

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA POR *Cintia Cristina*  
*Santos*..... E APROVADA  
PELA COMISSÃO JULGADORA EM *04* / *04* / *11*.....

*Stuek*

ORIENTADOR

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**Cintia Cristina Santos**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLDLA CARREGADAS  
COM SINVASTATINA**

**Campinas, 2011.**

**Cintia Cristina Santos**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLDLA CARREGADAS  
COM SINVASTATINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Materiais e processos de fabricação.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eliana Aparecida de Rezende Duek

**Campinas**

**2011**

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

Santos, Cintia Cristina  
Sa59o Obtenção e caracterização de microesferas de PLDLA  
carregadas com simvastatina / Cintia Cristina Santos. --  
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.  
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Tecnologia de Liberação Controlada. 2. Polímeros  
na medicina. 3. Fármacos. I. Duek, Eliana Aparecida de  
Rezende. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Título em Inglês: Obtaining and characterization of simvastatin loaded PLDLA  
microspheres

Palavras-chave em Inglês: Controlled drug delivery, Medicine in polymers,  
Drugs

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Maria Clara Filippini Ierardi, Maria Lourdes Peris Barbo

Data da defesa: 04/07/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA  
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS DE PLDLA CARREGADAS  
COM SINVASTATINA**

Autora: Cintia Cristina Santos

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliana Aparecida de Rezende Duek

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliana Aparecida de Rezende Duek  
Universidade Estadual de Campinas



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Clara Filippini Ierardi  
Universidade Estadual de Campinas



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lourdes Peris Barbo  
Pontifícia Universidade Católica de São Paulo

Campinas, 04 de Julho de 2011.



---

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Rose, pelo amor incondicional, por todo apoio, força e compreensão nesses longos anos de estudo. “Mãe, que você sinta todo o orgulho e a alegria que o pai sentiria se estivesse conosco.”

Aos meus irmãos Zé, Marcelo, Kátia e Andréia que sempre torceram por mim e me passaram os melhores valores da vida. A “pituquinha” de vocês cresceu.

Ao meu esposo, Júnior, que sempre me incentivou a estudar, às vezes acreditando em meu potencial mais do que eu mesma, que compreendeu todas as minhas ausências, cansaços e sempre me ajudou nos momentos mais difíceis.

Aos meus sogros, Clarisse e Pedro, pelo carinho demonstrado e por sempre orarem por mim.

Aos meus sobrinhos, Thiago, Juliana, Júlia, Lucas, Giovana e Gabriel pelos nossos momentos de alegria e descontração e por manterem viva minha criança interna.

AMO TODOS VOCÊS !!!

---

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser tão presente em minha vida, me guiando, me guardando e abençoando a mim e minha família.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliana Duek, pelas ótimas oportunidades que me proporcionou; pelos ensinamentos e conselhos valiosos; pela confiança depositada em mim e principalmente por me permitir fazer parte da família do Laboratório de Biomateriais, com a qual muito aprendi.

Aos meus amigos/irmãos do Laboratório de Biomateriais, André, Bruna e Andrea, que sempre me ajudaram e tiveram muita paciência comigo.

À toda equipe do Laboratório de Biomateriais, pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos, alunos de iniciação científica, TCC, apoio técnico, enfim, todos que conviveram comigo e/ou contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Claudinete pela agilidade e prontidão nas análises de TGA e DSC realizadas neste trabalho.

Ao amigo Lucas por todas as dúvidas esclarecidas e as longas horas de orientação por MSN que de muito valeram para a execução deste trabalho.

À amiga Mari da Bioquímica, que sempre tinha uma palavra de consolo para meus momentos de angústia.

À Malvern Instruments Incorporation, em especial ao especialista em processos Henrique Kajiyama pela atenção, paciência e realização de análises de caracterização das microesferas.

---

Ao gerente técnico da Altmann, Wagner Vittalis, pela realização de análises de caracterização das microesferas.

À toda equipe do laboratório de controle sanitário da Sabesp (RAOC) pelo apoio para a finalização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

*“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem desceu no coração humano o que Deus tem  
preparado para aqueles que o amam.”*

*I Coríntios 2:9.*

## RESUMO

SANTOS, Cintia Cristina, *Obtenção e caracterização de microesferas de PLDLA carregadas com sinvastatina*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2011. 100p. Dissertação (Mestrado).

Dispositivos de liberação controlada de fármacos têm sido indicados por profissionais da saúde como uma alternativa para aumentar a eficácia terapêutica de medicamentos assim como a adesão dos pacientes ao tratamento. Polímeros biorreabsorvíveis, seus copolímeros e blendas têm apresentado vantagens em relação a outros polímeros por serem: biocompatíveis, fáceis de processar, degradarem por hidrólise, apresentarem subprodutos não tóxicos, e determinarem a morfologia e distribuição de diâmetros de microesferas e conseqüentemente a taxa de degradação do dispositivo e a cinética de liberação do fármaco. O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar microesferas de PLDLA carregadas com sinvastatina. O poli L-co-D,L ácido láctico (PLDLA) é um copolímero do poli Ácido Láctico (PLA). A sinvastatina é um fármaco usado no tratamento de hiperlipidemias, que induz formação de tecido ósseo quando aplicado no local de fraturas e patologias ósseas. A técnica de simples emulsão permitiu a obtenção de microesferas com morfologia esférica, superfície lisa, tamanho em escala micrométrica, grande distribuição de diâmetros, manteve a integridade química do polímero e o fármaco encapsulado se encontra em estado amorfo disperso pela matriz polimérica. A eficiência de encapsulação do dispositivo foi de 96,2% e o estudo de liberação *in vitro* apresentou liberação inicial em explosão, característica de sistemas compostos por microesferas de diâmetros variados. A sinvastatina degradou em seu hidróxiácido e em produtos não identificados. As microesferas liberaram o fármaco até o 30º dia de estudo enquanto degradavam. Portanto, as microesferas de PLDLA obtidas são dispositivos promissores para a aplicação como carreadores na liberação local e controlada de fármacos.

Palavras-chave: PLDLA, liberação local e controlada de fármacos, microesferas, sinvastatina.

## ABSTRACT

SANTOS, Cintia Cristina, *Obtaining and characterization of simvastatin loaded PLDLA microspheres*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2011. 100p. Dissertação (Mestrado).

Drug delivery systems have been indicated by health professional as an alternative to improve drug efficacy and acceptability of the treatment to the patient. Bioreabsorbable polymers, its copolymers and blends have presented advantages and importance in relation to others polymers due to characteristics like: biocompatibility, easily to process, hydrolytic degradation, byproducts are nontoxic, control to microspheres morphology size distribution and consequently degradation rate and drug release kinetics. The aim of this work was to obtain and characterize simvastatin loaded PLDLA microspheres. The Poly L-co-D,L lactic acid (PLDLA) is a Poly lactic acid (PLA) copolymer. Simvastatin is a drug used for hyperlipidemia, that locally applied induces bone formation and fracture healing. The oil/water single emulsion/solvent evaporation technique produced microspheres in a spherical and smooth surface, micrometric size, large diameter distribution, the microencapsulation process did not interfere in the polymer chemical structure and the drug is in a amorphous state in the polymeric matrix. Simvastatin encapsulation efficiency was 96,2% and *in vitro* drug release showed a burst release, which characterize large diameter distribution systems. Simvastatin had degraded in its hydroxiacid and non-identified products. Microspheres released the drug up to 30° day while the degradation process occurred. Thus, the PLLA microspheres obtained are promising to apply as a carrier drug delivery system.

Key-words: PLDLA, controlled drug delivery, microsphere, simvastatin.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xv
NOMENCLATURA .....	xvi
Capítulo 1 INTRODUÇÃO .....	1
Capítulo 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Liberação Local e Controlada de Fármacos .....	3
2.2 Polímeros Biorreabsorvíveis .....	6
2.2.1 Poli (L-co-D,L ácido láctico) - PLDLA .....	9
2.3 Técnicas de Obtenção de Microesferas .....	10
2.4 Estatinas .....	16
2.4.1 Efeitos Pleiotrópicos .....	20
Capítulo 3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
3.1 Obtenção das Microesferas .....	24
3.1.1 Estudo Piloto .....	24
3.1.2 Microesferas Sem o Fármaco .....	25
3.1.3 Microesferas Com o Fármaco Sinvastatina .....	25
3.2 Caracterização da Morfologia e Distribuição de Diâmetros das Microesferas .....	26
3.2.1 Morfologia das Microesferas .....	26
3.2.2 Distribuição de Diâmetros .....	26
3.3 Caracterização Térmica das Microesferas .....	27
3.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	27
3.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA) .....	27

3.4 Eficiência de Encapsulação e Estudo da Liberação <i>in vitro</i> do Fármaco.....	28
Capítulo 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
4.1 Obtenção das Microesferas .....	30
4.1.1 Estudo Piloto .....	30
4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	32
4.3 Distribuição de Diâmetros das Microesferas .....	35
4.4 Análises Térmicas .....	40
4.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	40
4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA).....	43
4.5 Eficiência de Encapsulação e Estudo da Liberação <i>in vitro</i> do Fármaco.....	46
4.5.1 Eficiência de Encapsulação do Fármaco .....	46
4.5.2 Estudo da Liberação <i>in vitro</i> do Fármaco (HPLC) .....	47
Capítulo 5 CONCLUSÃO .....	54
Capítulo 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: administração convencional e liberação controlada [Adaptado de DASH & CUTWORTH, 1998]. .....	4
<b>Figura 2.2:</b> Rota metabólica de bioreabsorção dos poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos) PLA e PGA. [BARBANTI <i>et al.</i> , 2005] .....	8
<b>Figura 2.3:</b> Representação do método de simples emulsão óleo/água (O/W) .....	12
<b>Figura 2.4:</b> Representação do método de simples emulsão por óleo/óleo (O/O).....	13
<b>Figura 2.5:</b> Representação do método emulsificação e evaporação de solvente – dupla emulsão. ....	14
<b>Figura 2.6:</b> Representação das estruturas da atorvastatina (AV), lovastatina (LV), pravastatina (PV), sinvastatina (SV) e rosuvastatina (RV) [PASHA <i>et al.</i> , 2006] .....	16
<b>Figura 2.7:</b> Síntese do colesterol e atuação das estatinas .....	20
<b>Figura 3.1:</b> Representação da metodologia utilizada na obtenção das microesferas de PLDLA sem e com o fármaco sinvastatina.....	26
<b>Figura 3.2:</b> Equação para cálculo da eficiência de encapsulação do fármaco .....	28
<b>Figura 4.1:</b> Microscopia eletrônica de Varredura das Microesferas: A e B) Microesferas com fármaco obtidas no estudo piloto; C e D) Microesferas de PLDLA com o fármaco; E) Microesferas de PLDLA sem o fármaco .....	33
<b>Figura 4.2:</b> Conjunto representativo das fotos de microesferas de PLDLA obtidas pelo Morphologi G3 .....	34

<b>Figura 4.3:</b> Conjunto representativo das fotos de microesferas de PLDLA com o fármaco obtidas pelo Morphologi G3.....	34
<b>Figura 4.4:</b> Distribuição de diâmetros baseada em volume das microesferas de PLDLA sem o fármaco .....	36
<b>Figura 4.5:</b> Distribuição de diâmetros baseada em volume das microesferas de PLDLA com o fármaco .....	36
<b>Figura 4.6:</b> Distribuição de diâmetros baseada em número de microesferas de PLDLA sem o fármaco .....	37
<b>Figura 4.7:</b> Distribuição de diâmetros baseada em número de microesferas de PLDLA com o fármaco .....	38
<b>Figura 4.8:</b> Termogramas de DSC: A) sinvastatina pura, B) PLDLA puro, C) microesferas sem fármaco, D) microesferas com fármaco e E) mistura física de microesferas de PLDLA + sinvastatina .....	43
<b>Figura 4.9:</b> Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA): A) sinvastatina pura, B) PLDLA puro, C) microesferas sem fármaco e D) microesferas com fármaco .....	45
<b>Figura 4.10:</b> Quantidade de sinvastatina liberada <i>in vitro</i> pelo tempo de liberação estudado. ....	48
<b>Figura 4.11:</b> Cromatograma do sobrenadante após 3 dias de degradação e liberação .....	50
<b>Figura 4.12:</b> Cromatograma do sobrenadante após 5 dias de degradação e liberação. ....	50

<b>Figura 4.13:</b> Cromatograma do sobrenadante após 7 dias de degradação e liberação ....	51
<b>Figura 4.14:</b> Cromatograma do sobrenadante após 10 dias de degradação e liberação ...	51
<b>Figura 4.15:</b> Cromatograma do sobrenadante após 15 dias de degradação e liberação ...	52
<b>Figura 4.16:</b> Cromatograma do sobrenadante após 20 dias de degradação e liberação ...	52
<b>Figura 4.17:</b> Cromatograma do sobrenadante após 25 dias de degradação e liberação ...	53
<b>Figura 4.18:</b> Cromatograma do sobrenadante após 30 dias de degradação e liberação ...	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Poli( $\alpha$ -hidróxi ácidos), polímeros sintéticos bioreabsorvíveis [BARBANTI <i>et al.</i> , 2005] .....	7
<b>Tabela 3.1:</b> Detalhes dos testes realizados durante estudo piloto. Em negrito, metodologia para obtenção de microesferas de PLDLA sem e com o fármaco.....	24
<b>Tabela 4.1:</b> Diâmetros mínimos, médios e máximos das amostras de PLDLA sem e com o fármaco .....	38
<b>Tabela 4.2:</b> Comparação dos valores de $d(0,1)$ , $d(0,5)$ e $d(0,9)$ para as distribuições de diâmetros baseadas em volume e em número.....	39

## NOMENCLATURA

Tg- Temperatura de transição vítrea (°C)

Ti- Temperatura inicial de perda de massa (°C)

Tf- Temperatura final de perda de massa (°C)

Mw- Massa molar ponderal média

### *Fatores*

μ - micro (10<sup>-6</sup>)

n- nano (10<sup>-9</sup>)

### *Letras Latinas*

A- Ampère

### *Abreviações*

AINEs – Anti-inflamatórios não-esteroides

O/W - Processo por Simple Emulsão óleo/água

O/O – Processo por Simple Emulsão óleo/óleo

W/O/W- Processo por Emulsão Dupla água/óleo/água

PGA - Poli(ácido glicólico)

PLA - Poli(ácido láctico)

PLGA – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PCL - Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

PDLLA - Poli(D,L-ácido láctico)

PLLA - Poli(L-ácido láctico)

PLDLA- Poli(L-co-D,L ácido láctico)

PHB- Poli(hidroxibutirato)

PHBV- Poli(hidroxibutirato-co-valerato)

PEG- Polietilenoglicol

PVP- Polivinilpirrolidona

PEO- poli (óxido de etileno)

FDA- Food and Drug Administration

OMS- Organização Mundial da Saúde

LDL- Lipoproteínas de baixa densidade

VLDL- Lipoproteínas de muito baixa densidade

HDL- Lipoproteínas de alta densidade

HMG-CoA- Hidroximetilglutaril coenzima A

AV- Atorvastatina

LV- Lovastatina

PV- Pravastatina

RV- Rosuvastatina

SV- Sinvastatina

BMP-2- Proteína óssea morfogenética do tipo II

GTPases- Enzimas hidrolases

VEGF- Fator de crescimento endotélio vascular

Cbfa 1- Fator de transcrição para diferenciação osteoblástica

PVAI - Poli(álcool vinílico)

PBS - Solução tampão fosfato salina

LLS - Light Laser Scattering (Espalhamento de Luz Laser)

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

TGA - Análise Termogravimétrica

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

PD- Produtos de degradação

# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

A baixa adesão dos pacientes a tratamentos de longa duração propostos pelos profissionais da saúde é um dos problemas de saúde pública no Brasil que tem preocupado as autoridades responsáveis e levado pesquisadores à busca por soluções. Esse fato está relacionado principalmente aos efeitos colaterais causados pelos medicamentos, pelo esquecimento da administração das doses medicamentosas e à ineficiência da terapêutica.

Novas formas de administração de fármacos, novos tratamentos e terapias mais eficientes e menos invasivas têm sido pesquisados. As técnicas de liberação local e controlada de medicamentos por consistirem na encapsulação do fármaco em um dispositivo que o liberará de forma controlada, em doses terapêuticas eficazes, no local a ser tratado apresentam-se como soluções para a problemática brasileira. Tanto os pacientes como os profissionais da saúde são beneficiados, pois essa forma de administração requer uma frequência menor de dosagens o que proporciona ao paciente maior conforto por diminuir os indesejáveis efeitos colaterais e aumentar a eficiência do tratamento, já que a liberação controlada mantém o fármaco sempre na dose terapêutica desejada.

Segundo HOWLAND & MYCEK [2007], VIPPAGUNTA e colaboradores [2006], essas técnicas também solucionam outros desafios encontrados na busca de novos tratamentos, como o aumento da solubilidade de fármacos hidrofóbicos, que apresentam limitações de dissolução, mas não de absorção e, da quantidade de moléculas de fármacos de meia vida curta melhorando assim sua biodisponibilidade, já que estes tem sua dose reduzida pela metade em questão de horas resultando numa concentração plasmática oscilante entre as posologias.

O dispositivo de liberação local e controlada, que pode ser apresentar como hidrogel, membrana, nano e microesferas, deve ser composto por uma matriz biocompatível, fácil de fabricar, capaz de carregar altas doses de fármacos, confortável para o paciente, simples para administração e remoção.



Desta forma, os polímeros biorreabsorvíveis tem-se apresentado como materiais ideais por serem biocompatíveis, degradarem por hidrólise em subprodutos que não causam reação inflamatória e são excretados pelo organismo, o que torna desnecessária a intervenção cirúrgica para remoção do dispositivo, além de permitirem a obtenção de diferentes formas e tamanhos de dispositivos. Sua interação com o fármaco, massa molar, proporção de monômeros, cinética de degradação, propriedades físico-químicas influenciam no tamanho e forma do dispositivo assim como na cinética de liberação e na eficiência de encapsulação do fármaco.

O Poli (L-co-D,L ácido láctico), polímero da família dos Poli ( $\alpha$ -hidróxiácidos), utilizado em diversas aplicações por apresentar tempo de degradação adequado, boas propriedades mecânicas e a vantagem de ser um polímero amorfo, não deixando resíduos cristalinos no organismo que podem desencadear reação inflamatória indesejada foi o polímero escolhido para este trabalho.

A sinvastina, medicamento muito empregado clinicamente para o tratamento de hipercolesterolemia, tem sido explorada na última década pelos seus efeitos pleiotrópicos. O aumento da regeneração óssea, quando aplicada no local de fraturas ou patologias ósseas foi o efeito que nos levou a escolher esse fármaco para o desenvolvimento deste estudo.

Portanto os objetivos deste trabalho foram obter e caracterizar microesferas de PLDLA carregadas com sinvastatina como dispositivo para liberação local e controlada de fármacos, visando aplicação na regeneração óssea.

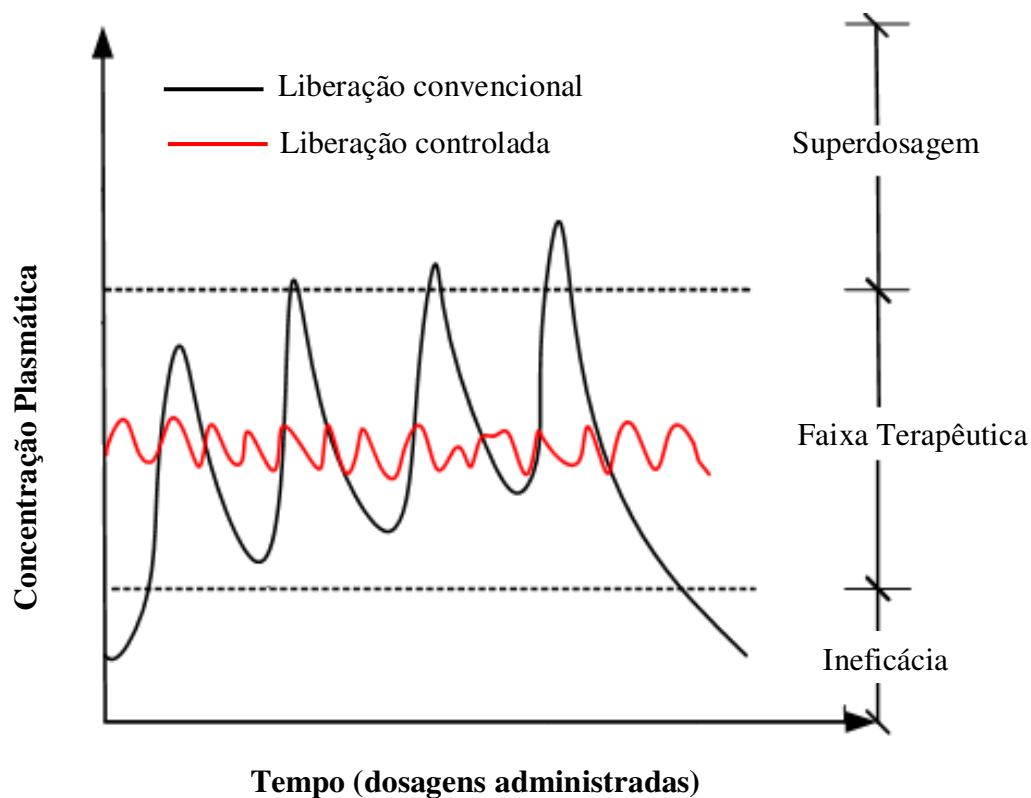
## Capítulo 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Liberação Local e Controlada de Fármacos

A liberação do fármaco de forma controlada é uma técnica que utiliza dispositivos carreadores de fármacos, que liberarão os mesmos mantendo-os numa concentração plasmática próxima da faixa terapêutica, por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem [DUMITRIU, 1994; ALLEN & CULLIS, 2004]. Essa técnica pode ser aplicada na administração local ou sistêmica de fármacos. Na local, o objetivo é restringir a ação do fármaco ao sítio a ser tratado, como por exemplo em uma inflamação, tumores, fraturas e/ou patologias ósseas. Pode-se utilizar dispositivos como adesivos, membranas, hidrogéis ou microesferas. Na administração sistêmica, o medicamento terá efeito no organismo todo, e pode-se utilizar nanoesferas como carreadores, aplicando-as na corrente sanguínea, ou pela via oral ou bastonetes em implante subcutâneo. LANGER & TIRELL [2004] e HAMMAN e colaboradores [2005] demonstraram maior eficácia terapêutica ao utilizar a liberação controlada, pois aumenta-se o tempo de permanência do fármaco na circulação; diminui-se significativamente sua toxicidade, em decorrência do uso de doses menores; a administração é segura e conveniente ao paciente, permite a incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos e a liberação em alvos específicos.

Após administração pela via oral, a concentração plasmática do fármaco apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Todo fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ele é tóxico e abaixo da qual ele é ineficaz. Os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica ou se houver acúmulo de fármaco no organismo e/ou metabólitos tóxicos, efeitos colaterais desagradáveis podem se manifestar. A Figura 2.1 compara a oscilação na concentração plasmática do fármaco entre as doses administradas pela via oral e de forma controlada.



**Figura 2.1:** Perfis de liberação de fármacos em função do tempo: liberação convencional e liberação controlada [Adaptado de DASH & CUTWORTH, 1998].

Os fármacos mais indicados para encapsulação em dispositivos são os que necessitam de uma pequena dose terapêutica diária, que são administrados em tratamentos longos, e estão associados à baixa adesão dos pacientes [WISCHKE & SCHWENDEMAN, 2008].

Sistemas poliméricos de liberação de fármacos têm sido largamente utilizados. A matriz ideal para liberação de drogas deve ser biocompatível, mecanicamente resistente, confortável para o paciente, capaz de carregar altas cargas de fármacos, simples para administração e remoção, fácil de fabricar e esterilizar e de baixo custo. O modelo e material adequados para a seleção da matriz em cada aplicação específica dependem de diversas variáveis, incluindo propriedades físicas (mecânica, degradação, formação do gel), propriedades do transporte (difusão), e propriedades biológicas (adesão celular e sinalização) [DRURY & MOONEY, 2003].

As matrizes poliméricas biorreabsorvíveis, naturais ou sintéticas, são biocompatíveis e degradáveis, isto é degradam *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados. Estes produtos de degradação são atóxicos, e não devem provocar nenhuma resposta inflamatória. Outra característica importante é a degradação ocorrer em um razoável período de tempo, requerido pela aplicação [FUKUSHIMA *et al.*, 2000].

Se o dispositivo que carrega o fármaco não degradar, dependendo da aplicação ele deve ser removido cirurgicamente, implicando em um alto custo e incômodo para o paciente. Já existiam registros, no passado, de sistemas alternativos para administração de vacinas. PREIS & LANGER, [1979] demonstraram que a produção de anticorpos em camundongos imunizados com uma única dose de um antígeno contido numa matriz polimérica não degradável mantinha-se por mais de seis meses em níveis comparados aos dos camundongos imunizados por duas vezes com o mesmo antígeno. Entretanto, a aplicação desta estratégia levantou a preocupação sobre os possíveis efeitos adversos que a presença deste material poderia ocasionar no organismo, fazendo-se necessária a remoção cirúrgica do implante, após a liberação do antígeno. Neste sentido, a síntese de polímeros biorreabsorvíveis contribuiu para a melhoria destes sistemas, visto que eles não requerem remoção cirúrgica e apresentam poucos efeitos colaterais.

As matrizes poliméricas utilizadas na liberação local e controlada podem ser apresentadas como hidrogéis, membranas, nano e microsferas.

Hidrogéis são materiais que possuem alta afinidade por água, estruturas similares à matriz extracelular da maioria dos tecidos, podem ser processados em condições relativamente brandas e aplicados de uma maneira minimamente invasiva, servindo como matriz extracelular sintética [DRURY & MOONEY, 2003]. Exemplos de hidrogéis: agar, alginato, quitosana.

Nanoesferas apresentam-se como partículas esféricas de diâmetro na faixa de 1 e 1000 nm, formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Passaram a ser amplamente desenvolvidas nos anos 70 como carreadores de vacinas e quimioterápicos [COUVREUR *et al.*, 1982]. Atualmente tem sido exploradas para aplicação na administração parenteral, carregando anticancerígenos e antibióticos, oral, visando diminuir efeitos colaterais de antiinflamatórios não esteróides e proteger fármacos que degradam no trato gastrointestinal ou, na aplicação oftálmica, para aumentar a biodisponibilidade ocular e diminuir os efeitos colaterais resultantes da absorção sistêmica do fármaco [SCHAFFAZICK *et al.*, 2003].

Microesferas poliméricas são partículas esféricas com diâmetro entre 1 e 250  $\mu\text{m}$ , que oferecem flexibilidade na dosagem, cinética de liberação e marcação de receptores para aplicações como liberação de fármacos ou genes [YUN *et al.*, 2004]. Facilitam a administração de novas drogas de estrutura complexa, como peptídeos, que são freqüentemente difíceis de serem administradas de maneira conveniente por outros meios. No caso dos anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) pode-se evitar a irritação da mucosa gástrica causada pelos medicamentos [PEPPAS, 1997; RÉ, 2000]. Microesferas biodegradáveis podem ser utilizadas na liberação controlada em formulações injetáveis, orais, e em sistemas bioadesivos [BRANNON-PEPPAS, 1995].

## 2.2 Polímeros Biorreabsorvíveis

Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis e biorreabsorvíveis encontram-se os poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais fazem parte o poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), seus copolímeros e outros. Originalmente usados como fios de sutura (Dexon®, Vicryl®, Maxon®, PDS®, etc), também podem ser encontrados em diversos produtos comerciais de fixação óssea, aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Nas últimas duas décadas, o PLGA tem se tornado o polímero biodegradável mais empregado na encapsulação de fármacos. Isso se deve ao fato de sua degradação e taxa de liberação serem mais rápidas, de 2 a 4 semanas, quando comparadas às do PLA, que levavam meses [WISCHKE & SCHWENDEMAN, 2008]. A Tabela 2.1 fornece algumas propriedades destes polímeros [MIDDLETON & TIPTON, 2000; ELKE *et al.*, 2003].

O processo de biodegradação e biorreabsorção dos poli ( $\alpha$ - hidróxi ácidos) é descrito na literatura como sendo uma sucessão de eventos. O material sofre hidratação quando exposto aos fluidos corpóreos. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de

massa, diminuição de massa molar ponderal média (Mw) e pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão [ELKE *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2004].

**Tabela 2.1:** Poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos), polímeros sintéticos biorreabsorvíveis [BARBANTI *et al.*, 2005].

Polímero	Sigla	Fórmula	Tg (°C)	Tm (°C)	Módulo de elasticidade (GPa)	Tempo de Degradação (meses) <sup>b</sup>
Poli(ácido glicólico)	PGA		35-40	225-230	8,4	6-12
Poli(L-ácido láctico)	PLLA		60-65	173-178	2,7	> 24
Poli(D,L-ácido láctico)	PDLLA		55-60	Amorfo	1,9	12-16
Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)	PLGA		45-50 <sup>a</sup>	Amorfo	2,0	1-2
Poli( $\epsilon$ -caprolactona)	PCL		(-65) (-60)	58-63	0,4	24-36

<sup>a</sup>Valores para o copolímero 50/50

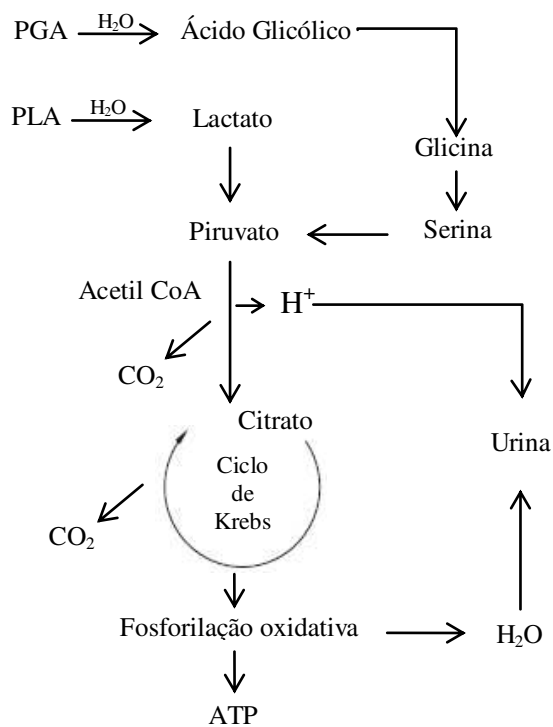
Tg=temperatura de transição vítrea

Tm=temperatura de fusão

<sup>b</sup>Até a completa bioreabsorção

A biorreabsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos com as características dos metabólitos orgânicos, especificamente os ácidos do Ciclo

de Krebs. Terminada a hidrólise do material a degradação segue o processo de oxidação a ácido láctico (para o PLA) e conversão das unidades de PGA em glicina, que por sua vez são convertidos em ácido pirúvico. Na presença da acetil coenzima A, ocorre a liberação de  $\text{CO}_2$  e, conseqüentemente, a decomposição em citrato. O citrato será então incorporado no Ciclo de Krebs, resultando em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , podendo sua eliminação ser feita através da urina e da respiração. Desta forma o material foi reabsorvido e metabolizado [ALI *et al.*, 1993]. Em estudos *in vivo*, o processo de biodegradação e bioreabsorção é um mecanismo complexo de eventos celulares e bioquímicos. Com o implante do material o organismo promove uma típica resposta a uma reação inflamatória de corpo estranho. A influência na degradação pela presença de peróxidos, enzimas e células fagocitárias, representa um importante enfoque nas pesquisas dos polímeros bioreabsorvíveis [CHU, 1999; SUNG *et al.*, 2004].



**Figura 2.2:** Rota metabólica de bioreabsorção dos poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos) PLA e PGA. [BARBANTI *et al.*, 2005].

### 2.2.1 Poli (L-co-D,L ácido láctico) - PLDLA

O Poli (ácido láctico), o PLA, polímero da família dos poli ( $\alpha$ - hidróxi ácidos) foi um dos poliésteres alifáticos precursores na fabricação de microesferas biodegradáveis [BOSWELL & SCRIBNER, 1973; NUWAYSER *et al.*, 1977; GARDNER *et al.*, 1977; BECK *et al.*, 1979, 1980, 1981; CONTI *et al.*, 1992]. A cristalinidade do PLA determina seu tempo de degradação. BERNATAVICIUS [2004] demonstrou que ao aplicar microesferas de PLLA carregadas com piroxicam e vancomicina em tecidos dentinários lesados obteve-se controle da dor e do processo inflamatório, assim como a manutenção da vitalidade pulpar.

A dificuldade em se encontrarem polímeros puros que atendam todas as necessidades requeridas para aplicação como biomaterial, levou à busca de alternativas como a síntese de copolímeros e blendas. Em MOURA [2007] aplicou-se membrana composta pela blenda PLLA/tri-etil-citrato em defeito ósseo na calvária de coelhos que após 90 dias de implante estava praticamente toda reabsorvida e permitira o fechamento completo do defeito. CERONI FILHO [2004] demonstrou que microesferas fabricadas com a blenda PLLA/PEO apresentaram degradação mais acelerada que as microesferas de PLLA.

O Poli (ácido láctico), o PLLA existe em duas formas químicas específicas ou enantiômeros: o Poli (L-ácido láctico), que tem como característica ser altamente cristalino e o Poli (D, L ácido láctico), que é completamente amorfo. Essas duas formas (L ou D,L) são passíveis de combinação, resultando na formação de um copolímero com propriedades diferentes daquelas exibidas por cada um desses homopolímeros isolados. Trata-se do copolímero Poli (L-co-D, L ácido láctico), PLDLA.

A obtenção do poli (L-co-D, L ácido láctico), PLDLA teve como objetivo diminuir a cristalinidade apresentada pelo PLLA, conferir boas propriedades mecânicas ao material, com tempo de degradação mais adequado ao requerido para diversas aplicações [MOTTA & DUEK, 2008].

A composição do copolímero rege a intensidade de cristalinidade do material. De maneira geral, a inserção de unidades D,L lactide na cadeia do polímero resulta em uma diminuição drástica da cristalinidade, podendo se obter copolímeros completamente amorfos, dependendo da



relação empregada dos estereoisômeros L/D,L. Segundo BENDIX, [1998] copolímeros de poli (L-co-D,L-ácido láctico) serão amorfos se a quantidade do estereoisômero L for menor que 90 %.

O copolímero poli (L-co-D,L-ácido láctico) na proporção 70:30 se mostra completamente amorfo, apresentando como consequência dessa ausência de cristalinidade, uma biocompatibilidade maior do que a apresentada pelo PLLA, além de uma excelente processabilidade [MOTTA, 2007].

As unidades D,L-ácido láctico na seqüência da cadeia do copolímero impedem a cristalização da parte L-ácido láctico, ao mesmo tempo em que a força do material é mantida durante o período necessário para a recuperação do tecido tratado [MOSEY *et al.*, 2005].

A taxa de degradação do copolímero é intermediária entre o poli (L-ácido láctico) e o poli (D,L-ácido láctico), se mostrando assim muito interessante para a maior parte das aplicações [ALEXANDER *et al.*, 2002 e HU *et al.*, 2000].

### **2.3 Técnicas de Obtenção de Microesferas**

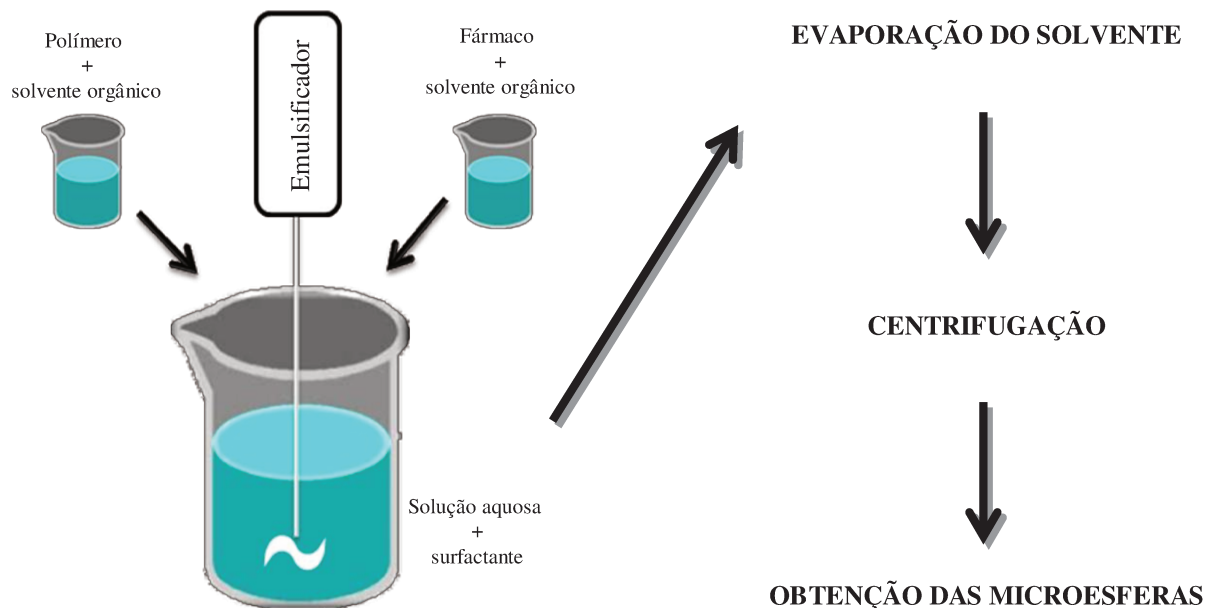
Há um grande número de técnicas disponíveis para encapsulação de fármacos, como os métodos de emulsificação e evaporação de solvente, ‘spray drying’, separação de fases ou coacervação. Cada método tem suas vantagens e desvantagens e a escolha depende do polímero, do fármaco, do local de ação e da duração da terapia. [JAIN, 2000; FUKUSHIMA *et al.*, 2000; OKADA & TOGUSHI, 1995]. Ao escolher o processo de preparação de microesferas deve-se considerar a manutenção da estabilidade química e biológica do fármaco e do polímero, durante e após o processo de encapsulação; melhor eficiência de encapsulação e rendimento possíveis; faixa de diâmetro compatível com a via de administração; a distribuição de diâmetro das partículas deve ser homogênea e as partículas serem facilmente resuspendidas em água [PARK *et al.*, 2005].

A técnica de emulsificação e evaporação de solvente pode ser subdividida em emulsões simples e duplas emulsões. As emulsões simples óleo/água (O/W) e óleo/óleo (O/O) são mais

usadas para encapsular fármacos hidrofóbicos. Enquanto que as duplas emulsões são usadas na encapsulação de fármacos hidrofílicos.

### *Óleo/água (O/W)*

Na técnica óleo/água (O/W), o polímero é dissolvido em solvente orgânico volátil imiscível em água, e o fármaco é dissolvido em solvente ou suspenso na solução do polímero (fase orgânica interna). A mistura resultante é emulsificada em um grande volume de solução aquosa com surfactante (fase aquosa externa) (Figura 2.3). O solvente é removido da emulsão por evaporação, resultando na formação das partículas. A taxa de evaporação do solvente interfere na morfologia e tamanho das partículas. [PEREZ *et al.*, 2000; PASSERINI & CRAIG, 2002; ARSHADY, 1991; ASTETE & SABLIOV, 2006]. Esse processo apresenta como desvantagem uma baixa eficiência de encapsulação para fármacos solúveis ou parcialmente solúveis em água [WU, 1995b], pois o fármaco pode se difundir da fase apolar para a fase aquosa se depositando em forma de microcristais na superfície da matriz polimérica [WADA *et al.*, 1988]. Entretanto este processo tem sido amplamente utilizado na encapsulação de esteróides [JAIN, 2000] e de diversos fármacos como os neurolépticos tioridazina [MAULDING *et al.*, 1986; FONG *et al.*, 1986], clorpromazina [SUZUKI & PRICE, 1985], e bromperidol [KINO *et al.*, 1997], anestésicos locais [WAKIYAMA *et al.*, 1981, 1982a,b; NAKANO *et al.*, 1984], o tranquilizante diazepam [BODMEIER & MCGINITY, 1987<sup>a</sup>], o opióide sintético metadona [CHA & PITT, 1988], os antitumorais aclarubicina [WADA *et al.*, 1988; YOSHIKAWA *et al.*, 1989; MURANISHI *et al.*, 1991], lomustine [BENITA *et al.*, 1984; BENOIT *et al.*, 1984; BISSERY *et al.*, 1984], e paclitaxel [BURT *et al.*, 1995; DEMETRICK *et al.*, 1997; LIGGINS *et al.*, 2000; LIGGINS & BURT, 2001; WANG *et al.*, 1996, 1997; GUPTA & CIFTCI, 2004; XIE *et al.*, 2007], os hormônios progesterona [BENITA *et al.*, 1984; BENOIT *et al.*, 1984; BODMEIER & MCGINITY, 1987a; ROSILIO *et al.*, 1991; YANG & OWUSU-ABABIO, 2000] e levonorgestrel [BECK *et al.*, 1985], e o glicocorticóide dexametasona [THOTE *et al.*, 2005].



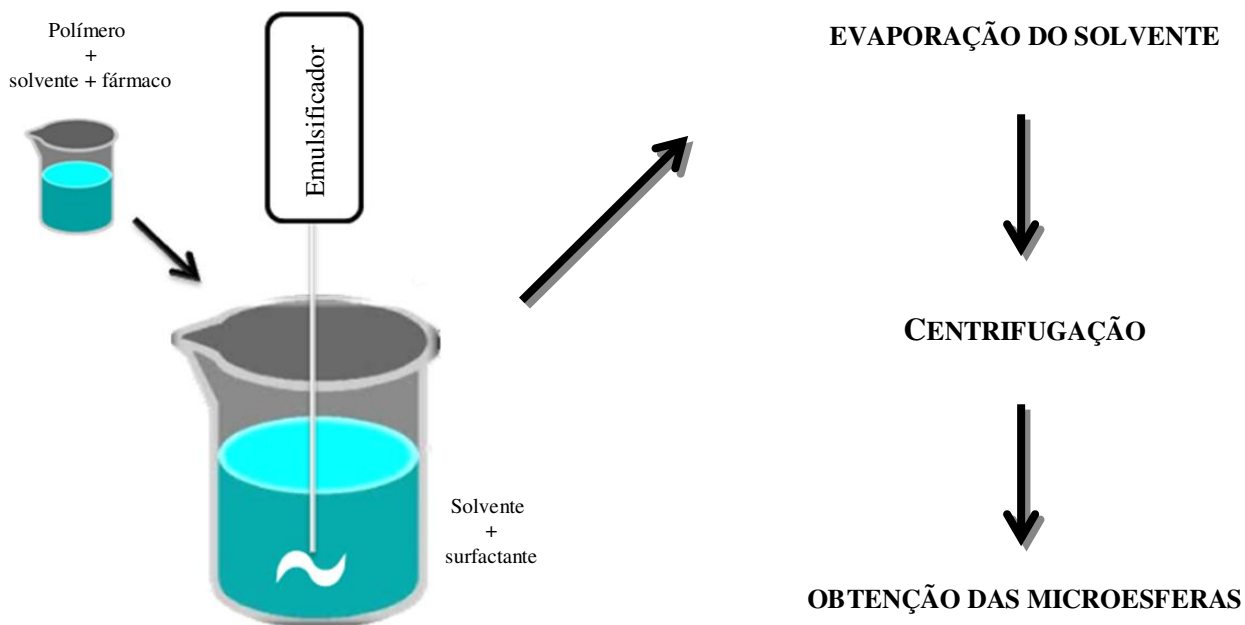
**Figura 2.3:** Representação do método de simples emulsão óleo/água (O/W).

### *Óleo/óleo (O/O)*

Para aumentar a eficiência na encapsulação de fármacos hidrofílicos uma variação do método por simples emulsão, conhecido por óleo/óleo (O/O), foi desenvolvido [JALIL & NIXON, 1990, ARSHADY, 1991]. Um líquido polar miscível em solvente solúvel, como a acetonitrila, solubiliza o fármaco no polímero também solúvel neste solvente (fase orgânica interna). Esta solução formada é então dispersa em um óleo mineral na presença de emulsificante (fase oleosa externa), formando assim uma emulsão óleo/óleo (O/O). As microesferas são obtidas extraíndo-se o solvente orgânico. Já em sua condição final as micropartículas são lavadas com n-hexano, secas ou liofilizadas [JALIL & NIXON, 1990]. TSAI e colaboradores [1986], utilizaram este método para encapsular mitomicina C em microesferas de poli(ácido láctico). A representação do processo O/O pode ser visto na figura 2.4.

Esse método apresenta como desvantagens a dificuldade de se obter microesferas com tamanho inferior a 50 $\mu$ m [JALIL & NIXON, 1990] e a tendência de ser aglomerarem quando

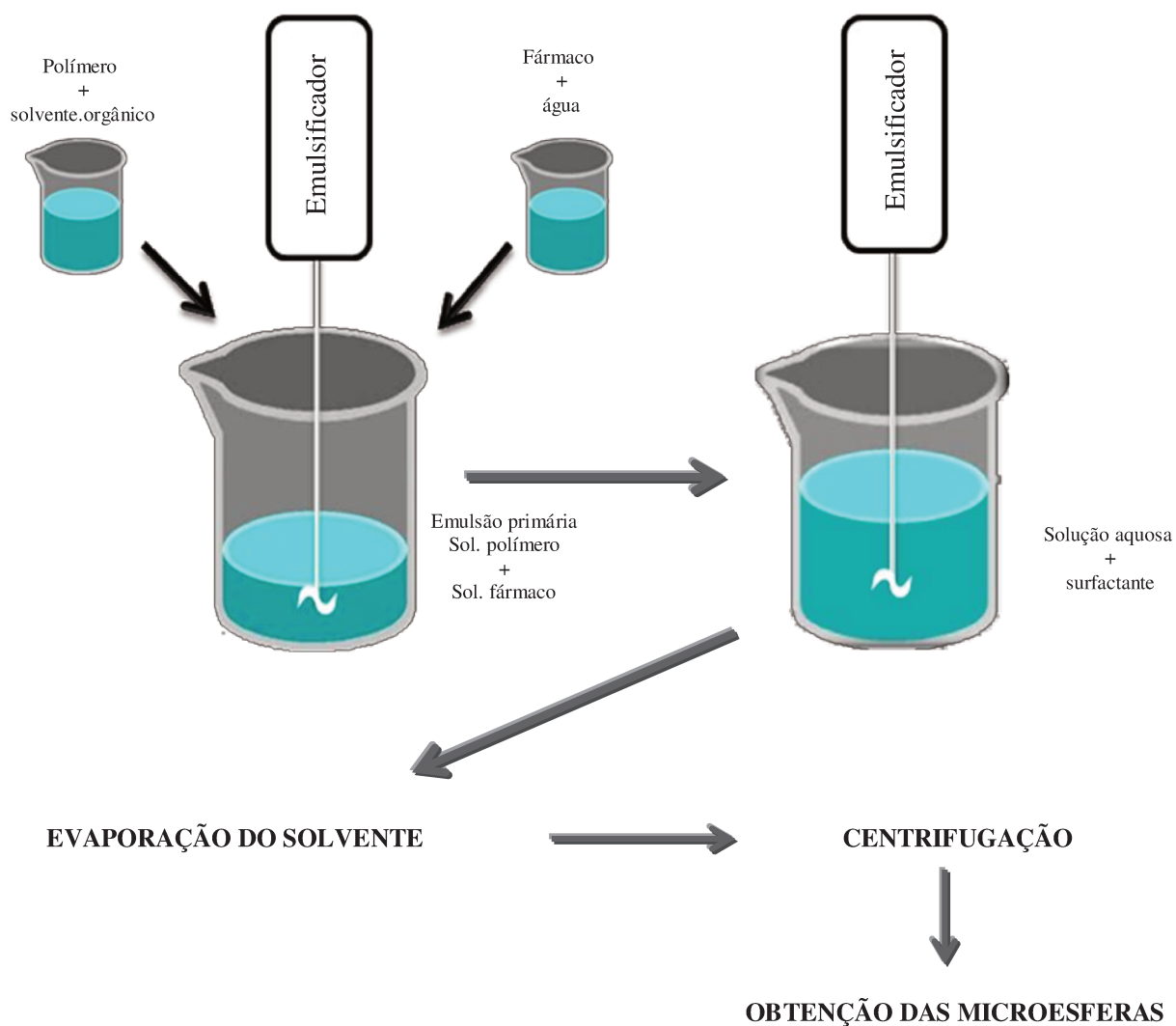
submetidas em veículos aquosos devido a sua natureza hidrofóbica de sua superfície sem a presença de um estabilizador hidrofílico [WHATELEY, 1993].



**Figura 2.4:** Representação do método de simples emulsão por óleo/óleo (O/O).

#### *Água/óleo/água (W/O/W)*

A dupla emulsão, água/óleo/água, (W/O/W) é a técnica mais indicada para encapsular fármacos hidrofílicos. O fármaco é dissolvido em água (fase aquosa interna), e o polímero em solvente orgânico (fase orgânica interna). Misturam-se os dois com o auxílio de emulsificador por ultrassom. Essa emulsão primária é transferida a um volume maior de água com surfactante (fase aquosa externa), formando assim a emulsão água/óleo/água (figura 2.5). As características das microesferas preparadas por esta variante do método são dependentes da propriedade do polímero (como composição e massa molar), a razão polímero/fármaco, a concentração do surfactante, temperatura e agitação [JAIN, 2000].



**Figura 2.5:** Representação do método emulsificação e evaporação de solvente – dupla emulsão.

### “*Spray drying*”

A técnica de “*spray drying*” oferece diversas vantagens quando comparada às demais técnicas para obtenção de microesferas [SINHA & TREHAN, 2003; MURILLO *et al.*, 2002; BLANCO-PRIETO *et al.*, 2004; BURKE *et al.*, 2004]. Essa técnica é menos dependente da solubilidade do fármaco e do polímero, mostra boa reprodutibilidade e permite controlar o tamanho das partículas. O fármaco e o polímero são dissolvidos em solventes voláteis como diclorometano ou acetona. A solução é então submetida a uma câmara de evaporação, causando a

rápida solidificação das gotículas atomizadas originando as partículas. O tamanho das microesferas é determinado pelas condições de atomização. As principais desvantagens dessa técnica é a grande perda de material, devido à adesão do mesmo na parede da câmara de evaporação, e a formação de muitos agregados resultantes da viscosidade que as microesferas apresentam antes da remoção total do solvente. A adição de solução aquosa de manitol e a dupla injeção de spray podem diminuir a formação dos agregados [PARK *et al.*, 2004].

### *Separação de fases ou Coacervação*

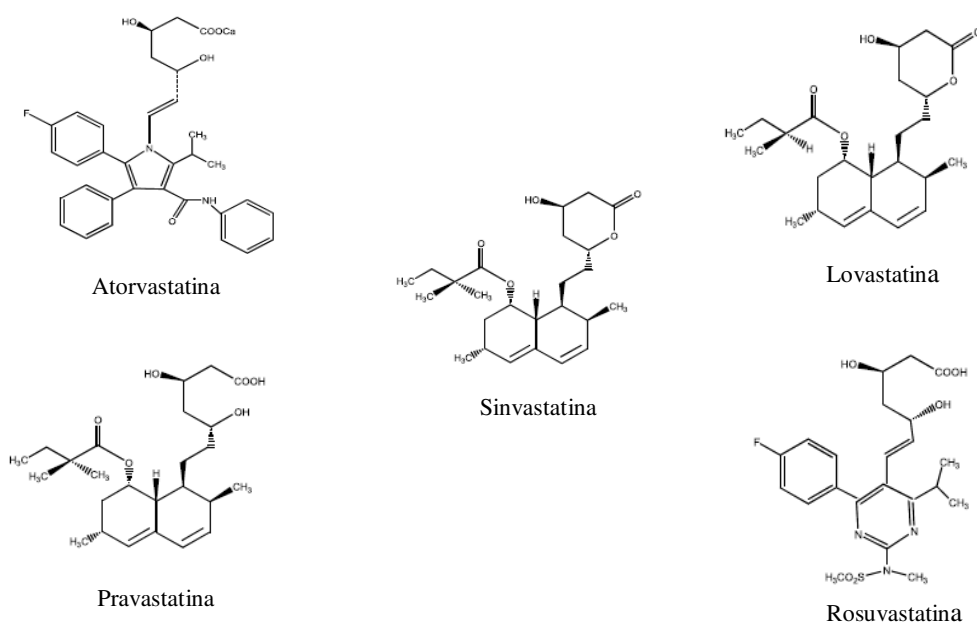
O processo por separação de fases ou coacervação é baseado na diminuição da solubilidade do polímero pela adição de um terceiro componente na solução polimérica [LEWIS, 1990, WU, 1995b, JALIL & NIXON, 1990]. Este processo é adequado para encapsular tanto fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos. Este processo tem sido comumente utilizado na encapsulação de peptídeos, vacinas e proteínas [JALIL & NIXON, 1990].

O processo consiste em dissolver o polímero em uma solução orgânica enquanto que o fármaco hidrofílico é solubilizado em uma solução aquosa. Esta solução é então dispersa na fase orgânica com a posterior adição de um solvente não orgânico ao sistema. No caso de fármacos hidrofóbicos estes são dissolvidos em solvente orgânico.

Com a adição do terceiro componente o sistema todo é submetido a uma agitação gradual para a retirada do solvente. Por consequência há uma separação de fases e a formação de gotículas cujo tamanho é controlado pela agitação. O sistema é transferido para um recipiente onde está contido outro solvente não orgânico. Nesta etapa as gotículas se enrijecem formando as microesferas. Ao final do processo as microesferas são lavadas, peneiradas ou filtradas e secas [WU, 1995b; EDELMAN *et al.*, 1993]. As desvantagens desse processo, que trazem limitações a utilização do método, são: presença de solvente residual nas microesferas, processo caro quando comparado aos demais devido à grande quantidade de solvente utilizada, as microesferas obtidas podem apresentar aglomerados caso não haja um estabilizador [PICOS *et al.*, 2001; WHATELEY, 1993].

## 2.4 Estatinas

As estatinas, uma família de drogas composta por atorvastatina (AV), lovastatina (LV), pravastatina (PV), rosuvastatina (RV) e sinvastatina (SV), representadas na figura 2.6, emergiram para prevenção de doenças cardiovasculares após demonstrarem efetiva redução da morbidade de doenças coronárias e seu tratamento abranger um amplo grupo de risco. Isso explica o grande sucesso médico e comercial dessas drogas [BARRIOS-GONZALEZ & MIRANDA, 2009].



**Figura 2.6:** Representação das estruturas da atorvastatina (AV), lovastatina (LV), pravastatina (PV), sinvastatina (SV) e rosuvastatina (RV) [PASHA *et al.*, 2006].

Em 1976, ENDO e colaboradores demonstraram que a mevastatina, primeira estatina descrita, isolada de culturas de *Penicillium citrinum*, inibia especificamente, de modo competitivo com relação ao substrato HMG-CoA, a HMG-CoA redutase, não afetando o restante das enzimas envolvidas. Posteriormente, a lovastatina foi isolada de culturas do fungo *Aspergillus terreus* por ALBERTS e colaboradores [1980]. A pravastatina e a sinvastatina são produzidas por processos biotecnológicos, semi-sintéticos derivados da lovastatina [KIDD, 2006]. As estruturas da lovastatina, pravastatina e sinvastatina são similares. A atorvastatina e

rosuvastatina são totalmente sintéticas e possuem estrutura diferente das demais. As estruturas químicas das estatinas determinam sua solubilidade em água, sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção [SERAJUDDIN *et al.*, 1991; LENNERNAS & FAGER, 1997; WHITE, 2002; SCHACHTER, 2005]. A atorvastatina, lovastatina e sinvastatina são lipossolúveis enquanto que a pravastatina e rosuvastatina são hidrossolúveis devido ao seu grupo hidroxil polar e metano sulfonamida, respectivamente [McTAVISH & SORKIN, 1991; McTAGGART *et al.*, 2001]. A hidrofobicidade reflete o potencial da estatina em cruzar as membranas celulares por difusão passiva [CORSINI *et al.*, 1999]. Estatinas lipofílicas cruzam facilmente as membranas celulares, enquanto que as hidrofílicas necessitam de moléculas ligantes que as farão entrar nas células. A atorvastatina, pravastatina e a rosuvastatina são administradas em suas formas ativas, os hidróxiácidos, responsáveis por baixarem o colesterol plasmático. Já a lovastatina e a sinvastatina são pró-drogas, administradas em suas formas lactonas inativas que se ativarão após a hidrólise no fígado, a um  $\beta$ -hidróxiácido, correspondente à forma biologicamente ativa do fármaco [TANG & KALOW, 1995].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares lideram as causas de mortes no mundo. Em 2005, cerca de 17,5 milhões de pessoas morreram em decorrência dessas doenças, estimando aproximadamente 30% da mortalidade global [BARRIOS-GONZÁLEZ & MIRANDA 2009].

As doenças cardiovasculares estão relacionadas com a alta concentração de colesterol no plasma. O colesterol é fundamental para o organismo humano, pois mantém a integridade de membranas celulares e funções fisiológicas do corpo, como síntese de hormônios [PASHA *et al.*, 2006]. Porém está associado a patologias como a hipercolesterolemia, altos níveis de colesterol no plasma, e a arteriosclerose, caracterizada pela deposição de colesterol nas paredes das artérias, que pode desencadear diversas doenças cardiovasculares levando o paciente à morte [LACOSTE *et al.*, 1995; HARDMAN *et al.*, 1996; LEVINE *et al.*, 1995; WILLIAMS & TABAS, 1995].

Há duas fontes de obtenção de colesterol: a exógena, quando o colesterol é ingerido na dieta e a endógena, quando sintetizado pelos tecidos humanos. Cerca de 75 % do colesterol presente no organismo é de origem endógena [FURBERG, 1999; ALBERTS *et al.* 1980].

A concentração de qualquer substância no sangue é resultado do equilíbrio entre sua taxa de produção e de remoção. O colesterol é sintetizado em uma variedade de tecidos a partir da acetil-



coenzima A (acetil-CoA) e, embora a biossíntese ocorra na maioria das células, essa capacidade é maior no fígado, no intestino, no córtex adrenal e nos tecidos reprodutores [GLEW, 1998]. O colesterol da dieta é transportado do intestino pelos quilomícrons. O fígado e os tecidos periféricos podem sintetizar esse esteróide ou obtê-lo a partir das lipoproteínas circulantes. O colesterol circula continuamente entre o fígado e os tecidos periféricos. No organismo humano o colesterol se liga a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e de muito baixa densidade (VLDL), responsáveis pelo transporte do colesterol do fígado para os tecidos periféricos, sendo classificados como o “mau colesterol”, pois sua disfunção pode acumular o colesterol nas paredes dos vasos sanguíneos causando efeitos deletérios no organismo. E à lipoproteína de alta densidade (HDL), o conhecido como o “bom colesterol”, pois atua no transporte da gordura para fora dos tecidos, removendo o “mau colesterol” dos vasos sanguíneos e levando-o para o fígado onde ele será utilizado na produção da bile, auxiliando assim na prevenção de doenças degenerativas decorrente do acúmulo do mesmo [VOET, *et al.*, 2000].

A síntese do colesterol envolve mais de 30 reações enzimáticas, mas pode-se resumir em 4 etapas fundamentais descritas abaixo e representadas na figura 2.7.

1. A condensação de três moléculas de acetil coenzima A (Acetil-CoA) produz hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA), que é reduzida a mevalonato pela enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase.

2. O mevalonato é convertido na unidade isoprenóide, o isopentenil-pirofosfato.

3. Seis unidades isoprenóides formam o esqualeno, um composto linear de 30 carbonos.

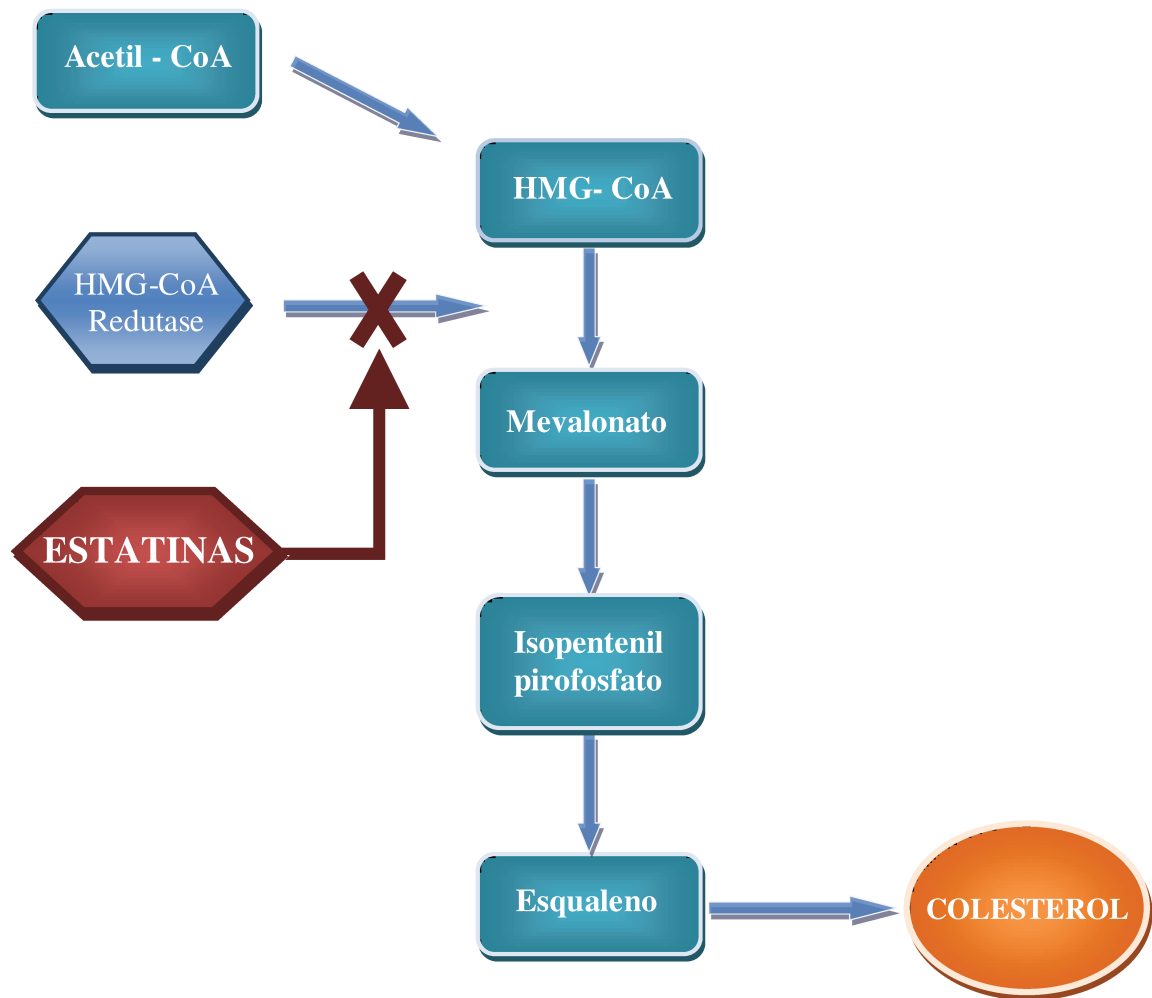
4. Através de vários passos, o esqualeno perde 3 grupos metil e é convertido em colesterol [McFARLANE *et al.*, 2009].

Os principais métodos para tratar as disfunções do colesterol, como a hipercolesterolemia são mudanças na dieta e no estilo de vida do paciente. Quando esses métodos não são suficientes torna-se necessária a administração de fármacos especialmente desenvolvidos para este fim [BETTERIDGE *et al.*, 1993]. Os agentes redutores de colesterol envolvem resinas de ligação de ácidos biliares, fibratos e inibidores da hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, as estatinas.

As estatinas são responsáveis por inibir a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (figura 2.7), que catalisa a conversão do HMG-CoA em mevalonato, o precursor do colesterol, constituindo a etapa limitante da via metabólica. As estatinas por se assemelharem ao substrato que a enzima HMG-CoA redutase se liga, competem com o mesmo pelas moléculas da enzima, diminuindo com isso a quantidade de HMG-CoA redutase que se ligará com seu substrato para a formação do colesterol, essa ação é conhecida como inibição competitiva [LEHNINGER *et al.*, 2002]. A inibição competitiva dessa enzima pelas estatinas produz respostas celulares compensatórias como o aumento da expressão de receptores de LDL e de HMG-CoA redutase. Em razão do aumento compensatório de HMG-CoA redutase, a síntese do colesterol celular é apenas ligeiramente reduzida, mas a eliminação deste pelo mecanismo de receptor LDL é marcadamente potencializada, levando a reduções mantidas do colesterol sérico [LENNERNÄS & FAGER, 1997].

A limitação da biossíntese de colesterol e de triacilglicerol, associada a uma dieta pobre em gorduras e colesterol diminuem as taxas de produção de VLDL e LDL. A remoção de LDL da circulação é mediada por receptores de LDL, possuindo uma função importante na manutenção dos níveis de colesterol [VEOT *et al.*, 2000]. Cada 10% de redução dos níveis de colesterol está associado a aproximadamente 20 a 30 % de redução da incidência de doenças cardiovasculares [THE PRAVASTATIN MULTINATIONAL STUDY GROUP FOR CARDIAC RISK PATIENTS, 1993; SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 1994; BYINGTON *et al.*, 1995; SHEPERD *et al.*, 1995; SACKS *et al.*, 1996; DOWNS *et al.*, 1998; THE LONG-TERM INTERVENTION WITH PRAVASTATIN IN ISCHEMIC DISEASE STUDY GROUP, 1998].

Apesar de serem amplamente prescritas e muito eficientes no tratamento de hiperlipidemias, as estatinas apresentam diversos efeitos colaterais como miopatias, cefaléia, flatulência, dispepsia, prurido e exantema cutâneo. Por isso os níveis de estatinas no organismo do paciente devem ser monitorados com exames periódicos a fim de se evitar os efeitos colaterais e buscar sempre administrar a dose terapêutica mais apropriada para o paciente [SHITARA & SUGYIAMA, 2006].



**Figura 2.7:** Síntese do colesterol e atuação das estatinas.

### 2.4.1 Efeitos Pleiotrópicos

Em 1996, MASSY e colaboradores levantaram a hipótese de que os efeitos benéficos das estatinas poderiam não estar centrados apenas na redução do colesterol plasmático, mas também na inibição do metabolismo do mevalonato, já que produtos desta via metabólica parecem ser críticos para a proliferação de várias células. Como o metabolismo do mevalonato dá origem a

uma série de isoprenóides vitais para diversas funções celulares, a inibição da HMG-CoA redutase pode levar a vários efeitos pleiotrópicos, como melhoria da disfunção endotelial mediada por óxido nítrico, efeitos antioxidantes, propriedades antiinflamatórias, inibição da proliferação celular com ações anticarcinogênicas em animais, estabilização de placas ateroscleróticas, efeitos anticoagulantes, inibição da rejeição de enxertos após transplante de coração e rim e ação no tecido ósseo [HOWLAND & MYCEK, 2007; PARK *et al.*, 2005; LIAO & LAUFS, 2005; KUREISHI *et al.*, 2000]. DULAK & JÓZKOWICZ, [2005] demonstraram redução da morte causada por câncer em pacientes envolvidos em tratamentos com estatinas para prevenção de doenças cardiovasculares. Estudos recentes evidenciaram a diminuição das chances (20-55%) do paciente desenvolver câncer localizado (colorectal, mama, próstata, pulmão e pancreático) quando em terapia com estatinas [BONOVAS *et al.*, 2006; GLYNN *et al.*, 2008]. Estudos epidemiológicos sugerem que as estatinas diminuem os riscos de uma pessoa desenvolver Mal de Alzheimer, doença causada pelo acúmulo de  $\beta$ -amiloide extracelular e vascular no cérebro, que se torna tóxico para os neurônios [PEDRINI *et al.*, 2005; HÖGLUND *et al.*, 2004]. Em WOLOZIN, [2002] pacientes que receberam lovastatina e pravastina tiveram 70% menos chance de desenvolver Mal de Alzheimer, porque a lovastatina foi capaz de reduzir os níveis de  $\beta$ -amiloide no sangue para 40%, em humanos. A disfunção do metabolismo dos lipídios tem grande importância em doenças e desordens do sistema nervoso central, por este ser um órgão com alta concentração de gordura [ADIBHATLA & HATCHER, 2008]. Embora níveis baixos de LDL não estejam relacionados ao Mal de Parkinson [HUANG *et al.*, 2007], as estatinas possuem efeitos benéficos potenciais nessa patologia neuro degenerativa por possuírem propriedades anti-inflamatórias [BECKER *et al.*, 2008].

As estatinas estão emergindo também como drogas para disfunções ósseas, como a osteoporose [PAHAN, 2006]. Estudos demonstram que a lovastatina pode ser usada no tratamento de fraturas ósseas [BARRIOS-GONZALEZ & MIRANDA, 2009]. A aplicação das estatinas no tecido ósseo foi demonstrada pela primeira vez por MUNDY e colaboradores [1999], em estudo realizado em calvária craniana de roedores e em estudo *in vitro*. Posteriormente estudos demonstraram que as estatinas possuem efeitos benéficos na mineralização óssea, reduzindo assim o risco de fraturas [EDWARDS & SPECTOR, 2002; PAHAN, 2006]. MACIEL-OLIVEIRA e colaboradores [2011] obtiveram estímulo de formação óssea e aumento da

qualidade do osso alveolar formado quando aplicaram sinvastatina em defeito realizado no alvéolo do 1º molar de ratos Wistar.

Embora o exato mecanismo pelo qual as estatinas influenciam a formação óssea ainda não esteja claro, existe a possibilidade de que pequenas enzimas GTPases, preniladas pelos produtos da síntese do colesterol, regulem negativamente a expressão da proteína óssea morfogenética do tipo II (BMP-2), um dos principais fatores de crescimento na formação óssea, que estimula a proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Assim, com a inibição da prenilação e função de pequenas GTPases, que ocorre como consequência da inibição da síntese do mevalonato, a expressão de BMP-2 pode ser então estimulada [ROGERS, 2000]. A BMP-2 é um fator de crescimento muito utilizado em enxertos e patologias ósseas, porém seu custo elevado limita sua utilização. Com isso, o baixo custo das estatinas as torna substâncias promissoras para aplicação na regeneração de tecido ósseo [ARMITAGE, 2007]. WILDEMANN e colaboradores em 2009 demonstraram que a sinvastatina aplicada de forma local nas fraturas ósseas provocadas em tíbias de ratas apresentou efeitos semelhantes aos da BMP-2 na regeneração do tecido.

GRIFFITHS & CARTMELL em 2007 cultivaram osteoblastos em uma solução contendo sinvastatina e subsequentemente colocaram as células em um arcabouço de poli (ácido láctico), (PLLA). A análise da matriz mineralizada mostrou um aumento da mineralização e da expressão da proteína óssea morfogenética do tipo 2 e da proteína não colágena osteopontina. Esses achados sugerem que as estatinas além de aumentarem a mineralização da matriz têm o potencial de aumentar a diferenciação e crescimento de osteoblastos, podendo contribuir assim, em cirurgias ortopédicas de reconstrução.

WONG & RABIE [2003] avaliaram a ação local da sinvastatina no reparo de defeitos ósseos, quando estudaram os efeitos do enxerto de esponja de colágeno reabsorvível com 0,5 mg de sinvastatina no reparo de defeitos em calvária de coelhos, em período de observação de 14 dias. A análise histomorfométrica revelou 308% mais de osso neoformado nos animais que receberam o medicamento do que naqueles em que apenas a esponja de colágeno foi implantada. Os mesmos autores, em 2005, em estudo semelhante, examinaram a expressão de fator de crescimento endotelial vascular, BMP-2 e Cbfa1, no processo de reparo inicial de defeitos com e sem sinvastatina e encontraram que a estatina induziu e acelerou a formação óssea localmente,

além de ativar a expressão inicial de fatores que regulam a angiogênese, a diferenciação de células ósseas e a osteogênese.

Em um modelo de fratura femural, GARRETT e colaboradores em 2007, administraram lovastatina ou não, em microesferas biodegradáveis de PLGA para determinar se o fármaco poderia melhorar a formação óssea. Os resultados mostraram um aumento da reparação óssea utilizando-se uma escala radiográfica e diminuição da distância entre as margens da fratura pela imagem em tomografia computadorizada. Além disso, a resistência à fratura foi significativamente maior quando foi utilizado o polímero com o fármaco.

MAEDA e colaboradores [2003] em cultura de células pré-osteoblásticas tratadas com estatinas relataram um aumento de expressão do fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF), outro fator de diferenciação de osteoblastos.

As estatinas também podem ter efeito na diminuição da reabsorção óssea. Os osteoclastos usam moléculas intermediárias da biossíntese do colesterol, o farnesil e geranylgeranyl, para modificar e ativar proteínas chaves intracelulares. Assim, a ausência desses subprodutos pode causar efeitos que diminuem a formação e função dos osteoclastos [CRUZ & GRUBER, 2002; GRASSER *et al.*, 2003].

## Capítulo 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das microesferas

##### 3.1.1 Estudo Piloto

Inicialmente desenvolveu-se um estudo piloto a fim de determinar os solventes utilizados para dissolver o polímero e o fármaco, a concentração e o volume da solução de PVAI, já que esses detalhes não foram encontrados em literatura. As demais etapas da metodologia foram adaptadas de GARRET *et al.*, [2007]. A técnica por simples emulsão em óleo e água (O/W) foi escolhida devido à natureza hidrofóbica do fármaco utilizado. A tabela 3.1 resume os detalhes dos testes realizados durante o estudo piloto e destaca (em negrito) a metodologia que permitiu a obtenção das microesferas desenvolvidas neste trabalho.

**Tabela 3.1:** Detalhes dos testes realizados durante estudo piloto. Em negrito, metodologia para obtenção de microesferas de PLDLA sem e com o fármaco.

Testes	Solventes		PVAI	
	Polímero	Fármaco	Volume	Concentração
1	acetona	acetona	50 mL	1 %
2	clorofórmio	clorofórmio	50 mL	1 %
3	clorofórmio	acetona	50 mL	1 %
<b>4</b>	<b>clorofórmio</b>	<b>acetona</b>	<b>100 mL</b>	<b>1 %</b>
5	clorofórmio	acetona	250 mL	3 %
6	clorofórmio	acetona	250 mL	5%

### ***3.1.2 Microesferas sem o Fármaco***

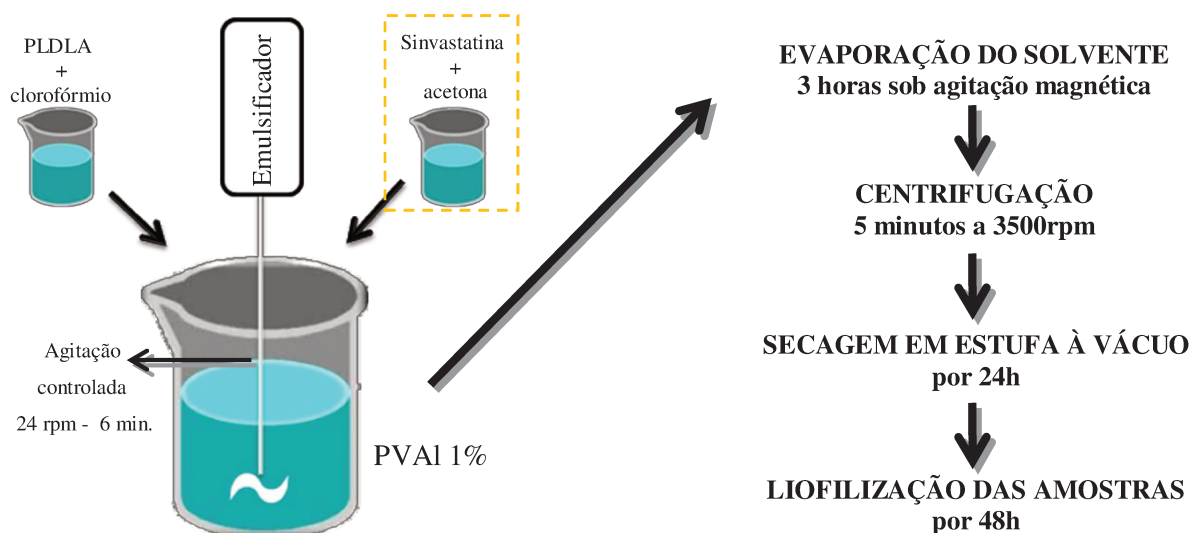
O PLDLA 70:30 foi sintetizado no laboratório de Biomateriais da PUC-SP, conforme descrito em Motta [2007].

Inicialmente dissolveu-se 1,0 g de PLDLA granulado em 10,0 mL de clorofórmio (Merck) sob agitação em agitador magnético (Ika) para sua total dissolução. A solução resultante foi adicionada a 100 mL de solução aquosa de PVAI a 1% (Vetec), à temperatura ambiente, sob constante agitação em emulsificador a 24 rpm por 6 minutos formando-se assim a simples emulsão. Para que ocorresse evaporação do solvente, a solução final permaneceu em agitação por 3 horas. O conteúdo do béquer foi então vertido em tubos de ensaio e estes submetidos à centrifugação por 5 minutos a 3500 rpm. As microesferas foram retiradas do tubo e congeladas em nitrogênio líquido para liofilização por 48 horas para estocagem. O processo descrito está demonstrado na figura 3.1.

### ***3.1.3 Microesferas com o fármaco Sinvastatina***

O procedimento para a obtenção das microesferas de PLDLA com o fármaco seguiu a mesma metodologia da obtenção das microesferas sem o fármaco. A diferença, entretanto, foi a adição de uma solução de sinvastatina em acetona a 5% à solução de PLDLA. Posteriormente a solução polímero/fármaco foi submetida à emulsificação com PVAI 1% seguindo a metodologia descrita anteriormente. O fármaco utilizado foi obtido em farmácia de manipulação.





**Figura 3.1:** Representação da metodologia utilizada na obtenção das microesferas de PLDLA sem e com o fármaco sinvastatina.

## 3.2. Caracterização da Morfologia e Distribuição de Diâmetros das Microesferas

### 3.2.1 Morfologia das Microesferas

Para a análise morfológica das microesferas de PLDLA, com e sem o fármaco, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura mod. JEOL JXA 840A onde a tensão utilizada foi de 10kV. Para metalização das amostras foi utilizado um metalizador SPUTER COATER BALTEC SCD 050 com corrente de 40 mA por 200s. Essa análise foi também executada no analisador analítico de imagem baseado em microscopia óptica automatizada, Morphologi G3S.

### 3.2.2 Distribuição de Diâmetros

Inicialmente, o tamanho e distribuição de diâmetros das microesferas com e sem o fármaco foram obtidos pelo equipamento Mastersizer 2000, pelo método de espalhamento de luz laser (LLS), onde a distribuição de diâmetros das amostras foi analisada baseada em volume. Para tal as amostras foram dispersas em água e agitadas por ultrassom. Após a lenta evaporação do

solvente as amostras foram então submetidas à análise. Utilizou-se aproximadamente 0,5 g de cada amostra.

Para se identificar as partículas de diâmetros menores que 10  $\mu\text{m}$ , as amostras foram submetidas à análise de distribuição de diâmetros baseada em número, pelo equipamento Morphologi G3S. As microesferas foram dispersas em uma combinação de solvente e surfactante e após a lenta evaporação dos mesmos, submetidas à análise. Utilizou-se aproximadamente 0,2 g de cada amostra.

### **3.3 Caracterização Térmica das Microesferas**

#### ***3.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)***

O estado físico da sinvastatina na microesfera de PLDLA foi caracterizado pelas análises de curvas de DSC. As curvas foram obtidas em um equipamento TA Instruments modelo MSDC2910 onde utilizaram-se cadinhos de alumínio com aproximadamente 10 mg de amostra, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) e taxa de aquecimento de 10°C/min iniciando o aquecimento em 25°C e atingindo 200°C. Realizaram-se análises da sinvastatina pura, PLDLA puro, microesferas de PLDLA com e sem o fármaco e mistura física de microesferas de PLDLA + sinvastatina na proporção de 1:1.

#### ***3.3.2 Análise Termogravimétrica (TGA)***

A estabilidade térmica das amostras foi analisada por TGA em um equipamento Netzsch modelo STA409C. As curvas termogravimétricas foram obtidas submetendo-se aproximadamente 10 mg das amostras ao aquecimento na faixa de 25 a 500 °C a 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio (N<sub>2</sub>). Avaliou-se a estabilidade térmica do polímero utilizado, das microesferas com e sem o medicamento e do fármaco puro.

### 3.4 Eficiência de Encapsulação e Estudo da Liberação *In Vitro* do Fármaco

A obtenção da eficiência de encapsulação e o estudo de liberação *in vitro* do fármaco foram obtidos por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) em análises conduzidas pelo software Waters Breeze, equipamento Waters equipado com um detector de UV modelo 2487 e uma bomba mod. LC-1525. A coluna utilizada na detecção da sinvastatina foi uma Symmetry C<sub>18</sub> 3,9 X150 mm (Waters corporation). A absorvância foi monitorada à 240 nm com um fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min. A injeção das amostras foi de 20 µL e realizada em triplicata para cada tubo de ensaio. O resultado final da concentração de fármaco é a média aritmética dos valores obtidos. A fase móvel utilizada era composta por 65 % de acetonitrila e 35% de tampão acetato de amônio 0,01M pH 6,8, filtrada em membrana de 0,45 µm e submetida a banho de ultrasson para eliminar bolhas, metodologia adaptada de KUMAR *et al.* [2009]. Para a obtenção da curva de calibração, foram preparadas soluções padrão de sinvastatina em fase móvel de concentrações 1,5; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 µg/mL.

Para a obtenção da eficiência de encapsulação do fármaco no dispositivo obtido, após a etapa de preparação das microesferas coletou-se o sobrenadante final e quantificou-se a concentração de fármaco existente no mesmo. Esse valor foi subtraído da quantidade total de fármaco utilizada para se conhecer a massa de fármaco encapsulada. A eficiência de encapsulação do dispositivo foi calculada utilizando-se a fórmula representada na figura 3.2.

$$\text{Eficiência de Encapsulação} = \frac{\text{massa de fármaco encapsulada}}{\text{massa total de fármaco utilizada}} \times 100 \%$$

**Figura 3.2:** Equação para cálculo da eficiência de encapsulação do fármaco.

Para o estudo de liberação *in vitro* do fármaco colocou-se 3,0 mg de microesferas de PLDLA com o princípio ativo em tubos de ensaio contendo 1mL de solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) e 30 % de etanol. Devido à baixa solubilidade da sinvastatina em água acrescentou-se o etanol a fim de solubilizar a sinvastatina liberada. Os tubos foram mantidos em banho termostático à 37,0°C ± 0,5 sob leve agitação até o 3º, 5º, 7º, 10º, 15º, 20º, 25º e 30º dias

de ensaio, quando os mesmos foram submetidos à centrifugação para separação das microesferas da solução, e o sobrenadante retirado para análise em CLAE os ensaios foram realizados em triplicada. Utilizou-se um tubo para cada tempo de estudo.

## Capítulo 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 Obtenção das Microesferas

##### *4.1.1 Estudo Piloto*

Na técnica por simples emulsão descrita em literatura dissolve-se o polímero e o fármaco no mesmo solvente [JAIN, 2000; PEREZ *et al.*, 2000; PASSERINI & CRAIG, 2002]. Inicialmente utilizou-se acetona devido ao fato da sinvastatina ser solúvel na mesma e 50 mL de solução de PVAL 1%. Ao adicionar a solução de fármaco e polímero à solução de PVAL 1%, o polímero coagulou formando um halo branco e rígido sobre a solução do emulsificante. No segundo teste utilizou-se clorofórmio como solvente. Após a centrifugação observou-se a formação de um precipitado amarelado com consistência coloidal no fundo do tubo de ensaio. Esse precipitado foi transferido para uma placa de petri e seco em estufa a vácuo. Depois da secagem não foi possível descolar a massa seca da placa de petri. Com isso optou-se por dissolver o PLDLA em clorofórmio e a sinvastatina em acetona. O precipitado que se formou após a centrifugação tinha coloração branca e secava imediatamente quando transferido a um papel filtro. Essa massa foi então submetida à estufa a vácuo, liofilizada e analisada em microscopia eletrônica de varredura. Dessa metodologia resultaram microesferas esféricas, porém apresentando muitos aglomerados e a não encapsulação do fármaco, pois era possível observar cristais do fármaco em forma de bastões sobre as superfícies das microesferas (figuras 4.1 A e B). Desta forma, no teste seguinte utilizou-se 100 mL da solução de PVAL 1% ao invés de 50 mL. Essa foi a metodologia que se mostrou eficiente para obtenção das microesferas de PLDLA sem e com o fármaco, pois utilizou-se clorofórmio para dissolver o PLDLA, acetona para a sinvastatina e 100 mL de solução PVAL 1% como emulsificante. No intuito de obter partículas de diâmetros menores, mais dois testes foram realizados alterando-se apenas as concentrações das soluções de

PVAI para 3 e 5 %, porém em ambos ao acrescentar as soluções de polímero e fármaco ao PVAI todo o líquido se transformava em uma massa densa.

A concentração do polímero, massa molecular, o surfactante, a proporção das fases aquosa e oleosa e a taxa de evaporação do solvente são parâmetros que influenciam nas características finais de micro e nanoesferas, assim como na encapsulação do fármaco [JULIENNE *et al.*, 1992; PANYAM *et al.*, 2004; MU & FENG, 2003; SONG *et al.*, 1997; CHUNG *et al.*, 2001; CHUNG *et al.* 2002].

Os solventes orgânicos devem ser selecionados considerando-se dois critérios: o polímero deve ser solúvel nesse solvente e o solvente deve ser completamente imiscível na fase aquosa. Solventes clorados têm sido amplamente empregados na metodologia de evaporação e emulsão. JULIENNE e colaboradores [1992] utilizaram diclorometano para obter nanoesferas de PLGA com tamanho médio de 177 nm. O mesmo solvente foi utilizado por PIETZONKA e colaboradores [2002], que obtiveram nanoesferas de diâmetro entre 400 e 500 nm. SONG e colaboradores [1997] utilizaram uma mistura de diclorometano e acetona (8:2 v/v) obtendo nanoesferas de diâmetro médio  $117 \pm 40$  nm.

A presença de cristais do fármaco em microesferas obtidas pelo método O/W [JALIL & NIXON, 1989] tem sido atribuída ao efluxo do solvente da fase oleosa que é capaz de levar o fármaco para a superfície das microesferas. Quando o solvente, em contato com a fase aquosa, perde seu poder de dissolução, as partículas do fármaco precipitam nas superfícies das microesferas ou se mantêm suspensas no meio aquoso.

Aumentando-se a concentração do PVAI é possível obter microesferas de diâmetros menores [JOBMANN & RAFLER, 1998]. Porém altas concentrações de PVAI podem impedir a separação das microesferas resultando em grande número de partículas agregadas [YANG & OWUSU-ABABIO, 2000].

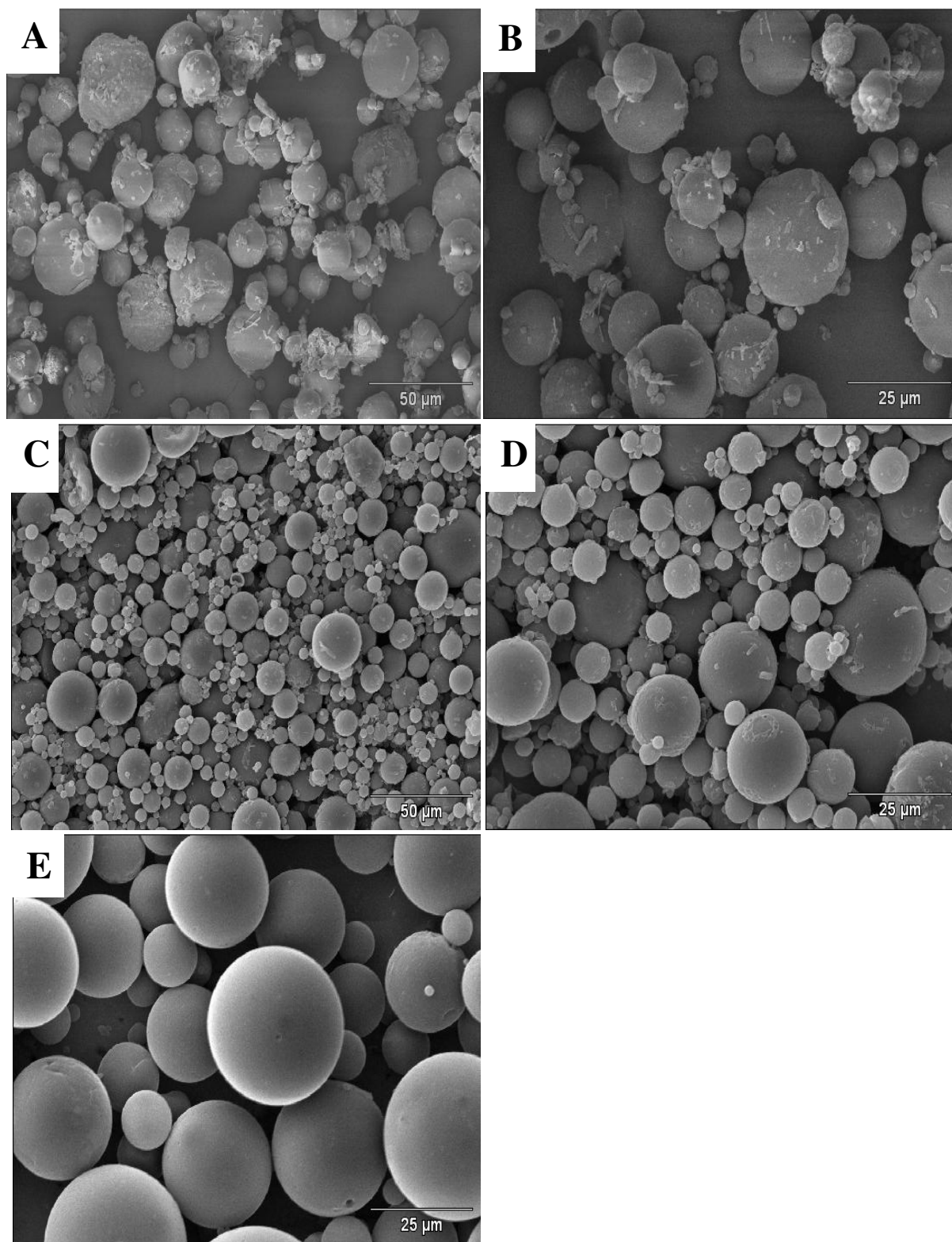
O processo de extração/remoção do solvente pela técnica de simples emulsão em óleo e água (O/W), conforme descrito na metodologia permitiu a obtenção com sucesso de microesferas com e sem o fármaco sinvastatina. As análises de microscopia eletrônica, distribuição de diâmetro, DSC e TGA demonstraram que as partículas obtidas nesse estudo apresentaram-se esféricas, com diâmetros na faixa de micrômetros, manutenção das características do polímero após o processamento e interação do polímero com o fármaco utilizado.

## 4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura e pela análise analítica de imagem baseada em microscopia óptica automatizada (Morphologi G3) demonstraram que as microesferas de PLDLA com e sem o fármaco apresentam morfologia esférica, superfície lisa, tamanho em escala micrométrica, grande distribuição de diâmetros, e ausência de agregação ou adesão como pode ser observado nas Figuras 4.1 C-E, 4.2 e 4.3.

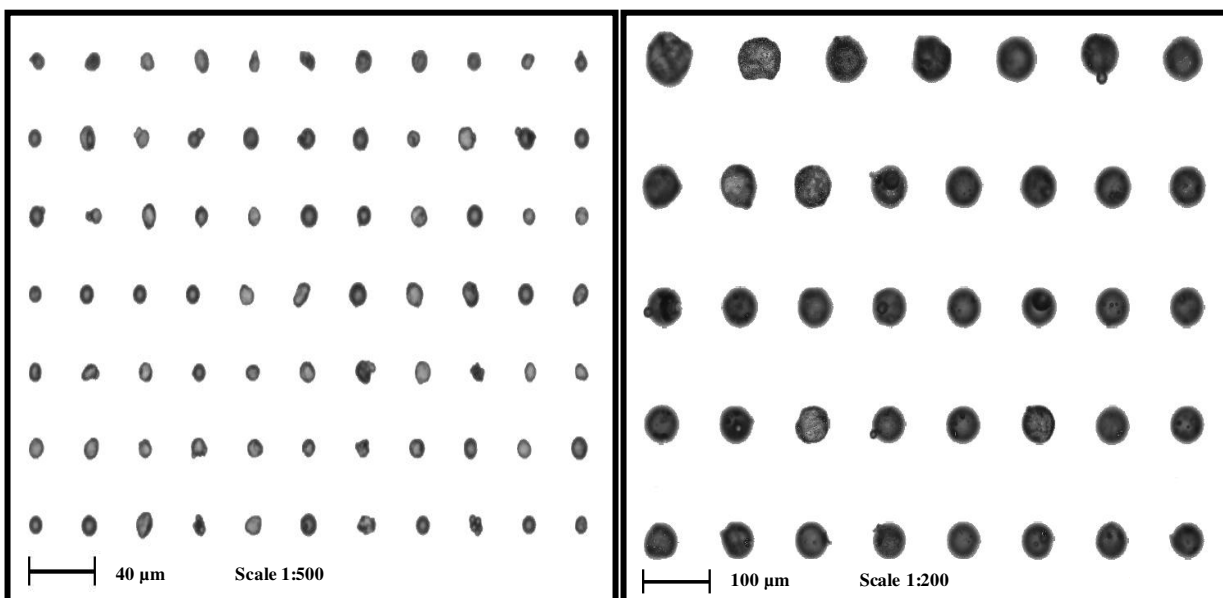
Segundo MARTIN e colaboradores [2000] microesferas preparadas com polímeros amorfos como o PLGA, poliestireno e resinas acrílicas tem levado a formação de esferas com superfície lisa enquanto que as preparadas com polímeros cristalinos como o Poli (hidroxi butirato) e o Poli (hidroxi butirato-co-valerato) tem apresentado superfície rugosa e porosa, sugerindo que as porções cristalinas do PHB e do PHBV determinam o comportamento das cadeias poliméricas.

A porosidade das microesferas depende, em parte, do fluxo de água entre as partículas poliméricas que vão originar as microesferas. Microesferas porosas permitem maior facilidade de difusão do meio pelo interior da microesferas liberando assim o fármaco de forma mais acelerada quando comparadas às microesferas maciças [WISCHKE & SCHWENDEMAN, 2008].

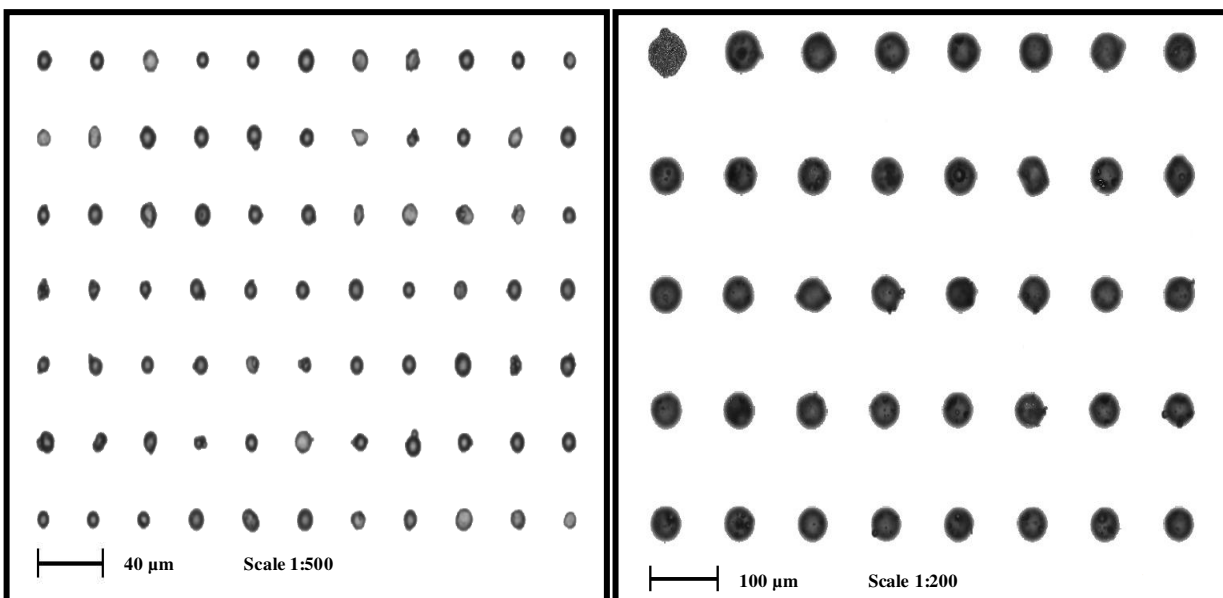


**Figura 4.1:** Microscopia eletrônica de Varredura das Microesferas: A e B) Microesferas com fármaco obtidas no estudo piloto; C e D) Microesferas de PLDLA com o fármaco; E) Microesferas de PLDLA sem o fármaco.





**Figura 4.2:** Conjunto representativo das fotos de microesferas de PLDLA obtidas pelo Morphologi G3.



**Figura 4.3:** Conjunto representativo das fotos de microesferas de PLDLA com o fármaco obtidas pelo Morphologi G3.

### 4.3 Distribuição de Diâmetros das Microesferas

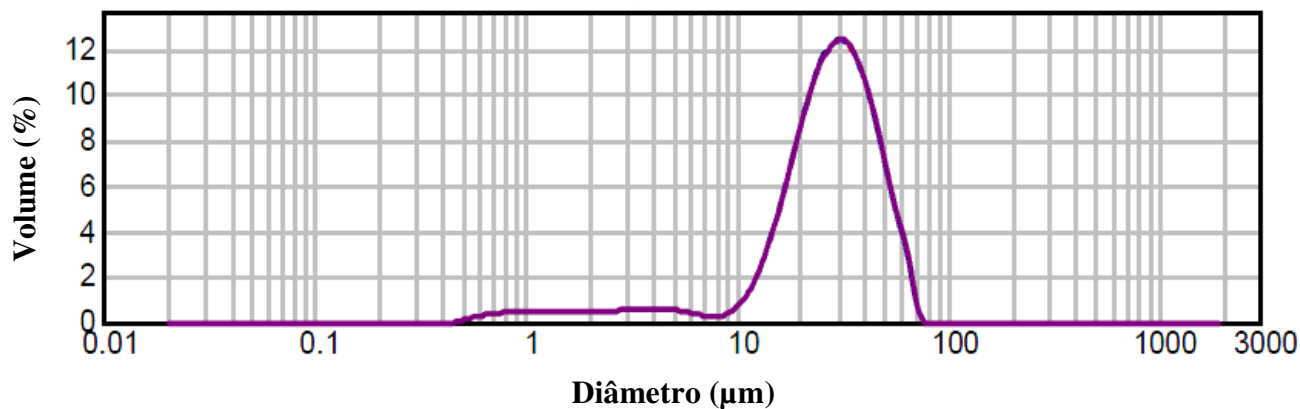
A técnica de espalhamento de luz laser (LLS) assim como a análise analítica de imagem baseada em microscopia óptica automatizada fornecem importantes parâmetros que devem ser considerados na caracterização da distribuição de diâmetros de microesferas. Parâmetros como  $d(0,1)$ -diâmetro abaixo do qual se encontram as partículas que representam 10% da amostra,  $d(0,5)$ -diâmetro abaixo do qual se encontram as partículas que representam 50% da amostra e  $d(0,9)$ -diâmetro abaixo do qual se encontram as partículas que representam 90 % da amostra para distribuições de diâmetros em volume e número e, os diâmetros mínimo, médio e máximo das partículas analisadas na distribuição de diâmetros em número.

Inicialmente as microesferas obtidas foram submetidas à análise de distribuição de diâmetros em volume para se conhecer a distribuição de diâmetros das mesmas.

As microesferas de PLDLA sem o fármaco apresentaram grande distribuição de diâmetro variando entre 0,56 e 69,18  $\mu\text{m}$  (figura 4.4).

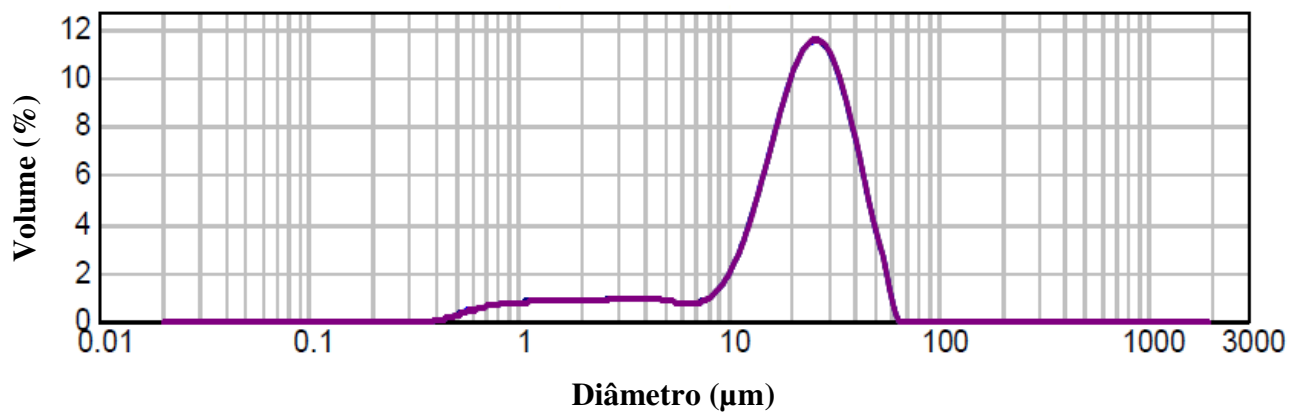
Para as microesferas de PLDLA com o fármaco, o gráfico da distribuição de diâmetros baseada em volume demonstrou diâmetros entre 0,42 e 60,25  $\mu\text{m}$  (figura 4.5). Pode-se observar no gráfico uma indicação da diminuição no diâmetro das microesferas, pois o volume que as partículas menores que 10  $\mu\text{m}$  representam mostra-se um pouco maior quando comparado ao mesmo conjunto da amostra nas microesferas de PLDLA.

#### Distribuição de Diâmetros em Volume



**Figura 4.4:** Distribuição de diâmetros baseada em volume das microesferas de PLDLA sem o fármaco.

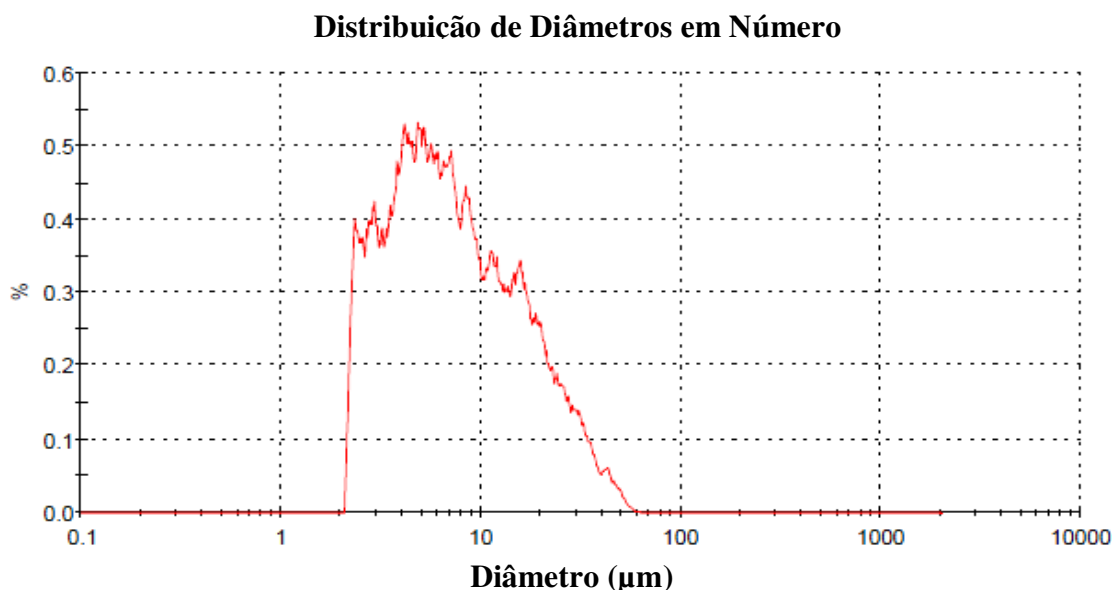
#### Distribuição de Diâmetros em Volume



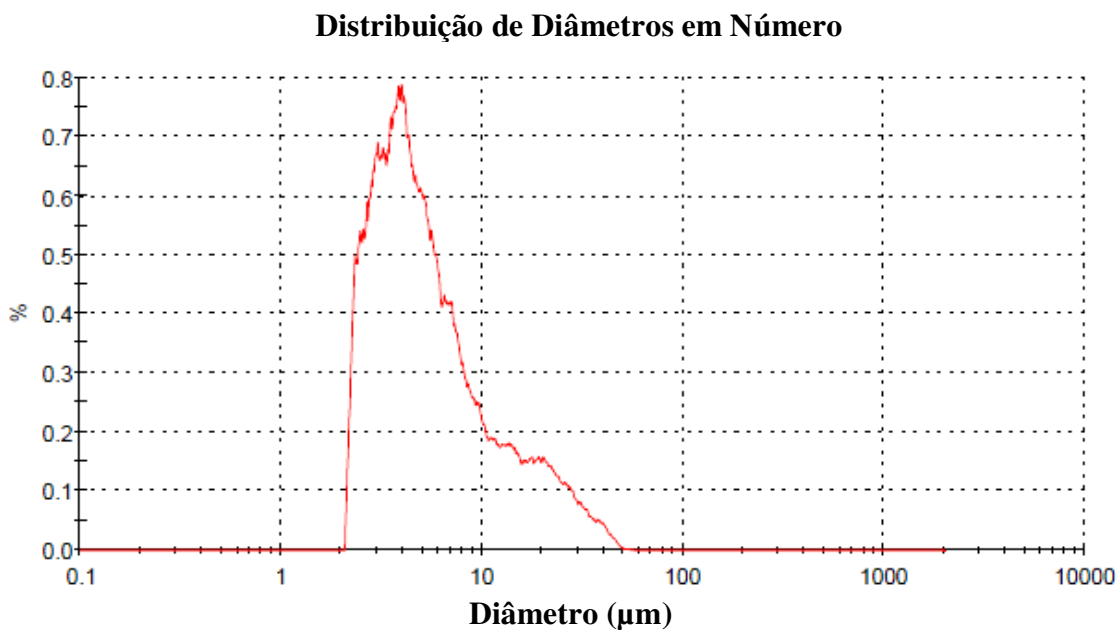
**Figura 4.5:** Distribuição de diâmetros baseada em volume das microesferas de PLDLA com o fármaco.

Quando se tem uma amostra com grande distribuição de diâmetros, a distribuição baseada em volume destaca as partículas de maiores diâmetros, já que as de menores diâmetros representam um volume muito pequeno da amostra. Por isso, a fim de se conhecer melhor as microesferas de diâmetros menores que 10  $\mu\text{m}$ , as amostras foram submetidas à análise de distribuição de diâmetros baseada em número.

As distribuições de diâmetros baseadas em número das microesferas de PLDLA sem e com o fármaco, obtidas por microscopia óptica automatizada, estão demonstradas nas Figuras 4.6 e 4.7, respectivamente.



**Figura 4.6:** Distribuição de diâmetros baseada em número de microesferas de PLDLA sem o fármaco.



**Figura 4.7:** Distribuição de diâmetros baseada em número de microesferas de PLDLA com o fármaco.

A distribuição de diâmetros baseada em número demonstrou que a maior parte das microesferas possui diâmetros menores que 10  $\mu\text{m}$  tanto na amostra de PLDLA sem o fármaco como na amostra com o fármaco encapsulado. Os valores dos diâmetros mínimos, médios e máximos obtidos nas amostras de PLDLA sem e com o fármaco estão representados na tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Diâmetros mínimos, médios e máximos das amostras de PLDLA sem e com o fármaco.

	<b>Diâmetro Mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro Médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro Máximo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>PLDLA sem fármaco</b>	2,22	10,08	65,22
<b>PLDLA com fármaco</b>	2,22	7,47	53,81

Analisando-se os valores dos diâmetros representados na tabela 4.1 e os gráficos da distribuição de diâmetros em número pode-se afirmar que a amostra das microesferas de PLDLA com o fármaco apresenta um material mais fino, ou seja, há mais partículas com diâmetro abaixo de 10  $\mu\text{m}$  que a amostra de PLDLA sem o fármaco. Esse aumento na quantidade de partículas menores pode ser devido ao fármaco que estava aderido à parede das microesferas e se soltou no processo de dispersão da amostra. BERKLAND e colaboradores [2003] demonstraram que à medida que se diminuía os diâmetros das microesferas, o fármaco rodamina encontrava-se mais na superfície do dispositivo. Como foi discutido na seção 4.1 deste trabalho o efluxo do solvente da fase oleosa para a aquosa do método O/W pode levar o fármaco para a superfície das microesferas. Esses resultados refletirão na liberação do fármaco, pois o tamanho e a distribuição de diâmetros e a localização do fármaco no dispositivo afetam diretamente a cinética de liberação do mesmo.

Os valores de d(0,1), d(0,5) e d(0,9) obtidos nas distribuições de diâmetros baseadas em volume e em número, para as microesferas de PLDLA sem e com o fármaco confirmam que a amostra de PLDLA com fármaco possui maior quantidade de partículas menores que 10  $\mu\text{m}$  quando comparada à amostra de PLDLA sem fármaco. Os valores estão representados na tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Comparação dos valores de d(0,1), d(0,5) e d(0,9) para as distribuições de diâmetros baseadas em volume e em número.

		<b>d(0,1)</b>	<b>d(0,5)</b>	<b>d(0,9)</b>
<b>Distribuição de Diâmetros baseada em Volume</b>	PLDLA sem fármaco	11,48 $\mu\text{m}$	28,19 $\mu\text{m}$	49,28 $\mu\text{m}$
	PLDLA com fármaco	3,71 $\mu\text{m}$	22,75 $\mu\text{m}$	41,13 $\mu\text{m}$
<b>Distribuição de Diâmetros baseada em Número</b>	PLDLA sem fármaco	2,92 $\mu\text{m}$	6,84 $\mu\text{m}$	21,54 $\mu\text{m}$
	PLDLA com fármaco	2,65 $\mu\text{m}$	4,71 $\mu\text{m}$	16,6 $\mu\text{m}$

Vários fatores determinam o tamanho e a distribuição de diâmetros das microesferas como a massa molecular do polímero, o surfactante, a concentração do mesmo, a proporção da fase orgânica/aquosa, o solvente utilizado na dissolução do polímero, a taxa de evaporação do solvente, a encapsulação do fármaco e a velocidade de agitação da emulsão [ASTETE E SABLIOV, 2006; WU, 1995b; JAIN *et al.*, 1998].

Segundo JAIN [2000], um sistema de liberação de fármacos ideal deve apresentar partículas com diâmetros médios que não excedam 250  $\mu\text{m}$ , possibilitando assim sua aplicação com seringas sem causar o entupimento da agulha.

O tamanho da microesfera afeta a taxa de degradação do polímero, o carregamento e a liberação do fármaco do dispositivo [RAMAN *et al.*, 2005].

Quando se quer obter microesferas para liberação de fármaco por um longo período de tempo, é desejável que as partículas tenham distribuição de tamanho variando de 20 a 100  $\mu\text{m}$  [JEFFERY *et al.*, 1991; JOHANSON *et al.*, 2000; O'HAGAN & SINGH, 2004].

Microesferas com grande distribuição de diâmetro muitas vezes liberam o fármaco em duas fases diferentes, a inicial, conhecida como “burst” por liberar uma dose alta de fármaco logo no início da aplicação, e a controlada que libera o fármaco em pequenas quantidades durante certo período de tempo. Uma possível explicação para esse fenômeno é que as microesferas de diâmetro menor que 10  $\mu\text{m}$  degradam mais rápido que as de diâmetro maior e, portanto, causam o efeito “burst”. A fim de evitar a liberação inicial, alguns pesquisadores removeram as microesferas menores de suas amostras [AKBUGA, 1991; COHEN, 1991; SANSDRAP, 1997; NARAYANI, 1996; BEZEMER, 2000].

Homogeneizadores de baixa rotação, vórtices e agitadores magnéticos permitem a obtenção de microesferas de diâmetros entre 20 e 100  $\mu\text{m}$ , enquanto que homogeneizadores de alta rotação produzem microesferas de diâmetros menores, mas são menos utilizados nos procedimentos de microencapsulação [SCHUCHMANN & DANNER, 2004].

## **4.4 Análises Térmicas**

### ***4.4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)***

As técnicas de DSC e TGA tem sido muito utilizadas para investigar interação entre polímeros e fármacos em micro e nanopartículas [GAMISANS *et al.*, 1999; CALVO *et al.*, 1996].

A Figura 4.8 A-E mostra as curvas de DSC para o PLDLA puro, para a Sinvastatina pura, para as microesferas de PLDLA com e sem a incorporação de sinvastatina e para a mistura física de microesferas de PLDLA+sinvastatina.

A sinvastatina pura (Curva 4.8 A) mostra um pico endotérmico que corresponde ao ponto de fusão à 139°C, indicando sua natureza semicristalina. Os resultados encontrados estão de acordo com ALI e colaboradores [2010] e OLIVEIRA e colaboradores [2010].

O PLDLA puro exibiu uma temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) de 59 °C referente ao processo de relaxação das cadeias poliméricas (Curva 4.8 B). De acordo com os resultados de MOTTA, 2007 e RIBEIRO, 2006 .

Sendo o PLDLA um copolímero amorfo, não se observou ponto de fusão, pois não há regiões cristalinas na composição do material. É conveniente que os dispositivos apresentem grau de cristalinidade baixo para que a taxa de degradação seja mais elevada, diminuindo assim a permanência de fragmentos do material no local do implante, pois à medida que o polímero degrada fragmentos cristalinos são acumulados no organismo gerando reação inflamatória [LEIGGNER, 2006]. Desta forma o PLDLA mostra-se um material adequado para a aplicação em liberação de fármacos por não apresentar os inconvenientes de materiais cristalinos.

As microesferas de PLDLA sem o fármaco apresentaram temperatura de transição vítrea semelhante à do PLDLA puro (59 °C) (Figura 4.8 C) comprovando que a técnica utilizada para a microencapsulação não afetou as transições térmicas do polímero [MAINARDES *et al.*, 2006].

A curva 4.8 D representa as microesferas com sinvastatina encapsulada e demonstra que a T<sub>g</sub> desta amostra foi a mesma do polímero puro (59 °C). Não se detectou o pico endotérmico do fármaco no sistema de liberação. Isso pode ser uma indicação de que a incorporação do fármaco nas microesferas resulta em um sistema altamente desordenado disperso na matriz polimérica, e que o processo de microencapsulação não interferiu na estrutura química do polímero.

Como demonstrado na figura 4.8 E, a mistura física de microesferas de PLDLA + sinvastatina exibiu a T<sub>g</sub> do polímero e o ponto de fusão do fármaco o que indica que não houve interação entre os materiais, contrastando com o resultado obtido na curva das microesferas de PLDLA com o fármaco.

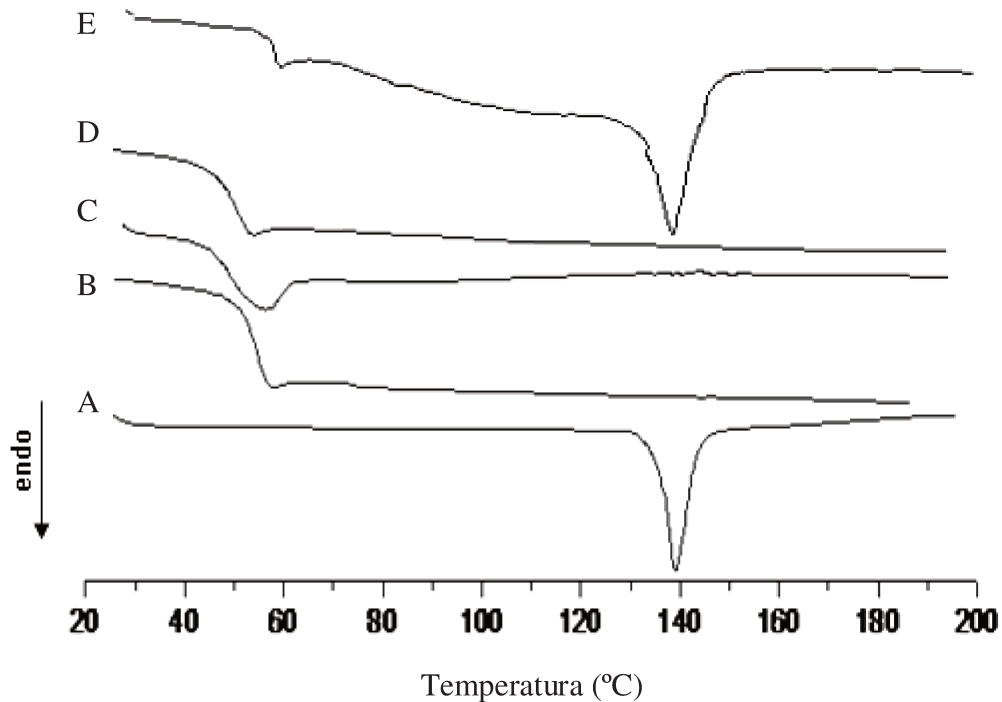
A temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) do polímero aponta o início do movimento das cadeias do polímero que compõem as regiões amorfas. Nesse estado a difusão do fármaco pela matriz polimérica é facilitada devida a mobilidade da cadeia. O valor da T<sub>g</sub> depende das características do polímero, mas sabe-se que a interação do polímero com o fármaco pode diminuir o valor da T<sub>g</sub> [WISCHKE & SCHWENDEMAN, 2008].



O fármaco em estado amorfo torna-se mais solúvel e biocompatível quando comparado ao estado cristalino [YU, 2001]. Em FERNANDEZ-CARBALLIDO *et al.* [2004] a curva de DSC das microesferas de Poli (DL-ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) contendo ibuprofeno não apresentou o pico de fusão característico do fármaco, indicando, dessa forma, a mudança no estado físico do mesmo. Resultados semelhantes de fármacos hidrofóbicos com polímero biodegradável foram encontrados por outros autores [VENIER- JULIENNE & BENOIT, 1996; MU & FENG, 2002; FITZGERALD & CORRIGAN, 1996].

Dispersões sólidas preparadas com polivinilpirrolidona (PVP) podem alterar ou inibir a cristalização de fármacos nas dispersões resultando em formas amorfas, as quais são menos estáveis termodinamicamente e liberam o fármaco mais rapidamente. A inibição da cristalização pode ser atribuída às ligações de hidrogênio entre o polímero e o fármaco e à incorporação de moléculas do fármaco dentro da matriz polimérica durante o preparo das dispersões sólidas [FORD, 1986; MATSUMOTO & ZOGRAFI, 1999; MOOTER *et al.*, 2001].

Há relatos, na literatura, de produção de dispersões sólidas de sinvastatina com PVP K30 preparadas pelo método de evaporação de solvente com polietilenoglicol PEG4000. As dispersões sólidas aumentaram a solubilidade da sinvastatina em solução aquosa em até 11,3 vezes em relação ao fármaco apenas. Entretanto, as proporções de polímero utilizadas foram muito altas (90,9%) e dessa forma, o desenvolvimento de comprimidos e cápsulas com essas proporções é dificultado, principalmente no caso de medicamentos com doses mais altas de sinvastatina (40 mg e 80 mg). Nesse estudo, não se relata a possibilidade de degradação da sinvastatina que venha a ocorrer durante o preparo das dispersões [AMBIKE *et al.*, 2005; PATEL & PATEL, 2008].



**Figura 4.8:** Termogramas de DSC: A) sinvastatina pura, B) PLDLA puro, C) microesferas sem fármaco, D) microesferas com fármaco e E) mistura física de microesferas de PLDLA + sinvastatina.

#### 4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria é utilizada para avaliar perda de massa em função do aumento da temperatura demonstrando assim a decomposição térmica dos materiais. Em muitos estudos, esta técnica também tem sido utilizada para determinar a presença ou ausência de solvente residual nas microesferas preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente [DUBERNET *et al.*, 1991; DUBERNET, 1995; GIRON, 2002].

A Figura 4.9 A-D mostra as curvas de TGA da sinvastatina pura, do PLDLA puro, das microesferas de PLDLA sem e com a incorporação de sinvastatina.

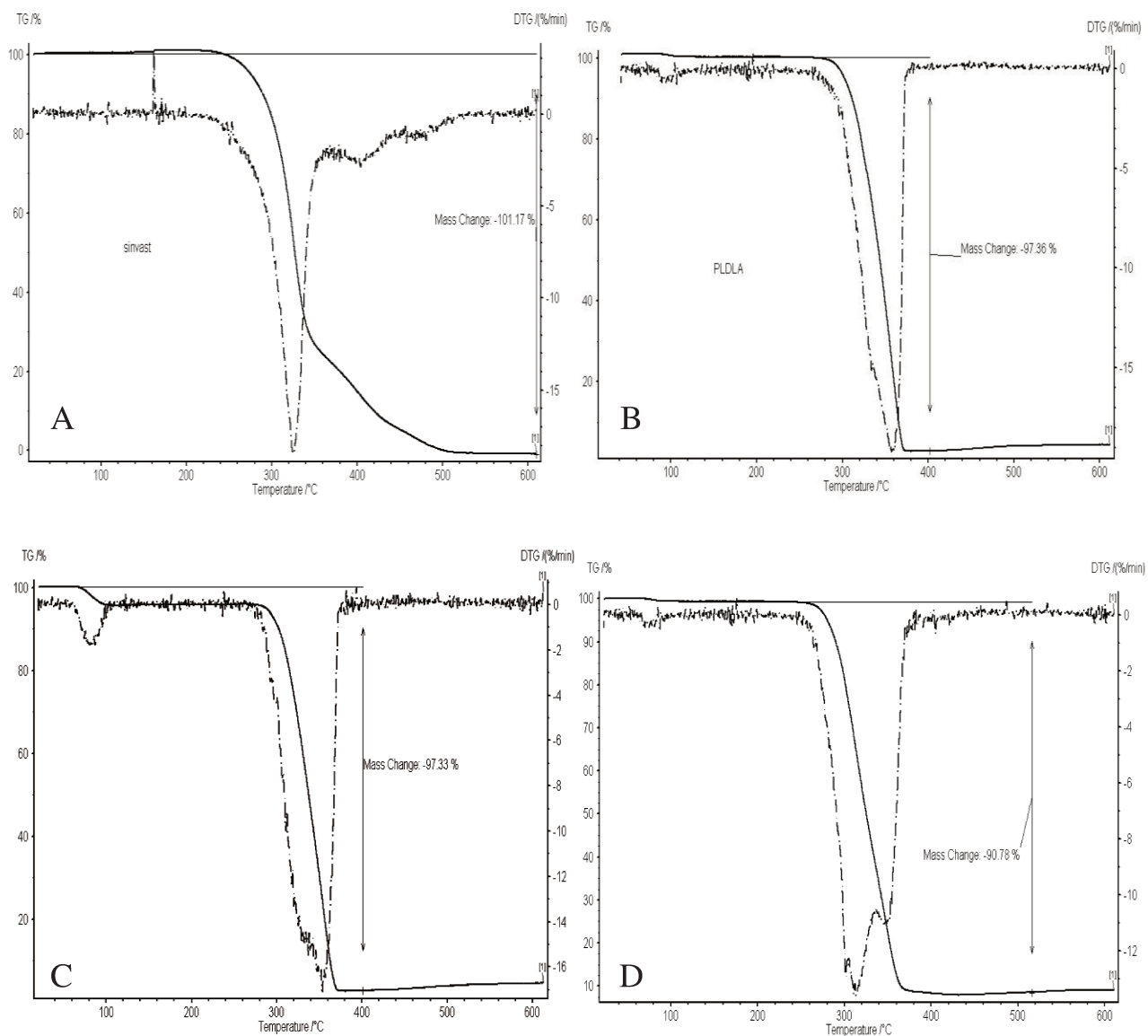
A análise termogravimétrica da sinvastatina pura (Figura 4.9A) demonstrou que o fármaco apresenta estabilidade térmica até 240°C e como ilustrado na curva da derivada há perda de massa máxima por volta de 320°C que, segundo XU *et al.* [2003] é decorrente da degradação do

fármaco. Os mesmos valores foram encontrados em estudos desenvolvidos por OLIVEIRA e colaboradores [2010], SOUZA e colaboradores [2007] e PEREIRA e colaboradores [2007].

As curvas termogravimétricas do PLDLA puro (Figura 4.9B) mostram um único estágio de decomposição que varia entre uma temperatura inicial ( $T_i$ ) da ordem de  $315^{\circ}\text{C}$  e uma temperatura final ( $T_f$ ) de, aproximadamente,  $380^{\circ}\text{C}$  com perda de massa máxima de acordo com RIBEIRO, [2006] e MOTTA & DUEK, [2008].

As microesferas de PLDLA sem o fármaco (Figura 4.9C) apresentaram estabilidade térmica semelhante à do polímero puro. Pode-se observar na curva que houve um único estágio de perda de massa com início à temperatura próxima de  $310^{\circ}\text{C}$  e a temperatura onde a perda de massa é máxima está próxima a  $370^{\circ}\text{C}$ .

O início da perda de massa das microesferas de PLDLA carregadas com sinvastatina (Figura 4.9D) se deu por volta dos  $270^{\circ}\text{C}$ . A curva da derivada apresentou dois picos de perda de massa máxima: a primeira em  $317^{\circ}\text{C}$  referente ao fármaco e a segunda em  $355^{\circ}\text{C}$  referente ao polímero. Como descrito em MAINARDES, [2006], não houve pico relacionado à fusão do fármaco o que reforça o fato da sinvastatina estar ligada em estado amorfo na matriz polimérica como verificado através das análises de DSC.



**Figura 4.9:** Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA): A) sinvastatina pura, B) PLDLA puro, C) microesferas sem fármaco e D) microesferas com fármaco.

## 4.5 Eficiência de encapsulação e Estudo de liberação *in vitro* do fármaco

### 4.5.1 Eficiência de Encapsulação do Fármaco

Conforme apresentado no item 3.4.1 da metodologia, a eficiência de encapsulação do fármaco foi calculada subtraindo-se a concentração encontrada no sobrenadante da concentração total usada na preparação das microesferas. As análises realizadas em cromatografia líquida demonstraram que a eficiência de encapsulação do fármaco foi de  $96,2 \pm 1,2 \%$ .

A eficiência de encapsulação pode ser influenciada pela técnica de encapsulação escolhida, velocidade de agitação da emulsão, concentração e temperatura do emulsificante (PVAI), pH da fase aquosa, quantidade de fármaco utilizada, massa molar do polímero e natureza do fármaco [O'DONNELL & MCGINITY, 1997; PARK *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2010] ou ainda pela solubilidade do solvente utilizado para solubilizar o polímero. Na técnica O/W a alta solubilidade do solvente pode resultar em um aumento da perda de fármaco na fase contínua do processo, reduzindo assim a eficiência de encapsulação [WISCHKE & SCHWENDEMAN, 2008].

A solubilidade do solvente em água determina a formação inicial das microesferas no processo de preparação. Em geral, uma precipitação rápida do polímero devido ao efluxo do solvente para a fase externa é considerado vantajoso por se obter alta eficiência de encapsulação [BODMEIER & MCGINITY, 1988; MAO *et al.*, 2008]. Porém, se o solvente é muito solúvel em água, e/ou um grande volume de água é usado, a solidificação do polímero ocorrerá mais rápido, formando uma casca polimérica densa em volta das gotas impedindo-as de diminuir de tamanho, originando partículas ocas [BIRNBAUM *et al.*, 2000; BIRNBAUM & BRANNON-PEPPAS, 2003] ou defeituosas, quando o solvente é extraído do núcleo das esfera.

A alta solubilidade do fármaco no emulsificante utilizado também pode diminuir a eficiência de encapsulação, pois o fármaco preferirá interagir com o emulsificante a interagir com o polímero, não ocorrendo desta maneira a encapsulação do mesmo nas microesferas poliméricas [YANG & OWUSU-ABABIO, 2000].

#### 4.5.2 Estudo da liberação “*in vitro*” do fármaco (HPLC)

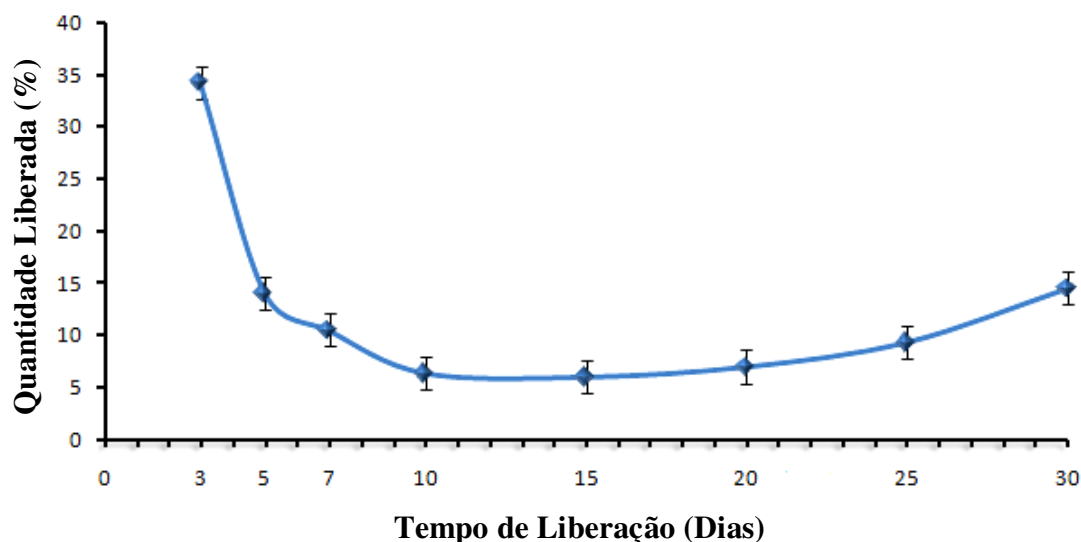
O estudo de liberação *in vitro* do fármaco é necessário para se conhecer a cinética de liberação do dispositivo a fim de se propor a melhor aplicação buscando o máximo em eficiência no tratamento de doenças específicas [TZAFRIRI *et al.*, 2005].

O estudo de liberação *in vitro* da sinvastatina demonstrou liberação inicial explosiva do fármaco, “burst release”, após 3 dias de ensaio, seguida por uma liberação mais lenta e controlada observada nos demais tempos de estudo (Figura 4.10). A concentração de sinvastatina no sobrenadante diminuiu nos tempos de 5, 7 e 10 dias e, essa diminuição deve-se ao fato da sinvastatina degradar em seu hidróxiácido sob condições de hidrólise ácida, como demonstrado em trabalhos recentes [OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA, 2009]. Como é conhecido, a hidrólise dos poli (hidroxi ácidos) gera produtos ácidos. Esses produtos dispersos no meio aquoso podem interferir na estabilidade do fármaco [LI *et al.*, 1990; PARK, 1995; VAN APELDOOR *et al.*, 2004; DING & SCHWEDEMAN, 2004]. A maior parte dos métodos de cromatografia para detecção e quantificação da sinvastatina retém a sinvastatina e seu hidróxiácido, isso se dá devido às condições que o fármaco é analisado [YANG *et al.*, 2003].

Nos cromatogramas 4.11 a 4.14 é possível observar com clareza os picos correspondentes à sinvastatina, ao hidróxiácido e aos produtos de degradação (PD) não identificados, esses resultados estão de acordo com os obtidos por GOMES e colaboradores [2009], CHAUDHARI e colaboradores [2007], MALENOVIC e colaboradores [2006], MALENOVIC e colaboradores [2004].

Nos tempos de 15, 20, 25 e 30 dias de ensaio a quantidade do fármaco no meio aumentou, o que supõe que havia fármaco encapsulado no interior das microesferas de diâmetros maiores que 10 µm; os picos de retenção desses tempos estão demonstrados nos cromatogramas 4.15 a 4.18.

O gráfico 4.10 ilustra a curva de liberação do fármaco em função do tempo estudado. Esses dados são característicos de sistemas compostos por carreadores de diversos diâmetros, onde as microesferas de menor diâmetro degradam rapidamente liberando o fármaco e as maiores apresentam liberação lenta. Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados em ALI *et al.*, [2010]; SILVA, [2009]; MU & FENG, [2002].



**Figura 4.10:** Quantidade de sinvastatina liberada *in vitro* pelo tempo de liberação estudado.

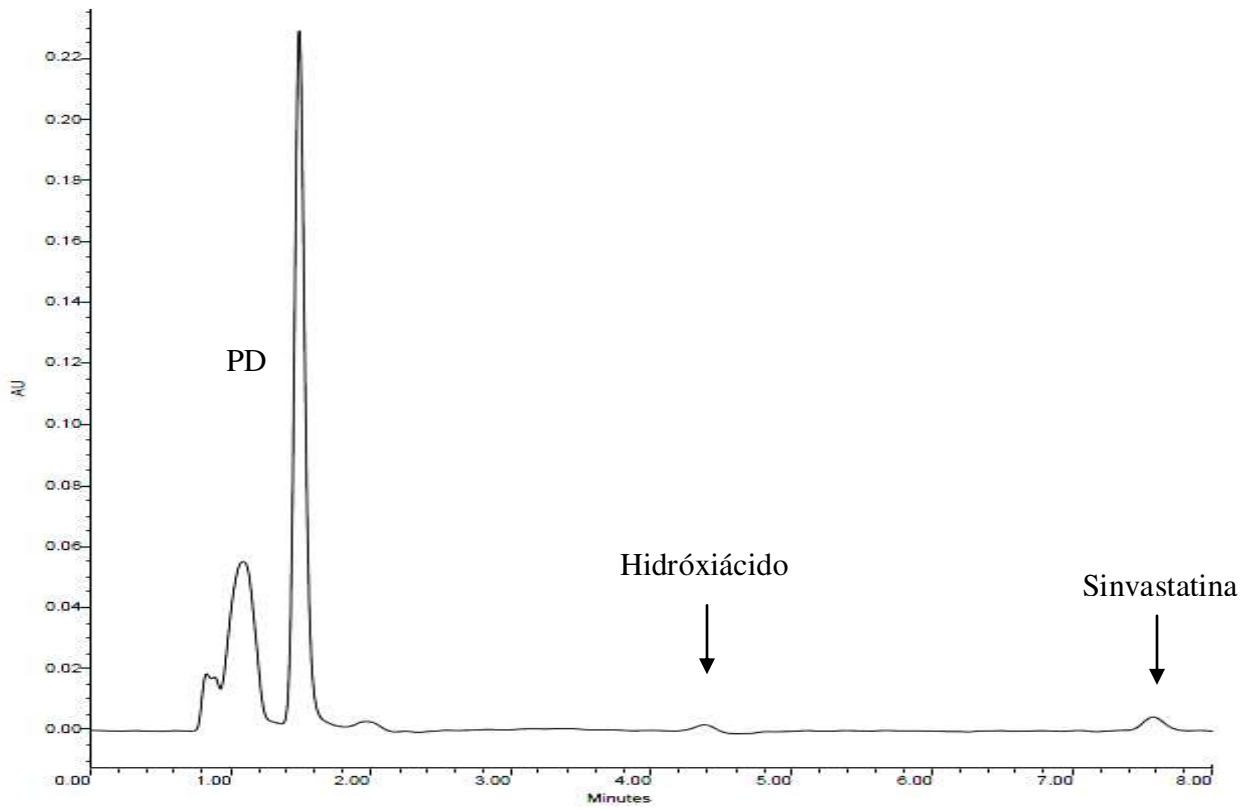
A liberação do fármaco pode ser controlada por difusão, erosão, osmose, ou pela combinação desses mecanismos [SCHWENDEMAN *et al.*, 1997]. O diâmetro das microesferas poliméricas é o primeiro determinante da taxa de degradação do dispositivo e da liberação do fármaco. Conforme se aumenta o diâmetro das partículas diminui-se a superfície específica dos dispositivos de liberação com o meio aquoso, o que conseqüentemente diminui a taxa de liberação do fármaco, pois o fármaco passa por difusão para o meio líquido. Portanto partículas de diâmetros menores degradam e liberam rapidamente o fármaco encapsulado [BERKLAND *et al.*, 2003].

Além do diâmetro das microesferas, a cinética de liberação do fármaco pode ser influenciada pela localização do fármaco na matriz polimérica, se este se encontra na superfície do dispositivo será liberado em menor tempo que o fármaco que está no interior do mesmo. A porosidade da microesfera é outro fator determinante, quanto maior for a quantidade e o diâmetro dos poros maior será a difusão de líquidos pelo dispositivo resultando assim numa degradação mais rápida do polímero com conseqüente liberação do fármaco; as características intrínsecas do polímero como tempo de degradação, porção amorfa e cristalina também influenciam na cinética de liberação do fármaco [SOPPIMATH *et al.*, 2001].

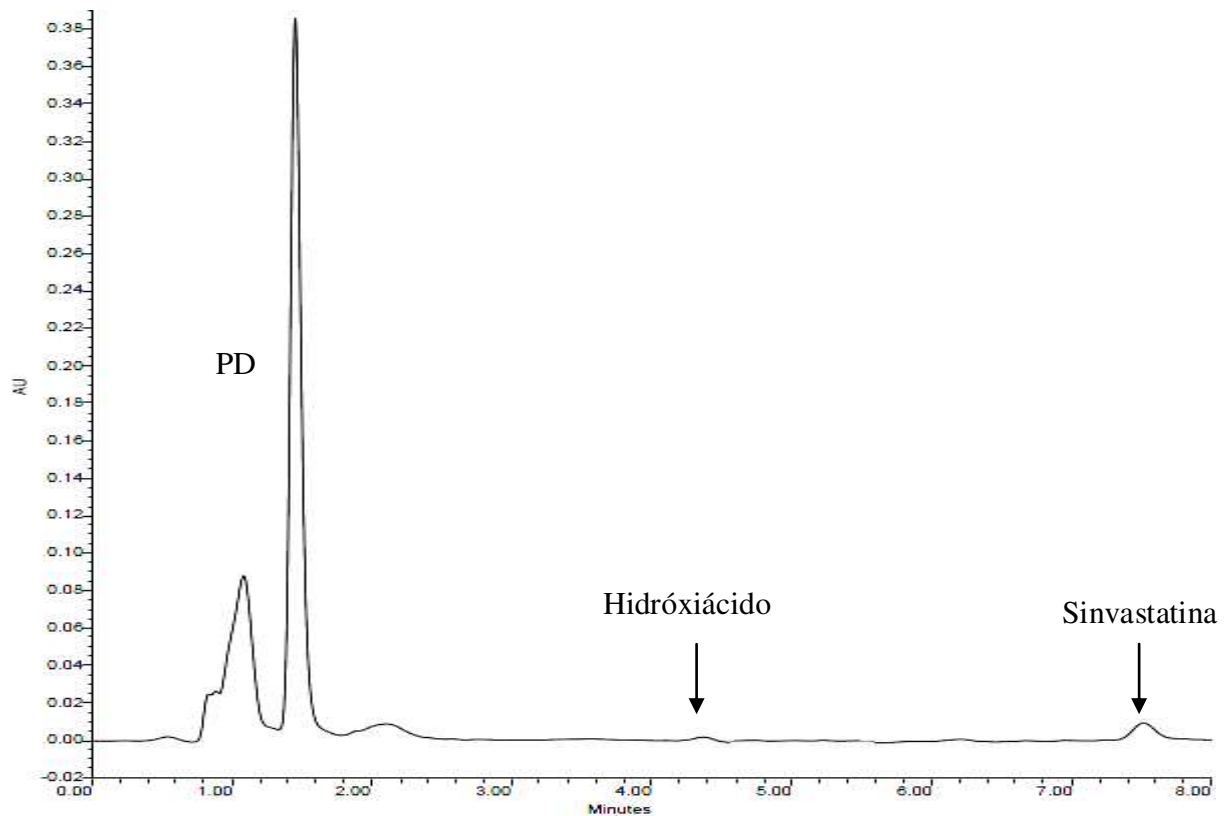
Um sistema de liberação controlada de fármacos pode apresentar até três diferentes fases de liberação: a liberação rápida do fármaco em poucas horas ou dias, conhecido como liberação explosiva, no inglês “burst release”, que é atribuída ao fármaco que se encontra aderido a parede das microesferas que apesar da agitação do sistema não se soltou; a liberação lenta dependente da degradação do polímero e a liberação tardia acelerada, que ocorre devido as condições do meio que aceleram a degradação das matrizes poliméricas [MAKINO *et al.*, 2000; WISCHKE & SCHWENDEMAN, 2008].

A degradação dos poli (hidróxi ácidos) ocorre pela hidrólise das ligações ésteres que pode ser auto-catalizada pelo acúmulo de produtos ácidos no meio [ANDERSON & SHIVE, 1997]. A velocidade de hidrólise desses polímeros depende de sua composição química, da proporção dos monômeros e do tamanho da cadeia podendo-se obter tempos de degradação que variam entre algumas semanas e vários meses.

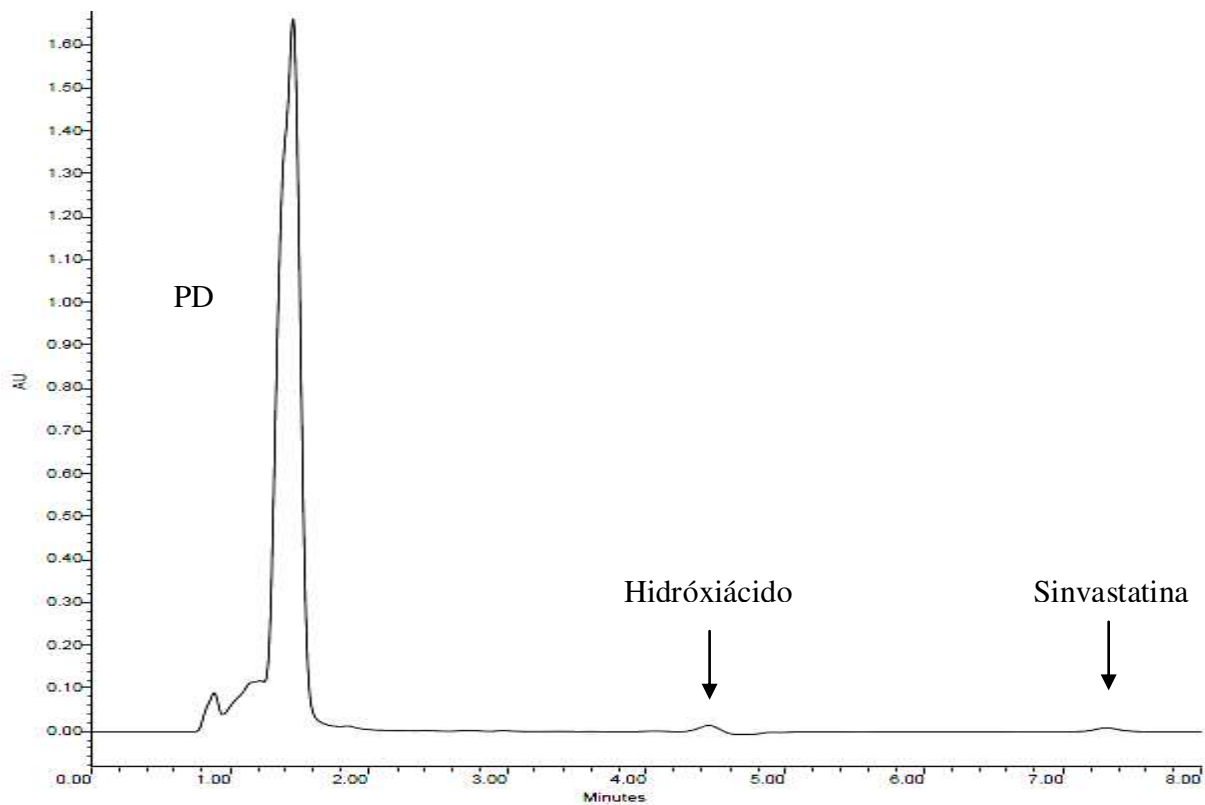




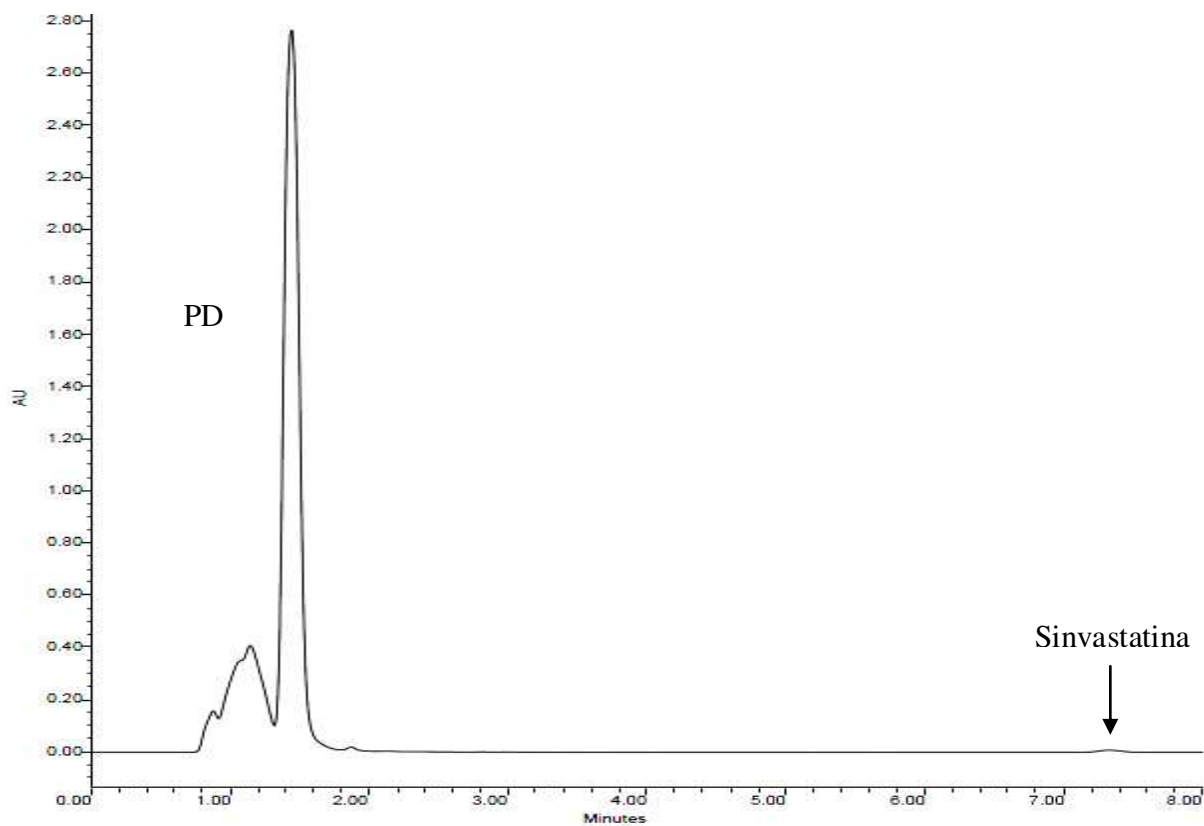
**Figura 4.11:** Cromatograma do sobrenadante após 3 dias de degradação e liberação.



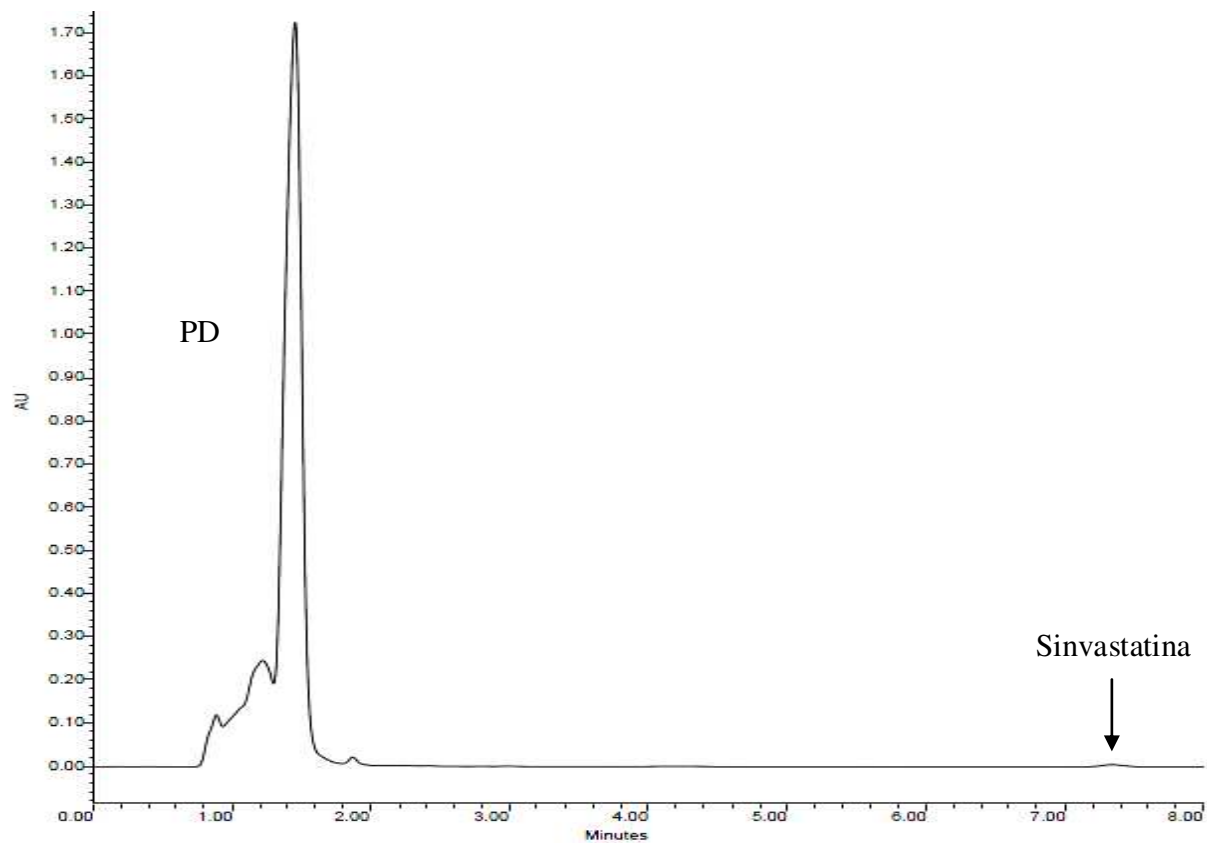
**Figura 4.12:** Cromatograma do sobrenadante após 5 dias de degradação e liberação.



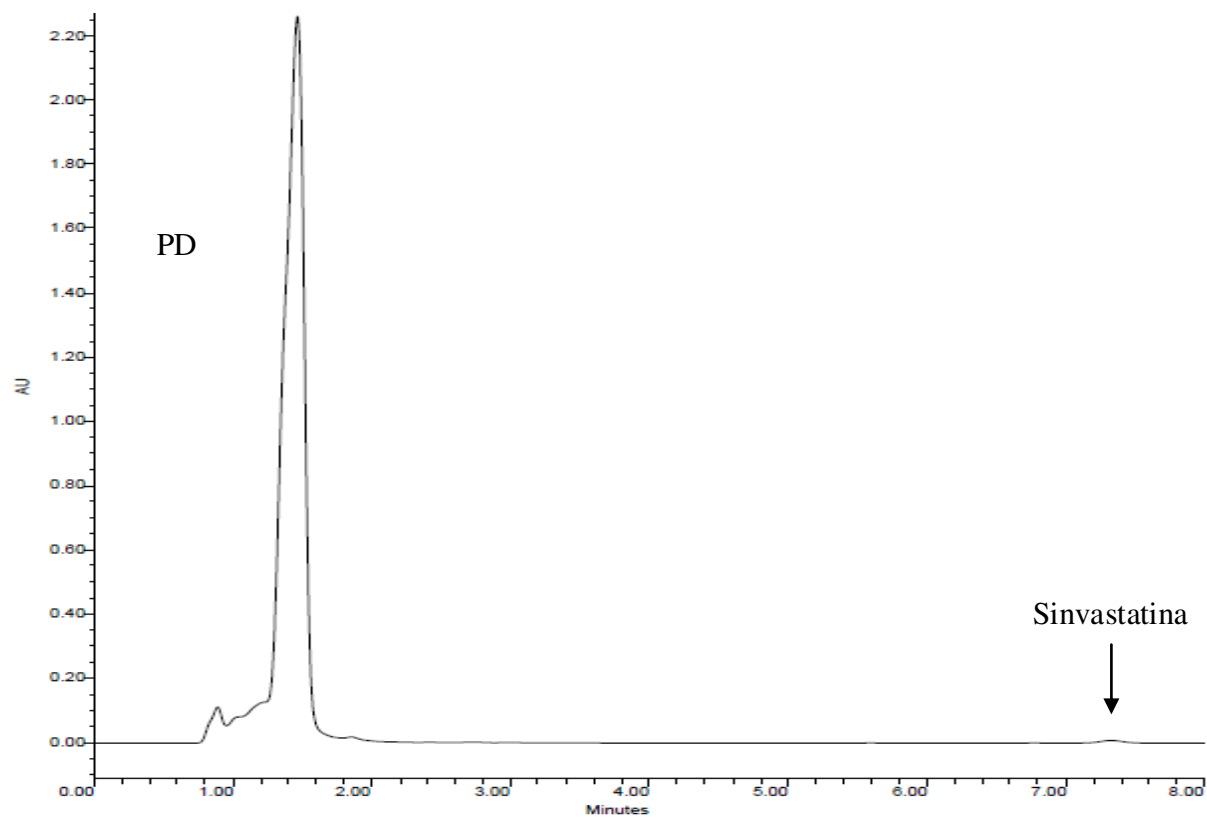
**Figura 4.13:** Cromatograma do sobrenadante após 7 dias de degradação e liberação.



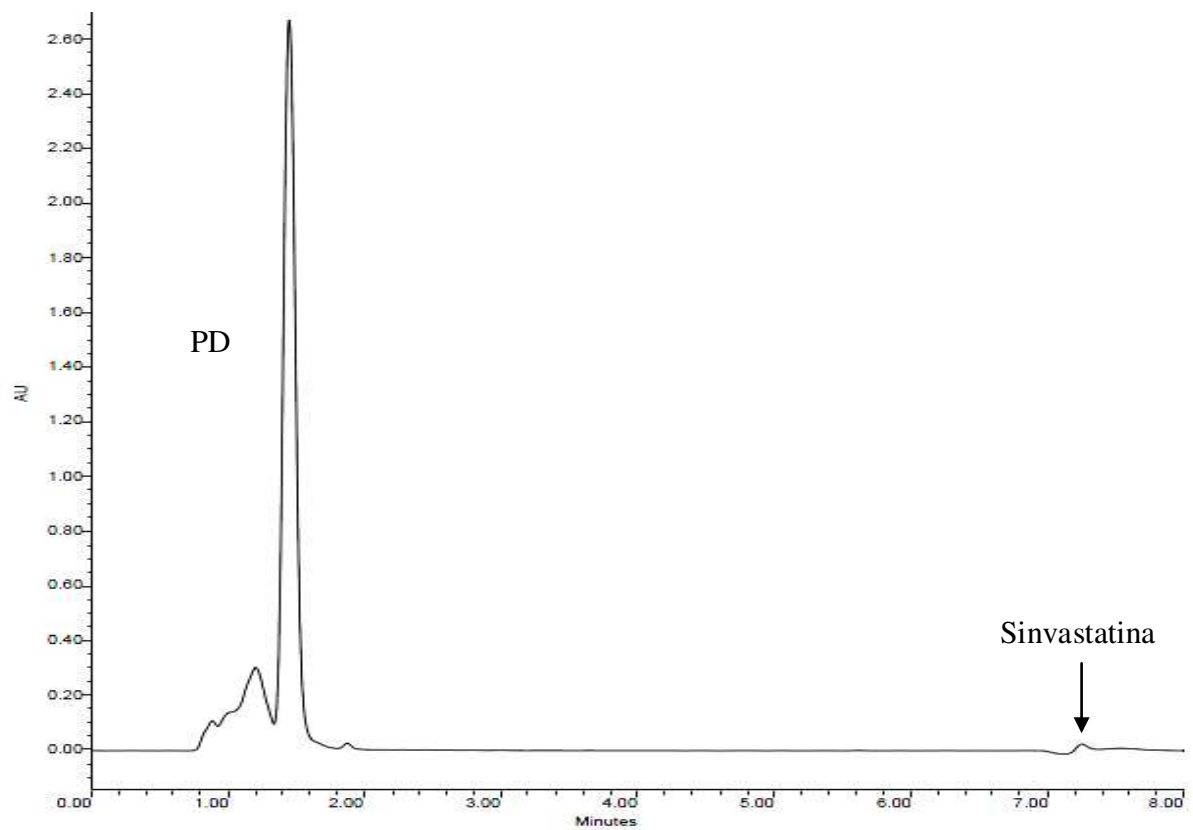
**Figura 4.14:** Cromatograma do sobrenadante após 10 dias de degradação e liberação.



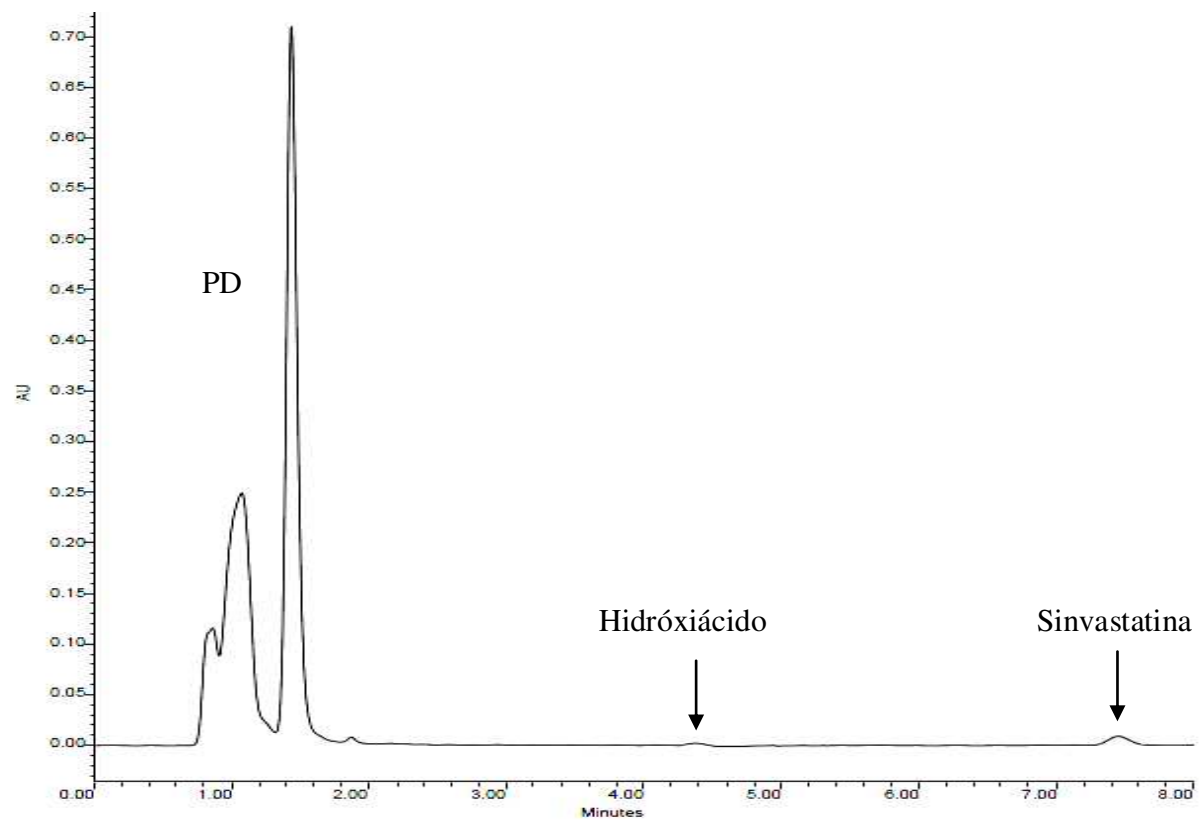
**Figura 4.15:** Cromatograma do sobrenadante após 15 dias de degradação e liberação.



**Figura 4.16:** Cromatograma do sobrenadante após 20 dias de degradação e liberação.



**Figura 4.17:** Cromatograma do sobrenadante após 25 dias de degradação e liberação.



**Figura 4.18:** Cromatograma do sobrenadante após 30 dias de degradação e liberação.

## **Capítulo 5**

### **CONCLUSÃO**

O método de simples emulsão, como descrita neste trabalho, possibilitou com sucesso a obtenção de microesferas de PLDLA com alta eficiência na encapsulação da sinvastatina.

As microesferas apresentaram morfologia e distribuição de diâmetros adequados para a aplicação como dispositivos para liberação local e controlada do fármaco.

As microesferas obtidas são dispositivos promissores para aplicação na liberação local e controlada de fármacos.

## SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

- Estudo *in vivo* da liberação do fármaco;
- Aplicação local das microesferas em osso para avaliação dos efeitos pleiotrópicos da sinvastatina;
- Aplicação das microesferas para tratamento da hipercolesterolemia.

## Capítulo 6

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcellular Biochemistry*, v.49, n.4, p. 241-268, 2008.

AKBUGA, J., Effect of microsphere size and formulation factors on drug release from controlled-release furosemide microspheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 17, n.4, p.593–607, 1991.

ALBERTS A.W.; CHEN J.; KUROV G.; HUNT V.; HUFF J.; HOFFMAN C.; ROTHROCK J.; LOPEZ M.; JOSHUA H.; HARRIS E.; PATCHETT A.; MONAGHAN R.; CURRIE S.; STAPLEY E.; ALBERS-SCHONBERG G.; HENSENS O.; HIRSCHFIELD J.; HOOFFSTEEN K.J.; LIESCH J.; SPRINGER J. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy Sciences*, v. 77, n.7, p. 3957–3961, 1980.

ALEXANDER, J. T; BRANCH, C. L. JR; SUBACH, B. R. Applications of a resorbable interbody spacer via a posterior lumbar interbody fusion technique. *Orthopedics 25 (Suppl 10)*, p.S1185–S1189, 2002.

ALI, H.; SHIRODE, A. B.; SYLVESTER, P. W.; NAZZAL, S. Preparation, characterization, and anticancer effects of simvastatin-tocotrienol lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 389, n.1-2, p. 223-231, 2010.

ALI, S. A. M.; ZHONG, S.-P; DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, D. F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices. 1. Poly(caprolactone). *Biomaterials*, v.14, n.9, p.648-656, 1993.

ALLEN T.M.; CULLIS P.R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, v. 303, n.5665, p.1818-1822, 2004.

AMBIKE, A. A.; MAHADIK, K. R.; PRADKAR, A. Spray-dried amorphous solid dispersions of simvastatin, a low Tg drug: *In Vitro* and *in Vivo* evaluations. *Pharmaceutical Research*, v. 22, n. 6, p. 990-998, 2005.

ANDERSON, J.M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 28, n.1, p. 5-24, 1997.

ARMITAGE, J. The safety of statins in clinical practice. *The Lancet*, v. 370, n.9601, p.1781-1790, 2007.

ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polylactides and related polyesters. *Journal of Controlled Release*, v.17, n.1, p.1-21, 1991.

ASTETE, C. E.; SABLIOV C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, v.17, n.3, p. 247-289, 2006.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARRIOS-GONZALEZ, J.; MIRANDA U. Biotechnological production and application of statins- Mini Review. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.85, n.4, p. 869-883, 2009.

BECK, L.R.; COWSAR, D.R.; LEWIS, D.H.; GIBSON, J.W.; FLOWERS, C.E. New longacting injectable microcapsule contraceptive system. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v.135, n.3, p. 419-426, 1979.

BECK, L.R.; POPE, V.Z.; COWSAR, F.R.; LEWIS, D.H.; TICE, T.R. Evaluation of a new three-month injectable contraceptive microsphere system in primates (Baboon). *Contraceptive*



*Delivery Systems*, v.1, n.1, p.79–86, 1980.

BECK, L.R.; POPE, V.Z.; TICE, T.R.; GILLEY, T.R. Long-acting injectable microsphere formulation for the parenteral administration of levonorgestrel. *Advances in Contraception*, v.1, n.2, p. 119–129, 1985.

BECK, L.R.; RAMOS, R.A.; FLOWERS, C.E.; LOPEZ, G.Z.; LEWIS, D.H.; COWSAR, D.R. Clinical evaluation of injectable biodegradable contraceptive system. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 140, n.7, p. 799–806, 1981.

BECKER, C.; JICK S.S.; MEIER C.R. Use of statins and the risk of Parkinson's disease: a retrospective case-control study in the UK. *Drug Safety*, v. 31, n.5, p. 399–407, 2008.

BENDIX, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, n.1-3, p.129-135, 1998.

BENITA, S.; BENOIT, J.P.; PUISIEUX, F.; THIES, C. Characterization of drug-loaded poly(D,L-lactide) microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.73, n.12, p. 1721–1724, 1984.

BERKLAND, C.; KIM, K.; PACK, D. W. PLG microspheres size controls drug release rate through several competing factors. *Pharmaceutical Research*, v. 20. n.7, p. 1055-1062, 2003.

BERNATAVICIUS, Sergio Tadeu, *Utilização de Microesferas de Poli (L-ácido-lático) Contendo Medicamento no Tratamento de Perda do Tecido Dental*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 71p. Dissertação (Mestrado).

BETTERIDGE D.J.; DODSON P.M.; DURRINGTON P.N.; HUGHES E.A.; LAKER M.F.; NICHOLLS D.P.; REES J.A.; SEYMOUR C.A.; THOMPSON G.R.; WINDER A.F. Management of hyperlipidaemia: guidelines of the British Hyperlipidaemia Association. *Postgraduate Medical Journal*, v.69, n.811, p. 359–369, 1993.

BEZEMER, J. M.; RADERSMA, R.; GRIJPMAN, D. W.; DIJKSTRA, P. J.; VAN

BLITTERSWIJK, C. A.; FEIJEN, J. Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers 2. Modulation of release rate. *Journal of Controlled Release*, v.67, n. 2-3, p. 249–260, 2000.

BIRNBAUM, D.T.; BRANNON-PEPPAS, L. Microparticle drug delivery systems. 2003 In: Braun, A.M. (Ed.), *Drug Delivery Systems in Cancer Therapy*. Humana Press, Totowa, p. 117–135.

BIRNBAUM, D.T.; KOSMALA, J.D.; HENTHORN, D.B.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of  $\beta$ -estradiol from PLGA microparticles: the effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *Journal of Controlled Release*, v.65, n.3, p.375–387, 2000.

BISSERY, M.C.; VALERIOTE, F.; THIES, C. *In vitro* and *in vivo* evaluation of CCNU-loaded microspheres prepared from poly((f)-lactide) and poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) In: Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G., Tomlinson, E. (Eds.), *Microspheres and Drug Therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects*. Elsevier, Amsterdam, p. 217–227, 1984.

BLANCO-PRIETO, M. J.; CAMPANERO, M. A.; BESSEGHIR, K.; HEIMGATNER, F.; GANDER, B. Importance of single or blended polymer types for controlled *in vitro* release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 96, n.3, p. 437-448, 2004.

BODMEIER, R.; CHEN, H. Preparation of biodegradable poly( $\pm$ )lactide microparticles using a spray-drying technique. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.40, n.11, p. 754–757, 1988.

BODMEIER, R.; MCGINITY, J.W. The preparation and evaluation of drug containing poly(D,L-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Pharmaceutical Research*, v.4, n.6, p. 465–471, 1987a.

BONOVAS S.; FILIOUSSI K.; TSAVARIS N.; SITARAS N.M. Statins and cancer risk: a literature-based meta-analysis and meta-regression analysis of 35 randomized controlled trials.

*Journal of Clinical Oncology*, v.24, n.30, p. 4808–4817, 2006.

BOSWELL, G.A.; SCRIBNER, R.M. Polylactide–drug mixtures. US Patent 3,773,919 (20 November), 1973.

BRANNON-PEPPAS, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.116, n.1, p. 1-9, 1995.

BURKE, P. A.; KLUMB, L. A.; HERBERGER, J. D.; NGUYEN, X. C.; HARRELL, R. A.; ZORDICH, M. Poly(lactide-co-glycolide) microsphere formulations of darbepoetin alfa: spray drying is an alternative to encapsulation by spray-freeze drying. *Pharmaceutical Research*, v.21, n.3, p.500-506, 2004.

BURT, H.M.; JACKSON, J.K.; BAINS, S.K.; LIGGINS, R.T.; OKTABA, A.M.C.; ARSENAULT, A.L.; HUNTER, W.L. Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (d,l-lactic acid). *Cancer Letters*, v.88, n.1, p.73–79, 1995.

BYINGTON R.P.; JUKEMA J.W.; SALONEN J.T.; PIT B.; BRUSCHKE A.V.; HOEN H.; FUBERG C.D.; MANCINI G.B. Reduction in cardiovascular events during pravastatin therapy. Pooled analysis of clinical events of the pravastatin atherosclerosis intervention program. *Circulation*, v. 92, n.9, p. 2419–2425, 1995.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutics Sciences*, v. 85, n.5, p. 530-536, 1996.

CERONI, A.S.F., *Obtenção, Caracterização e Estudo In Vitro de Microesferas de PLLA e da blenda PLLA/PEO para Liberação Controlada do Cloridrato de Vancomicina*, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Dissertação de Mestrado.

CHA, Y.; PITT, C.G. A one-week subdermal delivery system for l-methadone based on biodegradable microcapsules. *Journal of Controlled Release*, v. 7, n.1, p. 69–78, 1988.

CHAUDHARI, B. G.; PATEL, N. M.; SHAH, P. B. Stability-indicating reversed phase liquid chromatographic method for simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe from their combination drug products. *Journal of AOAC International*. v. 90, n.5, p. 1242-1249, 2007.

CHU, C. C. Biodegradable Polymeric Biomaterials: an Update Overview, in: *The Biomedical Engineering Handbook*, cap. 41, Bronzino, J. D. (ed.), CRC Press, 1999.

CHUNG, T.; HUANG, Y.; LIU, Y. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PLDLA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v.212, n.1, p.161-169, 2001.

CHUNG, T.; HUANG, Y.; TSAI, Y.; LIU, Y. Effects of solvent evaporation rate on the properties of protein-loaded PLLA and PDLLA microspheres fabricated by emulsion solvent evaporation process. *Journal of Microencapsulation*, v.19, n.4, 463-471, 2002.

COHEN, S.; YOSHIOKA, T.; LUCARELLI, M.; HWANG, L.H.; LANGER, R. Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharmaceutical Research*, v.8, n.6, p. 713–720, 1991.

CONTI, B.; PAVANETTO, F.; GENTA, I. Use of polylactic acid for the preparation of microparticulate drug delivery systems. *Journal of Microencapsulation*, v.9, n.2, p.153–166, 1992.

CORSINI A.; BELLOSTA S.; BAETTA R.; FUMAGALLI R.; PAOLETTI R.; BERNINI F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacology & Therapeutics*, v.84, n.3, p. 413–428, 1999.

COUVREUR, P.; KANTE, B.; GRISLAIN, L.; ROLAND, M.; SPEISER P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *Journal of*

*Pharmaceutical Sciences*, v.71, n.7, p.790-792,1982.

CRUZ, A.C.; GRUBER, B.L. Statins and osteoporosis: Can these lipid-lowering drugs also bolster bones? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, v.69, n.4, p.277-288, 2002.

DASH, A.K.; CUTWORTH II, G.C. Therapeutic, application of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.40, n.1, p. 1-12, 1998.

DEMETRICK, J.S.; LIGGINS, R.T.; MACHAN, L.; DAVIS, N.L.; BURT, H.M.; HUNTER, W.L. The development of a novel intraperitoneal tumor-seeding prophylactic. *American Journal of Surgery*, v.173, n.5, p. 403–406, 1997.

DING, A.G.; SCHWENDEMAN, S.P. Determination of water-soluble acid distribution in poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, n.2, p. 322–331, 2004.

DOWNS JR; CLEARFIELD M.; WEIS S.; WHITNEY E.; SHAPIRO DR.; BEERE A.; LANGENDORFER A.; STEIN E.A.; KRUYER W.; GOTTO A.M. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/ TexCAPS. *Journal of the American Medical Association* v.279, p. 1615–1622, 1998.

DRURY J. L.; MOONEY D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, v.24, n.24, p. 4337-4354, 2003.

DUBERNET, C. Thermoanalysis of microspheres. *Thermochimica Acta*, v. 248, n.1, p. 259-269, 1995.

DUBERNET, C.; ROULAND, J.C.; BENOIT, J.P. Ibuprofen-loaded ethylcellulose microspheres: analysis of the matrix structure by thermal analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 80, n. 11, p. 1029-1033, 1991.

DULAK, J.; JÓZKOWICZ, A. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins:

relevance to anti-cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*, v.5, n.8, p. 579–594, 2005.

DUMITRIU, S.(ed.), Dumitriu M.; em *Polymeric Biomaterial*, Marcel Dekker Inc., New York, p. 399-724, 1994.

EDELMAN, R.; RUSSELL. R. G.; LOSONSKY, G.; TALL, B. D.; TACKET, C. O.; LEVINE, M.; LEWIS, D. H. Immunization of rabbits with enterotoxigenic E-coli colonization factor antigen (CFA/I) ancapsulated in biodegradable microspheres of poly (lactide-co-glycolide). *Vaccine*, v.11, n. 2, p. 155-158, 1993.

EDWARDS C.J.; SPECTOR T.D. Statins as modulators of bone formation. *Arthritis Research & Therapy*, v.4, n.3, p. 151–153, 2002.

ELKE, M.; ROLF-JOACHIM, M. & WOLF-DIETER, D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, v.80, n.3, p.485-501, 2003.

ENDO A.; KURODA M.; TANZAWA K. Competitive inhibition of 3- hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. *FEBS Letters*, v.72, n.2, p.323–326, 1976.

FERNANDEZ-CARBALLIDO, A.;FITZGERALD, J.F.; CORRIGAN, O.I. Investigation of the mechanisms governing the release of levamisole from poly-lactide-co-glycolide delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 42, n.2, p. 125-132, 1996.

FONG, J.W.;NAZARENO, J.P.; PEARSON, J.E.;MAULDING, H.V. Evaluation of biodegradable microspheres prepared by a solvent evaporation process using sodium oleate as emulsifier. *Journal of Controlled Release*, v.3, n.1-4, p.119–130, 1986.

FORD, J. L. The current status of solid dispersions. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 61, n. 3, p. 69-88, 1986.

FUKUSHIMA, S.; KISHIMOTO, S.; TAKEUCHI, Y.; FUKUSHIMA, M. Preparation and evaluation of o/w type emulsions containing antitumor prostaglandin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 45, n.1, p. 65-75, 2000.

FURBERG, C.D. Natural statins and stroke risk. *Circulation*, v.99, n.2, p.185–188, 1999.

GAMISANS, F.; LACOUILONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M. GARCÍA, M.L.; EGEA, M.A. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 179, n.1, p. 37-48, 1999.

GARDNER, D.L., PATANUS, A.J., FINK, D.J. Steroid release from microcapsules In: Gabelnick, H.L. (Ed.), *Drug Delivery Systems*. US Department of Health, Education, and Welfare, Washington, DC, p. 265–278 (USDHEW Pub. No. (NIH) 77-1238), 1977.

GARRETT, i.r.; GUTIERREZ, G.E.; ROSSINI, G.; NYMAN, J.; McCLUSKEY, B.; FLORES, A.; MUNDY, G.R. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats. *Journal of Orthopaedic Research*, v.25, n.10, p.1351-1357, 2007.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.*, v. 68, n.2, p. 335-357, 2002.

GLEW, R.H. Metabolismo de lipídeos II: vias do metabolismode lipídeos especiais. In: Devlin T.M., coordenador. *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. 4.ed. São Paulo: Edgard Blücher; 1998. p.328-67.

GLYNN, S.A.; O'SULLIVAN, D.; EUSTACE, A.J.; CLYNES, M.; O'DONOVAN, N. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC Cancer* 8:9. doi:10.1186/1471-2407-8-9, 2008.

GOMES, F. P.; GARCÍA, P. L.; ALVES, J. M. P.; SINGH, A. K.; KEDORHACKMANN, E. R. M.; SANTORO, M. I. R. M. UV-derivative spectrophotometric and stability-indicating high-

performance liquid chromatographic methods for determination of simvastatin in tablets. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 2, p. 261-269, 2009.

GRASSER, W.A.; BAUMANN, A.P.; PETRAS, S.F.; HARWOOD H.J. JR.; DEVALARAJA, R.; RENKIEWICZ,R.; BARAGI,V.; THOMPSON, D.D.; PARALKAR, V.M. Regulation of osteoclast differentiation by statins. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, v.3, n.1, p. 53-62, 2003.

GRIFFITHS, S.L.; CARTMELL, S.H. Use of statins for enhancing bone-tissue-engineered grafts. *European Journal of Plastic Surgery*, 2007. doi: 10.1007/s00238-007-0190-2.

GUPTE, A., CIFTCI, K., Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v.276, n.1-2, p. 93–106, 2004.

HAMMAN J.H.; ENSLIN G.M.; KOTZÉ, A.F. Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. *BioDrugs*, v.19, n.3, p.165-177, 2005.

HARDMAN J. G.; GILMAN A. G.; LIMBIRD L. E.; GOODMAN and GILMAN'S: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 ed., McGraw-Hill: Nova York, 1996.

HERRERO-VANRELL, R.; MOLINA- MARTÍNEZ, I. T.; PASTORIZA, P. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration. Effect of Labrafil addition on release *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 279, n.1-2, p. 33-41, 2004.

HÖGLUND, K.; WIKLUND, O.; VANDERSTICHELE, H.; BLENNOW, K. Plasma levels of  $\beta$ -amyloid (1–40),  $\beta$ -amyloid (1–42), and total  $\beta$ - amyloid remain unaffected in adult patients with hypercholesterolemia after treatment with statins. *Archives of Neurology*, v.61, n.3, p. 333–337, 2004.

HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J. Farmacologia ilustrada. 3 ed. Artmed, p.552, 2007.



HU, Y.; ZHANG, Z.; SONG, D.; WANG, Y. Preparation and Properties of Self- reinforced L- and D,L lactide Copolymer Rods. *Chinese Chemical Letters*, v.11, n.11, p.1023-1026, 2000.

HUANG, M. H.; LI, S.; HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; VACANTI, C. A.; BRAUD, C.; VERT, M. Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol). *Journal of Biomedical Materials Research A*, v.69, n. 3, p.417-427, 2004.

HUANG, X.; CHEN H, MILLER W.C.; MAILMAN, R.B.; WOODARD, J.L.; CHEN, P.C.; XIANG, D.; MURROW, R.W.; WANG, Y.; POOLE, C. Lower low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with Parkinson´s disease. *Movement Disorders*, v.22, n.3, p.377–381, 2007.

JAIN, A. R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, v.21, n.23, p. 2475-2490, 2000.

JAIN, R.; SHAH, N.H.; MALICK, A.W.; RHODES, C.T. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v.24, n.8, p.703–727, 1998.

JALIL, R.; NIXON, J.R. Microencapsulation using poly(l-lactic acid) I: microcapsule properties affected by the preparation technique. *Journal of Microencapsulation* v. 6, n.4, p. 473–484, 1989.

JALIL, R.; NIXON, J. R. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal of Microencapsulation*. v.7, n.3, p.297-325, 1990.

JEFFERY, H.; DAVIS, S.S.; O'HAGAN, D.T. The preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles: I: oil-in-water emulsion solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics*. v.77, n.2-3, p. 169–175, 1991.

JOBMANN, M.; RAFLER, G. Controlled release systems of biodegradable polymers. 6<sup>th</sup>

communication: control of particle size and size distribution of microparticles produced by the solvent evaporation technique. *Pharmaceutical Industry*, v.60, n.1, p.979–982, 1998.

JOHANSON, P.; MEN, Y.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 50, n.1, p. 129–146, 2000.

JULIENNE, M.; ALONSO, M.; GOMEZ AMOZA, J.; BENOIT, J. Preparation of poly(D,L-lactide/glycolide) nanoparticles of controlled particle size distribution: application of experimental designs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.18, n.10, p. 1063-1077, 1992.

KIDD, J. Life after statin patent expires. *Nature Revs/Drug Discovery*, v. 5, n.10, p.813–814, 2006.

KINO, S.; OSAJIMA, T.; MINUTA, H. Sustained release microsphere preparation containing antipsychotic drug and production process thereof. US Patent 5,656,299 (12 August), 1997.

KUMAR, D.A.; SUJAN, D. P.; VIJAYASREE, V.; RAO, L. N. Simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe in tablets by HPLC. *E-Journal of Chemistry*, v.6, n.2, p.541-544, 2009.

KUREISHI, Y.; LUO, Z.; SHIOJIMA, I.; FULTON, D. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nature Medicine*. v.6, n.9, p. 1004-1010, 2000.

LACOSTE L.; LAM J. Y. T.; LETCHACOVSKI G.; SOLMYMOSS C.; WATERS D. Hyperlipidemia and coronary disease: correction of the increase thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation*, v. 92, n.11, p. 3172-3177, 1995.

LANGER, R.; TIRRELL, D. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, v. 428, n.6982, p. 487-492, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 3ª Ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LEIGGNER, C. S. ; CURTIS, R.; MÜLLER, A.A.; PFLUGER, D.; GOGOLEWSKI, S.; RAHN, B.A. Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration. *Biomaterials*, v.27, n.2, p. 202-207, 2006.

LENNERNAS H.; FAGER G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors: similarities and differences. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 32, n.5, p. 403–425, 1997.

LEVINE G.N.; KEANEY J. F.; VITA J. A. Medical progress: cholesterol reduction in cardiovascular disease-clinical benefits and possible mechanisms. *The new England Journal of Medicine*. v. 332, n.8, p. 512, 1995.

LEWIS, D.H, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M & Langer R (Editor), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, New York, p.1-43, 1990.

LI, S.M.; GARREAU, H.; VERT, M. Structure–property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly( $\alpha$ -hydroxy acids) in aqueous media. Part 1: degradation of lactide-glycolide copolymers: PLA37.5GA25 and PLA75GA25. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*. v.1, n.1, p. 131–139, 1990.

LIAO, J.K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, v.45, n.1, p.89-118, 2005.

LIGGINS, R.T.; BURT, H.M. Paclitaxel loaded poly(l-lactic acid) microspheres: properties of microspheres made with low molecular weight polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 222, n.1, p. 19–33, 2001.

LIGGINS, R.T.; D'AMOURS, S.; DEMETRICK, J.S.; MACHAN, L.S.; BURT, H.M. Paclitaxel

loaded poly(L-lactic acid) microspheres for the prevention of intraperitoneal carcinomatosis after a surgical repair and tumor cell spill. *Biomaterials*, v. 21, n.19, p. 1959–1969, 2001.

MACIEL-OLIVEIRA, N.; BRADASCHIA-CORREA, V.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontology*, 2011, doi:10.1016/j.tripleo.2010.08.027.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*, v.144, n.2 p.681-692, 2003.

MAINARDES, R. M.; GREMIÃO, M.P.D.; EVANGELISTA, R.C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.42, n.4, p. 523-530, 2006.

MAKINO, K.; MOGI, T.; OHTAKE, N.; YOSHIDA, M.; ANDO, S.; NAKAJIMA, T.; OHSHIMA, H. Pulsatile drug release from poly (lactide-co-glycolide) microspheres: how does the composition of the polymer matrices affect the time interval between the initial burst and the pulsatile release of drugs? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 19, n.2, p. 173–179, 2000.

MALENOVIC, A.; IVANOVIC, D., MEDENICA, M.; JANCIC, B.; MARKOVIC, S. Retention modeling in liquid chromatographic separation of simvastatin and six impurities using a microemulsion as eluent. *Journal of Separation Science*, v. 27, n.13, p. 1087-1092, 2004.

MALENOVIC, A.; IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; JANCIC, B.; MARKOVIC, S. Influence of structural and interfacial properties of microemulsion eluent on chromatographic separation of simvastatin and its impurities. *Journal of Chromatography A*, v. 1331, n.1-2, p. 67-73, 2006.

MAO, S.; SHI, Y.; LI, L.; XU, J.; SCHAPER, A.; KISSEL, T. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide)

microspheres formed by solvent evaporation method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, n.2, p. 214–223, 2008.

MARTIN, M.A. ; MIGUENS, F.C.; RIEUMONT, J.; SANCHEZ, R. Tailoring of the external and internal morphology of poly 3-hydroxy butyrate microparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 17, n.2, p. 111-116, 2000.

MASSY Z. A.; KEANE W. F.; KASISKE B.L. Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *The Lancet*, v. 347, n.8994, p.102-103, 1996.

MATSUMOTO, T.; ZOGRAFI, G. Physical properties of solid molecular dispersions of indomethacin with poly-(vinylpyrrolidone) and poly(vinylpyrrolidone-co-vinyl lactate) in relation to indomethacin crystallization. *Pharmaceutical Research*, v. 16, n.1, p. 1722-1728, 1999.

MAULDING, H.V.; TICE, T.R.; COWAR, D.R.; FONG, J.W.; PEARSON, J.E.; NAZARENO, J.P. Biodegradable microcapsules: acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of a basic medicament. *Journal of Controlled Release*, v.3, n.1-4, p. 103–117, 1986.

McFARLANE S, I.; MUNIYAPPA, R. F.; SOWERS, J. R. Pleiotropic Effects of Statins: Lipid Reduction and Beyond. *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.87, n. 4, p.1451-1458, 2009.

MCTAGGART, F.; BUCKETT, L.; DAVIDSON, R.; HOLDGATE, G.; MCCORMICK, A.; SCHNECK, D.; SMITH, G.; WARWICK, M. Pre-clinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *American Journal of Cardiology*, v.87, n.5, p. 28–32, 2001.

McTAVISH, D.; SORKIN, E.M. Pravastatin: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs*, v.42, n. 1, p.65–89, 1992.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v.21, n.23, p.2335-2346, 2000.

MOOTER, G.V.; WUYTS, M.; BLATON, N.; BUSSON, R.; GROBET, P.; AUGUSTIJNS, P.; KINGET, R. Physical stabilization of amorphous ketoconazole in solid dispersions with polyvinylpyrrolidone K25. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 12, n.3, p. 261-269, 2001.

MOSER, R. C.; McMANUS, A.; RILEY, S.; THOMAS, K. Strength retention of 70:30 Poly( L-lactide-co- D, L lactide) Following Real-Time Aging. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, v.75B, n.1, p.56- 63, 2005.

MOTTA, A.C. Duek, E. A. R., Estudo inicial da degradação *in vitro* de poli(L-co-D,L ácido láctico) sintetizado em laboratório. *Revista Matéria*, v.13, n.3, p. 429-438, 2008.

MOTTA, Adriana Cristina, *Síntese, Caracterização de dispositivos de poli (L-co D, L ácido láctico). Estudo da degradação in vitro e in vivo*. Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas. 124 p. Tese de Doutorado, 2007.

MOURA, Lucas Alves, *Utilização de membranas de Poli (L-ácido láctico) em regeneração tecidual guiada para Periodontia*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 67p. Dissertação (Mestrado).

MU, L.; FENG, S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release*, v.86, n.1, p.33-48, 2003.

MU, L.; FENG, S.S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>). *Journal of Controlled Release*, v. 80, n.1-3, p. 129-144, 2002.

MUNDY, G.; GARRET, R.; HARRIS, S.; CHAN, J.; CHEN, D.; ROSSINI, G.; BOYCE, B.; ZHAO, M.; GUTIERREZ, G. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. *Science*, v.286, n.5446, p. 1946-1949, 1999.

MURANISHI, S., IKADA, Y., YOSHIKAWA, H., GEN, S. Polylactic acid microspheres and process for producing the same. US Patent 4,994,281 (19 February), 1991.

MURILLO, M.; GAMAZO, C.; GONI, M.; IRACHE, J.; BLANCO-PRIETO, M. Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, n.1-2, p. 341-344, 2002.

NAKANO, M.; WAKIYAMA, N.; KOJIMA, T.; JUNI, K.; IWAOKU, R.; INOUE, S.; YOSHIDA, Y. Biodegradable microspheres for prolonged local anesthesia In: Davis, S.S., Illum, MCVIE, L.; TOMLINSON, J.G.E. (Eds.), *Microspheres and Drug Therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects*. Elsevier, Amsterdam, p. 327–335, 1984.

NARAYANI R.; RAO K. P. Gelatin microsphere cocktails of different sizes for the controlled release of anticancer drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.143, n.2, p. 255–258, 1996.

NUWAYSER, E.S.; WILLIAMS, D.L.; MEIER, P.M.; WU, T.C.; MERCHANT, S.F.; KERRIGAN, J.H. Amicrocapsule system for drug delivery In: Gabelnick, H.L. (Ed.), *Drug Delivery Systems*. US Department of Health, Education, and Welfare, Washington, DC, p. 193–251 (USDHEW Pub. No. (NIH) 77-1238), 1977.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 28, n.1, p. 25-42, 1997.

O'HAGAN, D.T., SINGH, M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems, 2004. In: Kaufmann, S.H.E. (Ed.), *Novel Vaccination Strategies*. Wiley, Weinheim, p. 147–172.

OKADA, H.; TOGUCHI, H. Biodegradable microspheres in drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.12, n.1, p.1-99, 1995.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; VIANNA-SOARES, C. D.; PIANETTI, G.A. Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. *Química Nova*, v. 33, n. 8, p. 1653-1657, 2010.

PAHAN, K. Lipid-lowering drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.63, n.10, p.1165–1178, 2006.

PANYAM, J.; WILLIAMS, D.; DASH, A.; LESLIE-PELECKY, D.; LABHASETWAR, V. Solid-state drug-polymer solubility: a determinant for the encapsulation of hydrophobic drugs in PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.93, n.7, p. 1804-1814, 2004.

PARK, J. H.; KWON, S.; NAM, J. O.; PARK, R. W.; CHUNG, H.; SEO, S. B.; KIM, I. S.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y. Self-assembled nanoparticles based on glycol chitosan bearing 5-beta-cholanic acid for RGD peptide delivery. *Journal of Controlled Release*, v.95, n.3, p. 579-588, 2004.

PARK, J. H.; YE, M.; PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, v.10, n.1, p.146-161, 2005.

PARK, T.G., Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials*, v.16, n.15, p. 1123–1130, 1995.

PASHA, K.; MUZEEB, S.; BASHA, S. J. S.; SHASHIKUMAR, D.; MULLANGI, R.; SRINIVAS, N. R. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors—atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and *in vitro* metabolism studies. *Biomedical Chromatography*, v.20, n.3, p. 282-293, 2006.



PASSERINI, N.; CRAIG, D. Q. Characterization of ciclosporin A loaded poly (D,L lactide-coglycolide) microspheres using modulated temperature differential scanning calorimetry. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.54, n.7, p. 913-919, 2002.

PATEL, R.; PATEL, M. Preparation, characterization, and dissolution behavior of a solid dispersion of simvastatin with polyethylene glycol 4000 and polyvinylpyrrolidone K30. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 29, n.2, p.193-204, 2008.

PEDRINI, S.; CARTER T.L.; PRENDERGAST, G.; PETANCESKA,S.;EHRlich, M.E.; GANDY, S. Modulation of statin activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK. *PLos Medicine*, v.2, n.1, 2005.

PEPPAS, L. B., Polymers in Controlled Drug Delivery. *Medical Plastics and Biomaterials*, v. 4, n.1, p.34-44, 1997.

PEREIRA, B. G.; RIBEIRO, E.G.; CARNEIRO, M.F.; LUZIA, A.B.; PIRES, M.A.S. Estudo térmico de pré-formulação de sinvastatina comprimidos. *Revista da Fundação Ezequiel Dias*, v.1, n.1, p. 45-50, 2007.

PEREZ, H. M.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The preparation and evaluation of poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of Controlled Release*, v. 65, n.3, p. 429-438, 2000.

PICOS, R. D.; CARRIL, G. M., MENA, F.D. Métodos de Obención de Microesferas Biodegradables. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 35, n.2, p. 126-35, 2001.

PIETZONKA, P.; WALTER, E.; DUDA-JOHNER,S.; LANGGUTH, P.; MERKLE H. Compromised integrity of excised porcine intestinal epithelium obtained from the abattoir effects the outcome of *in vitro* particle uptake studies. *European Journal of Pharmaceutics Science*, v.15, n.1, p. 39-47, 2002.

PREIS, I.; LANGER, R.S. A single immunization by sustained antigen release. *Journal of Immunology Methods*, v.28, n.1-2, p. 193-197.

RAMAN, C.; BERKLAND, C.; KIM, K.; PACK, D.W. Modeling small-molecule release from PLG microspheres: effects of polymer degradation and nonuniform drug distribution. *Journal of Controlled Release*, v.103, n.1, p. 149-158, 2005.

RÉ, M.I. Microencapsulação-em busca de produtos inteligentes. *Ciência Hoje*, v. 27, n.162, p.24-29, 2000.

RIBEIRO, Rodrigo Pinheiro, *Efeito da radiação gama no comportamento in vitro de um copolímero bioabsorvível*. Rio de Janeiro, Instituto Militar de Engenharia, 115 p. Dissertação de mestrado, 2006.

ROGERS, M.J. Statins: lower lipids and better bone? *Nature*, v.6, n.1, p.21-23, 2000.

ROSILIO, V.; BENOIT, J.P.; DEYME, M.; THIES, C.; MADELMONT, G. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded microspheres fabricated from poly(d,l-lactide-co-glycolide). *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 25, n.5, p. 667-682, 1991.

SACKS, F.M.; PFEFFER, M.A.; MOYE, L.A.; ROULEAU, J.L.; RUTHERFORD, J.D.; COLE, T.G.; BROWN, L.; WARNICA, J.W.; ARNOLD, J.M.; WUN, C.C.; DAVIS, B.R.; BRAUNWALD, E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *The New England Journal of Medicine*, v.335, n.14, p.1001-1009, 1996.

SANSDRAP, P.; MOES A. J. *In vitro* evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release*, v.43, n.1, p. 47-58, 1997.

SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *The Lancet*, v.344, n. 8934, p. 1383–1389, 1994.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v.19, n. 1, p.117–125, 2005.

SCHUCHMANN, H.P.; DANNER, T. Emulsification: more than just grind. *Chemie Ingenieur Technik*, v.76, n.4, p. 364–375, 2004.

SCHWENDEMAN, S.P., COSTANTINO, H.R., GUPTA, R.K., LANGER, R. Progress and challenges for peptide, protein, and vaccine delivery from implantable polymeric systems In: Park, K. (Ed.), *Controlled Drug Delivery: Challenges and Strategies*. The American Chemical Society, Washington, DC, p. 229–267, 1997.

SERAJUDDIN A.T.M.; RANADIVE, S.A.; MAHONEY, E.M. Relative lipophilicities, solubilities and structure pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin and simvastatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.80, n.9, p. 830–834, 1991.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. v.26, n.5, p.726-737, 2003.

SHEPHERD, J.; COBBE, S.M.; FORD, I.; ISLES, C.G.; LORIMER, A.R.; MACFARLANE, P.W.; MCKILLOP, J.H.; PACKARD, C.J. Prevention of Coronary Heart Disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *The New England Journal of Medicine*, v. 333, n.20, p.1301–1308, 1995.

SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions

and interindividual differences in transport and metabolic enzyme functions. *Pharmacology and Therapeutics*, v.112, n.1, p.71–105, 2006.

SILVA, Taízia Dutra, *Desenvolvimento de métodos analíticos e de formulações para estatinas*. Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia. 144 p. Dissertação de mestrado, 2009.

SINHA, V. R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, v.90, n.3, p. 261-280, 2003.

SONG, C.; LABHASETWAR, V.; MURPHY, X; QU, X.; HUMPHREY, W.; SHEBUSKI, R.; LEVY, R. Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v.43, n.1, p.197-212, 1997.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. v.70, n.1-2, p.1-20, 2001.

SOUZA, M. A.F. ; CONCEIÇÃO, M.M.; SILVA, M.C.D.; SOLEDADE, L.E.B.; SOUZA, A.G. Thermal and Kinetic Study of Statins: Simvastatin and Lovastatin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.87, n.3, p. 859-863, 2007.

SUNG, H. J.; MEREDITH, C.; JOHNSON, C.; GALIS, Z. S. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*, v. 25, n. 26, p.5735- 5742, 2004.

SUZUKI, K., PRICE, J.C. Microencapsulation and dissolution properties of a neuroleptic in a biodegradable polymer, poly(D,L-lactide). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 74, n.1, p. 21–24, 1985.

TANG, B.K.; KALOW, W. Variable activation of lovastatin by hydrolytic enzymes in human plasma and liver. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.47, n.5, p. 449–451, 1995.

THE LONG-TERM INTERVENTION WITH PRAVASTATIN IN ISCHEMIC DISEASE STUDY GROUP. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin inpatients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *The New England Journal of Medicine*, v.339, n.19, p.1349–1357, 1998.

THE PRAVASTATIN MUTINATIONAL STUDY GROUP FOR CARDIAC RISK PATIENTS. Effects of pravastatin in patients with serum total cholesterol levels from 5.2 to 7.8 mmol/liter (200 to 300 mg/dl) plus two additional atherosclerotic risk factors. *The American Journal of Cardiology*, v.72, n.14, p. 1031–1037, 1993.

THOTE, A.J.; CHAPPELL, J.T.; KUMAR, R.; GUPTA, R.B. Reduction in the initial burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 31, n.1, p. 43–57, 2005.

TSAI, D. C.; HOWARD, S. A.; HOGAN, T. F.; MALANGA, C. J.; KANDZARI, S. J.; MA, J. K. H. Preparation an *in vitro* evaluation of polylactic acid-mitomycin C microcapsules. *Journal of Microencapsulation*, v.3, n.3, p.181-193, 1986.

TZAFRIRI, A.R.; LERNER, E.I.; FLASHNER-NARAK, M.; HINCHCLIFFE, M.; RATNER, E.; PARNAS, H. Mathematical modeling and optimization of drug delivery from intratumorally injected microspheres. *Clinical Cancer Research*, v.11, n.2, p. 826–834, 2005.

VAN APELDOORN, A.A.; VAN MANEN, H.J.; BEZEMER, J.M.; DE BRUIJN, J.D.; VAN BLITTERSWIJK, A.C.; OTTO, C. Raman imaging of PLGA microsphere degradation inside macrophages. *Journal of American Chemical Society*, v.126, n.41, p. 13226–13227, 2004.

VENIER-JULIENNE, M.C.; BENOIT, J.P. Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 71, n.2, p. 121-128, 1996.

VIPPAGUNTA S.R.; WANG Z.; HORNING S.; KRILL S.L. Factors affecting the formation of eutectic solid dispersions and their dissolution behavior. *Journal of Pharmaceutics Sciences*, v.96, n. 2, p. 294-304, 2006.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Metabolismo dos lipídeos. In: Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: Artmed; 2000. p.563-610.

WADA, R., HYON, S.-H., IKADA, Y., NAKAO, Y., YOSHIKAWA, H., MURANISHI, S. Lactic acid oligomer microspheres containing an anticancer agent for selective lymphatic delivery: I. *In vitro* studies. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v.3, n.2, p. 126–136, 1988.

WAKIYAMA, N.; JUNI, K.; NAKANO, M. Influence of physicochemical properties of polylactic acid on the characteristics and *in vitro* release patterns of polylactic acid microspheres containing local anesthetics. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n.7, p. 2621–2626, 1982a.

WAKIYAMA, N.; JUNI, K.; NAKANO, M. Preparation and Evaluation *in vitro* of polylactic acid microspheres containing local anesthetics. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n.11, p. 3363–3368, 1981.

WAKIYAMA, N.; JUNI, K.; NAKANO, M. Preparation and evaluation of *in vitro* and *in vivo* of polylactic acid microspheres containing dibucaine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n.10, p. 3719–3727, 1982b.

WANG, Y.M.; SATO, H.; ADACHI, I.; HORIKOSHI, I. Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for targeted delivery of a novel anticancer agent, taxol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 44, n.10, p. 1935–1940, 1996.

WANG, Y.M.; SATO, H.; HORIKOSHI, I. *In vitro* and *in vivo* evaluation of taxol release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres containing isopropyl myristate and degradation of microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 49, n. 2-3, p.157–166, 1997.

WHATELEY, T. L. Biodegradable microspheres for controlled delivery, En: Whaterley TL, ed. Encapsulation and controlled release, Reino Unido: Harwood Acad, 57, 1993.

WHITE, C.M. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, n.9, p. 963–970, 2002.

WILLIAMS, K. J.; TABAS I. The response to retention hypothesis of early atherogenesis. *Atherosclerosis Trombosis and Vascular Biology*, v.15, n.5, p. 551-561, 1995.

WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 364, n.2, p. 298-327, 2008.

WOLOZIN, B. Cholesterol and Alzheimer's disease. *Biochemical Society Transactions*, v.30, n.4, p.525–529, 2002.

WONG, R.W.; RABIE, A.B. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v.41, n.4, p.244-248, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Adherence to long term therapies: evidence for action. Geneva: World Health Organization; 2003.

WU, X.S. Preparation, characterization, and drug delivery application of microspheres based biodegradable lactic/glycolic acid polymers In: Wise, D., Trantolo, D.J., Altobelli, D.E., YASZEMS, M.J. (Eds.), *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering:Materials/Applications*.Marcel Dekker,NewYork, p. 1151–1200 (Chapter 32), 1995b.

XIE, M.; ZHOU, L.; HU, T.; YAO, M. Intratumoral delivery of paclitaxel-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for Hep-2 laryngeal squamous cell carcinoma xenografts. *Anti-Cancer Drugs*, v. 18, n.4, p. 459–466, 2007.

XU, X. Y.; YEE, W. C.; HWANG, P. Y. K.; YU, H.; WAN, A. C. A.; GAO, S. J.; BOON, K. L.; MAO, H. Q.; LEONG, K. W.; WANG, S. Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. *Biomaterials*, v.24, n.13, p.2405-2412, 2003.

XU, X.; YEE, W. C.; HWANG, P. Y.; YU, H.; WAN, A. C.; GAO, S.; BOON, K. L.; YANG, H.; FENG, Y.; LUAN Y. Determination of Simvastatin in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.785, n.2, p. 369–375, 2003.

YANG, Q.; OWUSU-ABABIO, G. Biodegradable progesterone microsphere delivery system for osteoporosis therapy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 26, n.1, p. 61–70, 2000.

YOSHIKAWA, H.; NAKAO, Y.; TAKADA, K.; MURANISHI, S.; WADA, R.; TABATA, Y.; HYON, S.H.; IKADA, Y. Targeted and sustained delivery of aclarubicin to lymphatics by lactic acid-oligomer microsphere in rat. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 37, n.3, p. 802–804, 1989.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.48, n.1, p. 27–42, 2001.

YUN, Y.H.; GOETZ, D.J.; YELLEN, P.; CHEN, W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials*, v.25, n. 1, p.147-157, 2004.