

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Curso de Pós-Graduação em Engenharia**  
**Metalúrgica e de Minas**

**Dissertação de Mestrado**

**“Preparo, caracterização e perfil de liberação  
*in vitro* de microesferas de sílica processadas  
por *spray drying*”**

**Autor: Edson de Souza Moura**  
**Orientador: Wander Luiz Vasconcelos**  
**Co-orientadora: Maria Inês Ré**

**Belo Horizonte**  
**Escola de Engenharia da UFMG**  
**2005**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Curso de Pós-Graduação em Engenharia  
Metalúrgica e de Minas**

**Edson de Souza Moura**

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE LIBERAÇÃO  
*IN VITRO* DE MICROESFERAS DE SÍLICA PROCESSADAS  
POR SPRAY DRYING**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de  
Minas Gerais da Universidade Federal de Minas Gerais**

**Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais  
Orientador: Wander Luiz Vasconcelos  
Co-orientadora: Maria Inês Ré**

**Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG**

**2005**

Aos meus pais e irmãs, Carlão, minha esposa Luciana,  
minha filha Celina e ao amigo Jesus  
que são as bases da minha vida e  
amo incondicionalmente.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wander Vasconcelos pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho.

A Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Ré pela co-orientação e incentivo para publicação de parte deste trabalho no XIIIth International Workshop on Bioencapsulation, Kingston, Canada.

A Prof.<sup>a</sup> Glaura Goulart Silva pela colaboração nos estudos de análise térmica e ao Prof. Paulo Brandão pelas discussões das metodologias da parte experimental.

A Vallée S.A. que me disponibilizou e me apoiou financeiramente para realização deste mestrado.

Ao Dr. Américo Craveiro pelo esforço e colaboração para realização deste projeto.

Aos amigos do LTF (Vallée) que me auxiliaram ao longo deste trabalho: Larissa, Nádia, Fabiano, Patrícia, Alisson, Tanira, Carolina, Elbi e Bergson.

Aos colegas Gleicilane, Ivy, Igor, Márcio e Marcos por toda colaboração que me foi prestada.

Aos colegas do Laboratório de Materiais Cerâmicos Carlos, Mariana, Juliana, Marcílio, Weber e, especialmente, a Ângela, pela oportunidade de convívio.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS .....	03
2.1. Objetivos Gerais .....	03
2.2. Objetivos Específicos .....	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	04
3.1. Processo sol-gel .....	04
3.1.1. Química do processo .....	06
3.1.2. Descrição do método sol-gel e aplicações.....	14
3.2. Sistemas de liberação controlada .....	16
3.2.1. Aplicação .....	16
3.2.2. Utilização do processo sol-gel para obtenção de sistemas de liberação controlada .....	20
3.2.3. Biocompatibilidade dos vidros de sílica .....	25
3.2.4. Mecanismo de liberação de fármacos a partir de polímeros biodegradáveis.....	26
3.3. Vitamina B12 .....	31
3.3.1. Importância da vitamina B12 .....	31
3.3.2. Propriedades físico-químicas.....	32
3.3.3. Farmacocinética da vitamina B12.....	33
3.3.4. Deficiência de vitamina B12.....	35
3.3.5. Vias de administração e tratamento.....	36
3.3.6. Interações com outros fármacos .....	37
3.3.7. Efeitos adversos e precauções.....	37
4. METODOLOGIA .....	38
4.1. Padronização do método de análise da cianocobalamina por cromatografia líquida de alta eficiência.....	38
4.1.1. Parâmetros avaliados na padronização das metodologias analítica....	39
4.1.1.1. Seletividade.....	40
4.1.1.2. Linearidade .....	40

4.1.1.3. Precisão .....	40
4.1.1.4. Exatidão .....	42
4.1.1.5. Robustez .....	44
4.2. Procedimento de análise da matéria-prima .....	44
4.3. Avaliação da estabilidade da cianocobalamina em fase sol.....	45
4.4. Determinação da viscosidade e reologia do sol .....	46
4.5. Preparo de micropartículas de sílica por <i>spray drying</i> .....	47
4.6. Caracterização das microesferas.....	50
4.6.1. Medida de densidade .....	50
4.6.2. Análise por difração de raios X .....	50
4.6.3. Espectroscopia na região do infravermelho .....	51
4.6.4. Análise térmica .....	51
4.6.5. Microscopia e microanálise eletrônica .....	52
4.6.6. Distribuição granulométrica .....	52
4.6.7. Adsorção de gases .....	53
4.6.8. Liberação <i>in vitro</i> .....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1. Padronização do método de quantificação de cianocobalamina por CLAE .....	56
5.1.1. Seletividade .....	56
5.1.2. Linearidade e faixa de aplicação .....	58
5.1.3. Precisão do método .....	60
5.1.3.1. Teste de repetibilidade .....	60
5.1.3.2. Teste de precisão intermediária .....	63
5.1.4. Teste de exatidão .....	65
5.1.5. Teste de robustez .....	68
5.2. Quantificação do teor de cianocobalamina na matéria-prima .....	70
5.3. Estabilidade da cianocobalamina em fase sol .....	71
5.4. Análise de viscosidade e reologia da fase sol .....	73
5.5. Análise granulométrica e densidade real .....	74
5.6. Espectroscopia na região do infravermelho .....	76
5.7. Análise térmica .....	79

5.8. Difractometria de raios X .....	90
5.9. Microscopia e microanálise eletrônica .....	93
5.10. Análise por adsorção de nitrogênio .....	98
5.11. Perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	100
6. CONCLUSÕES .....	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111
Anexo 1 .....	124
Anexo 2 .....	127
Anexo 3 .....	131
Anexo 4 .....	133

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Processamento sol-gel usando precursor alcóxido .....	05
Figura 3.2 - Aplicações do processo sol-gel.....	07
Figura 3.3 - Mecanismo de hidrólise catalisado por ácido .....	10
Figura 3.4 - Mecanismo de hidrólise catalisado por base.....	10
Figura 3.5 - Erosão do volume da matriz polimérica.....	27
Figura 3.6 - Erosão da superfície da matriz polimérica.....	27
Figura 3.7 - Estrutura química da vitamina B12 .....	33
Figura 4.1 – Esquema do <i>spray dryer</i> utilizado para a produção de microesferas de sílica .....	49
Figura 5.1 - Cromatograma da amostra de cianocobalamina padrão diluída 50µg/mL .....	56
Figura 5.2 - Cromatograma da amostra de cianocobalamina matéria-prima diluída a 50µg/mL.....	57
Figura 5.3 - Cromatograma da amostra de cianocobalamina padrão diluída em tampão PBS-conservantes (6µg/mL).....	57
Figura 5.4 - Cromatograma do placebo.....	57
Figura 5.5 – Representação gráfica da curva padrão da cianocobalamina por CLAE .....	59
Figura 5.6 – Pico da cianocobalamina da amostra da fase sol após 24h de ensaio.....	71
Figura 5.7 – Cromatograma da solução padrão de cianocobalamina a 26,8µg/mL .....	72
Figura 5.8 – Reologia da fase sol de relação molar TEOS(1) : Água (14) : HCl (0,0008) após 5,5h .....	74
Figura 5.9 – Espectro na região do infravermelho da cianocobalamina .....	76
Figura 5.10 – Espectro na região do infravermelho da Formulação 1 (microesfera de sílica branca pH=1).....	77
Figura 5.11 – Espectro na região do infravermelho da Formulação 2 (microesferas carregadas pH=1) .....	77



Figura 5.12 – Curva TG em N <sub>2</sub> da cianocobalamina .....	80
Figura 5.13 – Curva DSC da cianocobalamina sob ar sintético e nitrogênio...	81
Figura 5.14 – Curva DSC de secagem da cianocobalamina .....	82
Figura 5.15 – Curva DSC de resfriamento da amostra de cianocobalamina...	82
Figura 5.16 - Curva DSC do segundo aquecimento da amostra de cianocobalamina .....	83
Figura 5.17 – Curvas TG (a) e DTG (b) para a Formulação 4 .....	84
Figura 5.18 – Curvas TG para cianocobalamina, Formulação 3, Formulação 4, Formulação 10 e Formulação 11 em N <sub>2</sub> .....	85
Figura 5.19 – Curvas TG para cianocobalamina, Formulação 3 e Formulação 4 sob ar sintético .....	87
Figura 5.20 – Curvas TG para cianocobalamina, Formulação 3 e Formulação 4 sob ar sintético: residual de cianocobalamina .....	87
Figura 5.21 – Curvas TG Formulação 3, Formulação 10 e Formulação 11, em ar .....	89
Figura 5.22 – Difratoograma da cianocobalamina matéria-prima.....	91
Figura 5.23 – Difratoograma da Formulação 3 .....	91
Figura 5.24 – Difratoograma da Formulação 4 .....	92
Figura 5.25 – Fotomicrografias das microesferas de sílica contendo cianocobalamina em aumentos de 1000x e 5000x (15kV) das Formulações 2, 3, 5, 6, 8, 11, 12, 13 e 14.....	96
Figura 5.26 – Fotomicrografias das microesferas da Formulação 14 (aumentos de 2000x e 5000x; 15kV) .....	97
Figura 5.27 – EDS Formulação 1 .....	97
Figura 5.28 – EDS Formulação 3 .....	98
Figura 5.29 – MEV das Formulações 12, 13 e 14 após ensaio de liberação <i>in vitro</i> (aumentos de 5000x e 10000x; 10kV).....	99
Figura 5.30 – Ensaio de liberação <i>in vitro</i> das Formulações 3, 5, 6 e 8 em sacos de diálise .....	101
Figura 5.31 – Ensaio de liberação <i>in vitro</i> das Formulações 2 e 11 em sacos de diálise .....	102

Figura 5.32 – Ensaio de liberação <i>in vitro</i> das Formulações 3 e 8 por dispersão direta em tampão PBS-conservantes.....	104
Figura 5.33 – Ensaio de liberação <i>in vitro</i> das Formulações 12, 13 e 14 por dispersão direta em tampão PBS-conservantes.....	104
Figura A1 – Espectros na região do infravermelho das Formulações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 11 .....	124
Figura A2 – Difractogramas das Formulações 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10 e 11 .....	127
Figura A3 – Fotomicrografias em aumentos de 1000X e 5000X (15kV) das microesferas de sílica branca correspondentes às Formulações 1, 4, 7 e 10..	131
Figura A4 – EDS das Formulações 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 e 14 .....	133

## LISTA DE TABELAS

Tabela III.1 - Potenciais do uso de microencapsulação na redução da dor e irritação em administrações injetáveis .....	19
Tabela III.2 - Expoente difusional e mecanismos de liberação de sistemas de liberação controlada intumescíveis e não intumescíveis de formas cilíndricas e esféricas.....	31
Tabela IV.1 - Matriz de experimentos do preparo de microesferas por <i>spray drying</i> .....	48
Tabela V.1 – Áreas obtidas por CLAE para construção da curva de calibração da cianocobalamina .....	59
Tabela V.2 – Teste de repetibilidade 1: solução padrão de cianocobalamina diluída em água ultra-pura.....	61
Tabela V.3 – Teste de repetibilidade 2: solução cianocobalamina padrão diluída a 5µg/mL em tampão PBS-conservantes .....	62
Tabela V.4 – Teste de precisão intermediária 1 .....	63
Tabela V.5 – Teste de precisão inter-dias 2 .....	64
Tabela V.6 – Teste de exatidão 1 .....	66
Tabela V.7 – Análise estatística do teste de exatidão 1 .....	66
Tabela V.8 – Teste de exatidão 2 .....	67
Tabela V.9 – Percentual de recuperação do teste de exatidão 2 por contaminação do placebo .....	67
Tabela V.10 – Teste de robustez 1 utilizando solução de cianocobalamina padrão diluída a 5µg/mL em água ultra-pura .....	68
Tabela V.11 – Teste de robustez 2 utilizando amostra de cianocobalamina padrão diluída a 5µg/mL em tampão PBS-conservantes.....	69
Tabela V.12 – Teste de robustez 3: modificação do diluente das preparações.....	70
Tabela V.13 – Teor de cianocobalamina na matéria-prima .....	71
Tabela V.14 – Teor da cianocobalamina na fase sol durante 24h .....	72
Tabela V.15 – Resultados de distribuição granulométrica e densidade real das formulações de microesferas.....	75

Tabela V.16 – Principais bandas do espectro no IV da cianocobalamina .....	78
Tabela V.17 – Principais bandas do espectro no IV da Formulação 1 (microesferas brancas).....	78
Tabela V.18 – Área superficial das microesferas de sílica .....	98
Tabela V.19 – Percentual de liberação de cianocobalamina a partir de sacos de diálise (n=3) durante ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	103

## LISTA DE NOTAÇÕES

$\alpha$  – Nível de significância

BET - Brunauer-Emmett-Teller

BSA – Albumina de soro bovino

$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$  - Cianocobalamina

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

C.V. - Coeficiente de variação

EDS – Espectroscopia por dispersão de elétrons

FI – Fator intrínseco

FT-IR – espectrometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier

$H_3O^+$  - Íon hidrônio

ICH - International Conference on Harmonization

IV - Infravermelho

JCPDS – The Joint Comitee on Powder Diffraction Standards

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MTES - Metiltrietoxissilano

PEGT/PBT – Poetilenoglicoltereftalato/polibutileno

PES - Polietoxissiloxano

PIE – Ponto isoelétrico

PTES - Propiltrietoxissilano

PTFE - Politetrafluoroetileno

$r$  - Coeficiente de correlação

$R_w$  - Razão molar de água/alcóxido

SEM - Microscopia eletrônica de varredura

TEOS – Tetraetilortossilicato

THEOS – Tetraquis(2-hidroxietil)ortossilicato

TMOS - Tetrametilortossilicato

TGA – Análise termogravimétrica

u.a. – Unidade arbitrária

TZA -  $(TiO_2/ZrO_2/Al_2O_3)$  – óxido de titânio; óxido de zircônio; óxido de alumínio

TZABC - ( $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{BaO}/\text{CaO}$ ) - óxido de titânio; óxido de zircônio; óxido de alumínio; óxido de bário; óxido de cálcio.

XRD – Difração de raios x

## RESUMO

Neste trabalho obteve-se microesferas de cianocobalamina por *spray drying* em matriz de sílica preparada por método sol-gel a fim de avaliar seu potencial como sistema de liberação controlada. O fármaco foi adicionado à fase sol posteriormente atomizada em um mini-secador Spray Dryer Büchi 190. Foram investigadas diferentes condições de síntese: pH, proporção água/tetraetilortossilicato, concentração de fármaco e influência do polietilenoglicol (híbrido sílica/polietilenoglicol). As microesferas foram caracterizadas por infravermelho (FT-IR), análise térmica (TGA, DSC), picnometria de hélio, distribuição granulométrica laser, microanálise (EDS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X, adsorção de nitrogênio (BET), cromatografia líquida de alta eficiência e perfil de liberação *in vitro*. A técnica de secagem por *spray drying* mostrou-se promissora para produção de micropartículas esféricas com estreita distribuição granulométrica. As microesferas de sílica apresentaram superfície lisa e, quando preparadas a partir de fase sol diluída ( $R_w=42$ ), observou-se estruturas ocas e aglomeradas. O perfil de liberação das amostras em saco de diálise apresentou efeito *burst* no sexto dia, seguido de um segundo período de liberação lenta. Quando o ensaio de liberação *in vitro* foi conduzido por dispersão direta das microesferas no meio líquido, a liberação mais importante da cianocobalamina ocorreu em 24h. Deste modo, verificou-se que o saco de diálise impõe uma modificação ao perfil de liberação do fármaco. A liberação de cianocobalamina das microesferas não foi afetada pelas diferentes proporções água/alcóxido utilizadas nas formulações. A liberação lenta da cianocobalamina foi associada à baixa porosidade e ao efeito inibidor do mecanismo de erosão das microesferas, resultante da provável saturação de sílica no meio de liberação.

Palavras-chaves: sol-gel; *spray drying*; microesferas de sílica; cianocobalamina.

## **SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* RELEASE RATE OF CYANOCOBALAMIN SOL-GEL PROCESSED SPRAY-DRIED SILICA MICROSPHERES**

### **ABSTRACT**

In this study, the release rate of cyanocobalamin from different sol-gel spray-dried silica microspheres formulations was investigated. The drug was incorporated into a sol phase of a silica precursor, tetraethyl orthosilicate (TEOS), before spray drying with a Büchi laboratory scale equipment. The effects of the sol phase pH, the drug loading, the water/alkoxide ratio of sol as well as polyethylene glycol ( $M_w$  6000) influence (hybrid microspheres) on the release behavior of drug and characteristics of microspheres were investigated. The microspheres were carefully characterized with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermal analyze (TGA, DSC), helium picnometry, laser diffractometry, microanalyses (EDS) and scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), high performance liquid chromatography (HPLC), nitrogen sorption measurements (BET) and in vitro release. Spray drying showed that it is a promising way to produce spherical silica gel particles with a narrow particle size range for controlled delivery of cyanocobalamin. Silica gel microspheres had a smooth surface. Microparticles prepared from diluted sol ( $R_w=42$ ) showed some structures aggregated, clustered and empty. The release from samples into dialyzes sacs showed a burst effect in the sixth day and, after that, a slow release period. Although, when the assay was performed without dialyze bag the most important release of drug occurred in 24h. It showed that dialyze sac had its own influence on the release rate of the system. The water/alkoxide ratios used under experimental conditions did not influence the cyanocobalamin release rate from the spray-dried silica microspheres. The slow release was associated with a very small BET surface area and the data obtained here also suggested that the possible rate-limiting step of release was the saturation of bulk solution with silica resulting in the inhibition of both erosion of matrix and diffusion of drug.

Keywords: sol-gel; spray drying; silica gel microspheres; cyanocobalamin.



## 1. INTRODUÇÃO

As perspectivas para melhoramento e novos materiais a partir de processo sol-gel aumentam à medida que novos conhecimentos são gerados com avanços na ciência de processamento sol-gel, desenvolvimento de estruturas e relação estrutura/propriedades.

Graças à versatilidade do processo sol-gel, a matriz de sílica gel tem sido utilizada para liberação controlada de diferentes tipos de ativos, sejam estes proteínas ou fármacos. Por ser um material biocompatível e biodegradável, possui grande potencial para administração parenteral (KORTESUO *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, *spray drying* se tornou um processo alternativo para preparação de partículas de sílica gel para obtenção de sistema de liberação controlada. Durante o processo, a sílica sol é forçada a uma rápida condensação sob aumento da temperatura. Isto é muito vantajoso em relação ao método de preparo de monolitos em que a polimerização espontânea ocorre ao longo de um período, embora partículas obtidas por *spray drying* resultem num material com núcleo significativamente menos poroso que os monolitos (AHOLA *et al.*, 2000). Em geral, a estrutura de monolitos sílica xerogel resulta em uma liberação mais rápida do ativo quando comparado com as micropartículas obtidas por *spray drying* (KORTESUO, 2001).

De forma geral, os processos utilizados para encapsulamento de fármacos e proteínas em matriz de sílica podem ser divididos em duas categorias: *in situ*, através da adição durante o preparo da fase sol e pós-impregnação, quando o ativo é encapsulado após a obtenção do gel. Elevado grau de impregnação e homogeneidade pode ser obtido através da pós-impregnação. Porém, em muitos casos a liberação é rápida devido à porosidade e difusão para o meio. O preparo *in situ* não exhibe porosidade e assume-se que a liberação pode ser baseada na erosão (CZURYSZKIEWICZ *et al.*, 2005).

Considerando a farmacologia e a posologia no tratamento de doenças decorrentes da carência de vitamina B12, esta é uma importante candidata para desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. A administração parenteral da vitamina B12 por via subcutânea ou intramuscular é muito importante no tratamento de doenças causadas pela deficiência da mesma, tal como a anemia perniciosa. A vitamina B12 é rapidamente e quantitativamente absorvida a partir da administração intramuscular e

subcutânea. O nível plasmático deste fármaco atinge a concentração máxima em uma hora a partir da administração intramuscular. Contudo, ocorre grande perda da dose administrada através da excreção urinária. Este fato, associado à necessidade de maior conforto, justificam o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada da vitamina (CHIEN, 1992). Ressalta-se que na área farmacêutica veterinária, a posologia torna-se ainda mais crítica devido às dificuldades e custo do manejo de grandes animais.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi de desenvolver um estudo de obtenção de microesferas de vitamina B12 por *spray drying* em matriz de sílica preparada por método sol-gel a partir de diferentes formulações, variando-se as condições de síntese.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Preparo, caracterização e avaliação do perfil de liberação *in vitro* de microesferas de cianocobalamina em matriz de sílica e híbrido sílica/polímero orgânico preparadas por método sol-gel utilizando *spray drying*.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtenção de microesferas de cianocobalamina em matriz de sílica e híbrido sílica/polietilenoglicol preparadas por método sol-gel utilizando *spray drying*;
- Estudo do efeito de parâmetros de síntese sol-gel (pH do sol; proporção água/tetraetilortossilicato; concentração de fármaco e adição de polietilenoglicol) nas características das microesferas;
- Caracterização físico-química das microesferas;
- Avaliação do perfil de liberação *in vitro*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. PROCESSO SOL-GEL

O processo sol-gel vem atraindo grande interesse desde meados da década de setenta devido a sua aplicação na síntese de materiais cerâmicos: pós ultrafinos, filmes finos e recobrimento, fibras, membranas inorgânicas microporosas, moldagem ou extrusão de diversas formas. Esse processo consiste na obtenção de uma matriz inorgânica pela conversão de precursores moleculares, por reação química, resultando na formação de um sol e sua transformação em um gel úmido, que após a retirada do líquido, forma o gel seco e poroso que pode ser sinterizado em um sólido denso e amorfo (LEV *et al.*, 1995; CHEETAHAM; MELLOTT, 1997).

Um sol é uma dispersão coloidal de um sólido em um meio líquido ou gasoso, ou seja, o sol é um fluido. Se as partículas sólidas formam pontes entre si gerando alguma resistência mecânica, o sistema passa a ser denominado gel (REMYNGTON, 2000). Sistemas coloidais são definidos como uma fase dispersa de partículas com dimensões entre 1nm e 100nm em um meio de dispersão (BUCKLEY; GREENBATT, 1994). No caso de partículas sol contendo entre  $10^3$  e  $10^9$  moléculas as interações são tipicamente de ordem molecular e não de nível coloidal. Este caso é característico do processo de hidrólise/condensação a partir de compostos alcóxido metálicos, chamados de organometálicos, que partem de uma solução que evolui formando uma suspensão coloidal (sol) e, em seguida, o gel (SEGAL, 1989; MAURITZ, 2001).

A força gravitacional nas partículas coloidais pode ser desprezada e a interação ocorre por forças de curto alcance, como as forças de Van de Waals e as elétricas devido às cargas na superfície das partículas (BRINKER; SCHERER, 1990). A formação de um gel pode ocorrer tanto pela redução da carga superficial das partículas suspensas, que perdem sua mobilidade através da agregação (gel particulado ou gel coloidal) quanto por polimerização de um precursor hidrolisado (gel polimérico) formando uma rede tridimensional rígida e porosa (DISLICH, 1985; HENCH; WEST, 1990). O ponto de gelação,  $t_{gel}$ , é definido como o ponto no qual a rede tridimensional formada é capaz de suportar tensões elásticas (BRINKER; SCHERER, 1990).

O gel pode ser descrito como sistema de duas fases, uma é o esqueleto sólido e outra é um líquido ou fase gasosa que preenche o sistema poroso. Se os poros estão preenchidos com líquido de base alcoólica o sistema é denominado alcogel e se o líquido é removido por secagem térmica, o gel seco é chamado xerogel. Quando o líquido é removido da estrutura do gel sob condições hipercríticas, a sua estrutura não colapsa e um aerogel de baixa densidade é produzido (HENCH; WEST,1990; LEV et al., 1995).

O processamento sol-gel de alcóxidos metálicos é resultante da susceptibilidade dos alcóxidos à hidrólise. A rota apresentada na Figura 3.1 parte de uma proporção de água/álcool/alcóxido que por hidrólise do alcóxido forma um gel como monolito rígido, fibras, pós ou filme (SEGAL, 1989). Particularmente, o tetraetilortossilicato (TEOS),  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , é um dos alcóxidos mais estudados (SEGAL, 1989; TOKI et al., 1988; HENCH; VASCONCELOS, 1990; BUCKLEY; GREENBLATT, 1994; LENZA, 2001, 2002). Também uma grande variedade de co-precusores, tais como metiltrimetoxissilano e feniltrietoxissilano, podem ser utilizados na preparação de matrizes de xerogéis a fim de alterar suas propriedades físicas (RAO; KALESH, 2004).

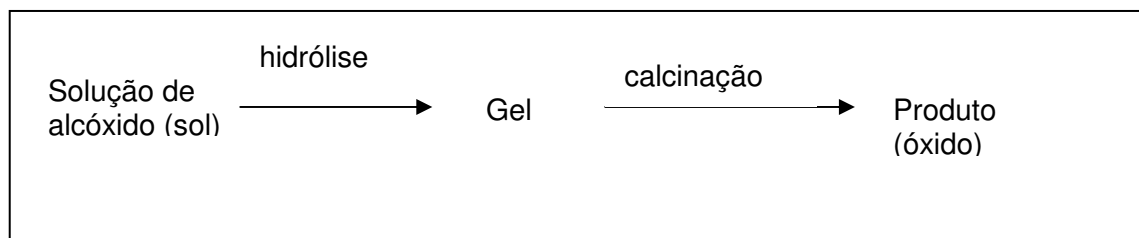


Figura 3.1 - Processamento sol-gel usando precursor alcóxido.

FONTE: SEGAL (1989)

O interesse pelo processo sol-gel nas últimas décadas é motivado por diversos fatores: baixa temperatura utilizada para processamento; manipulação da estrutura do material em escala extremamente fina, na ordem de nanômetros; elevado grau de homogeneidade do produto acabado devido às propriedades das matérias-primas; preparo do gel sob condições estequiométricas e com elevado grau de pureza; possibilidade de obtenção de materiais híbridos organo-inorgânicos através de grupos orgânicos permanentes na solução; possibilidade de sinterização de pó cerâmico

ativo; custo de materiais e processo é compatível com as aplicações (DISLICH, 1985; HENCH; VASCONCELOS, 1990; HENCH; WANG, 1990; AHOLA, 2001). Essas vantagens geraram aplicações em diversas áreas conforme ressaltou ULRICH (1990): óptica, biossíntese e materiais multifuncionais (Figura 3.2).

MACKENZIE (1982) enumerou as desvantagens do processo sol-gel, entre outras: grande contração do gel durante a secagem; longo tempo de processamento; existência de poros residuais; resíduos de grupos hidroxila e de carbono no material e toxicidade dos precursores.

Ressalta-se que uma das principais características do processo sol-gel é a grande variação na estrutura dos poros (tamanho, distribuição, área superficial, porosidade). Assim, variações da rede podem ser introduzidas pelo controle das reações de hidrólise-polimerização do alcóxido. O controle da estrutura dos poros é de grande interesse por ser crítica nas propriedades físicas do produto final e na determinação das condições de processamento (LENZA, 2002). HOANG; LEE (1997) avaliaram o tamanho de poros dos géis de sílica preparados a partir de reação de hidrólise de tetrametilortossilicato (TMOS) a pH 8,5, pH 10,2 e pH 11,2 e constataram um aumento do tamanho de poro com o aumento do pH.

### **3.1.1. Química do Processo**

Uma das vantagens da rota alcóxido é a possibilidade de controlar as taxas das reações por meios químicos e não através da química dos colóides ou de superfícies, além da grande solubilidade dos precursores numa série de solventes orgânicos (SCHMIDT, 1988).

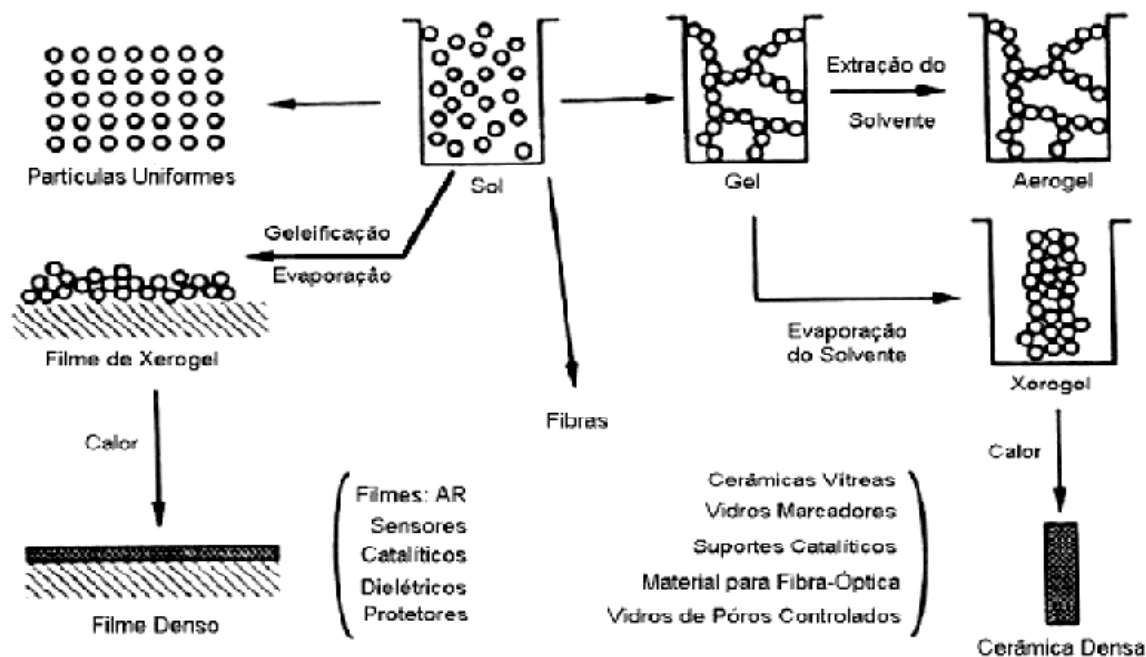


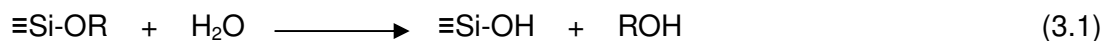
Figura 3.2 - Aplicações do processo sol-gel

FONTE: BRINKER; SHERER, (1990); MACETI (2003)

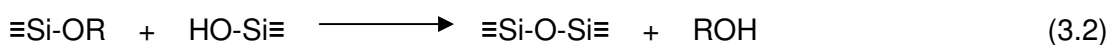
As propriedades físicas e químicas das sílicas xerogéis preparadas por hidrólise e condensação (Equações. 3.1, 3.2 e 3.3) do alcóxido de silício,  $(RO)_4Si$ , podem ser influenciadas pela natureza e concentração dos reagentes usados, temperatura, pH e razão molar água/alcóxido (HENCH; WEST, 1990; WEN; WILKES, 1996). As propriedades do gel dependem especialmente do tipo e concentração do catalisador usado. Estudos demonstraram que as modificações químicas e físicas na matriz alteram o perfil de liberação dos agentes ativos (NICOLL, 1997; AHOLA, 2001).

As seguintes reações ocorrem na produção de géis silicatos poliméricos tendo um precursor alcóxido:

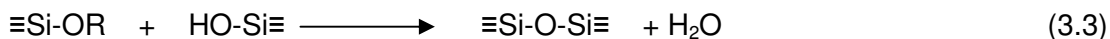
- Hidrólise:



- Condensação alcoólica:

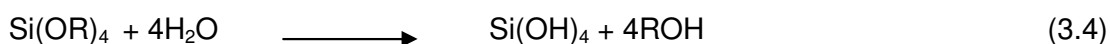


- Condensação aquosa:

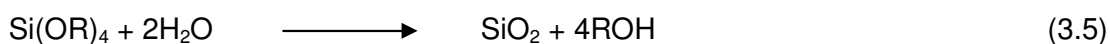


em que R é um grupo alquila.

Dependendo da quantidade de água e do catalisador, a hidrólise do tetraalcóxido pode ocorrer até se completar totalmente, ou seja, até que todos os grupos alcóxidos (OR) tenham sido substituídos por hidroxilas (OH).



A hidrólise também pode ser incompleta, gerando espécies parcialmente hidrolisadas do tipo  $\text{Si(OR)}_{4-n}(\text{OH})_n$ . Como a água é um produto de condensação subsequente, teoricamente uma pequena quantidade de água presente, razão molar  $R_w = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{Si}] = 2$ , seria suficiente para completar a hidrólise e produzir uma sílica anidra (BRINKER; SCHERER, 1990).



Porém, mesmo em condições de excesso de água ( $R_w > 4$ ), a hidrólise não ocorre totalmente devido aos efeitos de impedimento estérico e por causa das reações reversas de esterificação e alcólise que estariam restabelecendo novamente as ligações Si-OR dos alcóxidos (BRINKER; SCHERER, 1990).

Por sua vez, a reação de condensação envolvendo grupos silanol (Si-OH) produz ligações siloxanas (Si-O-Si) mais água ou álcool e pode iniciar antes da finalização da hidrólise (HENCH; WEST, 1990).



Uma vez que alcóxidos não são miscíveis com água e são sensíveis à mesma, um solvente miscível em ambos, tal como álcool, é usado como agente homogeneizador (HENCH; WANG, 1990; MAURITZ, 2001).

## **Hidrólise**

A reação de hidrólise é mais rápida e completa quando são utilizados catalisadores, tais como ácidos minerais, amônia, ácido acético, ácido fluorídrico, hidróxido de potássio entre outros. Um grande número de estudos tem focado os efeitos dos ácidos e bases e da concentração de água no controle das reações de hidrólise e condensação, no tempo de gelação e nas propriedades do produto final (GUN; TSIONSKY; LEV, 1994; BOGOMOLOVA; JACHKIN; KRASILNIKOVA, 1998; BOURGET *et al.*, 1998; AHOLA *et al.*, 2001).

A taxa e a extensão da hidrólise são afetadas principalmente pela natureza e concentração do catalisador ácido ou básico. Ácidos fracos requerem longo tempo de reação enquanto os ácidos fortes, que funcionam de maneira similar, tornam a reação mais rápida. A reação de hidrólise em sistemas ácidos é de primeira ordem em relação à concentração do ácido. A hidrólise em meio alcalino tem o mesmo comportamento em termos da concentração do catalisador (AELION *et al.*, 1950; AHOLA *et al.*, 2001).

Reações catalisadas por base e ácido ocorrem por substituição nucleofílica ( $SN_2$ ) e estão representadas nas Figuras 3.3 e 3.4. No mecanismo catalisado por ácido, uma rápida protonação do grupo alcóxido ligado ao silício torna-o mais susceptível ao ataque nucleofílico da água. A partir da estrutura de transição em que o silício está pentacoordenado, o álcool é o melhor grupo abandonador e é eliminado, resultando na inversão do tetraedro. Por outro lado, a hidrólise catalisada por base é lenta, uma vez que os oxigênios dos alcóxidos tendem a repelir o nucleófilo,  $OH^-$ . Contudo, a partir da hidrólise inicial, as reações subseqüentes se processam mais rapidamente com cada grupo alcóxido sendo mais rapidamente removido que o anterior. No mecanismo catalisado por base, a água se dissocia para formar a hidroxila que atua como nucleófilo atacando o átomo de silício (BUCKLEY; GREENBLATT, 1994; MAURITZ, 2001).

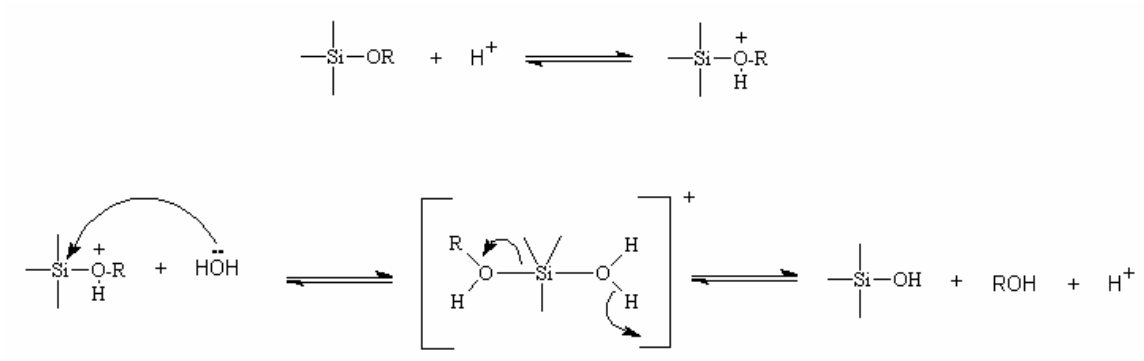


Figura 3.3 - Mecanismo de hidrólise catalisado por ácido

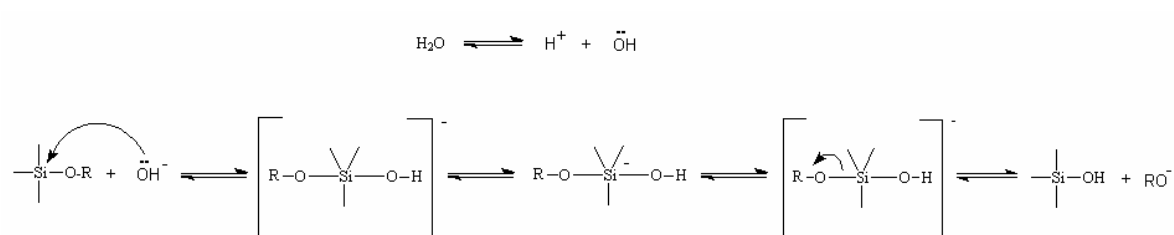


Figura 3.4 - Mecanismo de hidrólise catalisado por base.

O papel de doze diferentes catalisadores no processo sol-gel de sílica utilizando TEOS como precursor foi estudado por POPE; MACKENZIE (1986) que concluíram: diferentes catalisadores produziram significantes variações nas propriedades dos géis secos e sinterizados; o tempo e propriedades do gel não dependem somente do pH da solução, mas também do mecanismo catalítico; géis catalisados por ácido fluorídrico exibem rápida geleificação devido à substituição nucleofílica do íon  $\text{F}^-$ , ou seja, a maioria dos géis catalisados por HF é similar àqueles catalisados por bases, o que sugere que as funções  $\text{OH}^-$  e  $\text{F}^-$  são similares neste sentido.

## Condensação

ILER (1979) dividiu o processo de polimerização em três domínios de pH: pH<2, pH entre 2 e 7 e pH>7. Para tanto, foi considerado o ponto isoelétrico (PIE) da sílica que ocorre em pH na faixa de 2. O pH 7 é considerado limite porque as partículas de sílica são ionizáveis apreciavelmente acima do mesmo, maximizando a taxa de dissolução, de forma que o crescimento das partículas ocorre sem agregação ou geleificação.

O mecanismo mais aceito para condensação por catálise envolve o ataque silanol desprotonado e uma espécie neutra de silício.



Esta reação ocorre acima do ponto isoelétrico da sílica em que os grupos silanóis da superfície podem ser desprotonados, dependendo de sua acidez, que está em função dos substituintes ligados ao átomo de silício (BRINKER; SCHERER, 1990).

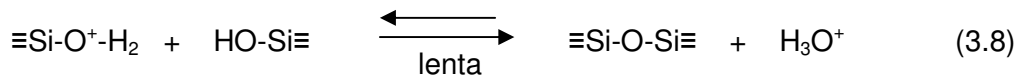
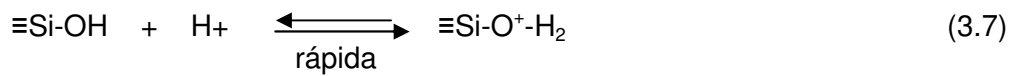
A taxa de condensação é máxima próxima a um pH neutro, onde a concentração de silanóis protonados e desprotonados é parecida. Esta taxa é mínima perto do ponto isoelétrico (BRINKER; SCHERER, 1990).

A condensação ocorre preferencialmente no centro dos oligômeros, que são mais ácidos, visto que a acidez do silício segue a seguinte ordem Si-OR < Si-OH < Si-O-Si e a concentração de espécies alcóxidos não hidrolisadas, é sempre maior nas extremidades. Portanto, sóis em condições alcalinas fracas e ácidas moderadas apresentam significativa extensão de grupos silanol (SiO<sup>-</sup>) desprotonado que resulta em aumento da taxa de condensação e formação de espécies de sílica altamente ramificadas e com partículas esféricas. Geleificação dessas espécies cruzadas resulta na formação de mesoporos com tamanho entre 2nm e 50nm (BRINKER; SCHERER, 1990; MEIXNER; DYER, 1999; FRANKEN, 2003).

Em pH abaixo do PIE o tempo de geleificação aumenta e resulta na formação de cadeias de sílica lineares e randomicamente cruzadas, de estrutura muito porosa, com diâmetro de poros < 2nm (MEIXNER; DYER, 1999).

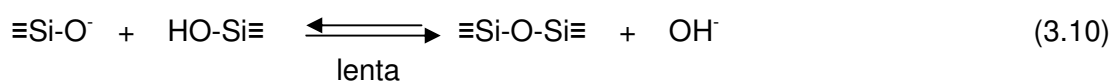
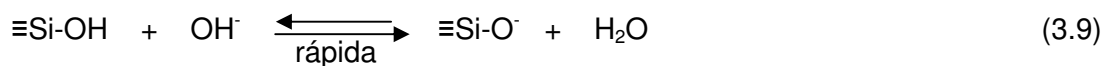
- Polimerização em pH menor que 2:

Em pH < 2 a dissolução das partículas é negligenciável e a geleificação é retardada pela carga positiva da superfície. A taxa de hidrólise e condensação é proporcional à concentração de H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> (ion hidrônio). Policondensação em pH fortemente ácido resulta em materiais densos e de baixa área superficial (LEV et al., 1995). A formação e agregação das partículas primárias ocorrem ao mesmo tempo dando origem a uma cadeia polimérica composta de partículas primárias muito pequenas.



- Polimerização na faixa de pH entre 2 e 7:

Acima do PIE, a taxa de condensação é proporcional à concentração de OH<sup>-</sup>. A condensação ocorre preferencialmente entre espécies mais condensadas, sugerindo que a taxa de dimerização é lenta (Equações 3.9 e 3.10). Contudo, uma vez que os dímeros são formados, eles reagem preferencialmente com monômeros para formar trímeros que também reagem com monômeros para formar tetrâmeros. A ciclização ocorre devido à proximidade das cadeias terminais e considerável diminuição da população de monômeros. Posteriormente, ocorre a adição de espécies de menor peso molecular a espécies mais condensadas e agregação das espécies condensadas para formarem cadeias e redes. Devido à baixa solubilidade da sílica nesta faixa de pH, o crescimento das partículas pára quando elas atingem 2 a 4nm (MAURITZ, 2001).



- Polimerização em pH maior que 7:

As mesmas equações descritas acima representam a polimerização em pH maior que 7. Nesta condição, as partículas de sílica estão carregadas negativamente e estas espécies ionizadas repelem-se mutuamente. Em pH ácido, o crescimento das partículas pára quando estas atingem o tamanho de 2 a 4nm, enquanto que, em pH maior que 7, o crescimento das partículas é dependente principalmente da temperatura e partículas com mais de 100nm podem ser formadas (partículas sol). Em condições ácidas, próximas ao PIE, as forças repulsivas entre partículas são pequenas e as partículas colidem e formam redes contínuas. Por outro lado, em pH alcalino, o crescimento ocorre principalmente através da adição de monômeros às partículas mais condensadas e está associado às suas solubilidades, que dependem dos seus raios de curvatura. O crescimento cessa quando a diferença de solubilidade entre as partículas maiores e menores se torna indistinguível. Este processo é conhecido como *Ostwald ripening* (ILER, 1979; BRINKER; SCHERER, 1990; MAURITZ, 2001).

Em resumo, um pH elevado acelera a hidrólise e condensação, aumenta a dissolução das partículas de sílica e resulta em espécies de baixo peso molecular. Estas condições também aumentam a desprotonação e a carga superficial e, desse modo, retarda a agregação e geleificação. Os monolitos estruturados são blocos densos e grandes que exibem grande fração de vazios, com diâmetro de poros e área superficial medianos (LEV *et al.*, 1995).

#### Razão Molar Água/ Alcóxido ( $R_w$ )

A razão molar de água/alcóxido ( $R_w$ ) é fator importante para controle da nanoestrutura do produto. Valores elevados de razão molar água/alcóxido levam a uma hidrólise mais completa dos monômeros antes da condensação. Diferentes extensões de hidrólise de monômeros podem afetar as taxas relativas das reações de condensação que produzem água e das que produzem álcool. O mecanismo de condensação que produz álcool é favorecido em condições subestequiométricas de água ( $R_w \ll 2$ ) e o mecanismo de condensação que produz água é favorecido quando  $R_w > 2$ . (BRINKER; SCHERER, 1990; BUCKLEY; GREENBLATT, 1994; MAURITZ, 2001).

Quando  $R_w$  é baixa, a condensação alcoólica é dominante e o tempo de geleificação é maior, resultando em um material mais microporoso. Géis preparados com alta concentração de água ( $R_w > 4$ ) mostram microestrutura mais grosseira que géis preparados a partir de menor concentração de água ( $R_w < 4$ ) (RO; CHUNG, 1991). Entretanto, quando  $R_w$  é maior que 10, a microestrutura não é muito afetada pela quantidade de água. Os géis preparados com baixa concentração de água têm mais ligantes alcóxidos que não reagiram que aqueles com alta concentração de água e, portanto, formam estruturas mais linear (KUSAKABE et al., 1999). Uma grande concentração de água conduz à formação de estruturas mais ramificadas e, conseqüentemente, mais porosas e com maior área superficial. Deste modo, fibras podem ser obtidas partir de baixas  $R_w$  e baixo pH (LEV et al., 1995).

Pode-se acrescentar que catálise ácida e baixa proporção de  $R_w$  resultam em sóis poliméricos pouco ramificados e géis que, após secagem, apresentam-se como xerogéis microporosos com textura muito fina; por outro lado, catálise básica e uma elevada proporção de  $R_w$  produzem partículas coloidais que formam xerogéis meso ou macroporosos compostos de partículas densas e não porosas. Condições intermediárias, tal como catálise ácido-base, resultam em estruturas e texturas intermediárias (BOURGET et al., 1998).

### 3.1.2. Descrição do Método Sol-Gel e Aplicações

Vários métodos são descritos para obtenção de produtos a partir do processo sol-gel, dentre os quais se pode citar:

- Geleificação de pós coloidais (HENCH; WEST, 1990; HENCH; VASCONCELOS, 1990);
- Hidrólise e policondensação de precursores alcóxidos, seguidas de secagem hipercrítica dos géis, resultando nos aerogéis (HENCH; WEST, 1990; MONER-GIRONA et al., 2003; RAO; KALESH, 2004);
- Hidrólise e policondensação de precursores alcóxidos, seguidas pela secagem em condições de pressão atmosférica, gerando os xerogéis (HENCH; WEST, 1990; JAIN, T. K., 1998);
- Ultrasonicação para preparo de partículas uniformes e monodispersas (RAO et al., 2005)

Técnicas de processamento foram introduzidas a fim de diminuir tempo de processo e obter estrutura e propriedades especiais como secagem por liofilização, gerando os criogéis (PHALIPPOU, 2000); polimerização e secagem por *spray drying* (SIZGEK; BERTLET; BRUNGS, 1998; KORTESUO *et al.*, 2002; VIITALA; JOKINEN; MAUNU, 2005; CZURYSZKIEWICZ *et al.*, 2005).

Sílica xerogéis são bons candidatos a sensores químicos, sistemas de liberação controlada, aplicações ópticas e eletrocromáticas. São aplicados em cromatografia, catálise e em estudos de separação de gases. Os aerogéis são materiais muito porosos usados em detectores de partículas e isoladores térmicos, coleta de material em pesquisa espacial e em muitos estudos de fluidos confinados, especialmente hélio ou mistura de hélio (GELB RESEARCH GROUP, 2003).

Xerogéis e aerogéis de sílica são preparados com titânio, vanádio e outros metais dopantes, ou preparados a partir de outros óxidos e são materiais promissores como suporte de catálise e em aplicações eletroquímicas e células solares. Filmes finos de xerogéis podem ser usados nas áreas de sensores, eletrônicos, óptica, lubrificação. Materiais moldados tiveram sua primeira produção, o chamado MCM-41, em 1992 demonstrando que estruturas com poros bem regulares poderiam ser obtidas em escalas muito mais amplas que aquelas presentes em zeólitos (GELB RESEARCH GROULP, 2003). Os recentes desenvolvimentos em moldagem e outras tecnologias em escala nanométricas e micrométricas sugerem um desenho racional de porosidade para diferentes aplicações (GELB RESEARCH GROUP, 2003; KOSSOVSKY *et al.*, 1994).

O uso de processo sol-gel para formar vidros a partir de precursores alcóxido é um método bastante atrativo para criação de materiais orgânico-inorgânico e bio-inorgânico. A sílica porosa funciona como hospedeira e a substância orgânica como convidada (GILLILAND; YOKOYAMA; YIP, 2005). Nas áreas farmacêutica, cosmética e alimentícia, partículas porosas estão sendo usadas para encapsulamento de nutracêuticos, flavorizantes e fragrâncias para aromatização de alimentos, materiais de embalagem ou fibras têxteis (VEITH; PRATSINIS, 2004). Preparações de matrizes de sílica para encapsulamento de proteínas e fármacos têm sido fortemente investigadas a mais de duas décadas não só pela biocompatibilidade deste material,

como também porque é possível utilizar parâmetros de síntese e processo compatíveis com moléculas orgânicas mais sensíveis (LI *et al.*, 2004; CZURYSKIEWICZ *et al.*, 2005 ; VIITALA; JOKINEN; MAUNU, 2005).

Partículas inorgânicas com dimensões que variam de nanômetros a micrometros têm sido empregadas com sucesso para revestimento de esferas, cristais e fibras utilizando método sol-gel. Na maioria dos casos, os revestimentos são aplicados para garantir as propriedades tanto do núcleo quanto de seu próprio revestimento. Desta forma, materiais orgânicos esféricos têm sido revestidos com várias camadas de material inorgânico resultando em partículas monodispersas com funcionalidade inorgânica na superfície (CARUSO; ANTONIETTI, 2001).

Em trabalho recente, RUPCICH *et al.* (2005) encapsulou, pela primeira vez, aptâmeros de DNA em matriz de sílica obtida por processo sol-gel. A matriz de sílica mostrou ser compatível e capaz de se transformar em barreira para entrada de enzimas (nucleases) que poderiam degradar a espécie encapsulada. Consequentemente abre possibilidade para desenvolvimento de tecnologias como instrumentos ou materiais utilizando aptâmeros, tais como colunas de afinidade, sensores de fibra óptica e “microarrays”.

## **3.2. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

### **3.2.1. Aplicação**

A tecnologia de sistemas de liberação de fármacos realizou um avanço quântico nas últimas três décadas a partir das formas farmacêuticas de liberação retardada na década de sessenta até aos sofisticados sistemas de auto-regulação da década de noventa (PARK; MRSNY, 2000). Fármacos podem ser liberados a uma taxa pré-determinada por um período definido. Em geral, a taxa de liberação depende do tipo de sistema e é independente das condições do ambiente. Esses sistemas podem liberar o fármaco por períodos que variam de dias a anos (LANGER, 1995). Tais avanços tecnológicos têm produzido muitas formas farmacêuticas clinicamente viáveis e promovido o rejuvenescimento de fármacos antigos (PARK; MRSNY, 2000).



O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada requer simultaneamente consideração de diversos fatores, tais como as propriedades dos fármacos, rota de administração, natureza do veículo de liberação, mecanismo de liberação, capacidade de direcionamento e biocompatibilidade (PARK; MRSNY, 2000).

Há diferentes objetivos em sistemas de liberação: - controle da duração da ação do fármaco e da concentração do fármaco no organismo; - direcionamento do fármaco a um local particular ou a células do organismo; - ultrapassar certas barreiras teciduais como a da pele, do pulmão e do intestino; - ultrapassar barreiras celulares possibilitando importantes aplicações como a terapia gênica (LANGER; PEPPAS, 2003).

De acordo com CHIEN (1994) e SENIOR; RADOMSKY (2000), as principais vantagens dos sistemas de liberação controlada podem ser resumidas da seguinte forma:

- Minimizar a toxicidade sistêmica e maximizar a eficiência pela administração direta na região onde a liberação sustentada é desejada;
- Reduzir a frequência da administração sem comprometer o sucesso do tratamento;
- Proteger o ativo da degradação que pode ocorrer no sítio de administração no organismo;
- Aumentar a confiança no tratamento, ou seja, maior adesão do paciente ao tratamento;
- Frequentemente, argumentos farmacoeconômicos podem ser feitos em favor do sistema de liberação;
- Possibilitar a obtenção de patente.

Por outro lado, SENIOR; RADOMSKY (2000) ressaltou as desvantagens:

- Usualmente não é possível interromper o tratamento após a administração;
- A maioria dos sistemas de liberação são vantajosos quando se empregam ativos potentes;
- É preciso estudar se novo efeito tóxico pode surgir devido à longa permanência do ativo no organismo;

- É preciso avaliar se é necessário o efeito inicial – “*burst effect*”, ou seja, liberação imediata de grande quantidade de ativo após administração, e qual seria o efeito caso ocorresse;
- É importante avaliar se permanece algum resíduo no local de administração;
- É requerido estudar se há algum efeito tóxico devido ao carreador ou ao sistema por si mesmo.

Produtos injetáveis têm algumas características muito especiais que diferem de outras formas farmacêuticas e tornam-se desafios para fabricação: segurança toxicológica, ou seja, a maioria dos excipientes não é suficientemente seguros para administração parenteral; esterilidade; isenção de pirogênio; isotonicidade; compatibilidade com outros componentes em preparações extemporâneas; mínima dor e irritação tecidual (AKERS, 1999).

Uma alternativa bastante difundida para se obter um sistema de liberação controlada injetável consiste na utilização de sistemas poliméricos para preparo de micro ou nanopartículas. Em geral, define-se partículas menores que 1µm como nanocápsulas e aquelas maiores que 1000µm como macrocápsulas. Microcápsulas correspondem a um diâmetro intermediário entre as nanocápsulas e as macrocápsulas. O material empregado para preparo do núcleo das cápsulas são polímeros orgânicos, em geral, mas lipídeos e graxas também podem ser utilizados (JAIN, R. *et al.*, 1998).

As microcápsulas apresentam uma variedade de estruturas. Algumas são esféricas e contínuas com algum tipo de recobrimento (estrutura do tipo reservatório) e outras podem ser irregulares e carregar partículas dispersas e são denominadas microesferas (MORRIS; CUFF, 1991; JAIN, R. *et al.*, 1998; BURGESS, 2005).

As principais vantagens do uso de micropartículas são: proteger o ativo contra degradação; redução do número de injeções; permitir o controle da liberação do ativo. Somada a estas vantagens, a encapsulação de fármacos em micropartículas potencialmente favorece a redução da dor e da irritação tecidual (Tabela III.1).

SOHIER *et al.* (2003) utilizou um copolímero de blocos de polietilenoglicol-tereftalato/polibutileno tereftalato (PEGT/PBT) para encapsular cianocobalamina por processo de dupla emulsão. As microesferas obtidas apresentaram morfologia regular,

de volume médio de 50 a 70µm, adequadas para administração parenteral. A adição de álcool polivinílico à emulsão água/óleo, aumentou de 56% para 80% a eficiência de encapsulamento. Também se verificou que a variação da composição do copolímero permitiu o ajuste da taxa liberação e da eficiência de encapsulamento.

NEW ZEALAND PASTORAL AGRICULTURE RESEARCH INSTITUTE (1999) desenvolveu uma composição para uso veterinário (ovinos e caprinos) contendo vitamina B12 encapsulada em matriz polimérica de poliésteres de ácido lático ou ácido glicólico ou ácido lático e glicólico e policaprolactona e seus copolímeros. A patente reivindica que a preparação obtida por suspensão em meio oleoso de microesferas de copolímero do ácido polilático e glicólico (95:5) contendo vitamina B12 encapsulada é capaz de liberar no mínimo 0,33µg/kg de peso vivo/dia durante período de até 360 dias.

Tabela III.1 – Potenciais de uso do microencapsulação na redução da dor e irritação em administrações injetáveis

Administração do fármaco livre	Vantagens da microencapsulação
Contato direto com o tecido	Contato direto é evitado devido a presença de micropartículas
Toda quantidade de fármaco está disponível imediatamente	Liberação lenta
Irritação devido ao solvente	Solvente é usualmente água
Irritação causada por degradação do produto no local de administração	Microencapsulação protege contra a degradação do fármaco
Injeções freqüentes	Redução do número de administrações

FONTE: FATTAL *et al.* (1999)

### **3.2.2. Utilização do Processo Sol-Gel para Obtenção de Sistemas de Liberação Controlada**

Sílica xerogel derivada de processo sol-gel tem sido estudada como carreadora de fármacos, peptídeos e proteínas. Os agentes ativos podem ser incorporados à sílica xerogel por adsorção à superfície do xerogel tratado com calor ou durante o processo de preparo (SIEMINSKA; ZERDA, 1996; NICOLL; RADIN; SANTOS, 1997; BÖTTCHER; SLOWIK; SÜB, 1998; FALAIZE; RADIN; DUCHEYNE, 1999; AHOLA *et al.*, 2000; AHOLA *et al.*, 2001; ROVERI *et al.*, 2005; WU, *et al.*, 2005).

Matrizes de sílica, de forma geral, apresentam características tais como elevada rigidez e boa resistência a abrasão; negligenciável intumescimento em soluções aquosas ou orgânicas; inércia química (baixa interação com analitos); biodegradabilidade; estabilidade fotoquímica e térmica (LEV *et al.*, 1995); não está sujeita a ataque microbiológico; não há intumescimento ou alteração da porosidade com modificação do pH (JAIN, T.K. *et al.*, 1998).

O perfil cinético de liberação da matriz pode ser controlado pela adição de polímeros hidrossolúveis ou por síntese, pela adição de alcóxido organomodificado (UNGER *et al.*, 1985; BÖTTCHER; SLOWIK; SÜB, 1998; AHOLA *et al.*, 2001). A velocidade de liberação do fármaco também pode ser controlada pelo grau de secagem ou pelo tamanho da partícula (NICOLL *et al.*, 1997; AHOLA *et al.*, 2001) e, não menos importante, pelo efeito dos poros (SANTOS; RADIN; DUCHEYNE, 1999). A superfície da sílica pode ser modificada pelo uso de agentes de acoplamento que aumentem a superfície de afinidade e a liberação de fármacos hidrofóbicos (OTSUKA; TOKUMITSU; MATSUDA, 2000).

O mecanismo de liberação a partir de uma matriz de sílica xerogel foi mais extensivamente estudado nos últimos anos. SIEMINSKA; ZERDA (1996) observaram que progesterona difundiu da matriz obedecendo à segunda equação de Fick e a taxa de liberação foi governada pelas taxas de dissolução e difusão. Por sua vez, a liberação de toremifeno foi também controlada por difusão e seguiu cinética de ordem zero a partir de monolitos (AHOLA *et al.*, 2000). Também a liberação de heparina de cilindros de sílica xerogel obedeceu à cinética de ordem zero (AHOLA *et al.*, 2001).

WU *et al.* (2005), por aplicação da lei de potências, sugeriu que mecanismo para liberação da lidocaína foi controlado por difusão.

A possibilidade do uso do método sol-gel na obtenção de sílica xerogel para sistemas de liberação de fármacos foi introduzida em 1983. Este material é biocompatível e não tóxico. A degradação da sílica xerogel ocorre através da hidrólise das ligações siloxano. A sílica difunde do implante no local de administração, entra na corrente sanguínea ou linfática e é excretada na urina ou é ativamente fagocitada por macrófagos (UNGER *et al.*, 1985; RADIN *et al.*, 2002; AHOLA *et al.*, 1999; KORTESUO *et al.*, 2000).

Ressalta-se que proteínas e peptídeos também podem ser processados pelo método sol-gel (SANTOS; RADIN; DUCHEYNE, 1999). AHOLA *et al.* (2001) incorporaram heparina em matriz de sílica durante a policondensação de TEOS. Observou-se que a heparina liberada manteve sua atividade biológica. O gel catalisado por ácido nítrico liberou heparina mais rapidamente que o gel catalisado com ácido acético e o gel seco teve uma taxa de liberação menor que o correspondente mais úmido.

VEITH; PRATSINIS (2004) produziram matriz de sílica com aromas de diferentes estruturas químicas adicionando o fármaco convidado antes da etapa final de geleificação para estudar os fatores mais importantes da imobilização das moléculas. Eles ressaltaram que a matriz em estado vítreo inibe a mobilidade molecular. Desta forma, carreadores amorfos exibem muito baixa permeação, e a quantidade de aroma liberado depende do poro e tamanho das partículas, do tamanho das microrregiões reservatórias (vazios que funcionam como bolsas) no interior das partículas e da espessura das paredes nestas áreas. A natureza dos grupos funcionais, o peso molecular, a polaridade e a volatilidade dos aromas são parâmetros que determinam o desempenho do sistema. Geralmente, a retenção de compostos de elevada massa molecular é favorecida.

Avaliando a liberação de corantes a partir de filmes de sílica, GILLILAND; YOKOYAMA; YIP (2005) verificaram que, apesar da interação entre cargas influenciar a mobilidade da molécula este não é o fator dominante. A solvatação do corante, imobilização física, ligações de hidrogênio e hidrofobicidade têm significativo papel na determinação da imobilização do convidado dentro da matriz de sílica.

A fim de estudar parâmetros de síntese e processo que afetam quimicamente a estrutura e a bioabsorção de micropartículas preparados sob condições compatíveis para aplicação a proteínas, VIITALA; JOKINEN; MAUNU (2005) encapsularam albumina de soro bovino (BSA) em micropartículas por *spray drying*. Foi demonstrado que, sob condições que favorecem a hidrólise e desfavorecem a condensação da sílica (menor proporção água/TEOS e pH mais ácido) resultaram em micropartículas com maior velocidade de dissolução.

É importante ressaltar, que subprodutos do processo sol-gel devem ser removidos quando se requer um produto de elevada pureza. A remoção por temperatura, em geral resulta no encolhimento da estrutura (WEN; WILKES, 1996). A presença de quantidades de orgânicos residuais (alcóxidos que reagiram parcialmente ou que não reagiram e álcoois) na estrutura potencialmente podem afetar a taxa de bioabsorção (VIITALA; JOKINEN; MAUNU, 2005).

## **Híbridos**

Materiais híbridos ou nanocompósitos consistem de uma fase chamada de matriz, a qual é contínua e avizinhada pela outra fase, freqüentemente, chamada de fase dispersa. As propriedades dos híbridos estão em função das propriedades das fases constituintes, de suas quantidades relativas, das características da interface e da geometria da fase dispersa, ou seja, a forma das partículas e o tamanho, distribuição e orientação na matriz (PEREIRA; VASCONCENLOS, OREFICE, 1999; ESTEVES *et al.*, 2004; NOHARA, 2004).

Materiais híbridos organo-inorgânico, podem ser divididos em duas classes, de acordo com a natureza da interface (SCHOTTNER, 2001):

- Classe I: predominam as interações físicas. Durante hidrólise e condensação do precursor inorgânico, a fase orgânica (moléculas, oligômeros ou polímeros) permanece dispersa no meio, sendo aprisionada nos vazios da rede inorgânica à medida que esta vai crescendo. As interações são do tipo Van der Waals e ligações de hidrogênio.

- Classe II: as duas fases ligadas mais fortemente entre si, por ligações do tipo covalente. Também neste caso o híbrido é obtido *in situ* e se a fase inorgânica é a sílica, a incorporação do componente orgânico à rede de sílica pode ser efetuada com utilização de organosilanos adequadamente funcionalizados.

Híbridos de polímeros orgânicos em matrizes inorgânicas foram aplicados em pesquisa na área de sensores, a fim de melhorar a flexibilidade e aumentar a resistência ao impacto (LEV *et al.*, 1995). RHEE; CHOI; KIM (2002) sintetizaram um híbrido de poli( $\epsilon$ -caprolactona)/sílica através do método sol-gel que resultou num material bioativo e degradável, potencial para reposição óssea. Nanopartículas de compósito de polidimetilsiloxano e sílica foram obtidas através da dissolução do polímero hidrofóbico em TEOS com ou sem tetrahidrofurano, seguido do processo de emulsificação em solução etanólica alcalina (SERTCHOOK.; ELIMELECH; AVNIR, 2005). SHCHIPUNOV; KARPENKO (2004) sintetizaram nanocompósitos de sílica a partir de vários polissacarídeos naturais, tais como quitosana e alginato, utilizando como precursor tetraquis(2-hidroxietil)ortossilicato (THEOS). WEN; WILKES (1996) listaram, a partir de revisão bibliográfica, muitos materiais híbridos utilizados no preparo de nanopartículas utilizando polímeros de interesse farmacêutico tais como, poli- $\epsilon$ -caprolactona, acetato de celulose, poliacrílicos e polivinilpirrolidona.

RICH *et al.* (2001) estudaram o desenvolvimento de um sistema polimérico biodegradável preparado com  $\epsilon$ -caprolactona/copolímeros DL-lático e sílica xerogel obtidos por processo sol-gel de TEOS. Foi observado que o período de liberação do citrato de toremifeno a partir de poli  $\epsilon$ -caprolactona/DL-lático pôde ser ajustado de 3 meses a um ano pela variação do peso inicial do copolímero, pela incorporação do ativo em sílica xerogel no sistema ou pela mudança da geometria do sistema. A incorporação do ativo em sílica xerogel permitiu a modulação da liberação do fármaco.

Outro estudo relevante foi feito com matriz de sílica modificada e verificou-se a possibilidade de controle da liberação de nifedipina . A taxa de liberação aumentou com a adição de polietilenoglicol ou sorbitol na fase sol, contudo mostrou-se inversamente proporcional ao tamanho de partícula e diminuiu com a modificação da matriz com metiltrietoxilano e polietilenoglicol (BÖTTCHER; SLOWIK; SÜB, 1998).

WU *et al.* (2005) prepararam híbridos de xerogel para liberação controlada de cloridrato de lidocaina utilizando diferentes tipos de precursores organosilanos, metiltrietoxissilano (MTES) e propiltrietoxissilano (PTES) e/ou pela adição de surfactante não-iônico (Igepal CO 720) dopante. Foi verificado que a adição de precursores organosilanos modificou a liberação do fármaco tornando-a decrescente na seguinte ordem de matriz xerogel: TEOS, MTES/TEOS e PTES/TEOS.

### ***Spray Drying***

A utilização de *spray dryer* para preparo de micropartículas com finalidade de obter sistemas de liberação controlada é bastante difundida pela sua reprodutibilidade, facilidade de escalonamento e baixo custo (RÉ, 1998, MAA *et al.*, 1998; HE; DAVIS; ILLUM, 1999; BARAS; BENOIT; GILLARD, 2000; CHIDAVAENZI; BUCKTON; KOOHA, 2001; CORRIGAN, D.O.; HEALY; CORRIGAN, O.I., 2002; MI *et al.*, 2002; MURILLO *et al.*, 2002; SHI; TAN, 2002; RÉ, 2002; REGE; GARMISE; BLOCK, 2003; WANG *et al.*, 2004). O princípio do *spray drying* consiste na atomização de uma solução, suspensão ou emulsão em pequeníssimas gotículas, seguida de evaporação quase instantânea do líquido e resultando num pó seco, de baixa umidade. A natureza do pó é função de diversas variáveis incluindo a concentração inicial de soluto, a distribuição do tamanho das gotículas e a taxa de remoção do solvente (REMINGTON, 2000). De acordo com a natureza da molécula a ser encapsulada e do polímero, microesferas ou microcápsulas podem ser obtidas. *Spray drying* permite processamento em uma única etapa, embora o processamento sob condições assépticas possa apresentar dificuldades tecnológicas (FATALL *et al.*, 1999).

Microesferas de titânio foram produzidas por *spray drying* dos sóis TZA ( $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ou TZABC ( $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{BaO}/\text{CaO}$ ), verificando-se que as propriedades do pó obtido foram dependentes das propriedades químicas do precursor. Mais propriamente, esferas ocas foram produzidas de sóis bem dispersos ao passo que sóis parcialmente agregados produziram esferas sólidas. Também se verificou que a taxa de secagem das gotículas influenciou a morfologia das partículas. Acima de um determinado tamanho de partícula, o aumento da taxa de secagem para sóis parcialmente agregados podem resultar em partículas ocas (SIZGEEK; BARTLETT, 1998).



KORTESUO *et al.* (2002) avaliaram o controle da taxa de liberação de dexmedetomidina a partir de diferentes formulações de sílica gel *spray-dried* usando TEOS como precursor. A técnica de secagem por *spray drying* mostrou-se rápida e simples para obtenção das micropartículas. A liberação do fármaco foi mais lenta para microesferas preparadas no pH 2,3 e 3 quando comparadas com microesferas obtidas no pH 1 e 5. Também se observou liberação muito mais lenta do fármaco em microesferas obtidas a partir de  $R_w$  28 e 35 em comparação com aquelas preparadas em diluições menores,  $R_w$  6 e 10. No ensaio de liberação *in vitro*, obteve-se liberação do tipo ordem zero para dexmedetomidina encapsulada a partir de fase sol com pH na faixa do PIE.

CZURYSZKIEWICZ *et al.* (2005) encapsularam etidronato em microesferas de sílica obtidas por *spray drying* e verificaram que a velocidade de liberação foi muito lenta, sendo que a maior parte do fármaco permaneceu no interior da matriz ao final do ensaio de liberação *in vitro* (39% do fármaco foram liberado após 58 dias).

### **3.2.3. Biocompatibilidade dos Vidros de Sílica**

Espera-se que os biomateriais não provoquem efeitos adversos, tais como efeitos tóxicos, carcinogênicos, imunogênicos e respostas inflamatórias. A biocompatibilidade é definida como efeito apropriado, seja local ou sistêmico, de um biomaterial num hospedeiro. A biocompatibilidade do biomaterial é freqüentemente descrita em termos de resposta inflamatória aguda ou crônica e como a formação de cápsula fibrosa vista em diversos tempos após a implantação do material. Os eventos seguidos após a implantação de um biomaterial são ferimento, inflamação aguda, inflamação crônica, granulação tecidual, fibrose e reação de corpo estranho. Neutrófilos predominam durante os primeiros dias e são substituídos por monócitos. A inflamação aguda termina em poucos dias dependendo da extensão do ferimento. Inflamação crônica é caracterizada pela presença de macrófagos, monócitos e linfócitos com a proliferação de vasos e tecidos conectivos. O estágio final da cura da resposta aos biomateriais é geralmente a encapsulação fibrosa e tem sido considerado como sinal da biocompatibilidade do material. Entretanto, a cápsula fibrosa em torno do implante pode afetar a liberação e absorção do ativo (KORTESUO, 2001; RATNER, 1996).

Silício foi reconhecido com um elemento traço essencial no corpo, participante do tecido conectivo, especialmente cartilagem e formação do tecido ósseo. Enquanto o dióxido de silício é conhecido como agente citotóxico em macrófagos e tecido de granulação, os vidros derivados de processo sol-gel, por outro lado, são biocompatíveis e também bioativos, isto é, eles formam ligação química com o tecido e promovem a formação óssea (KORTESUO, 2001).

Quando sílica xerogel é exposta a água inicia-se a degradação através de hidrólise das ligações siloxano formando  $\text{Si(OH)}_4$ , que se difunde no tecido local em torno do implante, atinge a corrente sanguínea ou linfática e é excretado na urina ou é ativamente fagocitado pelos macrófagos. Durante a reabsorção a concentração de Si permanece dentro da faixa fisiológica aceita e não foi observado acúmulo de sílica nos órgãos periféricos. Isto significa que a sílica é excretada em forma solúvel através dos rins sem produzir danos ao organismo (BRINKER; SCHERER, 1990; KORTESUO 2001; RADIN *et al.*, 2002).

#### **3.2.4. Mecanismo de liberação de fármacos a partir de polímeros biodegradáveis**

Em sistemas de liberação controlada, a liberação do fármaco geralmente ocorre através de um dos três mecanismos: difusão, reação química ou ativação e transporte por solvente. O primeiro, é o controle por difusão em que há dois tipos principais de geometrias de sistemas, uma é do tipo reservatório em que o fármaco é envolvido por uma barreira polimérica e a outra do tipo matriz onde o fármaco é distribuído uniformemente no polímero. Em sistema reservatório, a membrana pode ser porosa ou densa, mas em todos os casos a espessura é bem definida e as propriedades físico-químicas são bem conhecidas. Em quaisquer casos a difusão é passo limitante, salvo se o sistema biodegradável tem uma taxa de erosão significativa. No segundo mecanismo, por controle químico, o polímero pode ser degradado pela água ou através de reação química para liberar o fármaco. Alternativamente, o fármaco pode estar ligado ao polímero através de ligação covalente que pode ser clivada por enzima ou água. O último mecanismo é a ativação por solvente. O fármaco não é capaz de difundir-se através da matriz e a permeação do meio de dissolução através do polímero controla a liberação. O controle da liberação pode ocorrer de duas formas: sistema osmótico ou sistema controlado por intumescimento do polímero. Neste caso, o fármaco é colocado previamente dentro de um polímero em estado vítreo. Se a

penetração da água no polímero é mais rápida que a difusão do fármaco o sistema segue a lei de Fick. Se ocorrer simultaneamente difusão do fármaco e relaxação do polímero induzida pelo solvente, a difusão não segue a lei de Fick. Por sua vez, o sistema osmótico é construído colocando a matriz/fármaco dentro de uma membrana semi-permeável contendo um orifício. Por efeito osmótico a água entra no sistema direcionada pela força osmótica e subsequentemente dirige o fármaco para fora do sistema (RATHBONE; CARDINAL; OGLE, 2000; KORTESUO, 2001; LANGER; PEPPAS, 2003).

Muitos polímeros degradam através da erosão do volume (Figura 3.5). Embora este processo possa ser útil em alguns casos, o fenômeno potencialmente pode conduzir a intoxicação, que pode ser fatal se concentrações elevadas de fármaco tais como insulina e anti-câncer forem liberados rapidamente. Do ponto de vista da engenharia, seria mais desejável que a liberação ocorresse pela erosão da superfície. Este fato é comparável a maneira como uma barra de sabão dissolve (Figura 3.6). Desta forma, poder-se-ia minimizar o risco potencial de intoxicação e facilitar a engenharia dos sistemas de liberação (LANGER, 1995).

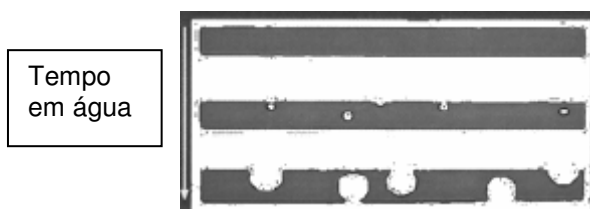


Figura 3.5 - Erosão do volume da matriz polimérica.

FONTE: LANGER; PEPPAS, 2003.

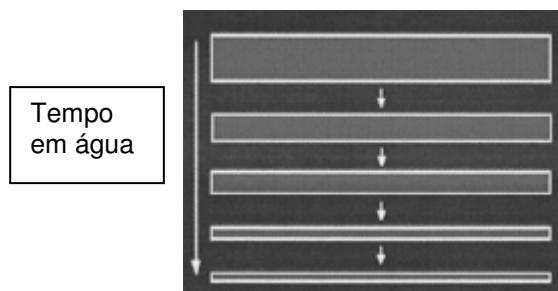


Figura 3.6 - Erosão da superfície da matriz polimérica

FONTE: LANGER; PEPPAS, 2003.

No caso da degradação do volume ou degradação homogênea, o polímero degrada homogeneamente em toda a matriz. Neste processo, ocorre a hidrólise do polímero ao longo do volume pela perda do peso molecular, seguida de perda de massa no segundo estágio. A taxa de biodegradação pode ser modificada pela mudança da composição do polímero, mas não pela alteração do tamanho ou forma (LANGER, 1995; LANGER; PEPPAS, 2003). Polímeros do ácido lático e copolímeros dos ácidos lático e glicólico apresentam este comportamento em condições aquosas (RATHBONE; CARDINAL; OGLE, 2000).

A liberação do fármaco da matriz pode ser governada pelas equações derivadas das equações de difusão se o fármaco difunde rapidamente do sistema antes que a matriz comece a degradar. Contudo, a degradação do volume resulta em dificuldade para controle da liberação porque a taxa de liberação modifica com a degradação do polímero. Quando o polímero começa a perder massa, a taxa de liberação acelera porque esta é determinada pela combinação da difusão e da erosão (LANGER, 1995; LANGER; PEPPAS, 2003).

Nos sistemas de erosão da superfície (erosão heterogênea) a perda de material da superfície bem como a taxa de erosão é dependente da área superficial e da geometria do sistema. O massa molar, em geral, não se modifica muito em função do tempo. Contudo a erosão da superfície significa que a mesma ocorre de forma mais rápida que a penetração da água no volume. Liberação de fármaco a partir do polímero por erosão da superfície resulta numa liberação constante se a área superficial da matriz e a concentração do fármaco são constantes durante o período de liberação. Conseqüentemente, uma geometria que não altere em função do tempo é requerida para obtenção de uma liberação de ordem zero (LANGER, 1995; LANGER; PEPPAS, 2003). Este comportamento ideal é encontrado em matrizes de polianidridos e poliortoésteres (RATHBONE; CARDINAL; OGLE, 2000).

Em realidade, uma erosão de matriz em que a perda de massa equivale a taxa de liberação é muito difícil de obter e frequentemente a difusão do fármaco é o fator limitante. Para fármacos bastante hidrossolúveis, a taxa de liberação é controlada principalmente por difusão através da matriz, enquanto que a erosão controla o processo de liberação de fármacos pouco solúveis. Deste modo, a taxa de liberação

pode ser a combinação do controle da erosão e controle da difusão (LANGER, 1995; LANGER; PEPPAS, 2003).

Higuchi desenvolveu diversos modelos teóricos para estudar a liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes sólidas e semi-sólidas (COSTA; LOBO, 2001). A equação de Higuchi (Equação 3.11) foi inicialmente empregada para sistemas planares, sendo depois modificada para considerar diferentes geometria dos sistemas matriciais.

$$f_t = Q = \sqrt{D(2C_o - C_s)C_s t} \quad (3.11)$$

em que Q é a quantidade de fármaco liberado no tempo t por unidade de área, D é o coeficiente de difusão da substância na matriz, C<sub>o</sub> é a concentração inicial da substância e C<sub>s</sub> é a solubilidade da substância na matriz.

É possível resumir o modelo de Higuchi conforme descrito na Equação 3.12, em que K<sub>H</sub> descreve a liberação do fármaco como um processo baseado na lei de Fick, linearmente proporcional à raiz quadrada do tempo (COSTA; LOBO, 2001; SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

$$f_t = K_H t^{1/2} \quad (3.12)$$

A aplicação do modelo de Higuchi segue alguns postulados: a) a concentração inicial da substância no sistema deve ser muito maior que a sua solubilidade no meio; b) a análise matemática é baseada em uma difusão unidimensional; c) a substância é considerada em estado molecularmente disperso, com partículas muito menores em diâmetro que a espessura do sistema; d) a dissolução do polímero carreador é negligenciável; e) a difusibilidade da substância é constante

Para simplificar a análise dos dados de sistemas poliméricos de variadas geometrias, uma expressão empírica exponencial foi desenvolvida para relacionar a liberação fracional do fármaco com o tempo de liberação (Equação 3.13). Este é o modelo de Korsmeyer-Peppas, também chamado lei da potência (COSTA; LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3.13)$$

Em que  $M_t/M_\infty$  é a liberação fracional do soluto ( $M_t$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$ ;  $M_\infty$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo infinito),  $t$  é o tempo de liberação,  $k$  é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas da forma farmacêutica e  $n$  é o expoente de liberação, característico do mecanismo de liberação (LANGER, 1995; COSTA; LOBO, 2001).

A lei de potência aplica-se até 60% da quantidade total do fármaco liberado. Prediz que a liberação fracional do fármaco é exponencialmente relacionada ao tempo de liberação e descreve adequadamente a liberação do fármaco a partir de esferas, barras, cilindros e discos de matrizes intumescíveis e não intumescíveis. A inclinação ( $n$ ) de um gráfico correlacionando log da concentração do fármaco liberado versus log do tempo é 0,5 para difusão que puramente segue a lei de Fick (Tabela III.2). Um padrão que não segue a lei de Fick ( $n=0,5-1$  ou  $n=0,45-0,89$ ) é observado quando a proporção de penetração do solvente e a liberação do fármaco estão num mesmo patamar. Este desvio é devido ao aumento da difusividade da matriz devido à relaxação do polímero pelo solvente. Liberação do tipo ordem zero ( $n=0,89$  ou  $n=1$ ) pode ser encontrada quando a difusão é mais rápida que a relaxação do polímero pelo solvente e intumescimento polimérico. Em caso de sistemas porosos, provavelmente o  $n < 0,5$ , uma vez que os mecanismos combinados (difusão através do polímero e poros) resultarão em um expoente de menor valor (PEPPAS, 1985; PEPPAS; RITGER, 1987; LANGER, 1995; KORTESUO, 2001).

Tabela III. 2- Expoente de liberação e mecanismos de liberação de sistemas de liberação controlada intumescíveis e não intumescíveis de formas cilíndricas e esféricas

Tipo de sistema	Expoente de liberação	Mecanismo de liberação do fármaco
Não intumescíveis	<0,5	Liberação a partir de material Poroso
	0,5	Difusão de acordo com Lei de Fick
	0,5-1.0	Transporte Anômalo (não Fick)
	1.0	Ordem zero
Intumescíveis	0,45	Difusão de acordo com Lei de Fick
	0,45-0,89	Transporte Anômalo (não Fick)
	0,89	Transporte Caso II
	>1	Transporte Caso II Especial

Fonte: KORTESUO (2001)

### 3.3. VITAMINA B12

#### 3.3.1. Importância da Vitamina B12

A vitamina B12 é importante na formação de glóbulos vermelhos, nervos e várias proteínas. É necessária para a síntese de nucleoproteínas e de mielina, reprodução celular e a manutenção da eritropoese normal. Estima-se que células caracterizadas por uma rápida divisão (células epiteliais, medula óssea, células mielóides) são aquelas que necessitam de uma maior quantidade de vitamina B12 (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002)

A vitamina B12 se encontra sob a forma de coenzimas ativas (principalmente como adenosilcobalamina e metilcobalamina) em vários alimentos de origem animal, particularmente fígado, rim, peixe e carne (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002).

As coenzimas B12, 5-desoxiadenosilcobalamina e metilcobalamina, participam, respectivamente, da conversão de metilmalonato a succinato e síntese de metionina a partir de homocisteína, uma reação que também requer folato. Em ausência da coenzima B12 o tetraidrofolato não pode ser regenerado da sua forma inativada, 5-metil tetraidrofolato e, conseqüentemente, ocorre uma deficiência funcional de folato. Vitamina B12 também pode estar associada a manutenção dos grupos sulfidrilas (-SH)

em sua forma reduzida que é requerida por muitos sistemas enzimáticos SH-ativados. Portanto, através destas reações, a vitamina B12 participa do metabolismo de gorduras e carboidratos e síntese de proteínas (GOODMAN *et al.*, 1987; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002; SANT'ANA, 2003).

### 3.3.2. Propriedades Físico-Químicas

A cianocobalamina e a hidroxocobalamina são formas sintéticas da vitamina B12. Esses fármacos possuem a estrutura molecular da cobalamina, mas diferem no grupo ligado ao átomo de cobalto (-CN na cianocobalamina e -OH na hidroxocobalamina) (GOODMAN *et al.*, 1987; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002). Os termos vitamina B12 e cianocobalamina (Figura 3.7) são usados de maneira intercambiável, como termos genéricos para todas as cobalaminas ativas no homem (GOODMAN *et al.*, 1987).

A cianocobalamina ( $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ ; 1355,36g/mol) é um pó cristalino, cristalino hidratado ou amorfo, vermelho escuro, inodoro e insípido. Em estado anidro é muito higroscópica. A quantidade de umidade pode chegar a 12% da massa do pó seco. É solúvel em até 1g em 80g de água e 1g em 180g de álcool; praticamente insolúvel em acetona, clorofórmio e éter. Incompatível com agentes oxidantes, agentes redutores e metais pesados. É estável em soluções aquosas neutras, mas é lentamente decomposta em soluções alcalinas e soluções fortemente ácidas. As soluções aquosas são neutras, estáveis em pH entre 3 a 7 e mais estáveis em pH entre 4,5 a 5,0. Nesta faixa de pH pode-se esterilizar soluções a 120°C por 20 minutos. A cianocobalamina e suas soluções devem ser estocadas em recipientes fechados e protegidas da luz (MARTINDALE, 1982; MONOGRAFÍAS FARMACÉUTICAS, 1999; THE MERCK INDEX, 2001; TRISSEL, 2005).



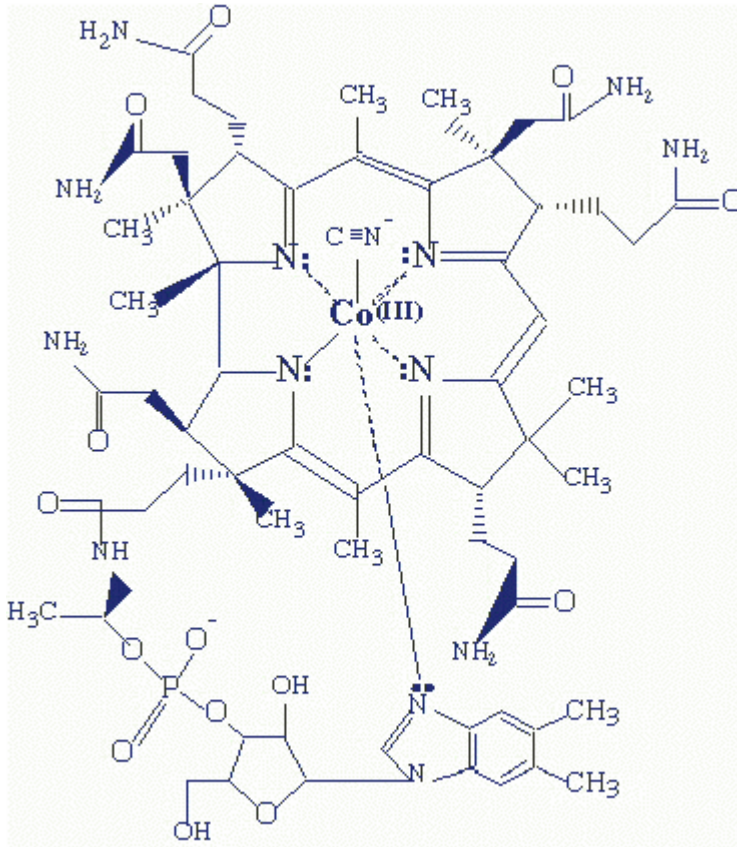


Figura 3.7- Estrutura química da vitamina B12

Fonte: STRUCTURE OF VITAMIN B12, 2004

### 3.3.3. Farmacocinética da Vitamina B12

#### Absorção

A absorção da vitamina B12 ao nível do íleo exige a presença do fator intrínseco (FI), que é uma glicoproteína encontrada no suco gástrico normal. Geralmente 1,5 a 3µg de vitamina B12 saturam o mecanismo de transporte pela glicoproteína. Valores adicionais de vitamina B12 podem ser absorvidos independentemente do sistema de transporte através da difusão passiva pela parede intestinal. A difusão passiva toma uma importância maior somente na presença de grandes quantidades de vitamina B12, maiores do que os valores habituais (GOODMAN *et al.*, 1987; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002; MARTINDALE 2002).

A vitamina B12 proveniente da dieta, na presença de enzimas digestivas e do ácido gástrico, é liberada das proteínas as quais está associada e logo se liga ao fator intrínseco. O complexo atinge o íleo, onde interage com um receptor específico nas células da mucosa ileal e é transportado para a circulação (GOODMAN *et al.*, 1987; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002; MARTINDALE 2002).

A absorção de vitamina B12 por via oral pode ser afetada por quaisquer danos estruturais ou funcionais do estômago ou íleo (GOODMAN *et al.*, 1987; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002; MARTINDALE 2002).

Como pode ser observado, a biodisponibilidade da vitamina B12 por via oral apresenta limitações e é variável (CHIEN, 1992).

### **Distribuição**

Ao se liberar do complexo vitamina B12-FI nas células da mucosa intestinal, a vitamina B12 passa para a circulação sistêmica e se liga rapidamente a proteínas plasmáticas, principalmente a uma proteína de transporte específica, a transcobalamina II. Quantidades menores são ligadas à proteína de armazenamento (transcobalamina I) e à transcobalamina III. Quantidades pequenas de vitamina B12 podem permanecer livres no plasma ou ligadas aleatoriamente. As concentrações plasmáticas de transcobalamina II diminuem depois da absorção da vitamina B12. Em estado de jejum, a maioria da vitamina B12 circulante está ligada à transcobalamina I. A vitamina B12 é distribuída para as células parenquimatosas hepáticas, principalmente, medula óssea, e outros tecidos, inclusive a placenta (GOODMAN *et al.*, 1987; MARTINDALE, 2002; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002).

### **Armazenamento**

Uma vez absorvida, a vitamina B12 liga-se transcobalamina II para o transporte aos tecidos. Esta é rapidamente eliminada do plasma e distribui-se para as células parenquimatosas hepáticas. O fígado é, portanto, um local de armazenagem para outros tecidos. A vitamina B12 é estocada como coenzima ativa, com a taxa de renovação de 0,05 a 0,2% por dia ou 0,5 a 8µg diários, dependendo do tamanho dos

estoques corporais. Em condições patológicas e nas alterações metabólicas, os depósitos de vitaminas são esgotados mais rapidamente (BOOTH; MCDONALD; JONES, 1983; GOODMAN *et al.*, 1987; BLOOD; RADOSTITS, 1989).

### **Eliminação**

Em indivíduos saudáveis, recebendo somente vitamina B12 proveniente da dieta, cerca de 3 a 8 µg da vitamina é secretada no trato gastrointestinal diariamente através da bile, principalmente, e cerca de 1 µg é novamente reabsorvido. Esse ciclo entero-hepático é importante, pois a interferência na reabsorção por doença intestinal pode resultar em contínua depleção dos estoques hepáticos da vitamina. Após filtração glomerular nos rins, a maior parte da vitamina B12 é reabsorvida, resultando na excreção diária de menos de 0,25 µg na urina. Quando a vitamina B12 é administrada em quantidades que ultrapassam a sua capacidade de ligação às proteínas plasmáticas ou armazenamento no fígado e outros tecidos, ela se encontra na sua forma livre e está disponível para ser excretada na urina (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002).

Após administração intra-muscular ou intra-venosa de 0,1 a 1 mg de cianocobalamina, 50 a 90% da dose podem ser excretadas na urina através da filtração glomerular dentro de 49 horas, sendo a maior parte excretada nas primeiras oito horas. No caso da hidroxocobalamina, 16 a 66% da dose de 0,5 a 1 mg por via intra-muscular podem ser excretadas na urina após 72 horas (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002).

#### **3.3.4. Deficiência de Vitamina B12**

A deficiência de vitamina B12 pode ser decorrente da dieta inadequada e mais comumente devido a síndrome de mal absorção ou desordem metabólica que está associada a atrofia ou cirúrgica gástrica, extensivo ressecamento ou dano a mucosa íleal e exagerado crescimento de bactérias ou parasitas intestinais. A deficiência resulta na anemia megaloblástica, desmielinização e outros danos neurológicos. A anemia perniciosa ou anemia Addison-Biermer, por sua vez, é uma doença séria, conseqüente a ausência da secreção do fator intrínseco no estômago (BOOTH; MCDONALD; JONES, 1983; GOODMAN *et al.*, 1987; BLOOD; RADOSTITS, 1989;

MARTINDALE, 2002). Calcula-se que aproximadamente 15% das pessoas com idade acima de sessenta anos nos Estados Unidos apresentem deficiência de vitamina B12 não diagnosticada (ANDRÈS *et al*, 2005).

### **3.3.5. Vias de Administração e Tratamento**

De acordo com AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS (2002):

- A cianocobalamina é administrada normalmente por via intramuscular ou através de injeção subcutânea profunda;
- A via intravenosa deve ser evitada devido a rápida excreção dos fármacos;
- A hidroxocobalamina é administrada somente por via intramuscular;
- A cianocobalamina e a cobalamina podem ser administradas oralmente;
- A terapia por via oral é menos eficaz que a realizada por via parenteral e deve ser utilizada somente em casos de deficiência alimentar da vitamina B12 em pacientes com absorção normal pelo trato gastrointestinal e sem necessidade de concomitante administração de fator intrínseco.

A vitamina B12 é utilizada no tratamento da anemia perniciosa e outras enfermidades decorrentes da deficiência em vitamina B12. A administração de vitamina B12 por via parenteral reverte completamente a anemia megaloblástica e os sintomas gastrintestinais. O nível de melhora dos sintomas neurológicos depende da duração e da natureza das lesões causadas previamente. Mas pelo menos a progressão dessas lesões é imediatamente cessada (BOOTH; MCDONALD; JONES, 1983; BLOOD; RADOSTITS, 1989).

A cianocobalamina é geralmente considerada a preparação de escolha para o suprimento em vitamina B12. Entretanto, a hidroxocobalamina pode ser utilizada no início do tratamento (BOOTH; MCDONALD; JONES, 1983; GOODMAN *et al.*, 1987; BLOOD; RADOSTITS, 1989; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002).

O tratamento da deficiência em vitamina B12 em adultos usualmente é feito pela administração de 30µg por via intramuscular ou subcutânea de cianocobalamina ou hidroxocobalamina por 5 a 10 dias. A dose de manutenção após recuperação dos

níveis normais de componentes sanguíneos e melhora clínica do paciente é de 100-200µg por via intramuscular (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002). Uma alternativa para tratamento da anemia perniciosa, é a administração por via intramuscular de 100µg de cianocobalamina por 7 dias consecutivos, seguidos de 7 doses em dias alternados e, finalmente, a cada 3 a 4 dias por 2 a 3 semanas. A dose de manutenção varia entre 100 a 200µg por mês (MARTINDALE, 2002). A partir de recente pesquisa feita por ANDRÈS *et al.* (2005), no Hospital de Strasbourg (França), foi sugerido que para pacientes com anemia perniciosa o tratamento pode ser feito por via oral com doses de cianocobalamina de 1000µg/dia. Esta alternativa é importante principalmente para paciente com contra-indicação para injeções intramusculares (concomitante terapia anticoagulante).

### **3.3.6. Interações com Outros Fármacos**

A absorção de vitamina B12 no trato gastrointestinal pode ser prejudicada com a administração de antibióticos aminoglicosídicos, colchicina, preparações liberadoras de potássio, ácido aminosalicílico e seus sais, anticonvulsivantes (exemplos : fenobarbital, primidona, fenitoína) (MARTINDALE, 2002; AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002).

### **3.3.7. Efeitos Adversos e Precauções**

A vitamina B12 é considerada como atóxica mesmo em doses elevadas. No entanto, foram relatados alguns casos de diarreia, trombose vascular periférica e anafilaxia. Edema pulmonar e falha cardíaca congestiva também foram relatados durante tratamentos com vitamina B12, eventualmente devido a um aumento no volume sanguíneo induzido pelo fármaco (AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS, 2002).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DA CIANOCOBALAMINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A quantificação da cianocobalamina na matéria-prima e nas amostras provenientes do ensaio de liberação *in vitro* foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com base no método descrito na monografia da Farmacopéia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2005) para vitamina B12 injetável. O padrão primário de vitamina B12 (padrão primário USP, 1mg equivale 10,7µg de cianocobalamina) foi utilizado para padronização das metodologias.

Salvo quando descrito no procedimento, o equipamento utilizado para análises foi Shimadzu HPLC System (Japão), incluindo uma bomba quaternária (LC-10 AT VP), auto-injetor (SIL-10AS), detector UV-VIS (SPD-10A VP). As áreas dos picos foram integradas utilizando software Class – VP 6.13SP2.

Para demonstrar que os métodos atendem as exigências analíticas, assegurando a confiabilidade nos resultados, o método foi avaliado quanto à linearidade da curva de calibração, precisão, exatidão e robustez (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 1996; AGÊNCIA NACIONAL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; USP, 2005).

Os valores de desvio padrão e do coeficiente de variação (CV%) foram obtidos pela aplicação das equações indicadas a seguir (Equações 4.1 e 4.2):

$$s = \sqrt{S^2} = \frac{\sum(X - X_m)^2}{N-1} \quad (4.1)$$

$$C.V.(%) = 100 \times \frac{s}{X_m} \quad (4.2)$$

Sendo:

N = número de amostras

X = área do pico

S<sup>2</sup> = variância

s = desvio padrão

X<sub>m</sub> = média das áreas dos picos

C.V.(%) = coeficiente de variação

## **Preparo da solução padrão estoque e solução padrão diluída**

A solução estoque de cianocobalamina padrão foi preparada na concentração de 500µg/mL, utilizando água ultra-pura como diluente. Esta solução foi diluída com água ultra-pura para obtenção das soluções padrão de cianocobalamina diluída: 1µg/mL, 2µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL e 150µg/mL.

Devido à fotossensibilidade da cianocobalamina, durante as determinações analíticas foram utilizados balões volumétricos âmbar.

Para todas as análises cromatográficas, uma alíquota de cerca de 0,5mL da solução a ser analisada foi filtrada através de filtro Millex™ (fluoropore) de porosidade de 0,45µm antes de serem transferidas para os *vials* para injeção automática.

## **Condições cromatográficas**

Parâmetros cromatográficos da análise de cianocobalamina por CLAE:

- Coluna cromatográfica: Phenomenex C18 Luna (5µm), medindo 250 x 4,60 mm;
- Fluxo: 0,5mL/min;
- Temperatura: 25°C ± 1°C;
- Volume de injeção: 20µL;
- Detecção: 361nm;
- Fase Móvel: a fase móvel foi preparada com mistura água e metanol (J.T. Baker, EUA) (65:35 V/V), filtrada através de dispositivo contendo membrana em politetrafluoroetileno (PTFE) 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade e degaseificada com gás hélio por 15min.

### **4.1.1. Parâmetros Avaliados na Padronização das Metodologias Analíticas**

Devido às diferenças intrínsecas das amostras para análise, os testes de seletividade, precisão, exatidão e robustez foram realizados utilizando como diluente a água ultra-pura (considerando a análise da matéria-prima) ou a solução tampão fosfato salino (PBS) com conservantes pH=7,4 (considerando o meio de liberação *in vitro*).

Os valores de área obtidos pela integração da área dos picos cromatográficos serão representados em unidades arbitrárias (u.a.).

#### **4.1.1.1. Seletividade**

A avaliação da seletividade foi realizada por comparação do perfil cromatográfico da solução de cianocobalamina padrão diluída 50µg/mL, solução de cianocobalamina matéria-prima diluída 50µg/mL, cianocobalamina padrão diluída em tampão PBS-conservantes 6µg/mL e placebo (tampão PBS-conservantes).

#### **4.1.1.2. Linearidade**

A curva de calibração foi construída a partir da solução estoque do padrão (500µg/mL), diluindo-se em água ultra-pura a fim de obter concentrações de cianocobalamina de 1µg/mL, 2µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL e 150µg/mL.

A curva foi construída, relacionando-se a área média dos picos de cinco injeções e a concentração teórica em cada nível. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados. Para cada concentração foi calculado a média das leituras, o desvio padrão e o coeficiente de variação (C.V.).

A relação linear foi avaliada aplicando-se teste “t” de Student, utilizando-se software SSPS 14.0.

#### **4.1.1.3. Precisão**

##### **Repetibilidade (precisão intra-corrída)**

O teste de repetibilidade foi realizado sob duas condições:

a) Teste de repetibilidade 1

A repetibilidade do método foi testada através de 15 determinações, dentro do intervalo linear do método, ou seja, 5 injeções de cada uma das soluções de



cianocobalamina padrão diluída 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL, utilizando água ultra-pura como diluente. As áreas correspondentes aos picos foram tratadas estatisticamente para obtenção do desvio padrão, C.V. e limites de confiança ( $\alpha=0,05$ ).

#### b) Teste de repetibilidade 2

A precisão do método foi testada através de 6 (seis) determinações consecutivas da amostra de concentração de 5µg/mL cianocobalamina padrão diluída em tampão PBS-conservantes. A partir das áreas dos picos calculou-se o desvio padrão, C.V. e limites de confiança ( $\alpha=0,05$ ).

### **Precisão intermediária (precisão inter-corrida)**

Foram estabelecidos os seguintes procedimentos para teste de precisão intermediária:

#### a) Teste de precisão intermediária 1

A precisão intermediária foi realizada em dias diferentes com equipamentos diferentes. As soluções de cianocobalamina padrão diluída com concentrações de 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL diluídas em água ultra-pura foram injetadas no primeiro dia no equipamento Shimadzu HPLC System (Japão), incluindo uma bomba quaternária (LC-10 AT VP), auto-injetor (SIL-10AS), detector UV-VIS (SPD-10A VP), forno (CTO-10AS VP) e software para integração dos picos CLASS VP 6.13SP2. No segundo dia, novas preparações de iguais concentrações de cianocobalamina padrão foram injetadas no equipamento Shimadzu HPLC System (Japão), incluindo uma bomba quaternária (LC-10AD VP), auto-injetor (SIL-10AD VP), detector DAD (SPD-M10A VP), forno (CTO-10AS VP) e software para integração dos picos CLASS VP versão 5.42. As áreas obtidas a partir de cinco injeções, em cada um dos equipamentos, foram tratadas estatisticamente para cálculo do desvio padrão e do C.V..

#### b) Teste de precisão intermediária 2

A precisão intermediária foi realizada em dois dias diferentes com analistas diferentes, utilizando cianocobalamina padrão diluída em tampão PBS-conservantes (5µg/mL). As áreas obtidas a partir de seis injeções consecutivas a cada dia foram tratadas

estatisticamente para cálculo do desvio padrão e do C.V. e comparadas aplicando-se teste “t” de Student ( $\alpha=0,05$ ), utilizando-se software SSPS 14.0.

#### **4.1.1.4. Exatidão**

##### a) Teste de exatidão 1

O teste de exatidão foi realizado pela adição de quantidade conhecida de padrão a uma solução de cianocobalamina matéria-prima utilizando água ultra-pura como diluente.

Pesou-se exatamente cerca de 50mg cianocobalamina matéria-prima e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100mL, completou-se o volume e homogeneizou-se. Em seguida, diluiu-se 10 vezes a fim de obter solução contendo 50 $\mu$ g/mL de cianocobalamina matéria-prima.

Para testar a recuperação do padrão, transferiu-se, quantitativamente, 1,0mL da solução de cianocobalamina matéria-prima (50 $\mu$ g/mL) para balões de 10mL. Em seguida, procedeu-se conforme descrito abaixo:

- a) Adicionou-se 5,0 mL da solução de cianocobalamina padrão diluída (50 $\mu$ g/mL), completou-se o volume com água ultra-pura e homogeneizou-se.
- b) Adicionou-se 1,0 mL da solução de cianocobalamina padrão estoque (500 $\mu$ g/mL), completou-se o volume com água ultra-pura e homogeneizou-se.
- c) Adicionou-se 2,0 mL da solução de cianocobalamina padrão estoque (500 $\mu$ g/mL), completou-se o volume com água ultra-pura e homogeneizou-se.

Cada solução foi injetada em triplicata.

Utilizando a equação da reta do teste de linearidade, determinou-se a recuperação da cianocobalamina a partir dos valores das médias obtidos.

A diferença entre o valor recuperado e o valor teórico foi comparada aplicando-se teste “t” de Student ( $\alpha=0,05$ ), utilizando-se software SSPS 14.0.

#### b) Teste de exatidão 2

Este teste de exatidão foi realizado por contaminação do placebo com quantidade conhecida de cianocobalamina padrão.

Para testar a recuperação do padrão, transferiu-se, quantitativamente, 50mg de microesferas branca (Formulação 1) para balões volumétricos de 10mL com auxílio de água ultra-pura. Em seguida, procedeu-se conforme descrito abaixo:

- Adicionou-se 1,0mL da solução de cianocobalamina padrão diluída 50 $\mu$ g/mL, completou-se o volume com tampão PBS-conservantes e homogeneizou-se.
  
- Adicionou-se 2,0mL da solução de cianocobalamina padrão diluída 50 $\mu$ g/mL, completou-se o volume com tampão PBS-conservantes e homogeneizou-se.
  
- Adicionou-se 3,0mL da solução de cianocobalamina padrão diluída 50 $\mu$ g/mL, completou-se o volume com PBS-conservantes e homogeneizou-se.
  
- Adicionou-se 5,0mL da solução de cianocobalamina padrão diluída 50 $\mu$ g/mL, completou-se o volume com PBS-conservantes e homogeneizou-se.

Cada solução foi injetada em triplicata.

Calculou-se a recuperação de cada preparação por comparação proporcional da área média de cada amostra com a área da solução padrão diluída de 5 $\mu$ g/mL.

A diferença entre o valor recuperado e o valor teórico foi comparada aplicando-se teste “t” de Student ( $\alpha=0,05$ ), utilizando-se software SSPS 14.0.

#### 4.1.1.5. Robustez

##### a) Teste de robustez 1

O teste de robustez foi realizado pela variação da temperatura da coluna cromatográfica em  $\pm 2^\circ\text{C}$ . A amostra da solução padrão de cianocobalamina diluída em água ultra-pura na concentração de  $5\mu\text{g/mL}$  foi injetada três vezes a temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , depois a  $23^\circ\text{C}$  e, novamente, três vezes, a  $27^\circ\text{C}$ . As médias das áreas dos picos obtidas a  $23^\circ\text{C}$  e a  $27^\circ\text{C}$  foram comparadas com a média das áreas dos picos obtida pelas injeções da mesma solução a  $25^\circ\text{C}$  através da análise de variância e teste Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

##### b) Teste de robustez 2

Para testar a robustez do método, variou-se a temperatura da coluna cromatográfica em  $\pm 2^\circ\text{C}$ . A amostra da solução padrão de cianocobalamina diluída em tampão PBS-conservantes na concentração de  $5\mu\text{g/mL}$  foi injetada três vezes a temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , depois a  $23^\circ\text{C}$  e, novamente, três vezes, a  $27^\circ\text{C}$ . As médias das áreas dos picos obtidas a  $23^\circ\text{C}$  e a  $27^\circ\text{C}$  foram comparadas com a média das áreas dos picos obtida pelas injeções da mesma solução a  $25^\circ\text{C}$  através da análise de variância ( $\alpha=0,05$ ).

##### c) Teste de robustez 3

Para testar a robustez do método, variou-se o diluente da solução padrão. Utilizou-se água ultra-pura ou tampão PBS-conservantes como diluentes a fim de obter soluções de cianocobalamina padrão na concentração final de  $5\mu\text{g/mL}$ . Cada solução foi injetada três vezes sob condições normais de operação do método. A média da área dos picos da solução padrão diluída foi comparada com a média das injeções da solução de cianocobalamina padrão diluída em tampão PBS-conservantes através do teste "t" de Student ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4.2. PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA

Foram pesados, exatamente, cerca de 50mg de cianocobalamina matéria-prima e transferidos, quantitativamente, para balão volumétrico âmbar de 100mL ( $500\mu\text{g/mL}$ )

com o auxílio de água ultra-pura. Após completar o volume com água ultra-pura, homogeneizou-se e a solução foi mantida em banho de ultra-som por 10 min. Em seguida, diluiu-se 10 vezes a fim de obter solução contendo 50µg/mL de cianocobalamina matéria-prima. Finalmente, uma alíquota da solução foi filtrada através de Millex™, coletada em *vial* e analisada por CLAE. A amostra foi injetada 3 vezes e a média das áreas dos picos foi comparada com a média das áreas dos picos da solução padrão diluída 50µg/mL (n=3).

O preparo da solução de cianocobalamina padrão diluída de 50µg/mL e as condições cromatográficas para análise foram descritas no item 4.1.

O cálculo do teor da matéria-prima foi realizado aplicando-se a equação abaixo:

$$Ca = \frac{Aa \times Cr}{Apa} \quad (4.3)$$

em que:

Ca = concentração de cianocobalamina na matéria-prima

Aa = área média da amostra

Apa = área média do padrão

Cr = concentração real da solução padrão

#### **4.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA CIANOCOBALAMINA EM FASE SOL**

A fim de avaliar a estabilidade da cianocobalamina em sol pH=1 e pH=2,3, adicionou-se 1,34g de cianocobalamina a cada uma das preparações abaixo:

- Preparação A (pH=1): sob agitação, em um béquer, adicionou-se 22,6mL de água ultra-pura, 22,1mL de TEOS e 2,4mL de solução 1M de HCl P.A. (Vetec, Brasil). Após a solubilização do TEOS (98%, Aldrich), adicionou-se a cianocobalamina. A preparação foi mantida durante 24h à temperatura ambiente (25°C ± 2°C) e amostras foram coletadas 2h, 4h, 6h e 24h para quantificação da cianocobalamina por CLAE.

- Preparação B (pH=2,3): sob agitação, em um béquer, adicionou-se 24,2mL de água ultra-pura, 22,1mL de TEOS e 0,8mL de solução de HCl 0,1M. Após a solubilização do

TEOS, adicionou-se a cianocobalamina. A preparação foi mantida durante 24h a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e amostras foram coletadas 2h, 4h, 6h e 24h para quantificação da cianocobalamina por CLAE.

Em paralelo, para teste de seletividade, foram preparados placebos das preparações A e B.

### **Procedimento**

Cada 1,0mL das amostras das preparações A e B foi coletado a cada tempo e diluído 1000 vezes utilizando água ultra-pura. Em seguida, a solução diluída foi filtrada através de filtro Millex<sup>TM</sup>, coletada para *vials* e injetada três vezes. Os valores médios das áreas dos picos a cada tempo foram comparados como comprovação da estabilidade da cianocobalamina na preparação.

O equipamento utilizado para a análise cromatográfica foi Shimadzu HPLC System (Japão), incluindo uma bomba quaternária (LC-10 AT VP), auto-injetor (SIL-10AS), detector DAD (SPD-10A VP), forno (CTO-10AS VP) e software para integração dos picos CLASS VP 6.13SP2. Este detector permite a avaliação de picos interferentes que estejam absorvendo no mesmo comprimento de onda (361nm).

A seletividade foi confirmada pela injeção em triplicata dos placebos das preparações A e B.

#### **4.4. DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE E REOLOGIA DA FASE SOL**

Sob agitação, em um béquer, adicionou-se 22,2mL de água ultra-pura, 22,1mL de TEOS (98%, Aldrich) e 2,8mL de solução 1M de HCl P.A. (Vetec, Brasil). A preparação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 5,5 horas de agitação, retirou-se uma amostra para análise reológica à temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  através do equipamento Brookfield DV-II+ (EUA), composto de software Wingather V.2.2, utilizando sistema SSA, spindle S31.

#### 4.5. PREPARO DE MICROPARTÍCULAS DE SÍLICA POR SPRAY DRYING

A preparação do sol foi realizada pela mistura de água ultra-pura e TEOS 99,9% (Merck, Alemanha) nas proporções molares TEOS (1) : H<sub>2</sub>O (14), TEOS (1) : H<sub>2</sub>O (28) e TEOS (1) : H<sub>2</sub>O (42). Em seguida, adicionou-se quantidade suficiente de solução 0,1M de HCl P.A. ou solução de 1,0M HCl P.A. (Vetec, Brasil) para obter pH estabelecido no delineamento experimental. A determinação do pH foi realizada utilizando peagômetro Mettler Toledo (Suíça). A preparação foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação magnética, durante todo processo (Tabela IV.1). Após a solubilização do TEOS, ajustou-se o pH com adição de HCl 1M (microesferas brancas) ou adicionou-se a cianocobalamina (North China Pharmaceutical Huas, China) e, em seguida, ajustou-se o pH com adição de HCl 1M (microesferas carregadas).

No caso da amostra com polietilenoglicol 6000 (PEG), o preparo do sol ocorreu pela adição de polietilenoglicol à água ultra-pura e após a solubilização, o procedimento seguiu as etapas padronizadas, conforme descrito acima.

O equipamento utilizado para produção das microesferas de sílica foi um mini-secador *Spray dryer* Büchi 190 (Büchi, Suíça) com capacidade nominal de evaporação de 1,5kg H<sub>2</sub>O/h, dotado de um sistema de aquecimento de ar, um sistema de injeção e um sistema de exaustão de gases, conforme esquematizado na Figura 4.1. O equipamento operou continuamente com fluxos concorrentes de ar e preparação e com um atomizador de orifício de 0,7mm. O material particulado produzido foi aspirado e coletado por um ciclone conectado à extremidade inferior do secador. Os finos não retidos no ciclone foram coletados por um filtro manga colocado na linha de evacuação de gás.

A concentração teórica de cianocobalamina nas microesferas carregadas é de aproximadamente 2,2%p/p. E a concentração teórica de PEG nas microesferas de matriz híbrida é de aproximadamente 3,5%p/p.

Tabela IV.1 - Matriz de experimentos do preparo de microesferas por *spray drying*.

Formulação	pH	Razão molar TEOS :H <sub>2</sub> O: cianocobalamina: PEG 6000
1	1	1:14:0:0 (micropartículas brancas)
2	1	1:14:0,001:0
3	2,3	1:14:0,001:0
4	2,3	1:14:0:0 (micropartículas brancas)
5	3,0	1:14:0,001:0
6	2,3	1:14:0,002:0
7	3,0	1:14:0:0 (micropartículas brancas)
8	2,3	1:28:0,001:0
9	2,3	1:14:0 :1,67x10 <sup>-4</sup> (micropartículas brancas)
10	2,3	1:14:0 :1,67x10 <sup>-4</sup> (micropartículas brancas)*
11	2,3	1:14:0,001 :1,67x10 <sup>-4</sup>
12	2,3	1:14:0,001:0*
13	2,3	1:28:0,001:0*
14	2,3	1:42:0,001:0

\*repetições



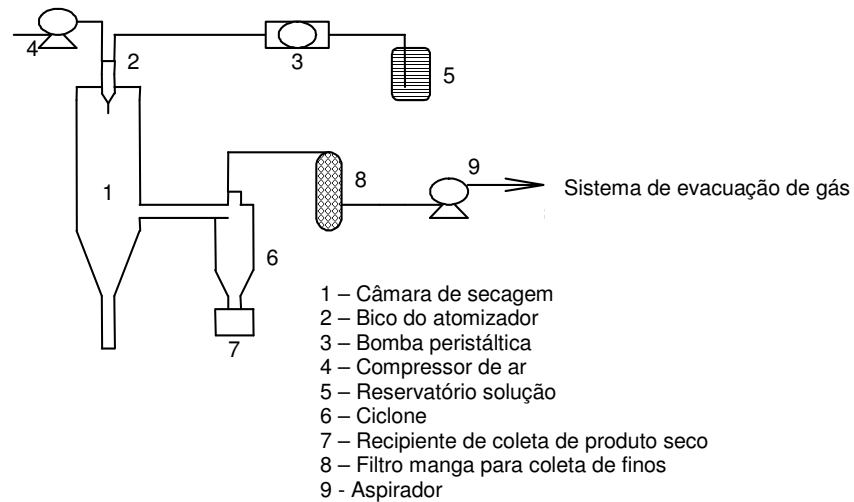


Figura 4.1- Esquema do *spray dryer* utilizado para a produção de microesferas de sílica

Os parâmetros de operação foram fixados para todos os experimentos: fluxo de alimentação de 5mL/min; temperatura de entrada do ar no secador 124 – 133°C; aspirador 18; vazão do ar de atomização 600NI/h e temperatura de saída do ar do secador 80 – 94°C (determinada por fatores como a temperatura de entrada e vazão de volumétrica de líquido).

As amostras foram coletadas, cuidadosamente, e mantidas em frascos de vidro âmbar bem fechados.

## **4.6. CARATERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS**

### **4.6.1. Medida de densidade**

As análises no picnômetro a hélio foram obtidas no aparelho Multipycnometer modelo MVP-4DC (Quantachrome Corporation, EUA).

O gás hélio é utilizado porque possui um tamanho molecular pequeno o suficiente para penetrar em poros nanométricos abertos. Considerando-se que o material não possua poros internos fechados, a densidade medida é a densidade real.

O picnômetro a hélio emprega o princípio de Arquimedes de fluido deslocado para determinar o volume. Nesta técnica, o volume da amostra é calculado através da medida da diferença de pressão quando uma quantidade conhecida deste gás sobre pressão flui de um volume de referência ( $V_r$ ) precisamente conhecido para uma célula (porta-amostra) contendo o material em pó. Obtém-se dois valores de pressão que são relacionados com o volume através da equação dos gases ideais ( $PV = nRT$ ). Posteriormente, a densidade é obtida através da razão da massa pelo volume medido.

Os valores médios foram calculados a partir de seis determinações para cada amostra.

### **4.6.2. Análise por difração de raios X**

A técnica de difração de raios X foi utilizada na avaliação da cristalinidade da cianocobalamina antes e após obtenção das micropartículas.

As amostras, Formulação 1 a 11, foram submetidas à análise de difração de raios X em um Difrátômetro da marca Philips (Holanda), modelo PW1710, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$ , corrente de 20mA, tensão de 40kV, varredura ao passo de  $0,06^\circ 2\theta/s$ , tempo de contagem de  $1s^{-1}$ , varredura de  $4^\circ$  a  $90^\circ 2\theta$ .

#### **4.6.3. Espectroscopia na região do infravermelho**

Os espectros de infravermelho foram empregados para identificação direta de grupos funcionais específicos da cianocobalamina (North China Pharmaceutical Huas, China), das microesferas de sílica branca e microesferas de sílica carregada com cianocobalamina. Foram analisadas amostras das Formulações 1 a 11.

Considerando a dificuldade de doseamento da cianocobalamina nas microesferas, procurou-se avaliar a possibilidade de utilização da técnica de espectroscopia na região do infravermelho para determinação quantitativa desse fármaco.

Os espectros no infravermelho foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 1000 (FT-IR) e as leituras foram feitas na região de  $4000\text{cm}^{-1}$  a  $500\text{cm}^{-1}$ . Em todos os casos foram preparadas pastilhas contendo 1,5mg da amostra e 150mg de KBr, exatamente pesados. As misturas foram trituradas em um grau de ágata e foram então prensadas.

#### **4.6.4. Análise térmica**

A análise térmica permite o acompanhamento dos efeitos de calor associados com as alterações químicas e físicas da amostra, tais como reações de dissociação, de decomposição, de desidratação, de oxi-redução, entre outras. É possível acompanhar as transições de fase (sublimação, congelamento, fusão, ebulição, inversões de estrutura cristalina), que são capazes de causar variações de calor. Também é possível medir a mudança de massa de uma substância em função do tempo ou da temperatura. Deste modo, utilizaram-se os dados da curva TG para quantificação da cianocobalamina nas microesferas das Formulações 3 e 11.

A primeira avaliação da cianocobalamina por análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC) foi conduzida utilizando equipamento Mettler Toledo modelo DSC 822e (Suíça) utilizando cadinho de alumínio de  $40\mu\text{L}$  com tampa perfurada numa faixa de temperatura de  $-30$  a  $600^\circ\text{C}$  com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Na segunda avaliação por DSC, para avaliação da temperatura de transição vítrea da cianocobalamina, utilizou-se o equipamento DSC 2920 da TA Instruments (EUA). O

ensaio foi realizado numa razão de aquecimento 10°C/min utilizando hélio como gás de purga.

Por sua vez, a termogravimetria (TG) foi realizada sob nitrogênio e ar sintético em equipamento Mettler Toledo, TGA/STDA 851e (Suíça) em cadinho de platina de 70µL sob uma temperatura de 25°C a 1000°C com razão de aquecimento de 10°C/min. Foram obtidas as curvas TG para cianocobalamina e Formulações 3, 4, 10 e 11.

#### **4.6.5 Microscopia e microanálise eletrônica**

As análises morfológicas das microesferas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura utilizando equipamento JEOL JSM – 6360LV (Japão) e a composição química foi analisada utilizando microsonda através do espectrômetro por dispersão de energia (EDS) de raios X THERMO NORAN modelo Quest (EUA).

As amostras foram montadas em um porta amostra com o auxílio de uma fita dupla face de carbono e submetidas à metalização em ouro. Em seguida, as amostras das Formulações 1 a 14 foram examinadas utilizando feixe de elétrons a uma intensidade de 15kV. Obteve-se fotomicrografias nos aumentos de 1000X, 5000X e 10000X.

A fim de avaliar alterações da superfície, as amostras das Formulações 12, 13 e 14 foram analisadas após o teste de liberação *in vitro* sob as condições anteriormente descritas. Obteve-se fotomicrografias nos aumentos de 5000X e 10000X.

#### **4.6.6 Distribuição Granulométrica**

As distribuições granulométricas das microesferas obtidas neste trabalho foram analisadas por difração laser em aparelho Cilas 1064 (França), que opera pelo princípio de difração de raios laser. Pequenas quantidades de micropartículas foram previamente dispersadas em aproximadamente 15mL de água contendo cerca de 0,05%p/V de hexametnofosfato de sódio (Quimibrás, Brasil) e mantidas em banho de ultra-som por 5min. Em seguida, porções da suspensão foram transferidas para cuba do aparelho contendo água, sob ultra-som, até que o índice de obscuração requisitado pelo aparelho fosse alcançado.

Foram determinados os diâmetros de partícula correspondente a 90, 50 e 10% da distribuição acumulada, ou seja, os parâmetros  $D_{0,9}$ ,  $D_{0,5}$  e  $D_{0,1}$ . A partir desses, foi calculado o índice de polidispersidade, span, por  $(D_{0,9} - D_{0,1}/D_{0,5})$ .

#### **4.6.7. Adsorção de gases**

Todas as amostras foram pré-preparadas para retirada de umidade sob vácuo à temperatura de 90°C por no mínimo 5 horas. A área superficial específica e o volume específico dos poros foram determinados pela técnica de Brunauer, Emmett e Teller (BET), utilizando equipamento Autosorb-1 Quantachrome (EUA), com isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio. Na faixa de validade da isoterma de BET, a área foi calculada a partir do coeficiente angular e intercepto da linha formada por, no mínimo, cinco pontos de medida. Para garantir a repetibilidade dos resultados, utilizou-se massa de aproximadamente 0,15g para Formulação 3 e de 0,5g para Formulações 12, 13 e 14.

#### **4.6.8. Liberação *in vitro***

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado para verificar a potencialidade da matriz de sílica carregada com cianocobalamina, obtida por método sol-gel por *spray dryer*, liberar de forma controlada este fármaco.

Foram utilizadas, neste experimento, microesferas produzidas sob diferentes condições com a finalidade de avaliar a influência das condições de síntese sob o perfil de liberação.

Preparo tampão PBS-conservantes

Foram exatamente pesados 0,20g de cloreto de potássio P.A. (Vetec, Brasil), 0,20g de fosfato de potássio monobásico P.A. (Vetec, Brasil), 8,00g de cloreto de sódio P.A. (Vetec, Brasil), 1,15g fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec, Brasil), 1,00g de metilparabeno (Veno Fine Chemical Industry, China) e 0,1g de propilparabeno (San Fu Chemical, Japão). O propilparabeno e o metilparabeno foram solubilizados em água ultra-pura aquecida à 70°C. Após o resfriamento dessa solução, adicionou-se mais água ultra-pura até aproximadamente 800mL e, em seguida, os demais sais foram solubilizados consecutivamente. Levou-se a solução ao banho-maria à 37°C e

acertou-se o pH da solução para 7,4 utilizando-se peagômetro Mettler Toledo MP 220, (Suíça) com solução 1M de hidróxido de sódio P.A. (Vetec, Brasil). Finalmente, transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 1000mL, completou-se o volume utilizando água ultra-pura e homogeneizou-se. O pH foi novamente conferido.

### **Ensaio de liberação *in vitro* utilizando sacos de diálise**

Cerca de 500mg de cada formulação de microesferas de sílica carregada com cianocobalamina (Formulação 2, 3, 5, 6, 8 e 11) foram colocados em sacos de diálise (Inlab, peso molecular de corte de aproximadamente 12 kDa), imergidos em 100mL solução tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) contendo 0,1%p/V de metilparabeno (Veno Fine Chemical Industry, China) e 0,01%p/V propilparabeno (San Fu Chemical) como conservantes. Todas as amostras foram mantidas sob agitação constante em incubador shaker C-24, NBS (EUA) a 75rpm, 37°C e protegidas da luz. A cada intervalo de amostragem, uma amostra de 1,0mL foi coletada e substituída por um volume idêntico de meio novo. A quantificação da cianocobalamina liberada foi realizada por CLAE.

A primeira série de ensaios (Formulação 3, 5, 6 e 8) foi realizada em duplicata por 22 dias, enquanto a segunda (Formulações 2 e 11) foi realizada em triplicata por 21 dias.

Paralelamente, foi avaliado por 72h o perfil de liberação do fármaco livre pela adição de cerca de 11mg de cianocobalamina colocados em saco de diálise (n=3) e submetidos às mesmas condições experimentais acima descritas.

### **Ensaio de liberação *in vitro* com dispersão direta no meio**

Cerca de 500mg de cada formulação de microesferas de sílica carregada com cianocobalamina (Formulações 3, 8, 12, 13 e 14), exatamente pesados, foram dispersos em 100mL solução tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) contendo 0,1%p/V de metilparabeno (Veno Fine Chemical Industry, China) e 0,01%p/V propilparabeno (San Fu Chemical) como conservantes. Todas as amostras foram mantidas sob agitação constante em incubador *shaker* C-24, NBS (EUA) a 75rpm, 37°C e protegidas da luz. A cada intervalo de amostragem, uma amostra de 100µL foi coletada e

substituída por um volume idêntico de meio novo. O ensaio foi realizado em triplicata por 14 dias e a quantificação da cianocobalamina foi realizada por CLAE.

#### **Procedimento para análise das amostras do ensaio de liberação *in vitro***

Uma alíquota foi retirada, filtrada através de filtro Millex™ e coletada em *vial* para análise por CLAE. Cada amostra foi injetada 3 vezes e a média das áreas dos picos foi comparada com a média das áreas dos picos da solução padrão diluída a 5µg/mL. A concentração de cianocobalamina no meio foi calculada pela aplicação da equação:

$$Ca = \frac{Aa \times Cr}{Apa} \quad (4.4)$$

em que:

Ca = concentração de cianocobalamina no meio (µg/mL)

Aa = média das áreas dos picos da amostra problema

Apa = média das áreas dos picos da solução padrão diluída

Cr = concentração real da solução padrão diluída (µg/mL)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Padronização do método de quantificação de cianocobalamina por CLAE

#### 5.1.1. Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (ICH, 1996, ANVISA, 2003; USP, 2005; RIBANI, 2004).

Os picos da cianocobalamina obtidos pela diluição do padrão primário a 50 $\mu$ g/mL (Figura 5.1) e da matéria-prima 50 $\mu$ g/mL (Figura 5.2) são bastante simétricos e aparecem no tempo de retenção de 5,1min. Observa-se que não há interferente na análise, pois o cromatograma não apresenta outros picos, senão o da cianocobalamina no intervalo de 0 a 15min.

A Figura 5.3 mostra o cromatograma obtido pela injeção de cianocobalamina padrão diluída a 6 $\mu$ g/mL em tampão PBS-conservantes. Como era se esperar, os conservantes, metilparabeno e propilparabeno, apresentam absorvidade na região do ultra-violeta. Contudo, observa-se boa separação dos picos e simetria do pico de cianocobalamina visualizado a 7,03min. É interessante observar a baixa intensidade dos picos relativos aos conservantes (Figuras 5.3 e 5.4).

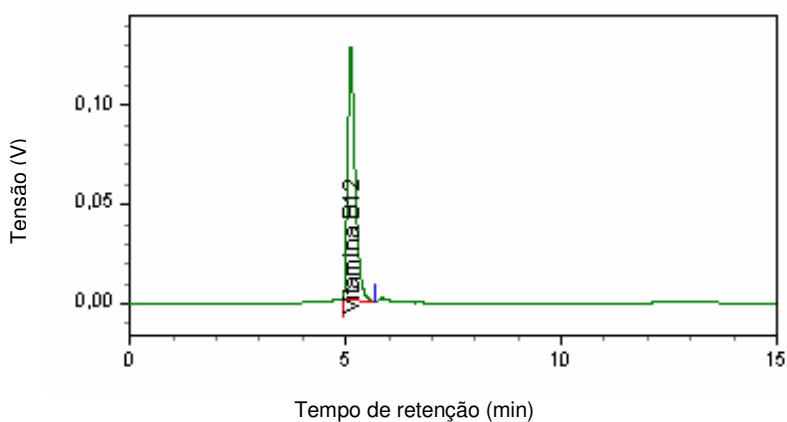


Figura 5.1 - Cromatograma da amostra de cianocobalamina padrão diluída 50 $\mu$ g/mL.



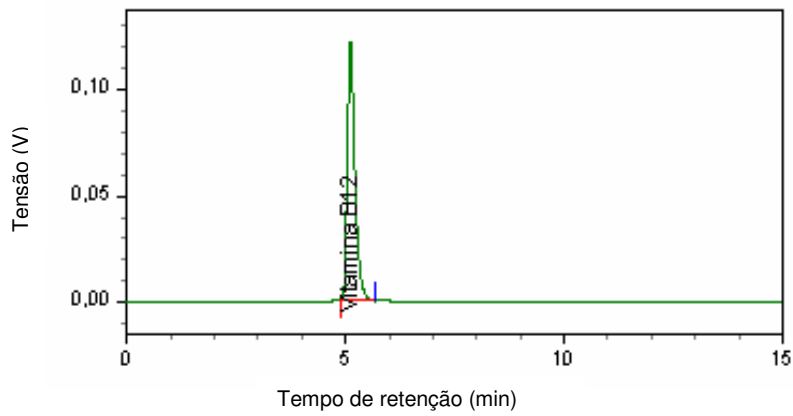


Figura 5.2 - Cromatograma da amostra de cianocobalamina matéria-prima diluída a 50µg/mL.

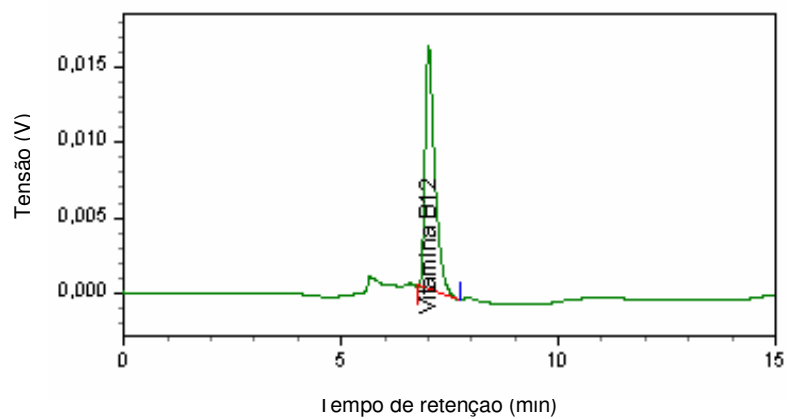


Figura 5.3 - Cromatograma da amostra de cianocobalamina padrão diluída em tampão PBS-conservantes (6µg/mL).

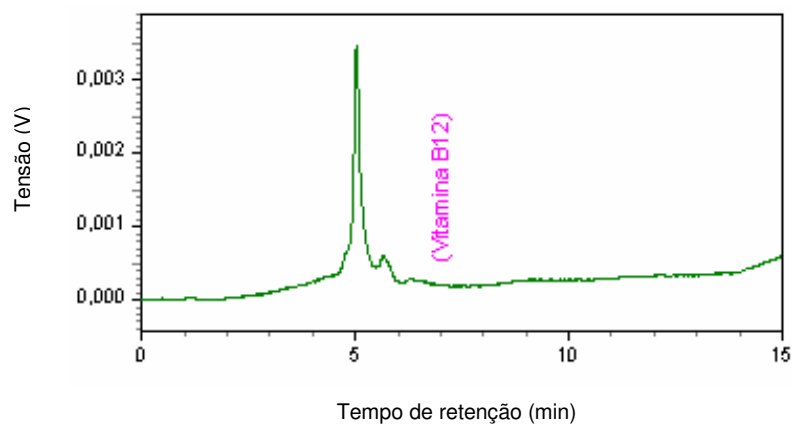


Figura 5.4 - Cromatograma do placebo. Os picos observados são relativos aos conservantes metilparabeno e propilparabeno.

Provavelmente, a diferença das características químicas das amostras e a mudança de polaridade da molécula são responsáveis pela pequena alteração do tempo de retenção quando se compara o uso de água e de tampão PBS-conservantes (pH=7,4) como diluente.

O estudo comparativo dos cromatogramas apresentados nas Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 mostra que as condições cromatográficas trabalhadas oferecem seletividade para a determinação da cianocobalamina nas diferentes amostras.

### **5.1.2. Linearidade e faixa de aplicação**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 1996, ANVISA, 2003; USP, 2005; RIBANI, 2004).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada é obtido experimentalmente a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (ICH, 1996, ANVISA, 2003; USP, 2005; RIBANI, 2004).

Através da regressão linear pode-se calcular o coeficiente de correlação  $r$ . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida. Para avaliar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima (RIBANI, 2004).

A ANVISA (2003) e o ICH (1996) recomendam um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99.

A Tabela V.1 apresenta as concentrações de trabalho e respectivas áreas obtidas pela injeção das replicatas. A representação gráfica da curva padrão e a equação da reta, determinada através do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, podem ser visualizadas na Figura 5.5.

Tabela V.1 - Áreas obtidas por CLAE para a construção da curva de calibração da cianocobalamina.

Concentração Cianocobalamina (µg/mL)	1	2	5	10	20	50	100	150
Área (u.a.)	40462	79968	209354	421850	827083	2104615	4224853	6334123
	39359	79679	207144	422455	820846	2109238	4228690	6325316
	39698	80076	208470	423549	825885	2097201	4221003	6315261
	39489	83298	207889	420025	831181	2090073	4228287	6337623
	40064	82265	209013	422114	826113	2098617	4235587	6304905
Média das áreas ± desvio padrão	39814 ± 500	81100 ± 1700	208400 ± 900	422000 ± 1300	826000 ± 3700	2100000 ± 7400	4228000 ± 5400	6323000 ± 14000
C.V. (%)	1,13	2,00	0,42	0,30	0,45	0,35	0,13	0,21

O valor do coeficiente de variação para as replicatas de injeções a cada ponto de concentração foi inferior a 2% e o coeficiente de correlação (r) foi superior a 0,99999 para a equação  $y=42218x - 5149,5$ .

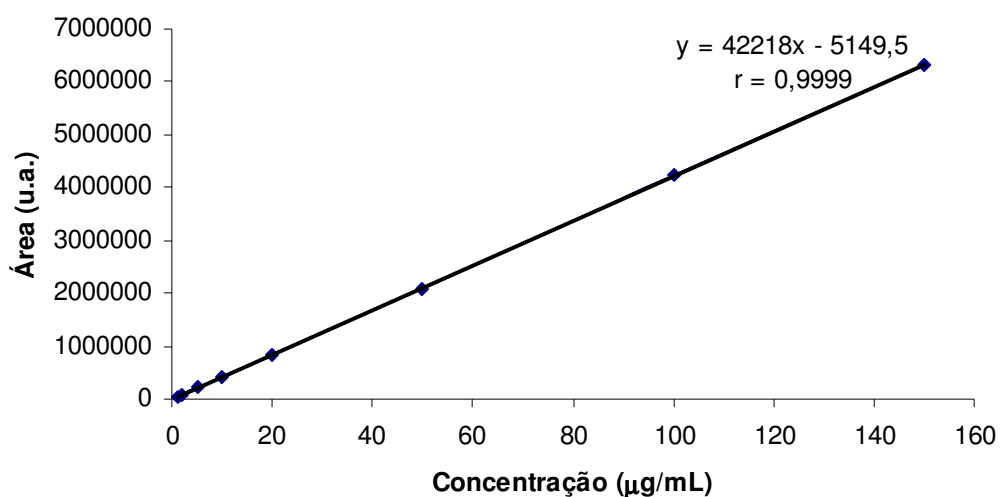


Figura 5.5 - Representação gráfica da curva padrão da cianocobalamina por CLAE.

Uma vez que o valor de  $r$  é superior a 0,99, pode-se afirmar que existe alta correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações de cianocobalamina no intervalo de  $1\mu\text{g/mL}$  a  $150\mu\text{g/mL}$ .

Para avaliar a relação linear entre concentração de cianocobalamina e área do pico foi aplicado teste “t” de Student (significância 5%) cuja hipótese nula ( $H_0$ ) é  $H_0: b=0$ . O parâmetro de Student ( $t$ ) encontrado foi de  $t=771,056$  ( $p<0,0001$ ) e indicou que o coeficiente  $b$  é estatisticamente diferente de zero, ou seja, rejeita-se  $H_0$ . Portanto, o modelo linear que expressa área do pico em função da concentração de cianocobalamina é adequado.

### **5.1.3 Precisão do Método**

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI, 2004).

De acordo com a ANVISA (2003), o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

A precisão em validação de métodos analíticos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A reprodutibilidade é aplicada aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como padronização de procedimento a serem incluídos em farmacopéias, CODEX e outros (ANVISA, 2003; RIBANI, 2004).

#### **5.1.3.1. Teste de Repetibilidade**

No teste de repetibilidade a precisão é avaliada pela concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação (ICH, 1996, ANVISA, 2003; USP, 2005; RIBANI, 2004).

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (ICH, 1996, ANVISA, 2003; USP, 2005; RIBANI, 2004).

### Teste de repetibilidade 1

A Tabela V.2 sumariza os resultados do teste de repetibilidade utilizando água ultra-pura como diluente, realizado pela injeção em triplicata das concentrações de cianocobalamina padrão diluída a 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL, bem como os valores encontrados para o desvio padrão e C.V..

Tabela V.2 - Teste de repetibilidade 1: solução padrão de cianocobalamina diluída em água ultra-pura.

Concentração cianocobalamina (µg/g)	5,0	10,0	20,0
Área (u.a.)	202328	417049	800838
	203350	415704	806214
	205612	419440	809059
	204229	419179	812042
	207861	419992	801336
Média das áreas ± desvio padrão	204700 ± 2200	418300 ± 1900	805900 ± 4900
C.V.(%)	1,05	0,43	0,60
Limites de Confiança (95%)	204700 ± 2700	418300 ± 2300	805900 ± 6100

Conforme se observa na Tabela V.2, os valores de coeficiente de variação foram 1,05%, 0,43% e 0,60% para as concentrações de 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL, respectivamente. Portanto, os valores são bem inferiores a 5%, o que demonstra boa precisão do método quanto à repetibilidade.

### Teste de repetibilidade 2

A Tabela V.3 resume os resultados do teste de repetibilidade utilizando tampão PBS-conservantes como diluente, realizado pela injeção consecutiva (n=6) da amostra de cianocobalamina padrão diluída a 5µg/mL, bem como os valores encontrados para o desvio padrão e C.V..

Conforme se observa na Tabela V.3, o valor de coeficiente de variação foi 0,20% para a concentração de 5µg/mL. Portanto, o valor é bem inferior a 5%, o que demonstra boa precisão do método quanto à repetibilidade.

Tabela V.3 - Teste de repetibilidade 2: solução de cianocobalamina padrão diluída a 5µg/mL em tampão PBS-conservantes.

Repetições	Área (u.a.)
1	217304
2	216101
3	216346
4	216843
5	216972
6	216574
Média das áreas ± desvio padrão	216700 ± 500
C.V. (%)	0,20
Limites de Confiança (95%)	216700 ± 500

### 5.1.3.2. Teste de Precisão intermediária (precisão intra-corrida)

No teste de precisão intermediária verifica-se concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou equipamentos diferentes ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (ICH, 1996, ANVISA, 2003; RIBANI, 2004; USP, 2005).

#### Teste de precisão intermediária 1

Avaliou-se a concordância de resultados entre dois equipamentos, em dias diferentes, injetando-se 5 vezes cada solução cianocobalamina padrão diluída em água ultra-pura a 5µg/mL, 10µg/mL e 20µg/mL . Os resultados foram sumariados na Tabela V.4.

Tabela V.4 - Teste de Precisão intermediária 1.

Concentração cianocobalamina (µg/mL)	5,0		10,0		20,0	
	1	2	1	2	1	2
Área (u.a.)	202328	107924	417049	215307	801336	424215
	203350	106160	415704	218882	800838	421337
	205612	106310	419440	214247	806214	428540
	204229	107752	419179	216754	809059	424552
	207861	106042	417049	213854	812042	424770
	202328	107924	415704	215307	801336	424215
Média das áreas ± desvio padrão	205000 ± 2200	106800 ± 900	418000 ± 1800	216000 ± 2100	806000 ± 4900	425000 ± 2600
C.V. (%)	1,05	0,86	0,43	0,95	0,60	0,60

Os valores de coeficiente de variação no equipamento 1 e no equipamento 2 para amostra de mesma concentração foram no máximo de 1,05%. Portanto, os dados experimentais mostram que o método apresenta boa precisão intra-corrída.

### Teste de Precisão intermediária 2

O teste de precisão intermediária utilizando solução tampão PBS-conservantes como diluente foi realizado em dois dias diferentes por analistas diferentes injetando-se 6 vezes a solução cianocobalamina padrão diluída a 5 µg/mL (Tabela V.5).

Tabela V.5 - Teste de precisão inter-dias 2.

Concentração cianocobalamina (µg/mL)	Área (u.a.) 1º dia	Área (u.a.) 2º dia
5,0	217304	215949
	216346	215875
	216972	219250
	216101	218819
	216843	218936
	216574	219422
Média das áreas ± desvio padrão	216700 ± 500	218000 ± 1700
C.V. (%)	0,20	0,76
Média das médias ± desvio padrão	217000 ± 1000	



A Tabela V.5 mostra o C.V. para cada dia, ou seja, 0,20% e 0,76% para o primeiro e segundo dia, respectivamente. Foi aplicado teste “t” de Student para amostras independentes, obtendo-se  $t=-1,925$  ( $p=0,105$ ). Portanto não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias da precisão inter-dias ( $\alpha=0,05$ ).

#### **5.1.4. Teste de Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ICH, 1996, ANVISA, 2003; RIBANI, 2004; USP, 2005).

Ressalta-se que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (RIBANI, 2004).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação entre métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI, 2004).

#### **Teste de exatidão 1**

Seguindo o método de adição padrão, quantidades conhecidas de padrão de cianocobalamina foram adicionadas à solução de cianocobalamina matéria-prima. Os resultados de recuperação de cianocobalamina padrão estão resumidos nas Tabelas V.6 e V.7.

Os valores de concentração de cianocobalamina correspondentes a cada concentração foram calculados e comparados ao valor teórico (equivalente a 100% de recuperação, ou seja, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ ). Foi aplicado teste “t” de Student e verificou-se não houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração de cianocobalamina recuperada e concentração teórica ( $\alpha=0,05$ ).

Tabela V.6 - Teste de exatidão 1.

Amostra	Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (u.a.)	Média das áreas $\pm$ desvio padrão	C.V. (%)
Matéria-prima	5,0	204825	206200 $\pm$ 2400	1,16
		204740		
		208934		
Matéria-prima + padrão	30,0	1199456	1230000 $\pm$ 26500	2,15
		1245171		
		1245304		
Matéria-prima + padrão	55,0	2290283	2299000 $\pm$ 9600	0,42
		2297303		
		2309219		
Matéria-prima + padrão	105,0	4407008	4421000 $\pm$ 17300	0,39
		4416660		
		4440467		

Tabela V.7 - Análise estatística do teste de exatidão 1.

Concentração teórica de cianocobalamina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Quantidade de cianocobalamina recuperada ( $\mu\text{g}$ )	t	p	Percentual médio de recuperação $\pm$ desvio padrão
25	24,37	-1,733	0,225*	99,0 $\pm$ 1,1
50	49,69	-2,329	0,145*	
100	99,97	-0,142	0,900*	

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t" de Student.

Conforme apresentado na Tabela V.7, a recuperação do método A foi de 99,0  $\pm$  1,1%.

### Teste de exatidão 2

Neste teste, amostra do placebo foi contaminada com quantidades conhecidas de cianocobalamina padrão. As Tabelas V.8 e V.9 mostram os resultados obtidos.

Os valores de concentração de cianocobalamina correspondentes a cada concentração foram calculados e comparados ao valor esperado (equivalente a 100% de recuperação, ou seja, 5, 10, 15 e 25 $\mu\text{g/mL}$ ). Foi aplicado teste "t" de Student e verificou-se não houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração de cianocobalamina recuperada e a concentração teórica nas concentrações teóricas de 5 e 15 $\mu\text{g/mL}$  ( $\alpha=0,05$ ).

Conforme se verifica na Tabela V.9, utilizando o método de contaminação do placebo, a recuperação de cianocobalamina foi de  $97,8 \pm 3,3\%$ .

Tabela V.8 - Teste de exatidão 2.

Preparação	Concentração teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (u.a.)	Média das áreas $\pm$ desvio padrão	C.V. (%)
Padrão	5,0	196713	197100 $\pm$ 800	0,37
		197734		
		196927		
Placebo + Padrão	5,0	190613	186000 $\pm$ 5000	2,64
		186483		
		180822		
Placebo+ Padrão	10,0	381277	382600 $\pm$ 3100	0,79
		380463		
		386050		
Placebo+ Padrão	15,0	586546	578000 $\pm$ 7500	1,29
		572602		
		574893		
Placebo+ Padrão	25,0	1008928	1007100 $\pm$ 2400	0,23
		1004506		
		1007904		

Tabela V.9 - Percentual de recuperação do teste de exatidão 2 por contaminação do placebo.

Concentração teórica cianocobalamina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração cianocobalamina recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	t	p	Média $\pm$ desvio padrão
5,0	4,72	-4,071	0,055*	97,8 $\pm$ 3,3
10,0	9,70	-6,786	0,021 <sup>NS</sup>	
15,0	14,66	-3,053	0,093*	
25,0	25,55	16,159	0,004 <sup>NS</sup>	

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t" de Student.

<sup>NS</sup> Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste "t" de Student.

### 5.1.5. Teste de robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Para método cromatográfico avalia-se, por exemplo, a variação da proporção dos solventes, pH e força iônica da fase móvel, programação de temperatura, fluxo da fase móvel pela coluna (ICH, 1996, ANVISA, 2003; RIBANI, 2004; USP, 2005).

#### Teste de robustez 1

O teste de robustez foi realizado pela variação da temperatura da coluna cromatográfica em  $\pm 2^\circ\text{C}$  durante a análise da solução de cianocobalamina padrão diluída a  $5\mu\text{g/mL}$  em água ultra-pura ( $n=3$ ) (Tabela V.10).

Tabela V.10 - Teste de robustez 1 utilizando solução de cianocobalamina padrão diluída a  $5\mu\text{g/mL}$  em água ultra-pura.

Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	23	25	27
Área (u.a.)	219172	219112	217947
	220020	217809	214695
	219544	219079	216351
Média das áreas $\pm$ desvio padrão	219600 $\pm 500$	218600 $\pm 800$	216300 $\pm 1700$
Média das médias $\pm$ desvio padrão	218200 $\pm 1700$		
C.V. (%)	0,77		

As áreas das replicatas, obtidas a cada temperatura, foram agrupadas e os três grupos foram comparados pela análise de variância (Anova). O valor "F" de Fisher obtido foi  $F=7,478$  ( $p=0,023$ ). Em seguida, foi aplicado teste Tukey para as múltiplas comparações entre grupos, cujos resultados observados foram  $p=0,574$ ,  $p=0,080$  e  $p=0,022$  para as comparações dos grupos  $23^\circ\text{C}$  e  $25^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  e  $27^\circ\text{C}$  e  $23^\circ\text{C}$  e  $27^\circ\text{C}$ ,

respectivamente. Portanto, o teste de robustez foi satisfatório uma vez que não houve diferença significativa entre médias das áreas obtidas a 25 °C e aquelas obtidas a 23 °C e 27 °C em nível de 5% de significância.

## Teste de robustez 2

O teste foi conduzido variando-se a temperatura da coluna cromatográfica. Deste modo, a amostra de cianocobalamina padrão diluída em tampão PBS-conservantes (5µg/mL) foi injetada em triplicata nas condições de temperatura da coluna em 23 °C, 25 °C e 27 °C. Os dados do teste de robustez estão sumariados na Tabela V.11.

Tabela V.11 - Teste de robustez 2 utilizando amostra de cianocobalamina padrão diluída a 5µg/mL em tampão PBS-conservantes.

Temperatura (°C)	23	25	27
Área (u.a.)	210825	203176	214932
	211235	211704	212429
	212404	213017	212055
Média ± desvio padrão	211500 ± 900	209300 ± 5400	213100 ± 1600
Média das médias ± desvio padrão	211300 ± 2000		
C.V. (%)	0,91		

As áreas das replicatas, obtidas a cada temperatura, foram agrupadas e os três grupos foram comparados pela análise de variância. O valor “F”, de Fisher, obtido foi F=1,054 (p=0,405). Portanto, o teste de robustez foi satisfatório uma vez que não houve diferença significativa entre médias das áreas a 23 °C, 25 °C e 27 °C em nível de 5% de significância.

### Teste de robustez 3

Neste teste, variou-se o diluente de preparo da solução de cianocobalamina padrão. Água ultra-pura ou tampão PBS-conservantes foram utilizados como diluentes a fim de obter uma concentração final de 5µg/mL. As amostras foram injetadas em triplicata seguindo as condições padronizadas dos parâmetros cromatográficos. Os resultados estão sumariados na Tabela V.12. Foi aplicado teste “t” de Student para amostras independentes, obtendo-se  $t=3,008$  ( $p=0,091$ ). Portanto, o método é robusto uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ( $\alpha=0,05$ ).

Tabela V.12 - Teste de robustez 3: modificação do diluente das preparações.

Técnicas	Água	Tampão PBS-conservantes
Área (u.a.)	219112	203176
	217809	211704
	219079	213017
Média ± desvio padrão	218700 ± 800	209300 ± 5400
C.V. (%)	0,34	2,55
Média das médias ± desvio padrão	214000 ± 3300	
C.V. (%)	1,53	

### 5.2. QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CIANOCOBALAMINA NA MATÉRIA-PRIMA

Conforme descrito no item 4.2, preparou-se amostras de cianocobalamina padrão diluída 50µg/mL e de cianocobalamina matéria-prima 50µg/mL a fim de quantificar a pureza da matéria-prima. Os dados obtidos foram sumariados na Tabela V.13.

Tabela V.13 - Teor de cianocobalamina na matéria-prima.

Analito	Concentração (µg/g)	Área (u.a.)	Média das áreas	Desvio Padrão	C.V.(%)	Concentração Real (teor %p/p)
Padrão	50,00	1525577	1523539	2573	0,17	100,00
		1520648				
		1524393				
Matéria-prima	50,00	1452047	1453340	1410	0,10	95,39
		1454843				
		1453131				

Conforme se verifica na Tabela V.13, o teor de cianocobalamina foi de 95,39%p/p. Ressalta-se que este teor não é com base na substância seca e que, de acordo com a Farmacopéia Americana (USP, 2005), a matéria-prima pode conter até 12%p/p de umidade.

### 5.3. ESTABILIDADE DA CIANOCOBALAMINA EM FASE SOL

O objetivo deste experimento foi avaliar a estabilidade da cianocobalamina durante o processo de preparo da fase sol utilizando valores de pH abaixo da faixa ótima da estabilidade, pH 4,5 a 5,0 ( PENTEADO, 2003; TRISSEL, 2005).

Observou-se que o pico da cianocobalamina, proveniente do teste de estabilidade da substância em fase sol, apresentou alargamento da base do pico e formação de cauda. Também houve deslocamento do pico para o tempo de retenção 9,09min. Estas modificações podem estar associadas principalmente a modificações da polaridade da molécula (comparar com cromatogramas das Figuras 5.1, 5.6 e 5.7).

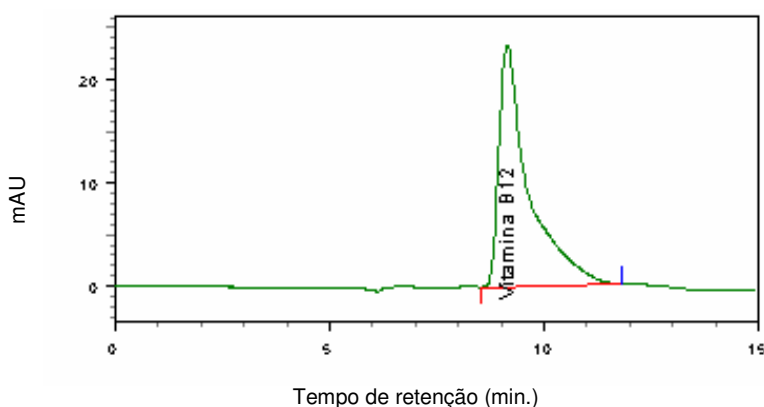


Figura 5.6 - Pico da cianocobalamina da amostra da fase sol após 24h de ensaio.

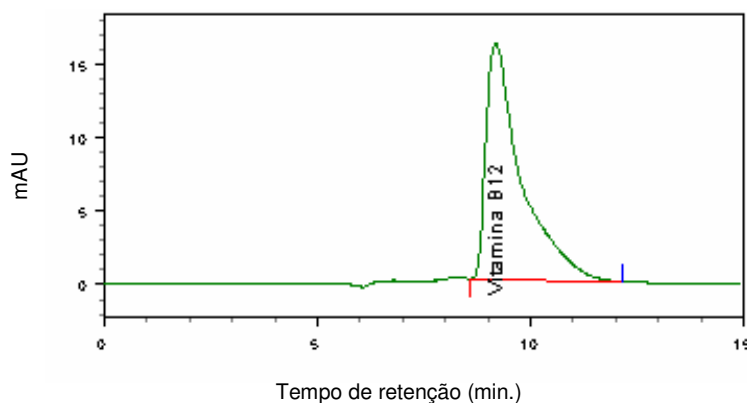


Figura 5.7 – Cromatograma da solução padrão de cianocobalamina a 26,8µg/mL.

O cromatograma da amostra da fase sol não apresenta outros picos, senão o da cianocobalamina no intervalo de 0 a 15 minutos. Esta evidência foi confirmada pela injeção em triplicata dos placebos respectivos e pela ausência de outros picos absorvendo no mesmo comprimento de onda (utilizando recursos do equipamento DAD).

A Tabela V.14 apresenta as médias dos picos de amostras tomadas nos tempos de 15 min, 2 h, 4h, 6h e 24h, bem como o C.V. obtido.

Em paralelo, foi injetada, em triplicata, solução padrão diluída na concentração de 26,8µg/mL e obteve-se valor de área média de 1055136,3 ± 5907,12.

Tabela V.14 - Teor da cianocobalamina na fase sol durante 24h

TEMPOS DE COLETA DE AMOSTRA	Médias das áreas ± desvio padrão (u.a.)	
	Formulação A pH = 1,0	Formulação B pH = 2,3
15min	1173000 ± 5000	1157900 ± 3600
2h	1171800 ± 13900	1190685 ± 5900
4h	1181100 ± 9500	1182500 ± 1200
6h	1214200 ± 5200	1162600 ± 6900
24h	1178000 ± 15300	1194200 ± 6300
C.V. (%)	1,48	1,40

n=3



O valor teórico de cianocobalamina nas preparações Formulação A e Formulação B é de 28,4µg/mL. Utilizando a área média da solução padrão diluído a 26,8µg/mL obteve-se valores de concentração das preparações superiores ao esperado, ou seja, valores iniciais de 29,80 e 29,41µg/mL para Formulação A e Formulação B, respectivamente. A diferença entre o valor teórico e o valor real, muito provavelmente, é devido ao fato das amostras Formulação A e Formulação B não serem analiticamente preparadas. O mais importante a salientar é que o teor obtido está na ordem de grandeza estimada e que não houve uma degradação imediata.

Verifica-se que a área do pico atribuído a cianocobalamina não teve variação significativa ao longo do experimento de estabilidade, uma vez que C.V. foi igual a 1,41% e 1,40% para os experimentos Formulação A e Formulação B, respectivamente.

#### **5.4. ANÁLISE DE VISCOSIDADE E REOLOGIA DA FASE SOL**

O tamanho médio das gotas formadas durante atomização é proporcional à viscosidade e à tensão superficial do líquido, afetando o tamanho das partículas geradas, sendo deste modo, variável de processo muito importante (RÉ, 1998).

UNGER *et al.*(1983) descreveram que na etapa de preparo da fase sol, o TEOS é parcialmente hidrolisado e então parcialmente condensado em presença de catalisadores ácidos tais como HCl, formando um líquido viscoso, polietoxissiloxano (PES). A viscosidade do PES aumenta exponencialmente com a média da massa molar do polímero e este é um parâmetro sensível para caracterização do grau de polimerização, que depende da quantidade de água e catalisador na mistura reacional.

Tendo em vista que a viscosidade das soluções desempenha um papel importante na determinação das propriedades de microesferas produzidas pela técnica de *spray drying*, podendo alterar propriedades tais como morfologia, tamanho e eficiência de encapsulação (RÉ, 1998; BURGESS, 2005), preparou-se um experimento para avaliar a viscosidade da fase sol. A Figura 5.8 se refere à reologia de uma amostra mantida

sob agitação durante 5,5h à temperatura ambiente. O valor da viscosidade obtida foi de 5,0mPa.s (torque= 81%) a 25°C utilizando spindle ULA, 100rpm.

Ressalta-se que, sob avaliação visual, as amostras preparadas neste trabalho não apresentaram mudanças significativas de viscosidade durante as primeiras 12h.

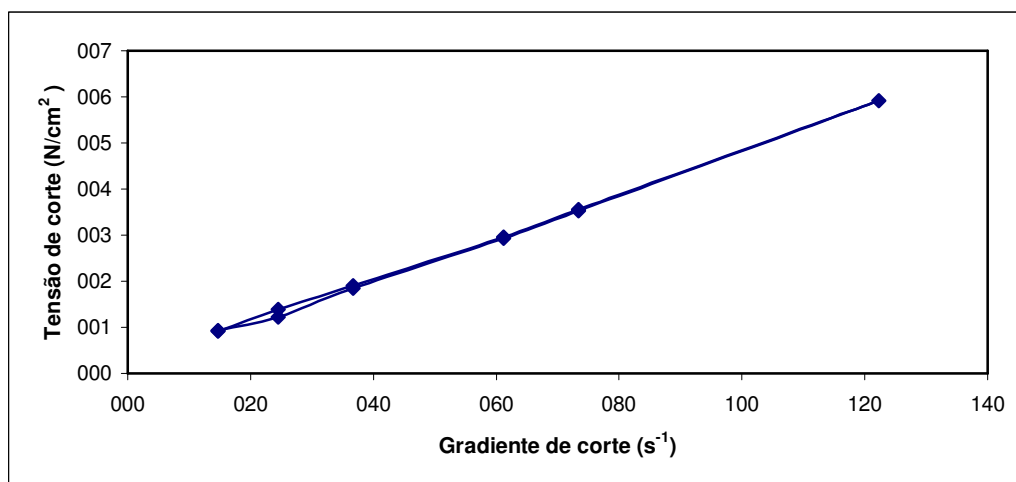


Figura 5.8 - Reologia da fase sol relação molar TEOS (1) : Água (14) : HCl (0,0008) após 5,5h.

## 5.5. ANÁLISE GRANULOMÉTRICA E DENSIDADE REAL

A distribuição granulométrica é um dos mais importantes parâmetros de caracterização de sistemas para aplicação injetável. Ou seja, a estabilidade, a sedimentação ou a tendência de cremagem de partículas em suspensões (BURGESS, 2005) ou em fluidos biológicos (MARTINEZ *et al.*, 2002) podem ser modificadas pelo tamanho e densidade das partículas. Por outro lado, o comportamento biológico é dependente do tamanho das partículas. Partículas de tamanho inferior a 5µm sofrem fagocitose por macrófagos e partículas com tamanho acima de 5µm não podem ser administradas por via intravenosa por causarem formação de êmbolos pulmonares (MORRIS; CUFF, 1991; BURGESS, 2005).

Os resultados de distribuição granulométrica laser e de densidade real foram sumariados na Tabela V.15.

Tabela V.15 - Resultados de distribuição granulométrica e densidade real das formulações de microesferas.

Formulação	Tamanho de partículas ( $\mu\text{m}$ )				Densidade real ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
	D <sub>0.1</sub>	D <sub>0.5</sub>	D <sub>0.9</sub>	Span	
1	1,19	3,64	8,18	1,92	1,93 ± 0,02
2	1,25	4,18	8,87	1,82	1,88 ± 0,01
3	1,56	5,91	13,76	2,06	1,87 ± 0,03
4	1,34	4,11	7,38	1,47	1,88 ± 0,03
5	1,27	4,17	7,64	1,53	1,86 ± 0,02
6	1,36	4,32	10,29	2,07	1,84 ± 0,01
7	1,36	4,90	8,58	1,47	1,85 ± 0,01
8	1,38	3,99	8,71	1,84	1,85 ± 0,03
9	1,66	7,91	16,70	1,90	1,83 ± 0,02
10	1,40	4,74	8,44	1,49	1,84 ± 0,02
11	1,35	4,91	8,94	1,55	1,80 ± 0,02
12	1,26	4,18	8,27	1,68	1,84 ± 0,02
13	1,32	3,96	8,86	1,90	1,91 ± 0,01
14	1,34	5,64	14,86	2,40	1,92 ± 0,02

Conforme mostra a Tabela V.15, os valores de densidade real variaram entre 1,80g/cm<sup>3</sup> a 1,93g/cm<sup>3</sup> e a distribuição granulométrica das diversas preparações apresentou valores de span  $\leq$  2,40.

As distribuições granulométricas das microesferas das Formulações 1 a 14 apresentam similaridade às obtidas em outros trabalhos utilizando método sol-gel e *spray dryer*. KORTESUO *et al.* (2001) prepararam microesferas de dexmedetomidina utilizando como precursores TEOS e mistura deste com 5 ou 25% de dimetildietoxissilano ou metiltrietoxissilano e obtiveram partículas com D<sub>10</sub> entre 1,41 e 2,04 $\mu\text{m}$  e D<sub>90</sub> entre 25,85 e 35,02 $\mu\text{m}$ . Em outro trabalho, KORTESUO *et al.* (2002) avaliaram o tamanho das micropartículas de dexmedetomidina e verificaram que D<sub>10</sub> estava entre 1,20 e 1,84 $\mu\text{m}$  e D<sub>90</sub> entre 12,20 e 34,30 $\mu\text{m}$ . VIITALA; JOKINEN; MAUNU (2005) obtiveram micropartículas de sílica de tamanho entre 1,5 a 15 $\mu\text{m}$  (avaliação em MEV) contendo albumina de soro bovino e CZURYSZKIEWICZ *et al.* (2005) obtiveram

microesferas de sílica contendo etidronato e verificaram por MEV que o tamanho das partículas estava entre 0,5µm e 30µm.

## 5.6. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Foram realizadas análises na região do infravermelho para a cianocobalamina (matéria-prima utilizada nos ensaios) e de modo investigativo para as Formulações 1 a 11. Os espectros da cianocobalamina, Formulação 1 e Formulação 2 estão representados nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11, respectivamente.

As principais bandas encontradas no espectro da cianocobalamina e da Formulação 1 estão listadas nas Tabelas V.16 e V.17, respectivamente.

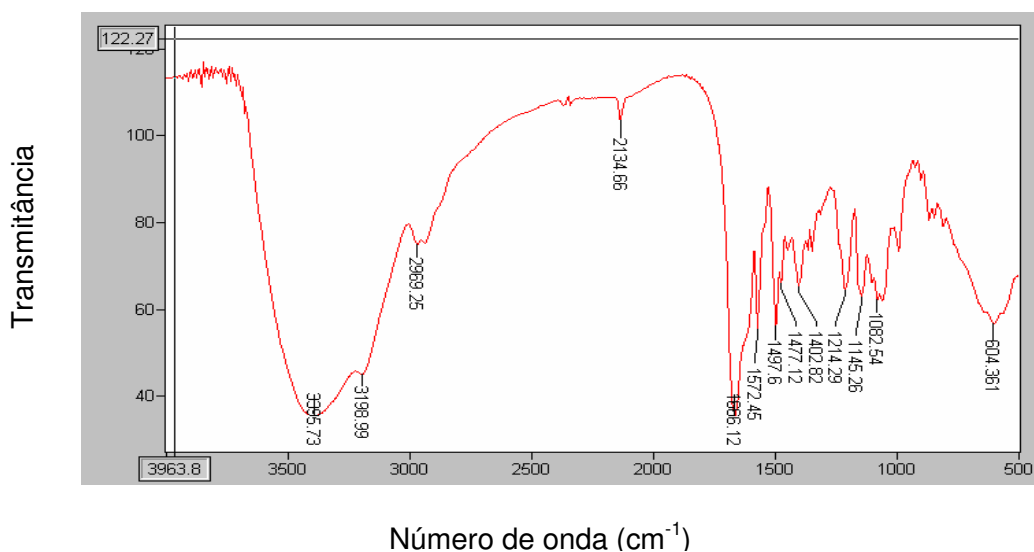


Figura 5.9 - Espectro na região do infravermelho da cianocobalamina.

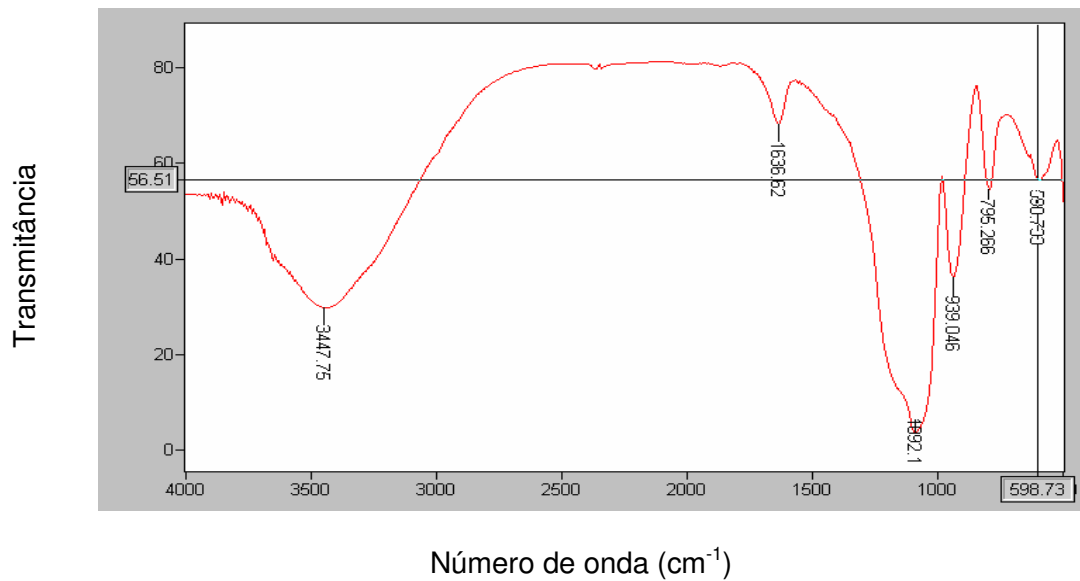


Figura 5.10 - Espectro na região do infravermelho da Formulação 1 (microesfera de sílica branca pH = 1).

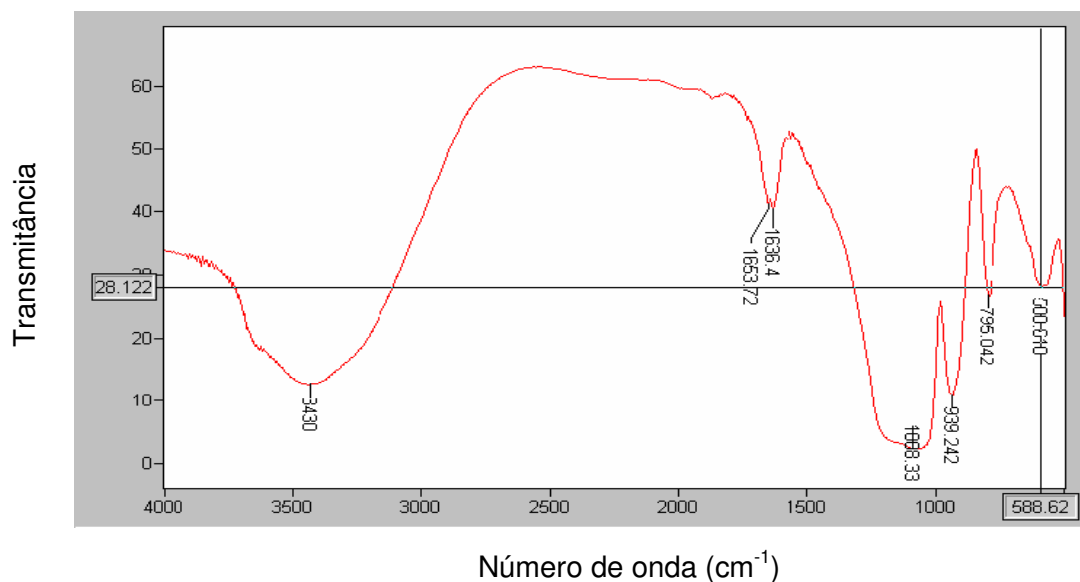


Figura 5.11 - Espectro na região do infravermelho da Formulação 2 (microesferas carregadas pH = 1).

Tabela V.16 - Principais bandas do espectro no IV da cianocobalamina.

BANDA	GRUPOS
3339 e 3198 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento de ligações O-H e N-H
2969 e 2868 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento de C-H.
1666 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento de C=O de grupo amida. Observa-se um ombro nesta banda que corresponde à deformação angular de $\text{NH}_2$ .
1572 e 1497 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento de C=C.
1214 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento de P=O.
604 $\text{cm}^{-1}$	Deformação angular de OH

As bandas listadas acima são consistentes com os grupos funcionais presentes na molécula da cianocobalamina. O espectro obtido é igual ao apresentado nas referências GUO, Z. *et al* (2005) e STANDARD INFRARED PRIM SPECTRA (1961).

Tabela V.17 - Principais bandas do espectro no IV da Formulação 1

BANDAS	GRUPOS
3448 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento de ligação OH (vibracional da água e de Si-OH)
1640 $\text{cm}^{-1}$	Água molecular (VIITALA, 2005)
1000 a 1250 $\text{cm}^{-1}$	Largo pico referente a vários picos devido a $\text{SiO}_2$ e álcool residual (LENZA, 2002; VIITALA, 2005)
1092 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si
939 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento da ligação Si-OH e/ou Si-O-R (R= $\text{CH}_2\text{CH}_3$ )
795 $\text{cm}^{-1}$	Vibração de estiramento simétrico de Si-O

A ampla banda de  $3000 - 3800\text{cm}^{-1}$  é composta pela combinação e superposição de vários modos de estiramento das vibrações do grupo silanol e água adsorvida (BRINKER; SCHERER, 1990), conforme se observa nos espectros das Formulações 1 e 2.

O espectro da Formulação 2 (Figura 5.11), embora apresente banda em  $1654\text{cm}^{-1}$ , que poderia ser referente ao estiramento da ligação C=O de amida da cianocobalamina, está junto à banda referente à água molecular observada no espectro da Formulação 1. Isso se deve, provavelmente, à baixa quantidade da cianocobalamina presente na amostra (a amostra foi diluída em KBr). Assim como nos espectros das Formulações 3, 5, 6, 8 e 11 (Anexo 1), o espectro da Formulação 2 não apresenta sinais que tornem possível qualquer tentativa de identificação de cianocobalamina.

O não aparecimento nos espectros das Formulações 1 a 11 (salvo Formulação 9, não realizado) das bandas em torno de  $1167\text{cm}^{-1}$  e em  $784\text{cm}^{-1}$ , referentes à vibração angular das ligações Si-O-C e deformação Si-O-C, sugerem que a hidrólise se completou durante o processo (LENZA, 2002). Outros picos indicadores de resíduos orgânicos em  $980-1130\text{cm}^{-1}$  para etanol,  $1200-1290\text{cm}^{-1}$  para C-O e  $2830-3040\text{cm}^{-1}$  para  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_3$  não foram observados.

Os espectros das Formulações 3, 4, 6, 8 e 11 apresentaram bandas similares às observadas para a Formulação 2 e os espectros das micropartículas brancas correspondentes às Formulações 4, 7 e 10 apresentaram bandas similares às apresentadas no espectro da Formulação 1 (Anexo 1).

## **5.7. ANÁLISE TÉRMICA**

Foram analisadas as amostras de cianocobalamina (matéria-prima), Formulação 3, Formulação 4, Formulação 10 e Formulação 11 pela técnica de TG sob gás inerte e em ar sintético.

Foram comparadas as curvas DSC, sob gás inerte e ar sintético, da cianocobalamina. Para melhor análise da região abaixo de  $140^\circ\text{C}$  e visualização da transição vítrea da estrutura da cianocobalamina, curvas de DSC foram obtidas por aquecimento,

resfriamento e novo aquecimento na razão de 10°C/min utilizando-se hélio como gás de purga.

### Análise da cianocobalamina

A Figura 5.12 mostra a curva TG para cianocobalamina matéria-prima realizada na faixa de temperatura de 25°C a 1000°C numa taxa de aquecimento de 10°C/min, sob gás inerte (N<sub>2</sub>). A curva TG mostra perda de 7,3% de massa a partir de 60°C, região que indica remoção de água. Após a remoção de água, um platô é observado até 240°C, sugerindo a existência de composto estável. Contudo, GOLDSTEIN; DUCA (1982) estudaram a curva de TG entre 140°C a 230°C usando uma taxa de aquecimento de 3°C/min e observaram processo envolvendo perda de massa de aproximadamente 2% entre 140°C e 145°C. Utilizando outras técnicas analíticas puderam confirmar ser esta remoção devido ao grupo ciano da estrutura da cianocobalamina (teoricamente, o grupo ciano representa 1,92% da massa de cianocobalamina).

Acima de 240°C o produto formado mostrou ser muito sensível ao aumento da temperatura. Deste modo, o produto começa a se decompor e extensivas modificações ocorrem em boa concordância com dados publicados na literatura (GOLDSTEIN, 1982). A cianocobalamina não atingiu um patamar de perda a 1000°C, sendo encontrado resíduo de aproximadamente 12% (Figura 5.12).

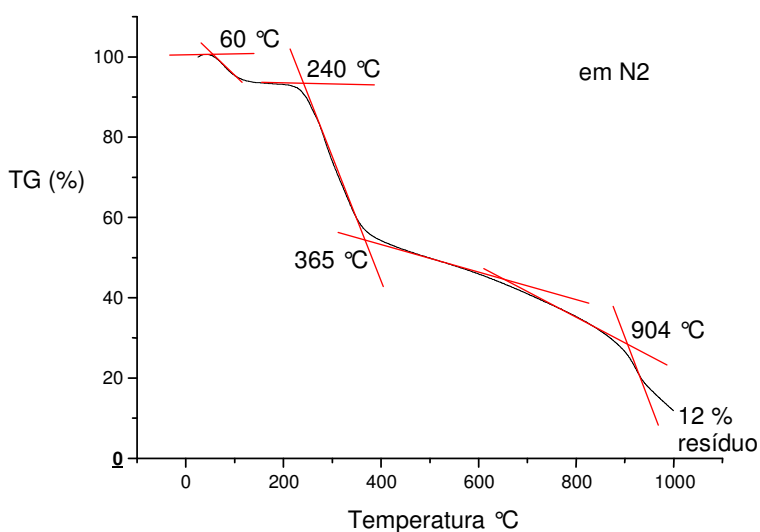


Figura 5.12 - Curva TG em N<sub>2</sub> da cianocobalamina



As curvas de DSC da Figura 5.13 mostram um evento endotérmico alargados de 25°C até aproximadamente 150°C e que pode ser atribuído à evolução da água e está congruente com a análise da curva TG apresentada. A partir de 210°C, sob ambas condições atmosféricas, sucessivos eventos endotérmicos são observados em decorrência da degradação da cianocobalamina e estão associados à perda de massa. Sob ar sintético, a degradação é observada como um desvio endotérmico da linha de base e, provavelmente, é resultante de um mecanismo diferente de degradação, se comparado ao observado para atmosfera em N<sub>2</sub>, e/ou escapamento de voláteis do cadinho.

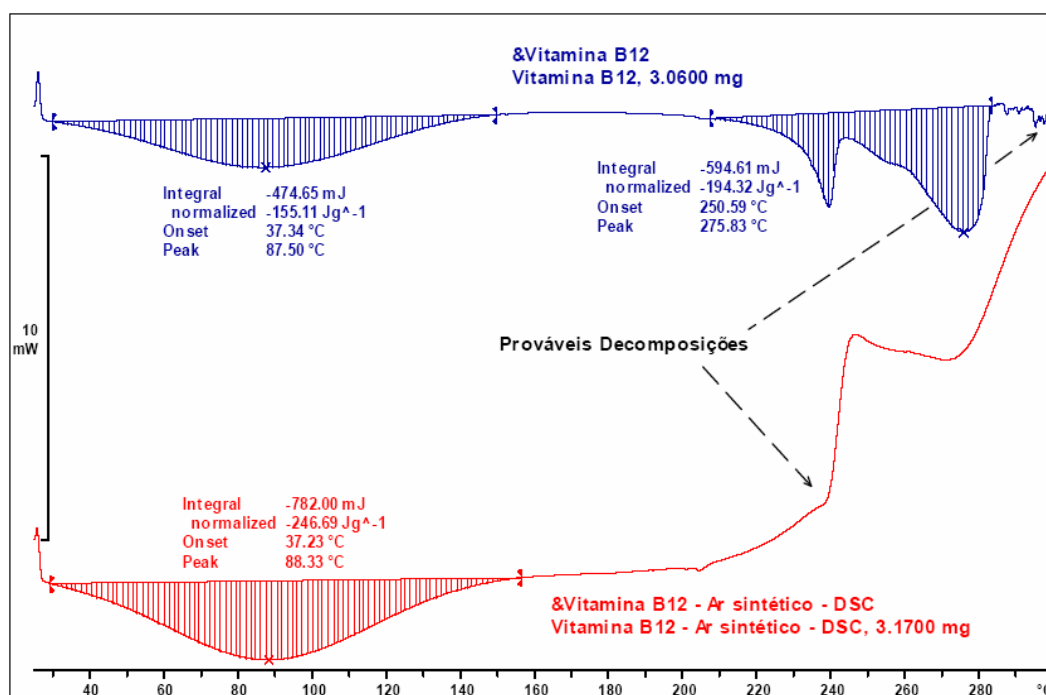


Figura 5.13 - Curva DSC da cianocobalamina sob ar sintético e nitrogênio.

A fim de avaliar as transições de fase da cianocobalamina a temperaturas mais baixas, curvas de DSC foram obtidas pela secagem da amostra, acompanhamento do resfriamento e durante o segundo aquecimento.

A Figura 5.14 mostra a curva DSC da cianocobalamina durante a secagem da amostra. O evento endotérmico é atribuído à perda de água da amostra.

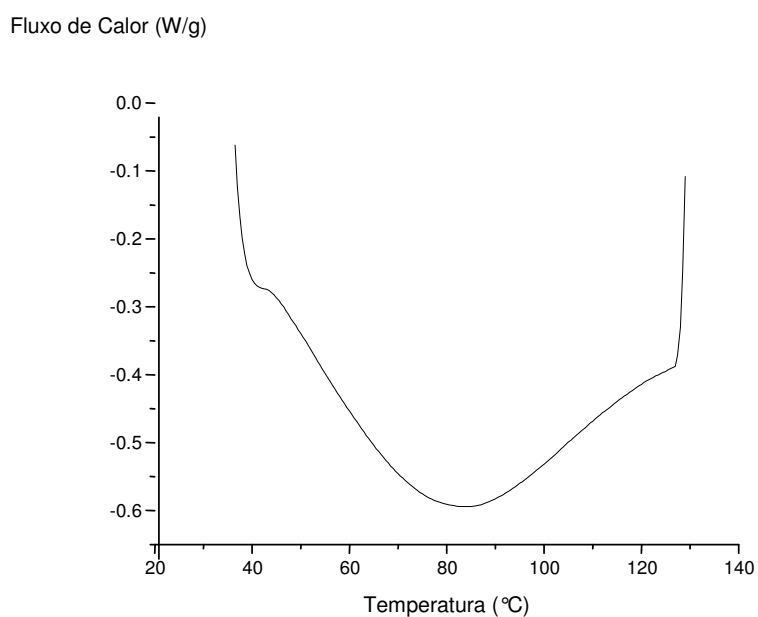


Figura 5.14 - Curva DSC de secagem da cianocobalamina.

A curva DSC de resfriamento (Figura 5.15) requer maior estudo para seu entendimento. Uma hipótese é que o evento esteja associado à transição vítrea da amostra em que a estrutura passa de um estado mais flexível para uma estrutura mais rígida, de menor mobilidade.

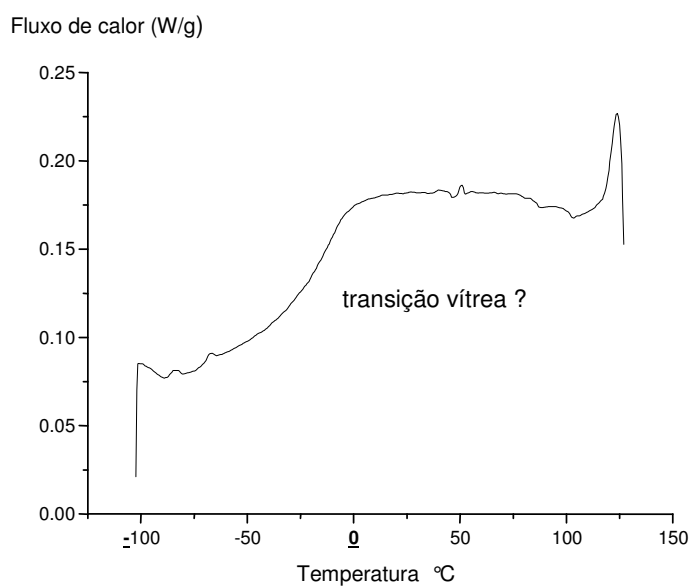


Figura 5.15 - Curva DSC de resfriamento da amostra de cianocobalamina.

A Figura 5.16 apresenta a curva DSC do segundo aquecimento da amostra. A hipótese é que o primeiro evento endotérmico seguido de outro exotérmico poderiam ser atribuídos, respectivamente, à recristalização e fusão da água associada à estrutura, ou seja, água que permaneceu na estrutura por estar fortemente ligada à mesma. Possivelmente, durante o resfriamento da amostra não houve tempo para que a cristalização ocorresse.

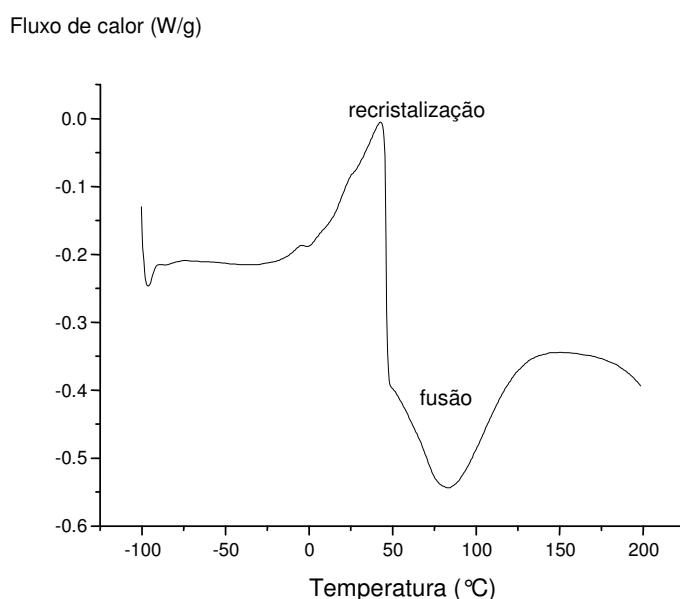


Figura 5.16 - Curva DSC do segundo aquecimento da amostra de cianocobalamina.

Ressalta-se que o experimento foi realizado uma única vez e, portanto, requer mais repetições para esclarecimento dos resultados. Contudo, maior aprofundamento sobre a descrição do comportamento térmico da cianocobalamina foge ao objetivo deste trabalho.

Análise das curvas TG das Formulações 3, 4, 10 e 11 em atmosfera de N<sub>2</sub>

Os gráficos da Figura 5.17(a) e (b) mostram a curva TG e DTG, respectivamente, da Formulação 4 (microesferas brancas, pH=2,3). A perda de massa total é de aproximadamente 16,5% e ocorre de forma contínua entre 25°C e 900°C. Até 152°C a perda de massa foi de 8%, sendo que o pico de DTG mostra que o máximo desta perda ocorreu a 79°C. Outros eventos de perda de massa ocorreram a 238°C e 521°C. Pode-se considerar que a perda de massa à temperatura de 79°C deve estar

associada a uma perda de voláteis mais fracamente associados à estrutura (umidade, resíduos de etanol). Por sua vez, os eventos em mais altas temperaturas devem estar associados a mudanças na estrutura do material.

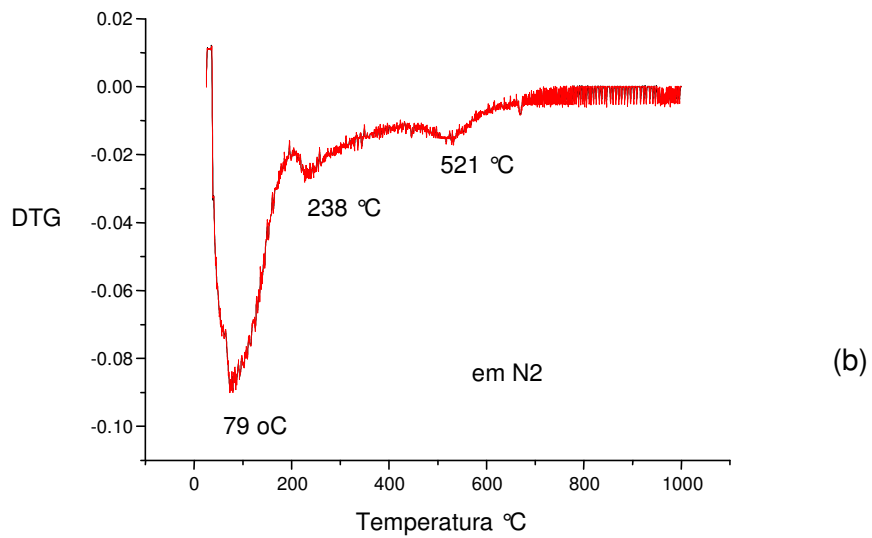
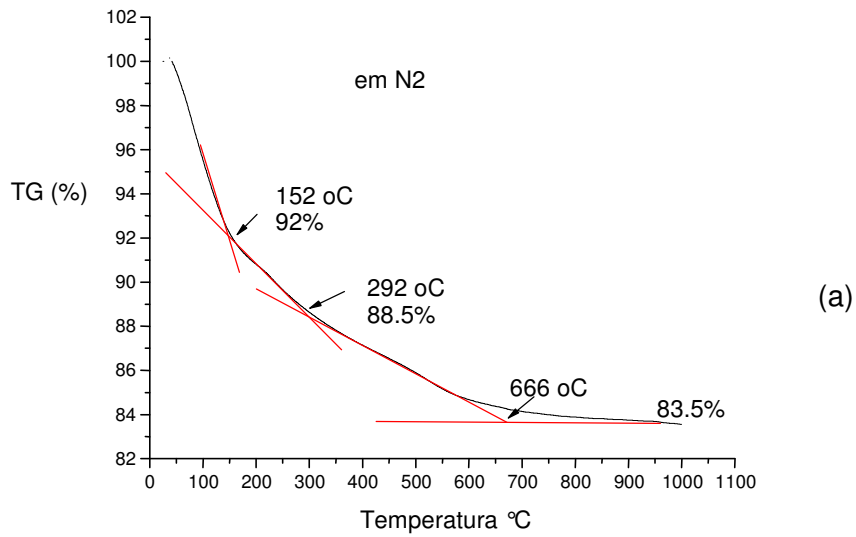


Figura 5.17 – Curvas TG (a) e DTG (b) para a Formulação 4.

A reestruturação do material foi demonstrada por LENZA (2002) a partir dos espectros de FT-IR de amostras de monolitos de sílica. Em amostras tratadas a temperaturas superiores a 110 °C ocorre um aumento gradual do pico a 3750  $\text{cm}^{-1}$  e redução do pico em 3400 $\text{cm}^{-1}$ , devido à conversão dos grupos silanóis ligados por ponte de hidrogênio que absorvem na ampla banda centrada em 3400 $\text{cm}^{-1}$  em grupos Si-OH livres que absorvem a 3750  $\text{cm}^{-1}$ .

A curva TG da amostra da Formulação 3 (microesfera carregada, pH=2,3) mostra perfil de degradação térmica em  $\text{N}_2$  similar ao da Formulação 4 (microesferas brancas, pH=2,3) (Figura 5.18).

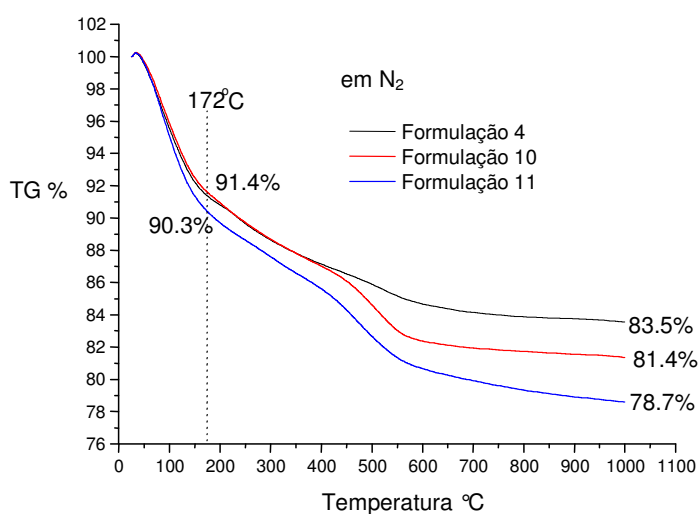
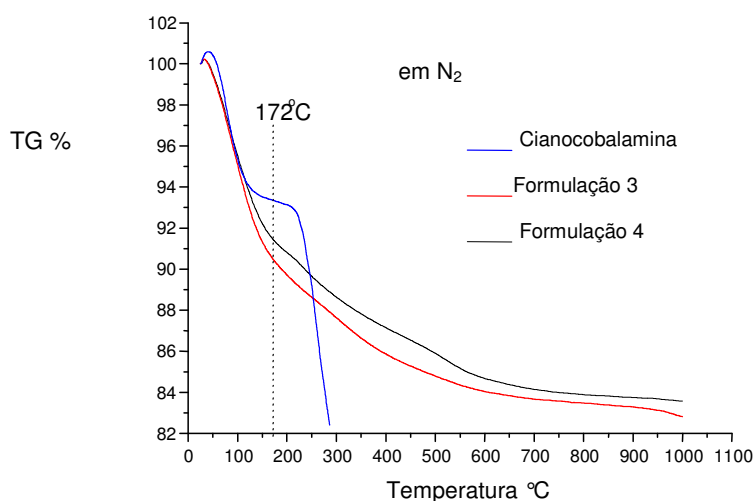


Figura 5.18 - Curvas TG para cianocobalamina, Formulação 3, Formulação 4, Formulação 10 e Formulação 11 em  $\text{N}_2$ .

Conforme mostra a Figura 5.18, a 172°C a amostra da Formulação 3 apresenta uma perda de massa superior ao da cianocobalamina e da Formulação 4 e o mesmo ocorre para a Formulação 11 (matriz híbrida com cianocobalamina) em comparação com as Formulações 4 e 10 (matriz híbrida branca). Apesar da variação ser muito pequena, este fenômeno pode sugerir diferenças de secagem das amostras durante o processo de *spray drying* e/ou início da degradação da cianocobalamina em temperaturas mais baixas (iniciando-se em 172°C e não a 240°C) por efeito do processo em condições de pH muito ácido (o pH ótimo de estabilidade é de 4,0 a 4,5).

Pode ser observado nas Figuras 5.18 que o polietilenoglicol não introduz uma maior perda de volátil até 400°C e só inicia sua degradação acima de 400°C. Já a curva da Formulação 11 mostra uma perda de 1% de massa superior às Formulações 4 e 10 a 172°C.

#### **Análise das curvas TG em atmosfera de ar**

Ressalta-se que a atmosfera oxidante pode alterar totalmente os mecanismos de decomposição. De fato, pode-se comprovar neste estudo, alterações importantes na curva TG da cianocobalamina em ar quando comparada à curva obtida sob nitrogênio.

Até 240°C o comportamento da cianocobalamina sob ar não se difere ao observado no ensaio sob N<sub>2</sub> e a perda de massa foi de 7,5% devido à umidade. Após o patamar de estabilidade, a degradação ocorre de forma mais complexa até 800°C. Um novo patamar é alcançado até 1000°C com um residual de 10% de massa (Figuras 5.19 e 5.20). Se considerada a umidade residual, o resíduo passaria para 11% da forma anidra. Este resíduo pode ser devido ao óxido de cobalto e há indicação de que se trata de Co<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, pois um resíduo deste tipo corresponderia a 12% da massa original anidra, ou seja, está próximo dos 11% obtidos. Impurezas ou mesmo o limite de precisão da TG seriam responsáveis pela diferença.

Os dados obtidos através das curvas TG em ar (Figura 5.20) permitem estimar a quantidade de cianocobalamina presente na amostra correspondente à Formulação 3. No início da TG da amostra de sílica branca (S) + cianocobalamina (C) a soma da quantidade dos dois compostos fornece 100% do material.

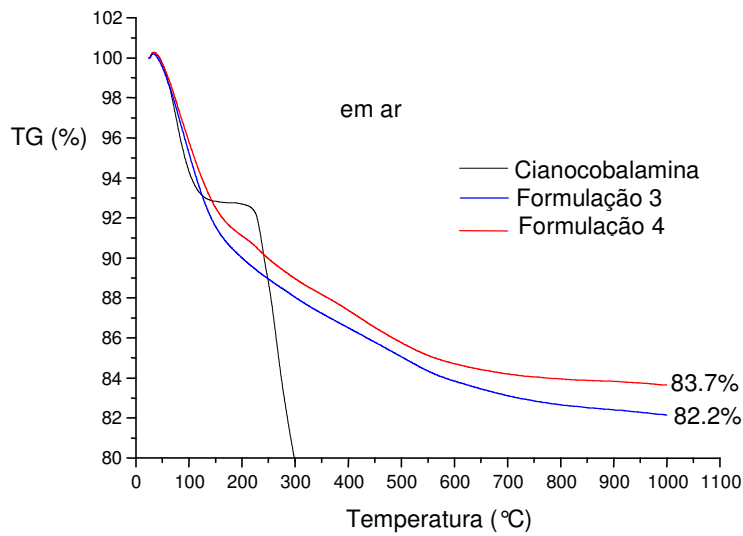


Figura 5.19 – Curvas TG das amostras de cianocobalamina, Formulação 3 e Formulação 4 sob ar sintético.

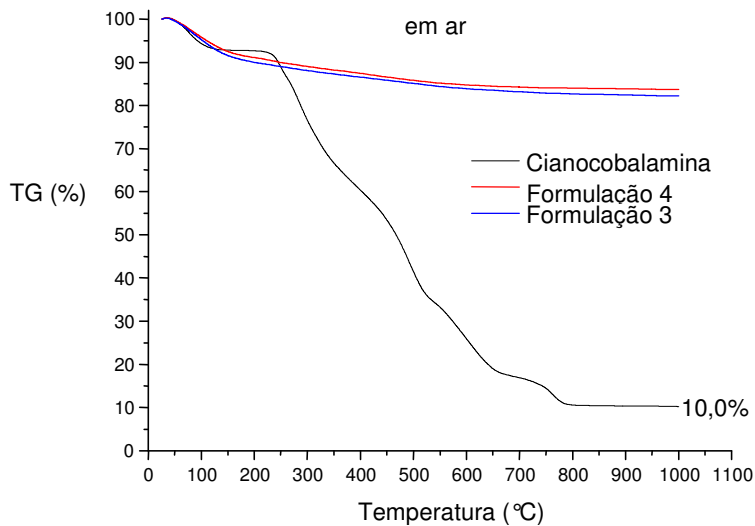


Figura 5.20 - Curvas TG da cianocobalamina, Formulação 3 e Formulação 4 em ar sintético: residual de cianocobalamina.

$$S + C = 100 \quad (5.1)$$

Ao final da curva TG da Formulação 3 restou 82,2% de resíduo (r) que é a soma dos resíduos dos dois componentes rS e rC.

$$rS + rC = 82,2\% \quad (5.2)$$

A curva TG da sílica branca (Formulação 4) fornece resíduo de 83,7%, ou seja,

$$S = rS \times 100/83,7 \quad \rightarrow \quad S = rS \times 1,19 \quad (5.3)$$

A curva TG da cianocobalamina fornece resíduo de 10%, ou seja,

$$C = rC \times 100/10 \quad \rightarrow \quad C = rC \times 10. \quad (5.4)$$

Utilizando as Eqs.5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 pode-se obter os valores das 4 incógnitas: S, C, rS e rC.

O valor de C, quantidade de cianocobalamina, na Formulação 3, é de 2%p/p nesta avaliação.

Um fator importante a levar em conta no cálculo acima é que se pressupõe que a natureza do resíduo é a mesma independente das amostras estarem puras ou misturadas. Ou seja, supõe-se não haver alteração do mecanismo de degradação de sílica e cianocobalamina quando estão em presença uma da outra, o que deve ser analisado com cuidado e estudado por outras técnicas físico-químicas.

Pode-se considerar que a degradação do PEG deve ser quase completa e deixar um resíduo próximo de 0%. Neste caso, a diferença de 3% (83,7-80,7) de resíduo entre a Formulação 4 e a Formulação 10 pode corresponder à quantidade deste componente na amostra (Figura 5.21).



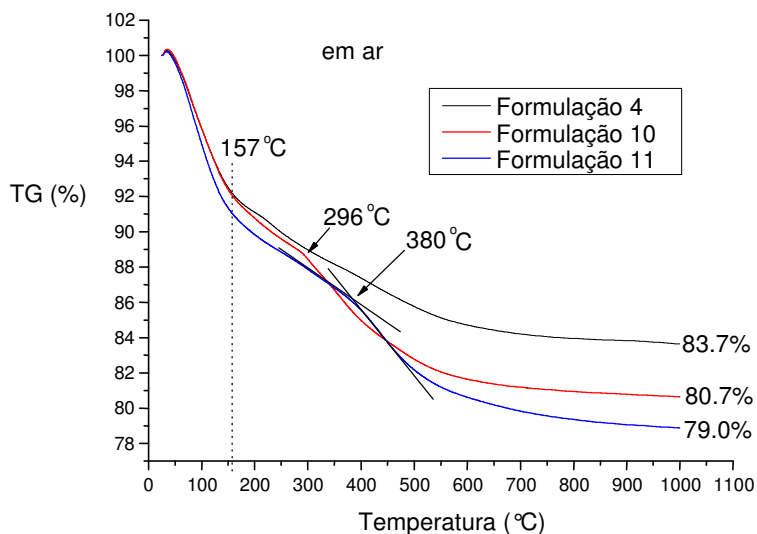


Figura 5.21 - Curvas TG para Formulação 3, Formulação 10 e Formulação 11, em ar.

Observa-se na Figura 5.21 que o início da degradação (após evolução dos voláteis) ocorreu a 296°C para a amostra da Formulação 10 e a 380°C para a amostra da Formulação 11. Esta alteração sugere algum tipo de interação entre os componentes (PEG e cianocobalamina) que leva à estabilização do sistema.

Através de sistemas de equações similares ao utilizado para cálculo da quantidade de cianocobalamina nas microesferas da Formulação 3, obteve-se valor de apenas 0,6%p/p de cianocobalamina nas microesferas da Formulação 11. Deve-se levar em consideração a possibilidade de heterogeneidade da amostra em fração muito pequena que é utilizada para análise por TG e a necessidade de validação do ensaio para garantir a confiabilidade no resultado.

A análise das curvas TG das microesferas de sílica mostra que este material sofre degradações com o aumento da temperatura. Uma questão resultante deste tipo de instabilidade é a possibilidade deste material sofrer alterações significativas de sua estrutura e composição considerando a armazenagem deste material à temperatura ambiente. Consequentemente, as alterações podem alterar o perfil de liberação da cianocobalamina à medida que ocorre o envelhecimento das microesferas. Por outro lado, os fenômenos podem não ocorrer em condições de temperatura ambiente ao longo de um prazo de tempo razoável, o que não impediria a sua utilização.

## 5.8. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

A difração de raios X possibilita averiguar a natureza amorfa ou cristalina das substâncias e acompanhar fenômenos relacionados com a cristalização de géis.

Amostras de cianocobalamina e formulações obtidas sob diversas condições de reação – pH, diluição e presença de PEG, ou seja, Formulações de 1 a 11 foram investigadas. Os resultados dos difratogramas de raios X da cianocobalamina, Formulação 3 (sílica carregada com cianocobalamina) e Formulação 4 (sílica branca) representam todo o conjunto (Figuras 5.22, 5.23 e 5.24).

Tal como o difratograma da Formulação 4, os difratogramas das Formulações 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10 e 11 mostraram que os materiais obtidos eram amorfos, não apresentando pico que pudesse ser atribuído à presença de fase cristalina (Anexo 2). Salvo, o difratograma da Formulação 3 que apresentou picos discretos coincidentes com os observados na curva da amostra de cianocobalamina.

A forma dos padrões de difração da cianocobalamina indica tratar-se de material semi-cristalino com picos proeminentes correspondentes às distâncias interplanares “d” iguais a 10, 92Å, 967Å, 2,35Å, 2,04Å, 1,44Å e 1,22Å (Figura 5.22)

Analisando os difratogramas das microesferas de sílica carregadas com cianocobalamina, observa-se que houve uma redução da cristalinidade da cianocobalamina e obtenção de um sólido amorfo. Este fenômeno pode ser devido ao processo de *spray drying* (uma rápida secagem não permitiria a cristalização da substância) ou a não detecção pela técnica (baixa concentração de cianocobalamina na amostra).

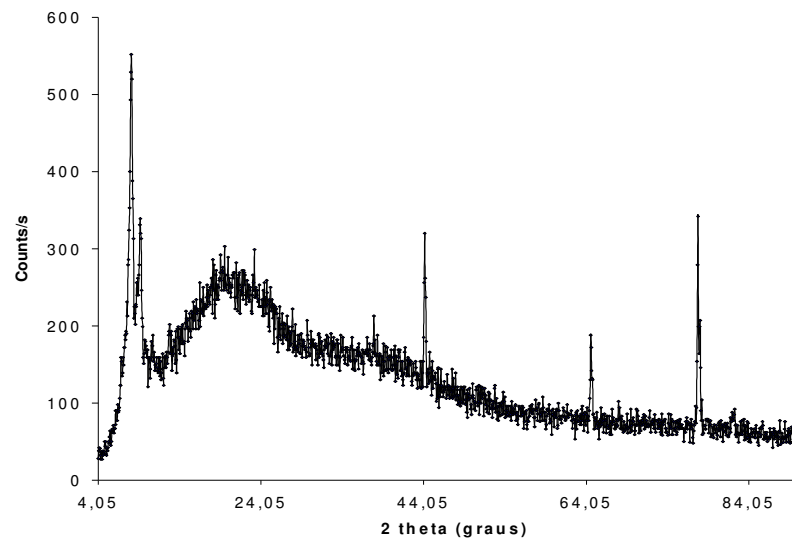


Figura 5.22 - Difratoograma da cianocobalamina matéria-prima.

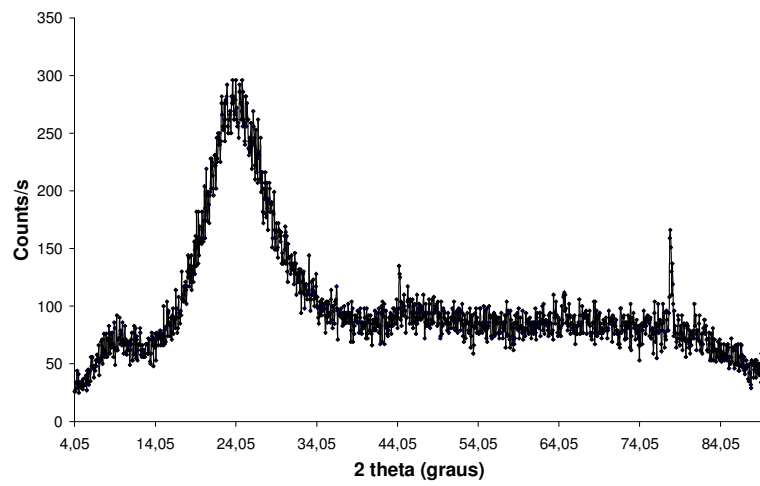


Figura 5.23 - Difratoograma da Formulação 3.

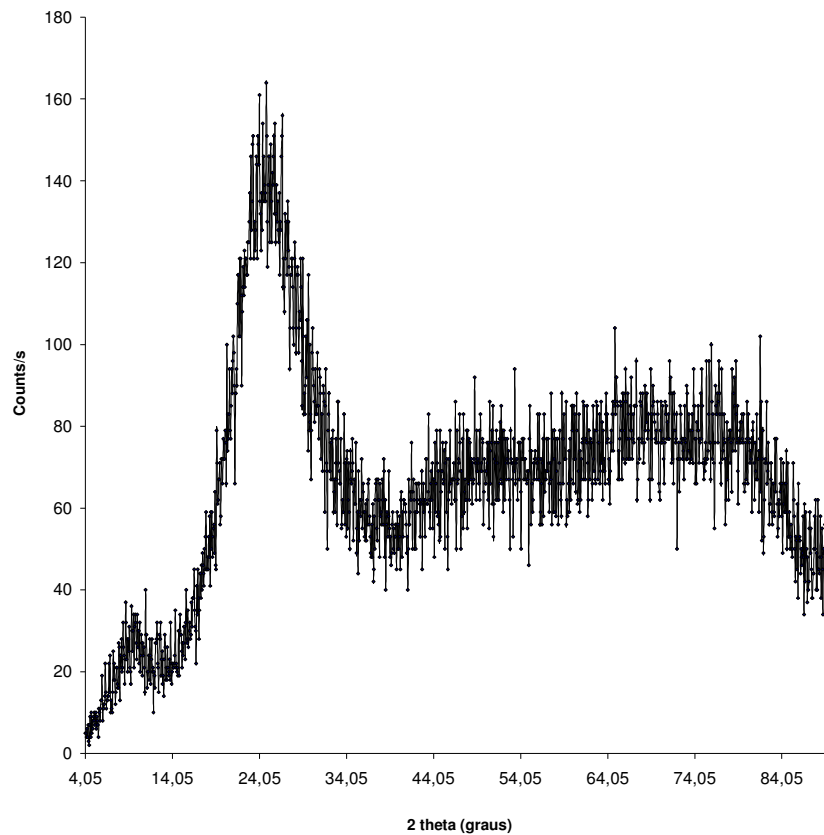


Figura 5.24 - Difratograma Formulação 4.

A cristalização é uma característica especial do sólido em que as moléculas se auto-organizam em padrões moleculares regulares e repetitivos. Ressaltam-se três papéis importantes em que o solvente participa do processo de cristalização: dissolução da substância a fim de obter uma solução concentrada; promoção da nucleação; e, assim como a temperatura e a taxa de resfriamento, o solvente afeta o tipo de empacotamento cristalino (REMINGTON, 2000).

O difratograma da cianocobalamina matéria-prima não apresentou o mesmo padrão de picos de duas amostras de cianocobalamina identificadas pelas fichas 05-0029 e 41-1683 do JCPDS – International Centre for diffraction Data (2001). Esta diferença pode ser explicada pelo processo de síntese que pode resultar em diferentes padrões de cristalização.

Cerca de um terço de todos os fármacos orgânicos são polimórficos, incluindo formas cristalinas e não-cristalinas (amorfas). Cada polimorfo exibe uma distinta propriedade físico-química, incluindo ponto de fusão e hidrossolubilidade (MARTINEZ, 2002). CARSTENSEN (2001) ressalta que a cristalização é um fenômeno muito importante na área farmacêutica porque a morfologia pode afetar a processabilidade e a dissolução das partículas. Normalmente, a purificação é a última etapa de produção de um fármaco, e esta é, frequentemente, obtida por recristalização.

Ressalta-se que a modificação de cristalinidade pode ter impactos na estabilidade e no perfil de liberação do sistema, uma vez que estruturas amorfas são mais energéticas que qualquer forma cristalina, apesar da literatura apresentar algumas exceções. Em decorrência, o sólido amorfo, em geral é menos estável física e quimicamente e apresenta maior taxa de dissolução (REMINGTON, 2000; CARSTENSEN, 2001).

## **5.9. MICROSCOPIA E MICROANÁLISE ELETRÔNICA**

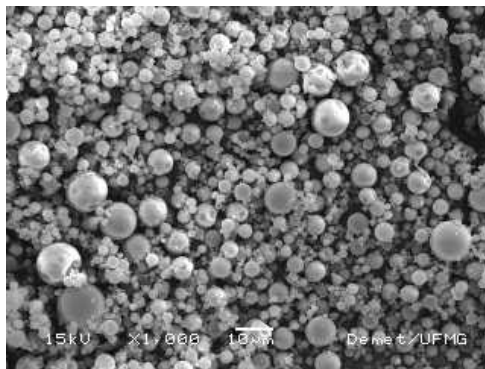
As amostras foram avaliadas em diversos aumentos. A Figura 5.25 apresenta fotomicrografias das Formulações 1, 3, 5, 6, 8, 11, 12, 13 e 14 com aumentos de 1000x e 5000x .

As microesferas apresentam-se de forma esférica, superfície lisa e não porosa. Os tamanhos observados nas fotomicrografias são compatíveis com aqueles obtidos pela técnica de difração de raios laser. Por sua vez, as microesferas brancas correspondentes às Formulações 1, 4, 7 e 10 apresentaram as mesmas características morfológicas descritas (Anexo 3).

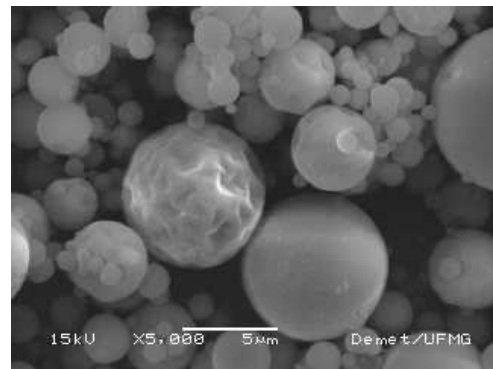
As microesferas das Formulações 1, 11, 12 e 13, entre outras, apresentaram cavidade (forma “doughnut”) ou estrutura colapsada, provavelmente devido à rápida solidificação da superfície das gotas ou fluxo muito rápido (GZURYSZKIEWICZ,2005; VIITALA, 2005).

A Formulação 14 apresentou muitas estruturas aglomeradas e agregadas conforme se observa na Figura 5.25 com ampliação de 1000X. KORTESUO *et al.* (2001) explicou a formação de agregados como resultantes da forte atração entre partículas

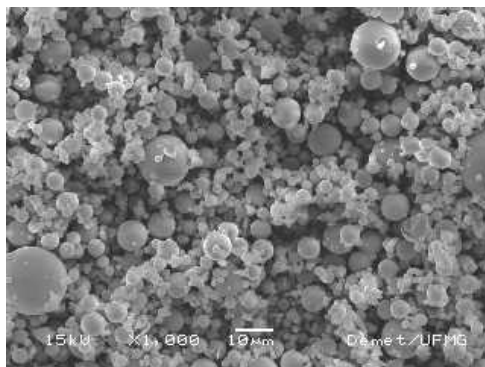
em nível coloidal, indicando que as partículas colaram quando do primeiro contato. Em outro trabalho, KORTESUO *et al.* (2002) ressaltou que quanto maior a diluição maior a quantidade de estruturas aglomeradas. Contudo, esta observação não é evidente nas fotomicrografias das Formulações 8 (Rw=28) e 13 (Rw=28) .



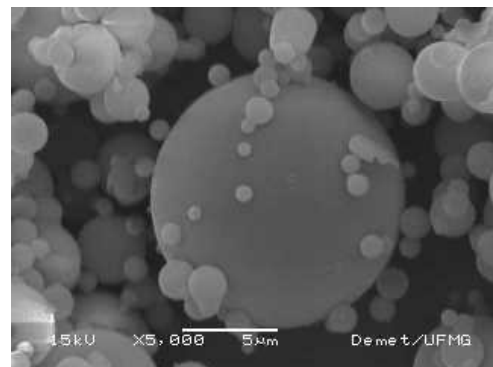
Formulção 2 – 1000X



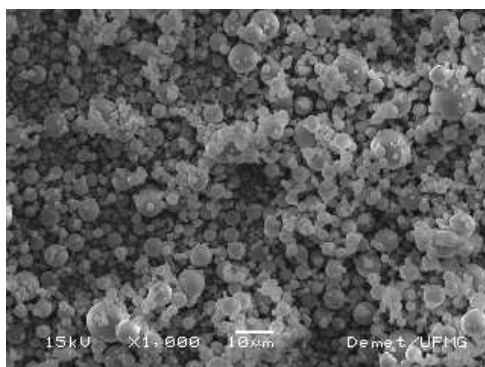
Formulção 2 – 5000X



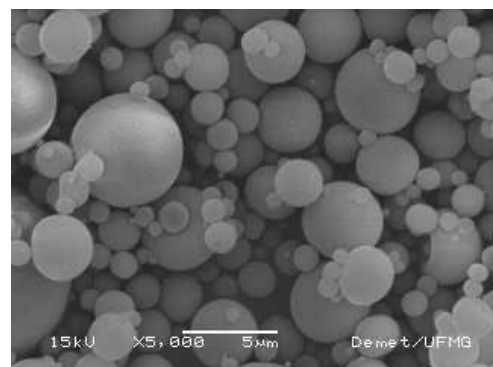
Formulção 3 – 1000X



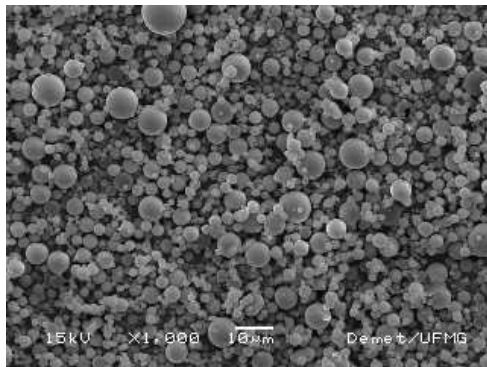
Formulção 3 – 5000X



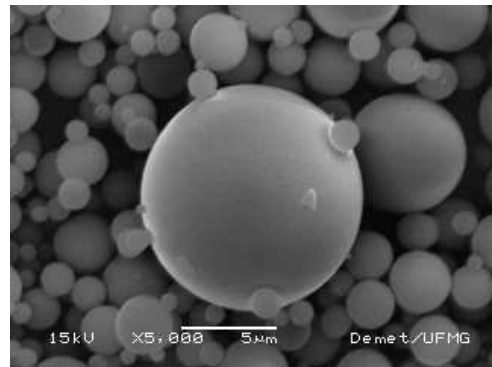
Formulção 5 – 1000X



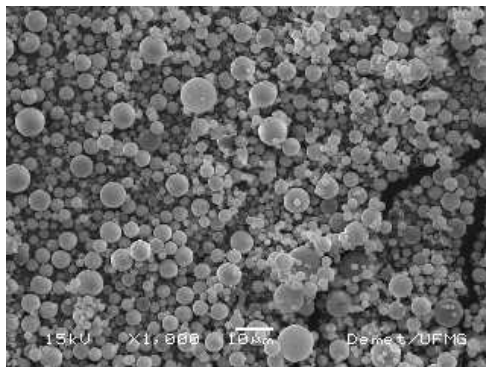
Formulção 5 – 5000X



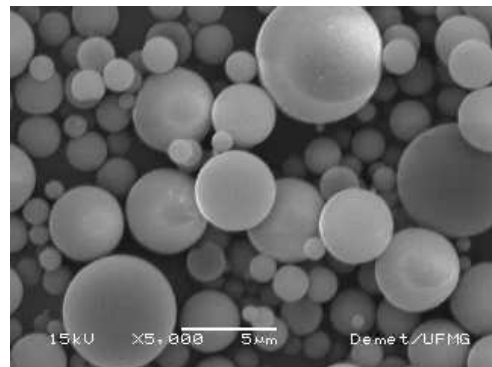
Formulação 6 – 1000X



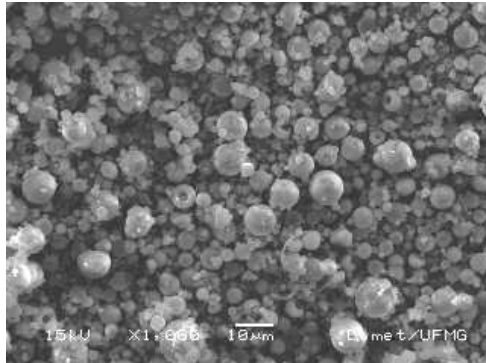
Formulação 6 – 5000X



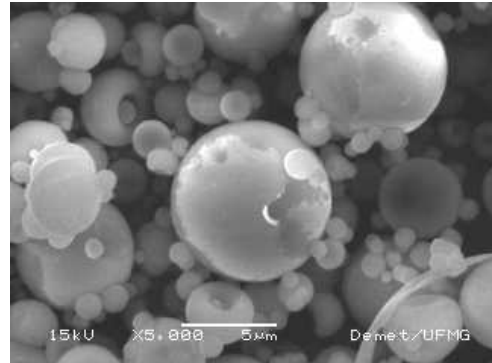
Formulação 8 – 1000X



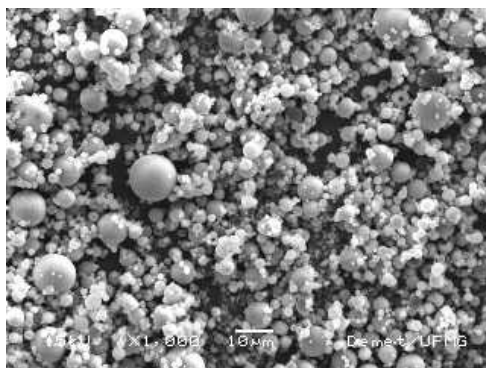
Formulação 8 – 5000X



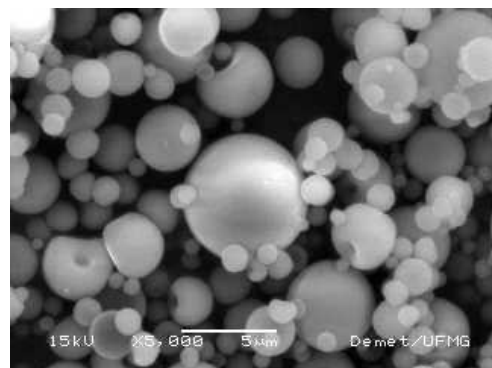
Formulação 11 – 1000X



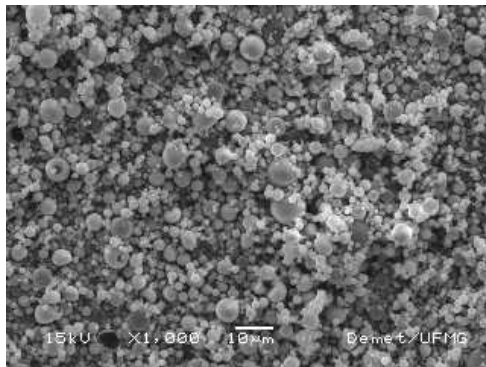
Formulação 11 – 5000X



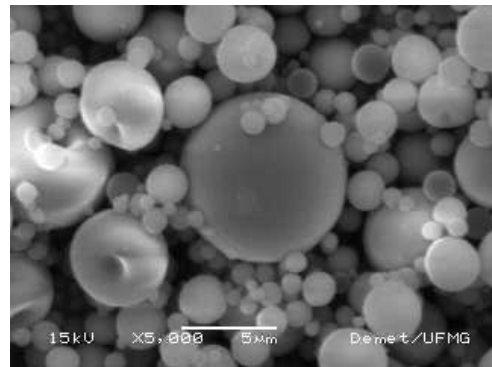
Formulação 12 – 1000X



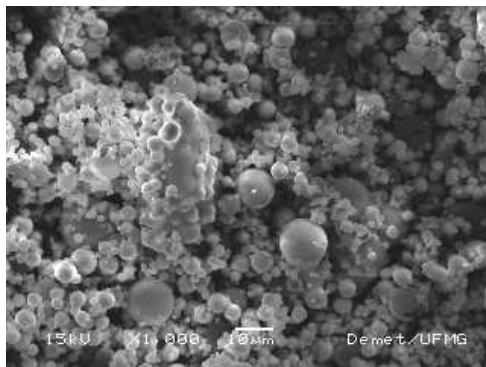
Formulação 12 – 5000X



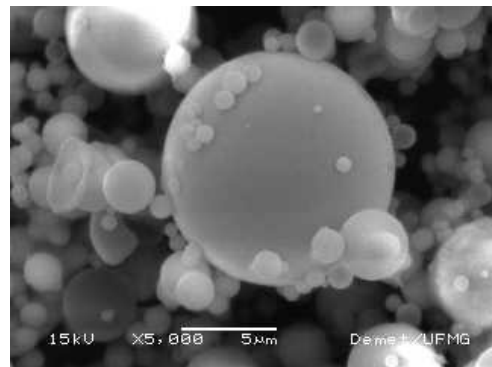
Formulação 13 – 1000X



Formulação 13 – 5000X



Formulação 14 – 1000X

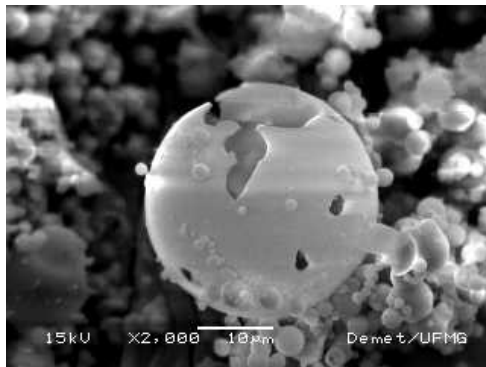


Formulação 14 – 5000X

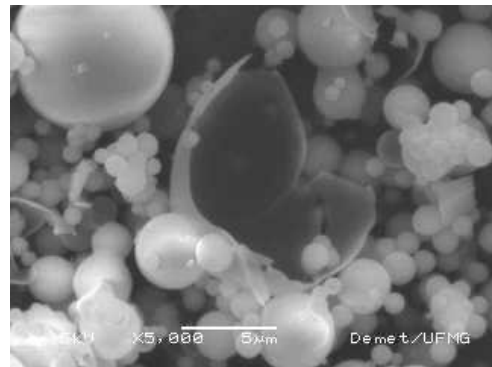
Figura 5.25 - Fotomicrografias das microesferas de sílica contendo cianocobalamina aumentos de 1000x e 5000x (15 kV) das Formulações 2, 3, 5, 6, 8, 11, 12, 13 e 14. Relação Formula e razão molar (TEOS:H<sub>2</sub>O:CIANOCOBALAMINA:PEG 6000/pH):  
 Formulação 2 (1:14:0,001:0/pH=1,0); Formulação 3 (1:14:0,001:0/pH=2,3);  
 Formulação 5 (1:14:0,001:0/pH=3,0); Formulação 6 (1:14:0,002:0)/pH=2,3);  
 Formulação 8 (1:28:0,001:0/pH=2,3); Formulação 11 (1:14:0,001:1,67x10<sup>-4</sup>/pH=2,3);  
 Formulação 12 (1:14:0,001:0/pH=2,3); Formulação 13 (1:28:0,001:0/pH=2,3);  
 Formulação 14 (1:42:0,001:0/pH=2,3).

A Figura 5.26 mostra outros detalhes das fotomicrografias da Formulação 14. Observam-se aglomerados de partículas e estruturas deformadas, ou seja, microesferas maiores com rachaduras, quebradas ou ocas. Inclusive a metalização mostrou-se mais difícil nesta amostra em comparação com as demais formulações.





Formulação 14 – 2000X



Formulação 14 – 5000X

Figura 5.26 - Fotomicrografias da Formulação 14 (aumentos de 2000x e 5000x; 15kV)

Provavelmente, a menor concentração de soluto, a rápida secagem da superfície em alta temperatura e a pressão de vapor interna podem ser responsáveis pela formação de micropartículas ocas ou quebra da estrutura.

Nos espectros por dispersão de energia (EDS) das amostras de microesferas representadas nas Figura 5.27 e 5.28, foram observados os picos dos elementos como O e Si e suas intensidades relativas. Na figura 5.28 não se verificou a presença de Co, certamente por estar em muito baixa concentração na amostra. O pico de Au é devido à metalização da amostra e o de C é devido, principalmente, à fita de carbono usada para suporte da amostra. Nenhum outro elemento foi observado, sugerindo um material de boa pureza. Os espectros EDS para todas as demais amostras são bastante similares (Anexo 4).

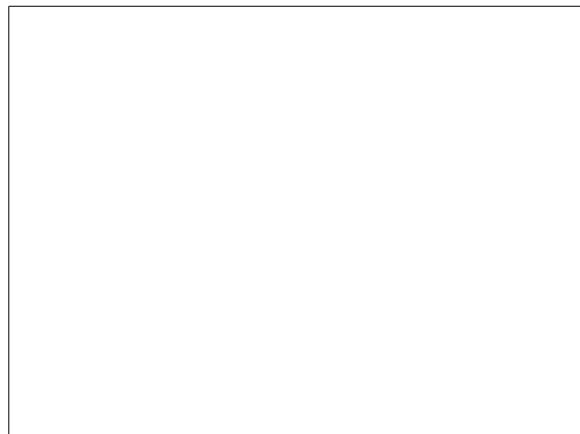


Figura 5.27 - EDS Formulação 1

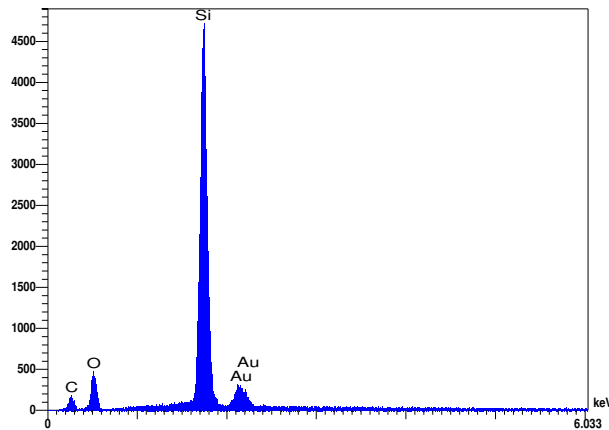


Figura 5.28 - EDS da Formulação 3.

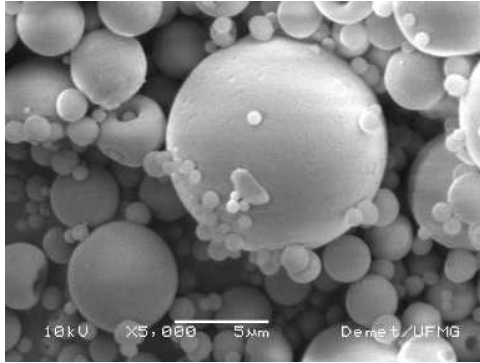
A Figura 5.29 apresenta fotomicrografias das Formulações 12, 13 e 14 após teste de liberação *in vitro*. Observa-se que não houve modificação da superfície ou da forma das microesferas.

#### 5.10. ANÁLISE POR ADSORÇÃO DE NITROGÊNIO

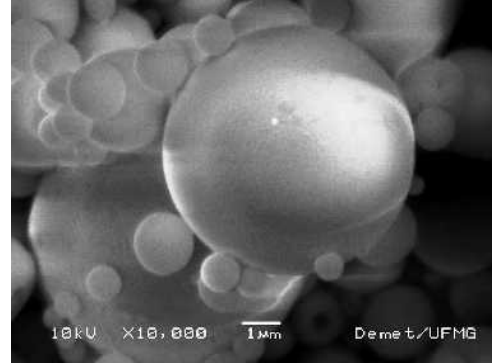
Os resultados da área superficial e do volume total de poros das Formulações 3, 12, 13 e 14 utilizando método de BET, estão na Tabela V.18. Foram tomados 5 pontos de pressão nas análises que apresentaram alto coeficiente de correlação para as Formulações 13 e 14 e mediano para Formulações 3 e 12. Esses resultados concordam com os valores obtidos por CZURYSZKIEWICZ *et al.* (2005), que encontraram para microesferas de sílica preparadas pela técnica de *spray drying* uma área superficial de 2 m<sup>2</sup>/g.

Tabela V.18 - Área superficial das microesferas de sílica

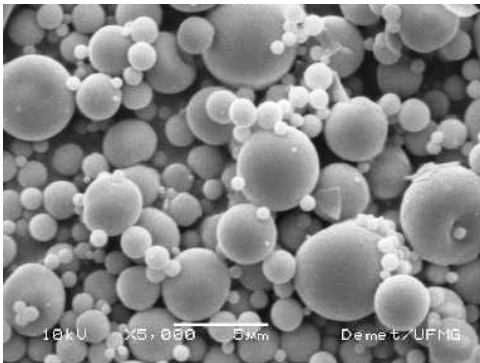
	microesfera de sílica	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Coeficiente de correlação (r)
	Formulação 3	0,01	0,8568
	Formulação 12	0,02	0,7930
	Formulação 13	0,20	0,9975
	Formulação 14	0,60	0,9921



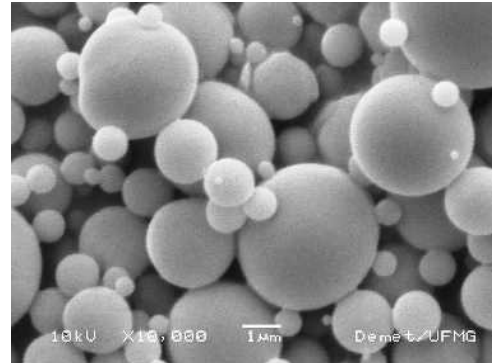
Formulação 12 – 5000x



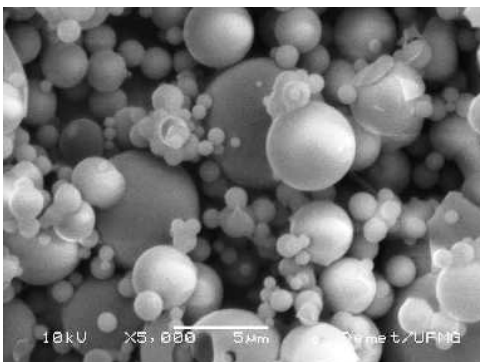
Formulação 12 – 10000x



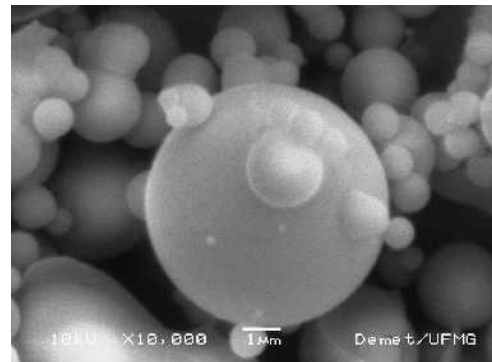
Formulação 13 – 5000x



Formulação 13 – 10000x



Formulação 14 – 5000x



Formulação 14 – 10000x

Figura 5.29 - MEV das Formulações 12, 13 e 14 após ensaio de liberação *in vitro* (aumentos de 5000x e 10000x; 10kV). As Formulações 12, 13 e 14 apresentam  $R_w$  de 14, 28 e 42, respectivamente.

Quanto ao volume específico dos poros, as Formulações 3, 12, 13 e 14 apresentaram valores abaixo do limite de detecção do equipamento ( $< 10^{-4} \text{ cm}^3/\text{g}$ ). Este resultado mostra que as microesferas estudadas apresentam poros muito pequenos ou não têm porosidade.

Contudo, uma observação importante é que, seguindo o efeito da diluição, observa-se que o valor de área superficial aumenta em 30X com o aumento de  $R_w$ , ou seja, a área superficial da Formulação 14 ( $R_w 42$ ) > Formulação 13 ( $R_w 28$ ) > Formulação 3 ou 12 ( $R_w 14$ ). Esta avaliação é feita com ressalva da análise estar fora da faixa ótima de leitura do aparelho (medidas em torno de  $50 \text{ m}^2/\text{g}$ ) e apresentar correlações lineares menores que 0,9 para as Formulações 3 e 12. Este aumento de área superficial pode ser devido à formação de micropartículas ocas com aumento de  $R_w$ , com fissuras ou quebradas, conforme foi verificado na análise por MEV (Figura 5.26).

## **5.11. PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO***

### **Liberação *in vitro* utilizando sacos de diálise**

Os resultados do experimento utilizando sacos de diálise estão apresentados na Figura 5.30 para as Formulações 3, 5, 6 e 8 ( $n=2$ ) e na Figura 5.31 para as Formulações 2 e 11 ( $n=3$ ).

A Figura 5.30 mostra duas etapas de liberação, uma longa fase *lag* durante os cinco primeiros dias e um efeito *burst* no sexto dia. Após 22 dias, a quantidade de cianocobalamina liberada foi de  $511 \mu\text{g}$ ,  $468 \mu\text{g}$ ,  $1197 \mu\text{g}$  e  $412 \mu\text{g}$  para as Formulações 3, 5, 6 e 8, respectivamente. Estes valores equivalem a cerca 5% do valor teórico de cianocobalamina, sugerindo que a maior parte do fármaco está incorporada na estrutura e é liberada muito lentamente.

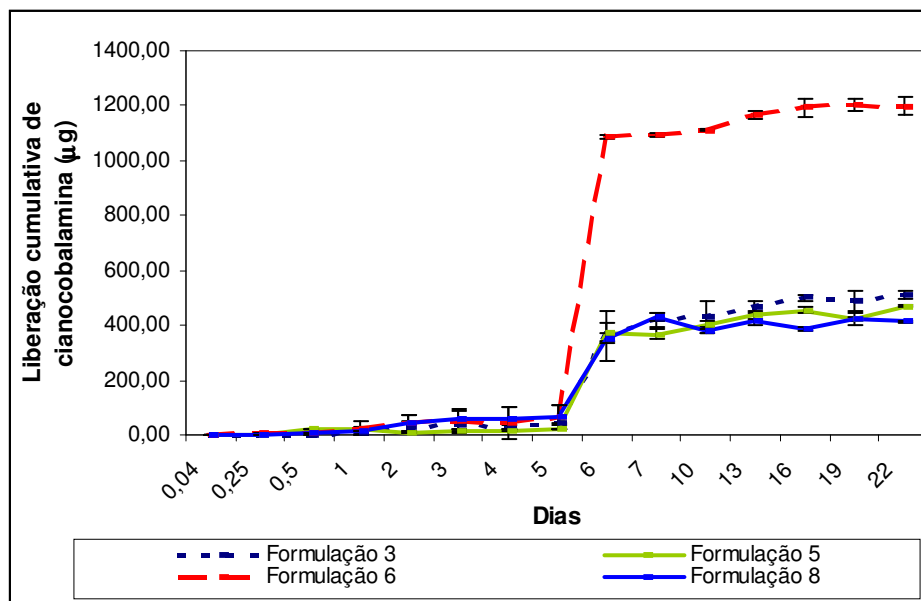


Figura 5.30 - Ensaio de liberação *in vitro* das Formulações 3, 5, 6 e 8 em sacos de diálise. A razão molar TEOS:H<sub>2</sub>O:CIANOCOBALAMINA:PEG 6000 foi de 1:14:0,001:0 (pH=2,3), 1:14:0,001:0 (pH=3,0), 1:14:0,002:0 (pH=2,3) e 1:28:0,001:0 (pH=2,3) para as Formulações 3, 5, 6 e 8, respectivamente.

As Formulações 2 e 11 apresentaram perfis de liberação diferentes das Formulações 3, 5 e 6 nos primeiros dias e, a partir do sétimo dia, atingiram nível e perfil de liberação de cianocobalamina semelhantes (Figura 5.31). Ou seja, na primeira fase, do primeiro ao sétimo dia, a taxa de liberação é mais rápida e após observa-se uma liberação mais lenta (menor inclinação da curva).

Nestes experimentos, entre as Formulações 2, 3, 5, 8 e 11 a maior e a menor quantidade de cianocobalamina liberada ao final do experimento foi para a Formulação 11 (582µg) e a Formulação 2 (360µg), respectivamente. Em relação ao percentual de liberação a diferença das Formulações 6 e 11 é pequena, ou seja, 5,27% e 5,11% do valor teórico, respectivamente.

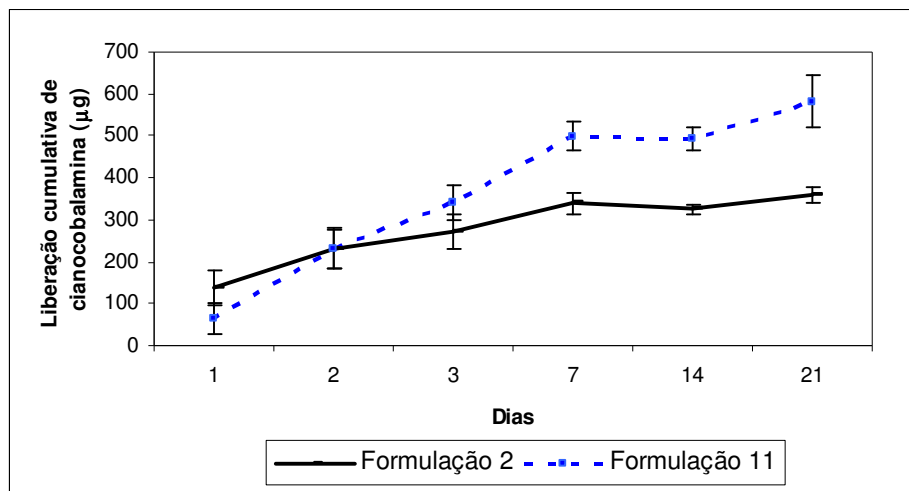


Figura 5.31 - Ensaio de liberação *in vitro* das Formulações 2 e 11 em sacos de diálise. A Formulação 2 foi obtida a partir de fase sol pH=1 e a Formulação 11 é um híbrido sílica/PEG preparada em fase sol pH=2,3.

Esperava-se uma liberação mais rápida da cianocobalamina nas Formulações 2 e 11. No caso da Formulação 2, sabe-se que o pH mais ácido desfavorece a reação de condensação, o que resulta em um material de mais fácil dissolução. KORTESUO *et al.* (2002) verificaram que a solubilização da matriz de microesferas de dexmedetomidina obtidas em pH=1 foi mais rápida que aquelas obtidas em pH=2,3. Por sua vez, o PEG é um polímero bastante hidrofílico e, portanto, deve se solubilizar mais rapidamente que a sílica, favorecendo o mecanismo de erosão e aumentando a liberação da cianocobalamina.

Em relação ao efeito do pH da fase sol, conforme ressaltaram KORTESUO *et al.* (2002), para óxidos como a sílica, a carga superficial pode ser determinada pelos íons  $H^+$  e  $OH^-$  no meio, resultando na formação de uma barreira de repulsão. Desse modo, no ponto isoelétrico (PIE), os colóides agregariam mais facilmente. Contudo, as forças de hidratação também influenciam nas propriedades de superfície e ela é responsável pela inibição da coagulação no PIE e, no mínimo, por forças fracas de atração. Colóides com fraca interação produzem microesferas mais densas e de liberação mais lenta. Contudo, a comparação dos perfis de liberação entre as Formulações 2, 3 e 5 mostrou que não houve efeito evidente devido ao pH da fase sol. No entanto, inversamente ao esperado, a Formulação 2 liberou menos cianocobalamina que as Formulações 3 e 5 (Figuras 5.30 e 5.31).

Comparativamente, quando se adicionou em saco de diálise cerca de 11mg de cianocobalamina, aproximadamente 90% foram liberados em 24h (Tabela V.19).

Tabela V.19 - Percentual de liberação de cianocobalamina a partir de sacos de diálise (n=3) durante ensaio de liberação *in vitro*

Dados	24h	28h	72h
Área (u.a.)	4912876	4911041	4895007
	5117980	5085297	5120995
	5079412	5015764	5004095
Média ± desvio padrão	500000 ± 109000	5000000 ± 88000	5000000 ± 110000
Quantidade liberada (mg)	10,51	10,45	10,45
Percentual de liberação ± desvio padrão	90,2 ± 0,4	89,6 ± 0,8	89,6 ± 0,7

O ensaio de liberação apresentado na Figura 5.30 mostrou uma longa fase *lag* que poderia ser atribuída à retenção do fármaco no interior do saco ou devido à liberação muito lenta nos primeiros dias. Através do ensaio feito pela adição de fármaco ao saco de diálise, mostrou-se que a membrana não era impedimento para liberação do mesmo. Contudo, a membrana impôs uma liberação mais lenta para as microesferas conforme se verifica por comparação do perfil de liberação das amostras Formulações 3 e 8 (Figura 5.30) em sacos de diálise e em meio de dispersão (Figura 5.32). Outra possibilidade é que no interior do saco de diálise o sistema esteja aglomerado, afetando, conseqüentemente, a velocidade de dissolução do mesmo e o perfil de liberação.

### Liberação *in vitro* com dispersão das microesferas diretamente no meio

Os resultados dos experimentos estão apresentados na Figura 5.32 para as Formulações 3 e 8 (n=3) e na Figura 5.33 para as Formulações 12, 13 e 14 (n=3).

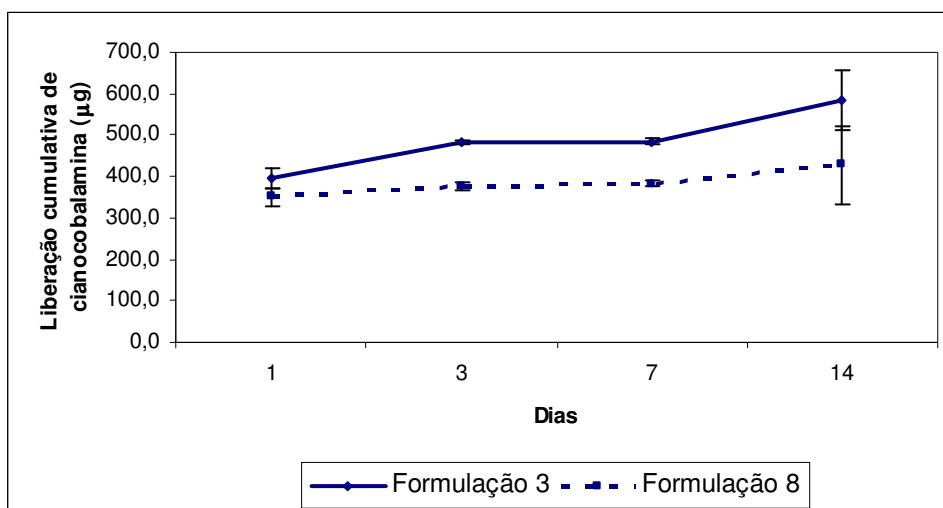


Figura 5.32 - Ensaio de liberação *in vitro* das Formulações 3 e 8 por dispersão direta em tampão PBS-conservantes. As Formulações 3 e 8 apresentam  $R_w$  de 14 e 28, respectivamente.

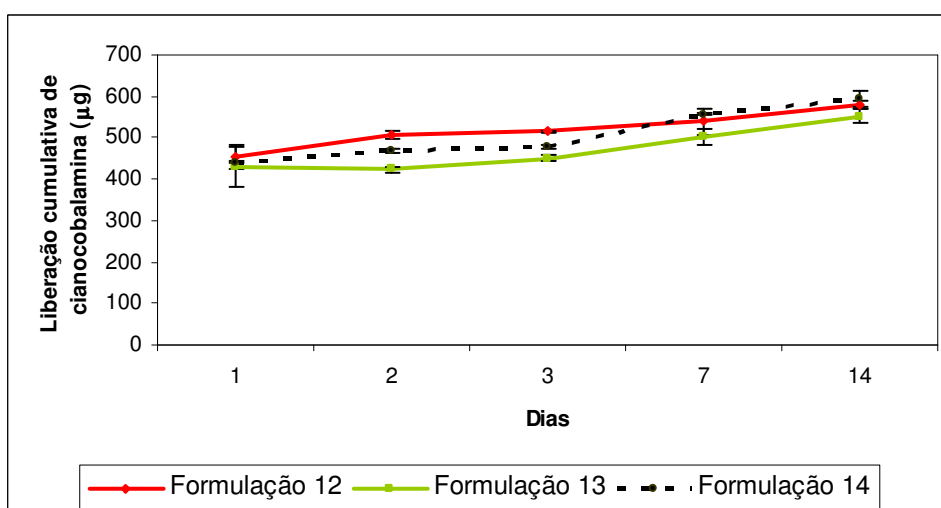


Figura 5.33 - Ensaio de liberação *in vitro* das Formulações 12, 13 e 14 por dispersão direta em tampão PBS-conservantes. As Formulações 12, 13 e 14 apresentam  $R_w$  de 14, 28 e 42, respectivamente.



As Figuras 5.32 e 5.33 mostram que em 24h cerca de 350 a 450µg de cianocobalamina foram liberados a partir das microesferas correspondentes às Formulações 3, 8, 12, 13 e 14. A partir deste ponto, a liberação permaneceu lenta até o final do ensaio para todas as formulações. Após 14 dias, o percentual de liberação foi o menor para Formulação 8, cerca de 3,5% do valor teórico, e o maior para Formulação 14, cerca de 5,2% do valor teórico.

Comparando-se os resultados apresentados nas Figuras 5.30 e 5.32, percebe-se de imediato o efeito do saco de diálise sobre o perfil de liberação, uma vez que a fase *lag* (primeiro ao quinto dia) não ocorreu quando as microesferas foram dispersas diretamente no meio tampão PBS-conservantes.

A comparação dos perfis de liberação das Formulações 3 e 8 sugeriam que a diluição do sol pudesse reduzir a liberação do fármaco (Figuras 5.30 e 5.32). De fato, conforme já discutido por KORTESUO *et al.* (2002) para outros modelos de fármacos, a diluição reduz a concentração de sólidos e a viscosidade do sol. Além disso, a diluição afeta a interação entre partículas coloidais tornando-as mais fracas. A mesma quantidade de partículas em um volume maior reduz a força de interação entre colóides e resulta em empacotamento mais denso. Para avaliar o efeito da diluição, foram preparadas as microesferas das Formulações 12, 13 e 14. Os perfis de liberação mostrados na Figura 5.33 são bastante similares e mostram que o efeito da diluição não foi importante para modificar a liberação da cianocobalamina durante o período avaliado.

Após o período de estudo apresentado, utilizando ambas técnicas para ensaio de liberação *in vitro*, verificou-se decaimento do teor da cianocobalamina no meio de liberação. Provavelmente, o crescimento microbiológico no meio e a condição de estresse térmico são os responsáveis pela diminuição do teor de cianocobalamina no meio após algumas semanas de experimento. Um melhor aproveitamento poderia ter sido obtido se o ensaio fosse conduzido sob condições assépticas.

### **Mecanismo de liberação**

Intumescimento, dissolução ou erosão e difusão da matriz são os mais importantes mecanismos de controle de liberação de produtos comercialmente disponíveis. Intumescimento é um fenômeno mais comum em hidrogéis orgânicos. Os géis

inorgânicos, entretanto, são conhecidos por dificilmente intumescerem (WU *et al.*, 2005). Portanto, o mecanismo envolvido na liberação de fármacos a partir de matriz de sílica deve envolver erosão e/ou difusão.

Tais dados foram considerados por CZURYSZKIEWICZ *et al.* (2005) que propuseram que deve haver uma camada superficial densa que dissolve lentamente em solução aquosa e depois expõe o núcleo menos denso com seus microporos e esta hipótese é suportada pelo aumento da área superficial verificada ao longo do teste de liberação *in vitro*. Deste modo, o passo inicial do processo de liberação pode estar baseado na erosão da camada externa seguida por difusão a partir dos poros internos abertos. Entretanto, como uma grande porção de fármaco permanece encapsulada nos poros fechados, ou inicialmente ligados covalentemente a grupos silanóis, a liberação ocorre mais lentamente porque depende também da erosão.

É importante salientar que a mobilidade de líquidos e gases em poros muito pequenos (na ordem de 2nm a 20nm) é diferente daquela observada no volume. Por exemplo, a difusão translacional de pequenas moléculas, tais como acetona, em poros com tamanho médio de 3nm é reduzida por um fator de 5, enquanto que grandes moléculas podem ter o coeficiente de difusão reduzido por um fator de 10 vezes. A redução também é observada na movimentação rotacional das moléculas (SIEMINSKA; ZERDA, 1996).

Neste trabalho, as microesferas obtidas por *spray drying* apresentaram baixa área superficial como resultado da rápida solidificação da superfície das gotas, conforme se verificou nos ensaios de adsorção de nitrogênio (método BET). Esperava-se aumento da porosidade ao longo do ensaio de liberação *in vitro*, no entanto a análise por MEV ao final do estudo sugere que não houve modificação da superfície das microesferas (Figura 5.29).

Outra consideração muito relevante é que o uso de saco de diálise interfere na cinética de liberação do fármaco e dificulta a interpretação dos resultados experimentais desse estudo. Além disso, os métodos empregados para liberação *in vitro* têm um volume fixo durante todo experimento e, é provável que tenha ocorrido saturação da sílica dissolvida no meio, já que em pH=7,4 a saturação da sílica é de 130-150ppm. Por esta razão, a dissolução da sílica deve ocorrer livremente na

primeira etapa, liberando o fármaco que está na superfície das microesferas. Mas, após a saturação do meio com sílica, a erosão é inibida, e o mecanismo esperado para liberação é a difusão. Entretanto, devido à baixa porosidade e à imobilização do fármaco no interior do polímero, a difusão é muito lenta, e a maior parte da cianocobalamina permanece na matriz de sílica sem ser liberada.

Neste contexto, a obtenção de microesferas de sílica por *spray drying* torna-se uma alternativa tecnológica de processo quando o objetivo é uma liberação mais lenta. Este método resulta na formação de micropartículas muito pouco porosas enquanto que os processos de geleificação, de forma geral, resultam na formação de estruturas muito porosas, que só têm sua porosidade reduzida através do processo de calcinação (SERTCHOOK, ELIMELECH; AVNIR, 2005). Portanto, o processo por *spray drying* é flexível por possibilitar diferentes condições de síntese e evita os problemas encontrados no preparo de sistemas com impregnação da substância após formação do gel (pós-impregnação) tais como, a mobilidade e a perda da molécula convidada.

## 6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho, estudou-se um processo sol-gel de obtenção de microesferas de cianocobalamina por *spray drying* em matriz de sílica. As condições de síntese (pH, proporção água/tetraetilortossilicato, concentração e presença de polímero orgânico) foram variadas nesse estudo e os produtos obtidos foram caracterizados por técnicas físico-químicas diversas. As principais conclusões obtidas são sintetizadas a seguir:

- A análise por CLAE da cianocobalamina usada como matéria-prima e de amostras em tampão PBS com conservantes atendeu às exigências analíticas, tais como seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, assegurando confiabilidade nos resultados.
- As microesferas de sílica obtidas utilizando método sol-gel por *spray drying* apresentaram valores de  $D_{10}$  e  $D_{90}$  entre 1,19 $\mu\text{m}$  e 16,70 $\mu\text{m}$  e estreita distribuição granulométrica com valores de span <2,40. Esta faixa granulométrica é adequada para preparo de suspensão e é compatível para administração parenteral por via intramuscular ou subcutânea.
- Através da técnica FT-IR não foram observadas bandas em torno de 1167 $\text{cm}^{-1}$  e em 784 $\text{cm}^{-1}$ , referentes à vibração angular das ligações Si-O-C e deformação Si-O-C ou picos indicadores de resíduos orgânicos em 980-1130 $\text{cm}^{-1}$  para etanol, 1200-1290 $\text{cm}^{-1}$  para C-O e 2830-3040 $\text{cm}^{-1}$  para  $-\text{CH}_2-$  e  $-\text{CH}_3$ , o que sugere que a reação de hidrólise se completou durante o preparo das microesferas.
- Através das curvas DSC e TG foi possível demonstrar que a cianocobalamina é estável nas condições de preparo por *spray drying* e que é possível estimar o percentual de encapsulação através de comparação das curvas TG para microesferas brancas e microesferas carregadas.
- A análise por MEV mostrou que as microesferas obtidas apresentaram forma esférica, superfície lisa e não porosa. Entre as microesferas carregadas, as Formulações 2, 5, 11, 12 e 13 apresentaram cavidade ou estrutura colapsada, provavelmente devido à rápida solidificação da superfície das gotas ou fluxo de

atomização muito rápido. O aumento de  $R_w$  resultou na formação de estruturas mais aglomeradas e agregadas e micropartículas ocas, quebradas ou com fissuras.

- A área superficial analisada por método BET foi menor que  $0,60\text{m}^2/\text{g}$  e é compatível com a observação da superfície lisa, isenta de poros, mostrada por MEV.
- No ensaio de liberação *in vitro* utilizando saco de diálise, verificou-se que Formulação 2 (fase sol pH=1) e a Formulação 11 (híbrido sílica/polietilenoglicol) apresentaram, do primeiro ao quinto dia, liberação mais rápida de cianocobalamina comparada às Formulações 3, 5 e 8.
- Os perfis de liberação das Formulações 12 ( $R_w=14$ ), 13 ( $R_w=28$ ) e 14 ( $R_w=42$ ) foram similares e mostraram que o efeito da diluição não foi importante para modificar a liberação da cianocobalamina durante o período avaliado.
- Comparando os procedimentos do estudo de liberação *in vitro* utilizando saco de diálise ou por dispersão no meio de liberação, observou-se que o primeiro interferiu na liberação do fármaco produzindo uma fase *lag* de cinco dias. Por sua vez, o procedimento por dispersão direta no tampão PBS com conservantes resultou em efeito liberação em 24h, o que coloca em evidência a importância das condições de testes de dissolução *in vitro* adotadas nos experimentos.
- Sugere-se que o mecanismo de liberação do fármaco está associado a uma liberação mais rápida do ativo que está na superfície da microesfera, simultaneamente à dissolução da sílica. Mas, após a saturação do meio com sílica, a erosão é inibida, e o mecanismo de difusão torna-se predominante. Entretanto, devido à baixa porosidade e à imobilização do fármaco no interior do polímero, a difusão é muito lenta, resultando na permanência da maior parte da cianocobalamina na matriz de sílica, durante o período do ensaio de liberação (14 dias).

- A preparação de matriz de sílica por método sol-gel utilizando *spray drying* é uma alternativa para encapsulamento de fármacos hidrofílicos, tal como a cianocobalamina, quando o objetivo é a obtenção de sistema de liberação lenta.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AELION, R. et al. Hydrolysis of ethyl silicate. **Journal of American Society**, v. 72, p. 5705-5712, 1950.

AHOLA, M. et al. In Vitro evaluation of biodegradable  $\epsilon$ -caprolactone-co-d,l-lactide/silica xerogel composites containing toremifene citrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, p. 181-191, 1999.

AHOLA, M. et al. Silica xerogel carrier material for controlled release of toremifene citrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 195, p. 219-227, 2000.

AHOLA, M. S. et al. In vitro release of heparin from silica xerogels. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 2163-2170, 2001.

AKERS, M. J. Challenges in the development of injectable products. In: GUPTA, P.K.; BRAZEAU, G.A. **Injectable drug development**. Denver: Interpharm Press, 1999. p. 3-14.

AMERICAN SOCIETY OF HEALTH-SYSTEMS PHARMACISTS. **Vitamin B12**: Cyanocobalamin, Hydroxocobalamin, Intrinsic Factor. File 229: Drug Information Fulltext, 2002. Disponível em: <http://www.dialogweb.com> >. Acesso em: 30 abr. 2004.

ANDRÈS, Emmanuel; LOUKILI, Nouredine Henoun; NOEL, Esther et al. Effects of oral crystalline cyanocobalamin 1000mg/d in the treatment of pernicious anemia: an open-abel, prospective study in ten patients. **Current Therapeutic Research**, v. 66, n. 1, p. 13-22, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA . Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jun. 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm) > Acesso em: 18 nov. 2004.

BARAS, B.; BENOIT, M. A.; GILLARD, J. Parameters influencing the antigen release from spray-dried poly(dl-lactide) microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, p. 133-145, 2000.

BERG, H. V. D. Vitamin B12. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 63 , n. 4, p. 282-284,1993.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Clínica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

BOGOMOLOVA, L. D.; JACHKIN, V. A; KRASILNIKOVA, H. EPR study of vanadium-containing amorphous silica formed by sol-gel method. **Journal of Non-Crystalline solids**, v. 24, p. 13-26, 1998.

BOOTH, H.; MCDONALD, E.; JONES, L. M. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983.

BÖTTCHER, H.; SLOWIK, P.; SÜB, W. Sol-gel carrier systems for controlled drug delivery. **Journal of Sol-Gel Sciences and Technology**, v. 13, p. 277-281, 1998.

BOURGET, L. et al. Non-hydrolytic sol-gel routes to silica. **Journal of Non-Crystalline solids**, v. 242, p. 81-91, 1998.

BRINKER,C.J. et al. Sol-gel strategies for controlled porosity inorganic materials. **Journal of Membrane Science**, v. 94, p. 85-102, 1994.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-gel science, the physics and chemistry of sol-gel processing**. San Diego: Academic Press, 1990. 908 p.

BUCKLEY, A.; GREENBLATT, M. The Sol-Gel preparation of silica gels. **Journal of Chemical Education**, v. 71, n. 7, 1994.

BURGESS, D. J. **Injectable dispersed systems**: formulation, processing, and performance. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005, 652 p.



CARUSO, R. A.; ANTONIETTI, M. Sol-gel nanocoating: an approach to the preparation of structured materials. **Chemistry of Material**, v. 13, p. 3272-3282, 2001.

CARSTENSEN, J. **Advanced Pharmaceutical Solids**. New York: Marcel Dekker, 2001, 518 p.

CHEETHAM, A. K.; MELLOTT, C. F. In situ studies of sol-gel synthesis of materials. **Chemistry of Materials**. v. 9, p. 2269-2279, 1997.

CHIDAVAENZI, O. C.; BUCKTON, G.; KOOHA, F. The Effect of co-spray drying with polyethylene glycol 4000 on the crystallinity and physical form of lactose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 216, p. 43-49, 2001.

CHIEN, Y. W. Controlled and modulated-release drug delivery systems. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. New York: Marcel Dekker, 1994. v. 3, p. 281-313.

CHIEN, Y. W. **Novel drug delivery systems**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1992.

CORRIGAN, D. O.; HEALY, A. M.; CORRIGAN, O. I. The Effect of spray drying solutions of polyethylene glycol (PEG) and lactose/PEG on their physicochemical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 193-205, 2002.

CZURYSZKIEWICZ, T.; AREVA, S.; HONKANEN, M. et al. Synthesis of sol-gel silica materials providing a slow release of biphosphonate. **Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 254, n. 1-3, p. 69-74, 2005.

DISLICH, H. Sol-Gel 1984-2004. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 73, p. 599-612, 1985.

ESTEVEZ, A. C. C. et al. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.

FALAIZE, S.; RADIN, S.; DUCHEYNE, P. In Vitro behavior of silica-based xerogels intended as controlled release carriers. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 82, p. 969-976, 1999.

FATTAL, E. et al. Biodegradable microparticles for the development of less-painful and less-irritating parenterals. In: GUPTA, P.K.; BRAZEAU, G.A. **Injectable drug development**. Denver: Interpharm Press, 1999. p. 355-372.

FRANKEN, L. **Síntese, caracterização e estudo das propriedades adsorventes do xerogel p-anisidinapropilsilica**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 55 p.

GELB Research Group. Simulations of sol gel materials. 2003 Disponível em: <<http://www.chemistry.wustl.edu/~gelb/solgel.html>>. Acesso em: 18 nov. 2004.

GILLILAND, J. W., YOKOYAMA, K., YIP, W. T. Comparative study of guest charge-charge interactions within silica sol-gel. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 11, p. 4816-4823, 2005.

GOLDSTEIN, S.; DUCA, A. Contributions to the analytical chemistry of vitamin B12 the thermal stability of cyanocobalamin, hydroxocobalamin and cobinamide in the solid state, **Thermochemica Acta**, v. 59, n. 2, p. 211-220, 1982.

GOODMAN, S. L.; GILMAN, A. F.; RALL, T. W. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

GUN, G; TSIONSKY, M.; LEV, O. Characterization of silica carbon electrodes. **Materials Research Society**, v. 346, p. 1011-1016, 1994.

GUO, Z.; ZHU, G.; GAO, B. et al. Adsorption of vitamin B12 on ordered mesoporous carbon coated with PMMA. **Carbon**, v. 43, p. 2344-2351, 2005.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 53-65, 1999.

HENCH, L. L.; VASCONCELOS, W. Gel silica science. **Annual Review of Materials Science**. Palo Alto, v. 20, p. 269-298, 1990.

HENCH, L. L.; WANG, H. The Sol-gel glass transformation of silica. **Phase Transitions**, v. 24-26, p. 785-834, 1990.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. **The Sol-gel process**. **Chemical Reviews**, v. 90, p. 33-72, 1990.

HOANG, G. C.; LEE, H. S. Pore size control of silica gels in basic water conditions using sol-gel processing. In: **PROCEEDINGS OF THE 5<sup>TH</sup> CONFERENCE ON PROPERTIES AND APPLICATIONS OF DIELECTRIC MATERIALS (IEEE)**, 5., 1997. p.174-177.

ILER, R. K. **The chemistry of silica**. New York: John Wiley, 1979.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION : ICH-Q2b - Guidance for Industry . **Validation of analytical procedures: methodology**. November, 1996.

JAIN, R. et al. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 8, p. 703-727, 1998.

JAIN, T. K. et al. Nanometer silica particles encapsulating active compounds: a novel ceramic drug carrier. **Journal of American Chemical Society**, v. 120, n. 43, p. 11092-11095, 1998.

KORTESUO, P. et al. Silica xerogel as na implantable carrier for controlled drug delivery - evaluation of drug distribution and time effects after implantation. **Biomaterials**, v. 21, p. 193-198, 2000.

KORTESUO, P. **Sol-gel derived silica gel monoliths and microparticles as carrier in controlled drug delivery in tissue administration**. 2001. Academic Dissertation - Department of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki.

KORTESUO, P. et al. Effect of synthesis parameters of the sol-gel processed spray-dried silica gel microparticles on the release rate of dexmedetomidine. **Biomaterials**, v. 23, p. 2795-2801, 2002.

KOSSOVSKY, N. et al. Surface-modified nanocrystalline ceramics for drug delivery applications. **Biomaterials**, v. 15, n. 15, p. 1201-1207, 1994.

KUSAKABE, K et al. Pore structure of silica membranes formed by sol-gel technique using tetraethoxysilane and alkyltriethoxysilanes. **Separation and Purification Technology**, v. 16, p. 139-146, 1999.

LANGER, R. Biomaterials and biomedical engineering. **Chemical Engineering Science**, v. 50, n. 24, p. 4109-4121, 1995.

LANGER, R.; PEPPAS, A. N. Advances in biomaterials drug delivery and bionanotechnology. **AIChE Journal**, v. 49, n. 12, p. 2290-3006, 2003.

LENZA, R. F. S.; VASCONCELOS, W. L. Preparation of silica by sol-gel method using formamide. **Materials Research**, v. 4, n. 3, p. 189-194, 2001.

LENZA, R. F. S. **Obtenção de materiais avançados via método sol-gel**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. 252 p.

LEV, O. et al. Organically modified sol-gel sensor. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 25-30, 1995.

LI, Zhu-Zhu; WEN, Li-Xiong; SHAO, Lei et al. Fabrication of porous hollow silica nanoparticles and their applications in drug release control. **Journal of Controlled Release**, v. 98, n. 2, p. 245-254, 2004.

MAA, Y. F. et al. Effect of spray drying and subsequent processing conditions on residual moisture content and physical/biochemical stability of protein inhalation powders. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 768-775, 1998.

MACETI, H. **Propriedades estruturais de géis obtidos a partir de sono-hidrólise de TEOS e troca de fase líquida por acetona.** Rio claro:: Universidade Estadual Paulista, 2003. 46p.

MACKENZIE, J.D. State of the art and prospects of glass science. **Journal of Non-Crystalline**, v. 52, p. 1-8, 1982.

**MARTINDALE the extra pharmacopoeia.** London: The Pharmaceutical Press, 1982.

**MARTINDALE the extra pharmacopoeia.** London: The Pharmaceutical Press, 2002.

MARTINEZ, M. et al. Applying the biopharmaceutics classification system to veterinary pharmaceutical products. Part I: biopharmaceutics and formulation considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 805-824, 2002.

MAURITZ Group. **Sol-gel chemistry (2001).** Disponível em: <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/solgel.html> . Acesso em: 18 nov. 2004.

MEIXNER, D. L.; DYER, P. N. Influence of sol-gel synthesis parameters on the microstructure of particulate silica xerogel. **Journal of Sol-Gel Sciences and Technology**, v. 14, p. 223-232, 1999.

MI, F. L. et al. In Vivo Biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. **Biomaterials**, v. 23, p. 181-191, 2002.

MONER-GIRONA, M. et al.. Sol-gel route to direct formation of silica aerogel microparticles using supercritical solvents. **Journal of Sol-Gel Sciences and Technology**, v. 26, p. 645-649, 2003.

**MONOGRAFÍAS farmacéuticas.** Alicante, Espanha: Colégio Oficial de Farmacéuticos de La Provincia de Alicante, 1999.

MORRIS, R. M.; CUFF, G. W. Parenteral drug delivery using microparticulates. In: GROVES, M.J.; OLSON,W.P.; ANISFELD, M.H. **Sterile Pharmaceutical Manufacturing applications for 1990's.** Buffalo Grove: Interpharm Press, 1991.

MURILO, M. et al. Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 341-344, 2002.

NEW ZEALAND PASTORAL AGRICULTURE RESEARCH INSTITUTE LIMITED. Danny H. Lewis; Kevin S. Burke; Neville Donovans Grace. **Controlled Release vitamin B12 compositions**. GB n. 2332274, 18 Dec. 1998, 23 jun. 1999.

NICOLL, S. B.; RADIN, C.; SANTOS, E. M. et al. In Vitro release kinetics of biologically active transforming growth factor  $\beta$ 1 from a novel xerogel carrier. **Biomaterials**, v. 18, p. 853-859, 1997.

NOHARA, L. B. et al. Síntese de um poli(ácido âmico) para aplicação como interfase em compósitos termoplásticos de alto desempenho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 2, p. 122-128, 2004.

OTSUKA, M.; TOKUMITSU, K.; MATSUDA, Y. Solid dosage form preparation from oily medicines and their release effect of degree of surface modification of silica gel on the drug release from phytonadione-loaded silica gel. **Journal of Controlled Release**, v. 67, p. 369-484, 2000.

PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ÓREFICE, R. L. Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos. **Polímeros**. v. 9, n. 4, p. 104-109, 1999.

PARK, K.; MRSNY, R. J. Controlled drug delivery: present and future. In: PARK, K.; MRSNY, R. J. **Controlled drug delivery**. Washington: American Chemical Society, 2000.

PEPPAS, N. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, p. 110-111, 1985.

PEPPAS, N. A.; RITGER, P. L. A. Simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form as slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release** , v. 5, p. 23-26, 1987.

PHALIPPOU, J. **Sol-gel: a low temperature process for the materials of the new millennium, 2000**. Disponível em: <<http://www.solgel.com/Tutorials/tutframe.htm>> Acesso em: 18 nov. 2004.

POPE, E. J. A.; MACKENZIE, J. D. Sol-gel processing of silica – II. the role of the catalyst. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 87, p. 185, 1986.

RADIN, S. et al. In Vitro bioactivity and degradation behavior of silica xerogels intended as controlled release materials. **Biomaterials**, v. 23, p. 3113 – 3122, 2002.

RAO, A. V.; KALESH, R. R. Comparative studies of the physical and hydrophobic properties of TEOS based silica aerogels using different co-precursors. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 4, n. 6, p. 509-515, 2004

RAO, S. K. et al. A novel method for synthesis of silica nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 289, p. 125-131, 2005.

RATHBONE, M. J.; CARDINAL, J. R.; OGLE, C. R. Mechanisms of drug release from veterinary drug delivery systems. In: RATHBONE, M. J.; GURNY, R. **Controlled release veterinary drug delivery**. Amsterdam: Elsevier Science., 2000.

RATNER, B.D. et al. **Biomaterials science: as introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996, 484 p.

RÉ, M.I; Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, Vol. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

RÉ, M. I. Formulation of multiparticulate delivery systems by spray drying. **20èmes Journées AFSIA** (Association Française de Séchage dans l'Industrie et l'Agriculture) – Formulation – Mise en Oeuvre – Séchage des solides fins., Albi, France, p. 147-157, 2002.

REED, J. E. **Introduction to principles of ceramic processing**. New York: John Wiley, 1995.

REGE, P. R.; GARMISE, R. J.; BLOCK, L. H. Spray-dried chitosans Part I: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 252, p. 41-51, 2003.

**REMINGTON – The science and practice of pharmacy**. 20. ed. Baltimore: University of the Sciences in Philadelphia, 2000.

RHEE, S.; CHOI, J.; KIM, H. Preparation of a bioactive and degradable poly( $\epsilon$ -caprolactone)/silica hybrid through a sol-gel method. **Biomaterials**, v. 23, p. 4915-4921, 2002.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICH, J. et al. Effect of the molecular weight of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-dl-lactide) on toremifene citrate release from copolymer/silica xerogel composites. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, p. 121-130, 2001.

RO, J. C.; CHUNG, I. J. Structures and properties of silica gels prepared by the sol-gel method. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.130, p. 8-17, 1991.

ROVERI, N. et al. Silica xerogels as a delivery system for controlled release of different molecular weight heparins. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 381, p. 601-606, 2005.

RUPCICH, N.; NUTIU, R.; LI, Y. et al. Entrapment of fluorescent signaling DNA aptamers in sol-gel-derived silica. **Anal. Chem.**, v. 77, n. 14, p. 4300-4307, 2005.

SANT'ANA, H. M. P. Vitamina B12 . In: PENTEADO, M.D.V.C, **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos , clínicos e analíticos. Barueri, SP : Manole , 2003. p. 527-550 .



SANTOS, E. M.; RADIN, S.; DUCHEYNE, P. Sol-gel derived carrier for controlled release of proteins. **Biomaterials**, v. 20, p. 1695-1700, 1999.

SCHMIDT, H. Chemistry of material preparation by the sol-gel process. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 100, p. 51-64, 1988.

SCHOTTNER, G. Hybrid sol-gel-derived polymers: applications of multifunctional materials. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 10, p. 3422-3435, 2001.

SEGAL, D. **Chemical synthesis of advanced ceramic materials**. Cambridge: Cambridge University, 1989.

SENIOR, J.; RADOMSKY, M. **Sustained-release injectable products**. Denver: Interpharm Press, 2000.

SERTCHOOK, H.; ELIMELECH, H.; AVNIR, D. Composite particles of silica/poly (dimethylsiloxane). **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 18, p. 4711-4716, 2005.

SHCHIPUNOV, Y. A.; KARPENKO, T. Y. Hybrid polysaccharide – silica nanocomposites prepared by the sol-gel technique. **Langmuir**, v. 20, n. 10, p. 3882-3887, 2004.

SHI, X.-Y.; TAN, T.-W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of vitamin D2. **Biomaterials**, v. 23, p. 4469-4473, 2002.

SIEMINSKA, L.; ZERDA, T. W. Diffusion of steroids from sol-gel glass. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 11, p. 4591-4597, 1996.

SIZGEK, E.; BERTLETT, J. R.; BRUNGS, M. P. Production of titanate microspheres by sol-gel and spray-drying. **Journal of Sol-Gel Sciences and Technology**, v. 13, p. 1011-1016, 1998.

SOHIER, J. et al. Release of small water-soluble drugs from multiblock copolymer microspheres: a feasibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 221-228, 2003.

**STANDARD Infrared Prim Spectra. Philadelphia: Sadtler Research Laboratories, 1961. v. 10**

**STRUCTURE of Vitamin B12.** Disponível em: <http://www.ce.udel.edu/~pei/B12.html>. Acesso em: 18 nov. 2004.

**THE MERCK Index.** 13. ed. Whitehouse Station: Merck, 2001

**UNITED States Pharmacopeia / National Formulary: USP28 / NF 23.** 28. ed. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

TOKI, M. et al. A Large-size silica glass produced by a new sol-gel process. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 100, p. 479-482, 1988.

TRISSEL, L. A. **Handbook on injectable drugs.** 13. ed. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2005.

ULRICH, D. R. Prospects for sol-gel processes. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 121, p. 465-479, 1990.

UNGER, K. et al. The use of porous and surface modified silicas as drug delivery and stabilizing agents. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9, p. 69-91, 1985.

VEITH, S. R.; PRATSINIS, S. E.; PERREN, M. Aroma retention in sol-gel-made silica particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 19, p. 5964-5971, 2004.

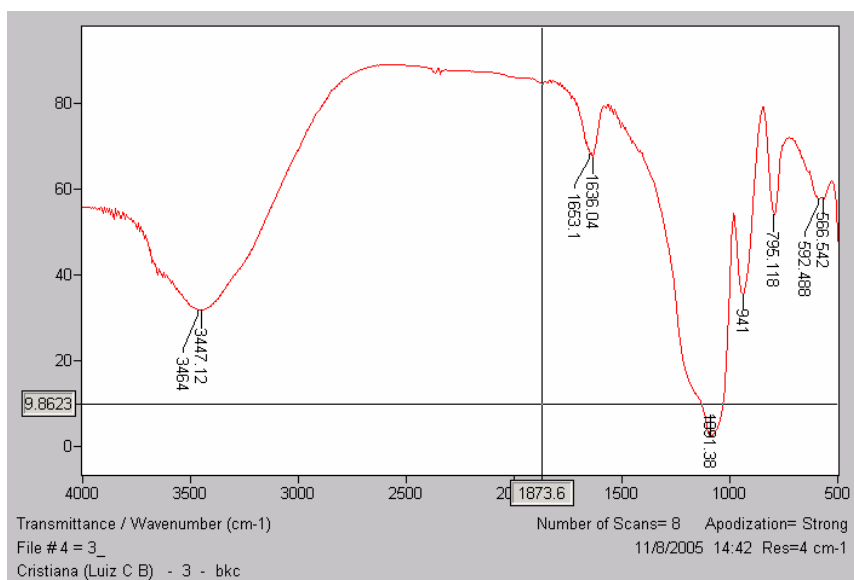
VIITALA, R.; JOKINEN, M.; MAUNU, S. L. et al. Chemical characterization of bioresorbable sol-gel derived SiO<sub>2</sub> matrices prepared at protein-compatible pH. **Journal of non-Crystalline solids**, v. 351, n. 40-42, p. 3225-3234, 2005.

WANG, L. et al. Preparation, characterization, and in vitro evaluation of physostigmine-loaded poly(ortho ester) and poly(ortho ester)/poly(d,l-lactide-co-glycolide) blend microspheres fabricated by spray drying. **Biomaterials**, v. 25, p. 3275-3282, 2004.

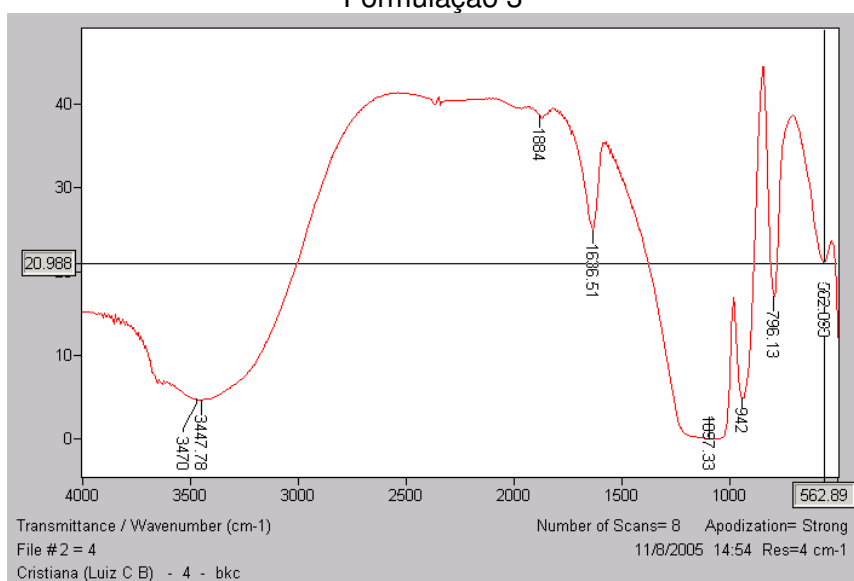
WEN, J., WILKES, G. L. Organic/inorganic hybrid network materials by the sol-gel approach. **Chemistry of Materials** v. 8, p. 1667-1681, 1996.

WU, Z.; JOO, H.; LEE, T. G. et al. Controlled release of lidocaine hydrochloride from the surfactant-doped hybrid xerogels. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 497-505, 2005.

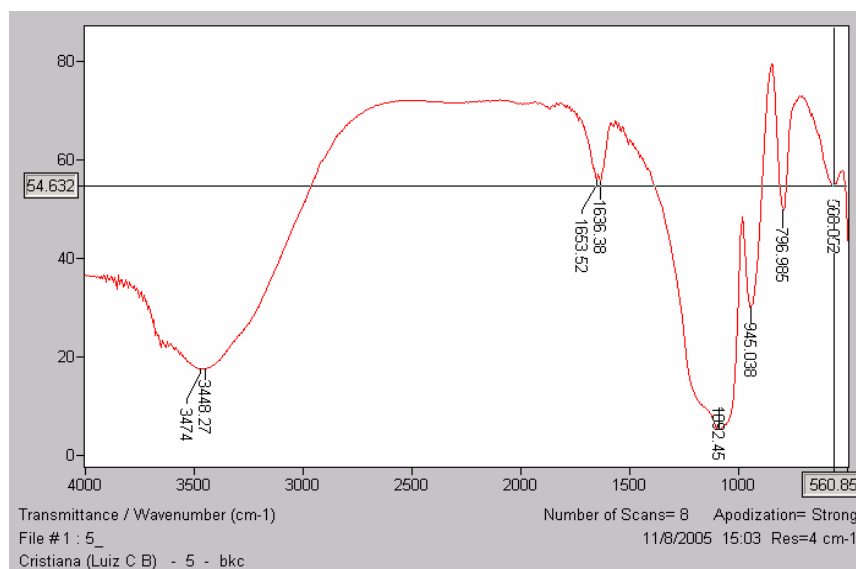
# ANEXO 1



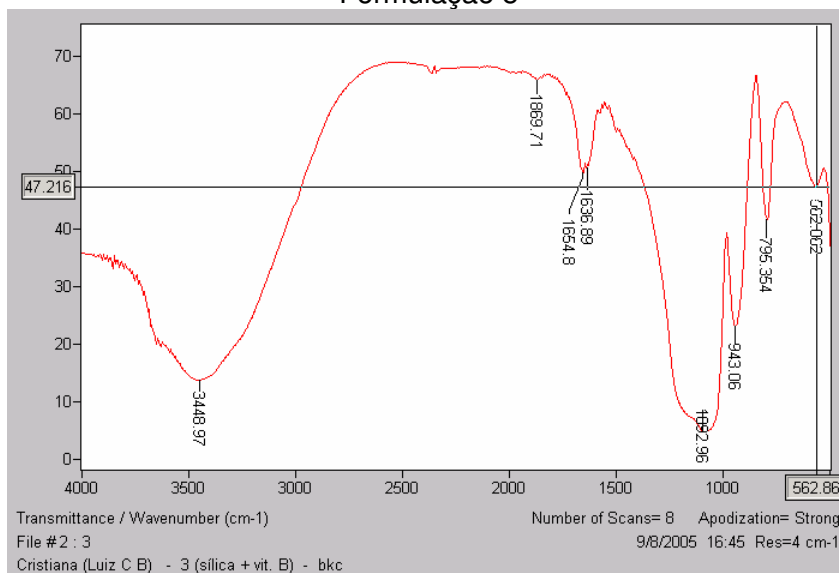
Formulação 3



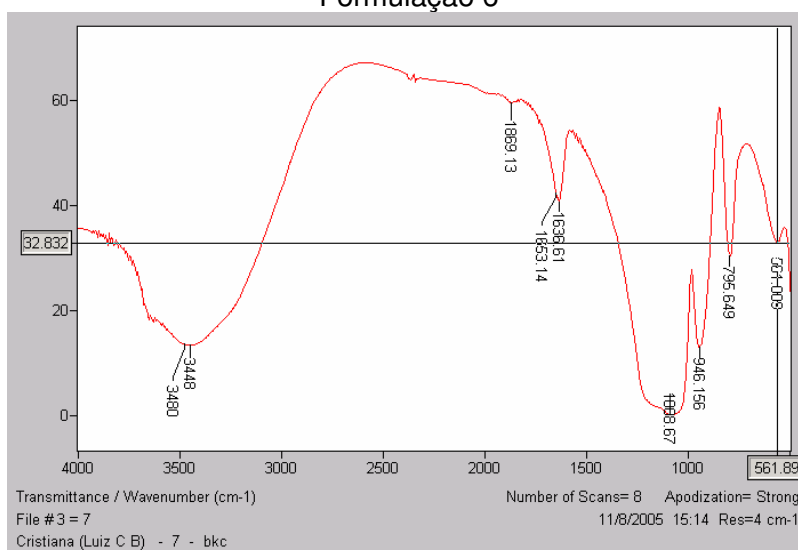
Formulação 4



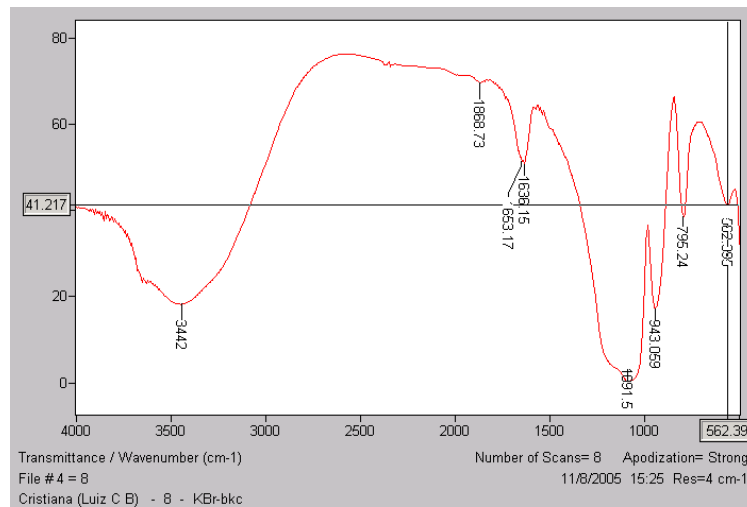
Formulção 5



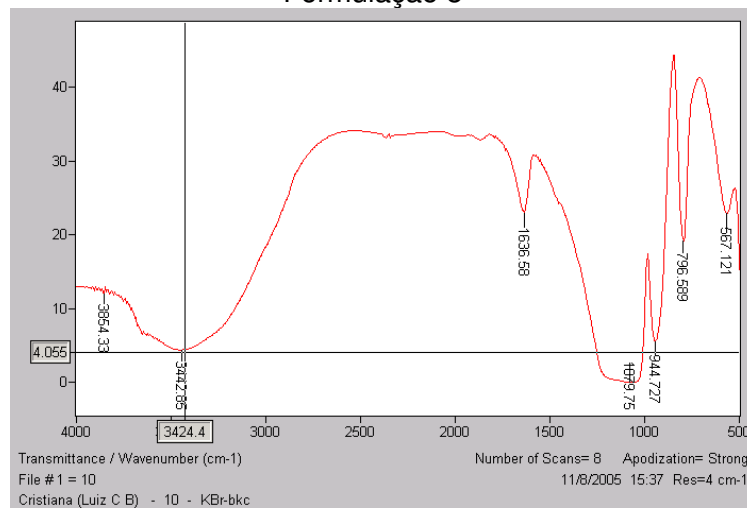
Formulção 6



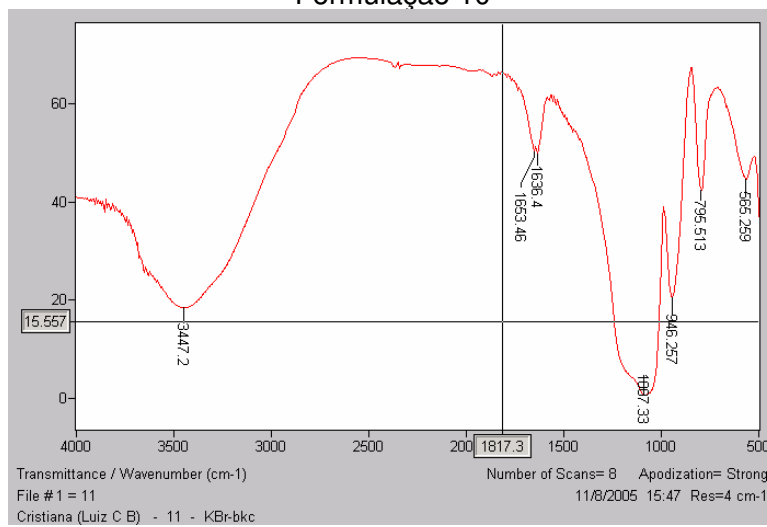
Formulção 7



Formulção 8



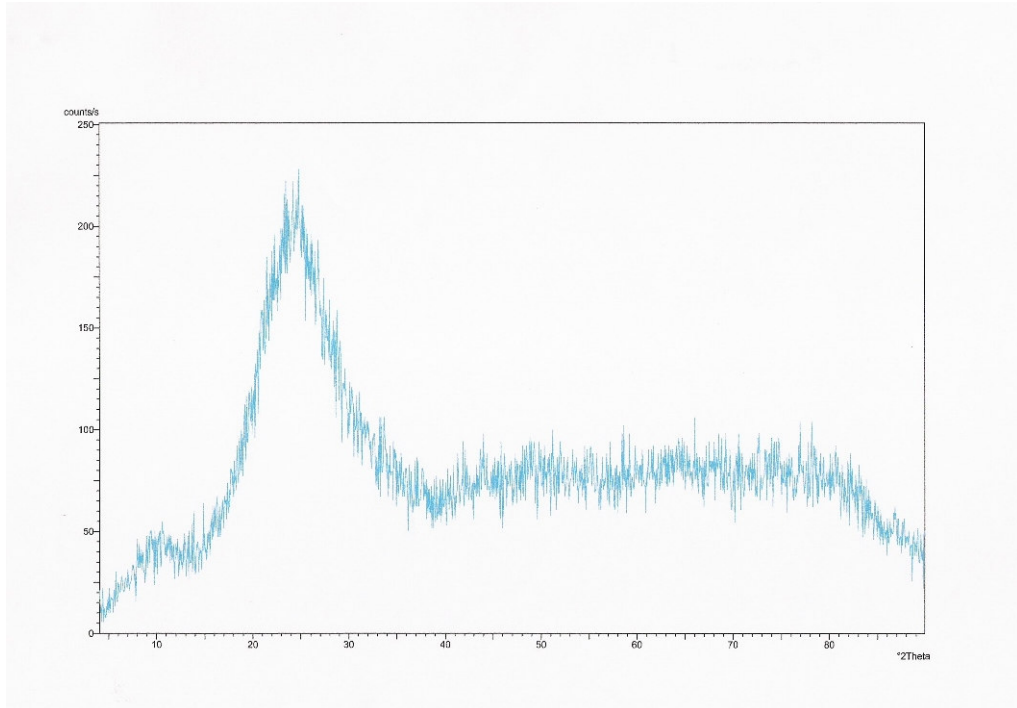
Formulção 10



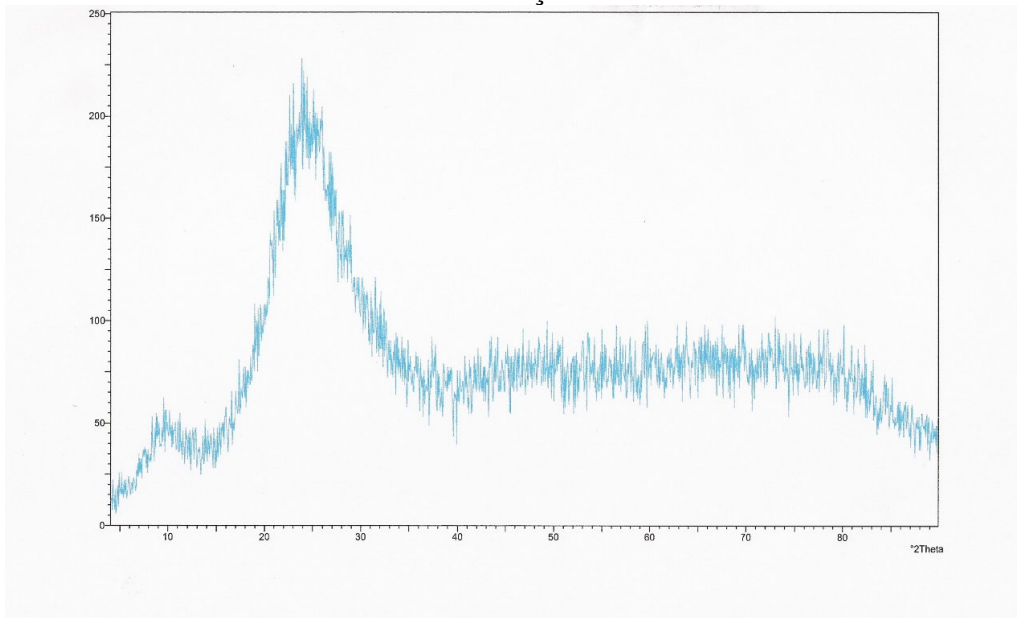
Formulção 11

Figura A1 – Espectros na região do infravermelho das Formulções 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 11.

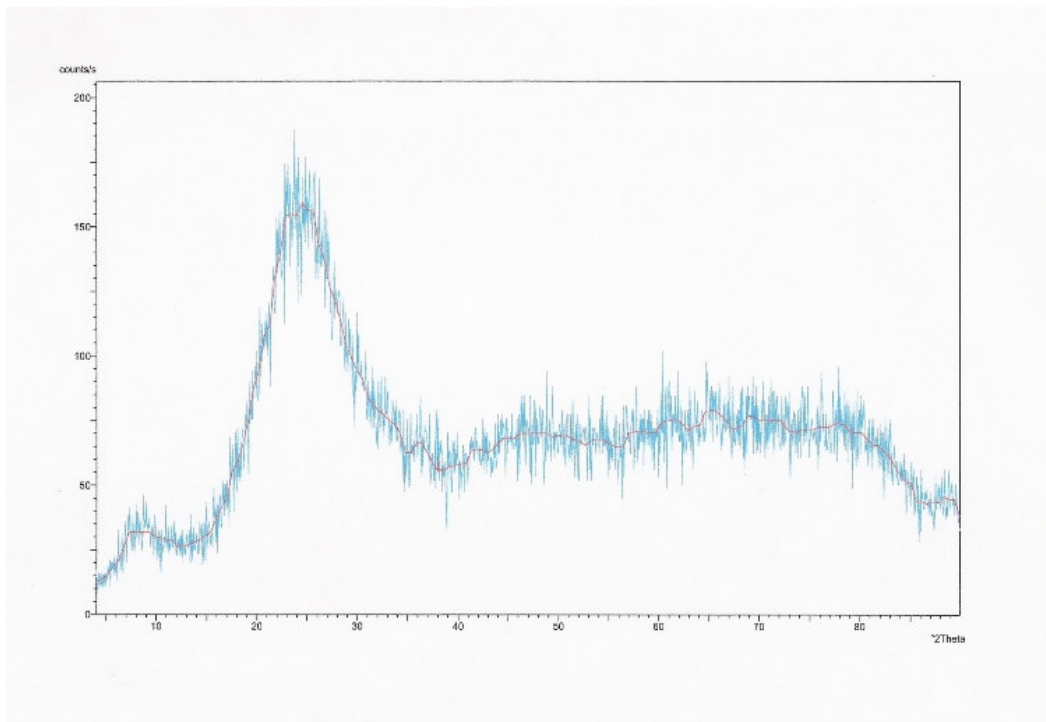
## ANEXO 2



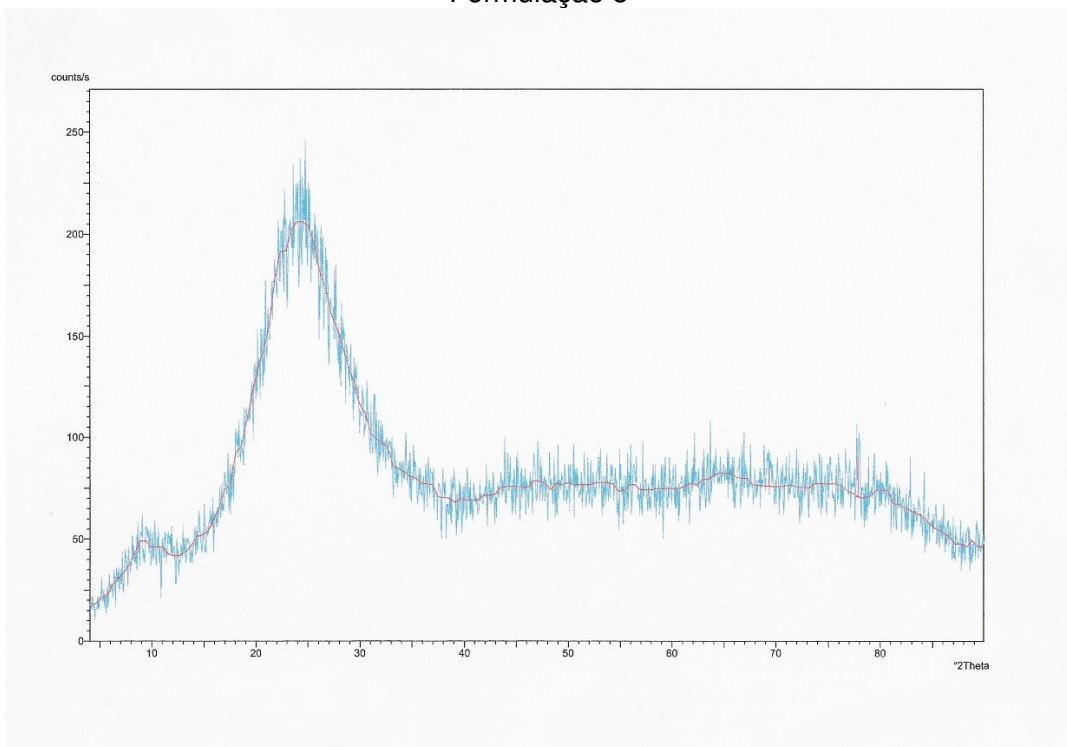
Formulação 1



Formulação 2

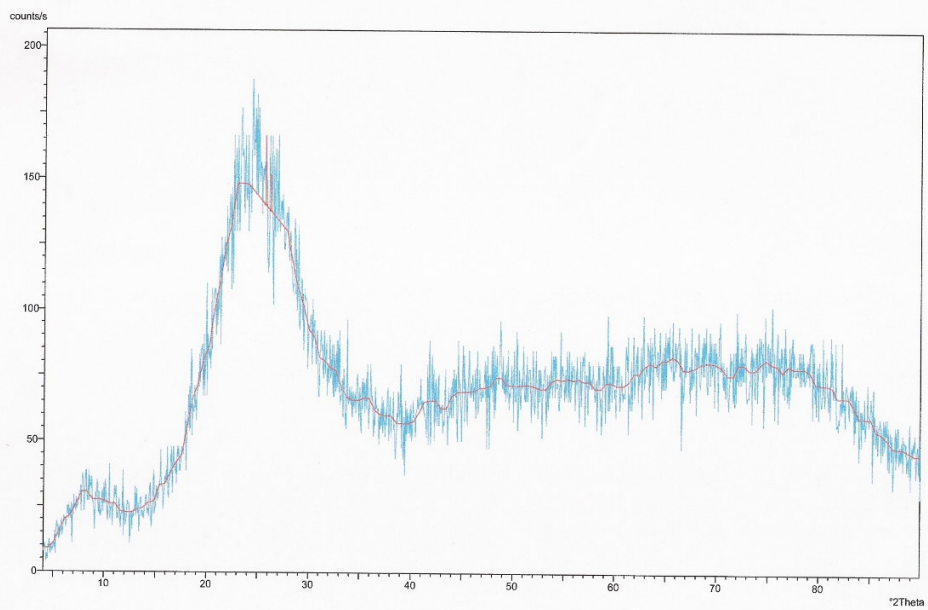


Formulação 5

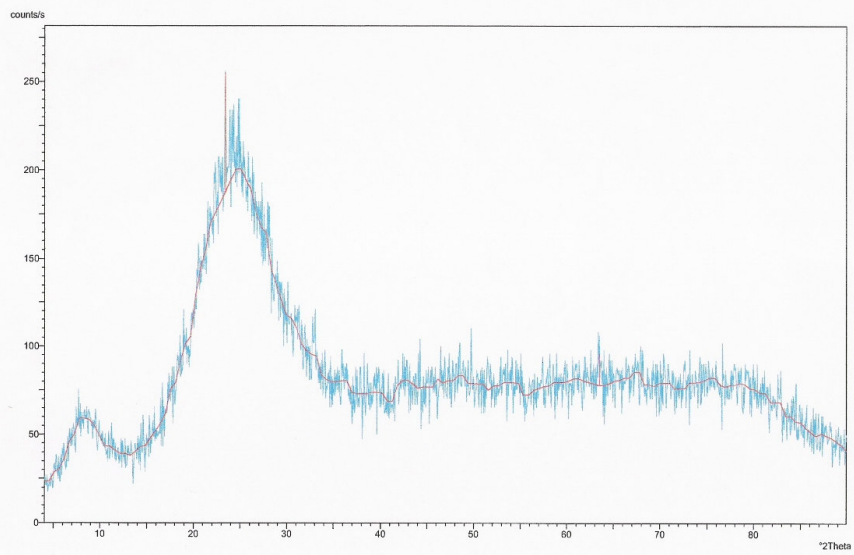


Formulação 6

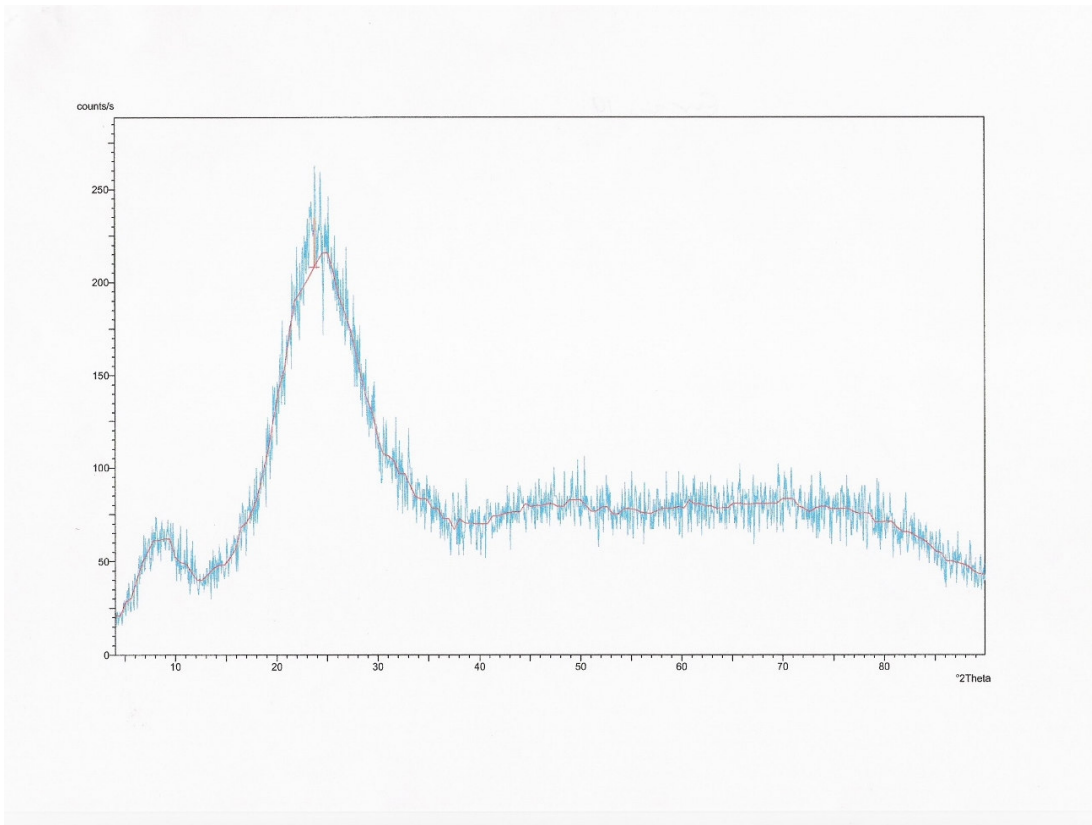




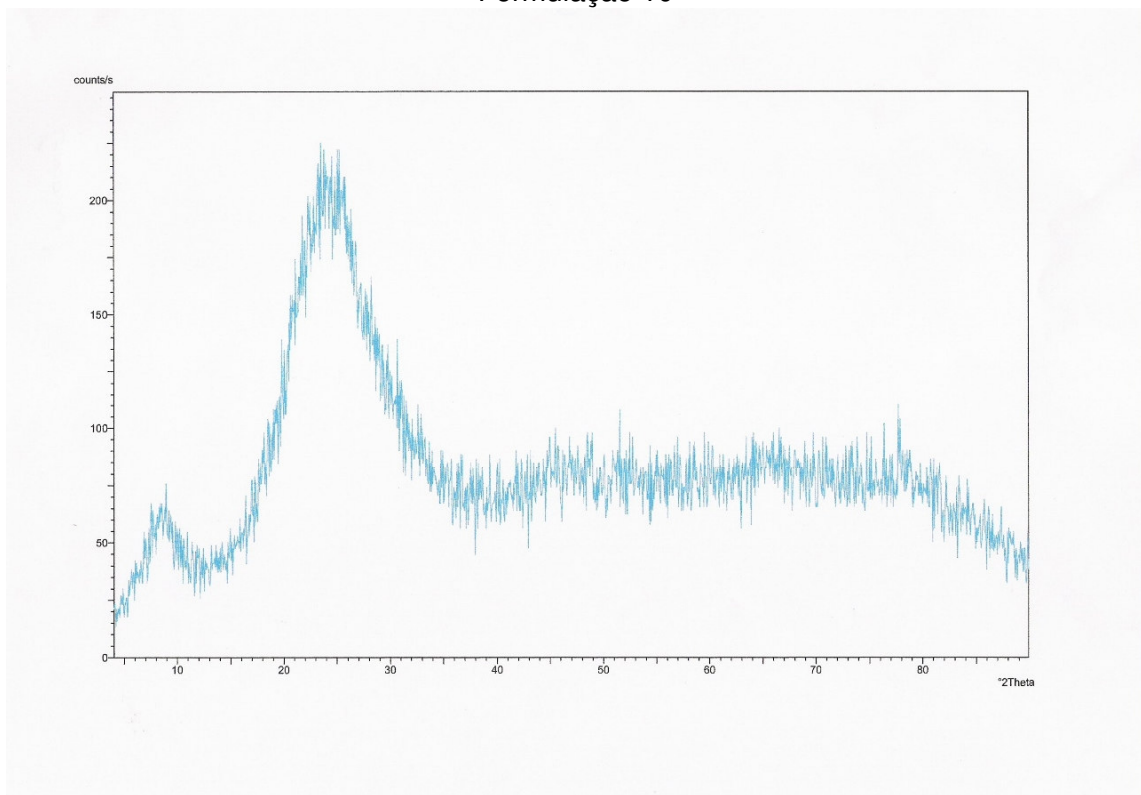
Formulção 7



Formulção 8



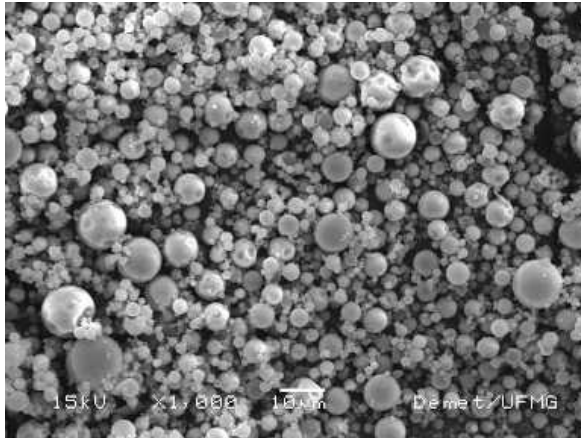
Formulção 10



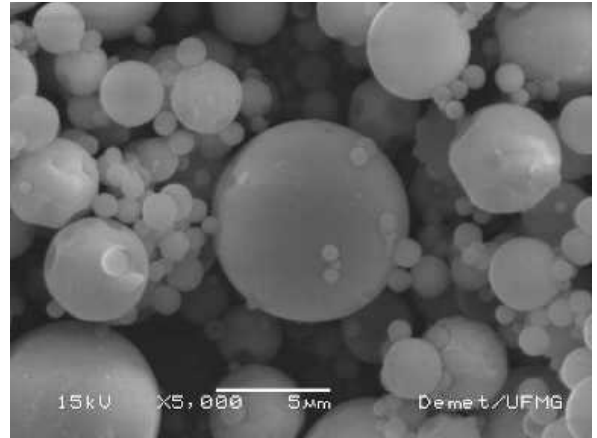
Formulção 11

Figura A2 – Difractogramas das Formulções 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10 e 11.

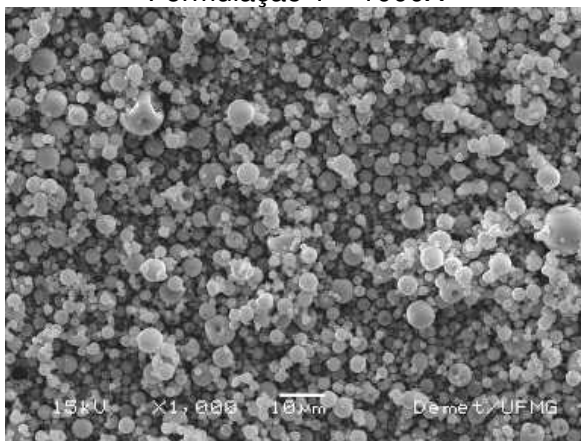
### ANEXO 3



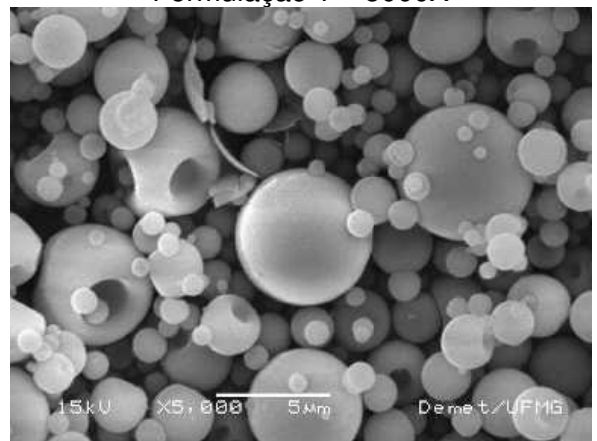
Formulação 1 – 1000X



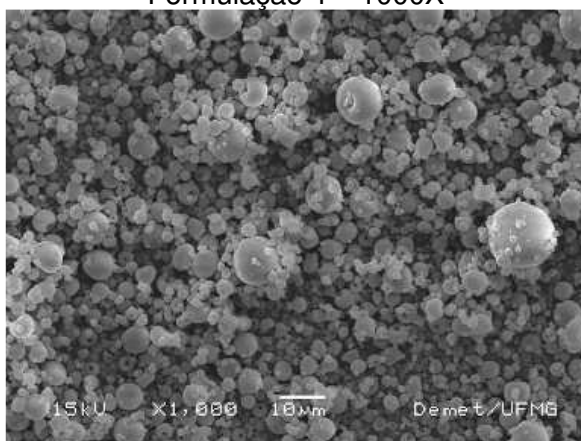
Formulação 1 – 5000X



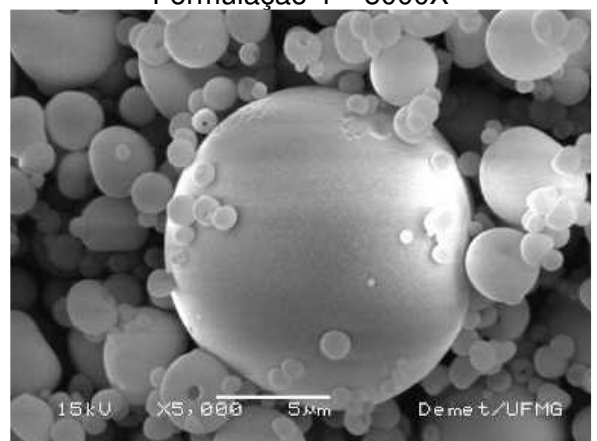
Formulação 4 – 1000X



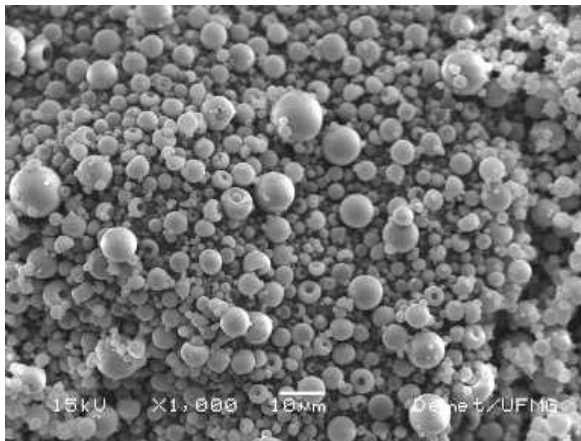
Formulação 4 – 5000X



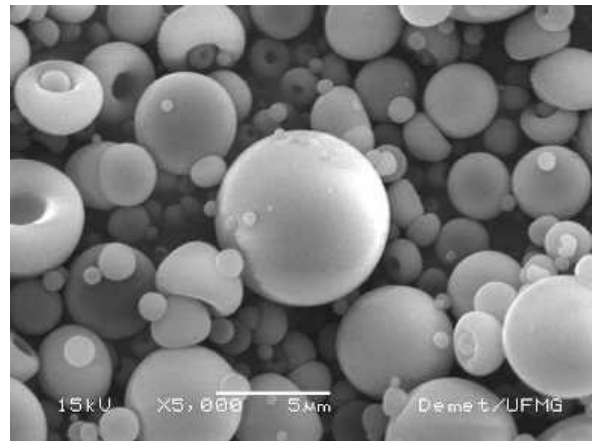
Formulação 7 – 1000X



Formulação 7 – 5000X



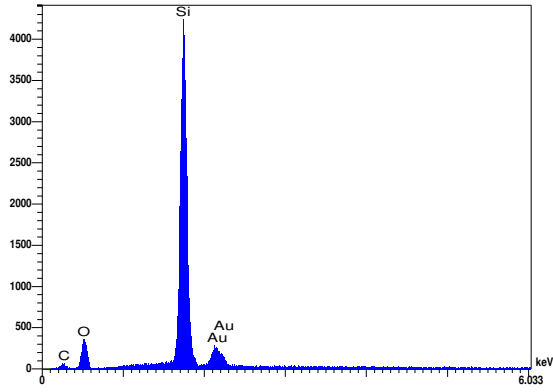
Formulação 10 – 1000X



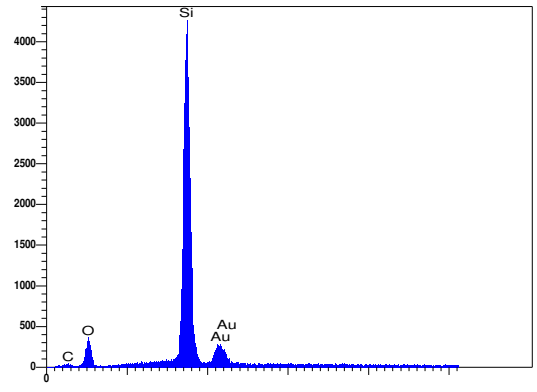
Formulação 10 – 5000X

Figura A3 – Fotomicrografias em aumentos de 1000X e 5000X (15kV) das microesferas de sílica branca correspondentes às Formulações 1, 4, 7 e 10.

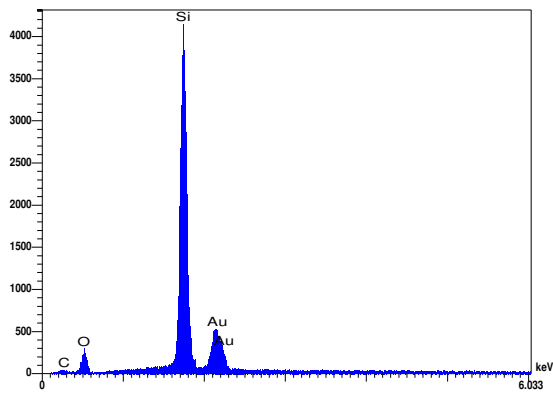
## ANEXO 4



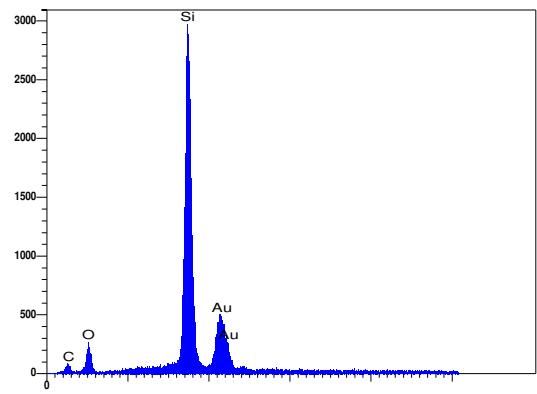
Formulção 2



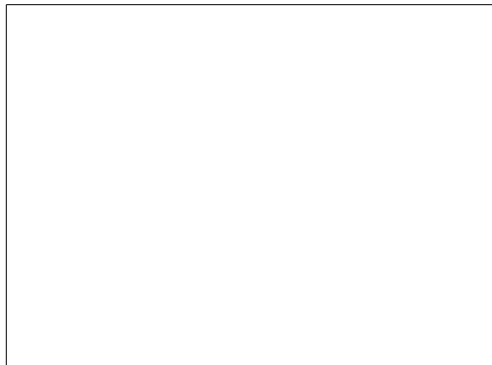
Formulção 4



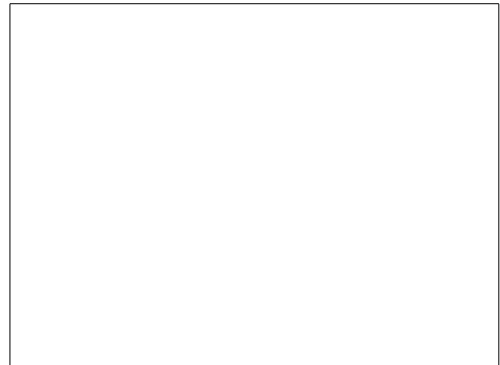
Formulção 5



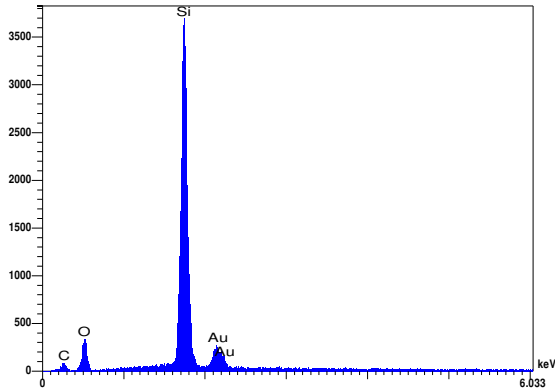
Formulção 6



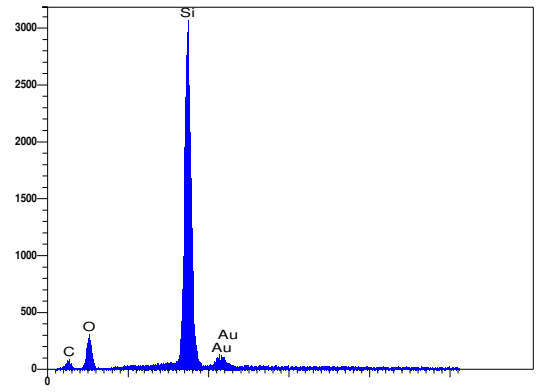
Formulção 7



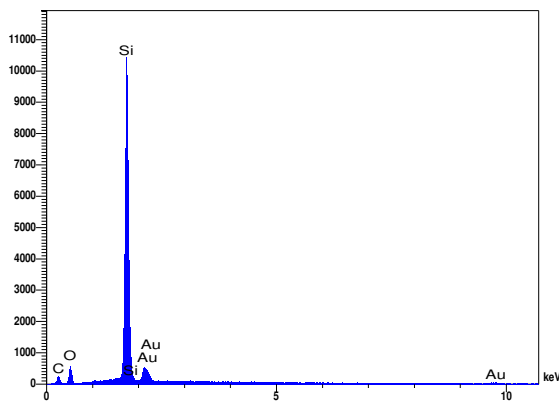
Formulção 8



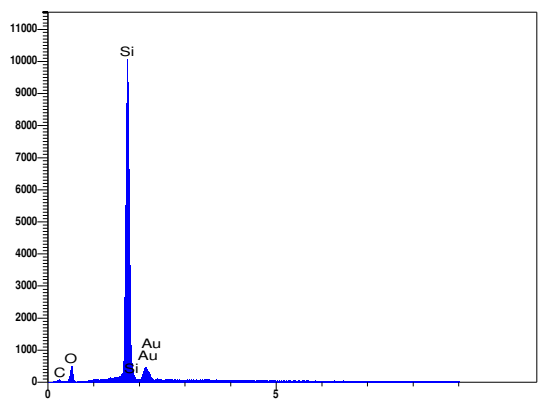
Formulção 10



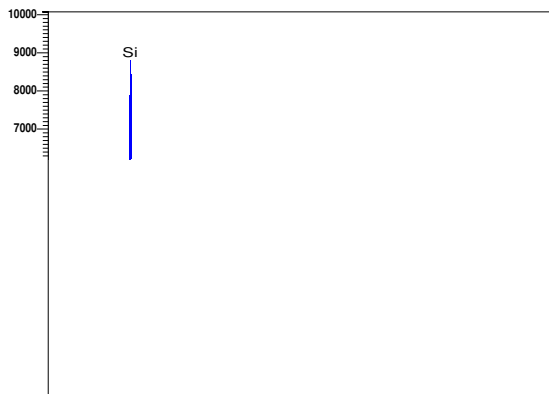
Formulção 11



Formulção 12



Formulção 13



Formulção 14

Figura A4 – EDS das Formulações 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 e 14.