



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

FRANCISCO WILLAME ALVES BEZERRA

**OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES MICELARES DO PLURONICS® F127 PARA
SOLUBILIZAÇÃO E LIBERAÇÃO DE BIOATIVOS**

**FORTALEZA
2016**

FRANCISCO WILLAME ALVES BEZERRA

OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES MICELARES DO PLURONIC® F127 PARA
SOLUBILIZAÇÃO E LIBERAÇÃO DE BIOATIVOS

Tese submetida à comissão julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes
Silva Ricardo

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Elenir Nobre
Pinho Ribeiro

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B469o Bezerra, Francisco Willame Alves.

Otimização de Formulações Micelares do Pluronic® F127 para Solubilização e Liberação de Bioativos / Francisco Willame Alves Bezerra. – 2016.
79 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientação: Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.

1. Copolímeros em bloco. 2. Solubilização de bioativos. 3. Nanocarreadores. 4. Neutrófilo.
I. Título.

CDD 540

FRANCISCO WILLAME ALVES BEZERRA

OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES MICELARES DO PLURONIC® F127 PARA
SOLUBILIZAÇÃO E LIBERAÇÃO DE BIOATIVOS

Tese submetida à comissão julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovada em 26/ 02/ 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Sandra de Aguiar Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Sônia Maria Oliveira Costa
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Eveline Solon Barreira Cavalcanti
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Ubiracy e Lenir, a quem eu amo e que me proporcionaram educação, carinho e muito amor.

A minha esposa Carla e aos meus filhos Júlia e Juliano pelo amor, carinho e compreensão a mim dedicados nesta fase difícil.

À minha Família pelo apoio recebido em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar nesta estrada que tanto almejei.

À professora Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo, minha orientadora, pelo acolhimento, confiança e disponibilidade empreendidos à minha pessoa e na realização deste trabalho.

À professora Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro, minha coorientadora, pelo acompanhamento nessa jornada, pela atenção e generosidade em transmitir conhecimentos e propor soluções.

As professoras participantes da Banca examinadora Sandra, Eveline, Kalyne e Sônia pelo tempo e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais – LabPIM, especialmente, a Rafael, Carol Barbosa, Ethanielda, Deyse, Carol Moura, Raquel, Luana, Flávia, Arcelina, Lillian, Solange, Igor e Débora, pelo apoio, convivência e auxílio na superação dos desafios e lutas travadas juntos.

Aos amigos da pós-graduação, Marcos, Gilmara, Aiêrta e Leônia que sempre me ajudaram nos momentos mais difíceis, meu muito obrigado.

Enfim, a todas as pessoas que tenham contribuído de qualquer forma para avançar com este novo passo em minha carreira profissional.

RESUMO

A utilização de sistemas de liberação controlada de bioativos é um tema que recebeu grande destaque nas últimas décadas no setor farmacêutico, devido aos grandes benefícios terapêuticos e às vantagens econômicas associadas. O estudo sobre a utilização de copolímeros na dissolução de bioativos 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 atuar na liberação controlada de bioativos hidrofóbicos no organismo. Esse trabalho propõe investigar o uso do polímero polietilenoglicol (PEG) como aditivo em soluções aquosas do copolímero Pluronic® F127, desenvolvendo estudos de solubilização, liberação e citotoxicidade em neutrófilo humano, com o objetivo de otimizar a solubilização dos bioativos griseofulvina, quercetina e mangiferina. Utilizou-se a técnica de inversão de tubo para o estudo das propriedades geleificantes das misturas entre F127 e os PEG 400, 6K e 35K. Os sistemas contendo os aditivos poliméricos PEG 400, 6K e 35K mostraram-se como alternativas promissoras para o uso em administração subcutânea de bioativos hidrofóbicos, sendo compatíveis com as características de geleificação do constituinte F127 puro, pois promove uma diminuição da concentração de formação de gel. Para os três bioativos em estudo, observou-se que as estruturas micelares de F127 1% imersas em aditivo PEG 6K a uma concentração de 0,5 % apresentaram os melhores valores de solubilização quando comparado às outras porcentagens, os bioativos foram quantificados por espectroscopia UV-Vis. A citotoxicidade foi investigada através da atividade da LDH em neutrófilo humano (5×10^6 células/mL). Em geral, os sistemas (PEG 6K 0,5% + F127 1%) não mostraram citotoxicidade significativa.

Palavras-chave: Copolímeros em bloco. Solubilização de bioativos. Nanocarreadores. Neutrófilo.

ABSTRACT

The drug delivery systems is a topic that has received much attention in the last decades in the pharmaceutical sector, due to the large therapeutic benefits and the economic advantages. The study on the use of copolymers in the dissolution of poorly water soluble bioactive has been increasingly practiced, mainly due to the low toxicity of these carriers and their high efficiency in the process of dissolution. Using polymer surfactants forming micelles in solution, it is possible to increase the solubility and act in the controlled release of hydrophobic bioactive in the body. This study aimed to investigate the use of the polyethylene glycol (PEG) polymer as an additive in aqueous solutions of Pluronic® F127 copolymer, developing solubilization studies, release and cytotoxicity in human neutrophils with the aim of optimizing the solubilization of bioactive griseofulvin, quercetin and mangiferin. Using the tube inversion technique to study the gelling properties of mixtures of F127 and PEG 400, 6K and 35K. The system containing the polymeric additive PEG 400, 6K and 35K are shown as promising alternatives for use in subcutaneous administration of hydrophobic bioactive, being compatible with the gelling characteristics of F127 pure constituents as promotes a decrease in concentration of formation gel. For the three bioactive study, it was observed that the micellar structures F127 immersed in 1% PEG 6K additive at a concentration of 0.5% showed good solubility values as compared to other percentages, the bioactive was quantified by UV-Vis spectroscopy. The cytotoxicity was investigated by LDH activity in human neutrophils (5×10^6 cells / ml). In general, the systems (PEG 6K 0.5% + 1% F127) have show no significant cytotoxicity.

Keywords: Block copolymers. Solubilizing agents. Nanocarriers, Neutrophil.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química do Pluronic®.....	18
Figura 2-	Estado físico dos copolímeros em condições ambientais: verde (Líquido), vermelho (Pasta) e laranja (Floco).....	19
Figura 3-	Estrutura simplificada de uma micela esférica em meio aquoso.....	20
Figura 4-	Representação da estrutura de uma micela polimérica com droga pouco solúvel em água.....	21
Figura 5-	Estrutura do polietilenoglicol (PEG).....	21
Figura 6-	Representação esquemática das estruturas de mesofase: a) cúbica, b) hexagonal e c) lamelar.....	25
Figura 7-	(a) Diagrama de fases de três sistemas: $E_{62}P_{39}E_{62}$ (Pluronic® F87), $E_{82}S_9E_{82}$ e sua mistura na proporção 1:1; (b) Diagrama de fases do Pluronic® P123 ($E_{21}P_{67}E_{21}$)....	26
Figura 8-	Diagrama esquemático mostrando difração de raios-X de um cristal. A distância entre os planos e o ângulo de incidência e reflexão estão marcados.....	30
Figura 9-	Estrutura química da (a) griseofulvina, (b) quercetina e (c) mangiferina.....	33
Figura 10-	Levantamento bibliográfico de estudos do Pluronic® F127.....	35
Figura 11-	Fluxograma do método de solubilização (dissolução direta) dos bioativos griseofulvina, mangiferina e quercetina nas misturas PEG 400, 6K e 35K com e sem o copolímero F127.....	40
Figura 12-	Diagramas de fase das soluções aquosas das misturas de F127 em PEG 400 nas concentrações: (Δ) 0,1%, (\blacksquare) 0,5%, (\square) 1%, (\bullet) 2%, (\circ) 5% m/m, e (\blacktriangleright) F127 puro em água.....	45
Figura 13-	Diagramas de fase das soluções aquosas das misturas de F127 com PEG6K e 35K nas concentrações 0,1 - 10 % em peso.....	47
Figura 14-	Efeito da adição PEG 400 na solubilidade da griseofulvina a 37 °C, com (\bullet) e sem (\blacksquare) F127 1% m/m, (\blacktriangle) somente em água, (\blacktriangledown) apenas no F127 1% m/m.....	51
Figura 15-	Comparativo da solubilidade da griseofulvina nos sistemas PEG 400, 6K* e 35K* com F127 1% m/m.....	53
Figura 16-	Efeito da adição de PEG 400, 6K* e 35K* em soluções de F127 a 1% m/m na solubilização da griseofulvina, expressos como (S-So/mt). Símbolo (\blacktriangledown) indica o valor de (S-So/mt) para F127 a 1% m/m em água pura. T = 37 °C.....	54

Figura 17-	Solubilidade da mangiferina em soluções aquosas de PEG 400 (a), 6K (b) e 35K (c) nas concentrações 0,1 -10 % em peso a 37 °C, com(●) e sem (■) F127 1% m/m.....	56
Figura 18-	Comparativo da solubilidade da mangiferina nos sistemas PEG 400, 6K e 35K nas concentrações 0,1 -10 % em peso a 37 °C, (a) sem F127 e (b) com F127.....	57
Figura 19-	Efeito da adição de PEG 400, 6K e 35K em soluções de F127 a 1% m/m na solubilização da mangiferina, expressos como (S-So/mt). Símbolo (▼) indica o valor de (S-So/mt) para F127 a 1% m/m em água pura. T = 37 °C.....	58
Figura 20-	Solubilidade da quercetina em soluções aquosas de PEG 400 (a), 6K (b) e 35K (c) nas concentrações 0,1 -10 % em peso a 37 °C. Símbolo (▼) indica o bioativo somente em F127 a 1% m/m em água pura. T = 37 °C.....	61
Figura 21-	Comparativo da solubilidade da quercetina nos sistemas PEG 400, 6K e 35K nas concentrações 0,1 -10 % em peso, Símbolo (▼) indica o bioativo somente em F127 a 1% m/m em água pura. T = 37 °C.....	62
Figura 22-	Comparativo da solubilidade da quercetina nos sistemas PEG 400, 6K e 35K nas concentrações 0,1 -10 % em peso a 37 °C, com F127 1% m/m.....	63
Figura 23-	Dados de SAXS obtidos a 30°C, para 30% em peso de géis aquosos de F127 mais PEG6K e PEG35K como indicado. Os valores de m/m% em peso de polímero são mostrados. Escalas de intensidade e zeros são arbitrárias.....	64
Figura 24-	Avaliação da citotoxicidade dos sistemas: (a) PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m, (b) PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m + Griseofulvina, (c) PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m + Quercetina e (d) PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m + Mangiferina, mensurada pela atividade da lactose desidrogenase.....	67
Figura 25-	Liberação da mangiferina encapsulada no sistema F127 1 % / PEG 6K 0,5 %.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-	As razões de espaços de Bragg consecutivos recíprocos para diferentes modelos morfológicos.....	31
Tabela 2-	Características moleculares dos polímeros PEG (400, 6K e 35K), e F127.....	38
Tabela 3-	Solubilidade dos bioativos griseofulvina, mangiferina e quercetina em água (S_0) a 37° C.....	49
Tabela 4-	Termos descritivos de solubilidade e seus significados.....	49
Tabela 5-	Solubilização da griseofulvina nas misturas de F127 a 1% m/m nas soluções com concentrações 0,1 - 30 % em peso do PEG 400, a 37 °C.....	50
Tabela 6-	Solubilização da griseofulvina nas misturas de F127 a 1% m/m com os polímeros PEG nas concentrações 0,1 - 30 % em peso a 37 ° C.....	52
Tabela 7-	Solubilização da mangiferina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 - 10 % em peso do PEG 400, a 37 ° C.....	55
Tabela 8-	Solubilização da mangiferina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso do PEG 6 K, a 37 ° C.....	55
Tabela 9-	Solubilização da mangiferina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso do PEG 35 K, a 37 ° C.....	56
Tabela 10-	Solubilização da quercetina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso do PEG 400, a 37 ° C.....	59
Tabela 11-	Solubilização da quercetina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso do PEG 6K, a 37 °C.....	60

Tabela 12- Solubilização da quercetina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso do PEG 35K, a 37 ° C.....	60
Tabela 13- SAXS: estrutura de gel, vetor de espalhamento q^* , d-espaçamento e raio da esfera micela (r_{hs}) para géis 30% em peso do copolímero F127 em água e em soluções aquosas dos polímeros PEG 6K e PEG 35K a 30 ° C.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P	Bloco de óxido de propileno
E	Bloco de óxido de etileno
PEG	Polietileno glicol
PEG 6K	Polietileno glicol 6000
PEG 35K	Polietileno glicol 35000
PEG 400	Polietileno glicol 400
S	Solubilidade do bioativo na solução do copolímero em g/dL
S_{cp}	Capacidade de solubilização em mg de bioativo por g de bloco hidrofóbico
W_h	Fração em massa do bloco hidrofóbico
W_E	Fração em massa do bloco de polióxido de etileno
n	Número de agregação
CMC	Concentração micelar crítica
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	Copolímero Tribloco.....	17
1.2.	Polietilenoglicol (PEG).....	21
1.3.	Geleificação e Termorresponsividade.....	24
1.4.	Solubilização de Bioativos em Sistemas Micelares.....	27
1.5.	Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS).....	29
1.6.	Bioativos: Griseofulvina, Quercetina e Mangiferina.....	32
2.	JUSTIFICATIVA DA PESQUISA.....	34
3.	OBJETIVOS.....	37
2.1.	Objetivo Geral.....	37
2.2.	Objetivos Específicos.....	37
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.1.	Materiais.....	38
4.2.	Inversão de Tubo.....	38
4.3.	Solubilização.....	39
4.3.1.	<i>Sistemas de F127 em Soluções Solvente PEG</i>	39
4.3.2.	<i>Solubilização dos Bioativos</i>	39
4.3.3.	<i>Quantificação por Espectroscopia UV/VIS</i>	41
4.4.	Estrutura de Gel: Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS).....	41
4.5.	Avaliação da Citotoxicidade: Atividade da Enzima Lactato Desidrogenase (LDH)	42
4.5.1.	<i>Análise Estatística</i>	43
4.6.	Liberção <i>in vitro</i>	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1.	Diagrama de Fase.....	44

5.2.	Solubilização do Bioativo - Quantificação por Espectroscopia UV/Visível.....	47
5.2.1.	<i>Curva de Calibração dos Bioativo.....</i>	47
5.2.2.	<i>Efeito dos Aditivos Polímeros PEG 400, 6K e 35K na Solubilidade dos Bioativos</i>	50
5.3.	Estrutura dos Géis: Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS).....	63
5.4.	Avaliação da Citotoxicidade.....	66
5.5.	Liberação <i>in vitro</i>	68
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS / PERSPECTIVAS.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

A aplicação da nanotecnologia para o desenvolvimento de medicamentos mais seguros e eficazes é o caminho trilhado pelas indústrias farmacêuticas e de biotecnologia nas últimas décadas, sendo impulsionada principalmente pela grande quantidade de novos e eficientes sistemas de administração de fármacos baseados em nanopartículas (KAMALY *et al.*, 2012).

Na descoberta de medicamentos, aproximadamente 70% dos novos candidatos a fármacos demonstram uma baixa ou praticamente nenhuma solubilidade em água constituindo um fator limitante para a atividade *in vivo*. Essas substâncias bioativas apresentam uma baixa biodisponibilidade *in vivo* após a administração oral decorrente de sua baixa solubilidade em água, ou seja, baixa dissolução nos fluidos gastrointestinais. (KAWABATA *et al.* 2011).

Portanto, o estudo de solubilização *in vitro* tem sido reconhecido como um elemento importante para predizer o desenvolvimento de medicamentos, assim, aumentar a taxa de dissolução de drogas pouco solúveis e sua biodisponibilidade *in vivo* (KHADKA *et al.*, 2014).

A medicina moderna em muitas circunstâncias faz uso de grandes quantidades de medicamentos para o tratamento de enfermidades, os quais atingem diversas células do corpo de forma indiscriminada (BADER; PUTNAM, 2014). Desta forma, o desenvolvimento de nanocarreadores poliméricos propostos pela primeira vez por BADER e colaboradores em 1984, visa não apenas potencializar a eficácia terapêutica como também, reduzir a dose e, conseqüentemente pode implicar na diminuição dos efeitos colaterais. (KHADKA *et al.*, 2014).

Pesquisas bibliográficas mostram que a utilização de polímeros para a liberação controlada de fármacos é capaz de direcionar os efeitos da droga a uma população de células específicas, visando a redução de muitos problemas relacionados a administração sistemática de fármacos. Estes problemas incluem a biodistribuição no corpo, a falta de especificidade, a necessidade de grandes doses para alcançar altas concentrações locais e outros efeitos colaterais derivados da administração de altas doses de ativos (BADER; PUTNAM, 2014).

Polímeros são moléculas de alto peso molecular, formadas por unidades estruturais menores, conhecidas como monômeros. A palavra polímero é de origem

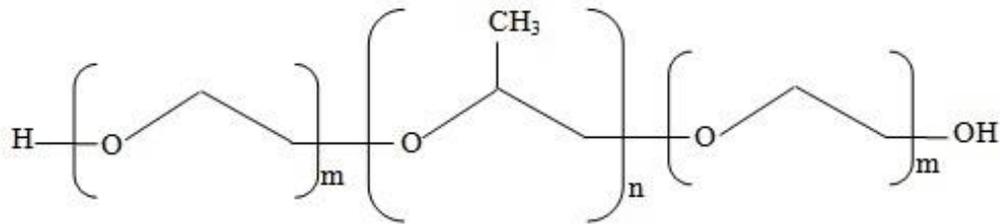
grega, onde poli significa muitos e meros significa partes. Podem ser encontrados abundantemente na natureza ou sintetizados, desempenhando um papel biológico importante na forma de carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e industrial como a celulose das plantas (principal constituinte do papel) e o poliisopreno (borracha natural). Devido às suas diversas propriedades e características, como tamanho, forma tridimensional e algumas vezes assimetria, os polímeros podem ser amplamente utilizados para diferentes finalidades, principalmente os copolímeros, no qual vêm sendo extensamente aplicado na indústria farmacêutica para a formulação de fármacos. (ATKINS; DE PAULA, 2011; AGUILAR *et al.*, 2007; CARRAHER, 2003).

1.1. Copolímero Tribloco

Os copolímeros são polímeros constituídos de diferentes unidades de repetição que podem ser distribuídas de diversas formas nas cadeias poliméricas. Copolímeros em bloco, por sua vez, são entidades macromoleculares que possuem extensões constituídas de monômeros distintos, que podem, inclusive, possuir diferentes características físicas e químicas, dentre elas a solubilidade, que é um fator determinante para esses materiais serem utilizados em formulações farmacêuticas, na dissolução de fármacos pouco solúveis em água (ALLINGER *et al.*, 1978; LODGE, 2003).

Soluções aquosas de copolímeros em bloco do tipo $E_mP_nE_m$ (onde E denota o bloco de óxido de etileno, P o bloco de óxido de propileno e os subscrito m e n indicam as unidades repetitivas de E e P, conforme Figura 1, têm sido amplamente estudadas como solubilizantes de fármacos pouco solúveis em água (KABANOV *et al.*, 2002a e 2002b; KABANOV; ALAKHOV, 2002; CHIAPPETTA; SOSNIK, 2007; WAN *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011) e em especial contribuição a esse estudo o grupo do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais - LabPIM da UFC, ao qual faço parte e faço referência (RIBEIRO *et al.*, 2009a e 2009b, RICARDO *et al.*, 2004, 2006, 2011, 2012, OLIVEIRA *et al.*, 2011a e 2011b). Por conveniência, copolímeros do tipo $E_mP_nE_m$ são comercialmente conhecidos como Pluronic® da BASF-Chemical Company e Poloxamers® da ICI Surfactants (PITTO-BARRY; BARRY, 2014).

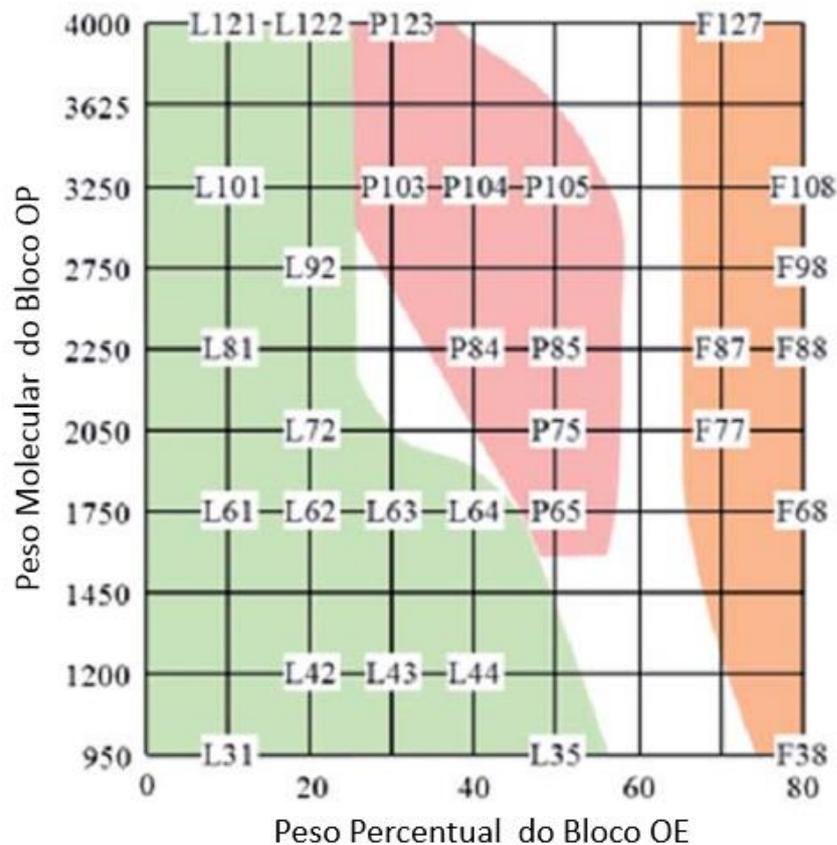
Figura 1- Estrutura química do Pluronic®.



Fonte: Autor.

A nomenclatura Pluronic® inclui uma letra, 'F', 'P' ou 'L', seguida de um código numérico de dois ou três dígitos, Figura 2. Essas letras representam "Flake" (escamas), Pasta ou Líquido, respectivamente, e o código numérico define os parâmetros estruturais do copolímero em bloco. O último dígito deste código dá a estimativa do conteúdo em peso do bloco de óxido de etileno em termos percentuais. Por exemplo, o dígito 8 indica que o conteúdo em peso do bloco de óxido de etileno correspondente a 80%; se o dígito é 1, este conteúdo corresponde a 10%. Os dois primeiros dígitos codificam a massa molar do bloco central P. Para decifrar o código, deve-se multiplicar o número correspondente por 300 (Fator de conversão) para obter a massa molar aproximada em Dalton (Da). Dessa forma, a nomenclatura Pluronic® fornece uma aproximação conveniente para a estimativa das características do polímero na ausência de literatura de referência. Por exemplo, o código "F127" define um polímero sólido, como um bloco central de 3600 Da (12 x 300) e 70 % em peso de E. As características moleculares precisas de cada polímero em bloco Pluronic® são fornecidas pelo fabricante e também podem ser encontrados na literatura (PITTO-BARRY; BARRY, 2014; AKASH; REHMAN, 2015).

Figura 2- Estado físico dos copolímeros em condições ambientais: verde (Líquido), vermelho (Pasta) e laranja (Floco).



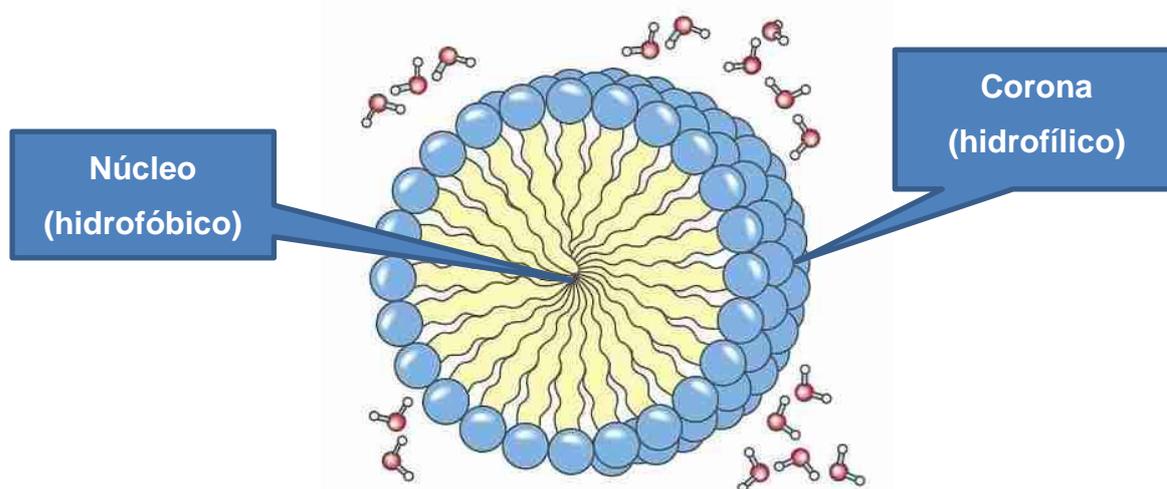
Fonte: PITTO-BARRY e BARRY, 2014.

Copolímeros em bloco com caráter anfifílico formam micelas, Figura 3, capazes de se combinar com o fármaco e otimizar a solubilidade, a estabilidade, a permeabilidade, controlar a liberação e proteger o fármaco (KABANOV *et al.*, 2002c; ALIABADI; LAVASANIFAR, 2006; MUELLEN *et al.*, 2009). Micelas são partículas de tamanho coloidal (10–100 nm) formadas em função da diminuição da energia entrópica do sistema dada a natureza anfifílica do polímero (LETCHFORD; BURT, 2007). Em geral, interações hidrofóbicas ou eletrostáticas são as forças diretivas de separação entre o núcleo e o meio aquoso circundante na formação das micelas (GAUCHER *et al.*, 2005). O núcleo (parte interna) da micela é hidrofóbico e a corona (parte externa) é hidrofílico.

Nas últimas décadas os periódicos científicos relatam a capacidade de solubilização de fármacos com o auxílio do copolímero Pluronic® F127 (AKASH; REHMAN, 2015). Nestes relatos, o copolímero atua como excipiente que, além de melhorar a solubilidades de fármacos pouco solúveis e oferecer liberação prolongada

do fármaco, atribui a capacidade de formação de géis ao produto final da mistura - excipiente e fármaco (CAVALCANTE, 2009; DUTRA, 2012).

Figura 3- Estrutura simplificada de uma micela esférica em meio aquoso.



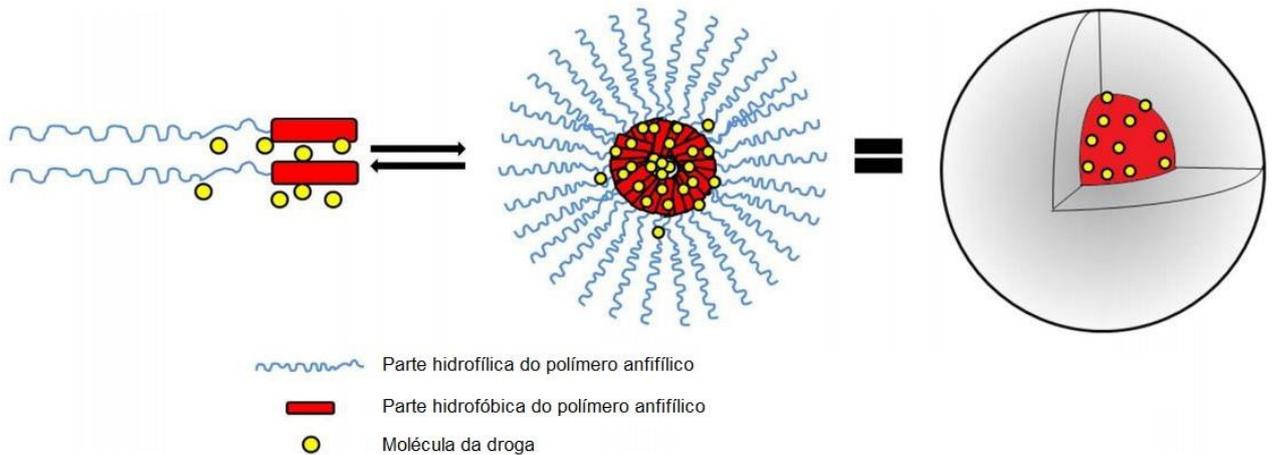
Fonte: MICLELA. Disponível em: < <http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Lipidos/micelas.htm> > adaptada. Acesso em: 15 de jan. 2016.

Para LU e PARK, 2013, a solubilidade é um dos parâmetros farmacológicos investigados. 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, ou seja, a sua biodisponibilidade, Figura 4.

Estudos realizados com sistemas baseados nos copolímeros triblocos exibiram também uma variedade de propriedades biológicas úteis, dentre elas, o aumento da taxa de cicatrização de ferimentos e queimaduras, a prevenção de adesões pós-operatórias e de necrose celular e a melhoria da quimioterapia do câncer em formulações que utilizaram estes copolímeros. (KABANOV *et al.*, 2002b).

Essa capacidade de solubilização do fármaco em soluções aquosas de copolímeros pode ser melhorada ao preparar solventes contendo polímeros que apresentem alta capacidade de solubilização, como é o caso por exemplo, do polietilenoglicol (PEG), muito utilizado em formulações de micelas poliméricas carreadoras de fármacos (LETCHEFORD; BURT, 2007; GONG *et al.*, 2012).

Figura 4- Representação da estrutura de uma micela polimérica com droga pouco solúvel em água.

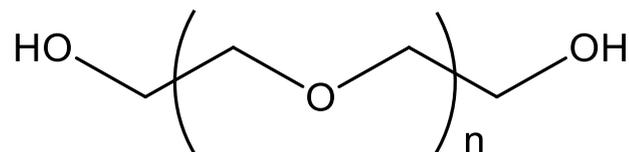


Fonte: LU e PARK, 2013, adaptada.

1.2. Polietilenoglicol (PEG)

O PEG, Figura 5, é um poliéter amplamente utilizado na indústria, seu nome aparece muitas vezes associada a um número que se refere à massa molecular do polímero ou oligômero, por exemplo, um PEG com $n=80$ possui uma massa molecular média de cerca de 3.500 Da, para o que será chamado PEG 3500. Como é um polímero solúvel em água, a maioria de suas aplicações ocorre em solução aquosa. Apresenta baixa inflamabilidade, baixa pressão de vapor e comparado com outros solventes alternativos, PEG é biodegradável, biocompatível e atóxico (SETHIA; SQUILLANTE, 2004).

Figura 5- Estrutura do polietilenoglicol (PEG).



Fonte: Autor.

Historicamente, polímero do tipo PEG é o mais eficiente carreador de fármacos (solúveis em água) utilizados em dispersão de sólidos (SETHIA; SQUILLANTE, 2004).

O efeito de aditivos poliméricos, como PEG em soluções aquosas de Pluronic®, tem sido estudado visando o aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água (RICARDO *et al.*, 2012; RÖSLER *et al.*, 2012).

Foi relatado por OLIVEIRA e colaboradores, 2011a 2011b, um aumento significativo na capacidade de solubilização (S_{cp}) para o fármaco hidrofóbico griseofulvina com adição de uma pequena quantidade (0,5% em peso) de PEG 35000 (PEG 35K) em soluções micelares do copolímero F127 1% em peso (m/m).

Cadeias de PEG ligadas a uma superfície ou a formação de uma coroa nanoesférica apresentam rápido movimento da cadeia em um meio aquoso e um grande volume de exclusão. A repulsão estérica resultante da perda de entropia conformacional das cadeias de PEG ligadas mediante a abordagem de uma substância estranha e a baixa energia livre interfacial de PEG em água contribuem para as propriedades fisiológicas extraordinárias das nanoesferas cobertas com PEG (KATAOKA, 1994; YOKOYAMA *et al.*, 1991; YOKOYAMA *et al.*, 1990; PERACCHIA *et al.*, 1997a; BERGSTRÖM *et al.*, 1994; GREF *et al.*, 1994; PERACCHIA *et al.*, 1998).

O Polietilenoglicol (PEG) enxertado em superfícies utilizadas para fins biomédicos também mostrou que aumenta a sua biocompatibilidade e reduz a trombogenicidade (HOLMBERG *et al.*, 1993; ISTA *et al.*, 1996; DEIBLE *et al.*, 1998a e 1998b; JO; PARK, 2000; OTSUKA *et al.*, 2000; OTSUKA *et al.*, 2001). Além disso, a organização da superfície micelar com os núcleos reativos por meio de *cross-linking* foi descrito, permitindo à superfície apresentar um caráter não incrustante extremamente elevado e trabalhar como um reservatório de agentes hidrofóbicos. A separação nuclear do meio aquoso é a força motriz direta para micelização e prossegue através de uma combinação de forças intermoleculares, incluindo interação hidrofóbica (YOKOYAMA *et al.*, 1990; GREF *et al.*, 1994; KABANOV *et al.*, 1989; KWON *et al.*, 1993; BAZILE *et al.*, 1995), interação eletrostática (HADADA; KATAOKA, 1995; KATAOKA *et al.*, 1996; BRONICH *et al.*, 1997; LYSENKO *et al.*, 1998), complexação de metais (YOKOYAMA *et al.*, 1996; NISHIYAMA *et al.*, 1999) e ligações de hidrogênio (KATAOKA *et al.*, 1998) dos constituintes blocos copoliméricos.

Uma variedade de medicamentos que utilizam genes, proteínas, metais, e semicondutores com diversas características podem ser incorporados para o segmento de formação do núcleo do copolímero de bloco, de modo que se pode esperar uma interação suficientemente forte com o núcleo molecular. A fim de preparar o sistema de distribuição de droga para o local de especificidade, a camada externa da micela polimérica foi construída de tal forma a ser coberta com grupos funcionais, que reagem facilmente com moléculas em potencial ou anticorpos dirigidos a alvos específicos. Essa estratégia para construção de camadas funcionalizadas de PEG foi aplicada a metais e semicondutores de nanopartículas, pois têm atraído muito interesse em sistemas de ensaio para atividade biológica devido às suas propriedades fotoquímica e fotofísicas (WELLER, 1993; KHAIRUTDINOV, 1997; HUANG *et al.*, 1997; ROGACH *et al.*, 1998; FENDLER, 1998).

A hidrofobicidade do sistema carreador pode ser perfeitamente modulada ajustando a proporção de PEG (PERACCHIA *et al.*, 1997b). Em pesquisas de revestimento de nanoesferas com PEG, o peso molecular e a densidade superficial das cadeias hidrofílicas do PEG, controlam as características de liberação de droga dessas nanoesferas (PERACCHIA *et al.*, 1997c). Logo, o desenvolvimento de drogas injetáveis de carreadores de drogas com a participação do PEG, sistemas não reconhecidos pelo corpo como partículas estranhas e eliminados muito rapidamente na corrente sanguínea serão bastante estudadas (PERACCHIA *et al.*, 1997d).

Segundo LI e colaboradores, 2014, nanopartículas que utilizam PEG (polietilenoglicol) são consideradas uma estratégia ideal para conceber sistemas de entrega de drogas anticâncer, uma vez que poderia evitar a absorção pelo sistema retículo-endotelial (RES) e prolongar o tempo de circulação no transporte do vaso sanguíneo. Resultados semelhantes foram relatados por LEI e colaboradores, 2013.

De acordo com LU e PARK, 2013, existem várias razões para a utilização de PEG em sistemas de distribuição de drogas de micelas poliméricas. Algumas vantagens específicas são:

- a) Ele não é tóxico, sendo um dos poucos polímeros sintéticos já aprovados para o uso em produtos de liberação de droga.
- b) Em meio aquoso, o PEG é altamente hidratado e pode mover rapidamente para fora um grande volume de exclusão. Em micelas, o PEG forma uma espécie de concha-escova densa que se estende para

fora do núcleo. Estas características atuam para limitar a interação de micelas com outras micelas (levando à agregação) e proteínas (opsonina), que promovem a captação e remoção pelo sistema mononuclear fagocitário.

- c) O PEG pode ser facilmente funcionalizado como ligante para entrega de drogas específicas. Esta propriedade em particular, tem gerado uma série de vantagens na entrega de compostos altamente potentes, como agentes anticancerígenos que possam beneficiar imensamente tanto em termos de perfis de eficácia e segurança. As razões acima mencionadas contribuem ao grande número de estudos sobre micelas de polímeros envolvendo PEG.

Nanopartículas poliméricas são preparadas a partir de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, com um tamanho entre 10-1000 nm, em que o fármaco é dissolvido, aprisionado, encapsulado ou ligado a uma matriz de nanopartículas de polímero. A penetração e transporte extenso desses sistemas através da pele depende da composição química dos ingredientes, o mecanismo de encapsulamento que influencia a libertação da droga, o tamanho das nanopartículas e da viscosidade das formulações. As nanopartículas poliméricas são capazes de modificar a atividade da droga, retardar e controlar a libertação do fármaco, e aumentar a adesividade da droga ou o seu tempo de permanência na pele. Resumidamente, as nanopartículas podem ser úteis como reservatórios de fármacos lipofílicos a libertá-los no estrato córneo se tornar uma estratégia importante para controlar a sua permeação na pele (GUTERRES *et al.*, 2007).

1.3. Geleificação e Termorresponsividade

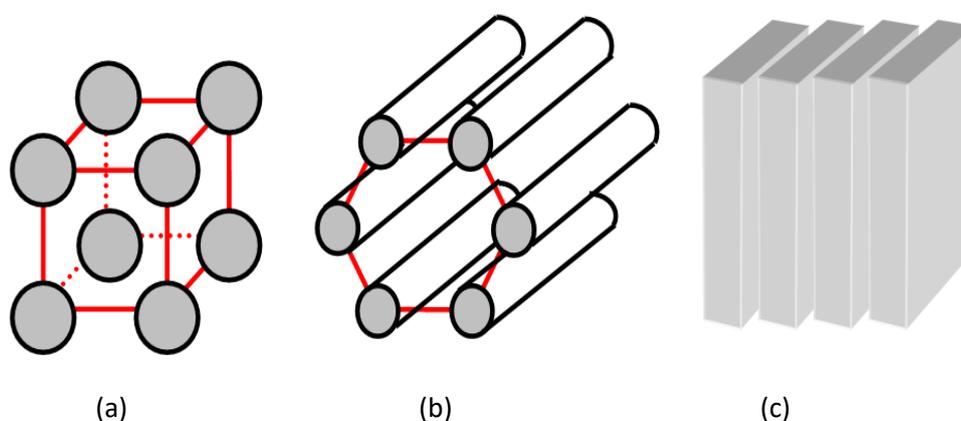
Um fenômeno interessante acontece com vários copolímeros com bloco hidrofílico de polioxietileno. Eles apresentam o chamado “cloud point” ou “clouding temperature” (“ponto de turvação” ou “temperatura de nuvem”). À medida que a temperatura do sistema aumenta, sua solubilidade em água diminui devido à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

essa nova fase é conhecida como “cloud point” e suas propriedades surfactantes podem ser perdidas a partir de então (MYERS, 2006).

À medida que a concentração desses copolímeros aumenta, suas soluções começam a tornar-se mais viscosas até atingir um estado de gel imóvel. WANKA *et al.*, 1994, propuseram que a geleificação acontece pelo empacotamento das micelas em mesofases cristalinas cúbicas, hexagonais ou lamelares, dependendo da forma das micelas. Micelas esféricas formam mesofases cúbicas, Figura 6a, micelas cilíndricas formam mesofases hexagonais, Figura 6b, e micelas na forma de disco formam mesofases lamelares, Figura 6c.

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

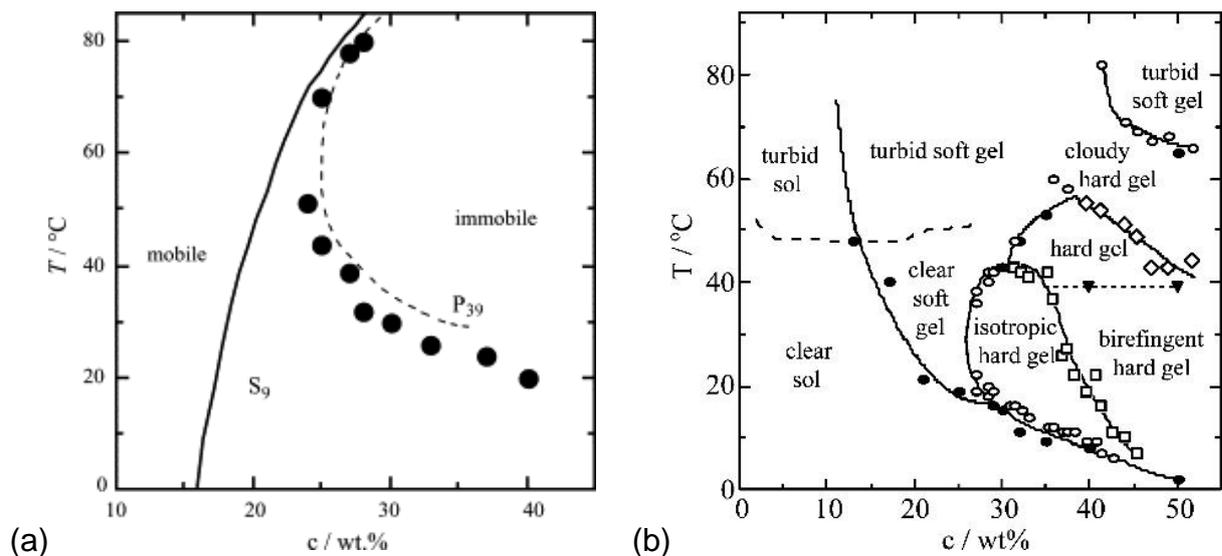
Figura 6- Representação esquemática das estruturas de mesofase: a) cúbica, b) hexagonal e c) lamelar.



Fonte: PINHO, 2006.

Para o estudo do comportamento de formação de gel desses polímeros em função da temperatura e da concentração, há duas técnicas bastante utilizadas: o método de inversão de tubo e a reometria (LI *et al.*, 1997; HAMLEY *et al.*, 1998; ALTINOK *et al.*, 1999; 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 em um gráfico de concentração *versus* temperatura, conhecido como diagrama de fases. As fases essenciais desse diagrama são a de solução ou fluido (“sol” ou “mobile”) e gel duro ou imóvel (“gel”, “hard gel” ou “immobile”) como é apresentado nos trabalhos de HAMLEY *et al.*, 1998 e RICARDO *et al.*, 2005 (Figura 7a). No entanto, podem-se mostrar fases mais específicas, caracterizando a turbidez, refração e textura do gel, dependendo do interesse do pesquisador, como fizeram LI *et al.*, 1997 e CHAIBUNDIT *et al.*, 2007, Figura 7b. Para caracterizar o gel quanto à refração, no entanto, deve-se usar um microscópio de luz polarizada, e então o gel pode ser definido como isotrópico ou birefringente. WANKA e colaboradores, 1994, mostraram que as propriedades isotrópicas de um gel duro de F127 são consistentes com uma estrutura de empacotamento do tipo cúbica.

Figura 7- (a) Diagrama de fases de três sistemas: E₆₂P₃₉E₆₂ (Pluronic® F87), E₈₂S₉E₈₂ e sua mistura na proporção 1:1; (b) Diagrama de fases do Pluronic® P123 (E₂₁P₆₇E₂₁).



Fonte: (a) RICARDO *et al.*, 2005; (b) CHAIBUNDIT *et al.*, 2007.

1.4. Solubilização de Bioativos em Sistemas Micelares

A solubilização de bioativos em polímeros de porção hidrofílica de polioxietileno tem se desenvolvido em recentes trabalhos devido às propriedades destes polímeros, tais como: capacidade de formar micelas estáveis, de promover maior tempo de circulação do bioativo no corpo, entre outros. O uso de polímeros não iônicos é vantajoso porque apresenta reduzida sensibilidade a variação do pH, ou seja, não é afetado pela presença de eletrólitos no sistema (RIBEIRO, 2010). Outra vantagem no uso desses polímeros é que eles já são sintetizados em escala industrial o que torna sua obtenção mais fácil e com o menor custo.

Atualmente o estudo da associação de micelas poliméricas formadas por copolímeros em bloco têm atraído grande interesse, devido a características gerais tais como: (ALIABADI; LAVASANIFAR, 2006; BATRAKOVA, 2008; MUELLEN *et al.*, 2009).

- a) Apresentam um diâmetro menor que 100 nm. Os vasos sanguíneos de tumores e locais de inflamação são mais permeáveis, o que permite o acúmulo de micelas carregadas de bioativos no seu interior, e dessa forma elas são investigadas como sistemas passivos que direcionem o bioativo para o sítio de ação, especialmente em quimioterapia (ALIABADI; LAVASANIFAR, 2006; SAVIC *et al.*, 2006).
- b) O núcleo hidrofóbico age como hospedeiro de bioativos hidrofóbicos, proteínas, DNA, protegendo-os e controlando sua liberação no organismo.
- c) Possuem uma versatilidade ímpar na estrutura núcleo-corona, o que permite desenvolver sistemas projetados individualmente com respeito à fisiopatologia da doença, às propriedades físico-químicas dos bioativos, seu sítio de ação e sua rota de administração.
- d) Baixa toxicidade (SCHMOLKA, 1972; KIM *et al.*, 2001; 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 etoxilato de óleo de rícino (Cremophor® EI, da BASF), usado para a solubilização de fármacos como o Paclitaxel (formulação Taxol®, da BMS), causa uma série de

efeitos colaterais e o Tween 80® usado em formulações do dodetaxel (DTX) comercialmente denominado Duopafei®. (LIU *et al.*, 2011; TIJE *et al.*, 2003; WEISS *et al.*, 1990).

Dependendo do tipo de bioativo e do polímero utilizado existem quatro maneiras do bioativo se localizar na micela: no núcleo micelar, na interface núcleo/corona, na corona, e na superfície (MYERS, 2006). Para bioativos hidrofílicos a corona é o ambiente mais favorável, enquanto para bioativos hidrofóbicos o núcleo é mais favorável, sendo estes bioativos o principal foco no desenvolvimento de formulações micelares.

O fato das micelas solubilizarem os bioativos hidrofóbicos pode ser explicado como uma partição do bioativo entre duas fases: a água e a micela. O coeficiente de partição micela-água pode ser calculado para uma solução de concentração conhecida do polímero pela seguinte equação (KADAM, *et al.*, 2009):

$$P = (S - S_0) / S_0 \text{ ou } P = S_{cp} / S_0 \quad (1)$$

onde S é a solubilidade do bioativo na solução micelar do polímero à concentração específica e S_0 é a solubilidade do bioativo em água.

A energia livre padrão (25 °C) de solubilização (ΔG°) do processo pode ser representada pela seguinte equação:

$$\Delta G^\circ = - RT \ln P \quad (2)$$

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

Um parâmetro importante nos estudos de solubilização de fármacos é a capacidade de solubilização do polímero (S_{cp}), que é a quantidade de fármaco solubilizada por grama de polímero em uma dada solução, e a capacidade de solubilização do núcleo hidrofóbico (S_h), que é a quantidade de fármaco solubilizada por grama de bloco hidrofóbico. Esses parâmetros não são fixos para um determinado polímero, como apontam os estudos, 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; LAVASANIFAR, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2009a).

Quando se comparam polímeros diferentes, fatores que alteram a S_{cp} são: o caráter hidrofóbico do núcleo, o comprimento do bloco hidrofóbico, a arquitetura do

copolímero, a razão em massa núcleo/corona, sua concentração e temperatura micelar crítica e a forma das micelas.

1.5. Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)

Espalhamento de raios-X a baixos ângulos é uma técnica em que o espalhamento elástico de raios-X é registrado a ângulos muito pequenos (tipicamente $0.1 - 10^\circ$). Esta faixa angular contém informação sobre a forma e o tamanho de macromoléculas, distâncias características de materiais parcialmente ordenados, tamanho dos poros e outros dados. No caso de macromoléculas biológicas como proteínas, a vantagem do SAXS sobre a cristalografia é que não necessita de amostras cristalinas.

SAXS é usado para a determinação da estrutura microescalar ou nanoescalar de partículas em termos de tamanho de partícula, forma, distribuição e razão volume/superfície. Os materiais podem ser sólidos ou líquidos e eles podem conter partículas sólidas, líquidas ou gasosas ao mesmo tempo e em combinações diferentes. Não apenas partículas, mas, sistemas com estrutura ordenada como lamelas e materiais fractais podem ser estudados.

Espalhamento de raios-X resulta da diferença na densidade eletrônica em uma amostra. A difração de raios-X por um arranjo de átomos ocorre devido a diferenças de fase entre duas ou mais ondas. A diferença de fase depende da diferença no comprimento do caminho percorrido por quaisquer duas ondas difratadas. Se a diferença de caminho é um inteiro múltiplo do comprimento de onda, as ondas estão completamente em fase e ocorre interferência construtiva. Inversamente, se a diferença no caminho é uma fração do comprimento de onda, as ondas estão fora de fase e a interferência destrutiva resulta num decréscimo na amplitude. A condição de interferência construtiva máxima dá um pico alto no padrão de espalhamento, o qual é chamado de reflexão.

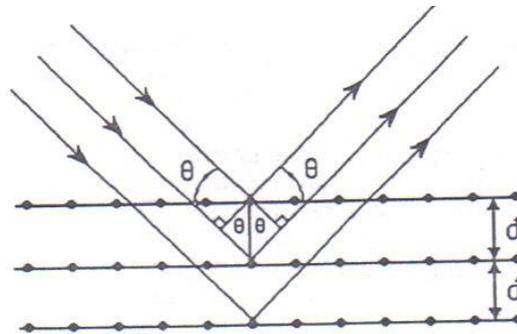
A condição sobre a qual um material cristalino difrata raios-X foi investigado por Bragg em 1933. O resultado de seu trabalho foi a lei de Bragg, a qual descreve a condição essencial para uma reflexão ocorrer, isto é:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (3)$$

onde n é a ordem de refração, dado qualquer valor e interage consistentemente com $\sin \theta$, não excedendo a unidade; λ é o comprimento de onda do raio-X, d é o espaço entre os planos e " θ " é o ângulo de incidência e reflexão do feixe de raio-X, conhecido como ângulo de Bragg, Figura 8.

O ângulo espalhado, isto é, o ângulo entre o feixe incidente e o refletido é 2θ . Esse é o ângulo medido empiricamente.

Figura 8- Diagrama esquemático mostrando difração de raios-X de um cristal. A distância entre os planos e o ângulo de incidência e reflexão estão marcados.



Fonte: OLIVEIRA, 2011c.

Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) está relacionado com o efeito de difração a ângulos tipicamente menores que 2° . Dado o comprimento de onda do raio-X, a distância na qual as flutuações na densidade da difração na faixa de ângulo baixo (determinado através da lei de Bragg) é $10 - 1000 \text{ \AA}$.

É comum expressar espalhamento a baixos ângulos em termos de vetor espalhamento " q " definido como:

$$q = (4\pi/\lambda)\sin\theta \quad (4)$$

onde λ é o comprimento de onda do raio-X e θ é o ângulo de Bragg. O valor de q para a primeira ordem de reflexão (q^*) fornece uma estimativa do espaçamento, através da aplicação da lei de Bragg, na forma:

$$d = 2\pi n/q^* \quad (5)$$

A lei de Bragg assume um nível regular de empilhamento numa direção. Se a amostra contém cristais orientados aleatoriamente então as intensidades podem ser

corrigidas para os valores de uma direção (unidimensional) por aplicação da correção de Lorentz, isto é, por multiplicação da intensidade de espalhamento por q^2 . Em equipamento moderno essa correção pode ser aplicada diretamente via computador. A posição de q^* máximo na $I(q)q^2$ contra q no gráfico é então usado para calcular o comprimento do espalhamento. A correção de Lorentz é relevante apenas se as intensidades são requisitadas para uma análise da estrutura por completo. A posição da reflexão (q^*) pode ser alterada se a intensidade de origem é alta e depende de q .

No que se refere a soluções micelares aquosas de copolímeros em bloco, existem três formas básicas de micelas: esféricas, cilíndricas e lamelares. Quando as estruturas micelares são altamente ordenadas, estruturas lamelares apresentam-se regularmente ordenadas, micelas cilíndricas longas estão empacotadas hexagonalmente e micelas esféricas podem estar empacotadas em uma das três formas cúbicas: simples (cs), face centrada (cfc), e corpo centrado (ccc). Outras estruturas regulares de um tipo bicontínuo são também possíveis.

O arranjo periódico no espaço dá um aumento para reflexões de Bragg bem definidas. O tipo de rede cristalina pode ser determinado por comparação das sequências observadas de espaços consecutivos recíprocos de Bragg com sequências características de redes cristalinas modelos, listados na Tabela 1.

Tabela 1- As razões de espaços de Bragg consecutivos recíprocos para diferentes modelos morfológicos.

Morfologias	Proporções (q/q^*)
Lamela Alternada (lam)	1:2:3:4:5...
Hexagonal (hex)	1: $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{7}$: $\sqrt{9}$... (1:1,73:2:2,65:3...)
Cúbica de Corpo Centrado (ccc) ou	1: $\sqrt{2}$: $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$...
Cúbica Simples (cs)	(1:1,41:1,73:2...)
Cúbica de Fase Centrada (cfc)	1: $\sqrt{(4/3)}$: $\sqrt{(8/3)}$: $\sqrt{(11/3)}$: $\sqrt{4}$... (1:1,16:1,64:1,92:2...)

1.6. Bioativos: Griseofulvina, Quercetina e Mangiferina

O bioativo griseofulvina, Figura 9a, é uma substância aromática de baixa solubilidade em água, usado em vários trabalhos como padrão para se comparar a capacidade de solubilização em copolímeros para fármacos hidrofóbicos (CROTHERS *et al.*, 2002; REKATAS *et al.*, 2001; WIEDMANN *et al.*, 2000).

A griseofulvina possui atividade antifúngica, sendo indicada nas infecções da pele, do couro cabeludo e das unhas causadas por *Dermatophytes* ou *Sporprtrychum* resistentes à terapêutica convencional. Pode ser isolada do *Penicillium griseofulvum dierckx* ou obtida por síntese (FINKELSTEIN *et al.*, 1996). A griseofulvina é um antibiótico não poliênico que age causando a destruição do fuso mitótico de microorganismos susceptíveis, ao interagir com seus microtúbulos polimerizados (CARLI; LARIZZA, 1988). Há vários estudos clínicos completos relatados no sítio eletrônico do governo norte-americano (clinicaltrials.gov, 2016).

A quercetina, Figura 9b, é um flavonóide obtido a partir da hidrólise da rutina que também apresenta baixa solubilidade em água. A rutina pode ser extraída de uma planta abundante no nordeste brasileiro, a fava d'anta (*Dimorphandra gardineriana* Tul.), (LANDIM; COSTA, 2012). Segundo BEHLING e colaboradores 2004, a quercetina, (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) é o principal flavonóide presente na dieta humana. Várias propriedades terapêuticas dos flavonóides, principalmente da quercetina, têm sido estudadas nas últimas décadas, destacando-se o potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático. como qualquer flavonóide, possui ação antioxidante e outras atividades biológicas relacionadas, como vasoconstritora, antiinflamatória e antitumoral. Nos últimos dez anos ela aparece entre os principais produtos farmacêuticos exportados pelo Brasil (ABIQUIFI, 2016). A quercetina é um bioativo em fase experimental, com vários estudos clínicos em andamento (clinicaltrials.gov, 2016).

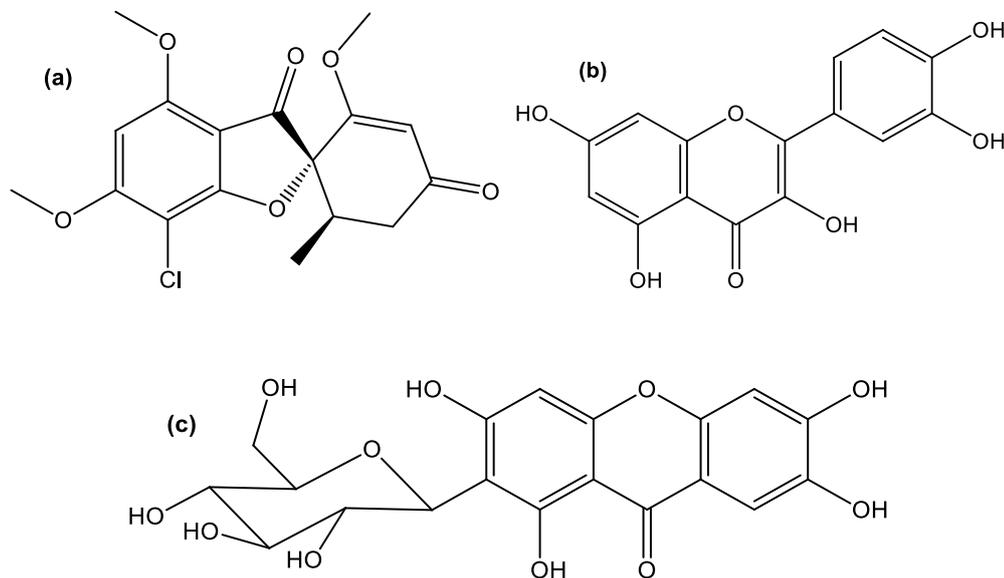
A mangiferina, Figura 9c, é um composto derivado da xantona, distribuído em plantas superiores das famílias *Anacardiaceae* e de *Gentianaceae*.

Estudos farmacológicos demonstraram que extratos da mangueira possuem atividades antiviral, antibacteriana, analgésica, anti-inflamatória, imunomodulatória, bem como ação inibidora de α -amilase e α -glicosidase. Além disso,

seu extrato hidroalcoólico exibiu propriedades antidiarreica, hipoglicemiante e hipolipidêmica (CANUTO, 2009). Devido ao seu espectro de atividades farmacológicas pode-se supor que alguns de seus metabólitos exercem efeitos ainda mais fortes. Por esta razão, a investigação da rota metabólica da mangiferina é de grande importância na elucidação de seus mecanismos farmacológicos e a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos a partir de seus metabólitos (LUI *et al.*, 2011) e, por conseguinte formas farmacêuticas de administração eficientes. Também estão em andamento alguns testes clínicos com essa substância (clinicaltrials.gov, 2016).

Resolver o problema de baixa solubilidade em água destes bioativos tem sido alvo de vários trabalhos, seja através de agentes solubilizantes (RIBEIRO *et al.*, 2009a e 2009b, RBEIRO, 2012; GAO *et al.*, 2009), ou do desenvolvimento de pró-fármacos (MULHOLLAND *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2001). Esses fatores impulsionaram o uso da griseofulvina, quercetina e mangiferina neste trabalho.

Figura 9- Estrutura química da: (a) griseofulvina, (b) quercetina e (c) mangiferina.



Fonte: Autor.

2. JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Nas últimas quatro décadas, as micelas poliméricas têm se destacado em pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de carreadores de bioativos. O interesse em potencial direciona-se à aplicação dessas micelas poliméricas em três principais segmentos: solubilização, vetorização e liberação controlada de bioativos (BADER; PUTNAM, 2014).

Micelas de copolímeros em bloco estão sendo estudadas como sistemas de liberação controlada de bioativos. Estes sistemas nanoestruturados têm se mostrado úteis na otimização terapêutica destes fármacos, aumentando a sua solubilidade, prevenindo a sua rápida eliminação do corpo, reduzindo a toxicidade e retardando a sua degradação. (PITTO-BARRY; BARRY, 2014).

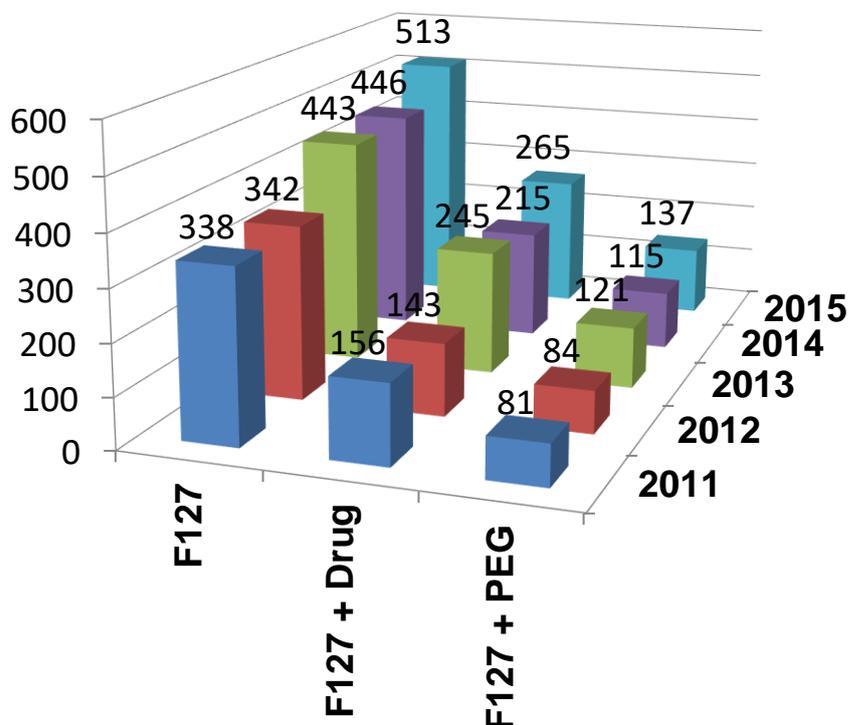
Segundo AKASH e REHMAN, 2015, a maioria das drogas para o tratamento do câncer é de natureza hidrofóbica, ou seja, de baixa solubilidade em água, as quais são rapidamente eliminadas pelo corpo e apresentam efeitos secundários sistêmicos. Sistemas micelares utilizando Pluronic® F127 mostram-se eficientes no transporte e no direcionamento de drogas anticancerígenas encapsuladas, minimizando a interação com as células normais. Entretanto, existem algumas limitações relacionadas a tal copolímero, amplamente utilizado em formulações de medicamentos atualmente comercializados, tais como, a baixa resistência mecânica e a rápida dissolução nos fluidos fisiológicos, que provocam sua curta permanência na circulação, seguida de sua eliminação do corpo. Essas limitações podem ser superadas a partir de várias modificações, como por exemplo, o preparo de sistemas mistos de copolímeros, a adição de aditivos e o preparo de nanopartículas conjugadas com F127.

Os copolímeros tribloco EnPmEn são utilizados em formulações para solubilização de bioativos hidrofóbicos, mas não apresentam valores de capacidade de solubilização tão satisfatórios, devido à baixa hidrofobicidade do bloco de polioxipropileno (Pm), o que lhes confere altos valores de concentração micelar crítica (CMC) e temperatura micelar crítica (TMC). No entanto, suas propriedades geleificantes termorresponsivas são interessantes para sistemas de administração subcutânea de fármacos, pois à temperatura ambiente, é possível 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.

O interesse pela pesquisa e desenvolvimento de sistemas micelares carreadores de fármacos com a utilização de copolímeros nos últimos 5 anos pode ser estimado a partir de uma pesquisa realizada na plataforma de busca ScienceDirect (Figura 10), onde investigou-se o número de publicações com o termo “F127”, que resultou em mais de 2 mil publicações, das quais mais da metade está também relacionado com o termo “drug” (carreamento de fármaco). A partir da pesquisa inicial se refinou a busca ao adicionar o termo “PEG” e 409 publicações foram obtidas relacionadas a esse polímero. A relevância e contemporaneidade do estudo da adição do PEG ao F127 podem ser observadas nos resultados nos últimos anos e principalmente em uma busca para o ano de 2016, resultando em 51 publicações, quase a metade do total do ano anterior.

Figura 10- Levantamento bibliográfico de estudos do Pluronic® F127.



Fonte: Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com> > Acesso em: 19 de jan. 2016.

A fim de contribuir na resolução do problema da baixa solubilidade em água dos bioativos hidrofóbicos, o presente trabalho visa a otimização de sistemas contendo o Pluronic® F127 como copolímero solubilizante e carreador, a partir da adição do PEG, além de estudar a toxicidade em neutrófilo humano e a liberação desses sistemas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Este trabalho tem como objetivo desenvolver sistemas poliméricos micelares obtidos pela interação dos polímeros PEG 400, 6K e 35K com o copolímero E₉₈P₆₇E₉₈ (Pluronic® F127), visando à aplicação de suas misturas na otimização da solubilidade em sistemas aquosos e liberação dos bioativos Griseofulvina, Mangiferina e Quercetina.

3.2. Objetivos Específicos

- Preparar misturas do copolímero F127 com os polímeros PEG400, PEG6K e PEG35K com e sem os bioativos Griseofulvina, Mangiferina e Quercetina;
- Estudar as características de gel das misturas do copolímero F127 com os polímeros PEG 400, PEG 6K e PEG 35K através da Técnica de Inversão de Tubo e Espalhamento de Raios-X a Baixos ângulos (SAXS);
- Investigar as soluções das misturas como solubilizadores dos bioativos hidrofóbicos propostos (Mangiferina, Quercetina e Griseofulvina);
- Estudar a liberação nos sistemas poliméricos de maior eficiência;
- Realizar uma avaliação preliminar da toxicidade dos sistemas propostos em neutrófilo humano.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Materiais

Os polímeros PEG (400, 6K e 35K) foram fornecidos por Sigma-Aldrich. O copolímero Pluronic® F127, foi produzido pela BASF Corp. e fornecido pela Sigma-Aldrich. Água Milli-Q e metanol (SYNTH) foram utilizados como solventes. A griseofulvina (massa molar 352,8 g/mol) foi obtida a partir da Sigma-Aldrich (Poole, Dorset, Reino Unido), os bioativos quercetina e mangiferina foram cedidos pelo Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da UFC. Todos os materiais foram usados sem purificação adicional. Os bioativos foram utilizados sob a forma de pó finamente dividido. Foi utilizada membrana Millipore 0,45µm.

As características moleculares dos copolímeros presentes na Tabela 2, foram obtidas em trabalhos anteriores e/ou fornecidas pelo fabricante: massa molar numérica (M_n) e índice de polidispersividade (M_w/M_n).

Tabela 2- Características moleculares dos polímeros PEG (400, 6K e 35K), e F127.

Copolímero	M_n (g/mol)	M_w/M_n
F127	12510	1,20
PEG 400	400	1,20
PEG 6K	6000	1,06
PEG 35K	35000	1,16

Fonte: Laboratório de Polímeros de Manchester.

4.2. Inversão de Tubo

O diagrama de fase foi obtido pelo método de inversão de tubo, o qual é utilizado para caracterizar a solução como sendo fluida ou não. As misturas foram preparadas em tubos apropriados, misturando sempre que possível e deixando por vários dias (~5 a 10 dias) em repouso sob refrigeração até atingir o equilíbrio. A possível modificação na fluidez das soluções foi observada invertendo-se o tubo

enquanto as soluções eram lentamente aquecidas (10–90 ° C), em que a verificação da geleificação era feita sempre em intervalos 1 ° C ($\pm 0,2$ ° C) num banho de água termostaticado, caracterizando o sistema como fluido (gel móvel) ou gel duro (gel imóvel). Para cada sistema, foram feitas pelo menos três medidas.

Foram preparadas soluções aquosas dos aditivos poliméricos PEG 400, nas concentrações: 0,1%; 0,5%; 1%; 2% e 5% m/m, os quais foram os solventes das soluções de F127 estudadas na faixa de concentração de 10 a 35 % m/m, foram preparadas em tubos de vidro com diâmetro interno de 10 mm. Para a homogeneização das soluções, os sistemas foram submetidos à agitação no Vortex e permaneceu sob refrigeração (mínimo de 3 dias) até atingir o equilíbrio, conforme a descrição de RICARDO *et al.*, 2005.

A reprodutibilidade foi de ± 2 °C para as temperaturas de transição fluido/gel e ± 4 ° C para as temperaturas de transição gel/fluido.

4.3. Solubilização

4.3.1. Sistemas de F127 em Soluções Solvente PEG

As soluções do copolímero F127 a 1 % m/m foram obtidas utilizando as soluções de PEG em diferentes concentrações como solvente. As soluções de PEG foram preparadas a partir da pesagem inicial dos polímeros PEG 400, PEG 6K e PEG 35K e posterior dissolução dos mesmos em água em concentrações de 0,1 % a 10 % m/m. As proporções foram:

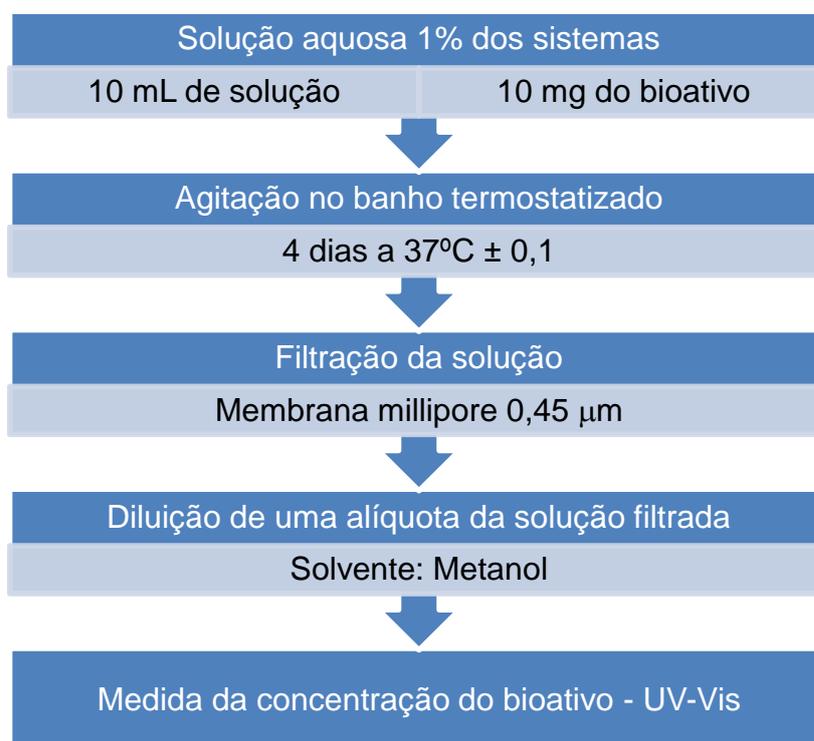
- a) solução do copolímero F127 na concentração de 1% em peso;
- b) solução dos polímeros PEG 400, PEG 6K e PEG 35K nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%, 7% e 10% em peso.

4.3.2. Solubilização dos Bioativos

O método utilizado de incorporação do bioativo nas micelas foi o da dissolução direta (também denominado de “shake flask”). Foram preparadas as soluções aquosas dos polímeros e depois a solubilização do F127 nestas soluções

aquopoliméricas. A cada alíquota de 10 mL de cada sistema, foi adicionada uma porção do bioativo ($m \approx 10$ mg) a ser testado. As misturas contendo o bioativo foram lentamente agitadas a $37^\circ\text{C} (\pm 0,1^\circ\text{C})$, por 48 horas, num banho termostaticado QUIMIS. Retirou-se o máximo possível do sobrenadante, que em seguida foi filtrado em membrana Millipore de porosidade $0,45\mu\text{m}$, para remoção de qualquer porção de bioativo não solubilizado. Alíquotas das amostras filtradas foram diluídas em metanol e a concentração do bioativo foi monitorada por espectrofotometria UV-VIS (espectrofotômetro U-2000 da Hitachi) no comprimento de onda adequado para cada um dos bioativos: griseofulvina, mangiferina e quercetina, utilizou-se metanol puro para estabelecer a linha de base (REKATAS *et al.*, 2001; CROTHERS *et al.*, 2005). O fluxograma do processo é apresenta a seguir na Figura 11.

Figura 11- Fluxograma do método de solubilização (dissolução direta) dos bioativos griseofulvina, mangiferina e quercetina nas misturas PEG 400, 6K e 35K com e sem o copolímero F127.



Fonte: Autor.

A solubilidade do bioativo foi determinada também apenas em água, apenas nas soluções aquosas do PEG, bem como apenas na solução aquosa do copolímero F127, segundo o mesmo procedimento descrito anteriormente. As

absorbâncias das soluções aquosas das misturas nos comprimentos de onda dos bioativos também foram medidas para correção dos valores de absorbância obtidos para os bioativos. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

4.3.3. Quantificação por Espectroscopia UV/VIS

A curva de calibração da griseofulvina, mangiferina e quercetina foram preparadas a partir dos dados de concentração (mg/L) *versus* absorbância (A) com leitura no comprimento de onda de 292, 257 e 375nm, respectivamente. Foi utilizado no experimento o Espectrofotômetro U-2000 da Hitachi.

Os bioativos foram solubilizados com os polímeros PEG 400, PEG 6K e PEG 35K e nas misturas entre esses polímeros e o copolímero tribloco F127. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.4. Estrutura de Gel: Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

As atribuições de SAXS foram obtidas usando um beamline I711. O comprimento de onda raios-X foi de $\lambda = 1,07 \text{ \AA}$. Os dados foram coletados por meio de um detector CCD (MAR CCD 165 mm de área ativa, com resolução de 79 x 79 microns pixels).. As curvas de espalhamento foram monitoradas numa faixa de onda (q) de $4\pi \sin\theta/\lambda$, onde θ corresponde ao ângulo de espalhamento e o comprimento de onda foi de $\lambda = 1,033 \text{ \AA}$. As amostras foram calibradas com behenato de prata ($\text{AgC}_{22}\text{H}_{43}\text{O}_2$).

SAXS adicionais foram realizadas para a amostra PEG 6K em um beamline BM26 (Duplo) no ESRF(The European Synchrotron), Grenoble, França. O comprimento de onda de raios-X foi $1,033 \text{ \AA}$ e a distância da amostra ao detector-SAXS foi de 4 m. A escala q foi calibrada com colágeno. As amostras foram montadas num suporte de amostras de latão projetado dentro de um anel de vedação entre as folhas de mica. O controle de temperatura foi realizado através de um banho de água com recirculação, e os géis foram mantidos a uma temperatura constante durante 15 min antes da exposição. Padrões de SAXS foram coletadas e as imagens 2D foram convertidas a 1D.

4.5. Avaliação da Citotoxicidade: Atividade da Enzima Lactato Desidrogenase (LDH)

Vários parâmetros são disponíveis para a avaliação da citotoxicidade, um deles é obtido medindo a integridade da membrana celular. Como exemplo, podemos citar a lactato desidrogenase, utilizada em ensaios *in vitro* na avaliação de várias substâncias químicas (PEDROSA, 2013), como por exemplo, polímeros que serão utilizados em formulações farmacêuticas.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente no citoplasma das células cuja detecção no fluido extracelular é indicativa de morte ou perda da integridade da membrana celular. Esta enzima é responsável pela conversão de piruvato à lactato na presença de NADH. O ensaio é realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform) e baseia-se na medida do decréscimo da absorvância em 340 nm devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra.

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C na presença dos sistemas em estudo (10, 50 e 100 µg/mL), Hanks (células não-tratadas) ou Triton x-100 (0,2% - padrão citotóxico) em tubos de ensaio. Os tubos foram centrifugados a 755 x g, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo enquanto realizou-se a leitura. Para a determinação da LDH retirou-se alíquotas de 250 µL de substrato e adicionou-se 25 µL da amostra de sobrenadante. A leitura foi realizada a 340nm nos tempos de 1 e 3 minutos em espectrofotômetro. A atividade da enzima foi calculada de acordo com as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = [(A1 - A2)/2] \times 1746,03 \dots \dots \dots (6)$$

Onde:

A = atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A1 = absorvância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A2 = absorvância final (3 minutos) em 340 nm;

1746,03 = fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

Os ensaios foram realizados no Departamento de Farmácia, Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC)/Laboratórios: Farmacognosia,

Tecnologia de Produtos naturais e Toxicologia e Farmacologia Celular.; Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce, da Profa. Dra. Luzia Kalyne A. M. Leal.

4.5.1. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.01 (USA). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$ para todas as análises.

4.6. Liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* foi realizado com os sistemas que apresentaram melhores resultados na solubilização dos bioativos griseofulvina, mangiferina e quercetina, foi realizado através da técnica de difusão usando uma membrana de diálise de MWCO 2000 g/mol da Sigma. A massa de 120 mg de mangiferina solubilizada no sistema copolímero F127 1% em solução de PEG 6K (amostra liofilizada) foi dissolvida em 1,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 (+ 1) inserido na membrana de diálise e imerso em 100 mL de tampão fosfato a 37 °C (+ 0,2 °C). Em intervalos que variam de 5 minutos até 24 horas durante 7 dias, alíquotas de 3 mL foram retiradas e o volume final reconstituído com a solução tamponada (3 mL). As soluções foram diluídas em metanol (2x) e a quantidade dos bioativos em estudo liberados foi determinada por UV/Vis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Diagrama de Fase

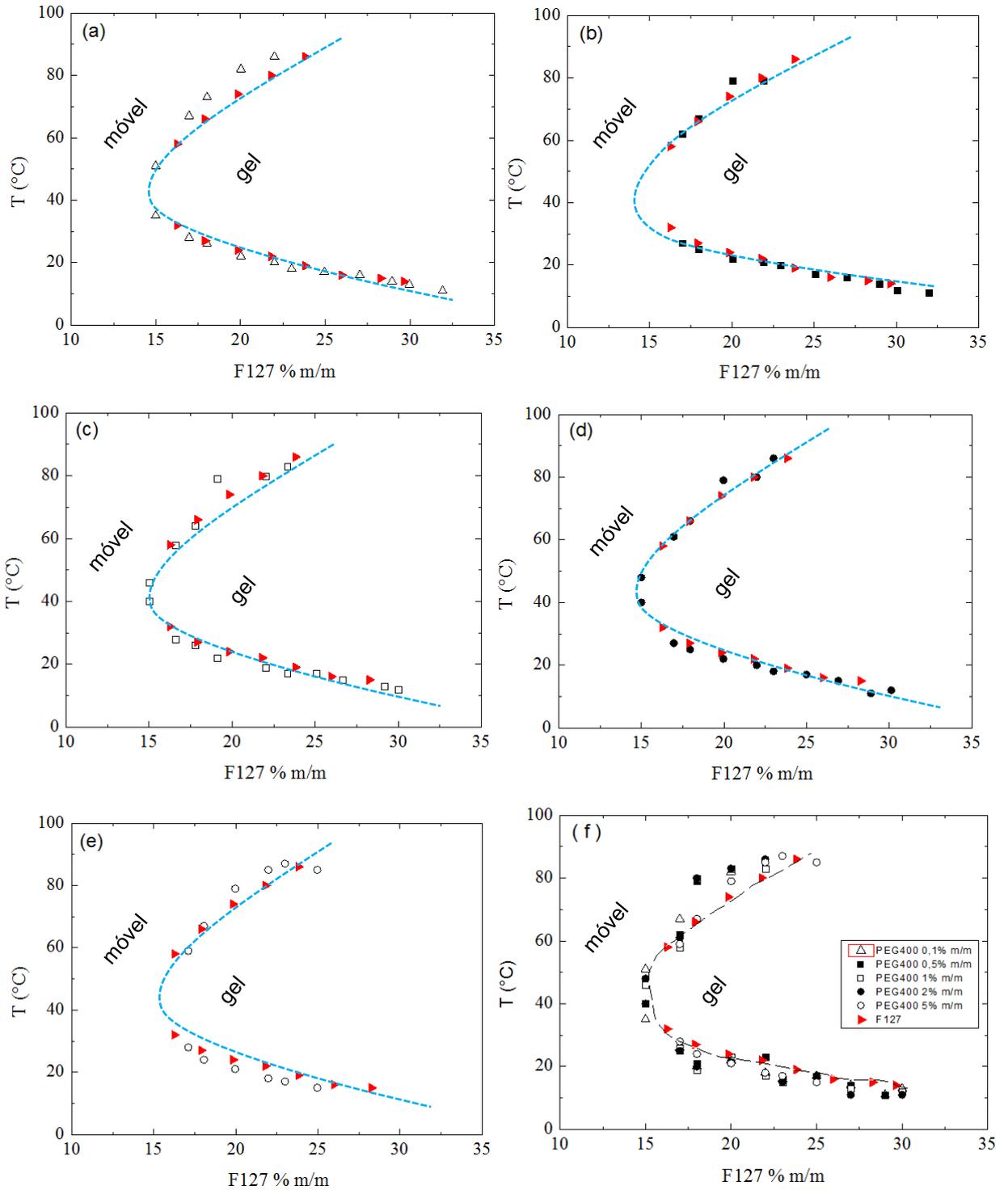
As propriedades de geleificação foram estudadas a partir dos diagramas de fases obtidos pelo método de inversão de tubo. Estudos de inversão de tubo foram feitos para a mistura do PEG 400 com o copolímero F127 e para a solução de F127 puro, e os resultados obtidos encontram-se na Figura 12.

Os limites observados, Figura 8, para formação de gel rígido para o copolímero F127, obtido por inversão de tubo, são de aproximadamente 16,2% m/m, para o limite inferior transição fluido/gel e a temperatura de 58° C para limite superior transição gel/fluido, esses valores estão de acordo com os apresentados por Chaibundit e colaboradores, em 2007, obtidos por inversão de tubo e reometria, onde o limite de concentração para a formação do gel do F127 em água foi de aproximadamente 15,5% m/m e a temperatura para o limite superior de 50 °C.

O limite inferior ocorre com o aumento na extensão de micelização do copolímero F127, até sua geleificação pelo empacotamento das micelas, o limite superior ocorre pela contração dos blocos E, via corona micelar, pois o solvente torna-se pouco solúvel (“pobre”) para o bloco E em altas temperaturas, não sendo mais possível assim, o empacotamento das micelas (CHAIBUNDIT, *et al.*, 2007). Comportamento semelhante foi observado em sistemas triblocos E/P e E/B (HARRISON *et al.*, 2005; HAMLEY *et al.*, 2001).

Analisando na Figura 12 as concentrações do polímero PEG400 são indicadas por, (Δ) 0,1% em peso, (\blacksquare) 0,5% em peso, (\square) 1% em peso, (\bullet) 2% em peso e (\circ) 5% em peso, e (\blacktriangleright) para o F127 puro em água.

Figura 12– Diagramas de fase das soluções aquosas das misturas de F127 em PEG 400 nas concentrações: (Δ) 0,1%, (\blacksquare) 0,5%, (\square) 1%, (\bullet) 2%, (\circ) 5% m/m, e (\blacktriangleright) F127 puro em água.



Fonte: Autor.

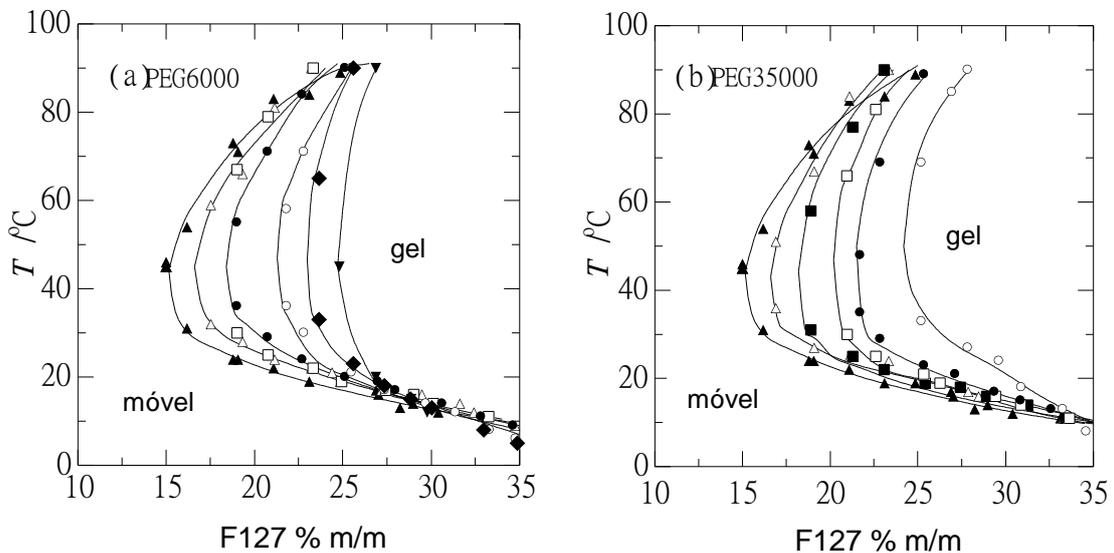
Na Figura 12a, podemos observar que o limite inferior da transição fluido/gel inicia a uma concentração de $\approx 15\%$ m/m do copolímero F127 e a temperatura de $\approx 35^\circ\text{C}$ e o limite superior da transição gel/fluido é iniciada a temperatura de $\approx 51^\circ\text{C}$, nas figuras 12c e 12d, o início da transição fluido/gel foi observado também a $\approx 15\%$ m/m do copolímero F127, entretanto as temperaturas relativas aos limites, inferior fluido/gel e superior gel/fluido, observados são 40°C e 48°C respectivamente. Este limite inferior se forma quando o aumento da concentração do F127 afeta o empacotamento das micelas levando a formação do gel, o PEG400 apresenta função de agente aglutinante, diminuindo a concentração do F127 para a transição inferior de fluido/gel de $\approx 16,2\%$ m/m para $\approx 15\%$ m/m, mantendo-se dentro da faixa observada para o F127 puro que é de 32°C a 58°C , isto é, as temperaturas de transição de geleificação se mantem apropriadas para aplicação farmacêutica, que deve ser aproxima a temperatura corpórea, igual a $36,5^\circ\text{C}$. Estes limites inferior e superior são observados nas demais soluções analisadas, entretanto iniciam em concentrações maiores para o F127.

Os diagramas para soluções de copolímero F127 em água e em soluções aquosas de PEG 6K e PEG 35K, nas concentrações de polímero no intervalo de 0,1 a 10% em peso são indicados por: (Δ) 0,1% m/m, (\blacksquare) 0,5% m/m, (\square) 1% m/m, (\bullet) 2% m/m, (\circ) 5% m/m, (\blacklozenge) 7% m/m, (\blacktriangledown) 10% m/m e (\blacktriangle) Para o F127 puro em água (Figura 13). As curvas são desenhadas através de todas as concentrações disponíveis para PEG 6K e 35K (RICARDO *et al.*, 2012).

Regiões de gel e solução móvel determinada por inversão do tubo são mostradas na Figura 13 para F127 em água e em soluções que contêm até 5% em peso de PEG 35K, e até 10% em peso para PEG 6K. Fases claras e turvas não são mostradas nesta figura. Dados relacionados para F127 com PEG 6K foram relatados por MALMSTEN e LINDMAN, 1993.

É possível observar na Figura 13, que os PEG 6K e 35K causam maior influência na faixa de concentração e temperatura de gel do F127 que o aditivo PEG 400, dada a menor massa molar deste.

Figura 13 – Diagramas de fase das soluções aquosas das misturas de F127 com PEG6K e 35K nas concentrações 0,1 - 10 % em peso.



Fonte: Autor.

5.2. Solubilização do Bioativo - Quantificação por Espectroscopia UV/Visível

5.2.1. Curva de Calibração dos Bioativos

A solubilidade é estudada através da massa do bioativo 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 bioativo na solução do copolímero (S_{tot}) subtraída a solubilidade do bioativo em água (S_o) dividido pela massa do copolímero (m_{cop}):

$$S_{cp} = S_{tot} - S_o / m_{cop} \quad (7)$$

Visando verificar a contribuição da corona de polióxido de etileno na solubilização promovida pelo copolímero, CHAIBUNDIT e colaboradores, 2002, estudaram a solubilidade da griseofulvina (bioativo modelo), numa solução de PEG 6K 5% m/m, e verificaram que a solubilidade se apresentou pouco diferente das medidas de solubilidade desse bioativo em água. Portanto, a solubilização na corona formada pelos blocos E não é uma consideração relevante.

CROTHERS e colaboradores, 2005, também estimaram a capacidade de solubilização (S_{cp}) da corona composta por blocos E usando o bioativo griseofulvina e

concluíram que esta não influencia no valor de S_{cp} do copolímero como um todo. Assim, apenas a porção hidrofóbica é levada em consideração e a capacidade de solubilização em mg/g de bloco hidrofóbico (S_h) é analisada. A solubilidade é calculada a partir dos valores de S_{cp} , com:

$$S_h = S_{cp}/W_h \quad (8)$$

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

A curva de calibração para os bioativos griseofulvina, mangiferina e quercetina foram obtidas em metanol, e a partir de cada curva de calibração foram obtidas as respectivas equações enumeradas abaixo, que relacionam a absorção a concentração (mg/dm^3) dos bioativos em estudo.

Griseofulvina ($\lambda = 292 \text{ nm}$)

$$\text{Abs} = 0,06556.[S_0] + 0,01187 \text{ (mg/L)} \quad R^2 = 0,99982 \quad (9)$$

Mangiferina ($\lambda = 257 \text{ nm}$)

$$\text{Abs} = 0,06011.[S_0] - 0,0048 \text{ (mg/L)} \quad R^2 = 0,99973 \quad (10)$$

Quercetina ($\lambda = 375 \text{ nm}$)

$$\text{Abs} = 0,07722.[S_0] + 0,00186 \text{ (mg/L)} \quad R^2 = 0,99899 \quad (11)$$

O resultado de solubilidade aquosa (S_0) obtidos para os bioativos a 37° C , seguindo o mesmo procedimento do método de dissolução direta, está listado na Tabela 3. Observamos que a solubilidade da mangiferina é 8,7 vezes maior que a determinada para a griseofulvina (bioativo modelo) e para a quercetina a solubilidade determinada é 8,9 vezes menor quando comparada a da griseofulvina.

Tabela 3- Solubilidade dos bioativos griseofulvina, mangiferina e quercetina em água (S₀) a 37° C.

Bioativo	S ₀ (mg/dL) à 37 °C
Griseofulvina	1,88 ± 0,02
Mangiferina	16,30 ± 0,02
Quercetina	0,21 ± 0,01

Fonte: Autor.

Segundo a FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010, Tabela 4, a expressão partes refere-se à dissolução de 1 g de um sólido no número de mililitros do solvente estabelecido no número de partes. Para os bioativos temos: Para solubilizar 1 g de griseofulvina – 53.192 mL de água a 37° C sendo classificado como praticamente insolúvel ou insolúvel; para solubilizar 1 g de mangiferina – 6.131 mL do solvente, muito pouco solúvel e para solubilizar 1 g de quercetina – 476.191 mL de água a 37° C sendo descrita como praticamente insolúvel ou insolúvel.

Tabela 4- Termos descritivos de solubilidade e seus significados.

SOLVENTE	TERMO DESCRITIVO (1 g do sólido / mL do solvente)
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1.000 partes
Muito pouco solúvel	De 1.000 a 10.000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10.000 partes

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

5.2.2. Efeito dos Aditivos Polímeros PEG 400, 6K e 35K, na Solubilidade dos Bioativos.

O estudo da solubilização foi realizado observando-se o comportamento da solubilidade dos bioativos griseofulvina, mangiferina e quercetina nas soluções micelares dos polímeros PEG 400, 6K e 35K nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 2,0%, 5,0% e 10,0%, com e sem o copolímero Pluronic® F127 1% em peso, na temperatura de 37°C.

Na Tabela 5, observa-se que a influência do PEG 400 na solubilização da griseofulvina em solução de F127 1% em peso é significativa, confirmando a compatibilidade entre a estrutura do polímero PEG 400 com o bloco-E hidrofílico do copolímero F127. Segundo Oliveira e colaboradores, 2011a e 2011b, em soluções mais concentradas, o PEG 400 atua como pontes entre as micelas formando aglomerados, o que acarreta uma maior estabilidade ao sistema, e uma maior solubilidade do bioativo.

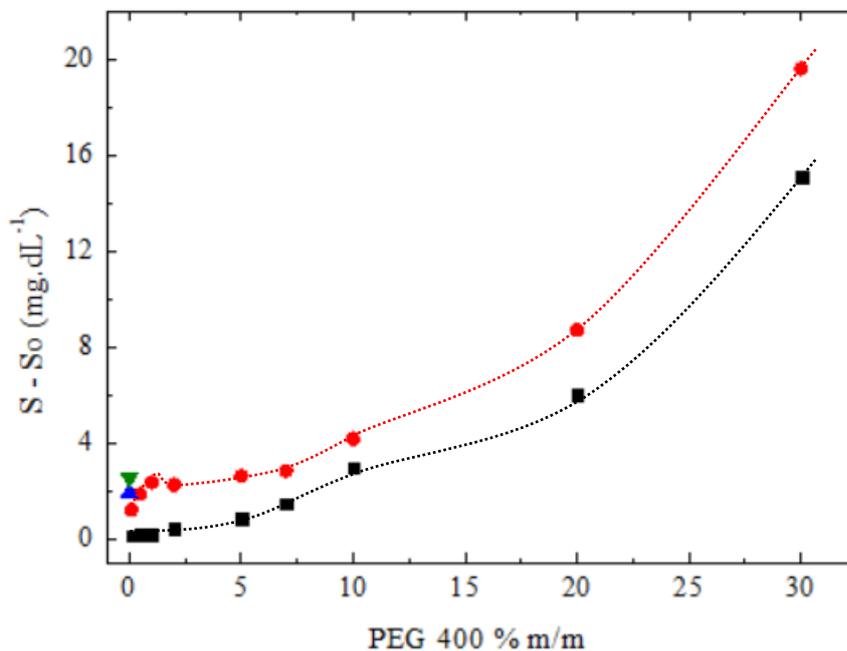
Tabela 5- Solubilização da griseofulvina nas misturas de F127 a 1% m/m nas soluções com concentrações 0,1 - 30 % em peso do PEG 400, a 37 °C.

PEG 400 %	S	S-S ₀	S	S-S ₀
	Sem F127		Com F127	
0	1,88	---	4,42	2,54
0,1	1,78	0,10	3,07	1,19
0,5	2,06	0,18	3,72	1,84
1,0	2,02	0,14	4,22	2,34
2,0	2,30	0,42	4,11	2,23
5,0	2,72	0,84	4,48	2,60
7,0	3,34	1,46	4,70	2,82
10,0	4,82	2,94	6,03	4,15
20,0*	7,2	6,0	9,9	8,7
30,0*	16,3	15,1	20,8	19,6

Fonte: Autor. * RIBEIRO *et al.*, 2013.

A Figura 14 mostra os valores obtidos para a solubilidade da griseofulvina em soluções aquosas 0,1 – 30% em peso do PEG 400 ($T = 37^{\circ}\text{C}$). O valor plotado ($S - S_0$) refere-se à solubilidade do bioativo no aglomerado polimérico formado, onde S é a solubilidade na solução e S_0 é a solubilidade do bioativo de estudo em água. Este gráfico foi construído com base nos valores da Tabela 4.

Figura 14- Efeito da adição PEG 400 na solubilidade da griseofulvina a 37°C , com (●) e sem (■) F127 1% m/m, (▲) somente em água, (▼) apenas no F127 1% m/m.



Fonte: Autor.

No gráfico apresentado na Figura 14, o símbolo (■) representa a solução contendo PEG 400 sem o F127, (●) para a solução de PEG 400 com F127 1% m/m, (▼) representa uma solução contendo apenas o copolímero F127 1% m/m e o bioativo, e o símbolo (▲) para a griseofulvina em água. Observa-se que soluções diluídas dos sistemas representados por (● e ■) tem baixo efeito na solubilidade da griseofulvina. A partir da concentração de 5 %m/m do PEG em soluções de F127 1 % m/m que se observa um efeito de aumento de solubilidade da griseofulvina quando comparada com a observada em água (▲) e ou em solução aquosa de F127 1 % m/m (▼).

A Tabela 6 mostra a influência do PEG 400, este trabalho, PEG 6 K e 35 K, OLIVEIRA *et al.*, 2011 a e b, na solubilidade da griseofulvina em solução aquosa do copolímero F127 1% m/m.

Tabela 6- Solubilização da griseofulvina nas misturas de F127 a 1% m/m com os polímeros PEG nas concentrações 0,1 - 10 % em peso a 37 °C.

Concentração	PEG 400		PEG 6 K*		PEG 35 K*	
	S-S ₀	S/S ₀	S-S ₀	S/S ₀	S-S ₀	S/S ₀
0,1	1,19	0,63	2,40	1,28	2,20	1,17
0,5	1,84	0,98	2,63	1,40	6,43	3,42
1,0	2,34	1,24	3,06	1,63	6,18	3,29
2,0	2,23	1,19	3,66	1,95	6,30	3,35
5,0	2,60	1,38	4,58	2,44	6,18	3,29
7,0	2,82	1,50	5,16	2,74	6,24	3,32
10,0	4,15	2,21	5,76	3,06	7,96	4,23

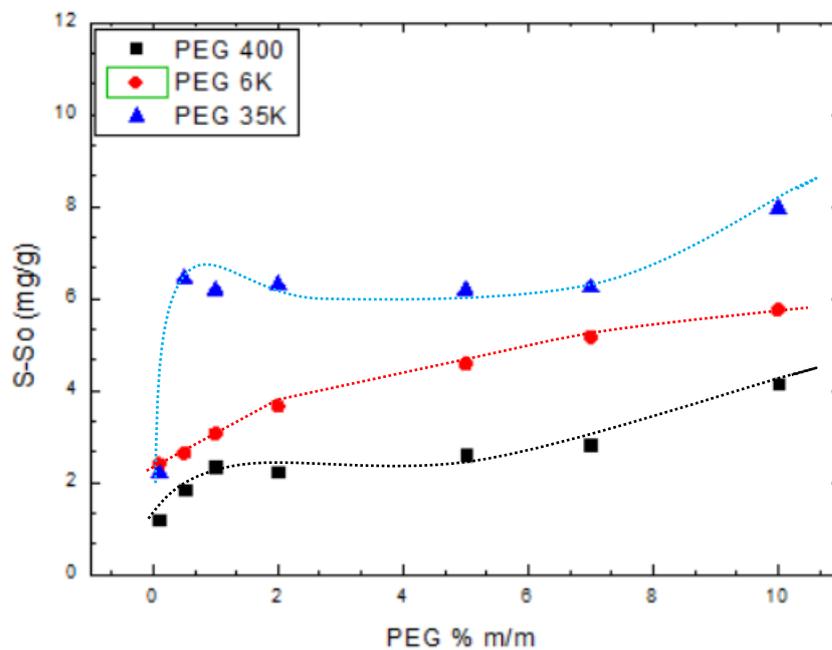
Fonte: Autor. * Oliveira et al. 2011 a e b.

Observa-se que um aumento de solubilidade mais significativo para griseofulvina foi a obtida no polímero PEG 35K (0,5 % m/m), pois com a adição de uma pequena quantidade do polímero a solubilidade da droga encontrada foi de 6,43 mg/dL, sendo maior do que o valor em F127 2,5% m/m, que é de 5,6 mg/dL (OLIVEIRA *et al.*, 2011 a e b), levando o resultado a mais uma vez confirmar a afinidade entre a estrutura do polietilenoglicol com o bloco-E hidrofílico do copolímero F127. Este estudo sugere uma simples alternativa de otimização na capacidade de solubilização de soluções micelares para a griseofulvina, permitindo evitar a utilização de uma grande quantidade de surfactante, o qual pode ser econômica e farmacologicamente indesejável.

Ao comparar na Figura 15 a atuação do PEG na solubilidade da substância griseofulvina, observa-se o aumento da solubilidade para o bioativo, podemos relacionar com o aumento da massa molar dos polímeros utilizados como aditivo. Desta forma, observa-se que para a solubilidade da griseofulvina o melhor sistema a

concentrações abaixo de 2% é o PEG 35K, entretanto, considerando questões econômicas/farmacológicas, o PEG 6K consegue obter uma melhoria ainda maior na solubilidade com o aumento da quantidade adicionada ao sistema, se compararmos o intervalo estudado, ocorre um aumento de 100 vezes na concentração do aditivo e o PEG 6K teve o melhor rendimento no ganho de solubilidade para a griseofulvina.

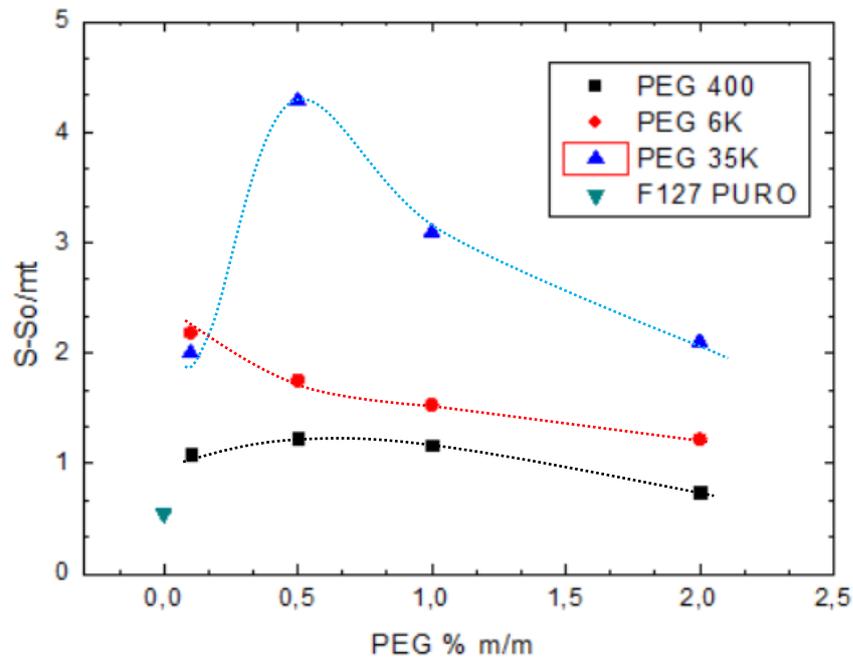
Figura 15- Comparativo da solubilidade da griseofulvina nos sistemas PEG 400, 6K* e 35K* com F127 1% m/m.



Fonte: Autor. * Oliveira et al. 2011 a e b.

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram o efeito em adicionar polímero para melhorar a solubilidade da griseofulvina por grama de solubilizante em solução, por exemplo, como (S-So)/mt, onde mt é a concentração total de F127 (1% m/m) mais polímero PEG, entretanto a adição de 0,5% m/m de PEG 35K aumenta a capacidade de solubilização ((S-So)/mt) para um valor próximo ao dobro do valor referente a solubilidade em F127 1% m/m puro (OLIVEIRA *et al.*, 2011 a e b).

Figura 16- Efeito da adição de PEG 400, 6K* e 35K* em soluções de F127 a 1% m/m na solubilização da griseofulvina, expressos como (S-So/mt). Símbolo (\blacktriangledown) indica o valor de (S-So/mt) para F127 a 1% m/m em água pura. T = 37 °C.



Fonte: Autor. * Oliveira et al. 2011 a e b.

Nas tabelas 7, 8 e 9 observa-se a influência dos aditivos PEG 400, 6K e 35K na solubilidade do bioativo mangiferina na presença e ausência de F127 1% em peso.

A solubilidade da mangiferina é 8,6 maior que a solubilidade da griseofulvina em água ($S_0 = 16,1$ mg/dL e $1,88$ mg/dL para mangiferina e griseofulvina, respectivamente). Por essa razão observam-se valores de solubilidade bem maiores para mangiferina que para griseofulvina nos sistemas de maiores concentrações e, portanto de maior hidrofiliicidade. Entretanto acredita-se que a maior solubilidade da mangiferina em água promova uma limitação para o efeito da massa molar do aditivo nos sistemas de F127 e por isso haja uma diminuição da solubilidade deste bioativo quando se analisa os resultados obtidos na presença e ausência dos PEG's 6K e 35K. Todos os valores de solubilidade da mangiferina em F127 1% m/m na presença de PEG 35K foram menores que os valores obtidos apenas em PEG 35K, enquanto os resultados de solubilidade na presença do PEG 6K tornaram-se menores que no aditivo puro a partir de uma concentração de 5% m/m.

Tabela 7- Solubilização da mangiferina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 - 10 % em peso de PEG 400, a 37 °C.

PEG 400 %	S	S-S ₀	S-S ₀ /m _t	S	S-S ₀	S-S ₀ /m _t
Sem F127			Com F127			
0	16,31	---	---	18,36	2,05	2,05
0,1	12,09	-4,22	-3,84	25,20	8,89	8,08
0,5	12,50	-3,81	-2,54	26,86	10,55	7,03
1,0	12,23	-4,08	-2,04	27,08	10,77	5,38
2,0	13,72	-2,59	-0,86	25,03	8,72	2,91
5,0	14,38	-1,93	-0,32	28,18	12,05	2,01
7,0	16,80	0,49	0,06	29,18	12,87	1,61
10,0	20,75	4,44	0,40	36,43	20,12	1,83

Fonte: Autor.

Tabela 8- Solubilização da mangiferina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso de PEG 6 K, a 37 °C.

PEG 6 K %	S	S-S ₀	S-S ₀ /m _t	S	S-S ₀	S-S ₀ /m _t
Sem F127			Com F127			
0	16,31	---	---	18,36	2,05	2,05
0,1	20,48	4,17	3,79	25,76	9,45	8,59
0,5	22,50	6,19	4,13	28,19	11,88	7,92
1,0	23,99	7,68	3,84	30,27	13,96	6,98
2,0	28,97	12,66	4,22	34,67	18,36	6,12
5,0	71,51	55,20	9,20	41,47	25,16	4,19
7,0	87,83	71,52	8,94	47,87	31,56	3,94
10,0	111,99	95,68	8,70	66,00	49,69	4,52

Fonte: Autor.

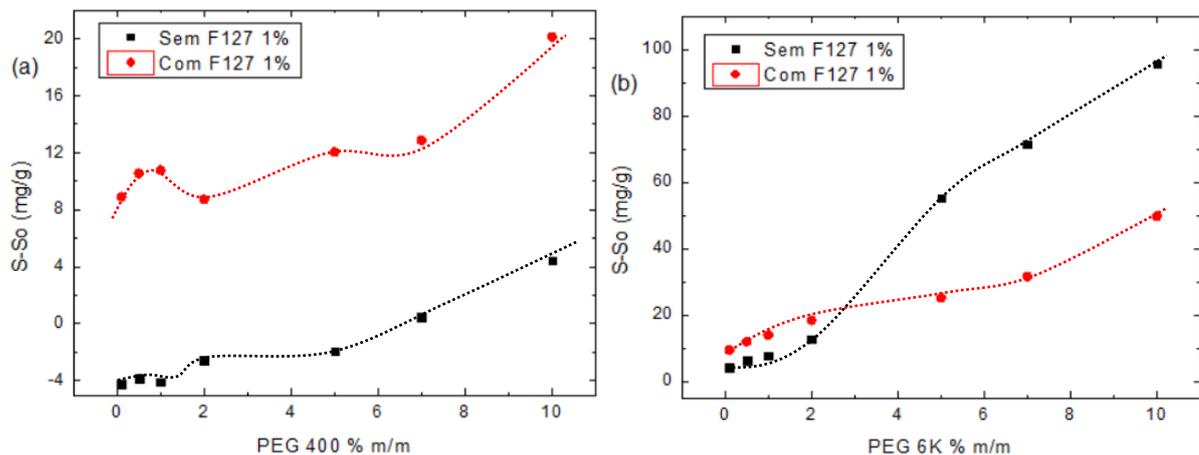
Tabela 9- Solubilização da mangiferina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso de PEG 35 K, a 37 °C.

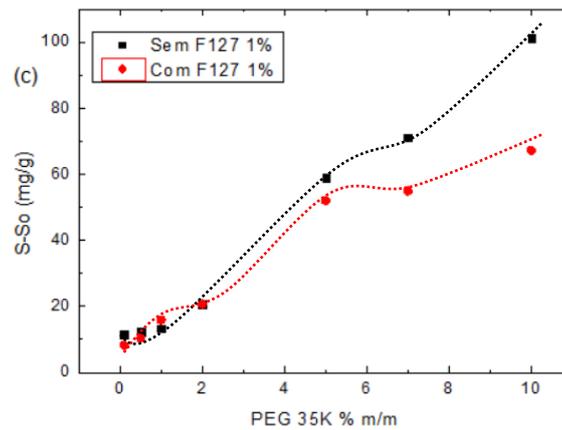
PEG 35 K %	S	S-S ₀	S-S ₀ /m _t	S	S-S ₀	S-S ₀ /m _t
Sem F127			Com F127			
0	16,31	---	---	18,36	2,05	2,05
0,1	27,96	11,65	10,59	24,53	8,22	7,47
0,5	28,61	12,30	8,20	26,67	10,36	6,91
1,0	29,63	13,32	6,66	32,18	15,87	7,94
2,0	36,99	20,68	6,89	37,01	20,70	6,90
5,0	75,32	59,01	9,84	68,34	52,03	8,67
7,0	87,48	71,17	8,90	71,23	54,92	6,87
10,0	117,65	101,34	9,21	83,53	67,22	6,11

Fonte: Autor.

Os gráficos apresentados nas Figuras 17 (a), (b) e (c) apresentam os valores obtidos da capacidade de solubilidade da mangiferina (S-S₀) versus concentração do polímero PEG 400, 6K e 35K em soluções aquosas, preparadas com (●) e sem (■) F127 a 1% m/m, na temperatura de 37°C.

Figura 17- Solubilidade da mangiferina em soluções aquosas de PEG 400 (a), 6K (b) e 35K (c) nas concentrações 0,1 -10 % em peso a 37 °C, com(●) e sem (■) F127 1% m/m.





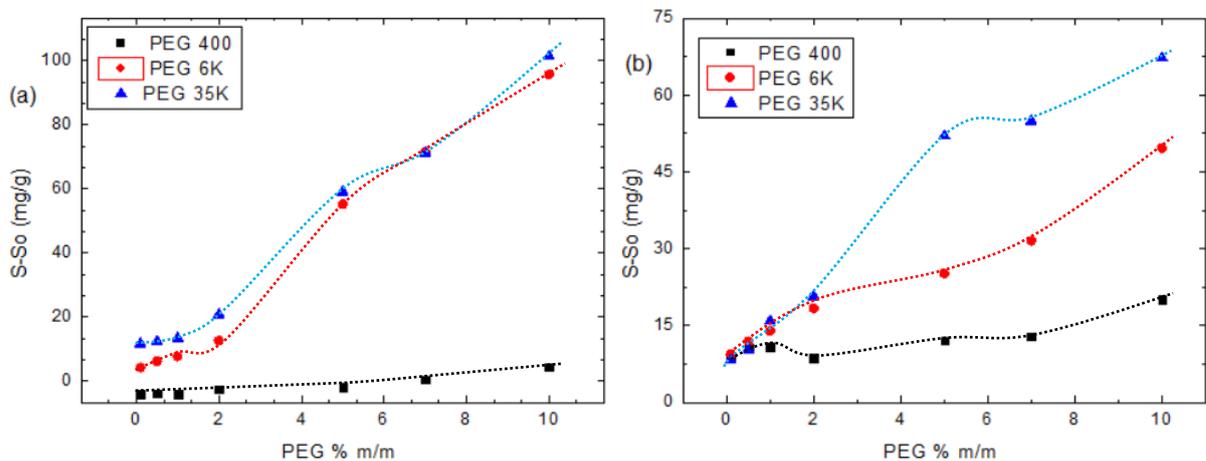
Fonte: Autor.

A solubilidade aumenta com a adição do polietilenoglicol, principalmente com os que apresentam maiores massas molares, indicando que o aumento da hidrofilicidade do meio melhoram a solubilidade da mangiferina, também pode-se esperar que devido a afinidade do aditivo hidrofílico com a corona micelar hidrofílica ocorre na solução uma maior formação de aglomerados das micelas de F127.

Comparando os três sistemas na Figura 18, (a) com e (b) sem a presença do F127, em concentrações baixo de 2% m/m do aditivo o PEG 6K é o mais eficiente.

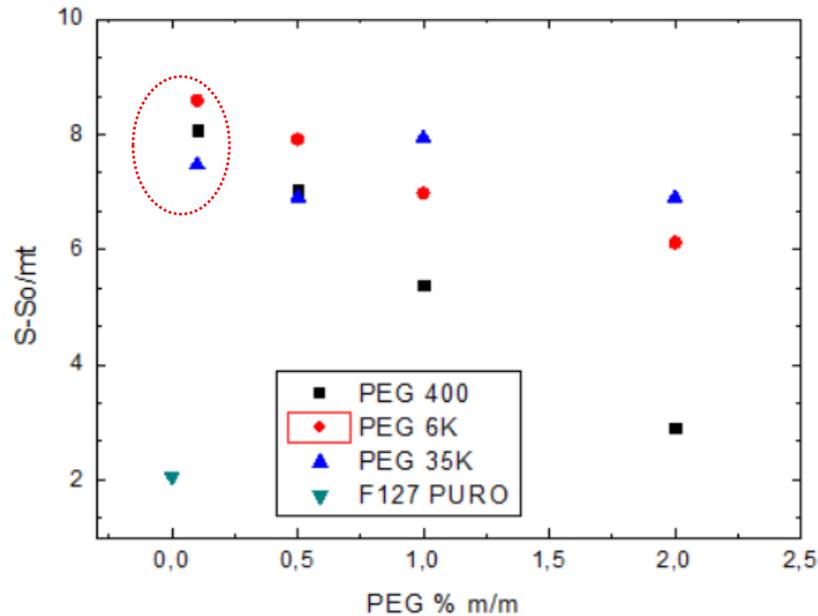
Os gráficos apresentados nas figuras 19 (a) e (b), de (S-So/mt) *versus* as concentrações auxiliam na visualização do PEG 400 e PEG 6K a baixas concentrações como melhor sistema para o bioativo mangiferina, pois atendem ao objetivo do ganho de solubilidade com pouco adição de material a formulação.

Figura 18. Comparativo da solubilidade da mangiferina nos sistemas PEG 400, 6K e 35K nas concentrações 0,1 -10 % em peso a 37 ° C, (a) sem F127 e (b) com F127.



Fonte: Autor.

Figura 19- Efeito da adição de PEG 400, 6K e 35K em soluções de F127 a 1% m/m na solubilização da mangiferina, expressos como (S-So/mt). Símbolo (▼) indica o valor de (S-So/mt) para F127 a 1% m/m em água pura. T = 37 °C.



Fonte: Autor.

O aumento na quantidade de PEG aumenta a solubilidade da mangiferina, entretanto, esse ganho não é proporcional a quantidade utilizado, na avaliação do aumento da solubilidade para o bioativo em baixas adições do PEG, Figura 19, o PEG 6K 0,5% m/m mostra uma capacidade de solubilização de aproximadamente 7,92 mg/g, valor que quase quatro vezes maior (2,05 mg/g) que a do bioativo somente em F127 1% m/m. É um resultado que mais uma vez confirma a compatibilidade entre a estrutura do polímero PEG com o bloco-E hidrofílico do copolímero F127, causando um aumento micelar e consequente maior solubilidade do bioativo. Este estudo sugere uma simples alternativa de aproximação para um aumento na capacidade de solubilização de soluções micelares, permitindo evitar a utilização de uma grande quantidade de surfactante, o qual pode ser econômica e farmacologicamente indesejável.

Nas Tabelas 10, 11 e 12 observa-se a influência dos aditivos PEG 400, 6K e 35K na solubilidade do bioativo quercetina na presença e ausência de F127 1% em peso, (Figuras 20 (a), (b) e (c)). A solubilidade da quercetina nos sistemas estudados foi diferente do observado para a griseofulvina e mangiferina. Tal resultado pode ser explicado pelo fato da quercetina apresentar a menor solubilidade em meio aquoso

dos três bioativos estudados. A sua solubilidade em água determinada é 8,9 vezes menor que a solubilidade da griseofulvina, fármaco de comparação ($S_0 = 0,21$ mg/dL e 1,88 mg/dL para quercetina e griseofulvina, respectivamente). Por essa razão observa-se que embora o PEG 400 não seja satisfatório como aditivo para griseofulvina nos sistemas estudados, obtém valores de solubilidade da quercetina crescentes com o aumento da concentração deste PEG. Quanto aos PEG's 6K e 35K, observa-se que ocorre uma queda da solubilidade do bioativo com o aumento de suas concentrações, fato igualmente observado para a mangiferina. Tal resultado pode estar relacionado a grande hidrofobicidade do bioativo e por essa razão incompatibilidade com grandes aglomerados como os que ocorrem nestes sistemas a altas concentrações (OLIVEIRA, *et al.*, 2011a e 2011b). Entretanto deve-se destacar que os aditivos PEG 6K e 35K nas concentrações de 0,1 e 0,5 apresentam os melhores valores de solubilidade para a quercetina e, portanto, os três sistemas são viáveis econômica/farmacológica com destaque para o PEG 6K a 0,1% m/m (Figura 20 (d)).

Tabela 10- Solubilização da quercetina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso do PEG 400, a 37 °C.

PEG 400 %	S	S-S ₀	S/S ₀	S-S ₀ /m _t	S	S-S ₀	S/S ₀	S-S ₀ /m _t
Sem F127					Com F127			
0	0,21	---	---	---	7,92	7,71	37,71	7,71
0,1	1,09	0,88	5,19	0,80	14,89	14,68	70,90	13,35
0,5	1,26	1,05	6,00	0,70	12,85	12,64	61,19	8,43
1,0	0,57	0,36	2,71	0,18	15,28	15,07	72,76	7,54
2,0	0,61	0,40	2,90	0,13	14,27	14,06	67,95	4,69
5,0	2,47	2,26	11,76	0,38	21,96	21,75	104,57	3,63
7,0	3,73	3,52	17,76	0,44	20,81	20,60	99,10	2,58
10,0	6,43	6,22	30,62	0,57	24,97	24,76	118,90	2,25

Fonte: Autor.

Tabela 11- Solubilização da quercetina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso do PEG 6K, a 37 ° C.

PEG 6K %	S	S-S ₀	S/S ₀	S-S ₀ /m _t	S	S-S ₀	S/S ₀	S-S ₀ /m _t
Sem F127				Com F127				
0	0,21	---	---	---	7,92	7,71	37,71	7,71
0,1	0,21	0,00	1,01	0,00	23,90	23,69	113,81	21,54
0,5	0,35	0,14	1,64	0,09	17,65	17,44	84,05	11,63
1,0	-0,06	-0,27	-0,30	-0,14	16,73	16,52	79,67	8,26
2,0	0,70	0,49	3,31	0,16	12,90	12,69	61,43	4,23
5,0	2,28	2,07	10,85	0,34	13,57	13,36	64,62	2,23
7,0	2,72	2,51	12,97	0,31	11,76	11,55	56,00	1,44
10,0	4,59	4,38	21,87	0,40	8,73	8,52	41,57	0,77

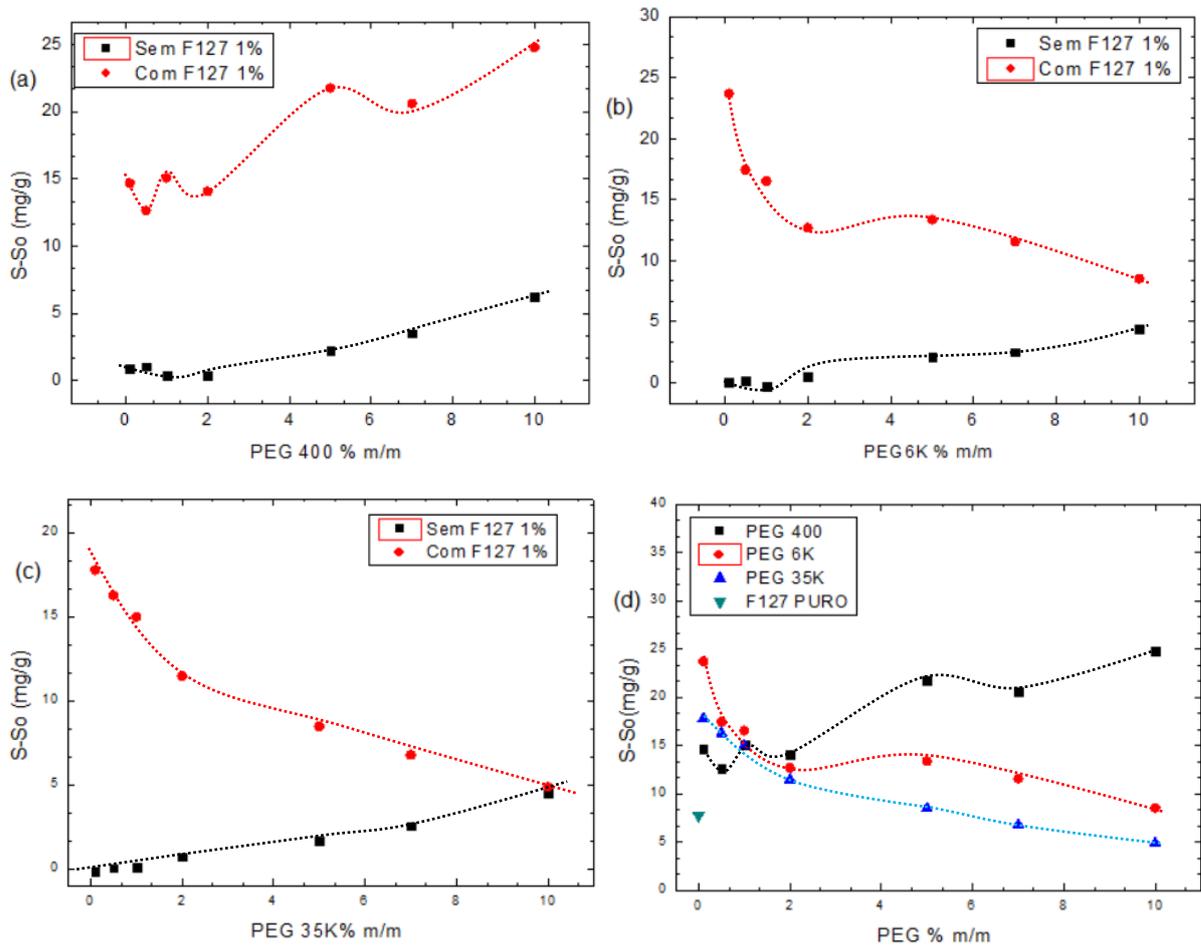
Fonte: Autor.

Tabela 12- Solubilização da quercetina nas misturas de F127 a 1% m/m nos polímeros e nas concentrações 0,1 -10 % em peso do PEG 35K, a 37 ° C.

PEG 35K %	S	S-S ₀	S/S ₀	S-S ₀ /m _t	S	S-S ₀	S/S ₀	S-S ₀ /m _t
Sem F127				Com F127				
0	0,21	---	---	---	7,92	7,71	37,71	7,71
0,1	0,05	-0,16	0,26	0,23	17,98	17,77	85,61	77,83
0,5	0,25	0,04	1,20	0,80	16,47	16,26	78,44	52,29
1,0	0,30	0,09	1,42	0,71	15,19	14,98	72,31	36,15
2,0	0,91	0,709	4,34	1,45	11,65	11,44	55,50	18,50
5,0	1,85	1,64	8,80	1,47	8,67	8,46	41,30	6,88
7,0	2,74	2,53	13,06	1,63	6,96	6,75	33,13	4,14
10,0	4,71	4,50	22,43	2,04	5,06	4,85	24,09	2,19

Fonte: Autor.

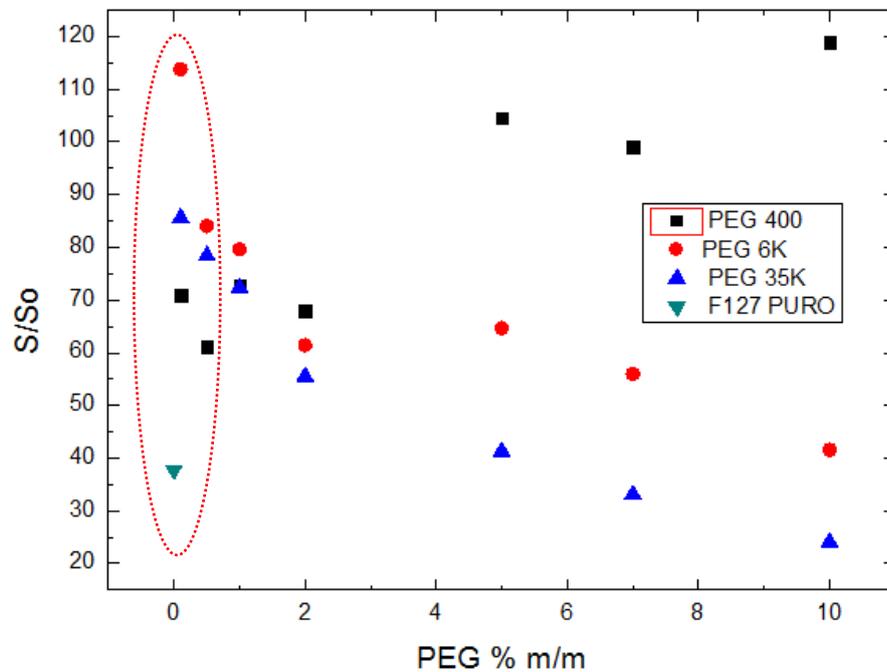
Figura 20- Solubilidade da quercetina em soluções aquosas de PEG 400 (a), 6K (b) e 35K (c) nas concentrações 0,1 -10 % em peso a 37 °C. Símbolo (▼) indica o bioativo somente em F127 a 1% m/m em água pura. T = 37 °C.



Fonte: Autor.

O gráfico da Figura 21 a seguir mostra em quantas vezes a solubilidade da quercetina foi modificada com a adição dos aditivos PEG's, observa-se que as misturas mais diluídas (menor concentração do aditivo) são as que proporcionam os melhores valores de solubilidade para o bioativo. Observa que a adição do PEG 400 aumentou a solubilização da quercetina, entretanto a adição do PEG 6K e 35 K diminuiu, sendo explicado pelo fato dos mesmos serem mais hidrofílicos.

Figura 21- Comparativo da solubilidade da quercetina nos sistemas PEG 400, 6K e 35K nas concentrações 0,1 -10 % em peso, Símbolo (\blacktriangledown) indica o bioativo somente em F127 a 1% m/m em água pura. T = 37 °C.

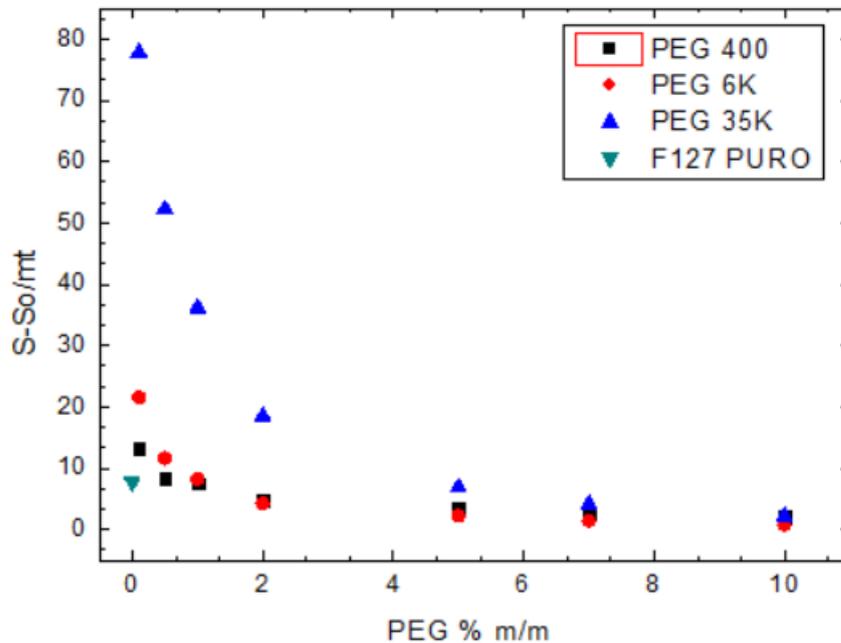


Fonte: Autor.

Os valores de S/S_0 mostram que o aumento da proporção de PEG 6K e 35K nas misturas ocasiona uma diminuição da solubilidade para o fármaco, sendo as misturas diluídas as de melhores resultados, e ainda o aumento da concentração do PEG 400 aumenta a solubilidade para quercetina confirmando a sua atuação como melhor sistema na solubilidade deste fármaco.

A Figura 22 apresenta o gráfico dos resultados do aumento da quantidade de material polimérico e a solubilidade da quercetina. A solubilidade cai com o aumento da quantidade de PEG presente em solução.

Figura 22- Comparativo da solubilidade da quercetina nos sistemas PEG 400, 6K e 35K nas concentrações 0,1 -10 % em peso a 37 °C, com F127 1% m/m.

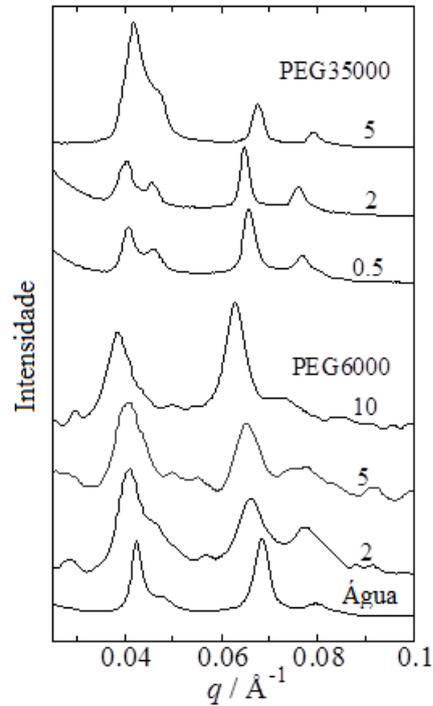


Fonte: Autor.

5.3. Estrutura dos Géis: Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)

Soluções das misturas analisadas por SAXS foram usualmente retiradas da refrigeração, aquecidas até a temperatura requerida e mantidas em repouso por 15 min para atingir o equilíbrio. As misturas com géis de F127 (30% em peso) a 30 °C com os polímeros PEG 6K e PEG 35K são mostrados na Figura 23. Quatro picos ou ombros são vistos em cada perfil, correspondendo a reflexões com valores do vetor de espalhamento na sequência $q/q^* = 1, 1,155, 1,633, 1,915$ característicos da estrutura cúbica de face centrada (cfc). A Tabela 13 apresenta as amostras para os quais os perfis obtidos foram satisfatórios, juntamente com os valores do vetor de espalhamento na reflexão de primeira ordem (q^*), e os valores correspondentes do espaçamento d calculado como $d^* = 2\pi / q$ e o raio da esfera da micela para a estrutura cfc calculado como $r_{hs} = (d \sqrt{6}) / 4$. Dada uma incerteza experimental para q^* de $\pm 0,002 \text{ \AA}^{-1}$, os valores de d (intervalo de 150-161 \AA) e r_{hs} (intervalo de 92-98 \AA) são aproximados para todos os géis listados na Tabela 11, se claro ou turvo.

Figura 23-. Dados de SAXS obtidos a 30°C, para 30% em peso de géis aquosos de F127 mais PEG6K e PEG35K como indicado. Os valores de m/m% em peso de polímero são mostrados. Escalas de intensidade e zeros são arbitrárias.



Fonte: Autor.

Tabela 13- SAXS: estrutura de gel, vetor de espalhamento q^* , d-espaçamento e raio da esfera micela (r_{hs}) para géis 30% em peso do copolímero F127 em água e em soluções aquosas dos polímeros PEG 6K e PEG 35K a 30 ° C.

	m/m %	gel	Estrutura	$q^*/\text{Å}^{-1}$	$d/\text{Å}$	$r_{hs}/\text{Å}$
Água	—	claro	cfc*	0.042	150	92
PEG6K	2	claro	cfc	0.041	153	94
	5	claro	cfc	0.041	153	94
	7	claro	cfc	0.040	157	96
	10	claro	cfc	0.039	161	98
PEG35K	0.1	claro	cfc	0.041	153	94
	0.5	claro	cfc	0.041	153	94
	1	claro	cfc	0.041	153	94
	2	claro	cfc	0.040	157	96
	5	turvo	cfc	0.042	150	92

cfc* = cúbica de face centrada

O valor quase constante de r_{hs} derivados de SAXS, valor médio 94 nm, contrasta com o intervalo de valores do raio hidrodinâmico (RICARDO *et al.*, 2012).

Os dados de SAXS para todas as misturas apresentadas mostram uma característica comum, todos se referem a uma estrutura cúbica de face centrada (cfc), evidenciando que o gel de 30% m/m de F127 em água apresenta uma estrutura cfc, característica de um sistema ordenado.

O empacotamento eficiente numa estrutura cúbica acontece quando micelas interagem efetivamente como esferas rígidas, isto é, a corona do bloco E de uma micela que intumesce na água é simetricamente radial (ou quase isso) e é suficientemente concentrada que, a um dado raio, ela efetivamente exclui a corona de bloco E de uma segunda micela.

5.4. Avaliação da Citotoxicidade.

A LDH é uma enzima citosólica, sendo assim, sua detecção no fluido extracelular é um indicativo de morte ou perda da integridade e, na avaliação da viabilidade celular, constitui num dos métodos mais sensíveis e eficazes (LOPES, 2010).

As Figuras 24 (a), (b), (c) e (d) mostram o efeito dos sistemas PEG 6K 0,5% + F127 1% com e sem os bioativos em estudo sobre a viabilidade de neutrófilo humano, medido através da atividade da LDH.

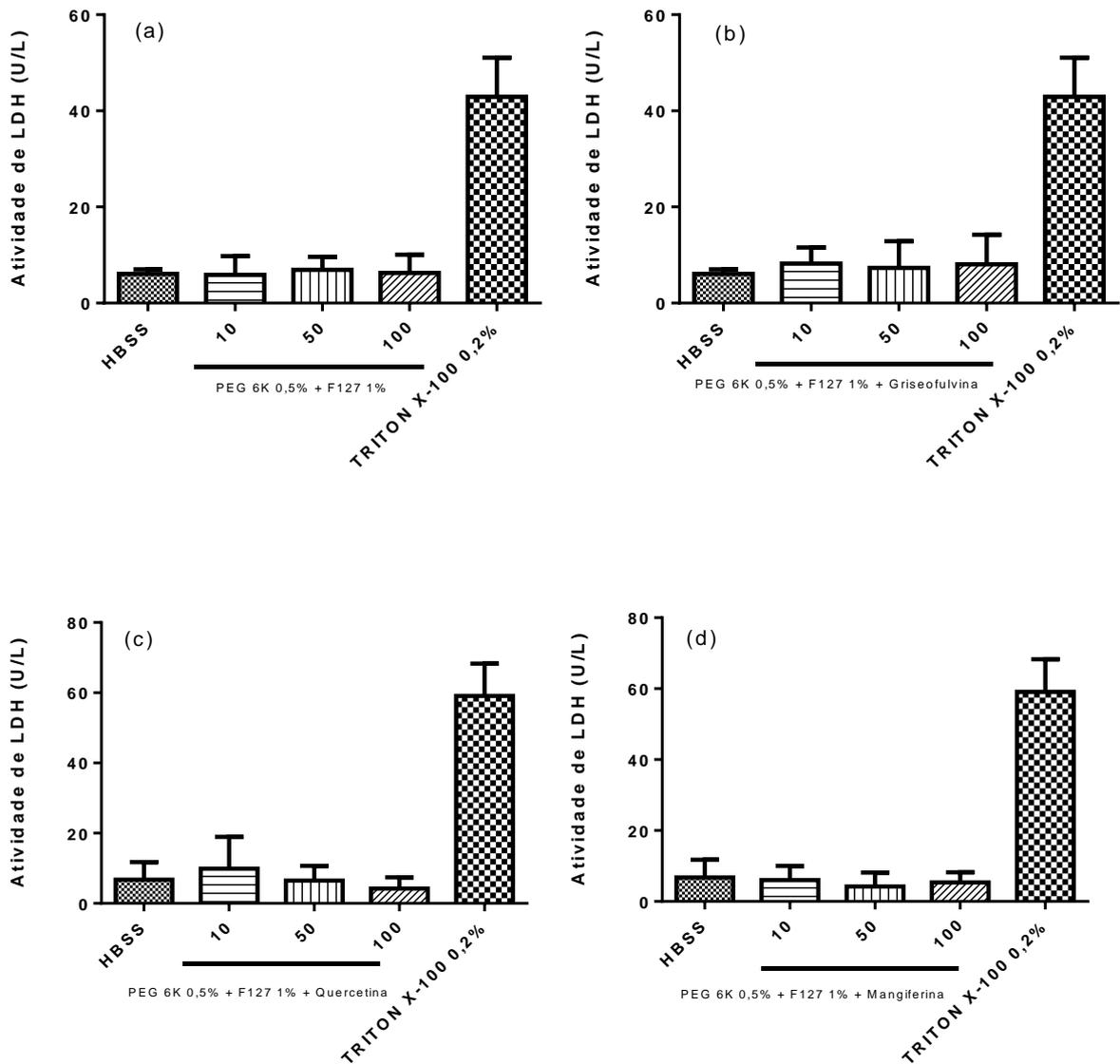
A mistura PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m (10, 50 e 100 μ m/mL), Figura 24a, ao contrário do Triton X-100 0,2% v/v (padrão de citotóxico) não aumentou significativamente a atividade da LDH dos neutrófilos humanos, LDH: $5,87 \pm 1,60$; $6,90 \pm 1,12$; $6,30 \pm 1,53$ U/L, respectivamente, quando comparado ao grupo controle a solução salina de Hanks, HBSS ($6,06 \pm 0,40$ U/L).

Para os sistemas avaliados no estudo com bioativos esses foram os resultados:

- a) A mistura PEG 6K 0,5% + F127 1% com o bioativo griseofulvina, Figura 24b, apresentou os seguintes valores (LDH: $5,03 \pm 1,24$; $2,54 \pm 1,28$ e $2,59 \pm 2,59$ U/L) para as concentrações em estudo, valores menores que os apresentados pelo grupo controle HBSS ($6,61 \pm 0,26$ U/L);
- b) A mistura PEG 6K 0,6%/F127 1% com o bioativo quercetina (Figura 30c), apresentou os valores (LDH: $9,87 \pm 3,72$; $6,41 \pm 1,71$ e $4,41 \pm 1,32$) para as concentrações em estudo, valores menores que os apresentados pelo grupo controle HBSS ($6,76 \pm 2,25$ U/L);
- c) A mistura PEG 6K 0,6%/F127 1% com o bioativo mangiferina (Figura 24 (d)), apresentou os valores (LDH: $6,06 \pm 1,63$; $4,22 \pm 1,78$ e $5,34 \pm 1,19$) para as concentrações em estudo, valores menores que os apresentados pelo grupo controle HBSS ($6,76 \pm 2,25$ U/L).

Todos os sistemas avaliados apresentaram valores muito próximos para a atividade do LDH em relação ao grupo controle negativo (não tratado), indicando ausência de citotoxicidade.

Figura 24-. Avaliação da citotoxicidade dos sistemas: (a) PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m, (b) PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m + Griseofulvina, (c) PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m + Quercetina e (d) PEG 6K 0,5% m/m + F127 1% m/m + Mangiferina, mensurada pela atividade da lactose desidrogenase.



Fonte: Autor.

5.5. Liberação *in vitro*

A realização do estudo de liberação de um bioativo é necessária para que se tenha um parâmetro da quantidade de droga a ser veiculada no ambiente fisiológico e a conseqüente absorção na corrente sanguínea.

Três mecanismos têm sido considerados como padrões de liberação em encapsulados de nanopartículas baseados em micelas: (i) difusão, (ii) degradação do copolímero e (iii) estabilidade da micela (ALLEN *et al.*, 1999). Nesse trabalho, o mecanismo de liberação utilizado, devido à concentração do polímero no interior da membrana de dialise ser estável, foi o de difusão.

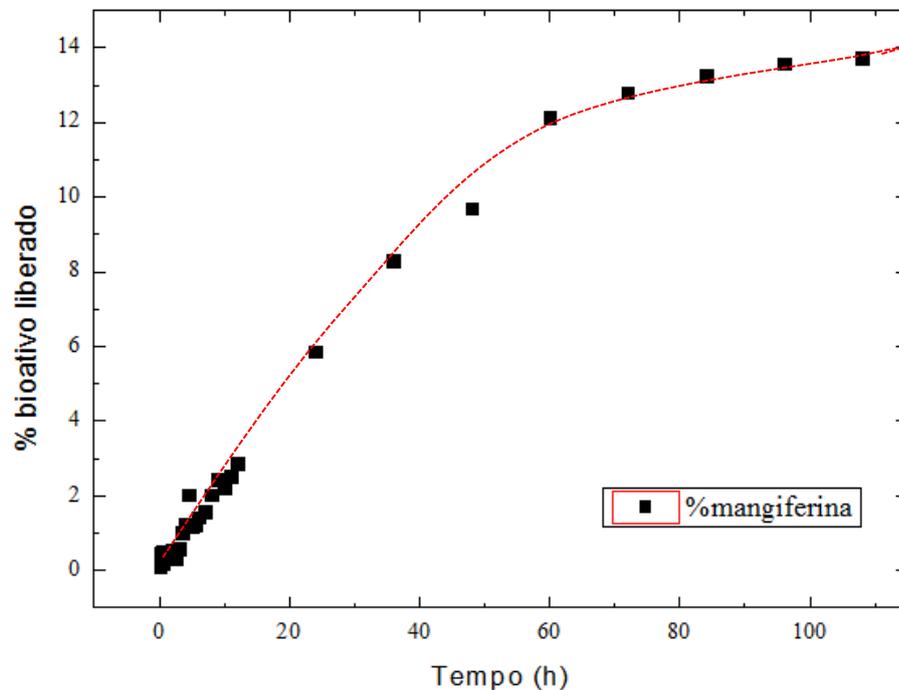
No caso de copolímeros com baixa taxa de degradação, a taxa de liberação é fortemente influenciada por fatores como: a força de interação entre o fármaco e o bloco formador do núcleo (principal fator), a fase de agregação do núcleo micelar, a quantidade de fármaco encapsulado, a massa molecular do fármaco, o comprimento do bloco formador do núcleo e a localização do bioativo dentro da micela (ALLEN *et al.*, 1999).

Na Figura 25 encontram-se os perfis de liberação da mangiferina encapsulada no sistema F127 1 % com PEG 6K 0,5 %, no qual se estuda a variação da porcentagem de liberação do bioativo com o tempo de liberação gasto pelo sistema em meio a um tampão simulando o fluido intestinal de pH 7,4.

SHIN e colaboradores, 1998, notaram que os testes com o bioativo 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 bioativos hidrofóbicos, fato esse também observado nesse trabalho para o sistema contendo mangiferina.

A liberação ocorre através do mecanismo de difusão durante as 170 h, correspondente a 7 dias, o que é condizente com o tipo de interação não-covalente entre a mangiferina e nano-micela, sistema similar foi proposto MISSIRLIS e colaboradores, 2006. A liberação da mangiferina por difusão permite controle sobre a liberação.

Figura 25-. Liberação da mangiferina encapsulada no sistema F127 1 % / PEG 6K 0,5 %.



Fonte: Autor.

O sistema que possui maior quantidade de bioativo encapsulado possui menor taxa de liberação conforme observado por SOO e colaboradores, 2005, num estudo de liberação do estradiol em micelas de um copolímero em bloco de policaprolactona-polietilenoglicol (PCL-PEG) e por SHIN e colaboradores, 1998, em estudo com o bioativo indometacina em um copolímero dibloco do mesmo tipo.

ALLEN e colaboradores, 1999, mostraram que o comportamento das micelas nesse transporte de bioativo é determinado pelo fato de que a estabilidade micelar é altamente dependente da composição e da formação das micelas. Dessa forma, podemos concluir que o sistema F127 com PEG 6K apresentou um perfil de liberação controlada, tendo sua liberação máxima iniciada em torno de 4 dias com liberação de 14% do ativo.

O sistema F127 com PEG 6K aqui estudado é promissor para sistemas de liberação de bioativos por serem bons agentes carreadores, apresentam micelas de tamanho nanométrico, estáveis promovem uma liberação sustentada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS / PERSPECTIVAS

Os sistemas contendo os aditivos poliméricos PEG 400, 6K e 35K mostraram-se alternativas promissoras para o uso em administração subcutânea de bioativos hidrofóbicos, sendo compatíveis com as características de geleificação do constituinte F127 puro, pois promove uma diminuição da concentração de formação de gel.

Para os três bioativos estudados, griseofulvina, quercetina e mangiferina, observou-se que as estruturas micelares imersas em aditivo PEG 6K a uma concentração de 0,5 % apresentou melhores valores de solubilização quando comparado às outras porcentagens e aos outros aditivos.

O estudo relacionado a toxicidade em neutrófilos humanos dos sistemas PEG 6K 0,5% com F127 1% com e sem os bioativos não apresentaram citotoxicidade significativa quando comparados ao grupo controle sendo indicativo viável sua aplicação em formulações farmacêuticas.

O estudo por SAXS revelou que a adição do polietilenoglicol as formulações micelares do F127 não alterar sua estrutura cúbica de face centrada.

O sistema F1271% com PEG 6K 0,5% contendo mangiferina apresentou um perfil de liberação controlada, tendo sua liberação máxima iniciada em torno de 4 dias com liberação de 14% do ativo.

REFERÊNCIAS

- ABIQUIFI, Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de Insumos Farmacêuticos. Disponível em: < <http://abiquifi.org.br/>> Acesso em: 15 de jan. **2016**.
- AGUILAR *et al.*, *Topics in Tissue Engineering – Chapter 6: Smart Polymers and Their Applications as Biomaterials*, volume 3, **2007**, 27 p.
- AKASH e REHMAN, *Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives*, **Journal of Controlled Release**, 209, **2015**, p. 120–138.
- ALIABADI e LAVASASNIFAR, *Polymeric micelles for drug delivery*, **Expert Opinion on Drug Delivery**, 3, 1, **2006**, p. 139-162.
- ALLEN, *et al.*, *Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 16, **1999**, p. 3-27.
- ALLINGER *et al.*, **Química Orgânica**, 2ª ed., LTC, Guanabara Dois: Rio de Janeiro, **1978**, 961 p.
- ALTINOK, *et al.*, *Micellisation and gelation of diblock copolymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution, the effect of P-block length*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 16, **1999**, p. 73–91.
- ATKINS e DE PAULA, **Físico-Química: Fundamentos**, 5. ed., Rio de Janeiro, ed. LTC, **2011**, 500 p.
- BADER e PUTNAM, **Engineering polymer systems for improved drug delivery**, ed. Wiley, New Jersey, **2014**, 492 p.
- BATRAKOVA, *et al.*, *Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers*, **Journal of Controlled Release**, 130, **2008**, p. 98–106.
- BAZILE *et al.*, *Stealth Me. PEG-PLA Nanoparticles Avoid Uptake by the Mononuclear Phagocytes System*, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 84, **1995**, p. 493–498.
- BEHLING, *et al.*, *Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e Ações Biológicas*, **Alimentos e Nutrição Araraquara**, 15, **2004**, p. 285-292.
- BERGSTRÖM *et al.*, *Effects of branching and molecular weight of surface-bound poly(ethylene oxide) on protein rejection*, **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, 6, **1994**, p. 123–132.
- BRONICH *et al.*, *Soluble complex from poly(ethylene oxide)-block-polymethacrylate anions and N-alkylpyridinium cations*, **Macromolecules**, 33, **1997**, p. 3519–3525.
- CANUTO, *Propriedades Químicas e Farmacológicas de Mangiferina: Um Composto Bioativo de Manga (Mangifera indica L.)*, **Embrapa Semi-Árido**, Petrolina, **2009**, p.27.

- CARLI e LARIZZA, *Griseofulvin*, **Mutation Research**, 195, **1988**, p. 91-126.
- CARRAHER, ***Polymer Chemistry***, 6 ed., New York, ed. Marcel Dekker, **2003**, 903 p.
- CAVALCANTE, *Copolímeros em Bloco para Administração de Fármacos Hidrofóbicos: Caracterização, Solubilização e Liberação*, **Dissertação (Mestrado em Química)** – Departamento de Química Inorgânica e Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2009**.
- CHAIBUNDIT *et al.*, *Micellization and Gelation of Mixed Copolymers P123 and F127 in Aqueous Solution.*, **Langmuir**, 23, **2007**, p. 9229-9236.
- CHAIBUNDIT *et al.*, *Micellization of Diblock(oxyethylene/oxybutylene) Copolymer E₁₁B₈ in Aqueous Solution. Micelle Size and Shape. Drug Solubilization*, **Langmuir**, 18, **2002**, 4277-4283.
- CHIAPPETTA e SOSNIK, *Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs*, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 66, **2007**, p. 303–317.
- CLINICALTRIALS.GOV. Disponível em: < <https://clinicaltrials.gov> > Acesso em: 10 de jan. **2016**.
- CROTHERS, *et al.*, *Micellization and Gelation of Diblock Copolymers of Ethylene Oxide and Styrene Oxide in Aqueous Solution*, **Langmuir**, 18, **2002**, p. 8685-8691.
- CROTHERS, *et al.*, *Solubilisation in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s*, **International Journal of Pharmaceutics**, 293, **2005**, p. 91–100.
- DEIBLE *et al.*, *Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol*, **Biomaterials**, 19, **1998b**, p. 1885-1893.
- DEIBLE *et al.*, *Creating molecular barriers to acute platelet deposition on damaged arteries with reactive polyethylene glycol*, **Journal Biomedical Materials Research**, 41, **1998a**, p. 251–256.
- DUTRA, *Sistemas Micelares de F127®, P123® e suas Misturas como Nanocarreadores dos Fármacos Griseofulvina e Mangiferina*, **Dissertação (Mestrado em Química)** – Departamento de Química Inorgânica e Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2012**.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária: ANVISA**, 5ª ed., Brasília, **2010**, p. 57.
- FENDLER, ***Nanoparticles and Nanostructured Film: Preparation, Characterization and Applications***, ed. Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, **1998**, 488 p.
- FINKELSTEIN *et al.*, *Griseofulvin and its uses*, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 6, **1996**, p. 189-194.

- GAO, *et al.*, *Formulation optimization and in situ absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion*, **Colloids Surf B: Biointerfaces**, 71, **2009**, p. 306-314.
- GAUCHER *et al.*, *Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery*, **Journal of Controlled Release**, 109, **2005**, p. 169–18.
- GONG *et al.*, *Polymeric micelles drug delivery system in oncology*, **Journal of Controlled Release**, 159, **2012**, p. 312–323.
- GRAF *et al.*, *Biodegradable long-circulating polymeric nanosphere*, **Science**, 28, **1994**, p.1600–1603.
- GUTERRES *et al.*, *Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application*, **Drug Target Insights**, 2, **2007**, p. 147–157.
- HADADA e KATAOKA, *Formation of polyion complex micelles in aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly(ethylene glycol) segments*, **Macromolecules**, 28, **1995**, p. 5294–5299.
- HAMLEY *et al.*, *Cubic gels and lamellar crystals in concentrated solutions of an amphiphilic diblock copolymer*, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 145, **1998**, p. 185–190.
- HAMLEY, *et al.*, *Aqueous mesophases of block copolymers of ethylene oxide and 1,2-butylene oxide*, **Physical Chemistry Chemical Physics**, 3, **2001**, p. 2972-2980.
- HARRISON, *et al.*, *Micelles and Gels of Mixed Triblock Copoly(Oxyalkylene)s in Aqueous Solution*, **Langmuir**, 21, **2005**, p. 6170-6178.
- HOLMBERG *et al.*, *Effects on protein adsorption, bacterial adhesion and contact angle of grafting PEG chains to polystyrene*, **Journal of Adhesion Science and Technology**, 7, **1993**, p. 503–517.
- HUANG *et al.*, *Synthesis, characterization, and nonlinear optical properties of copper nanoparticles*, **Langmuir**, 13, **1997**, p. 172–175.
- ISTA *et al.*, *Attachment of bacteria to model solid surfaces: oligo(ethylene glycol) surfaces inhibit bacterial attachment*, **FEMS Microbiology Letters**, 142, **1996**, p. 59-63.
- JO e PARK, *Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s*, **Biomaterials**, 21, **2000**, p. 605–616.
- KABANOV e ALAKHOV, *Pluronic® Block Copolymers in Drug Delivery: from Micellar Nanocontainers to Biological Response Modifiers*, **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 19, **2002**, p. 1–73.
- KABANOV *et al.*, *Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery*, **Journal of Controlled Release**, 82, **2002a**, p. 189–212.
- KABANOV *et al.*, *Pluronic® block copolymers for overcoming drug resistance in cancer*, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 54, **2002c**, p. 759-779.

- KABANOV *et al.*, *Pluronic® block copolymers: novel functional molecules for gene therapy*, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 54, **2002b**, p. 223-233.
- KABANOV *et al.*, *The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles*, **Federation of European Biochemical Societies**, 258, 2, **1989**, p. 343–345.
- KADAM, *et al.*, *Solubilization of poorly water-soluble drug carbamazepine in pluronic micelles: effect of molecular characteristics, temperatura and added salt on the solubilizing capacity*, **Colloids Surf B: Biointerfaces**, 72, **2009**, p. 141-147.
- KAMALY *et al.*, *Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation*, **Chemical Society Reviews**, 41, **2012**, p. 2971-3010.
- KATAOKA *et al.*, *Spontaneous Formation of Polyion Complex Micelles with Narrow Distribution from Antisense Oligonucleotide and Cationic Block Copolymer in Physiological Saline*, **Macromolecules**, 29, **1996**, p. 8556-8557.
- KATAOKA, *Design of nanoscopic vehicles for drug targeting based on micellization of amphiphilic block copolymers*, **Journal of Macromolecular Science, Part A**, **1994**, p. 1759-1769.
- KATAOKA, *et al.*, *Effect of the Secondary Structure of Poly(L-lysine) Segments on the Micellization in Aqueous Milieu of Poly(ethylene glycol)-Poly(L-lysine) Block Copolymer Partially Substituted with a Hydrocinnamoyl Group at the N^ε-Position*, **Macromolecules**, 31, **1998**, p. 6071-6076.
- KAWABATA *et al.*, *Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications*, **International Journal of Pharmaceutics**, 420, **2011**, p. 1-10.
- KAWAGUCHI, *et al.*, *Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats*, **Journal Control Release**, 136, **2009**, p. 240-146.
- KHADKA *et al.*, *Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability*, **Asian Journal of Pharmaceutical Science**, 9, **2014**, p. 304-316.
- KHAIRUTDINOV, *Physical chemistry of nanocrystalline semiconductors*, **Colloid Journal of the Russian Academy of Sciences**, vol. 59, **1997**, p. 535-548.
- KIM *et al.*, *In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy*, **Journal of Controlled Release**, 72, **2001**, p. 191–202.
- KWON *et al.*, *Micelles based on AB block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(β -benzyl L-aspartate)*, **Langmuir**, 9, **1993**, p. 945–949.
- LANDIM e COSTA, *Dimorphandra gardneriana Tulasne (Fava d'anta) - Uma abordagem etnobotânica e riscos de extinção*, **Revista da Biologia**, 9, **2012**, p. 6-11.

- LEE *et al.*, *Binary mixing of micelles using Pluronic for a nano-sized drug delivery system*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 82, **2011**, p. 190–195.
- LEI *et al.*, *Anticancer drug delivery of PEG based micelles with small lipophilic moieties*, **International Journal of Pharmaceutics**, 453, **2013**, p. 579–586.
- LETFORD e BURT, *A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes*, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 65, **2007**, p. 259–269.
- LI *et al.*, *Concentrated Aqueous Micellar Solutions of Diblock Copoly(oxyethylene/oxybutylene) E₄₁B₈: A Study of Phase Behavior*, **Macromolecules**, 30, **1997**, p. 1347-1354.
- LI *et al.*, *Polymeric micelles with small lipophilic moieties for drug delivery*, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 116, **2014**, p. 627-632.
- LIU, *et al.*, *Docetaxel-loaded pluronic p123 polymeric micelles: in vitro and in vivo evaluation*, **International Journal of Molecular Sciences**, 12, **2011**, p. 1684-1696.
- LODGE, *Block Copolymers: Past Successes and Future Challenges*, **Macromolecular: Chemistry and Physics**, 204, **2003**, p. 265-273.
- LOPES, *Avaliação da atividade antiinflamatória e antioxidante das cápsulas do extrato seco padronizado e da afrormosina, isoflavonóide, obtido de Amburana cearensis A C Smith. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.*
- LU e PARK, *Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs*, **International Journal of Pharmaceutics**, 453, **2013**, p. 198–214.
- LYSENKO *et al.*, *Block ionomer complexes from polystyrene-block-polyacrylate anions and N-cetylpyridinium cations*, **Macromolecules**, 31, **1998**, p. 4511–4515.
- MALMSTEN e LINDMAN, *Effects of homopolymers on the gel formation in aqueous block copolymer solutions*, **Macromolecules**, 25, **1993**, p. 1282-1286.
- MICELA. Disponível em: < <http://www.educa.madrid.org/web/cc.nsdelasabiduria.madrid/Ejercicios/2b/Biologia/Lipidos/micelas.htm> > Acesso em: 15 de jan. **2016**.
- MISSIRLIS, *et al.*, *Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles*, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 29, **2006**, p. 120-129.
- MUELLEN *et al.*, *Targeted block copolymer micelles*, **European Patent Office**, EP 2025348 A1 20090218, **2009**, Acesso em: 15 de jan. 2016.
- MULHOLLAND, *et al.*, *Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin*, **Annals of Oncology**, 12, 2001, p. 245-248.
- MYERS, *Surfactant Science and Technology*, 3. ed., Wiley-VCH Publishers, New York, **2006**, 448 p.

NISHIYAMA *et al.*, *Preparation and characterization of self-assembled polymer-metal complex micelle from cis-dichlorodiamine platinum (II) and poly(ethylene glycol)-poly(a,b-aspartic acid) block copolymer in an aqueous medium*, **Langmuir**, 15, **1999**, p. 377–383.

OLIVEIRA *et al.*, *The effect of polymeric additives on the solubilisation of a poorly-soluble drug in micellar solutions of Pluronic® F127*. **International Journal of Pharmaceutics**, 409, **2011b**, p. 206–208.

OLIVEIRA *et al.*, *The effect of water-soluble polymers, PEG and PVP, on the solubilisation of griseofulvin in aqueous micellar solutions of Pluronic® F127*, **International Journal of Pharmaceutics**, 421, **2011a**, p. 252–257.

OLIVEIRA, *et al.*, *Binary Micellar Solutions of Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Styrene Oxide) Copolymers with Pluronic® P123: Drug Solubilisation and Cytotoxicity Studies*, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 26, **2015**, p. 2195-2204.

OLIVEIRA, *Solubilização da griseofulvina e estudo micelar dos copolímeros: PVP 30K, PVP 90K, PEG 35K, F127 e das misturas: (F127/PVP 30K), (F127/PVP 90K) e (F127/PEG 35K)*, **Tese (Doutorado em Química)** – Departamento de Química Inorgânica e Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2011c**.

OTSUKA *et al.*, *Novel approaches for the construction of functionalized poly(ethylene glycol) (PEG) layer on surfaces using heterobifunctional PEG/poly(lactide)(PLA) block copolymers and their micelles, in polymers from renewable resources: biopolyesters and biocatalysis*, in: R. Gross, C. Scholz (Eds.), **ACS Symposium Series 764**, **American Chemical Society**, Washington, DC, **2000**, p. 311–327.

OTSUKA *et al.*, *Self-assembly of poly(ethylene glycol)-based block copolymers for biomedical applications*, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 6, **2001**, p. 3–10.

PEDROSA, *Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiuréia*. 111 f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2013**.

PERACCHIA, *et al.*, *Complement Consumption by Poly(Ethylene Glycol) in Different Conformations Chemically Coupled to Poly(Isobutyl 2-Cyanoacrylate) Nanoparticles*, **Life Sciences**, 61, **1997d**, p. 749-761.

PERACCHIA, *et al.*, *Development of sterically stabilized poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles by chemical coupling of poly(ethylene glycol)*, **Journal of Biomedical Materials Research**, 34, **1997a**, p. 317-326.

PERACCHIA, *et al.*, *PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics*, **Journal of Controlled Release**, 46, **1997c**, p. 223-231.

PERACCHIA, *et al.*, *Pegylated Nanoparticles from a Novel Methoxypolyethylene Glycol Cyanoacrylate-Hexadecyl Cyanoacrylate Amphiphilic Copolymer*, **Pharmaceutical Research**, 15, **1998**, p. 550–556.

PERACCHIA, *et al.*, *Synthesis of a Novel Poly(MePEG cyanoacrylate-co-alkyl cyanoacrylate) Amphiphilic Copolymer for Nanoparticle Technology*, **Macromolecules**, 30, **1997b**, p. 846-851.

PINHO, *Solubilização de fármacos em formulações micelares de misturas de copolímeros triblocos*, **Dissertação (Mestrado em Mestrado)**, Departamento de Química Inorgânica e Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2006**.

PITTO-BARRY e BARRY, *Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances*, **Polymer Chemistry**, 5, **2014**, p. 3291-3297.

REKATAS, *et al.*, *The effect of hydrophobe chemical structure and chain length on the solubilization of griseofulvin in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s*, **Physical Chemistry Chemical Physics**, 3, **2001**, p. 4769-4773.

RIBEIRO *et al.*, *Efeito do polietileno glicol 400 (PEG 400) nas propriedades de micelização e solubilização de fármaco do pluronic® F127*, **12° Congresso Brasileiro de Polímeros (12°CBPol)**, Piauí, **2013**.

RIBEIRO, *et al.*, *Solubilisation capacity of Brij surfactants*, **International Journal of Pharmaceutics**, 436, **2012**, p. 631-635.

RIBEIRO, *et al.*, *Solubilisation of griseofulvin in aqueous micellar solutions of diblock copolymers of ethylene oxide and 1,2-butylene oxide with lengthy B-blocks*, **International Journal of Pharmaceutics**, 369, **2009a**, p. 196–198.

RIBEIRO, *et al.*, *Solubilisation of griseofulvin, quercetin and rutin in micellar formulations of triblock copolymers E₆₂P₃₉E₆₂ and E₁₃₇S₁₈E₁₃₇*, **International Journal of Pharmaceutics**, 378, **2009b**, p. 211–214.

RIBEIRO, *Micelas de Copoli(oxyalkileno)s: Caracterização, Encapsulação e Liberação de Fármaco*, **Tese (Doutorado em Química)** – Departamento de Química Inorgânica e Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, **2010**.

RICARDO *et al.*, *Association Behavior of Mixed Triblock Copoly(oxyalkylene)s (Type EBE and ESE) in Aqueous Solution*, **Langmuir**, 22, **2006**, p. 1301–1306.

RICARDO *et al.*, *Controlling the gelation of aqueous micellar solutions of ethylene-oxide-based block copoly(oxyalkylene)s*, **International Journal of Pharmaceutics**, 300, **2005**, p. 22–31.

RICARDO *et al.*, *Effect of water-soluble polymers, polyethylene glycol and poly(vinylpyrrolidone), on the gelation of aqueous micellar solutions of Pluronic copolymer F127*, **Journal of Colloid and Interface Science**, 368, **2012**, p. 336–341.

RICARDO *et al.*, *Gelation of Concentrated Micellar Solutions of a Triblock Copolymer of Ethylene Oxide and Styrene Oxide, S₅E₄₅S₅*, **Langmuir**, 20, **2004**, p. 4272–4278.

RICARDO *et al.*, *The effect of n-, s- and t-butanol on the micellization and gelation of Pluronic P123 in aqueous solution*, **Journal of Colloid and Interface Science**, 353, **2011**, p. 482–489.

ROGACH, *et al.*, *Thiol-stabilized CdSe and CdTe nanocrystals in the size quantization regime: Synthesis, optical and structural properties*, **Macromolecular Symposia**, 136, **1998**, p. 87–89.

RÖSLER *et al.*, *Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers*, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 64, **2012**, p. 270–279.

SAVIC *et al.*, *Block copolymer micelles as delivery vehicles of hydrophobic drugs: micelle-cell interactions*, **Journal Drug Target**, 14, **2006**, p. 343-355.

SCHMOLKA, *Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns*, **Journal of Biomedical Materials Research**, 6, **1972**, p. 571-582.

SETHIA e SQUILLANTE, *Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods*, **International Journal of Pharmaceutics**, 272, **2004**, p. 1–10.

SHIN *et al.*, *Methoxy poly(ethylene glycol)/ε-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. I. Preparation and characterization*, **Journal of Controlled Release**, 51, **1998**, p. 1–11.

SOO, *et al.*, *Polycaprolactone-block-poly(ethylene oxide) Micelles: A Nanodelivery System for 17β-Estradiol*, **Molecular Pharmaceutics**, 2, **2005**, p. 519-527.

TIJE *et al.*, *Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy*, **Clinical Pharmacokinetics**, 42, **2003**, p. 665-685.

WAN *et al.*, *Solubilization of Ibuprofen in Pluronic Block Copolymer F127 Micelles*, **Acta Physico-Chimica Sinica**, 26, 12, **2010**, p. 3243-3248.

WANKA *et al.*, *Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly (oxyethylene)-Poly (oxypropylene) -Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions*, **Macromolecules**, 27, **1994**, p. 4145-4159.

WEISS, *et al.*, *Hypersensitivity reactions from taxol*, **Journal of Clinical Oncology**, 8, **1990**, p. 1263-1868.

WELLER, *Colloidal Semiconductor Q-particle: Chemistry in the Transition Region Between Solid State and Molecules*, **Angewandte Chemie International Edition in English**, 32, **1993**, p. 41–53.

WIEDMANN, *et al.*, *Drug solubilization in lung surfactant*, **Journal of Controlled Release**, 65, **2000**, p. 43–47.

YOKOYAMA *et al.*, *Introduction of cisplatin into polymeric micelle*, **Journal of Controlled Release**, 39, **1996**, p. 351-356.

YOKOYAMA *et al.*, *Polymer Micelles as Novel Drug Carrier: Adriamycin-Conjugated Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Aspartic Acid) Block Copolymer*, **Journal of Controlled Release**, 11, **1990**, p. 269-278.

YOKOYAMA *et al.*, *Toxicity and Antitumor Activity against Solid Tumors of Micelle-forming Polymeric Anticancer Drug and Its Extremely Long Circulation in Blood*, **Cancer Research**, 51, **1991**, p. 3229-3236.