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b> .....	<b>52</b>



## 1. INTRODUÇÃO

---

A utilização de copolímeros na dissolução de fármacos pouco solúveis em água vem sendo cada vez mais estudada, devido, principalmente, à baixa toxicidade desses carreadores e da sua alta eficiência no processo de solubilização. Com o uso de uma solução de copolímero é possível controlar a liberação de fármaco no organismo (OLIVEIRA e LIMA, 2006). Segundo Gaucher *et al.*, (2005) as interações hidrofóbicas ou eletrostáticas são as forças de separação entre o núcleo micelar e o meio aquoso circundante na formação das micelas.

Em especial, os copolímeros em bloco de caráter anfifílico têm despertado um grande interesse por formarem micelas em solução aquosa (LETCHFORD e BURT, 2007), o que viabiliza o carregamento de fármacos.

Os copoli(oxialquileno)s em bloco, preparados a partir do óxido de etileno e do óxido de propileno, têm sido bastante explorados, quanto a capacidade de solubilização de fármacos pouco solúveis em água como por exemplo a griseofulvina (CROTHERS *et al.*, 2005; DONG, CHOWDHRY e LEHARNE, 2006).

Estudos físico-químicos de misturas binárias de copolímeros com diferentes hidrofobicidades vêm sendo relatados há algum tempo (RICARDO *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2005). No entanto, a potencialidade dessas misturas quanto à solubilização de fármacos pouco solúveis em água foi investigada por Pinho *et al.*, (2007). Segundo Kyung, Bronich e Kabanov (2004) as misturas de Pluronic de hidrofobicidades semelhantes apresentaram capacidade de solubilização maior do que os Pluronic isolados. Lee *et al.*, (2011) relataram que a solubilidade do fármaco aumenta com a mistura de copolímeros triblocos com diferentes balanço hidrofílico- lipofílico (HLB), principalmente com o aumento da proporção do copolímero mais hidrofóbico.

Nesse contexto, estudos de misturas binárias de copolímeros em bloco, do tipo  $E_nP_mE_n$ , mostram-se promissores como nanocarreadoras de fármacos pouco solúveis em água.

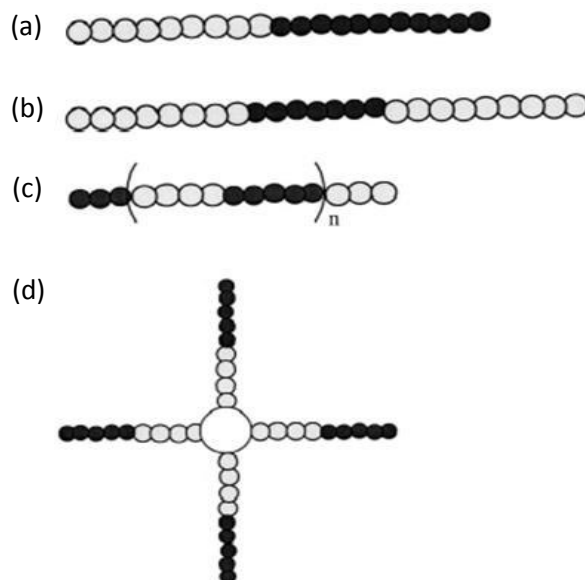
### 1.1. Copolímeros em bloco

Polímeros que contêm apenas uma unidade monomérica são chamados de homopolímeros, enquanto os que contêm duas ou mais unidades monoméricas diferentes são

conhecidos como copolímeros. De acordo com a disposição de seus monômeros, os copolímeros podem ser divididos em quatro classes: em bloco, alternado, estatístico, e enxertado (YOKOYAMA, 1992).

Os copolímeros em bloco são formados por uma sequência de monômeros A ligados covalentemente a uma sequência de monômeros B, como é o caso do EVA (formado por um bloco de polietileno e um bloco de poliacetato de vinila). Os copolímeros em bloco podem ser classificados em grupos, de acordo com a disposição de seus blocos, como mostra a Figura 1.

Figura 1. Diferentes tipos de copolímeros em bloco: (a) dibloco, (b) tribloco, (c) multibloco e (d) estrela (KUMAR, RAVIKUMAR e DOMB, 2001).



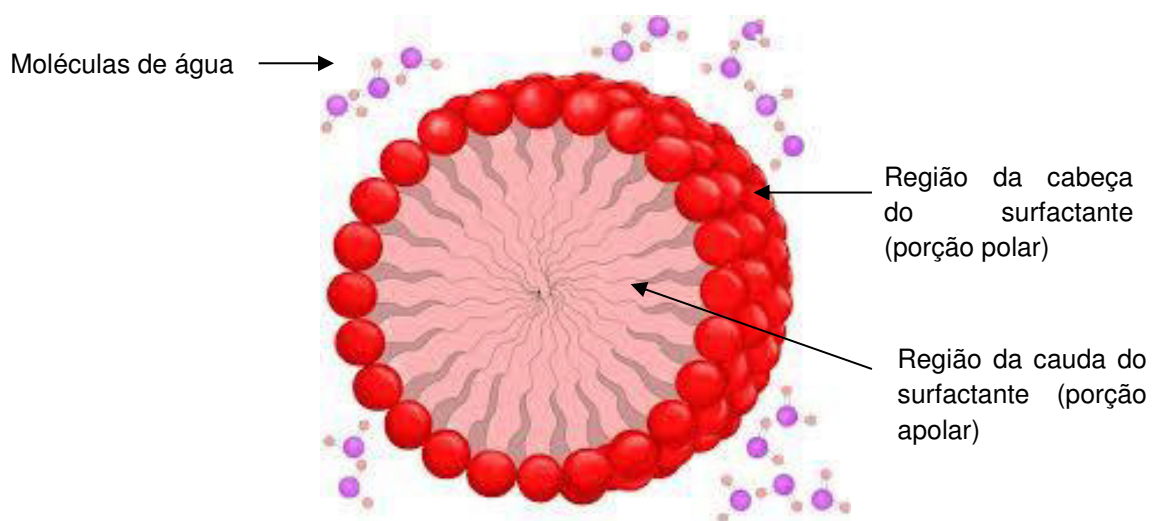
O mais simples copolímero em bloco é o tipo  $A_mB_n$ , onde o homopolímero  $A_m$  encontra-se ligado ao homopolímero  $B_n$  sendo chamado de copolímero dibloco (Figura 1a). O segundo tipo de copolímero, chamado de tribloco, é constituído do homopolímero  $B_n$  com ambas as terminações ligadas a homopolímeros  $A_m$  (Figura 1b). No terceiro tipo, os segmentos  $A_m$  e  $B_n$  ligados são repetidos muitas vezes e é chamado de multibloco (Figura 1c). O quarto tipo de copolímero em bloco é chamado de estrela, onde a unidade  $A_m$  com muitos braços funcionalizados copolimeriza em bloco com os blocos  $B_n$  e apresenta-se na forma de estrela. É evidente que o número de braços no copolímero em bloco estrela depende do

número de grupos funcionais no bloco A (Figura 1d) (KUMAR, RAVIKUMAR e DOMB, 2001).

Copolímeros em bloco são surfactantes que podem apresentar caráter anfifílico, dependendo de sua composição, e possuem um bloco hidrofóbico (apolar) e um bloco hidrofílico (polar), e em solução aquosa (ou em um solvente seletivo para apenas uma das porções) tendem a se concentrar nas interfaces do sistema por adsorção, pois minimizam as interações desfavoráveis visando reduzir a energia livre do sistema. Uma das conseqüências desse fenômeno de interfaces é a redução da tensão superficial da água, o que aumenta o seu poder de “molhabilidade” (MYERS, 1992).

À medida que a concentração do surfactante em uma solução aumenta, as interfaces do sistema começam a saturar, e a estabilização do sistema pode continuar por outros mecanismos, como cristalização, precipitação, ou formação de vesículas e/ou micelas de surfactante (MYERS, 1992). A formação dessas micelas (Figura 2) é impulsionada pela hidrofobicidade das porções apolares de suas moléculas e pela hidrofiliicidade das porções polares. Essas moléculas se agregam de formas variadas (esféricas, cilíndricas, lamelares...) com sua porção hidrofóbica constituindo a parte interna (núcleo) e a porção hidrofílica, a parte externa (corona).

Figura 2. Estrutura simplificada de uma micela esférica em meio aquoso (FORMAÇÃO DE MICELAS, 2012).



Corte transversal na estrutura 3D de uma micela

## 1.2. Micelização

Há dois modelos clássicos que explicam o processo de micelização: o modelo de ação das massas, onde as micelas e suas espécies formadoras estão em uma espécie de equilíbrio químico, e o modelo de separação de fases, onde as micelas são consideradas uma nova fase formada no sistema a partir de uma dada concentração, a concentração micelar crítica (cmc). A análise dos dois modelos produz praticamente os mesmos resultados gerais em termos energéticos de formação de micelas.

A concentração micelar crítica é a mais importante característica físico-química de um tensoativo, pois representa a barreira entre concentrações em que as moléculas têm comportamento diferente, sendo importante seu conhecimento para que se possa entender as aplicações possíveis de cada tensoativo (DALTIM, 2011).

A concentração micelar crítica (cmc) é a concentração mais baixa em que um surfactante livre está em equilíbrio com as micelas, existindo um equilíbrio dinâmico em concentrações superiores a cmc, em que a constante de equilíbrio é variável com o aumento da concentração do surfactante, pois o equilíbrio se desloca para a concentração de tensoativo organizado em micela (DALTIM, 2011).

Segundo Daltin (2011), a cmc de um surfactante pode ser determinada por qualquer propriedade físico-química que seja alterada pela organização das moléculas em micelas, como tensão superficial e solubilização.

Alexandridis, Holzwarth e Hatton (1994) estudaram métodos de determinação da cmc para copolímeros em bloco utilizando a solubilização de corante hidrofóbico com detecção por UV-Visível e Fluorescência, pois sua solubilização em meio aquoso depende da existência de micelas.

Outro parâmetro importante é a temperatura micelar crítica (tmc) do surfactante, que é a temperatura a partir da qual, numa dada concentração, as moléculas começam a se agregar em micelas. A temperatura atua de forma diferente sobre a solubilidade dos diferentes tipos de tensoativos em água (DALTIM, 2011). Os surfactantes não iônicos têm sua solubilidade diminuída com o aumento da temperatura, e espera-se a redução da sua cmc com a temperatura, já que a solubilidade interfere na cmc dos tensoativos (DALTIM, 2011).

Vale ressaltar que, além da cmc e tmc, outras características importantes da micelização dos copolímeros são o número de agregação ( $n$ ) e o raio hidrodinâmico ( $r_h$ ).

O número de agregação da micela é o número de moléculas (unímeros) que formam a micela. Ele depende das características moleculares do copolímero, da temperatura e da sua concentração. Em geral, um aumento de temperatura favorece um aumento de  $n$ . O raio hidrodinâmico ( $r_h$ ) da micela, que corresponde ao tamanho das micelas, é obtido através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, que mede o movimento Browniano das partículas suspensas em um líquido e o relaciona com o seu tamanho. O raio hidrodinâmico (ou raio de Stokes) é o raio da esfera rígida que promove a mesma difusão de luz das micelas. A equação usada para essas medidas é a equação de Stokes-Einstein. Estes parâmetros, em geral, também crescem com a temperatura (DALTIM, 2011).

Foi observado que a variação da cmc com a temperatura é um indicativo de que o calor de formação ( $\Delta H^\circ$ ), ou entalpia padrão de micelização, é um processo endotérmico, com  $\Delta G^\circ < 0$ , sendo um processo espontâneo de micelização (DALTIM, 2011).

Um fenômeno interessante acontece com vários copolímeros com bloco hidrofílico de polioxietileno. Eles apresentam o chamado “cloud point” ou “clouding temperature” (“ponto de turvação” ou “temperatura de nuvem”). À medida que a temperatura do sistema aumenta, sua solubilidade em água diminui devido à quebra das ligações de hidrogênio entre o polioxietileno e a água, e ele começa a formar uma segunda fase que confere turbidez ao sistema, e a temperatura a partir da qual ele forma essa nova fase é conhecida como “cloud point” e suas propriedades surfactantes podem ser perdidas a partir de então (DALTIM, 2011).

### **1.3.Surfactantes**

Os tensoativos ou surfactantes apresentam afinidade por óleos, gorduras e superfícies das soluções com sólidos, líquidos ou gases, mas também pela água, pertencendo aos dois meios. Essa propriedade permite ao surfactante conciliar fases imisíveis, formando emulsões, espumas, suspensões, microemulsões ou propiciando a umectação, formação de filmes líquidos e detergentes de superfícies. Assim, os tensoativos podem ter aplicações como detergentes, agroquímicos, cosméticos, tintas, cerâmicas, alimentos, tratamento de couro e têxteis, formulações farmacêuticas e óleos lubrificantes (DALTIM, 2011).

Os surfactantes são classificados de acordo com sua porção hidrofílica (polar). Quando a região polar apresenta carga negativa, este tipo de surfactante é chamado de aniônico. Alguns exemplos de grupos aniônicos são: o carboxilato, sulfato, sulfonato e o fosfato. Existem também tensoativos cuja parte polar apresenta cargas positivas, conhecido como surfactantes catiônicos. Um exemplo é o dodecanoato de sódio, pois a parte polar é formada pelo nitrogênio quaternizado. Os surfactantes anfóteros (zwitteriônicos) se comportam como aniônicos ou catiônicos, dependendo do pH da solução em que se encontram. Para isso apresentam tanto a carga negativa quanto a positiva na mesma molécula. Os mais comuns são as cocoamidopropilbetaínas, sendo utilizados em xampus de baixa irritabilidade ocular. Existe ainda outra classe de surfactantes conhecido como não iônicos (DALTIM, 2011).

Os tensoativos não iônicos não se dissociam em íons em solução aquosa e, por isso, são compatíveis com qualquer outro tipo de tensoativo, sendo muito utilizados para formulações complexas, tanto de uso doméstico quanto industrial (DALTIM, 2001).

Na grande maioria dos tensoativos não iônicos a parte polar é formada de um poliéter, óxido de eteno, polimerizado ligado a uma parte apolar (DALTIM, 2011). Dentre os tensoativos etoxilados existem diversas classes que podem ser distintas: o alquil-fenol etoxilado, o éster etoxilado, a amina etoxilada, os ácidos graxos etoxilados, o álcool etoxilado e os copolímeros de óxidos como óxido propileno-etileno referidos às vezes como surfactantes poliméricos (NITSCHKE, 2002).

### **1.3.1. Balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)**

Os tensoativos são tipicamente moléculas anfifílicas que contêm grupos hidrofílicos e lipofílicos. O balanço hidrofílico-lipofílico (número HLB) é usado como uma medida da relação entre estes grupos. O valor pode variar entre 0-60 e definem a afinidade de um agente tensoativo em água ou óleo. Números de HLB são calculados para os surfactantes não iônicos, e esses agentes tensoativos têm números que variam de 0-20. Números de HLB > 10 tem uma afinidade pela água (hidrofílica) e número HLB < 10 têm uma afinidade pelo óleo (lipofílica). Os surfactantes iônicos foram recentemente designados valores relativos de HLB, permitindo que o intervalo de valores se estenda até 60 (DALTIM, 2011).

Para alcoóis graxos, alquilfenóis ou outras bases etoxiladas o HLB é calculado de acordo com as equações mostradas abaixo:

$$\text{HLB} = \frac{\% \text{ OE}}{5} \quad (1)$$

$$\text{HLB} = \frac{\text{MM}_{\text{parte hidrofílica}}}{\text{MM}_{\text{total}}} \times 20 \quad (2)$$

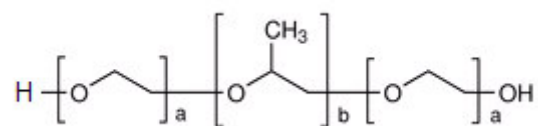
Onde % OE é a porcentagem de OE na molécula do tensoativo não iônico em peso, e MM é a massa molar.

A solubilidade do tensoativo varia de acordo com o HLB calculado. Quanto maior o HLB, mais solúvel em água é o tensoativo (DALTIM, 2011).

### 1.3.2. Pluronicos

Dentre os copolímeros com propriedades surfactantes, os que mais ganham destaque são os que possuem bloco hidrofílico de polioxietileno (MYERS, 1992). Um exemplo são os poliéteres ou polioialquilenos triblocos  $E_mP_nE_m$  (Figura 3), onde E denota a unidade monomérica óxido de etileno e P a unidade de óxido de propileno. Eles são conhecidos como Pluronic® e começaram a ser comercializados em 1951 pela BASF. Estudos quanto à sua micelização começaram a ser publicados em 1965 (SCHMOLKA e RAYMOND, 1965).

Figura 3. Estrutura geral dos Pluronicos®.



À medida que a concentração desses copolímeros aumenta, suas soluções começam a tornar-se mais viscosas até atingir um estado de gel imóvel. Wanka, Hoffman e Ulbricht (1990) propuseram que a geleificação acontece pelo empacotamento das micelas em mesofases cristalinas cúbicas, hexagonais ou lamelares, dependendo da forma das micelas. Os Pluronicos apresentam uma propriedade interessante, a termorresponsividade, que é a formação de gel imóvel com o aumento da temperatura.

Essa transição sol-gel é uma conseqüência de uma diminuição na solubilidade do copolímero em água com o aumento da temperatura, o sistema vai se tornando viscoso até atingir o estado de gel imóvel. A menor concentração a partir da qual se observa esse

fenômeno é a concentração crítica de formação de gel. Essa transição pode ser revertida com o abaixamento da temperatura ou, em algumas concentrações, o estado de gel possui uma temperatura máxima, acima da qual ele volta a ser fluido. Esse comportamento termorresponsivo tem sido explorado para uma vasta gama de sistemas carreadores de fármacos, onde o copolímero é usado como matriz para a administração subcutânea de fármacos por oferecer uma liberação controlada e prolongada.

Attwood e Booth (2007) estudaram a termodinâmica de micelização em soluções concentradas e diluídas de copolímeros do tipo  $E_nP_mE_n$ , e observaram que em soluções concentradas a fase contínua não é estruturada e o bloco polioxietileno é que contribui para a solubilização de fármacos.

Segundo Attwood e Booth (2007) a formação de gel sob aquecimento de soluções de copolímeros em bloco é dirigida pela entropia, que é a entropia padrão e a entalpia padrão de micelização, e são ambas positivas, refletindo o aumento da desordem em água quando o bloco hidrofóbico é removido para o núcleo da micela, chamado efeito hidrofóbico.

O valor da entalpia padrão de micelização é um indicador da magnitude do efeito hidrofóbico. Para esses copolímeros, especificamente, em soluções diluídas o valor é alto (150 – 350 KJ/mol) e em soluções concentradas (a partir de 10%) o valor é bem menor aproximadamente 20 KJ/mol. Esses valores consistem com a modificação do bloco em água e o enfraquecimento do efeito hidrofóbico (ATTWOOD e BOOTH, 2007).

Há duas técnicas bastante utilizadas no estudo do comportamento de formação de gel desses copolímeros em função da temperatura e da concentração: o método de inversão de tubo e a reologia (CHAIBUNDIT *et al.*, 2007). Nos dois métodos, soluções dos copolímeros em diferentes concentrações são analisadas quanto à formação de gel numa faixa de temperatura que normalmente varia de 10 a 90 °C. Os dados do estudo são apresentados num diagrama de fases, um gráfico de concentração *versus* temperatura. Nesse diagrama as fases são: solução ou fluido (“sol” ou “mobile”) e gel duro ou imóvel (“gel”, “hard gel” ou “immobile”) como mostra o trabalho de Pinho *et al.*, (2007). No entanto, podem-se mostrar fases mais específicas, caracterizando a turbidez, refração e textura do gel (CHAIBUNDIT *et al.*, 2007).



## **1.4. Aplicação dos copolímeros na administração dos fármacos**

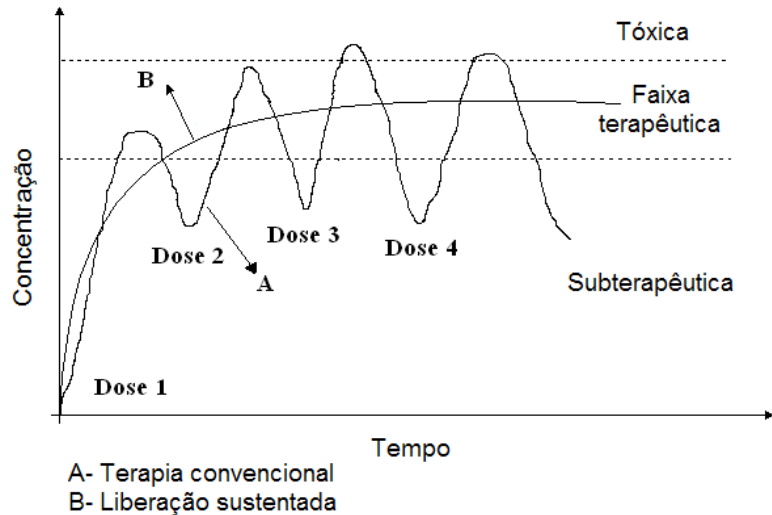
### **1.4.1. Administração de fármacos**

Um dos grandes problemas encontrados pelas ciências da saúde e pelas indústrias farmacêuticas são a baixa solubilidade da maioria dos fármacos em água e os efeitos colaterais causados pela liberação desordenada desses fármacos no organismo. E aperfeiçoar esses parâmetros, como reduzir as doses de administração, o nível de toxicidade e os efeitos colaterais, está sendo objeto de estudo contínuo de grandes pesquisas. Os aspectos mais estudados nos fármacos são a solubilidade em água, a liberação e a distribuição biológica no organismo (PATRAVALE, DATE e KULKARNI, 2004).

Estima-se que quase metade dos fármacos falha em suas formulações farmacêuticas devido a sua baixa solubilidade em água (PATRAVALE, DATE e KULKARNI, 2004). Um fator limitante para o desempenho *in vivo* de fármacos pouco solúveis em água é a sua resistência em ser umedecido e dissolvido nos fluidos do trato gastrointestinal. O aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água é, portanto, muito importante para incrementar sua taxa de absorção no organismo (biodisponibilidade).

Muitas vezes, ao se administrar um medicamento ao paciente, a sua concentração inicial é muito elevada, podendo até ultrapassar a concentração máxima da dose terapêutica, que é a faixa de concentração do fármaco no organismo na qual ele exerce sua atividade com eficiência e sem causar danos ao paciente. Depois de um curto período a concentração fica abaixo da mínima, como mostra a Figura 4.

Figura 4: Gráfico da concentração sanguínea do fármaco *versus* tempo de administração: curva A, uma formulação convencional, e curva B, uma formulação ideal de liberação controlada. Adaptado de Peppas *et al.*, (1997).



Visando manter a concentração do fármaco na faixa terapêutica, diminuindo as doses e os efeitos colaterais, tem-se desenvolvido sistemas de encapsulação de fármacos para liberação controlada. Tais sistemas também possuem a vantagem de conferir uma maior estabilidade química ao fármaco, ao protegê-lo de fatores externos tais como o pH gástrico e o calor no ambiente de armazenagem do fármaco, impedindo sua degradação.

Outro aspecto que vem sendo estudado é o direcionamento do fármaco até alvos específicos, assim como tecidos tumorais, pois ao entrar na corrente sanguínea sua distribuição biológica atinge todos os órgãos que não são o foco do tratamento, causando efeitos colaterais e diminuindo a eficiência do tratamento.

#### **1.4.2. Cinética de liberação controlada**

Um sistema matricial pode ser definido como sistema que controla a liberação da(s) substância(s) ativa(s), molecularmente dispersa(s) ou dissolvida(s) num suporte resistente à desintegração, polímero ou agente formador da matriz (LOPES, LOBO e COSTA, 2005).

A classificação dos sistemas matriciais leva em consideração diversos critérios, especificamente a estrutura da matriz, a cinética de liberação, os mecanismos para controlar a liberação, a natureza química e as propriedades dos materiais utilizados. A erosão, a difusão e o intumescimento das matrizes são os vários mecanismos pelos quais os sistemas matriciais

podem controlar a liberação das substâncias ativas. A predominância de um destes mecanismos depende invariavelmente das propriedades do polímero empregado no sistema (LOPES, LOBO e COSTA, 2005).

A melhoria no desenvolvimento de sistemas de liberação depende da seleção de uma matriz apropriada capaz de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e/ou de liberar o ativo ao nível de um determinado tecido ou órgão alvo (LOPES, LOBO e COSTA, 2005).

Dentro das várias opções, os polímeros são agentes versáteis para exercer tal função, na qual o fármaco fica envolto por cadeias polimerizadas, que funcionam como agentes controladores da sua liberação no meio.

#### **1.4.3. Sistemas micelares como carreadores de fármacos**

A fim de aperfeiçoar e potencializar essas formulações, uma variedade de sistemas coloidais de nanopartículas vêm sendo estudados. Dentre eles, micelas poliméricas formadas por copolímeros em bloco têm atraído grande interesse devido suas propriedades em geral (ALIABADI e LAVASANIFAR, 2006). Elas apresentam um diâmetro menor que 100 nm, o que permite o acúmulo de micelas carregadas de fármaco no interior de vasos sanguíneos de tumores e locais de inflamação, e dessa forma elas são investigadas como sistemas passivos que direcionam o fármaco para o sítio de ação, especialmente em quimioterapia (ALIABADI e LAVASANIFAR, 2006); O seu núcleo hidrofóbico age como hospedeiro de fármacos hidrofóbicos, proteínas, DNA, protegendo-os e controlando sua liberação no organismo; e possuem baixa toxicidade (KAWAGUCHI *et al.*, 2009).

A maioria dos surfactantes usados como agentes de solubilização em formulações comerciais são, em geral, pouco eficientes e causam efeitos colaterais, como o Tween® 80, usado para a anfotericina B (ELLIS, CRINIS, e WEBSTER, 1996; YU *et al.*, 1998).

#### **1.4.4. $E_nP_mE_n$**

Attwood, Zhou e Booth (2007) relataram que copolímeros com porção hidrofílica de polioxietileno e porção hidrofóbica de polioxiálquilenos, ou de poliésteres, têm sido alvo de interesse nas últimas décadas em relação à solubilização e liberação de fármacos pouco solúveis em água.

Esses copolímeros apresentam algumas vantagens específicas como propriedades furtivas da corona de polioxietileno, isto é, as micelas formadas por corona de polioxietileno não são capturadas pelos macrófagos do sistema reticular endotelial, aumentando seu tempo na circulação sanguínea (ADAMS, LAVASANIFAR e KWON, 2003).

Os copolímeros triblocos  $E_nP_mE_n$  conhecidos como Pluronic<sup>®</sup>, possuem propriedades de geleificação termorresponsivas interessantes para aplicação subcutânea (RICARDO *et al.*, 2006), muitos apresentam baixos valores de cmc, o que confere estabilidade às micelas mesmo após sua diluição no sangue.

Sua massa molecular suficientemente baixa ( $M.M. \leq 15.000$  g/mol) permite filtração nos rins e excreção pela urina (PEC, WOUT e JOHNSTON, 1992).

Por serem surfactantes não iônicos, seu processo de micelização e suas propriedades como solubilizantes de fármacos são pouco influenciadas por alterações no pH e pela adição de eletrólitos (DALVIN, 2011).

#### **1.4.5. Solubilização de fármacos em sistemas micelares**

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

Existem vários métodos de solubilização de fármacos hidrofóbicos nas micelas dos copolímeros. De acordo com Aliabadi e Lavasanifar (2006) pelo menos sete métodos são mais utilizados: diálise, emulsão óleo/água, evaporação do solvente, evaporação do co-solvente, liofilização, agitação em solução ou dissolução direta (“Shake Flask”), método fundido (“Melt loading”). A escolha do método de solubilização depende das propriedades do fármaco e do copolímero.

A solubilização de fármacos hidrofóbicos em micelas pode ser explicada como uma partição do fármaco entre duas fases: a água e a micela. O coeficiente de partição micela-água pode ser calculado para uma solução de concentração conhecida do polímero, como mostra a equação 3.

$$P = (S - S_o) / S_o \text{ ou } P = S_{cp} / S_o \quad (3)$$

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

Parâmetros importantes nos estudos de solubilização de fármacos é a capacidade de solubilização do polímero ( $S_{cp}$ ), que é a quantidade de fármaco solubilizada por grama de polímero em uma dada solução. Estudos mostram que esse parâmetro não é fixo para um dado polímero, dependendo principalmente da compatibilidade química entre o núcleo e o fármaco. Além disso, a capacidade de solubilização do polímero pode também depender da temperatura, do pH, da concentração da solução do polímero, de aditivos na solução e do método de solubilização do fármaco (ALIABADI e LAVASANIFAR, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2009).

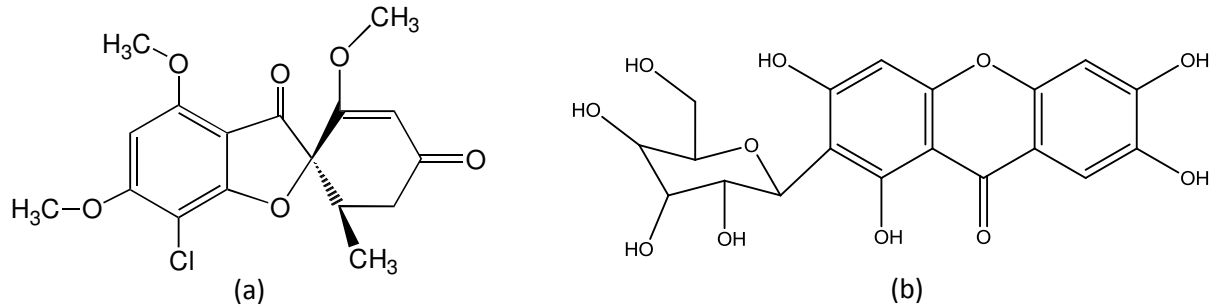
Lee *et al.*, (2011) estudaram copolímeros triblocos do tipo  $E_nP_mE_n$  e observaram que para copolímeros com bloco hidrofóbico semelhante a capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ) pode ser influenciada pela sua morfologia micelar em solução, seu comprimento do bloco hidrofílico, sua concentração e temperatura micelar crítica, e o seu balanço hidrofílico-lipofílico (HLB).

### 1.5.Fármacos aromáticos utilizados na pesquisa

A griseofulvina (Figura 5a) é um fármaco aromático antifúngico de baixa solubilidade em água (3,6 mg/dL a 25 °C), usado em vários trabalhos como fármaco modelo para se comparar a capacidade de solubilização de copolímeros com outros fármacos hidrofóbicos (REKATAS *et al.*, 2001; CHAIBUNDIT *et al.*, 2002). A griseofulvina possui atividade antifúngica, sendo indicada no tratamento de infecções de pele, do couro cabeludo e das unhas, causadas por *Dermatophytes* ou *Sporprytrichum* resistentes à terapêutica convencional. Pode ser isolada do *Penicillium griseofulvum dierckx* ou obtida por síntese (FINKELSTEIN, AMICHAH e GRUNWALD, 1996).

A mangiferina (Figura 5b) é um composto derivado da xantona, distribuído em plantas superiores das famílias *Anacardiaceae* e de *Gentianaceae*. Esse fármaco apresenta diversas atividades terapêuticas incluindo propriedades antidiabéticas, anti-HIV, anticancerígeno, imunomodulatório, antiinflamatório, antioxidante, que são amplamente estudadas na aplicação farmacológica (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Figura 5. Estrutura química dos fármacos (a) griseofulvina e (b) mangiferina.



Resolver o problema de baixa solubilidade em água destes fármacos (3,6 mg/dL e 9,92 mg/dL a 25 °C para griseofulvina e mangiferina, respectivamente) tem sido alvo de vários trabalhos, seja através de agentes solubilizantes (RIBEIRO *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2009), ou do desenvolvimento de pró-fármacos (MULHOLAND; KIM *et al.*, 2001).

## 2. JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

---

Os copolímeros tribloco  $E_nP_mE_n$  podem não apresentar altos valores de capacidade de solubilização quando comparados com outros copolímeros, no entanto, suas propriedades geleificantes termorresponsivas são interessantes para sistemas de administração subcutânea de fármacos, pois à temperatura ambiente, podem-se ter soluções concentradas que são fluidas, mas que, à temperatura do corpo, geleificam rapidamente. Além disso, sua produção já é bem estabelecida em escala industrial, o que torna seu uso economicamente viável.

Chaibundit *et al.*, (2007) estudou as propriedades geleificantes dos Pluronicos F127 e P123 e observou que nas temperaturas de interesse para aplicação farmacológica, 25 e 37 °C, que o F127, em uma determinada concentração, forma um gel rígido, no qual é viável para aplicações subcutânea. Foi observado, ainda que as misturas binárias entre esses copolímeros triblocos conservaram essa propriedade geleificante na mesma faixa de temperatura.

Um estudo feito por Silva *et al.*, (2007) mostra que as misturas binárias de copolímeros triblocos  $E_nP_mE_n$  aumentam sua capacidade de solubilização quando comparados aos Pluronicos sozinhos. Lee *et al.*, (2011) evidenciaram que o aumento da capacidade de solubilização para misturas binárias é devido a influência do comprimento do bloco hidrofílico de polioxietileno no balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) do sistema.

A importância dos copolímeros em bloco pode ser visualizada pelo número de publicações. Uma pesquisa no Scopus.com exibiu mais de 36 mil artigos com o termo “block copolymer” desde 1952, dos quais cerca de 4 mil estão relacionados com sua aplicação no transporte de fármaco (“drug”), onde 21 publicações estão relacionadas com o fármaco griseofulvina e copolímeros em bloco. Das 4 mil publicações envolvendo fármacos e os copolímeros em bloco, 597 estão relacionadas a patentes, das quais 423 são dos últimos dez anos, e 2 patentes em 2012. Na pesquisa o fármaco mangiferina teve 27 publicações desde 1973, mas nenhuma envolvendo sistemas poliméricos como carreadores. Os copolímeros em bloco P123 e F127 são muito estudados, das 112 publicações feitas em 2012 envolvendo copolímeros em bloco, 10 são com P123 e F127 e 1 utilizando o fármaco griseofulvina.

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver sistemas poliméricos micelares utilizando misturas binárias dos copolímeros F127 (E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub>) e P123 (E<sub>21</sub>P<sub>67</sub>E<sub>21</sub>) como nanocarreadores dos fármacos griseofulvina e mangiferina pelo método de dissolução direta, e estudar sua capacidade de solubilização e cinética de liberação.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar a concentração micelar crítica (cmc) dos copolímeros F127, P123 e suas misturas, nas proporções P123/F127 30/70 (PF 30), 50/50 (PF 50) e 70/30 (PF 70), por Espectroscopia Ultravioleta/Visível (UV-Visível) a 25 e 37 °C, avaliando a influência da temperatura na micelização dos sistemas poliméricos;
- Determinar o tamanho de partícula dos sistemas F127, P123 e suas misturas em solução com e sem o fármaco hidrofóbico griseofulvina a 25 e 37 °C;
- Realizar estudos de solubilização dos surfactantes F127, P123 e suas misturas com os fármacos hidrofóbicos griseofulvina e mangiferina a 25 e 37 °C, avaliando a influência do percentual de P123 nas misturas e o efeito da temperatura no potencial de solubilização dos sistemas;
- Pelo método de dissolução direta, determinar a capacidade de solubilização dos sistemas poliméricos, F127, P123 e suas misturas, por quantificação em UV-Visível;
- Realizar estudos de cinética de liberação *in vitro* do copolímero em gel F127 e sua mistura PF 50, sob método de diálise simulando o pH sanguíneo, com os fármacos griseofulvina e mangiferina, avaliando o percentual de fármaco liberado (taxa de liberação) por quantificação em UV-Visível.



## 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

---

### 4.1. Materiais

Os copolímeros E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub> (F127) e E<sub>21</sub>P<sub>67</sub>E<sub>21</sub> (P123), comercialmente conhecidos como Pluronic® ou Lutrol®, foram obtidos da Uniquema (ICI Surfactants). Valores da razão de peso médio e massa molar numérica média,  $M_w/M_n$  (índice de polidispersividade), foram determinados por cromatografia de permeação de gel (GPC) utilizando N, N-dimetilacetamida a 70 °C como solvente (CHAIBUNDIT *et al.*, 2007). A griseofulvina (massa molar 352,8 g/mol) foi obtida a partir de Sigma-Aldrich (Poole, Dorset, Reino Unido) e foi utilizada sob a forma de um pó finamente dividido. O fármaco mangiferina (massa molar 422,33 g/mol) foi cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais (LPN) – Universidade Federal do Ceará (UFC). Água milli-Q e metanol (Synth) foram utilizados como solventes para quantificação por UV-Visível. O corante 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) foi obtido da Biochemika para determinação da concentração micelar crítica (cmc). Membrana Millipore 0,45 µm para filtração na determinação da capacidade de solubilização dos fármacos, e membrana de diálise de MWCO 2000 g/mol da Sigma na cinética de liberação.

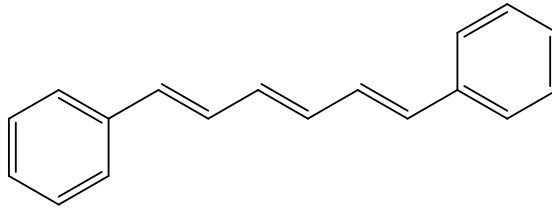
### 4.2. Misturas binárias dos copolímeros

As misturas foram preparadas a partir da pesagem dos copolímeros e posterior dissolução com água para as concentrações desejadas em cada experimento. As proporções foram P123 e F127 (30/70, 50/50 e 70/30) e foram denominadas, respectivamente, de PF 30, PF 50 e PF 70. O número 30, por exemplo, denota o percentual de P123 na mistura.

### 4.3. Concentração micelar crítica (cmc)

A determinação da concentração micelar crítica (cmc) dos copolímeros e suas misturas foi realizada usando um espectrofotômetro U-2000 da Hitachi, utilizando o corante hidrofóbico 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) da Biochemika como encapsulado (Figura 6).

Figura 6. Estrutura química do DPH.



Soluções estoque dos copolímeros foram preparadas por dissolução em água milli-Q e agitação de no mínimo 14 h antes das diluições necessárias (0,01 mg/L – 1 g/L). O DPH foi dissolvido em metanol (0,4 mM) e adicionado à solução do copolímero na razão de 1:100 (30  $\mu$ L DPH: 3 mL solução). Dessa forma foram obtidas soluções dos copolímeros com 1% (v/v) de metanol e 0,004 mM de DPH. O comprimento de onda de absorbância usado para o DPH foi de 356 nm. As medidas de absorbância foram feitas entre 3 e 24 h após a adição de DPH. Os estudos foram realizados a 25 e  $37 \pm 0,2$  °C, permitindo-se um mínimo de 40 min de estabilização na temperatura analisada. O método da solubilização do DPH foi utilizado para determinar o início da micelização no estudo de copoliéteres triblocos realizado por Alexandridis, Holzwarth e Hatton (1994).

#### 4.4.Solubilização dos fármacos

As moléculas dos fármacos normalmente têm forte absorbância na região do ultravioleta. Os comprimentos de onda para as bandas de absorção da griseofulvina e mangiferina em metanol são 292 nm e 256 nm, respectivamente.

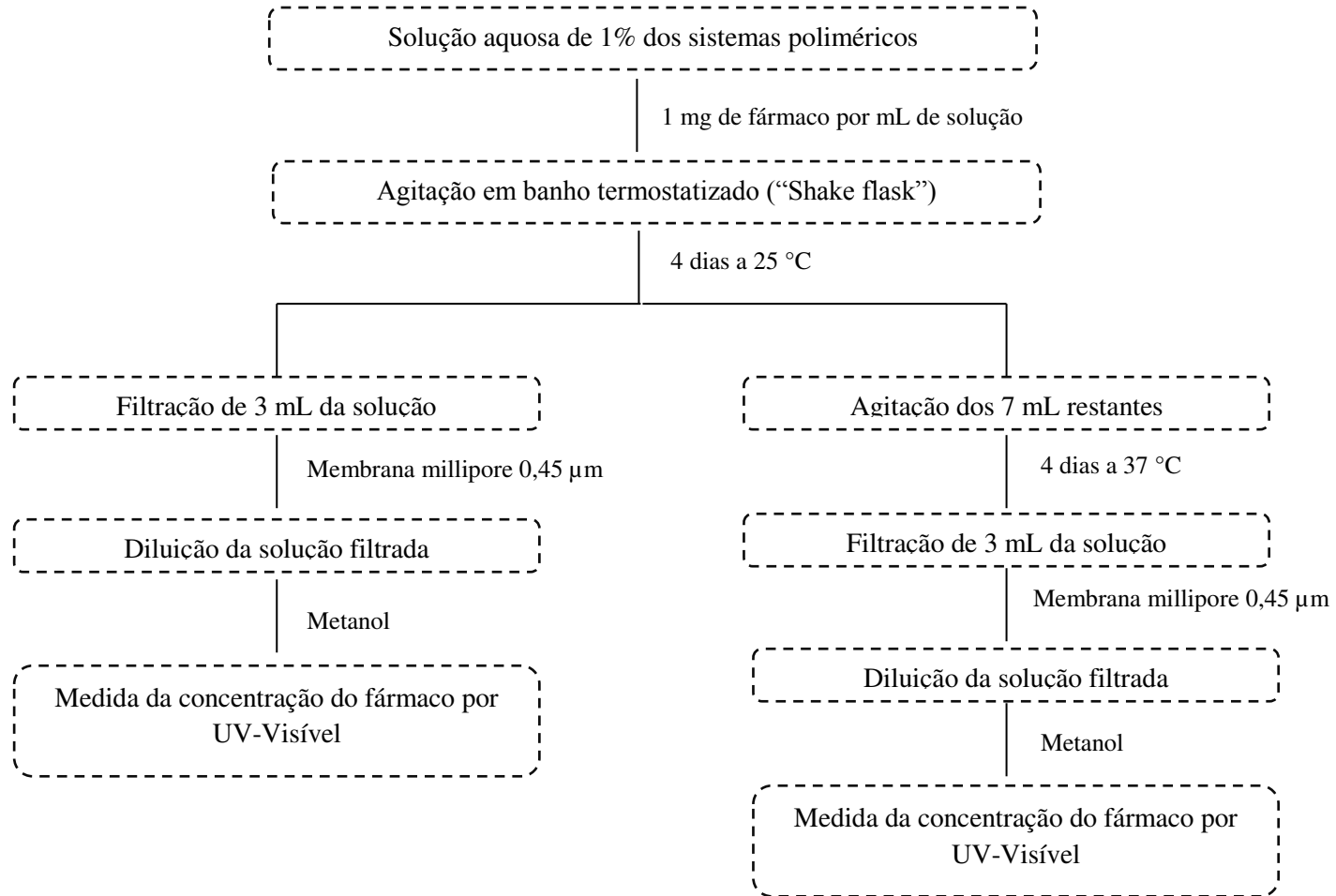
As curvas de calibração dos fármacos foram preparadas a partir dos dados de concentração (mg/L) *versus* absorbância (A) no espectrofotômetro U-2000 da Hitachi foi utilizado no experimento.

O método de incorporação do fármaco nas micelas foi o da dissolução direta (também chamado de “shake flask”) e está esquematizado no fluxograma da Figura 7.

Foram preparadas soluções aquosas de 1% m/v dos copolímeros e de suas misturas. A uma alíquota de 10 mL de solução foi adicionada uma porção do fármaco (m  $\approx$  10 mg) a ser testado. Cada fármaco foi testado separadamente. As misturas foram lentamente agitadas a 25 °C ( $\pm 0,1$  °C), por 4 dias, num banho termostatizado QUIMIS. Retirou-se uma alíquota de 3 mL do sobrenadante, que logo em seguida foi filtrado em membrana Millipore

de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ , para remoção de qualquer porção de fármaco não solubilizado. Alíquotas das amostras filtradas foram diluídas com metanol e a concentração de fármaco foi monitorada por espectrofotometria UV-Visível nos comprimentos de onda adequados para cada fármaco, usando-se metanol puro para estabelecer a linha de base. Os frascos contendo as misturas restantes (7 mL) ficaram por mais 4 dias sob agitação no banho a 37 °C ( $\pm 0,1$  °C), e o mesmo procedimento foi realizado. A solubilidade dos fármacos apenas em água foi calculada com o mesmo procedimento descrito acima. As absorvâncias das soluções aquosas dos copolímeros e de suas misturas nos comprimentos de onda dos fármacos também foram medidas para correção dos valores de absorvância obtidos para os fármacos. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

Figura 7. Fluxograma do método de solubilização (dissolução direta) da griseofulvina e da mangiferina nos sistemas poliméricos aquosos de F127, P123 e suas misturas.



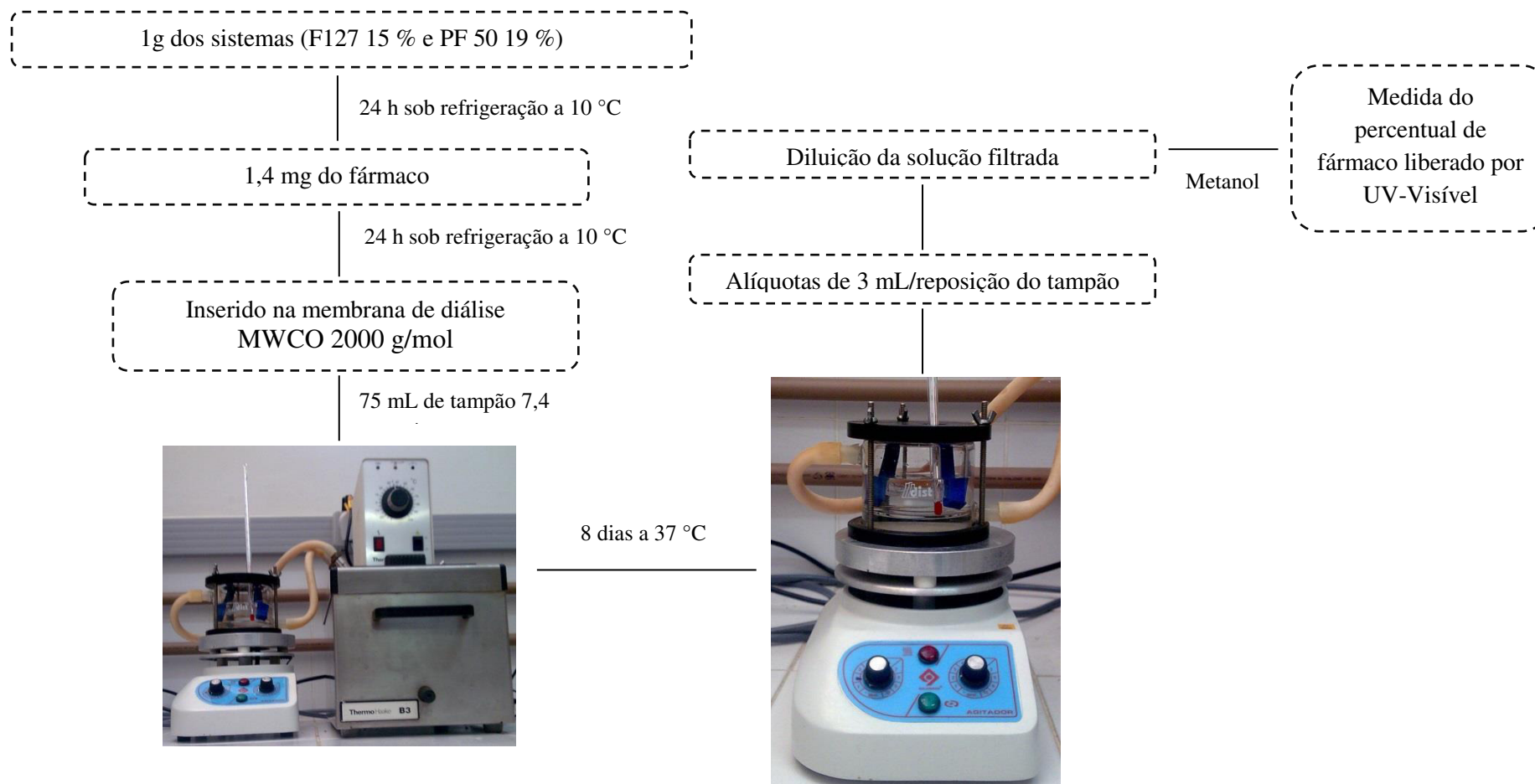
#### 4.5. Tamanho de partícula

O diâmetro hidrodinâmico médio ( $D_h$ ) e o raio hidrodinâmico médio ( $r_h$ ) dos copolímeros triblocos F127, P123 e suas misturas PF 30, 50 e 70, com e sem fármaco (griseofulvina) encapsulado, foram determinados a 25 e 37 °C utilizando o equipamento Nano Zetasizer da Malvern modelo ZEN 3500 existente no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. As medidas foram feitas retirando alíquotas de 2,5 mL de cada sistema filtrado ao final do procedimento de solubilização. As medidas foram feitas em triplicata.

#### 4.6. Liberação *in vitro*

O estudo da cinética de liberação *in vitro* da griseofulvina e da mangiferina foi realizado através da técnica de difusão usando uma membrana de diálise de MWCO 2000 g/mol da Sigma (Figura 8). Foram preparados 1g dos sistemas F127 e PF 50, no qual suas concentrações de géis a 37 °C (CHAIBUNDIT *et al.*, 2007) foram 15 e 19 %, respectivamente, e deixados por 24 h a 10 °C para homogeneização. Em seguida foram adicionados 1,4 mg do fármaco, e deixados por mais 24h a 10 °C para o seu encapsulamento nas micelas. O sistema preparado foi inserido na membrana de diálise e imerso em 75 mL de tampão fosfato a 37 °C ( $\pm 0,2$  °C). Em intervalos de 15 em 15 min na primeira hora, 30 em 30 min na segunda hora, 1 em 1 h até nove horas, e a cada 24 h por 8 dias (PF 50) e 12 dias (F127), alíquotas de 3 mL foram retiradas e o volume final reconstituído com a solução tamponada (3 mL). As soluções foram diluídas em metanol (2x) e a quantidade de fármaco liberada foi determinada por UV-Visível no comprimento de onda de 292 nm (griseofulvina) e 256 nm (mangiferina), utilizando as equações obtidas a partir da curva de calibração para cada fármaco.

Figura 8. Fluxograma da liberação *in vitro* a 37 °C para os fármacos griseofulvina e mangiferina nos sistemas poliméricos em gel F127 e PF 50, sob método de diálise.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Concentração Micelar Crítica

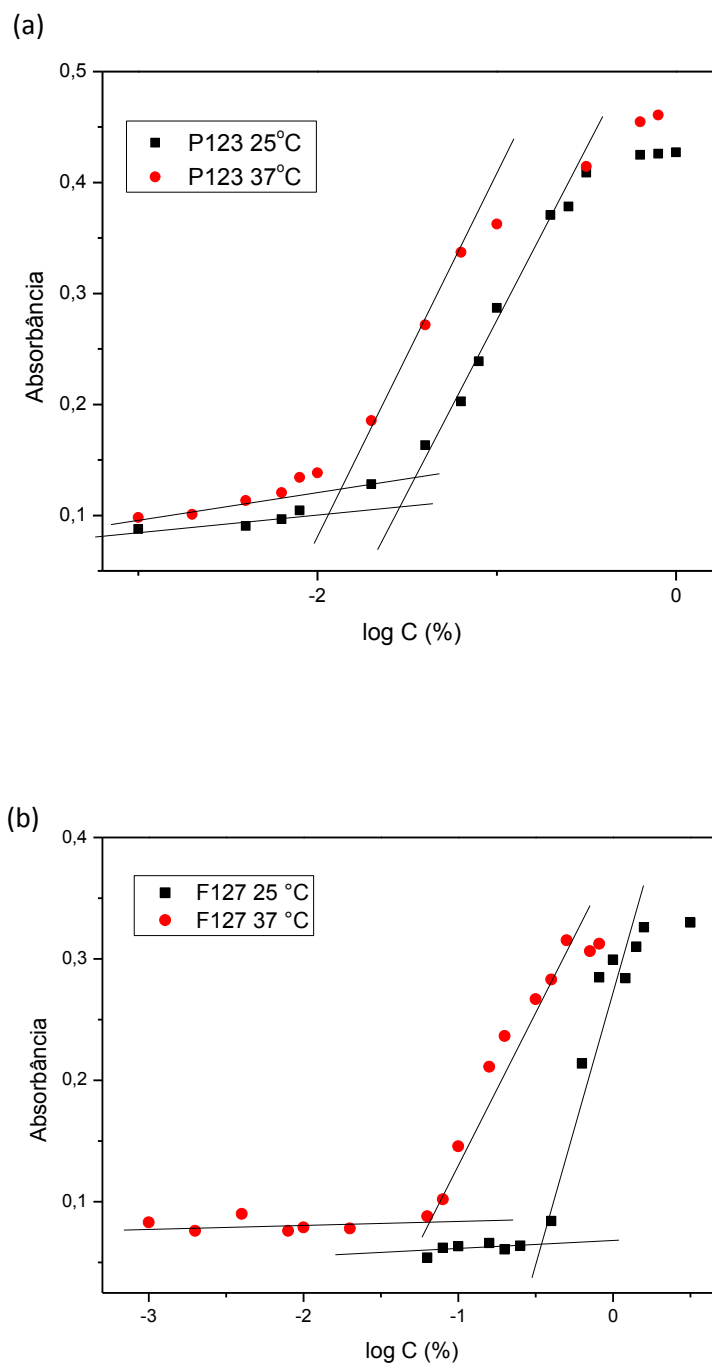
Os copolímeros utilizados para aplicação em solubilização de fármaco devem estar de preferência completamente micelizados em solução aquosa diluída a 25 °C. Isso permite que o fármaco seja solubilizado e a solução estocada à temperatura ambiente (ATTWOOD e BOOTH, 2007). A Tabela 1 mostra valores de cmc desses triblocos a 25 °C para uma análise geral desse parâmetro.

Tabela 1. Valores de concentração micelar crítica (cmc) a 25 °C de copolímeros  $E_mP_nE_m$ , dados publicados por Attwood e Booth, (2007).

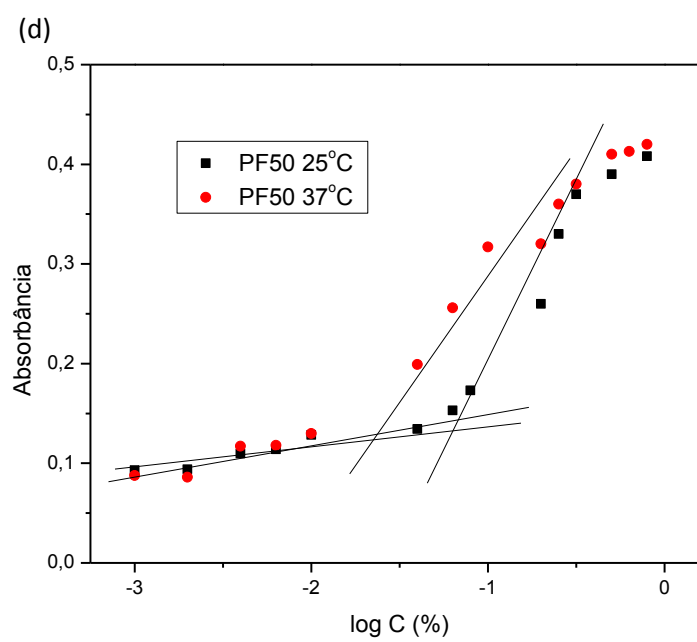
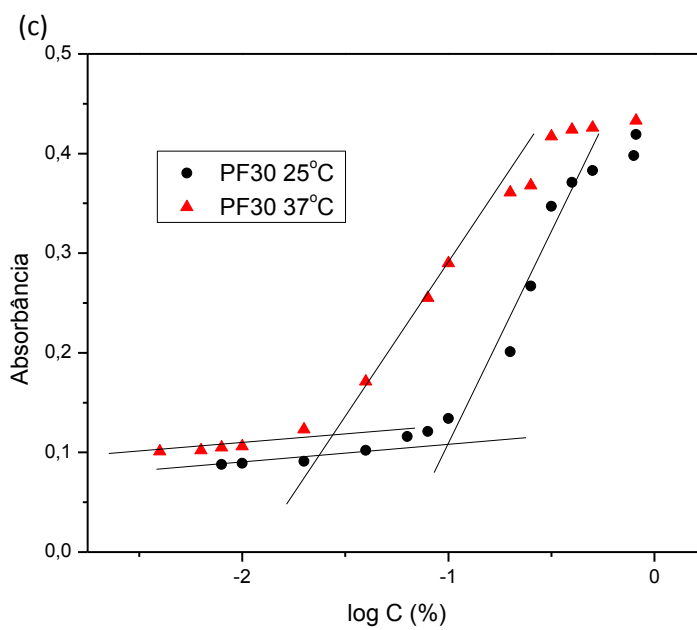
Copolímero	cmc a 25 °C (%)	Referência
$E_{62}P_{39}E_{62}$ (F87)	2,6	Harrison <i>et al.</i> , (2005)
$E_{21}P_{47}E_{21}$ (P94)	0,3	Nixon <i>et al.</i> , (2004)
$E_{20}P_{54}E_{20}$ (P103)	0,07	Alexandridis <i>et al.</i> , (1994)
$E_{31}P_{54}E_{31}$ (P104)	0,1; 0,3	Harrison <i>et al.</i> , (2005)
$E_{38}P_{54}E_{38}$ (P105)	0,2	Alexandridis <i>et al.</i> , (1994)
$E_{13}P_{67}E_{13}$ (L122)	0,01	Wanka <i>et al.</i> , (1994)
$E_{21}P_{67}E_{21}$ (P123)	0,03	Alexandridis <i>et al.</i> , (1994)
$E_{98}P_{67}E_{98}$ (F127)	0,7; 1,0	Bohorquez <i>et al.</i> , (1999)

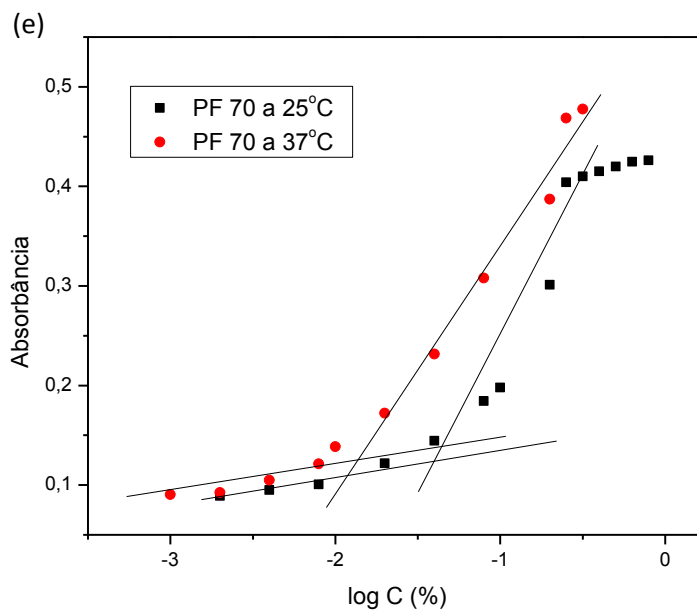
O método da solubilização do DPH realizado por Alexandridis, Holzwarth e Hatton (1994) indicou que o melhor comprimento de onda de absorbância do DPH é de 356 nm, e a partir dos dados de absorbância do DPH nos sistemas poliméricos diluídos, foram plotados gráficos da absorbância do DPH no comprimento de onda de 356 nm *versus* o logaritmo da concentração (%) dos sistemas poliméricos. A cmc dos sistemas poliméricos foi calculada a partir do vértice da curva de absorbância *versus* log C (Figura 9), onde ocorre um aumento brusco da absorbância do DPH, devido à sua solubilização nas micelas do sistema após a cmc.

Figura 9. Dependência da absorvância em função do logaritmo da concentração (%) de (a) P123, (b) F127 e suas misturas (c) PF 70, (d) PF 50 e (e) PF 30 a 25 e 37 °C.



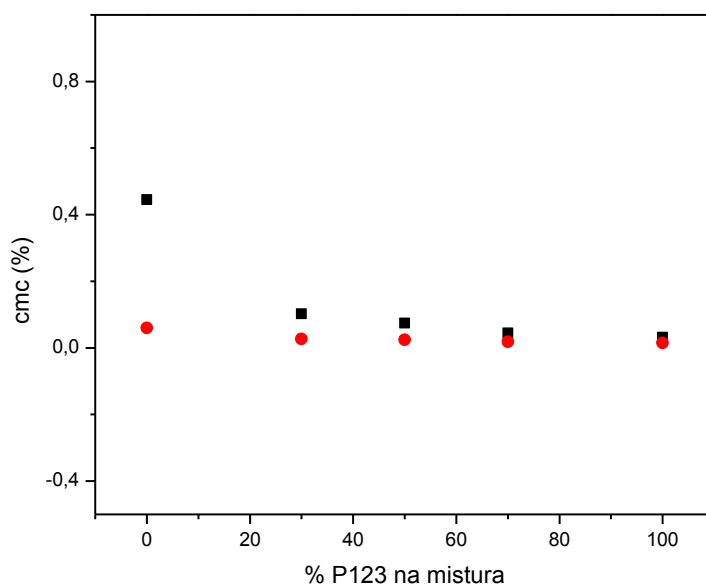






A Figura 10 mostra os resultados de cmc a 25 e 37 °C dos copolímeros e suas misturas. Os resultados foram expressos em termos de percentual de polímero em solução (%), uma vez que esta é a forma usual de se avaliar as aplicações de soluções aquosas de polímeros (ATTWOOD e BOOTH, 2007).

Figura 10. Concentração micelar crítica (cmc) dos copolímeros P123, F127 e suas misturas: (■) 25 °C e (●) 37 °C.



Segundo Daltin (2011) a temperatura atua de forma diferente sobre a solubilidade dos diferentes tipos de surfactantes. Foi observado que aqueles tensoativos que têm sua solubilidade alterada com o aumento da temperatura teriam o mesmo comportamento em relação a sua cmc, já que a solubilidade interfere na cmc.

De um modo geral, a concentração micelar crítica (cmc) para copolímeros não-iônicos sofrem redução com o aumento de temperatura como observado por Alexandridis, Holzwarth e Hatton (1994).

A cmc, para todos os sistemas estudados, a 37 °C é menor que a 25 °C, coerente com Daltin (2011), para tensoativos não-iônicos, onde a variação da cmc com a temperatura é um indicativo de que o calor de formação ( $\Delta H^\circ$ ), ou entalpia padrão de micelização, é um processo endotérmico, com  $\Delta G^\circ < 0$ , sendo um processo espontâneo de micelização (DALTIM, 2011).

Para os Pluronics<sup>®</sup>, esse comportamento pode ser explicado por estudos anteriores que mostram um processo de micelização mais endotérmico para os copolímeros triblocos do tipo  $E_nP_mE_n$ , com valores de entalpia padrão de micelização em torno de 200 kJ/mol (ALEXANDRIDIS, HOLZWARTH e HATTON, 1994), assim com um pequeno aumento de temperatura há uma diminuição significativa da cmc.

Attwood e Booth (2007) relataram que a dependência do cmc em função do número de unidades E no copolímero é pequena, mas quando dois copolímeros são de mesmo comprimento de bloco hidrofóbico, é considerado o efeito do comprimento do bloco E. Quanto maior o caráter hidrofóbico do copolímero, menor a cmc do copolímero, uma vez que a micelização reduz as interações desfavoráveis com a água.

Por isso, tem-se que a cmc do F127 é maior que o do copolímero P123, pois seu bloco hidrofílico é cinco vezes maior comparado com o mesmo bloco do P123. Assim como observado por Attwood e Booth (2007), os valores de cmc do P123 foram menores comparados com o F127 nas duas temperaturas, afirmando o que foi discutido anteriormente.

As misturas conservam o perfil de dependência da temperatura dos seus copolímeros isolados. As cmc's (Figura 10) das misturas são intermediárias às dos polímeros puros tanto a 25 quanto a 37 °C. Por isso, devido os baixos valores de cmc na temperatura de administração, essas misturas são promissoras para aplicações farmacológicas devido à estabilidade de suas micelas após a diluição sanguínea.

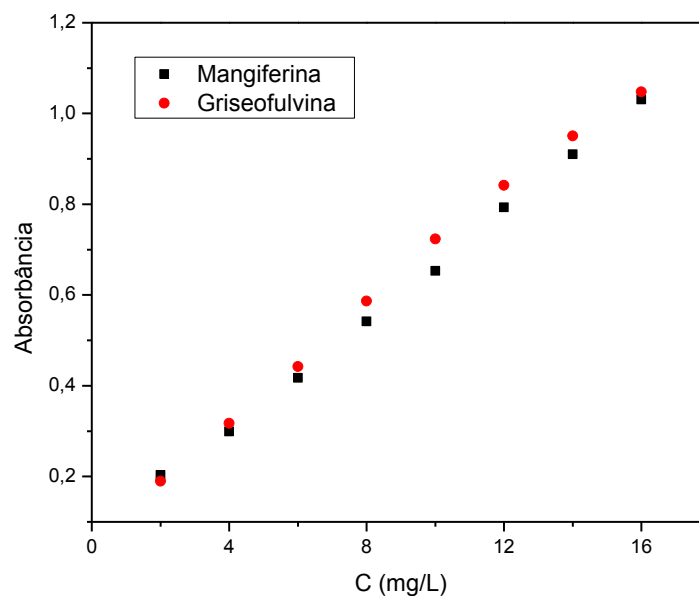
## 5.2. Solubilização dos fármacos

A curva de calibração em metanol para griseofulvina e mangiferina é mostrada na Figura 11. A partir da curva de calibração foi obtida a equação que relaciona absorvância e concentração (mg/L). Assim como as equações 4 e 5 apresentadas a seguir:

$$\text{Griseofulvina } (\lambda = 292 \text{ nm}): \quad \text{Abs} = 0,06255C + 0,07445 \quad R = 0,9985 \quad (4)$$

$$\text{Mangiferina } (\lambda = 356 \text{ nm}): \quad \text{Abs} = 0,06006C + 0,06546 \quad R = 0,9994 \quad (5)$$

Figura 11. Curva de calibração da (■) mangiferina e (●) griseofulvina em metanol.



A solubilidade é estudada através da massa do fármaco solubilizada (mg) por massa de copolímero (g), chamada de capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ). A  $S_{cp}$  é calculada a partir da solubilidade total do fármaco na solução do copolímero ( $S_{tot}$ ) subtraída à solubilidade do fármaco em água ( $S_o$ ) dividido pela massa do copolímero ( $m_{cop}$ ), como mostra a equação 6.

$$S_{cp} = S - S_o / m_{cop} \quad (6)$$

As características moleculares dos copolímeros P123 e F127 (Tabela 2) foram obtidas de trabalhos anteriores, tais como massa molar numérica média ( $M_n$ ) por RMN de  $^{13}\text{C}$  e o índice de polidispersividade ( $M_w/M_n$ ) obtido por cromatografia de permeação em gel (GPC).

Tabela 2. Características moleculares dos copolímeros exploradas neste trabalho publicadas por Chaibundit *et al.*, (2007).

Copolímero	$M_n$ (g.mol <sup>-1</sup> )	% E <sup>a</sup>	$M_w/M_n$	$M_w$ <sup>b</sup>	Referência
E <sub>21</sub> P <sub>67</sub> E <sub>21</sub> <sup>c</sup>	5750	32	1,10	6600	Chaibundit <i>et al.</i> , (2007)
E <sub>98</sub> P <sub>67</sub> E <sub>98</sub> <sup>d</sup>	12500	69	1,20	15000	Chaibundit <i>et al.</i> , (2007)

<sup>a</sup> Porção hidrofílica do copolímero em bloco.

<sup>b</sup> Massa molar numérica teórica, calculado do  $M_n$  e  $M_w/M_n$ .

<sup>c</sup> P123.

<sup>d</sup> F127.

Os resultados da solubilidade da griseofulvina foram de 1,34 mg/dL (25 °C) e 1,83 mg/dL (37 °C) semelhantes aos relatados por Crothers *et al.*, (2005). A griseofulvina foi usada como fármaco modelo para comparação de resultados de solubilização com outros copolímeros. Os resultados de solubilidade da mangiferina em água foram 10,3 mg/dL a 25 °C e 15,6 mg/dL a 37 °C, semelhantes aos obtidos por Ribeiro *et al.*, (2010).

Os valores de  $S_{cp}$  obtidos para o E<sub>98</sub>P<sub>67</sub>E<sub>98</sub> (F127) e E<sub>21</sub>P<sub>67</sub>E<sub>21</sub> (P123) na Tabela 3 mostram que para os fármacos griseofulvina e mangiferina a 25 °C os resultados foram bem maiores para o P123 do que para o F127.

Tabela 3. Capacidade de solubilização dos copolímeros P123 e F127 a 25 °C.  $S_0 = 1,34$  mg/dL para griseofulvina e  $S_0 = 10,3$  mg/dL para a mangiferina.

Sistemas	Griseofulvina		Mangiferina	
	S (mg/dL)	$S_{cp}$ (mg/g)	S (mg/dL)	$S_{cp}$ (mg/g)
F127	2,18 ± 0,07	0,84	16,07 ± 1,9	5,77
PF 30	2,69 ± 0,29	1,35	16,6 ± 1,1	6,33
PF 50	3,73 ± 0,06	2,39	17,3 ± 1,3	6,73
PF 70	3,52 ± 0,96	2,18	17,19 ± 1,6	6,89
P123	4,37 ± 0,19	3,03	19,18 ± 2,2	8,88

O mesmo foi observado nos estudos feitos por Lee *et al.*, (2011). Eles estudaram a capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ) e estabilidade dos copolímeros do tipo  $E_mP_nE_m$  analisando seu HLB (“hydrophilic-lipophilic balance” ou balanço hidrofílico-lipofílico), e observaram que a solubilidade do fármaco nesses sistemas nano-coloidais não dependem só do bloco hidrofóbico, mas também do comprimento do bloco hidrofílico.

De acordo com Kadam, Yerramilli e Bahadur (2009) os valores de HLB para os copolímeros P123 e F127 são 8 e 22, respectivamente.

Analisando os valores de capacidade de solubilização, para os dois fármacos, foi observado um aumento significativo do  $S_{cp}$  nas misturas PF 30, 50 e 70 com o aumento da proporção do tribloco mais hidrofóbico P123 na mistura.

As misturas do Pluronic conservam as características de solubilidade dos Pluronic sozinho devido a sua co-micelização em solução. Os dados de raio hidrodinâmico aparente ( $r_{h, app}$ ) e Número de associação ( $N_w$ ) para os Pluronic e suas misturas mostrados na Tabela 4 publicados por Chaibundit *et al.*, (2007) dão suporte ao perfil de solubilização observado.

Chaibundit *et al.*, (2007) relatam que os copolímeros P123 e F127 em solução a 40 °C apresentam um pico único com  $r_{h, app}$  de 8,6 e 12,5 nm, respectivamente, sendo característico da presença de micelas monodispersas, evidenciando que não há unímeros livres em solução. A distribuição para as misturas apresentam também picos únicos monodispersos, isto é, há um único tipo de micela no meio, mostrando que as misturas binárias dos Pluronic® formam co-micelas em solução.

Tabela 4. Propriedades micelares a 40 °C ( $N_w$  e  $r_{h, app}$ ) dos copolímeros F127, P123 e suas misturas PF 30, 50 e 70 publicados por Chaibundit *et al.*, (2007).

Sistemas	$N_w$	$r_h$
F127	26	12,5
PF 30	68	14,6
PF 50	81	13,2
PF 70	85	11,4
P123	98	8,6

Os valores de número de associação ( $N_w$ ) encontrados por Chaibundit *et al.*, (2007) justificam os valores encontrados de capacidade de solubilização para as misturas. As misturas que apresentam menor  $N_w$ , ou seja, menor número de moléculas na micela, apresentam menor  $S_{cp}$ , pois tem menos moléculas do tribloco mais hidrofóbico P123 que compõe a co-micela, justificando um menor efeito de solubilização para misturas com baixas proporções do P123.

Em estudos realizados com uma série de copolímeros do tipo  $E_mP_nE_m$  foi observado um aumento no coeficiente de partição ( $P$ ) em função da temperatura, mostrando que o copolímero torna-se mais hidrofóbico com o aumento da temperatura no estudo de solubilização (KADAM, YERRAMILI e BAHADUR, 2009).

Tendo como base os estudos feitos por Kadam, Yerramilli e Bahadur (2009), foi analisado o aumento da capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ) com o aumento da temperatura (Tabela 5) para os fármacos griseofulvina e mangiferina, para os Pluronicos® sozinhos e suas misturas.

Tabela 5. Parâmetros de solubilização dos copolímeros P123, F127 e suas misturas a 25 e 37 °C.

Sistemas	$S_{cp}$ (mg/g)			
	Griseofulvina		Mangiferina	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
F127	0,84	2,59	5,77	7,47
PF 30	1,35	2,55	6,33	7,44
PF 50	2,39	3,33	6,73	10,13
PF70	2,18	2,85	6,89	7,79
P123	3,03	4,08	8,88	8,48

Na Tabela 5 é analisado os valores de  $S_{cp}$  com o aumento da temperatura de 25 a 37 °C, para os dois fármacos, e foi observado que para o F127 e as misturas PF 30, 50 e 70 o  $S_{cp}$  aumentou com o aumento da temperatura.

Pelo cálculo do coeficiente de partição ( $P$ ), pode-se observar que há um aumento significativo no coeficiente de partição com o aumento da temperatura, para o fármaco griseofulvina nas soluções aquosas a 1% dos copolímeros F127 e suas misturas com P123, PF 30 e 50, mostrados na Tabela 6, condizente com os estudos feitos por Kadam, Yerramilli e Bahadur (2009).

Tabela 6. Valores de coeficiente de partição ( $P$ ) da griseofulvina e da mangiferina para os copolímeros P123, F127 e suas misturas a 25 e 37 °C.

Sistemas	Coeficiente de partição ( $P$ )			
	Griseofulvina		Mangiferina	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
F127	0,63	1,42	0,56	0,48
PF 30	1,01	1,39	0,61	0,47
PF 50	1,79	1,82	0,65	0,65
PF 70	1,62	1,56	0,67	0,50
P123	2,26	2,23	0,86	0,54

O mesmo não foi observado para o copolímero P123 e a mistura PF 70 com a griseofulvina. Myers (1992) observou que copolímeros com bloco hidrofílico de polioxietileno diminuem sua solubilidade a medida que a temperatura aumenta devido á quebra das ligações de hidrogênio entre o polioxietileno e a água formando um segunda fase, o que dá turbidez ao sistema e interfere na sua capacidade de solubilização.

O P123 se torna mais sensível a esse fenômeno chamado de “cloud point” ou “clouding temperature” (“ponto de turvação” ou “temperatura de nuvem”) pelo fato de seu bloco hidrofílico ser menor e ter menos ligações de hidrogênio, atingindo o ponto de turvação com um pequeno aumento de temperatura. O mesmo foi observado em outros trabalhos feitos por Lee *et al.*, (2011). Esses resultados podem ser explicados pela diferença do tamanho dos seus blocos hidrofílicos, já que a porção hidrofílica (%E) do P123 é 32%, e a do F127 é 69%.

Para o fármaco mangiferina o aumento de  $P$  não foi observado com o aumento da temperatura (Tabela 6). Esses resultados podem ser explicados pela alta solubilidade ( $S_0$ ) da mangiferina com o aumento da temperatura, 10,3 mg/dL a 25 °C e 15,6 mg/dL a 37 °C.

A Tabela 7 e 8 mostram em quantas vezes a solubilidade da griseofulvina e da mangiferina aumentaram nas soluções aquosas a 1% dos copolímeros F127 e suas misturas com o P123 a 25 e 37 °C em função do aumento da proporção de P123 na mistura. Esses valores de  $S/S_0$  expressam os resultados de solubilização para aplicação direta das formulações aquosas dos copolímeros a 1%.



Tabela 7. Aumento ( $S/S_0$ ) das solubilidades da griseofulvina nas soluções a 1% dos copolímeros F127 e suas misturas com o P123 a 25 e 37 °C;  $S_0 = 1,34$  mg/dL a 25 °C e 1,83 mg/dL a 37 °C.

Sistemas	Griseofulvina			
	25 °C		37 °C	
	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$
F127	2,18	1,6	4,42	2,5
PF 30	2,69	1,3	4,38	2,6
PF 50	3,73	2,4	5,16	3,3
PF 70	3,52	2,2	4,68	2,9
P123	4,37	3,0	5,91	4,0

Os valores de  $S/S_0$  mostram de uma forma direta que o aumento de P123 na mistura aumenta a solubilidade de ambos os fármacos.

Tabela 8. Aumento ( $S/S_0$ ) das solubilidades da mangiferina nas soluções a 1% dos copolímeros F127 e suas misturas com o P123 a 25 e 37 °C;  $S_0 = 10,3$  mg/dL a 25 °C e 15,6 mg/dL a 37 °C.

Sistemas	Mangiferina			
	25 °C		37 °C	
	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$	$S$ (mg/dL)	$S/S_0$
F127	16,07	1,5	23,07	1,4
PF 30	16,60	1,6	23,04	1,5
PF 50	17,03	1,7	25,73	1,6
PF 70	17,19	1,8	23,39	1,5
P123	19,18	2,0	24,08	1,7

Foi observado, no geral, que o aumento da solubilidade para os dois fármacos foram maiores para o copolímero P123 devido á sua maior hidrofobicidade promovendo maior capacidade de solubilização. As mistura do P123 com o F127 apresentaram valores satisfatórios, sendo a mistura PF 50 o melhor resultado, mostrando que nessa proporção há uma boa capacidade de solubilização e estabilidade do sistema. Os resultados são equivalentes aos obtidos para copolímeros do mesmo tipo em trabalhos anteriores (KYUNG, BRONICH e KABANOV, 2004).

### 5.3. Tamanho de partícula

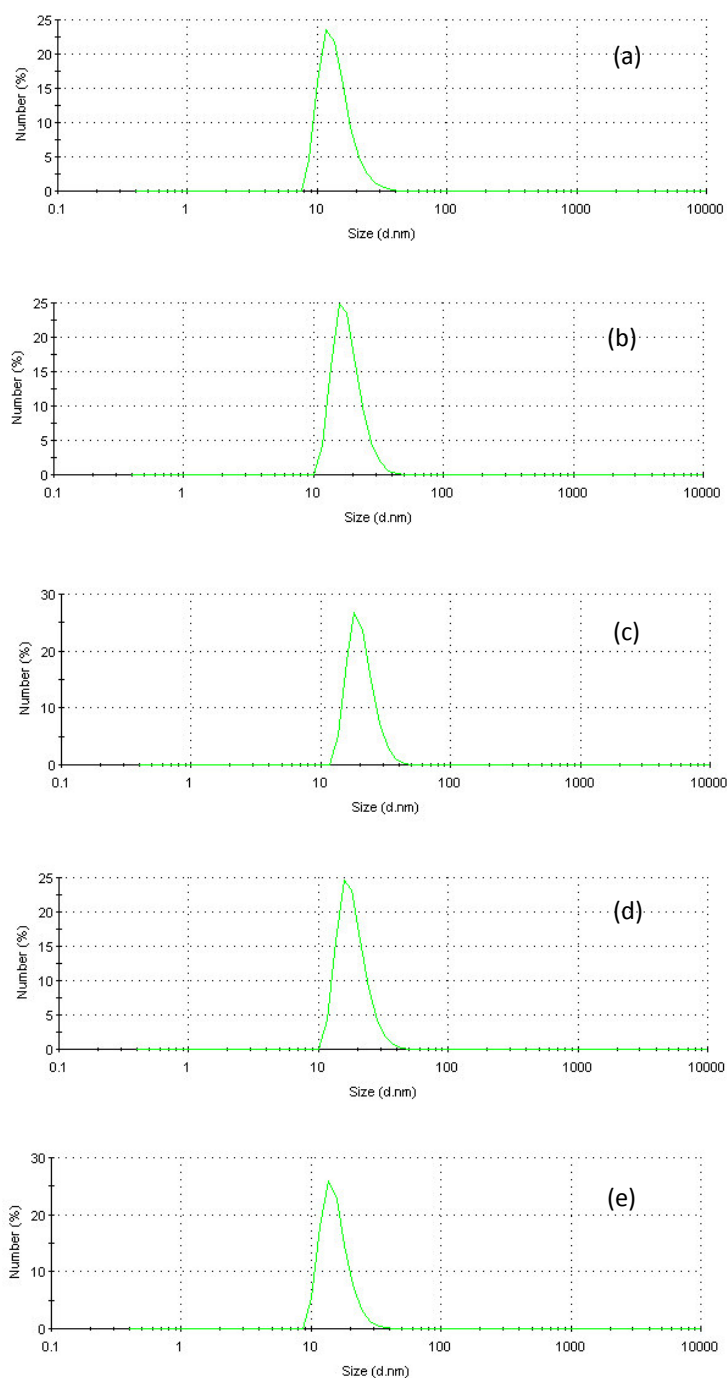
Em geral, para que a eficiência do ativo encapsulado seja longa durante seu tempo de circulação no sangue, as micelas devem ser pequenas o bastante para serem detectadas e envolvidas pelo sistema reticular endotelial (WEI *et al.*, 2009).

Nos estudos feitos por Wei *et al.* (2009) foi observado co-micelização para as misturas entre P123 e F127 com o fármaco paclitaxel com diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) em torno de 20 a 30 nm e índice de polidispersividade entre 0,14 e 0,23, coerentes com os dados obtidos nesse estudo para os mesmos sistemas utilizando o fármaco griseofulvina.

Todos esses sistemas estão em concentrações acima de sua cmc a 25 °C, então suas micelas apresentam um tamanho médio menor que 200 nm, que é uma grande vantagem para seu uso em aplicações farmacológicas intravenosas ou subcutâneas (RICARDO *et al.*, 2006).

Os gráficos de distribuição de tamanho por volume das nanopartículas (micelas) dos sistemas poliméricos a 1% com griseofulvina a 37 °C em água estão apresentados na Figura 12. Pode-se observar que as distribuições são todas unimodais, sendo característico da presença de micelas monodispersas, evidenciando que não há unímeros livres em solução. A distribuição para as misturas apresentam também picos únicos monodispersos, isto é, há um único tipo de micela no meio, mostrando que as misturas binárias dos Pluronicos formam co-micelas em solução.

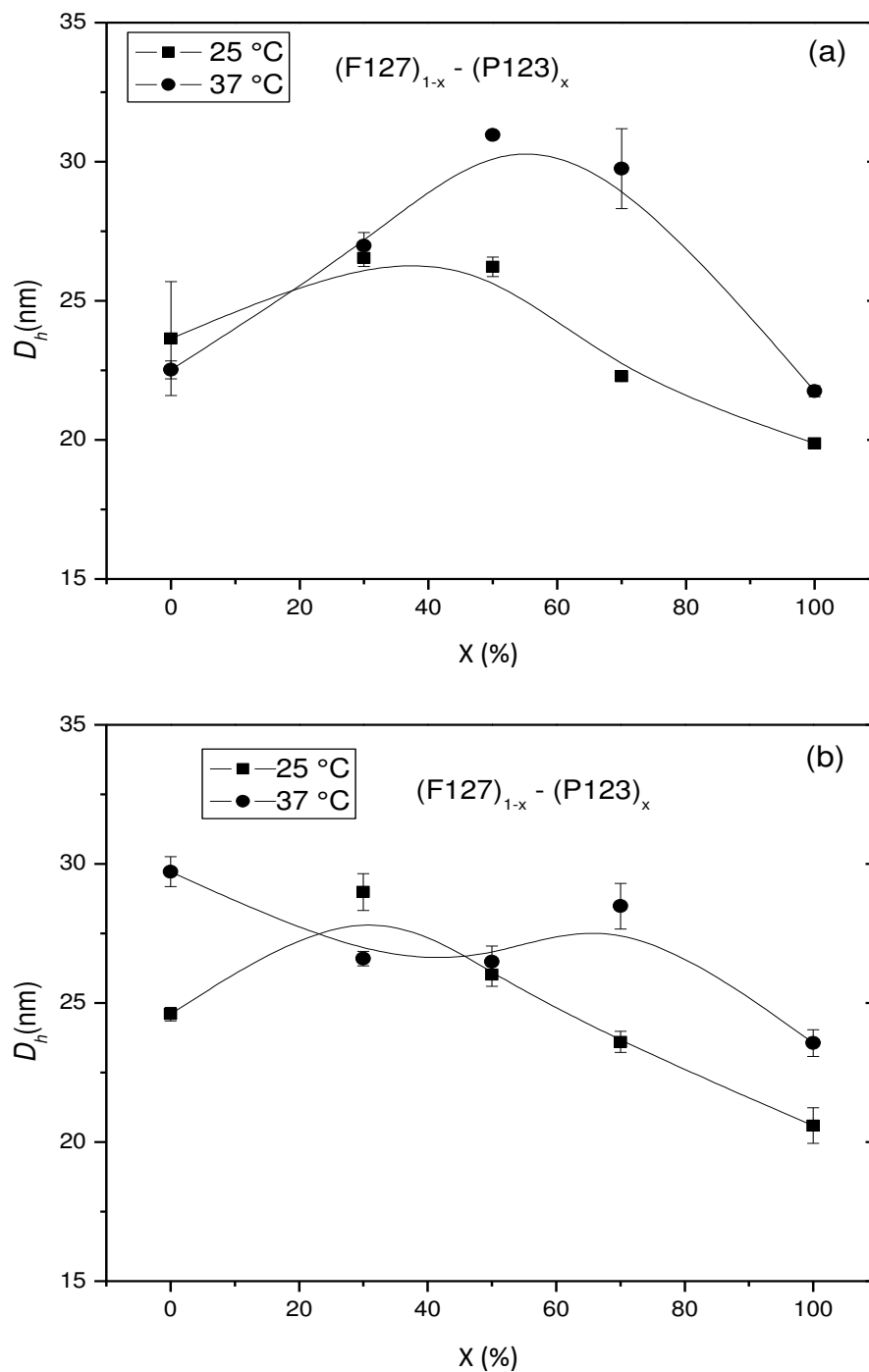
Figura 12. Curvas de distribuição de tamanho por volume dos sistemas com griseofulvina a 37 °C: (a) F127, (b) PF 70, (c) PF 50, (d) PF 30 e (e) P123.



Os valores de diâmetro hidrodinâmico médio de pico ( $D_h$ ) são apresentados na Figura 13 para os sistemas F127, P123 e suas misturas PF 30, 50 e 70 com e sem griseofulvina a 25 e 37 °C, e assim como observado por Wei *et al.* (2009), o  $D_h$  para todas as análises foi entre 20 e 30 nm. O  $D_h$  do copolímero F127 é maior que o do

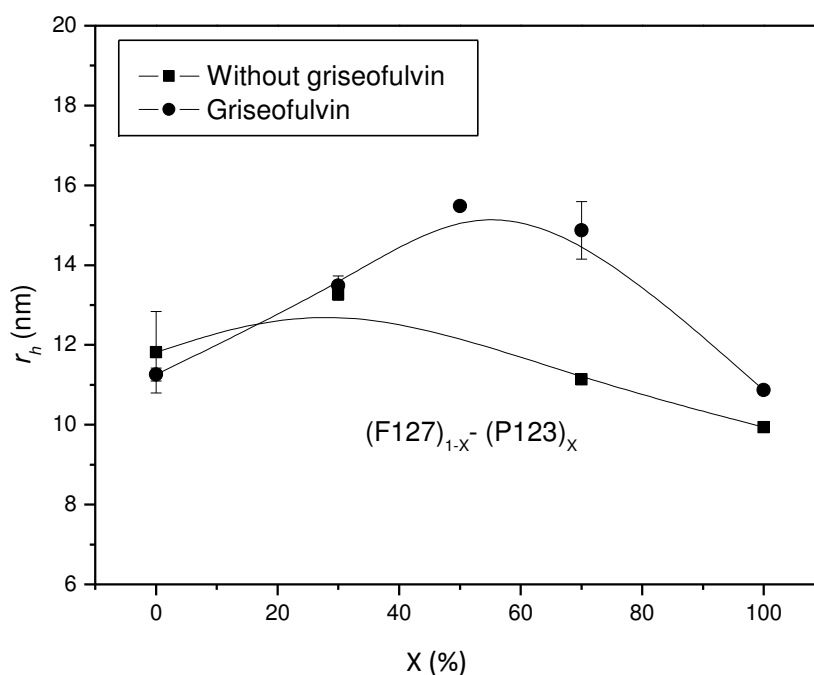
copolímero P123, uma vez que o maior comprimento da cadeia hidrofílica de polioxietileno do F127 promove o maior  $D_h$ .

Figura 13. Diâmetro hidrodinâmico médio de pico ( $D_h$ ) dos sistemas poliméricos a 1% m/v: (a) sem fármaco e (b) com fármaco.



Nesse estudo foi avaliado a influência do fármaco encapsulado no raio hidrodinâmico ( $r_h$ ) das micelas, e não foi observado um efeito significativo no tamanho do raio, considerando o desvio padrão das análises entre os sistemas estudados (Figura 14). A diferença do tamanho de  $r_h$  para os sistemas P123 e F127 com a griseofulvina e o branco está entre 1 e 3 nm, e nas suas misturas essa diferença é menor ainda, confirmando o que foi observado por Wei *et al.* (2009).

Figura 14. Efeito do fármaco encapsulado no raio hidrodinâmico ( $r_h$ ) dos sistemas a 37 °C.



Os resultados de  $r_h$  a 37 °C estão próximos com os resultados obtidos por Chaibundit *et al.* (2007), onde foram estudados os mesmos sistemas a 40 °C (Tabela 9).

Tabela 9.  $r_h$  a 37 °C experimentais e encontrado na literatura.

Sistemas	$r_h$	$r_h^*$
F127	29,72 ± 0,54	12,5
PF 30	26,59 ± 0,26	14,6
PF 50	26,48 ± 0,57	13,2
PF 70	28,48 ± 0,82	11,4
P123	23,56 ± 0,48	8,6

\*Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S., Costa, F. M. L. L., Yeates, S. G. e Booth, C., *Micellization and Gelation of Mixed Copolymers P123 and F127 in Aqueous Solution*, *Langmuir*. **2007**, 23, 9229.

### 5.4. Liberação *in vitro*

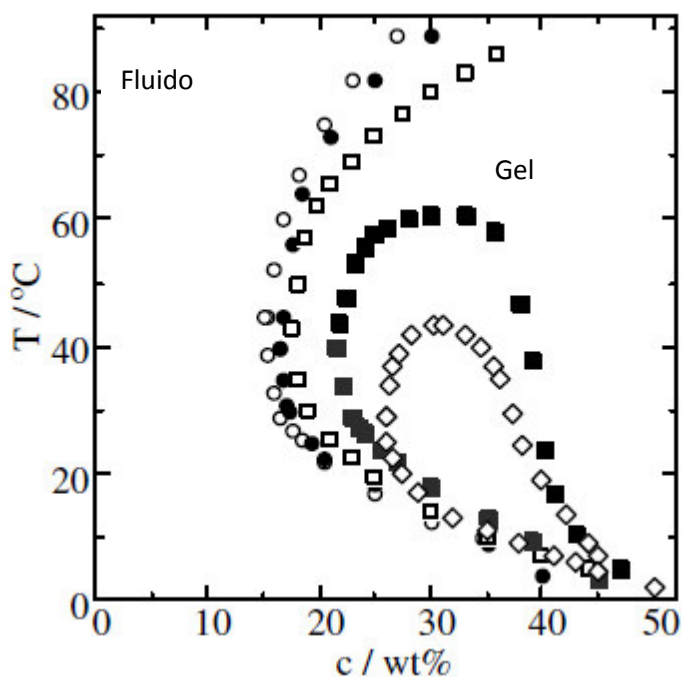
A eficácia da liberação de substância lipofílica, como fármacos hidrofóbicos, utilizando nanopartículas na forma núcleo-corona é dependente da interação entre o ativo e as propriedades hidrofóbicas do núcleo (ALLEN, MAYSINGER e EISENBERG, 1999).

Allen, Maysinger e Eisenberg (1999) estudaram que a taxa de liberação pode ser influenciada pela força de interação entre o fármaco e o núcleo, o estado físico das nanopartículas, a quantidade de fármaco encapsulado, entre outros fatores.

Nesse trabalho alguns estudos prévios foram feitos para se determinar o melhor método de liberação para se utilizar os triblocos P123 e F127 como nanoencapsuladores com objetivo para aplicação subcutânea.

Silva *et al.*, (2007) estudaram as propriedades geleificantes dos Pluronicos P123, F127 e suas misturas binárias, PF 25, 50 e 75 (Figura 15).

Figura 15. Diagrama de fases dos copolímeros (○) F127, (◇) P123, (●) PF 25/75, (□) PF 50/50 e (■) PF 75/25 publicado por Silva *et al.*, 2007.



As propriedades termorresponsivas desses copolímeros é uma consequência da diminuição na solubilidade do copolímero em água com o aumento da temperatura, que resulta na formação de gel a partir de micelas adicionais, tornando-as

hermeticamente empacotadas com sua mobilidade restrita (ATTWOOD e BOOTH, 2007).

Silva *et al.*, (2007) observaram que na faixa de temperatura estudada (10-90 °C), o F127 começa formar gel na concentração de 15%, com uma temperatura crítica de 45 °C, temperatura a partir da qual, sob aquecimento, o fluido torna-se gel, enquanto que o P123 começa a formar gel numa concentração superior, 26%, com uma temperatura crítica de 28 °C.

Apesar da grande semelhança entre os copolímeros, pois ambos são do tipo  $E_mP_nE_m$  e têm o mesmo tamanho da cadeia hidrofóbica de polioxipropileno, a diferença entre eles está na cadeia hidrofílica de polioxietileno, que com o aumento da cadeia hidrofílica há uma redução da concentração mínima para formação de gel (SILVA *et al.*, 2007).

Silva *et al.*, (2007) também observaram que o aumento de P123 %m/m diminui o limite da temperatura em que o sistema encontra-se turvo, para o F127 o diagrama mostra que com o aumento de F127 %m/m o limite da fase gel move-se para concentrações mais baixas e temperaturas mais altas.

As mudanças dos limites de formação de gel das misturas dos copolímeros estudadas por Silva *et al.*, (2007) foram proporcionais à quantidade dos copolímeros no sistema, consistente com a pesquisa realizada por Chaibundit *et al.*, (2007), como mostra a Tabela 11.

Tabela 10. Concentração ( $c^*$ ) e temperatura ( $T^*$ ) críticas de formação de gel dos copolímeros F127, P123 e suas misturas.

Sistemas	$c^*$ (% m/m)	$T^*$ (°C)
P123 <sup>2</sup>	26,0	28,0
PF 75/25 <sup>2</sup>	23,3	33,0
PF 70/30 <sup>1</sup>	22,5	40,0
PF 50/50 <sup>2</sup>	21,7	40,0
PF 30/70 <sup>1</sup>	16,5	42,5
PF 25/75 <sup>2</sup>	16,1	43,0
F127 <sup>2</sup>	15,0	45,0

<sup>1</sup>Chaibundit, C., Ricardo, N. M. P. S., Costa, F. M. L. L., Yeates, S. G. e Booth, C., *Micellization and Gelation of Mixed Copolymers P123 and F127 in Aqueous Solution*, *Langmuir*, **2007**, 23, 9229.

<sup>2</sup>Silva, D. S., Ribeiro, M. E. N. P., Nogueira, R. B. M., Oliveira, S. A., Trevisan, M. T. S., Ricardo, N. M. P. S., *in Anais do 9º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Campina Grande, **2007**.

A Tabela 10 mostra a concentração mínima em que cada mistura de copolímero tornou-se um gel rígido determinadas por Silva *et al.*, (2007) e Chaibundit *et al.*, (2007). Os estudos verificaram que em toda faixa de concentração o limite de formação de gel das misturas tem o comportamento esperado. O resultado da proporção PF 50/50 determinada por Silva *et al.*, (2007) mostrou-se semelhante ao relatado por Chaibundit *et al.*, (2007), e as demais proporções, PF 75/25 e PF25/75, mostraram uma boa tendência na faixa de temperatura e concentração da formação do gel comparadas com as misturas PF70/30 e PF30/70.

A formação de géis desses sistemas com uma temperatura de transição na faixa entre a temperatura ambiente e a temperatura corpórea torna essas misturas interessantes para administração subcutânea de medicamentos.

Segundo Allen, Maysinger e Eisenberg (1999) a taxa de liberação do fármaco é afetada pelo estado físico das nanopartículas, pois influencia na força de interação entre o fármaco e o núcleo micelar.

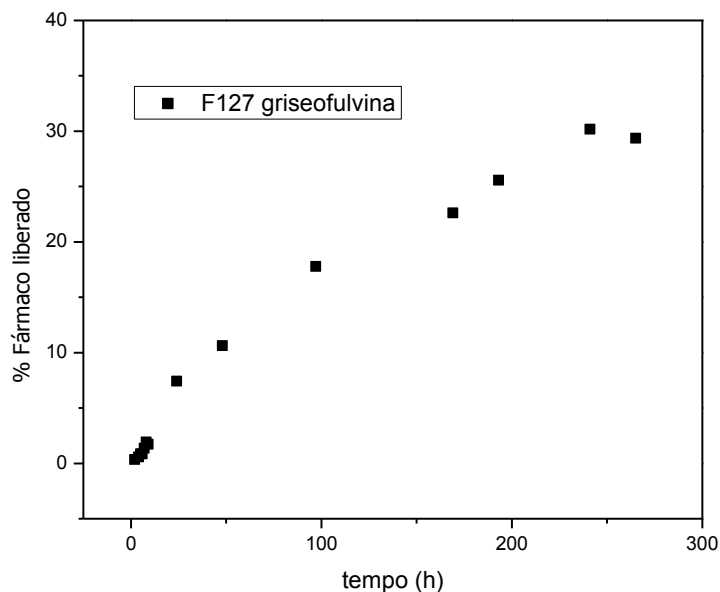
No estado gel espera-se uma interação maior entre o fármaco e o núcleo, devido ao maior empacotamento do sistema deixando a sua mobilidade restrita, controlando a taxa de liberação do fármaco.

As concentrações, na qual o copolímero F127 e sua mistura de 50% com P123 tornam-se géis são 15 e 19%, respectivamente, variando a temperatura de 25 a 37 °C, que é a temperatura viável para aplicação subcutânea.

Na Figura 16 é mostrado o perfil de liberação do fármaco griseofulvina encapsulada no sistema em gel F127 15%, no qual se estuda a variação da porcentagem de liberação do fármaco com o tempo de liberação gasto pelo sistema em meio a um tampão simulando o fluido sanguíneo de pH 7,4 a 37 °C.



Figura 16. Cinética de liberação *in vitro* da griseofulvina encapsulada no sistema em gel F127 a 37 °C e pH = 7,4.



Kim *et al.*, (2001) notaram que os testes com o fármaco não encapsulado exibem uma liberação inicial bastante rápida e uma taxa de liberação de quase 100%, mostrando a eficiência de sistemas micelares em controlar a liberação de fármacos hidrofóbicos, fato esse também observado nesse trabalho para os sistemas.

Allen *et al.* (1999) estudaram padrões de liberação baseados em nanopartículas formadas por micelas em solução, e consideram que a liberação do ativo é feita por três mecanismos: (i) difusão, (ii) degradação do copolímero e (iii) estabilidade da micela.

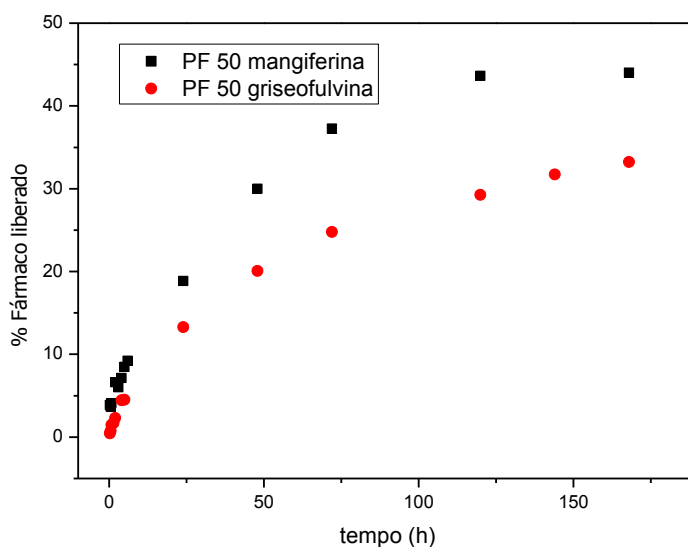
No método de liberação utilizado nesse trabalho o mecanismo considerado foi o de difusão, pois a massa molar de corte da membrana de diálise ( $M_{wCO}=2000$  g/mol) é menor que a massa dos copolímeros, não variando a concentração do polímero no interior da membrana durante o experimento.

A liberação da griseofulvina ocorreu através do mecanismo de difusão durante 288 h, correspondente a 12 dias, com uma taxa de liberação de 29%, o que é condizente com o tipo de interação não-covalente entre a griseofulvina e nano-micela (MISSIRLIS *et al.*, 2006). A liberação da griseofulvina por difusão permite controle sobre a liberação.

Nos estudos feitos no tópico anterior para determinar a capacidade de solubilização ( $S_{cp}$ ) dos sistemas foi observado que a mistura PF 50 para ambos os fármacos, griseofulvina e mangiferina, a 37 °C teve os melhores resultados de  $S_{cp}$ .

Na Figura 16 é mostrado o perfil de liberação dos fármacos griseofulvina e mangiferina encapsulada no sistema em gel PF 50 19% meio a um tampão simulando o fluido sanguíneo de pH 7,4 a 37 °C.

Figura 17. Cinética de liberação *in vitro* dos fármacos mangiferina e griseofulvina no sistema em gel PF 50 a 37 °C e pH = 7,4.



Na cinética de liberação, ocorrida durante 8 dias utilizando o gel de PF 50 19%, foi observado que para a griseofulvina, de  $S_{cp}$  3,33, a taxa de liberação controlada foi de 34 %, aproximadamente, e para a mangiferina, de  $S_{cp}$  10,3, a taxa foi de 44%,

Soo *et al.*, (2005) observou que sistemas que possui maior quantidade de fármaco encapsulado possuem menor taxa de liberação. O mesmo não foi observado na cinética de liberação do PF 50, para a mangiferina a taxa de liberação foi de 44% enquanto para a griseofulvina foi de 34%. Esse comportamento pode ser explicado pela maior solubilidade do fármaco mangiferina em água ser maior do que a solubilidade da griseofulvina.

É interessante notar que os testes com o fármaco não encapsulado exibem uma liberação inicial bastante rápida e uma taxa de liberação de quase 100% (KIM *et al.*, 2001), mostrando a eficiência de sistemas micelares em controlar a liberação de fármacos hidrofóbicos. A estabilidade das micelas após a diluição sanguínea (baixa

cmc) acarreta maior tempo de circulação do fármaco no sangue (LETCHEFORD e BURT, 2007), acrescido da minimização dos efeitos colaterais causados pelo fármaco em sua forma livre.

Allen, Maysinger e Eisenberg (1999) mostraram que o comportamento das micelas nesse transporte de fármaco é determinado pelo fato de que a estabilidade micelar é altamente dependente da composição e da formação das micelas. Dessa forma, podemos concluir que a mistura PF 50 apresentou um perfil de liberação controlada para os dois fármacos, tendo sua liberação máxima iniciada em torno de 5 dias, e mantendo-se constante até o 8º dia de estudo, mostrando bons sistemas carreadores de fármacos para liberação controlada, conforme confirmado por sua baixa cmc.

A mistura estudada nesse trabalho de pesquisa é promissora para sistemas de liberação de fármaco por ser bom agente carreador, apresentar micelas de tamanho nanométrico, estáveis à diluição sanguínea e promover uma liberação sustentada.

## 6. CONCLUSÃO

---

As misturas dos copolímeros triblocos F127 e P123, em todas as proporções estudadas, guardam as características de seus constituintes isolados, o que as tornam interessantes para aplicação farmacológica.

A concentração micelar crítica (cmc) do copolímero F127 é maior que a cmc do tribloco P123, coerente com a sua menor hidrofobicidade. As cmc's dos copolímeros F127, P123 e suas misturas sofrem influência da temperatura, o que promove aumento do número de moléculas na micela. As cmc's das misturas dos copolímeros triblocos F127 e P123 são inferiores à cmc do F127 sozinho, tornado as misturas importantes para aplicações farmacológicas, devido à potencial estabilidade de suas micelas após a diluição sanguínea.

Destaca-se que a capacidade de solubilização apresenta a maior vantagem do uso de mistura de copolímeros contendo 50% do copolímero mais hidrofóbico tanto para a griseofulvina quanto para a mangiferina nas duas temperaturas. Os dois fármacos tiveram um aumento maior que 1,5 vezes com o uso de soluções poliméricas. Tal fato incentiva em muito a aplicabilidade desses copolímeros.

As misturas PF 30, PF 50 e PF 70 são alternativas promissoras, as quais combinam as características de geleificação tão boas quanto seus constituintes separadamente e melhor capacidade de solubilização. Os encapsulados da mistura em gel PF 50 para os dois fármacos apresentou liberação sustentada por um período de importância clínica de 7 dias, promissora para carregamento e liberação, estáveis a diluição e ao pH sanguíneo.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. L., LAVASANIFAR, A., KWON, G. S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Science**, 92, 1343, 2003.
- ALLEN, C., MAISINGER, D., EISENBERG, A. Nano-Engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surface B: Biointerface**, 16, 3 - 27, 1999.
- ALEXANDRIDIS, P., HOLZWARATH, J. F., HATTON, T. A. Micellization of Poly(ethyleneoxide)-Poly(propyleneoxide)-Poly(ethyleneoxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. **Macromolecules**, 27, 2414, 1994.
- ALIABADI, H. M., LAVASANIFAR, A. Polymeric micelles for drug delivery. **Expert Opinion Drug Delivery**, 3, 139, 2006.
- ATTWOOD, D., BOOTH, C. Solubilisation of a Poorly Aromatic Drug by Micellar Solutions of Amphiphilic Block Copoly(oxyalkyne)s. **Colloids and Interface Science Series**, 3, 61, 2007.
- NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25, 772-775, 2002.
- BOHORQUEZ, M., KOCH, C., TRYGSTAD, T., PANDIT, N., A Study of the Temperature - Dependent Micellization of Pluronic F127. **Colloids and Interface Science Series**, 216, 34-40, 1999.
- CHAIBUNDIT, C., RICARDO, N. M. P. S., CROTHERS, M., BOOTH, C. Micellization of Diblock(oxyethylene/oxybutylene) Copolymer E<sub>11</sub>B<sub>8</sub> in Aqueous Solution. Micelle Size and Shape. Drug Solubilization. **Langmuir**, 18, 4277, 2002.
- CHAIBUNDIT, C., RICARDO, N. M. P. S., COSTA, F. M. L. L., YEATES, S. G. e BOOTH, C. Micellization and Gelation of Mixed Copolymers P123 and F127 in Aqueous Solution. **Langmuir**, 23, 9229, 2007.
- CROTHERS, M., ZHOU, Z Y., RICARDO, N. M. P. S., YANG, Z., TABOADA, P., CHAIBUNDIT, C., ATTWOOD, D., BOOTH, C. Solubilisation of aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. **International Journal of Pharmaceutical**, 293, 91, 2005.
- DALTIN, D. **Tensoativos: Química, propriedades e aplicações**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

DONG, J., CHOWDHRY, B. Z., LEHARNE, S. A. Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect**, 277, 249, 2006.

ELLIS, A. G., CRINIS, N. A., WEBSTER, L. K. Inhibition of etoposide elimination in the isolated perfused rat liver by Cremophor EL and Tween 80. **Cancer Chemotherapy and Pharmacological**, 38, 81, 1996.

FINKELSTEIN, E. AMICHAJ, B. GRUNWALD, M. H. Griseofulvin and its uses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 6, 189, 1996.

GAO, Y., WANG, Y., MA, Y., YU, A., CAI, F., SHAO, W., ZHAI, G. Formulation optimization and in situ absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion. **Colloids and Surface B: Biointerface**, 71, 306, 2009.

GAUCHER, G., DUFRESNE, M. H., SANT, V. P., KANG, N., MAYSINGER, D., LEROUX, J. C., Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 109, 169, 2005.

HARRISON, W. J., ABOULGASEM, G. J., ELATHREM, F. A. I., NIXON, S. K., ATTWOOD, D., PRICE, C., BOOTH, C., Micelles and Gels of Mixed Triblock Copoly(Oxyalkylene)s in Aqueous Solution. **Langmuir**, 21, 6170, 2005.

KADAM, Y., YERRAMILI, U., BAHADUR, A. Micelles from PEO-PPO-PEO block copolymers as nanocontainers for solubilisation of a poorly water soluble drug hydrochlorothiazide. **Colloids and Surface B: Biointerface**, 72, 141, 2009.

KAWAGUCHI, T., HONDA, T., NISHIHARA, M., YAMAMOTO, T., YOKOYAMA, M. Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats. **Journal of Controlled Release**, 136, 240, 2009.

KIM, S. C., KIM, D. W., SHIM, Y. H., BANG, J. S., OH, H. S., KIM, S. W., SEO, M. H. In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: Toxicity and efficacy. **Journal of Controlled Release**, 72, 191, 2001.

KYUNG, T. O., BRONICH, T. K., KABANOV, A. V. Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers. **Journal of Controlled Release**, 94, 411, 2004.

KUMAR, N., RAVIKUMAR, M. N. J., DOMB, A. J. Biodegradable block copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 53, 23, 2001.

LETCHFORD, K., BURT, H., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymerosomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 65, 259, 2007.

LEE, E. S., OH, Y. T., YOUN, Y. S. NAM, M., PARK, B., YUN, J., KIM, J. H., SONG, H., OH, K. T. Binary mixing of micelles using Pluronics for a nano-sized drug delivery system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 82, 190-195, 2011.

LOPES, C.M., LOBO, J.M.S., COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41, 143-154, 2005.

MISSIRLIS, F., HOLMBERG, S., GEORGIEVA, T., DUNKOV, B.C., ROUAULT, T.A., LAW, J.H., Characterization of mitochondrial ferritin in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 103(15), 5893-5898, 2006.

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

MULHOLAND, P. J., FERRY, D. R., ANDERSON, D., HUSSAIN, S. A., YOUNG, A. M., COOK, J. E., HODGKIN, E., SEYMOUR, L. W., KERR, D. Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin. **Journal Annals of Oncology**, 12, 245, 2001.

NIXON, S. K., HVIDT, S., BOOTH, C. Micellization of block copolymer P94 in aqueous solution. **Journal of Colloids and Interface Science**, 280, 219, 2004.

OLIVEIRA, R. B., LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3, 29, 2006.

PATRAVALE, V. B., DATE, A. A., KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacological**, 56, 827, 2004.

PEC, E. A., WOUT, Z. G., JOHNSTON, T. P. Biological activity of urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 81, 626., 1992.

PEPPAS, L. B. Polymers in Controlled Drug Delivery. **Medical Plastics and Biomaterials Magazine**, 34, 1997.

PINHO, M. E. N., COSTA, F. de M. L. L., RICARDO, N. M. P. S., YEATES, S. G., ATTWOOD, D., BOOTH, C. Mixtures of triblock copolymers E<sub>62</sub>P<sub>39</sub>E<sub>62</sub> and E<sub>137</sub>S<sub>18</sub>E<sub>137</sub> – Potential for drug delivery from in situ gelling micellar formulations. **International Journal of Pharmaceutical.**, 328, 95, 2007.

REKATAS, C. J., MAI, S. M., CROTHERS, M., QUINN, M., COLLETT, J. H., ATTWOOD, D., HEATLEY, F., MARTINI, L., BOOTH, C. The effect of hydrophobe chemical structure and chain length on the solubilisation of griseofulvin in aqueous micellar solutions of copoly(oxyalkylene)s. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 3, 4769, 2001.

RIBEIRO, M. E. N. P. Micelas de Copoli(oxialquileno)s: Caracterização, Encapsulação e Liberação de Fármaco. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

RIBEIRO, M. E. N. P., VIEIRA, I. G. P., CAVALCANTE, I. M., RICARDO, N. M. P. S., ATTWOOD, D., YEATES, S. G., BOOTH, C. Solubilisation of griseofulvin, quercetin and rutin in micellar formulations of triblock copolymers E<sub>62</sub>P<sub>39</sub>E<sub>62</sub> and E<sub>137</sub>S<sub>18</sub>E<sub>137</sub>. **International Journal of Pharmaceutical**, 378, 211, 2009.

RICARDO, N. M. P. S., CHAIBUNDIT, C., YANG, Z., ATTWOOD, D., BOOTH, C. Association behaviour of mixed triblock copoly(oxyalkylene)s (type eBE and ESE) in aqueous solution. **Langmuir**, 22, 1301, 2006.

SCHMOLKA, I. R., RAYMOND, A. J. Micelle formation of polyoxyethylene - polyoxypropylene surfactants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 44, 559, 1965.

SILVA, D. S., RIBEIRO, M. E. N. P., NOGUEIRA, R. B. M., OLIVEIRA, S. A., TREVISAN, M. T. S., RICARDO, N. M. P. S. Copolímeros triblocos do tipo P123 e suas misturas: solubilização da griseofulvina e mangiferina. *In: 9º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS*, 2007, Campina Grande.

SOO, P. L., LOVRIC, J., DAVIDSON, P., MAYSINGER, D., EISENBERG, A. Polycaprolactone-block-poly(ethylene oxide) Micelles: A Nanodelivery System for 17β-Estradiol. **Molecular Pharmaceutical**, 2, 519, 2005.

WANKA, G., HOFFMAN, H., ULBRICHT, W. The aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) -poly(oxyethylene)- blockcopolymers in aqueous. **Colloid and Polym Science**, 268, 101, 1990.

WEI, Z., HAO, J., YUAN, S., LI, Y., JUAN, W., SHA, X., FANG, X. Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization and in vitro characterization. **International Journal of Pharmaceutical**, 376, 176-185, 2009.

YOKOYAMA, M. Block copolymers as drug carriers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 9 213, 1992.

FORMAÇÃO DE MICELAS. Disponível em:

<[http://zeus.qui.ufmg.br/~qgeral/?attachment\\_id=557](http://zeus.qui.ufmg.br/~qgeral/?attachment_id=557)>. Acesso em: 27 set. 2012.