



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

Carlos Alves do Nascimento Filho

PERFIL DE LIBERAÇÃO DA QUERCETINA INCORPORADA EM
COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA E POLIETILENOGLICOL
DETERMINADO COM DISSOLUTOR HM-RJ/CF01

Juazeiro – BA

2014

CARLOS ALVES DO NASCIMENTO FILHO

**PERFIL DE LIBERAÇÃO DA QUERCETINA INCORPORADA EM
COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA E POLIETILENOGLICOL
DETERMINADO COM DISSOLUTOR HM-RJ/CF01**

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, Campus Juazeiro como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Jefferson Bezerra do Nascimento
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Larissa Araújo Rolim

Juazeiro – BA

2014

Nascimento, Carlos.

Perfil de Liberação da Quercetina Incorporada em Compósito de Hidroxiapatita e Polietilenoglicol Determinado com Dissolutor HM-RJ/CF01/Carlos Alves do Nascimento Filho.

Juazeiro, 2014.

XVI.: 121f.: il.; 29 cm

Trabalho de conclusão de curso (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Juazeiro, Juazeiro-BA, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Jefferson Bezerra do Nascimento.

Referências.

1. Quercetina incorporada em compósito de hidroxiapatita e polietilenoglicol para liberação controlada do fármaco. Universidade

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

CARLOS ALVES DO NASCIMENTO FILHO

**PERFIL DE LIBERAÇÃO DA QUERCETINA INCORPORADA EM COMPÓSITO DE
HIDROXIAPATITA E POLIETILENOGLICOL DETERMINADO COM DISSOLUTOR**
HM-RJ/CF01

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências dos Materiais, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 04 de dezembro de 2014.

Banca Examinadora

Presidente: Prof. Dr. Roberto Jefferson Bezerra do Nascimento
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

Membro Interno: Prof. Dr. Helinando Pequeno de Oliveira
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

Membro externo: Prof. Dr. Eduardo Jesus de Oliveira
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Dedico este trabalho à minha mãe, Darci, ao meu pai, Carlos (*in memoriam*), aos meus filhos Aquiles, Apolo e Andrei, e a minha esposa Angélica.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por mais esta etapa finalizada.

Aos meus pais, por me mostrarem o caminho correto.

Aos meus irmãos que, se pudesse escolher, não teria escolhido melhor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Jefferson Bezerra do Nascimento, pela orientação, paciência, confiança, amizade, sinceridade e pelos conhecimentos transmitidos, sem os quais este trabalho não teria sido possível. “Uns são homens; alguns são professores; poucos são mestres. Os primeiros, escuta-se; os segundos respeita-se; os últimos, segue-se”. Muito obrigado.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Larissa Araújo Rolim, pela orientação, ensinamentos, paciência, amizade, pela imensa ajuda e pela utilização de seu laboratório. “Os melhores professores são aqueles que se fazem de ponte e convidam seus alunos a atravessá-la, e depois de facilitada a travessia, eles se desfazem com prazer, incentivando seus alunos a construírem suas próprias pontes”.

Ao professor Alan Dantas pelo apoio e confiança no início do mestrado.

Aos professores Nelson Cárdenas, Helinando Oliveira e Arlan Gonsalves, por concederem as estruturas laboratoriais necessárias para realização de experimentos.

Ao professor José Bismark pela qualificação física do dissolutor construído.

À todos os professores e técnicos que fazem parte do Colegiado de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais - CPGCM.

Ao técnico Francimário Nésio pela grande contribuição no planejamento e construção do dissolutor.

Aos colegas discentes e a pós-doutoranda Alessandra Félix do CPGCM.

Após a realização de um trabalho como este, percebemos que houve muitas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para esta conquista, às quais gostaria de humildemente agradecer, externando todo o meu reconhecimento e gratidão.

O Rio e o Oceano

“Diz-se que, mesmo antes de um rio cair no oceano, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada: os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados e vê a sua frente um oceano tão vasto que, entrar nele, nada mais é que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Você pode apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entra no oceano é que o medo desaparece. Porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas torna-se oceano. Por um lado é desaparecimento, e por outro lado é renascimento. Assim somos nós. Voltar é impossível na existência. Você pode ir em frente e se arriscar: Torna-se OCEANO!”

Osho

RESUMO

As neoplasias (cânceres) constituem a segunda maior causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. No Brasil, as neoplasias conduzem a altas taxas de mortalidade, devido ao fato de serem diagnosticadas tardiamente e pela limitação dos tratamentos disponíveis. Sistemas poliméricos de liberação de fármacos antitumorais vêm sendo amplamente investigados como uma alternativa terapêutica para neoplasias. Esses sistemas podem ser implantados diretamente no local de ação, permitindo a liberação modificada do agente quimioterápico, minimizando, conseqüentemente, os efeitos colaterais provocados por esses fármacos administrados pelas vias convencionais. Sendo assim, o projeto proposto para esta dissertação constitui-se claramente em um desafio tecnológico: desenvolver matriz de polietilenoglicol-PEG e hidroxiapatita-HA, determinar suas características físicas e químicas, com a finalidade de se avaliar o perfil de liberação da quercetina (QUE) incorporada na mesma, bem como, desenvolver o dissolutor HM-RJ/CF01 que possibilite tal avaliação. Para execução desses objetivos, a hidroxiapatita foi preparada por meio da reação entre o nitrato de cálcio e o hidrogenofosfato de amônio em meio básico, em seguida, o pó cerâmico foi disperso em polietilenoglicol líquido com posterior adição de quercetina para a obtenção dos compósitos do material, sendo que o mesmo foi desenvolvido nas seguintes proporções: PEG8/HA2, PEG6/HA4, PEG5/HA5 e PEG4/HA6, cada uma com 100 mg de quercetina p/p. A caracterização foi realizada por MEV, EDS, FTIR, DRX, TG e teste de dureza. Em paralelo, foi desenvolvida e validada uma metodologia de quantificação de quercetina por CLAE-DAD no meio de dissolução apropriado. O desempenho como sistemas de liberação controlada foi avaliado por meio da determinação da liberação *in vitro* de quercetina nos compósitos desenvolvidos. O conjunto de resultados mostrou que foi possível obter a cerâmica na sua forma pura, bem como, produzir os compósitos contendo a quercetina com características interessantes que permitiram a avaliação do perfil de liberação. A caracterização dos compósitos mostrou uma coesão entre HA/PEG/QUE, evidenciado pelo aumento do ponto de fusão da quercetina na TG. Os perfis de liberação evidenciados pelos compósitos apresentaram maior correlação com o modelo de Weibull, indicando que a liberação do fármaco, ocorre segundo um mecanismo complexo, no qual estão envolvidos a difusão, o intumescimento e a erosão, caracterizando-se, dessa forma, um sistema de liberação prolongada para quercetina. Os resultados mostraram ainda um bom desempenho do dissolutor utilizado neste trabalho como também que o compósito PEG5/HA5/QUE possuem características que abrem margens para prospecções futuras no tocante a avaliação da liberação da quercetina em modelos para animais e humanos.

Palavras chave: Hidroxiapatita; Polietilenoglicol; Quercetina.

ABSTRACT

Neoplasms are the second leading cause of death worldwide, second only to cardiovascular disease. In Brazil, neoplasms lead to high mortality rates due to their being diagnosed late and the limitation of available treatments. Polymeric delivery systems for antitumor drugs have been widely investigated as an alternative treatment for cancer. These systems can be deployed directly in the place of action, allowing the modified release of the chemotherapeutic agent, thus minimizing side effects caused by these drugs administered by conventional routes. Therefore, the proposed project for this thesis clearly constitutes a technological challenge: to develop matrix and hydroxyapatite-HA and polyethylene glycol-PEG, assess their physical and chemical characteristics, in order to evaluate the release profile of quercetin (QUE) incorporated therein, as well as develop a *HM-RJ/CF01* dissolution instrument that allows such an evaluation. To achieve these objectives, the hydroxyapatite was prepared by the reaction between calcium nitrate and ammonium phosphate in basic medium, then the ceramic powder was dispersed in liquid polyethylene glycol with subsequent addition of quercetin to obtain the composite material and it was developed in the following proportions: PEG8/HA2, PEG6/HA4, PEG5/HA5 and PEG4/HA6, each with 100 mg of quercetin. The characterization was performed by SEM, EDS, FTIR, XRD, TG-DTA and hardness test. In parallel, it was developed and validated a method for quantification of quercetin by HPLC-DAD in the middle of suitable dissolution. The performance as a drug delivery systems was evaluated by determining the in vitro release of quercetin in the developed composites. The set of results showed that it was possible to obtain ceramics in their pure form, as well as producing composites containing quercetin with interesting characteristics that allow the evaluation of the release profile. The characterization of the composite showed cohesion of HA / PEG / WHO, evidenced by the increase in quercetin melting point TG. The release profiles evidenced by the composite had higher correlation with the Weibull model, indicating that drug release occurs according to a complex mechanism, in which are involved the diffusion, swelling and erosion, characterized thus a sustained release system for quercetin. The results also showed a good performance dissolutor used in such work as well as the composite PEG5 / HA5 / WHO has characteristics that open margins for future research regarding the evaluation of the release of quercetin models for animals and humans.

Keywords: hydroxyapatite; polyethylene glycol; Quercetin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura monomérica do polietilenoglicol.	23
Figura 2. Representação da micela incorporada com um fármaco.....	25
Figura 3. (a) Estrutura química da quercetina aglicona. Fonte: (HERTOG, M.G.L., <i>et al.</i> , 1993).....	37
Figura 4. Representação esquemática do sistema matricial.....	40
Figura 5. Representação esquemática do sistema reservatório.	40
Figura 6. Fluxograma da síntese da hidroxiapatita.	46
Figura 7. Equipamento <i>HM-RJ/CF01</i> para produção das pastilhas dos compósitos. Fonte: Arquivo pessoal.	48
Figura 8. Esquema que resume os principais passos para obtenção e caracterização dos compósitos de PEG/HA com a adição da quercetina. Fonte: Arquivo pessoal.	50
Figura 9. Hidroxiapatita em pó, obtida por método úmido.	61
Figura 10. Pastilhas dos compósitos de polietilenoglicol e hidroxiapatita, sem quercetina. Fonte: Arquivo pessoal.	63
Figura 11. Pastilhas dos compósitos obtidos nas diferentes proporções de polietilenoglicol e hidroxiapatita com a presença da quercetina.	64
Figura 12. Difração de Raio-X dos compósitos constituídos por PEG/HA em suas diferentes proporções com quercetina incorporada (1 - 4), e da hidroxiapatita pura (5), atribuída como padrão de composto cristalino.	68
Figura 13. Espectro de EDS para a hidroxiapatita pura produzida neste trabalho. ...	69
Figura 14. Espectro de EDS dos compósitos mostrando a relação das massas dos átomos presentes no compósito. Fonte: Arquivo pessoal.	70
Figura 15. Ensaio de dureza para as diferentes pastilhas de PEG/HA/QUE.	72
Figura 16. Espectro de FTIR da hidroxiapatita sintetizada neste trabalho.	73
Figura 17. Espectro de FTIR do polietilenoglicol (Viafarma®).	74
Figura 18. Espectro de FTIR da quercetina (Sigma-Aldrich®).....	75
Figura 19. Espectro de FTIR do compósito PEG8/HA2/QUE.	77
Figura 20. Espectro de FTIR do compósito PEG6/HA4/QUE.	78
Figura 21. Espectro de FTIR do compósito PEG5/HA5/QUE.	79
Figura 22. Espectro de FTIR do compósito PEG4/HA6/QUE.	80
Figura 23. TG/DTA da hidroxiapatita produzida no laboratório.....	82

Figura 24. TG/DTA do polietilenoglicol.....	83
Figura 25. TG/DTA da quercetina.	84
Figura 26. TG/DTA do compósito PEG8/HA2/QUE.....	85
Figura 27. TG/DTA do compósito PEG6/HA4/QUE.....	86
Figura 28. TG/DTA do compósito PEG5/HA5/QUE.....	87
Figura 29. TG/DTA do compósito PEG4/HA6/QUE.....	88
Figura 30. Projeto do dissolutor <i>HM-RJ/CF01</i> utilizado no ensaio de liberação <i>In vitro</i> . (a) detalhamento dos componentes e dimensões, (b) detalhamento das engrenagens de rotação. Fonte: Arquivo pessoal.	90
Figura 31. Dissolutor <i>HM-RJ/CF01</i> : (a) perspectiva da parte frontal (destaque para as cubas de dissolução, interruptores e seringas de sucção e reposição); (b) visualização da parte posterior. Fonte: Arquivo pessoal.....	91
Figura 32. Dissolutor <i>HM-RJ/CF01</i> construído neste trabalho para o ensaio de liberação <i>In vitro</i> . Fonte: Arquivo pessoal.....	95
Figura 33. Laudo de validação do dissolutor <i>HM-RJ/CF01</i> utilizado no ensaio de liberação <i>in vitro</i> . Fonte: Arquivo pessoal.....	97
Figura 34. Cromatograma e espectro de UV da quercetina. Fonte: Arquivo pessoal.	99
Figura 35. a) Regressão linear da média dos dados da curva nos três dias de análise. b) Gráfico de resíduos. Fonte: Arquivo pessoal.	100
Figura 36. Cromatogramas da quercetina durante e após o validação do método. Fonte: Arquivo pessoal.	102
Figura 37. Perfil de liberação de todos os compósitos, em triplicata, depois de 4 horas de experimento. Fonte: Arquivo pessoal.	104
Figura 38. Eficiência de dissolução de todos os compósitos, em triplicata, depois de 4 horas de experimento. Fonte: Arquivo pessoal.	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Características químicas das apatitas naturais e sintéticas.	28
Quadro 2. Representação dos diferentes tipos de dissolutores.....	44
Quadro 3. Comparação entre a quantidade de solvente e a solubilidade.....	58
Quadro 4. Reagentes para preparação do <i>Simulated body fluid</i> (SBF - fluido corporal simulado). Fonte: (MARQUES, M.R.C., <i>et al.</i> , 2011).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eletrofotomicrografias da superfície das pastilhas dos compósitos constituídos por PEG/HA com quecetina (a esquerda) e sem quercetina (a direita). Fonte: Arquivo pessoal. -----	66
Tabela 2. Relação entre as quantidades e valores que foram investidos na construção do dissolutor utilizado neste trabalho (gastos com materiais e mão de obra). Fonte: Arquivo pessoal. -----	93
Tabela 3. Especificações da Farmacopeia brasileira, americana (USP) e do dissolutor produzido neste trabalho para algumas peças (aparato 2, com valores em mm). Fonte: (TECHNOLOGY, P., 2007) -----	96

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS e SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector com arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
DTA	Análise Térmica Diferencial
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva
F. Bras.	Farmacopeia Brasileira
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC	Inclinação da curva
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
m/m	Massa por massa
m/v	Massa por volume
PEG	Polietilenoglicol
p/V	Peso por volume
Q%	Porcentagem de fármaco liberado
QUE	Quercetina
RDX	Difração de raios-X
Rpm	Rotações por minuto
SBF	Fluído Corporal Simulado
T	Temperatura
T _{MÁX}	Tempo máximo
TG	Termogravimetria
UNIVASF	Univ. Fed. do Vale do São Francisco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DE NOVOS MATERIAIS COM FINALIDADES MÉDICAS	22
3.2. HIDROXIAPATITA E POLIETILENOGLICOL: EMPREGO NAS ÁREAS MÉDICAS	23
3.2.1. <i>Poli(et)ilenoglicol</i>	23
3.2.1.1. <i>Poli(et)ilenoglicol e liberação controlada de fármacos</i>	25
3.2.2. <i>Hidroxiapatita</i>	27
3.2.2.1. <i>Formas de obtenção da HA na forma de pó</i>	30
3.2.2.2. <i>Hidroxiapatita na liberação controlada de fármacos</i>	32
3.2.3. <i>Estruturas implantáveis utilizando polímeros à base de hidroxiapatita e poli(et)ilenoglicol</i>	34
3.3. PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO CÂNCER	345
3.3.1. <i>Polifenóis e sua ação antineoplásica</i>	36
3.3.2. <i>Quercetina</i>	37
3.4. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	39
3.5. ESTUDO DE DISSOLUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS, CONSTRUÇÕES E ESPECIFICAÇÕES DE APARELHOS DISSOLUTORES	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA (HA)	45
4.1.1. <i>Reagentes</i>	45
4.1.2. <i>Equipamentos</i>	45
4.1.3. <i>Acessórios</i>	45
4.1.4. <i>Procedimento Experimental</i>	45
4.2. OBTENÇÃO DO COMPÓSITO COMPOSTO POR HIDROXIAPATITA E POLIETILENOGLICOL	47
4.2.1. <i>Reagentes</i>	47
4.2.2. <i>Equipamentos</i>	47
4.2.3. <i>Acessórios</i>	47
4.3. OBTENÇÃO DOS COMPÓSITOS DE PEG/HA COM A ADIÇÃO DA QUERCETINA	48
4.3.1. <i>Reagentes</i>	48
4.3.2. <i>Equipamentos</i>	48
4.3.3. <i>Acessórios</i>	49
4.3.4. <i>Procedimento Experimental</i>	49
4.3.5. <i>Caracterização física dos compósitos</i>	50
4.4. CONSTRUÇÃO DO DISSOLUTOR <i>HM-RJ/CF01</i> PARA O ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	51
4.4.1. <i>Concepção do projeto</i>	51
4.4.2. <i>Projeto do sistema de dissolução HM-RJ/CF01</i>	51
4.4.3. <i>Obtenção das peças para montagem do dissolutor HM-RJ/CF01</i>	51
4.4.4. <i>Qualificação física do equipamento (qualificação física)</i>	52

4.4.5. Avaliação de desempenho (Qualificação química).....	52
4.5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA QUERCETINA NO MEIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	52
4.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA QUERCETINA NO MEIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	54
4.6.1. Parâmetros de validação	54
4.6.1.1. Especificidade e Seletividade	54
4.6.1.2. Linearidade	54
4.6.1.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	55
4.6.1.4. Exatidão.....	55
4.6.1.5. Precisão.....	56
4.7. ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DA QUERCETINA EM COMPÓSITO DE POLIETILENOGLICOL E HIDROXIAPATITA	56
4.7.1. Ensaios de liberação <i>In vitro</i>	56
4.7.1.1. Dissolução	57
4.7.1.2. Equipamentos	59
4.7.1.3. Acessórios	59
4.8. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA QUERCETINA POR CLAE-DAD	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1. SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA (HA).....	61
5.2. OBTENÇÃO DAS PASTILHAS DE COMPÓSITOS CONSTITUÍDOS POR DIFERENTES PROPORÇÕES DE POLIETILENOGLICOL E HIDROXIAPATITA (PEG/HA)	62
5.3. OBTENÇÃO DAS PASTILHAS DE COMPÓSITOS DE PEG/HA COM A ADIÇÃO DA QUERCETINA	64
5.3.1. Caracterização física dos compósitos.....	65
5.3.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	65
5.3.1.2. Difração de Raio-X (DRX).....	67
5.3.1.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	69
5.3.1.4. Testes de Dureza.....	71
5.3.1.5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	72
5.3.1.6. Termogravimetria (TG) associada à análise térmica diferencial (DTA).....	81
5.4. CONSTRUÇÃO DO DISSOLUTOR <i>HM-RJ/CF01</i> PARA O ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	89
5.4.1. Construção do Dissolutor.....	92
5.4.2. Qualificação do sistema de dissolução <i>HM-RJ/CF01</i>	97
5.4.2.1. Qualificação física do equipamento.....	97
5.4.2.2. Avaliação de desempenho (Qualificação química).....	98
5.5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA QUERCETINA NO MEIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	98
5.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DA QUERCETINA NO MEIO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	99
5.6.1. Especificidade e Seletividade	99
5.6.2. Linearidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) ...	100
5.6.3. Exatidão.....	101
5.6.4. Precisão.....	101
5.6.5. Considerações gerais sobre o método validado	102
5.7. ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DA QUERCETINA EM COMPÓSITO DE POLIETILENOGLICOL E HIDROXIAPATITA	103

5.7.1. <i>Ensaio de liberação In vitro</i>	103
6. CONCLUSÕES	107
7. PERSPECTIVAS	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos materiais vem sendo o foco de diversos estudos nas áreas médicas e de ciências de materiais, com o intuito de fornecer alternativas mais eficientes e menos onerosas para o tratamento de inúmeras enfermidades. Os materiais poliméricos orgânicos, inorgânicos ou suas combinações (compósitos), quando demonstram biocompatibilidade, são considerados biomateriais (NETO R. S, *et al.*, 2008). Os biomateriais atualmente ganham destaque por possuírem propriedades físicas e químicas que favorecem a incorporação de moléculas ativas em sua estrutura, fornecendo a elas uma estrutura de sustentação para sua liberação em meio, tempo e quantidades apropriadas, melhorando sua eficácia e reduzindo o risco de toxicidade (KIM, J.K., *et al.*, 2014). Uma proposta atual para o emprego de novos materiais é a produção de estruturas implantáveis, as quais já são utilizadas para o tratamento de enfermidades crônicas ou doenças degenerativas como câncer (SIEPMANN, J., *et al.*, 2006; WEINBERG, B.D., *et al.*, 2008). O tratamento do câncer normalmente é viabilizado por diferentes modos terapêuticos, que podem ser divididos em tratamento cirúrgico, radioterapia e tratamento clínico, o qual engloba a quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e uso de bloqueadores enzimáticos (GIACCHETTI, S., *et al.*, 1999; LEE C. PEDERSON, *et al.*, 1997; ROSENBERG, S.A., *et al.*, 1990). Nesse contexto, a quimioterapia é a modalidade terapêutica que possui maior incidência de cura de muitos tumores, incluindo os mais avançados, e a que mais aumenta a sobrevivência dos portadores de câncer (KELLER, J.H., *et al.*, 1982). Entretanto, apesar da eficácia dos quimioterápicos no tratamento das neoplasias, tais agentes são extremamente tóxicos a qualquer tecido, seja ele normal ou canceroso, provocando efeitos colaterais graves aos pacientes, o que diminui a qualidade de vida dos mesmos. A utilização de estruturas implantáveis para o tratamento de cânceres é uma alternativa que pode oferecer uma maior proximidade entre o fármaco e seu sítio de ação. Por outro lado, essas estruturas podem amenizar as limitações farmacocinéticas da substância ativa, que são mais contundentes, geralmente, quando a administração é realizada por via oral ou por outra via que possua um elevado nível de barreiras biológicas, dificultando o acesso do fármaco ao seu alvo molecular. Contudo, alguns estudos demonstram que existem técnicas implantáveis

promissoras para o tratamento de diversos tipos de neoplasias (NASONGKLA, N., 2009; WEINBERG, B.D., *et al.*, 2008).

Um composto natural promissor contra doenças neoplásicas e que pode ser associado a sistemas de liberação modificada implantáveis é a quercetina. A mesma faz parte da classe dos flavonoides e é um polifenol obtido originalmente do metabolismo especializado de plantas. Apresenta atividade biológica com elevado potencial anticâncer, especialmente, contra câncer de mama (DUO, J., *et al.*, 2012; LI, S.-Z., *et al.*, 2013; SCAMBIA, G., *et al.*, 1991). Entretanto, se enquadra no exemplo de substância que possui muitas limitações farmacocinéticas, com biodisponibilidade oral limitada, em decorrência do seu elevado metabolismo colônico e hepático e da sua baixa solubilidade aquosa (CAI, X., *et al.*, 2013; GOHLKE, A., *et al.*, 2013). Estes podem ser alguns dos motivos que limitam a produção de medicamentos a base de quercetina para o tratamento de neoplasias.

Os sistemas de liberação modificada de fármacos são muitas vezes constituídos por compósitos e de acordo com Dhanalakshmi (2012), a utilização destes materiais poliméricos compostos por polietilenoglicol (PEG) e hidroxiapatita (HA), pode ser uma alternativa para estes sistemas. Em seu estudo, ele produz misturas com diferentes proporções de PEG/HA e relata que os compósitos formados possuem características físicas que permitem a produção de estruturas semirrígidas para fins implantáveis, e que naturalmente poderão servir como matrizes para liberação modificada de fármacos (DHANALAKSHMI C. P, *et al.*, 2012).

A hidroxiapatita já foi utilizada em outros estudos como matriz de liberação modificada de diversas classes de fármacos (LEPRETRE, S., *et al.*, 2009; RIBEIRO, C.C., *et al.*, 2006; SANTOS, C., *et al.*, 2009; VENKATASUBBU, G.D., *et al.*, 2013; YAMAMURA, K., *et al.*, 1994; YANG, P., *et al.*, 2008) onde a mesma melhorou a biodisponibilidade, resposta terapêutica, conferiu uma maior eficácia, segurança e permitiu uma liberação prolongada de fármacos. Já o polietilenoglicol é relatado como atóxico, não-imunogênico e não antigênico, sendo também utilizado em sistemas de liberação (FENG, B., *et al.*, 2008; LE THI MAI HOA, *et al.*, 2009; PETER J. PHOTOS, *et al.*, 2003).

Uma fase relevante no desenvolvimento de compósitos é a análise física de sua estrutura, que fornece dados importantes para explicar parâmetros de estabilidade e composição. Estes dados podem ser obtidos por meio da observação

morfológica de sua superfície ou interstícios através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A presença de grupos funcionais químicos é analisada por meio da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR), mostrando as interações químicas que provavelmente foram estabelecidas entre o conjunto polímero/cerâmica presente nos compósitos e a substância incorporada. Dados de temperaturas e entalpias características de fusão, cristalização, transições polimórficas, reações, transição vítrea, decomposição, estabilidade térmica, compatibilidade entre componentes, distribuição do peso molecular, entre outros, podem ser obtidos através de análises térmicas como termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC/DTA) (DHANALAKSHMI C. P, *et al.*, 2012).

Até o presente momento não existem relatos na literatura sobre estudos que demonstrem o perfil de liberação da quercetina incorporada em compósito constituído pelo polímero polietilenoglicol e a cerâmica hidroxiapatita. Esta observação pode ser vantajosa pela união das características físicas e químicas de ambos, com o intuito de desenvolver um novo tipo de formulação para liberação modificada de substâncias, que pode possibilitar a introdução da quercetina definitivamente na terapêutica de neoplasias.

Uma forma comum de avaliar o perfil de liberação de fármacos é por meio de ensaios de dissolução, obtidos em aparelhos dissolutores, que são configurados de forma a mimetizar ao máximo o meio biológico no qual a formulação farmacêutica em desenvolvimento será exposta. Desta forma, o ensaio de dissolução caracteriza-se como uma ferramenta especialmente importante no desenvolvimento de novos medicamentos, identificação de variáveis críticas na produção, formulação, controle de qualidade, estabelecimento de correlações *In vitro/In vivo* (MANADAS R, *et al.*, 2002). Alguns laboratórios optam por utilizar os equipamentos dissolutores industrializados com sistemas de amostragem automatizados e acoplados a diferentes modos de detecção e análise. Contudo, a busca por inovação tecnológica e por modelos experimentais originais motivam cada vez mais a produção de equipamentos para realização de experimentos científicos. Por outro lado, as restrições orçamentárias podem ser um fator limitante para aquisição de equipamentos sofisticados para o laboratório de pesquisa. Sendo assim, equipamentos como dissolutores podem ser desenvolvidos de forma “artesanal” ou “caseira” na própria universidade, conhecidos mais apropriadamente como “HM-

RJ/CF01 equipment". Tal equipamento, depois de construído, deve passar por uma avaliação de desempenho de dissolução, conhecida como qualificação química, recomendado pela Federação Internacional de Farmácia (FIP) e de acordo com *Guidelines* de 1995, utilizando comprimidos calibradores da USP ("*Desintegrating*" - prednisona e "*Non-Desintegrating*" - ácido salicílico) (MOLLER, H., *et al.*, 1995; USP, 2000). Outro teste realizado é a qualificação física do equipamento, onde são avaliadas as especificações de dimensionamento, temperatura, volume do meio de dissolução, rotação do sistema de agitação do meio, bem como a técnica de amostragem (FARINHA, A., *et al.*, 1997).

O estudo do perfil de dissolução da quercetina incorporada em compósitos constituídos por PEG/HA, para fins implantáveis, é um passo no processo de desenvolvimento de um medicamento. Com este tipo de ensaio pode-se prever o comportamento *in vivo* da forma farmacêutica, bem como do seu perfil de liberação, corroborando para redução de custos e tempo envolvido, além de agregar uma maior confiabilidade relacionada à qualidade do produto em desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o perfil de dissolução da quercetina incorporada em compósito constituído pelo polímero polietilenoglicol e pela cerâmica hidroxiapatita.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a cerâmica hidroxiapatita a partir da rota úmida;
- Desenvolver o compósito constituído por hidroxiapatita e polietilenoglicol 4000 comercial;
- Incorporar a quercetina no compósito e produzir uma pastilha para fins implantáveis;
- Realizar a caracterização morfológica, física e química do compósito desenvolvido;
- Construir um equipamento dissolutor *HM-RJ/CF01* para avaliar o perfil de liberação da quercetina incorporada no compósito;
- Realizar a qualificação física e química do dissolutor *HM-RJ/CF01* construído;
- Desenvolver e validar a metodologia analítica para quantificar a quercetina no meio de dissolução;
- Determinar o perfil de liberação da quercetina no processo de dissolução.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Desenvolvimento científico e tecnológico de novos materiais com finalidades médicas

O desenvolvimento científico e tecnológico de novos materiais traz materiais poliméricos bem diversificados quando se leva em consideração às suas constituições, bem como, suas finalidades. Alguns biomateriais poliméricos são utilizados na sua forma pura, enquanto outros podem ser compósitos, com características distintas dos materiais que lhe deram origem, tornando-os versáteis para utilização nas áreas médicas. Atualmente existem biomateriais empregados na engenharia tecidual, a exemplo da regeneração ou substituição de cartilagem, músculos e ossos (CAO, Z., *et al.*, 2014; KEANE, T.J., *et al.*, 2014; VENKATESAN, J., *et al.*, 2014), implantes para liberação de fármacos, entre outros (ANDERSON, D.G., 2014).

No desenvolvimento de matrizes de liberação controlada de fármacos frequentemente emprega-se estruturas poliméricas de origem natural ou sintética. Os biomateriais utilizados nas formulações destas matrizes devem permitir o rastreamento do fármaco como também a determinação de sua rota no organismo, com base nos parâmetros de biodisponibilidade, estabilidade, toxicidade, facilidade de produção, etc. (KIM, J.K., *et al.*, 2014).

Estruturas poliméricas que se destacam na liberação controlada de fármacos são os hidrogéis, que possuem uma malha tridimensional, hidrofílica, que pode ser homopolimérica ou copolimérica e possuem uma elevada capacidade de absorver água ou fluidos biológicos. A hidroxiapatita e o polietilenoglicol são exemplos de materiais associados a outros polímeros para obtenção de hidrogéis de liberação controlada (KIM, J.K., *et al.*, 2014).

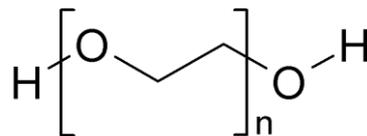
3.2. Hidroxiapatita e polietilenoglicol: emprego nas áreas médicas

3.2.1. Polietilenoglicol

O polietilenoglicol (PEG) é um poliéter diol linear, que possui um número médio de grupos oxietileno repetidos (**Figura 1**).

É muito utilizado em um grande número de aplicações na área farmacêutica humana e veterinária, sendo o mesmo considerado imunologicamente seguro, pois é eliminado do corpo intacto pelos rins (MOGHIMI, S.M., *et al.*, 2001).

Figura 1. Estrutura monomérica do polietilenoglicol.



Fonte: Arquivo pessoal.

Existem polietilenoglicóis em estados físicos sólidos e líquidos. No estado sólido, são substâncias de coloração branca, hidrofílicas, estáveis e não irritantes. No estado líquido possuem coloração que varia de transparente para levemente amarelado. Seu ponto de fusão aumenta conforme ocorre aumento da massa molecular. É um polímero não tóxico, não imunogênico, usado como uma das estratégias para superar desvantagens associadas a alguns produtos biofarmacêuticos (VERONESE, F.M., *et al.*, 2005).

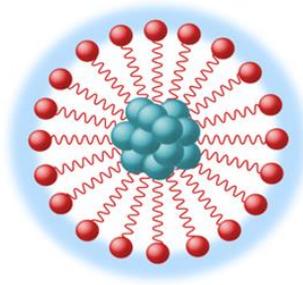
O PEG é utilizado na indústria farmacêutica nas mais variadas formas, como por exemplo, em preparações de uso parenteral, tópico, oftálmico, oral ou retal. Os que possuem alta massa molecular são utilizados em formulações de comprimidos como agregantes ou plastificantes (ROWE R. C, *et al.*, 2003). Rodriguez *et al.*, (2002) utilizaram o PEG 4000 como excipiente em formulações de comprimidos de diclofenaco. Ele foi escolhido como excipiente por suas características físico-químicas de hidrofiliidade e baixo ponto de fusão. O estudo mostrou que o PEG 4000 é um excipiente adequado para qualquer tipo de granulação aumentado a porcentagem de dissolução do diclofenaco (RODRIGUEZ, L., *et al.*, 2002).

Mais recentemente, foi identificado como um agente terapêutico por ter uma variedade de configurações experimentais e terapêutica veterinária, inclusive sua solução é muito utilizada no processo de preparação do cólon para exames de colonoscopia (BRAMBILLA E, *et al.*, 2008). Por ser quimicamente inerte e por apresentar poucos riscos ambientais, pode ser descartado sem tratamento prévio. Pode ser expelido pelo corpo sem ser metabolizado, e é comumente empregado em cosméticos e como carreador em produtos farmacêuticos (CHEN, J., *et al.*, 2005). É utilizado ainda como estrutura tecidual, a exemplo de cartilagens artificiais e estruturas biodegradáveis (NORIYUKI TAMAI, *et al.*, 2005; PAN, Y., *et al.*, 2009; WANG, M., *et al.*, 2008).

Em outro estudo recente, conduzido por Krok *et al.*, (2012), o PEG é misturado com poli(L-ácido-láctico-co-ácido glicólico)(PLGA) previamente dissolvido em cloreto de metileno. Neste estudo, os autores concluíram que as membranas produzidas com 60% de PEG têm propriedades mecânicas mais favoráveis para aplicações médicas. Concluíram ainda que o tamanho e a distribuição dos poros nas membranas dependem do peso molecular do PEG utilizado: Os compósitos constituídos com PEG de baixos pesos moleculares produziram membranas com uma distribuição mais homogênea dos poros, enquanto que os de maiores pesos moleculares resultaram em membranas com poros mais assimétricos. As membranas produzidas podem suportar o crescimento celular e são materiais promissores para aplicações biológicas (KROK, M., *et al.*, 2012).

Em formulações farmacêuticas com fármacos pouco solúveis o PEG pode agir como lubrificante. Esta ação não é comparada a do estearato de magnésio, porém, um pequeno efeito antiaderente pôde ser evidenciado (ROWE R. C, *et al.*, 2003). Além disso, o PEG tem sido amplamente estudado como solubilizante de fármacos pouco solúveis em água (KABANOV, A.V., *et al.*, 2002) e também é associado como precursor orgânico a polímeros inorgânicos formando sistemas de liberação controlada de fármacos. Essa associação vem de sua capacidade de formar micelas (estrutura globular formada por várias moléculas que possuem características polares e apolares simultaneamente, dispersos em um líquido constituindo um das fases de um colóide) (**Figura 2**). São capazes de se combinarem com o fármaco, melhorando sua solubilidade, estabilidade, permeabilidade além de controlar o processo de liberação (ALIABADI HM, *et al.*, 2006; KEANE, T.J., *et al.*, 2014; MULLEN, L.M., *et al.*, 2009).

Figura 2. Representação da micela incorporada com um fármaco.



Fonte: (BRITO D. H. A., *et al.*, 2012).

3.2.1.1. Polietilenoglicol e liberação controlada de fármacos

Wulff e colaboradores (1999) incorporaram indometacina, que possui ação analgésica, antirreumática e antipirética e griseofulvina, que age no combate contra micoses, ambos em dispersões sólidas de polietilenoglicol 6000. Neste estudo, eles prepararam diversas dispersões sólidas entre o polietilenoglicol e a indometacina com a adição de até 5% do fármaco, sendo as dispersões formadas na temperatura de 120 °C. Para a griseofulvina seguiu-se a mesma metodologia, mas a temperatura utilizada foi de 200 °C. Neste estudo eles concluem que ocorre a formação de complexos entre os fármacos e o polietilenoglicol (WULFF, M., *et al.*, 1999).

Catauro *et. al.*, (2014) utilizaram o polietilenoglicol na sua forma líquida (PEG 400), associado ao tetraetoxissilano em diferentes proporções de PEG para liberação controlada de indometacina. Os dados obtidos permitiram afirmar que a proporção de polietilenoglicol influenciou marcadamente a liberação do fármaco (CATAURO, M., *et al.*, 2014). O mesmo demonstra a viabilidade e a potencial utilização do polietilenoglicol em aplicações clínicas para o tratamento de neoplasias.

Em outro estudo conduzido por Jing *et. al.*, (2014), o PEG foi utilizado para incorporar paclitaxel, um fármaco com conhecida ação antineoplásica, mas que é pouco solúvel em água e potencialmente tóxico. Em seguida esse sistema foi misturado com solução lipídica comercial para liberação controlada do fármaco. Nesse estudo, o fármaco foi liberado de forma rápida nas primeiras 4 h, seguida de uma liberação lenta e sustentada (JING, X., *et al.*, 2014).

Em formulações fabricadas por compressão direta contendo mais que 5% de PEG verificou-se um aumento no tempo de desintegração de formulações de liberação controlada. Quando se utiliza granulações úmidas, é possível prolongar o tempo de desintegração utilizando o PEG 6000 com composição de 10 a 15% em massa. (LLOYD, G.R., *et al.*, 1999; ROWE R. C, *et al.*, 2003).

Em formulações úmidas, pode-se prolongar o tempo de desintegração utilizando-se o PEG 6000 de 10 a 15%. Para fármacos pouco solúveis em água, utilizam-se os polietilenoglicóis para aumentar a solubilidade dos mesmos por meio de dispersões sólidas (LLOYD, G.R., *et al.*, 1999; ROWE R. C, *et al.*, 2003).

Lloyd e colaboradores (1999) relataram que o PEG 4000 aumenta a solubilidade do paracetamol tanto em misturas simples como em dispersões sólidas, aumentando os níveis de liberação do mesmo (LLOYD, G.R., *et al.*, 1999).

No trabalho proposto por Mojica *et al.*, (2014) o polietilenoglicol e o dextrano foram revestidos com nanopartículas de óxido de ferro paramagnético. Neste trabalho o dextrano é inicialmente associado ao PEG e em seguida os mesmos são encapsulados pelas nanopartículas de óxido de ferro. Os autores relatam que esse sistema possui alta viabilidade celular além da capacidade de liberação controlada do fármaco (MOJICA PISCIOTTI, M.L., *et al.*, 2014).

Jones *et al.*, McCoy e Colin (2011) relataram a utilização do fármaco rifampicina contendo policaprolactona (PCL) em redes de polietilenoglicol. Nesse estudo, matrizes de PCL contendo rifampicina (entre 1 e 5% m/m) e PEG (entre 0 e 15% m/m) foram preparadas por fundição a partir de um solvente orgânico (diclorometano). Os autores concluíram que a incorporação de PEG afetou significativamente as propriedades de tração e de superfície de PCL, diminuindo a resistência à tração, a porcentagem de alongamento na ruptura, o módulo de elasticidade e módulos de armazenamento e de perda (JONES, D.S., *et al.*, 2011).

O PEG também é muito utilizado na modificação química de biomoléculas, processo chamado de PEGilação, que pode ser definida como a modificação química de uma biomolécula por meio de ligação covalente a uma ou mais cadeias de polímero (VERONESE, F.M., *et al.*, 2005).

Os estudos com o PEG demonstram que este polímero apresenta um elevado potencial no desenvolvimento de novas formulações de medicamentos de liberação controlada, tornando-se um elemento importante neste tipo de desenvolvimento tecnológico.

3.2.2. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é um constituinte natural dos ossos e dentes, variando entre 30% e 70% de sua massa total. Dependendo de sua pureza, ela pode suportar aquecimentos superiores a 1.200 graus Celsius, sem se decompor. Além disso, pode ser modelada como a maioria dos materiais cerâmicos. Suas propriedades químicas podem ser modificadas através do método de preparação. Para implantes ósseos ou dentários, duráveis por muitos anos, utiliza-se um material pouco solúvel, constituído por hidroxiapatita pura totalmente sinterizada (MISCH., C.E., 2000).

Quando se deseja que o implante seja reabsorvido pelo corpo, cedendo lugar ao tecido ósseo novo, usa-se uma cerâmica mais solúvel, geralmente constituída por uma mistura de hidroxiapatita com outros fosfatos (NAKAZAWA, T., 1989).

Segundo Eanes (1980), a hidroxiapatita sintética possui propriedades de biocompatibilidade, onde a mesma serve como suporte para o crescimento do novo osso, dentro de seus poros, a partir de defeitos, e de osteointegração, o que a torna um substituto em potencial para implantes ósseos e próteses. A mesma também possui a capacidade de absorver/adsorver moléculas em sua estrutura, sendo dessa forma utilizada como suporte no tratamento do câncer, pois atua na liberação de fármacos anticancerígenos (EANES, E.D., 1980.).

Outra característica da HA é sua capacidade de adsorção, ou seja, de fixar em sua superfície moléculas de outra substância. Essa propriedade faz com que ela possa ser usada em implantes, como suporte para antibióticos e fármacos anticancerígenos, no tratamento prolongado de infecções e doenças ósseas (neste último caso, liberando aos poucos a medicação necessária na região afetada). Pode ainda ser utilizada como removedora de metais e complexos como chumbo (Pb^{2+}), cádmio (Cd^{2+}), cobre (Cu^{2+}), zinco (Zn^{2+}), estrôncio (Sr^{2+}), cobalto (Co^{2+}), ferro (Fe^{2+}), flúor (F^-), cloro (Cl^-), bem como grupos carbonatos (CO_3^{2-}) e vanadatos (VO_4^{3-}) (MAVROPOULOS, E., 1999).

A hidroxiapatita raramente é encontrada na natureza, porém, sua estrutura é semelhante a da fluorapatita (LOGAN T. J., *et al.*, 1995). Esses minerais são constituintes de rochas ígneas e metamórficas (ELLIOTT, J.C., 1994).

A fórmula molecular da hidroxiapatita estequiométrica é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, com razão estequiométrica entre Ca/P igual a aproximadamente 1,67. A hidroxiapatita

sintetizada por via úmida possui características semelhantes as dos tecidos ósseos e dentário, diferente da hidroxiapatita que é sintetizada em altas temperaturas, que é menos porosa (ELLIOTT, J.C., 1994).

A HA desperta um imenso interesse biológico, já que o principal constituinte mineral de ossos e dentes são nanocristais de hidroxiapatita de cálcio. Sua composição química pode conter desde metais alcalinos e alcalinos terrosos como sódio, potássio e magnésio até metais de transição como zinco e íons como o carbonato CO_3^{2-} , como pode ser visto no **Quadro 1** (KOHN, M.J., 2002).

Quadro 1. Características químicas das apatitas naturais e sintéticas.

Constituintes (p/p%)	OSSOS	HIDROXIAPATITA
Cálcio	24,5	39,6
Fósforo	11,5	18,5
Razão Ca/P	1,65	1,67
Carbonato	5,8	-
Sódio	0,7	-
Magnésio	0,55	-
Cloro	0,1	-
Potássio	0,03	-
Flúor	0,02	-
Elementos (Traços)	-	-
Estrôncio	0,02	-
Bário	0,1	-
Chumbo	0,08	-
Ferro	0,1	-
Zinco	0,04	-
Cobre	0,1	-
Silício	0,05	-

Fonte: (KOHN, M.J., 2002)

Ainda de acordo com o **Quadro 1**, a habilidade da HA de aceitar íons distintos em sua estrutura e em sua superfície é muito explorada. A HA porosa é aplicada em muitos procedimentos como preenchimento de ossos defeituosos, reconstrução facial, implantes orbitais nos olhos, cirurgias nas mãos e sistemas de liberação de fármacos. Algumas propriedades como solubilidade, tamanho e distribuição dos poros são importantes aspectos para promover a osteocondução e/ou condução de fluídos (KOHN, M.J., 2002).

Outro fator importante para um biomaterial é a sua biodegradação. A HA leva em torno de 4 ou 5 anos para ser absorvida após o implante. De maneira geral, as biocerâmicas de fosfato de cálcio se degradam com a seguinte velocidade: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HENCH, L.L., 1991). A absorção da HA é causada pela dissolução, que depende do produto de solubilidade do material, do pH do local do implante, da desintegração das partículas como também de fatores biológicos, como a fagocitose, a presença de leucócitos, e de mediadores químicos, que por sua vez, causam a redução do pH local e a porosidade do material, sendo que a velocidade de absorção da HA pode aumentar em função do aumento da área superficial (HA/pó > HA/porosa > HA/sólida) (NARASARAJU T. S. B, *et al.*, 1996).

A cinética de decomposição da hidroxiapatita ligeiramente não-estequiométrica numa temperatura que simula o corpo humano (cerca de 37 °C) obedece a uma reação de primeira ordem (NARASARAJU T. S. B, *et al.*, 1996).

Várias técnicas são utilizadas na síntese da HA. Uma das mais utilizadas é a precipitação por via úmida (utilizada neste trabalho). Esta técnica envolve reações entre os precursores de cálcio e fósforo com constante controle do pH da solução. O pó é seco para obter uma estrutura de hidroxiapatita estequiométrica. A precipitação rápida durante a titulação da solução de fosfato em solução de cálcio pode levar a falta de homogeneidade química no produto final. A titulação lenta e as soluções diluídas devem ser utilizadas para melhorar a homogeneidade química e estequiométrica da HA resultante. O cuidadoso controle das condições da solução é crítico na precipitação via úmida. Caso contrário, uma diminuição do pH da solução abaixo de 9 pode conduzir à formação da estrutura da HA deficiente em íons de Ca (SANTOS, M.L., *et al.*, 2005).

Outro meio importante utilizado na obtenção da HA é a rota *sol-gel*. O termo *sol* designa dispersões com partículas com dimensões entre 1 e 100 nm, estáveis

em um fluido. O termo *gel* define um sistema formado por uma estrutura tridimensional de partículas coloidais e de cadeias poliméricas que imobiliza o solvente formando um sistema intermediário entre um sólido e um líquido. Em suma, o *gel* é formado quando uma substância muito pouco solúvel é rapidamente precipitada (SANTOS, M.L., *et al.*, 2005).

Essa formação do *gel* é devida a precipitação incompleta de um *sol* e em sua formação e as partículas coloidais do *sol* se unem formando fibras que se entrelaçam formando um sólido muito poroso, sendo que nesse processo pode ocorrer a solvatação das partículas (SANTOS, M.L., *et al.*, 2005).

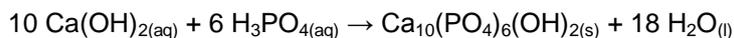
A escolha dos reagentes e solventes comuns para a obtenção do *sol* deve sempre seguir a regra de se utilizar reagentes mais reativos, que geralmente são alcóxidos dos respectivos cátions e ânions que devem compor a fase inorgânica final desejada. Neste caso, os reagentes mais indicados são o ácido fosfórico e o nitrato de cálcio que são solúveis em álcoois e água, minimizando alguns problemas como a elevada volatilidade e baixa reatividade dos reagentes (SANTOS, M.L., *et al.*, 2005).

A HA pode ainda ser obtida pela desproteinização do tecido ósseo (PARK, J., 1984), por tratamento hidrotérmico de corais (WHITE, E., *et al.*, 1986), pela precipitação das soluções aquosas (OSAKA, A., *et al.*, 1991) ou reações no estado sólido (VIDEAU, J.J.D., V., 1991).

3.2.2.1 Formas de obtenção da HA na forma de pó

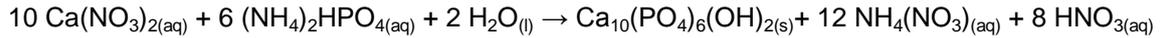
Método Via Úmida

- **Reação ácido-base:**



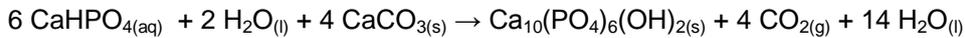
- **Reações entre sais de fosfato:**





O produto é um pó de partículas pequenas (<10 µm).

Métodos Via Seca



O produto é um pó de alta cristalinidade, obtido por volta de 900°C.

- **Método Hidrotermal**

Esse método é idêntico à via úmida, só que ocorre em pressões e temperaturas elevadas. O produto formado é um pó nanométrico ou milimétrico, sendo possível a obtenção de materiais com porosidade similar à hidroxiapatita obtida de corais. A partir dos diferentes pós é possível a obtenção de diversas morfologias e formatos de materiais, de denso até materiais extremamente porosos, os quais incluem técnicas de processamentos cerâmicos tradicionais e avançadas como: prensagem, colagem de barbotina, *gelcasting*, injeção, *tape-casting*, *sol-gel*, etc. (AOKI, H., 1991).

Alguns estudos demonstram que os nanocristais de apatita, que são muito semelhantes à fase mineral da matriz óssea, fornecem um ambiente adequado para as células migrarem e se fixarem, produzindo um novo osso. Vários estudos enfatizam que a formação dessa camada de apatita é imprescindível para a bioatividade *in vivo* (FUJIBAYASHI, S., *et al.*, 2003). Após o processo de implantação da HA, a sequência de mudanças passa pela neovascularização, diferenciação de células osteoprogenitoras, formação do novo osso e também o remodelamento ósseo (WALSH, W.R., *et al.*, 2003).

Existem muitas semelhanças entre a HA e a matriz óssea natural, sendo elas química, física e estrutural. Sua estrutura possui poros e os mesmos funcionam como suporte para migração e deposição de células osteogênicas, o que permite a formação do novo osso (OLIVEIRA, P.M., 2005).

O contato estabelecido com o tecido ósseo se forma entre os grânulos e no interior dos poros em sua estrutura, assim, a HA é incorporada ao tecido ósseo em

formação (BORGES, A.P.B., *et al.*, 2000; GALEGO, N., *et al.*, 2000; TAMPIERI, A., *et al.*, 2001). Acredita-se que o tamanho ideal dos poros para permitir a migração de células osteoprogenitoras esteja entre 150 e 500 μm (TAMPIERI, A., *et al.*, 2001).

A degradação da hidroxiapatita é mais uma de suas vantagens, pois envolve um processo semelhante à degradação natural do tecido ósseo, por osteoclastos, o que sugere a possibilidade da completa degradação durante o remodelamento do osso, o que é ideal. Foi observado ainda que esse processo ocorre mais rapidamente quando o contato ocorre com o osso (BORGES, A.P.B., *et al.*, 2000).

Por possuir semelhança química com os dentes, Nikpour e colaboradores (2012) sintetizaram um compósito formado por quitosana e hidroxiapatita, onde o mesmo foi preparado *in situ*. Os testes de compressão mecânica indicaram que os compósitos sintetizados têm comportamento mecânico aceitável para substituição do tecido (NIKPOUR, M.R., *et al.*, 2012).

3.2.2.2. Hidroxiapatita na liberação controlada de fármacos

A hidroxiapatita pode ser utilizada pura, porém, tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento e na preparação de compósitos para liberação controlada de fármacos. Ela pode ser combinada com soluções de colágeno (DU, C., *et al.*, 1998) com membranas (RHEE, S.H., *et al.*, 1998) ou com filmes de gelatina (BIGI, A., *et al.*, 1998). Sua vasta utilização deve-se à sua similaridade com o tecido calcificado do osso humano.

Uma desvantagem que limitaria seu uso como biomaterial é o fato de apresentar a fragilidade característica das cerâmicas (METSGER, D.S., *et al.*, 1999), que pode ser explicado por não possui coesão e nem resistência mecânica suficiente para ser utilizada na fabricação de implantes. É um material rígido e com pouca elasticidade, o que o torna frágil e limita sua utilização em locais que requeiram sustentação de peso (SHISHATSKAYA, E.I., 2005).

Visando minimizar as deficiências mecânicas da HA, ou seja, aumentar sua elasticidade, diminuir sua rigidez e promover a coesão entre as partículas, costuma-se associá-la a polímeros (BOLBASOV, E.N., *et al.*, 2014).

A associação da hidroxiapatita com fibrina é um exemplo claro da utilização do biomaterial carreador de fator proteico de crescimento e fator-1 de crescimento de fibroblasto, os quais melhoraram a resposta celular no processo de angiogênese

e osteogênese (GEER, D.J., *et al.*, 2005). Outra composição relatada são as micropartículas de hidroxiapatita com mesoporos magnéticos carbonatados. Estas foram desenvolvidas com a perspectiva de minimizar sérios problemas relacionados com implantes na cirurgia ortopédica. Os estudos realizados por meio de ensaios celulares *in vitro* indicam que as estruturas microparticuladas de hidroxiapatita promovem a adesão e proliferação de células estromais da medula óssea humana e estimula a diferenciação osteogênica, além de possuírem excelente biocompatibilidade, osteoindutividade, liberação controlada de fármaco e propriedade bactericida (GUO, Y.-P., *et al.*, 2014).

Barroug e colaboradores (2002) utilizaram cristais de hidroxiapatita associada ao fármaco cisplatina para liberação controlada do mesmo. Os autores relatam que ocorre um aumento da quantidade de cisplatina ligada a hidroxiapatita conforme aumenta a concentração de cloretos no equilíbrio reativo. A taxa de liberação de cisplatina é relativamente lenta, aproximadamente 33% do total de cisplatina ligada aos cristais de hidroxiapatita foi liberada após 4,35 dias (BARROUG, A., *et al.*, 2002).

Outro trabalho conduzido por Netz *et al.*, (2001), que relata a produção da HA pelo método *gelcasting* se baseia na introdução de monômeros orgânicos a uma suspensão aquosa do pó cerâmico, que através da polimerização *in situ* produzem um reticulado tri-dimensional que consolida a matriz cerâmica para sistemas implantáveis de liberação de fármacos. Nesse estudo utilizou-se cisplatina como fármaco, sendo a mesma intercalada na rede porosa da hidroxiapatita. De acordo com os autores, as amostras com maior porosidade apresentaram uma forma estrutural irregular, que pode interferir com a liberação do fármaco. Dessa forma, os mesmos sugerem que a hidroxiapatita porosa seria útil como sistema de liberação de fármacos apenas para matrizes com porosidades abaixo de 78,29% (NETZ, D.J.A., *et al.*, 2001).

Um estudo realizado por Ogawa *et al.*, (2001) relata a utilização da hidroxiapatita associada ao colágeno para liberação do antibiótico ciprofloxacino. Neste estudo os autores relatam que a melhor proporção HA e colágeno foi de 10:1 (m/m), respectivamente. Os resultados mostram que a associação entre hidroxiapatita e colágeno foi satisfatória e enfatizam que a vantagem deste tipo de liberação é que pode-se impedir uma concentração muito baixa do medicamento no sítio de ação no início do tratamento de uma infecção, evitando efeito terapêutico ineficiente e até

mesmo uma possível resistência bacteriana ao antibiótico (OGAWA C. A, *et al.*, 2001).

Wang *et al.*, (2010) relatam a utilização de microesferas de hidroxiapatita para liberação de cloridrato de doxiciclina, fármaco utilizado como modelo. Neste trabalho, pastilhas de HA foram mergulhadas em uma solução supersaturada de cloridrato de doxiciclina para a incorporação do mesmo. O perfil de liberação do fármaco nas microesferas mostrou uma liberação lenta e constante, que durou por pelo menos 7 dias e sem uma liberação “inicialmente explosiva” (WANG, S., *et al.*, 2010).

Nos estudos de revisão da literatura, até o presente momento, foram observados artigos que relatam a associação entre PEG e a HA, porém, não foi evidenciada nos mesmos a expressa utilização dos compósitos para liberação modificada de fármacos com a exceção do trabalho de Venkatasubbu *et al.*, (2013). No mesmo eles utilizaram nanopartículas do compósito constituído por hidroxiapatita e polietilenoglicol para a liberação controlada de paclitaxel. Neste estudo, os autores concluem que existe interação entre o fármaco utilizado e o polietilenoglicol com uma rápida liberação do mesmo seguido de uma liberação sustentada (VENKATASUBBU, G.D., *et al.*, 2013).

3.2.3. Estruturas implantáveis utilizando polímeros à base de hidroxiapatita e polietilenoglicol

Como mencionado anteriormente, apesar de existirem inúmeros estudos de liberação controlada de fármacos utilizando hidroxiapatita ou polietilenoglicol associados a outros polímeros, há apenas um único relato, até o presente momento, da associação de ambos na liberação de fármacos, realizado por Venkatasubbu *et al.*, (2013), porém, o mesmo não envolve a produção de uma estrutura rígida implantável.

3.3. Produtos Naturais no tratamento do câncer

O emprego de plantas medicinais como matrizes para produtos terapêuticos acompanha a história da humanidade desde a antiguidade. A busca por alívio e cura

de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos naturais (VIEGAS C., *et al.*, 2005). Além disso, cerca de 25% das drogas prescritas no mundo são de origem vegetal. Entre 2001 e 2002 quase um quarto dos fármacos mais vendidos no mundo eram obtidos diretamente ou derivados de fontes naturais (BALUNAS, M.J., *et al.*, 2005). Cerca de 30% das novas substâncias químicas descobertas entre os anos de 1981 e 2002 são produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN, D.J., *et al.*, 2003) e mais de 60% dos fármacos anticâncer introduzidos na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (NEWMAN, D.J., *et al.*, 2007).

A primeira substância natural utilizada no combate ao câncer foi encontrada por Farber em 1954, que utilizou um antibiótico, a Actinomicina D, extraída de uma espécie de *Streptomyces*, no tratamento de um paciente com câncer. A partir daí surgiram diversas pesquisas na área e muitas substâncias foram encontradas e utilizadas (COSTA-LOTUFO, L.V., 2010).

Tendo em vista as dificuldades de tratamento contra o câncer devido a diversos efeitos colaterais provenientes dos tratamentos já existentes, percebe-se ainda mais o valor da pesquisa na área buscando medicamentos com maior eficácia (COSTA-LOTUFO, L.V., 2010). Os agentes supressores do câncer são os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença (BRANDÃO A., 2010).

Vários fatores têm aumentado extensivamente a síntese de novos fármacos de origem vegetal e a corrida na descoberta de fármacos eficazes no tratamento contra o câncer foi um dos principais (CARVALHO M. B., 2001). No campo da oncologia, diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica foram sintetizadas. Dentre estes se destacam a vimblastina (Velban[®]) e a vincristina (Oncovin[®]) e os análogos vindesina (Eldisine[®]) e vinorelbina (Navelbine[®]); o paclitaxel (Taxol[®]) e o análogo docetaxel (Taxotere[®]); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos[®]) e teniposídeo (Vumon[®]); e a camptotecina e os análogos. Estes medicamentos movimentam anualmente em torno de 60 bilhões de dólares (PINTO, A.C., *et al.*, 2002).

A descoberta de substâncias naturais com potente atividade anticancerígena renovou o interesse das indústrias pelos medicamentos de origem vegetal, dois exemplos disso são a vimblastina e a vincristina.

O atual interesse na busca de novos agentes antimitóticos, por exemplo, é consequência de sua importância para o tratamento de diferentes formas de tumores malignos. Alguns fármacos em uso corrente na terapia do câncer foram descobertos de forma racional, baseada no desenho da estrutura, porém, a grande maioria foi descoberta por processos empíricos. Hoje existem mais de uma centena de fármacos ativos no tratamento do câncer, muitos dos quais obtidos em programas de bioprospecção. Uma proporção importante dos fármacos antitumorais atualmente utilizados em clínicas foi obtida a partir de produtos naturais. É importante ressaltar que as plantas têm uma longa história de uso no tratamento do câncer (HARTWELL., J.L., 1982). Embora muitas das suposições quanto à eficácia possam ser vistas com certo ceticismo porque o câncer, como uma doença específica, é pouco definido em termos de medicina tradicional (CRAGG G. M., *et al.*, 1994).

3.3.1. Polifenóis e sua ação antineoplásica

Plantas da medicina tradicional chinesa que apresentam propriedades anticâncer contêm uma grande variedade de compostos fenólicos naturais com diferentes estruturas e com variável atividade antioxidante. Estas diferenças nas atividades antioxidantes podem ser atribuídas a diferenças estruturais quanto à hidroxilações, glicosilações e metoxilações (CAI, Y.-Z., *et al.*, 2006).

Alguns estudos com chá verde sugerem a relação das propriedades antioxidantes das catequinas e seu efeito contra o câncer, principalmente nos estágios de iniciação e promoção da carcinogênese. Estes estudos demonstram que a administração do chá verde confere proteção à indução do câncer devido à presença de componentes fenólicos no mesmo (MUKHTAR, H., *et al.*, 1994).

A aplicação tópica dos polifenóis resulta na proteção ao desenvolvimento de tumores e sua promoção (WEIJL, N.I., *et al.*, 1997). A alimentação oral crônica rica em polifenóis do chá verde fornece proteção também aos tumores induzidos por radiação UVB, e assim, sugere que o chá verde poderia atuar na quimioproteção aos estágios da carcinogênese e na resposta inflamatória devido à exposição solar (KUZUHARA, T., *et al.*, 2006; MORLEY, N., *et al.*, 2005; MUKHTAR, H., *et al.*, 1994).

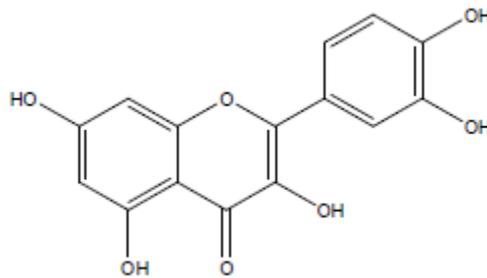
Dentre os vários exemplos citados anteriormente, destaca-se a quercetina, que é um conhecido antineoplásico, mas que não possui nenhum tipo de medicamento associado à sua estrutura por via oral, pois sua baixa solubilidade

aquosa é um fator que limita sua administração e/ou absorção (WITTIG, J., *et al.*, 2001).

3.3.2. Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7 pentahidroxi flavona – Figura 3.3) é um polifenol pertencente a classe dos flavonoides encontrados numa grande variedade de frutas, vegetais e bebidas, dentre eles pode-se destacar a cebola, maçã e vinho tinto (LAMSON D, *et al.*, 2000). Ela está envolvida em uma série de ações farmacológicas e, por isto, tem sido objeto de estudos químicos e biológicos. Ela também pode ser encontrada sob a forma aglicona ou glicosídica (**Figura 3**) (HERTOG, M.G.L., *et al.*, 1993).

Figura 3. (a) Estrutura química da quercetina aglicona.



Fonte: (HERTOG, M.G.L., *et al.*, 1993).

É o flavonoide mais abundante na dieta humana. Várias de suas propriedades têm sido estudadas nas últimas décadas, destacando-se seu potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático (BEHLING, E.B., *et al.*, 2004).

Uma proposta de terapia complementar recomendada para pacientes oncológicos é o uso desses antioxidantes. Os mesmos podem ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia por reduzir sua toxicidade (WEIJ, N.I., *et al.*, 1997). Eles podem ser uma boa escolha na intervenção terapêutica junto à quimioterapia por auxiliar na redução do tamanho do tumor e no aumento da longevidade dos pacientes.

Quercetina é um antioxidante dietético que exerce uma significativa atividade anti-tumoral, anti-alérgica e anti-inflamatória. É eficaz no tratamento contra o câncer de colo do útero, mama, pulmão e de desempenhar um papel anti-metastático no câncer de próstata (XING N., *et al.*, 2001).

A quercetina, por regular o ciclo celular, interagir com os locais de ligação do estrogênio tipo II, diminuir a resistência às drogas e induzir a apoptose de células tumorais, pode tornar-se um potente composto antitumoral. (BEHLING, E.B., *et al.*, 2004).

Sob o ponto de vista farmacológico, atribui-se várias ações biológicas à quercetina, tais como anti-inflamatória (WILLIAMS, S.D., *et al.*, 1987), espasmo lítica, antimicrobiana para alguns tipos de bactérias gram-positivas e gram-negativas, antiviral, entre outras (OLIVEIRA, R.B.L., E.M. , 2006).

Essas ações são produzidas tanto pela substância isolada quanto quando contida em extrativos vegetais. Neste caso, dependendo dos parâmetros de transformação ou do produto obtido, há variação da intensidade do efeito.

Em um extenso número de estudos *In vitro* a quercetina foi caracterizada com um potente antioxidante com capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, oxigênio singleto e radicais de diferentes origens. Um estudo de relação estrutura-atividade identificou os elementos na estrutura dos flavonoides que contribuem para a sua atividade antioxidante. Ela possui todos esses elementos na sua estrutura, os quais incluem a dupla ligação C2=C3, o grupamento cetona em C4, o grupo hidroxil em C3 e a estrutura orto-difenólica no anel B (RICE-EVANS, C.A., *et al.*, 1996).

As rotas metabólicas utilizadas pela quercetina são motivos de controvérsia e geram vários estudos. (HOU, Y.C., *et al.*, 2003) realizaram avaliação das diferenças farmacocinéticas entre a quercetina e a morina em ratos. Os autores encontraram no plasma metabólitos glicuronados e sulfatados para a quercetina, o que indica uma biodisponibilidade baixa para esta substância. Foi demonstrado também que a quercetina possui uma farmacocinética linear. O estudo propõe que a diferença entre os comportamentos farmacocinéticos entre os dois flavonoides deve-se ao padrão de hidroxilação no anel B.

A quercetina presente nas plantas, frutas e legumes encontra-se em grande parte, na forma hidrofílica glicosídica (QU-Glic), que não é absorvida diretamente com facilidade (WITTIG, J., *et al.*, 2001).

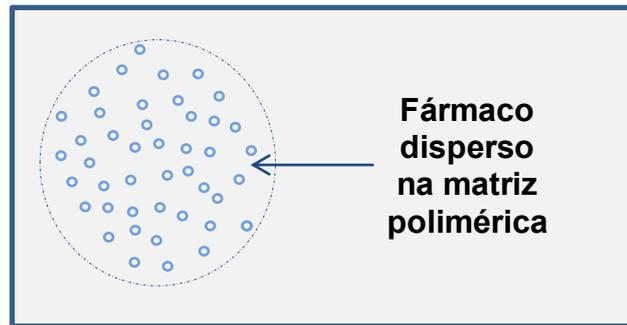
A ligação glicosídica é hidrolisada pela enzima β -glicosidase, encontrada no fígado, nos rins, e no intestino. Esta enzima possui alta afinidade por glicosídeos de flavonoides e isoflavonóides quando a glicose está ligada ao carbono nas posições 7 ou 4'. Porém, flavonoides 3'-glicosídicos não são substratos para a enzima, possivelmente devido ao impedimento estérico. O maior obstáculo para o tratamento com a quercetina, por via oral, está relacionado à sua baixa biodisponibilidade, sendo a proposta deste trabalho incorporá-la a uma matriz composta por um polímero (polietilenoglicol) e uma cerâmica (hidroxiapatita).

3.4. Estudos de liberação controlada de fármacos

Os biomateriais que se destacam na terapêutica de doenças crônicas e degenerativas, são as formas implantáveis, com a finalidade de liberação modificada de fármacos. As formulações com biomateriais possuem objetivos singulares no melhoramento do *design*, forma de dosagem, alterando os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos de um determinado fármaco, contribuindo para melhoria da sua eficácia e segurança. No desenvolvimento destas estruturas implantáveis, pode-se usar ou misturar matrizes poliméricas naturais ou sintéticas, controlando fatores importantes no desenvolvimento como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, porosidade, carga, resistência mecânica e hidrofobicidade/hidrofilicidade (FATTAHI, P., *et al.*, 2014).

Existem diversos tipos de sistemas (dispositivos) de liberação controlada de fármacos, dentre eles, destacam-se os sistemas matriciais e reservatório. No sistema matricial o fármaco está molecularmente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica resistente à desintegração onde o mesmo é formado por cadeias de uma ou mais substâncias químicas polimerizadas, que funcionam como agentes moduladores da liberação. Quando em contato com o meio biológico, o fármaco dissolve-se e difunde-se para o exterior a partir das camadas superficiais da matriz. Esse processo é contínuo e progride lentamente para o interior da matriz polimérica (**Figura 4**) (LOPES, C., *et al.*, 2000).

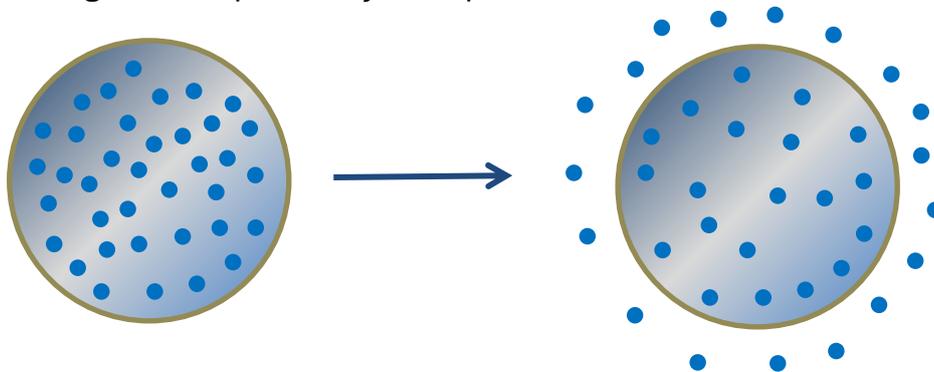
Figura 4. Representação esquemática do sistema matricial.



Fonte: (LOPES, C., *et al.*, 2000)

Os sistemas do tipo reservatório (**Figura 5**) são dispositivos em que o fármaco (no estado sólido ou líquido) encontra-se em um núcleo isolado do meio externo por uma capa ou membrana, geralmente polimérica. Neste tipo de dispositivo, a concentração de saturação do fármaco no interior do dispositivo é essencial para manter um gradiente de concentração constante por meio da membrana. O mecanismo de transporte do fármaco pela membrana é controlado por difusão e depende de alguns fatores: Solubilidade do fármaco, afinidade química entre o fármaco e a matriz polimérica, do caráter hidrofílico da matriz polimérica como também da estrutura e da porosidade da matriz polimérica.

Figura 5. Representação esquemática do sistema reservatório.



Fonte: (LOPES, C., *et al.*, 2000).

O fármaco contido nestes sistemas é liberado através de 4 mecanismos principais: difusão, erosão, expansão e osmose, onde comumente um medicamento ou dispositivo apresenta mais de um tipo de mecanismo de liberação. A

classificação do sistema de liberação controlada de fármacos segundo o mecanismo de liberação é feita tomando-se por base o mecanismo principal de liberação (RATNER, B.D., *et al.*, 1996).

Um medicamento age por difusão quando este fenômeno representa uma etapa decisiva na liberação do fármaco. O principal dispositivo que utiliza este fenômeno como controlador da liberação do fármaco é do tipo reservatório, onde é possível identificar um núcleo diferenciado que pode ser um fármaco sólido, uma solução diluída, ou altamente concentrada dentro de uma matriz. Neste tipo de sistema a taxa de liberação é constante se houver uma concentração constante do fármaco no interior do reservatório (SOUZA, A., 2006).

Já na erosão, a matriz polimérica utilizada desempenha um papel relativamente passivo, tendo a função de carrear e retardar a velocidade com a qual o fármaco é distribuído para o alvo. Alguns dispositivos são elaborados para desempenhar um papel um pouco mais ativo no processo de liberação. Tais materiais se desgastam quando sofrem reações químicas, libertando o fármaco para a distribuição no alvo. A liberação de fármaco destes sistemas é principalmente governada pela cinética de degradação da ligação, sendo, portanto, específica para cada sistema (SOUZA, A., 2006).

Os sistemas tipo expansão são sistemas matriciais onde o fármaco se encontra dissolvido ou disperso em um suporte polimérico hidrofílico, com ou sem ligações cruzadas, o qual se expande sem se dissolver quando em contato com o meio aquoso. Estes sistemas são denominados hidrogéis. O grau de expansão (e, portanto a quantidade de fármaco liberada) depende do balanço hidrofílico/hidrofóbico da matriz polimérica e do grau das ligações cruzadas. A migração do fármaco para o meio aquoso de um sistema como este implica em um processo de absorção de água e desorção do fármaco (SOUZA, A., 2006).

A osmose é um tipo de mecanismo reservatório, mas que contém um agente osmótico (por exemplo, o próprio fármaco na forma de um sal), que retira água do meio circundante por meio de uma membrana semipermeável. Uma pressão é gerada ao longo do dispositivo, o que força a saída do fármaco (em solução) do mesmo, através de um orifício. Já que o volume do dispositivo permanece constante e há um excesso de sólido (solução saturada) dentro do dispositivo, a taxa de liberação permanece constante, liberando um volume de solução do fármaco igual ao volume de solvente absorvido (SOUZA, A., 2006).

3.5. Estudo de dissolução de substâncias, construções e especificações de aparelhos dissolutores

O estudo de dissolução no desenvolvimento de novas formulações traz informações importantes sobre as variáveis que podem influenciar na liberação de substâncias ativas. Para isso, se faz necessário o cuidado com a uniformização das condições dos ensaios e dos procedimentos (MANADAS R, *et al.*, 2002). Sobre este aspecto, o ensaio pode revelar com elevada segurança o provável comportamento *in vivo* da forma farmacêutica em desenvolvimento (BANAKAR, U.V., 1992; FARINHA, A., *et al.*, 1997; KHAN, K.A., 1975). Um parâmetro importante para determinar esse comportamento é a eficiência de dissolução (ED), determinada a partir da divisão da área sob a curva de dissolução (AUC) em função do tempo, pela área total do retângulo definido por 100% de dissolução e pelo limite de tempo do ensaio.

Atualmente existem inúmeros modelos de equipamentos dissolutores disponíveis comercialmente, porém, algumas universidades em seu período inicial de desenvolvimento não possuem todos os equipamentos necessários para realização desses estudos, como o de liberação controlada de fármacos, assim como para realização de ensino na Academia sobre assuntos relacionados aos métodos de dissolução. Uma alternativa a necessidade do estudo de liberação é a produção de um aparelho de dissolução, obedecendo aos parâmetros e requisitos de desempenho adequados. A construção de um equipamento caseiro (HM-RJ/CF01) pode ser promissora em oferecer uma boa resposta no processo de dissolução, como também pode associar um menor ônus aos estudos relacionados.

A avaliação do perfil de dissolução de formulações farmacêuticas atualmente é realizada por sete principais tipos de aparelhos de dissolução (**Quadro 2**). A farmacopeia americana (USP) relata as especificações necessárias destes aparelhos, possibilitando a livre construção de equipamentos como esses. Para produção destes equipamentos é recomendado o alinhamento de suas especificações com critérios importantes de qualidade, como (TECHNOLOGY, P., 2007):

1. A fabricação, dimensionamento e posicionamento dos componentes devem ser especificados com precisão;

2. O aparelho deve ser de concepção simples, fácil de operar, e utilizável sob diferentes condições;
3. Deve ser sensível o suficiente para revelar mudanças de processos e comparar diferentes formulações, além de permitir a obtenção de resultados reprodutíveis em condições idênticas;
4. Na maioria dos casos, deve permitir um controle, com intensidade variável e uniforme com agitação laminar;
5. O aparelho deve propiciar a introdução fácil de um meio de dissolução e da formulação a ser testada;
6. Deve provê o mínimo de abrasão mecânica para a formulação (com algumas exceções) durante o período do teste;
7. O Meio deve ser mantido em uma temperatura fixa, dentro de uma pequena faixa específica, evitando-se ainda a sua evaporação;
8. As amostras devem ser facilmente recolhidas, de forma manual ou automática;
9. O aparelho deve ser capaz de permitir a avaliação de formulações desintegrantes, não-desintegrantes, densas ou flutuantes, cápsulas e pós.

Entre as configurações dispostas pela USP, o aparelho 2 (conjunto de pás), é de simples produção, além de permitir uma metodologia operacional e interpretativa muito simples, elevada robustez e versatilidade para inúmeros tipos de formulações. A seguir são mostrados os principais modelos de aparelhos dissolutores, de acordo com a farmacopeia americana e com a Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (TECHNOLOGY, P., 2007) (**Quadro 2**):

2. Representação dos diferentes tipos de dissolutores.
 Fonte: (TECHNOLOGY, P., 2007)

<p>Aparelho 1 (cesto giratório)</p>	<p>Aparelho 2 (conjunto de pás)</p>
<p>Aparelho 3 (cilindro alternativo)</p>	<p>Aparelho 4 (célula de fluxo contínuo)</p>
<p>Aparelho 5 (pás sobre disco)</p>	<p>Aparelho 6 (cilindro)</p>
<p>Aparelho 7 (fixador alternativo)</p>	

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese da Hidroxiapatita (HA)

4.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados na síntese da hidroxiapatita foram nitrato de cálcio (Merk[®]), hidrogenofosfato de amônio (Merk[®]) e hidróxido de amônio (Merk[®]).

4.1.2. Equipamentos

- Agitador magnético
- Balança analítica
- pHmetro
- Deionizador de água
- Bomba de sucção
- Sistema para acomodar as soluções para o gotejamento

4.1.3. Acessórios

- Vidrarias de laboratório.

4.1.4. Procedimento Experimental

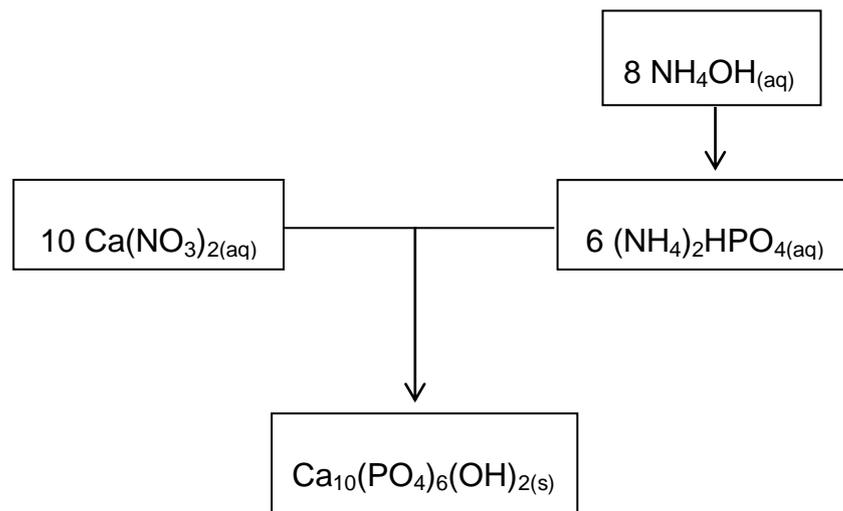
A síntese da HA foi realizada no laboratório de Ensaios de Materiais do colegiado de Engenharia mecânica da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF.

A HA foi produzida pelo método químico via úmida (**Figura 6**). Inicialmente, a 25 °C e em balão volumétrico, 212,4 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (nitrato de cálcio tetra hidratado) foram dissolvidos em um volume de água deionizada suficiente para formar 1,5 L de solução, com concentração molar igual a 0,6 mol/L. A solução de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (hidrogenofosfato de amônio) foi preparada também em balão volumétrico, dissolvendo-se 71,28 g desse composto em água deionizada suficiente

para formar 1,5 L de solução, com concentração molar igual a 0,36 mol/L. Dessa forma, a relação entre Ca/P ficou estabelecida em 1,67, que é a razão ideal para a síntese estequiométrica da hidroxiapatita (AOKI, H., 1991; LE GEROS, R.Z.L.G., J.P., 1990).

Em seguida, adicionou-se 80 ml da solução de hidróxido de amônio concentrado para elevar o pH da solução de hidrogenofosfato acima de 10 e posteriormente a solução de nitrato de cálcio foi gotejada lentamente, a taxa de 2 ml/min, sobre a solução de hidrogenofosfato de amônio com agitação vigorosa e constante. A hidroxiapatita começou a se formar de acordo com a seguinte reação:

Figura 6. Fluxograma da síntese da hidroxiapatita.



Fonte: Arquivo pessoal.

Essa reação ainda produz nitrato de amônio e água como produtos, sendo o nitrato de amônio eliminado na lavagem e secagem do material. Depois que todo o nitrato de cálcio foi adicionado, o sistema reativo continuou sob agitação constante por um período de 1h. Posteriormente, o produto formado foi decantado durante 48 h. Em seguida, a hidroxiapatita formada foi filtrada e lavada até pH 7, obtendo uma pasta, que foi seca em estufa a 70 °C durante 72 h. O produto final foi triturado com grau e pistilo para a obtenção do pó de hidroxiapatita finamente dividido.

O polietileno glicol foi obtido comercialmente, designado como PEG 4000, produzido pela empresa Viafarma[®], na forma de flocos brancos inodoros, com ponto

de fusão variando numa faixa entre 54 °C a 58 °C, com densidade aparente de 1220 kg/m³ e número de registro CAS 25322-68-3.

A quercetina também foi obtida comercialmente, através da empresa Sigma-Aldrich® (grau HPLC), na forma de um pó amarelo finamente dividido, com fórmula molecular C₁₅H₁₀O₇, massa molar de 302,24 g/mol, ponto de fusão de 316 °C e número de registro CAS 117-39-5.

4.2. Obtenção do compósito composto por hidroxiapatita e polietilenoglicol

4.2.1. Reagentes

- Hidroxiapatita (produzida no laboratório) e polietilenoglicol (Viafarma®).

4.2.2. Equipamentos

- Agitador magnético
- Balança analítica
- pHmetro
- Deionizador de água
- Equipamento para destacar as pastilhas (HM-RJ/CF01)

4.2.3. Acessórios

- Vidrarias de laboratório

Com o intuito de se obter estruturas semirrígidas com finalidade implantável, seguiu-se o modelo descrito em HARVARD (DAVID J. M. , *et al.*, 2009). O PEG e a HA foram misturados sob diferentes proporções: PEG8/HA2, PEG6/HA4, PEG5/HA5, PEG4/HA6 e PEG2/HA8. Para o desenvolvimento das pastilhas dos compósitos, o PEG foi inicialmente fundido a 70 °C durante 10 minutos e seguida misturado com HA com agitação constante, ambos em quantidade apropriadas para produção de cada compósito nas proporções descritas acima. Não foi possível

desenvolver a formulação PEG2/HA8, pois havia muito pó cerâmico para pouco polietilenoglicol líquido.

As pastilhas dos compósitos foram produzidas em formato cilíndrico, com auxílio de um equipamento *HM-RJ/CF01*, constituído por uma plataforma de madeira perfurada com seringas cortadas na ponta e apoiadas nos furos dessa placa (**Figura 7**).

A base do equipamento foi coberta com uma camada de filme plástico para evitar que o material derretido caísse diretamente em sua superfície. O material derretido é vertido nessas seringas e posteriormente o mesmo é destacado pela ação do êmbolo, dando assim, forma aos compósitos.

Figura 7. Equipamento *HM-RJ/CF01* para produção das pastilhas dos compósitos.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.3. Obtenção dos compósitos de PEG/HA com a adição da quercetina

4.3.1. Reagentes

Hidroxiapatita (produzida no laboratório), polietilenoglicol (Viafarma[®]) e quercetina, (Sigma[®]).

4.3.2. Equipamentos

- Agitador magnético

- Balança analítica
- pHmetro
- Deionizador de água
- Equipamento para destacar as pastilhas (HM-RJ/CF01).

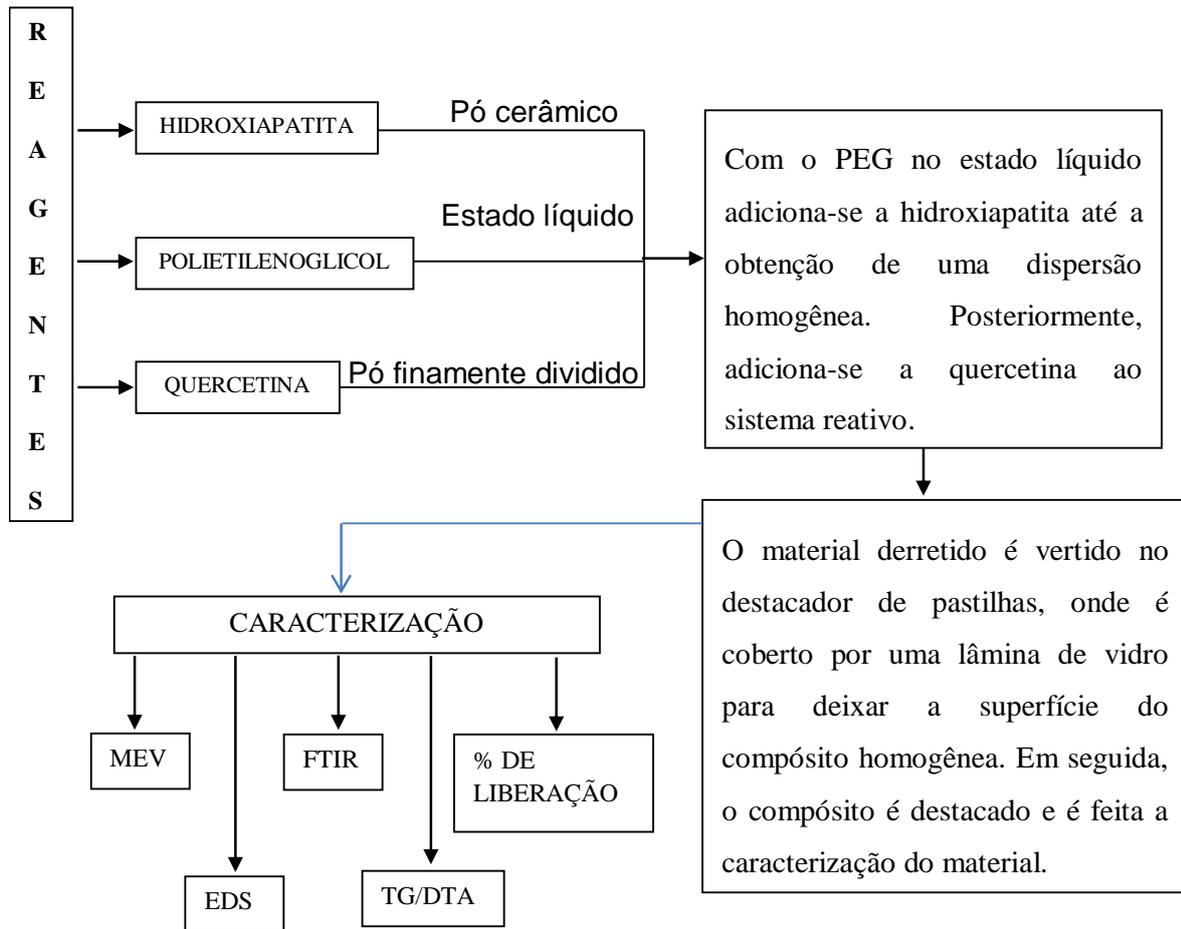
4.3.3. Acessórios

- Vidrarias de laboratório

4.3.4. Procedimento Experimental

Os compósitos PEG/HA/QUE foram desenvolvidos de forma muito similar à produção dos mesmos sem a quercetina. A mistura foi produzida inicialmente com o derretimento do PEG, logo após adicionou-se a HA e em seguida colocou-se 100 mg de quercetina ao sistema com agitação constante por 10 minutos. O PEG e HA foram misturados de forma a se obter as diferentes razões entre eles: PEG8/HA2, PEG6/HA4, PEG5/HA5 e PEG4/HA6 perfazendo uma proporção em massa de QUE/COMPÓSITO igual a 0,1/1 (m/m)(**Figura 8**).

Figura 8. Esquema que resume os principais passos para obtenção e caracterização dos compósitos de PEG/HA com a adição da quercetina.



Fonte: Arquivo pessoal

4.3.5. Caracterização física dos compósitos

A análise morfológica da superfície foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio marca TESCAN[®], modelo VEGA 3, com diferença tensão de trabalho de 5 kV, sendo a amostra metalizada com ouro (Au). O estudo estrutural foi realizado por meio da difração de raios-X (DRX) utilizando um equipamento marca INEL, modelo EQUINOX 1000, com diferença de tensão de experimentação de 30 kV, corrente de 30 mA, passo de varredura fixo, taxa de exposição de 900 s, sem aquecimento e com taxa de ângulo de 4°. A composição química do material foi determinada pela espectroscopia de energia dispersiva (EDS) utilizando um equipamento da marca OXFORD[®], com voltagem de aceleração de 15 kV, tempo de aquisição de dados de 60 s e tempo de

processamento desses dados de 4 s. Os testes de dureza foram realizados com uma máquina universal de dureza marca EMIC modelo DL 10000. A presença de grupos funcionais químicos foi analisada através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) marca SHIMADZU modelo IR *prestige 21*, utilizando a faixa do infravermelho médio (varredura de 400 a 4700 cm^{-1}) com transmissão em pastilha de KBr, resolução de 1 cm^{-1} , 65 *scans* e temperatura ambiente. As curvas de TG foram obtidas utilizando Termobalança TG-60 Shimadzu interligada ao software Shimadzu TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 25-500°C. As amostras foram colocadas em um porta-amostra de platina com massa de 5 mg ($\pm 0,2$) de cada amostra. As determinações foram realizadas em triplicata, sendo o oxalato de cálcio trihidratado utilizado para calibrar a escala de temperatura e as perdas de massa.

4.4. Construção do dissolutor *HM-RJ/CF01* para o ensaio de liberação *in vitro*

4.4.1. Concepção do projeto

O aparelho de dissolução foi inicialmente racionalizado tomando-se como base alguns modelos comerciais de dissolutores e principalmente as especificações descritas pela farmacopeia americana (USP). O mesmo foi idealizado tendo como base aparelhos já comercialmente utilizados no mercado tomando-se o cuidado de torná-lo o mais funcional possível.

4.4.2. Projeto do sistema de dissolução *HM-RJ/CF01*

O projeto do dissolutor foi desenvolvido utilizando o *software Autodesk Inventor Professional 2013*[®] para desenho estrutural com *interface CAD 3D*, com licença acadêmica de utilização.

4.4.3. Obtenção das peças para montagem do dissolutor *HM-RJ/CF01*

As peças utilizadas para construção do equipamento foram adquiridas comercialmente nos municípios de Petrolina-PE e Juazeiro-BA, principalmente em

casas de ferragens, material de construção, farmácias, lojas virtuais (*internet*), lojas automotivas e também de variedades. Foram utilizados serviços de marcenaria, torneiro mecânico e metalurgia.

4.4.4. Qualificação física do equipamento (qualificação física)

O aparelho foi qualificado por meio da análise de um Engenheiro Mecânico, que fez a aferição das dimensões do mesmo e certificou parâmetros como frequência de rotação das pás (rpm), temperatura do banho e das cubas de dissolução, perpendicularidade e bamboleio das hastes e das cubas, profundidade das hastes e das cubas, tempo de experimento, vibração e inclinação do equipamento e da bancada. Esse estudo de qualificação foi realizado com os seguintes equipamentos devidamente calibrados: termohigrômetro, tacômetro, transferidor de ângulo, inclinômetro, cronômetro e relógio comparador.

A qualificação física foi realizada na Central Analítica, no pavilhão de laboratórios da UNIVASF, campus Petrolina-PE/centro, onde o equipamento foi instalado.

4.4.5. Avaliação de desempenho (Qualificação química)

A qualificação química do aparelho foi efetuada por meio de um ensaio de dissolução de acordo com o preconizado pela USP-37, 2014, com comprimidos-padrão de prednisona 5 mg (Lote: 620176) utilizando os seguintes parâmetros:

- Meio de dissolução: 500 mL de água ultrapura e degaseificada.
- Tempo: 30 minutos.
- Aparato: USP 2 – Pá a 50 rpm

4.5. Desenvolvimento do método de quantificação da quercetina no meio de liberação controlada

Foram utilizadas soluções de quercetina preparadas a partir do padrão de quercetina para CLAE, com pureza superior a 99%, Sigma Aldrich[®]. O cromatógrafo utilizado no experimento possui configuração modular, equipado com um sistema

quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, sendo os dados tratados através do software Shimadzu[®] LC solution 1.0 (Japão).

A interfase de separação utilizada foi composta por uma coluna cromatográfica de C18 (250 x 4,6 cm, 5 micrometros) marca Supelco.

As filtrações das amostras foram realizadas com membranas filtrantes com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore[®]). A acetonitrila grau HPLC foi utilizada como fase orgânica. A fase aquosa foi preparada com água ultrapura obtida no aparelho Mili-Q[®] e ácido trifluoracético a 0,1% (v/v).

Inicialmente o eluente aquoso foi preparado na concentração de 0,1 % de ácido trifluoracético em água ultrapura. Esta solução foi submetida à filtração utilizando uma membrana filtrante de 0,45 µm de diâmetro de poro.

A quercetina foi adquirida do fornecedor e o preparo das soluções foi realizado da seguinte maneira: Pesou-se 0,012 g da mesma e essa massa foi solubilizada em 100 mL de acetonitrila, perfazendo uma concentração de 120 µg/mL. A partir dessa solução foram obtidas soluções-teste nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg/mL, sendo que, as concentrações de 10, 60 e 120 µg/mL foram preparadas em quintuplicata e as demais, em triplicata. Essas soluções foram transferidas para *vials* e em seguida levadas ao CLAE-DAD para a corrida cromatográfica.

A separação cromatográfica foi realizada em modo isocrático, sendo a fase móvel uma mistura de 25% de acetonitrila e 75% de solução aquosa de ácido trifluoracético a 0,1% (v/v) sob fluxo de 2,0 mL/minuto, coluna de C₁₈, temperatura de 25 °C e volume de injeção de 20 µL.

A partir dos cromatogramas obtidos, avaliou-se a adequação do sistema cromatográfico através dos parâmetros: fator de capacidade, número de pratos, fator de assimetria e resolução entre os picos. Os critérios de avaliação utilizados para escolha do melhor método cromatográfico desenvolvido foram: fluxo da fase móvel, fase estacionária, volume de injeção, resolução entre os analitos e seletividade.

4.6. Validação do método de quantificação da quercetina no meio de liberação controlada

4.6.1. Parâmetros de validação

4.6.1.1. Especificidade e Seletividade

O termo especificidade define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias. A seletividade refere-se a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles.

Cromatogramas representativos devem apresentar especificidade. Em métodos cromatográficos o ideal é que não haja nenhuma substância que seja detectada no mesmo tempo de retenção do analito.

4.6.1.2. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática (equação da regressão linear) usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado como livre de tendências se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem.

Foram registrados os resultados individuais do analito obtido e traçado um gráfico da concentração *versus* resposta. Determinou-se o coeficiente de correlação (r^2), intersecção com eixo “y”, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo.

O critério mínimo aceitável de coeficiente de correlação (r^2) foi 0,99, limite especificado pela RE n° 899 da ANVISA.

4.6.1.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas no teste. Ou seja, é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser verdadeiramente distinguida de zero.

Já o limite de quantificação é a concentração mais baixa de um analito que pode ser determinada com precisão aceitável (repetitividade) e exatidão, nas condições declaradas do teste. Pode ainda ser conceituado como a característica de desempenho que define a habilidade de um processo de medida química de quantificar um analito adequadamente.

4.6.1.4. Exatidão

É definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, constitui a chave para o propósito da validação.

A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (método com precisão e exatidão avaliadas).

A determinação da exatidão foi feita repetidamente com várias alíquotas de um único volume homogêneo da solução padrão. Nesse contexto, a exatidão foi calculada utilizando cinco determinações para cada uma das concentrações: baixa (10 µg/mL), média (60 µg/mL) e alta (120 µg/mL).

A exatidão foi calculada intra-dia e inter-dias pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100\%$$

Onde, CME é a concentração média experimental e CT é a concentração teórica.

Os valores de exatidão foram comparados com os limites especificados pela RE nº 899 da ANVISA, nos quais tiveram um intervalo de 80% a 120% para determinações intra-dia e inter-dias, respectivamente.

4.6.1.5. Precisão

É o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra do processo analítico. Usualmente, é expressa como o desvio padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas.

A mesma foi obtida em duas vertentes: Repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dias). No primeiro caso deve haver uma concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista utilizando a mesma instrumentação. A mesma foi calculada utilizando cinco áreas quantificadas para cada uma das concentrações, baixa (10 mg/L), média (60 mg/L) e alta (120 mg/L), sendo os cálculos obtidos com a utilização da equação abaixo:

$$\text{Precisão (cv\%)} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \times 100\%$$

Em que DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

Os valores de precisão foram comparados com os limites especificados pela RE nº 899 da ANVISA, nos quais tiveram um intervalo de 5% a 15% para determinações intra-dia e inter-dias, respectivamente.

4.7. Ensaio de dissolução da quercetina em compósito de polietilenoglicol e hidroxiapatita

4.7.1. Ensaio de liberação *In vitro*

4.7.1.1. Dissolução

A dissolução pode ser definida, num sentido restrito, como o processo pelo qual uma substância sólida entra no solvente para formar uma solução. No entanto, no sentido amplo da palavra, é mais do que a simples medida da taxa de solubilidade, podendo ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação para uma determinada área numa determinada quantidade e no tempo correto (MANADAS R, *et al.*, 2002).

Esta definição é mais consentânea com a aplicação dos ensaios de dissolução aos estudos biofarmacêuticos e farmacocinéticos. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico o libera (COSTA, P., LOBO, J. M. S. , 1999; HANSON-RESEARCH-CORPORATION., 1996).

Podem ser incorporadas substâncias no seio da forma farmacêutica, que permitem alterar a solubilidade do fármaco no meio (PREECHAGOON, D., *et al.*, 2000). A solubilidade de um fármaco é parâmetro chave nos estudos de pré-formulação.

Normalmente, a solubilidade (ou concentração de saturação) é determinada por meio da adição de um excesso de fármaco ao meio, agitação da suspensão durante um determinado período, filtração ou centrifugação da suspensão e medição da quantidade de fármaco dissolvida.

Entretanto, outras técnicas mais eficientes e rápidas estão sendo desenvolvidas no intuito de tornar a determinação destes parâmetros menos dispendiosa (ROY, D., *et al.*, 2001). As substâncias podem ser classificadas, quanto à sua solubilidade, de acordo com o **QUADRO 3** (INFARMED., 1997). Contudo, para preparação do meio de dissolução (SBF) utilizou-se os reagente listados no **Quadro 4**.

Quadro 3. Comparação entre a quantidade de solvente e a solubilidade.

Termos Descritos	Quantidades aproximadas do solvente, em mililitros, para um grama da substância
Muito solúvel	Menos de 1
Facilmente solúvel	De 1 a 10
Solúvel	De 10 a 30
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100
Pouco solúvel	De 100 a 1.000
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10.000
Praticamente insolúvel	Mais de 10.000

Fonte: (INFARMED., 1997)

Quadro 4. Reagentes para preparação do *Simulated body fluid* (SBF - fluido corporal simulado).

Reagente	Quantidade para 1 L de SBF
Cloreto de sódio	8,035 g
Bicarbonato de sódio	0,355 g
Cloreto de potássio	0,225 g
Fosfato de potássio dibásico trihidratado	0,231 g
Cloreto de magnésio hexahidratado	0,311 g
Ácido clorídrico	39 mL
Cloreto de cálcio	0,292 g
Sulfato de sódio	0,072 g
Tris(hidroximetil) amino metano	6,118 g

Fonte: (MARQUES, M.R.C., et al., 2011)

4.7.1.2. Equipamentos

- Dissolutor (*HM-RJ/CF01*)
- CLAE-DAD

4.7.1.3. Acessórios

- Vidrarias de laboratório

Os ensaios de liberação *in vitro* foram conduzidos num aparelho de dissolução (*HM-RJ/CF01*) e foram realizados para os compósitos nas proporções polímero/cerâmica PEG8/HA2/QUE, PEG6/HA4/QUE, PEG5/HA5/QUE e PEG4/HA6/QUE empregando-se um sistema de tipo pá (Aparato 2), SBF (fluido corporal simulado) com temperatura do meio de dissolução igual a 37°C (+/- 0,5 °C), velocidade de agitação de 50 rpm, volume do meio de dissolução de 500 mL.

Inicialmente, o meio de dissolução foi colocado nas cubas de dissolução estando às mesmas diagonalmente posicionadas, para evitar a formação de bolhas. O sistema de aquecimento foi ligado para estabilizar a temperatura em 37 °C (+/- 0,5 °C) e no intuito de manter uma maior homogeneidade na temperatura, o sistema de circulação de água também foi ligado nessa etapa. Os compósitos foram colocados dentro das cubas de dissolução (um em cada cuba) e em seguida o sistema de rotação foi ligado estabelecendo 50 rpm (rotações por minuto) ao mesmo. O dissolutor se foi protegido da luz, para não haver interferência pela degradação da quercetina.

Foram retiradas alíquotas de 1,5 mL (em triplicata) e o mesmo volume foi imediatamente repostado, empregando-se o mesmo meio, na mesma temperatura. As alíquotas foram retiradas nos seguintes intervalos de tempo: 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos. As mesmas foram filtradas em membranas de 0,45 µm e imediatamente levadas ao CLAE-DAD para quantificação da quercetina dissolvida.

A partir dos resultados, gráficos de porcentagem de quercetina liberada (Q%) em função do tempo foram construídos modelos matemáticos para descrever o perfil de dissolução da quercetina.

4.8. Determinação do perfil de liberação *in vitro* da quercetina por CLAE-DAD

Para determinação do perfil de liberação *In vitro* da quercetina, o método analítico utilizado foi desenvolvido e validado por CLAE – DAD, em equipamento Shimadzu[®] equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, sendo os dados tratados através do software Shimadzu[®] LC solution 1.0 (Japão).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese da Hidroxiapatita (HA)

A hidroxiapatita foi obtida na forma de pó branco e amorfo com rendimento de 71 % em relação ao cálculo teórico de obtenção (**Figura 9**). Foram 25 experimentos para obtenção da cerâmica total utilizada para realização dos experimentos de caracterização e dissolução, obtendo-se ao final cerca de 600 g de material.

Figura 9. Hidroxiapatita em pó, obtida por método úmido.



Fonte: Arquivo pessoal.

A hidroxiapatita foi obtida com rendimento razoável e com características físicas apropriadas para o desenvolvimento dos compósitos, com o objetivo de estudos científicos voltados para liberação modificada de fármacos. Além disso, os reagentes utilizados para obtenção da cerâmica não foram tão onerosos, quando se considera objetivo, obtenção de matrizes de liberação de fármacos. Diante disso, a obtenção da hidroxiapatita por este método torna-se um meio aparentemente viável, sabendo-se que ainda é necessário estudos mais aprimorados para se determinar a produção da mesma em escala industrial, bem como, estudos que possibilitem

determinar os impactos econômicos para produção dessa matéria-prima pela indústria farmacêutica.

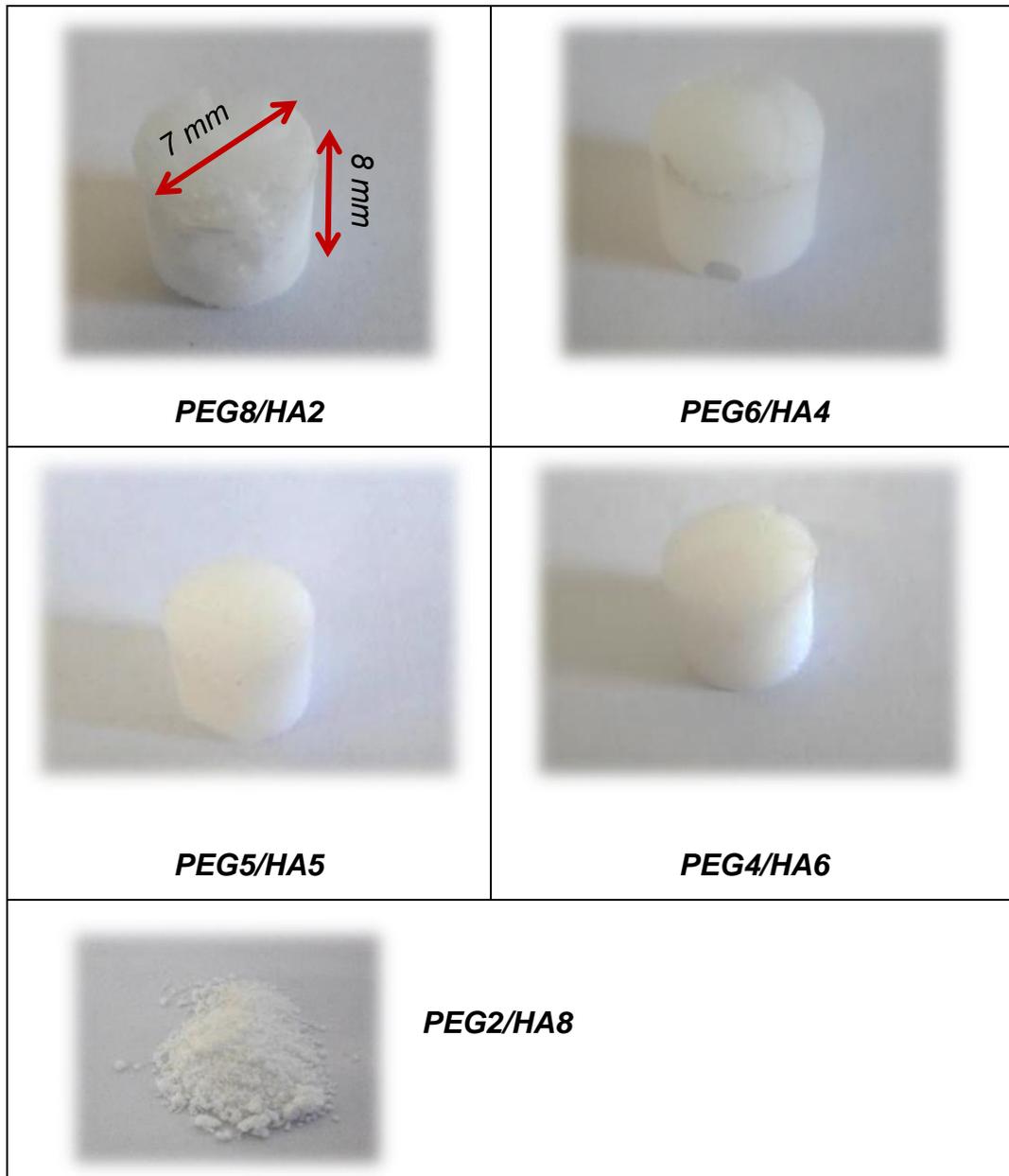
5.2. Obtenção das pastilhas de compósitos constituídos por diferentes proporções de polietilenoglicol e hidroxiapatita (PEG/HA)

As pastilhas constituídas por PEG/HA foram obtidas em quatro diferentes proporções, seguindo o modelo de Dhanalakshmi, (2012), porém, no estudo citado, o autor produz os compósitos na forma de pó, sendo as proporções obtidas: PEG8/HA2, PEG6/HA4, PEG5/HA5 e PEG4/HA6 (**Figura 10**). Como mencionado anteriormente, a pastilha PEG2/HA8 não foi obtida devido à grande quantidade de pó cerâmico em comparação com o polietilenoglicol líquido. Todas as pastilhas produzidas apresentaram formato cilíndrico maciço, com 8,0 mm de diâmetro por 7,0 mm de altura.

Entre todas as pastilhas obtidas, apenas a forma PEG4/HA6 apresentou-se um pouco quebradiça e, por outro lado, as outras pastilhas apresentaram-se com aspecto ceroso e íntegro.

A obtenção das pastilhas dos compósitos demonstrou a possibilidade de produção de estrutura com formas definidas, característica que pode propiciar a produção de elementos implantáveis, que poderão ser aplicados na liberação controlada de fármacos.

Figura 10. Pastilhas dos compósitos de polietilenoglicol e hidroxiapatita, sem quercetina.



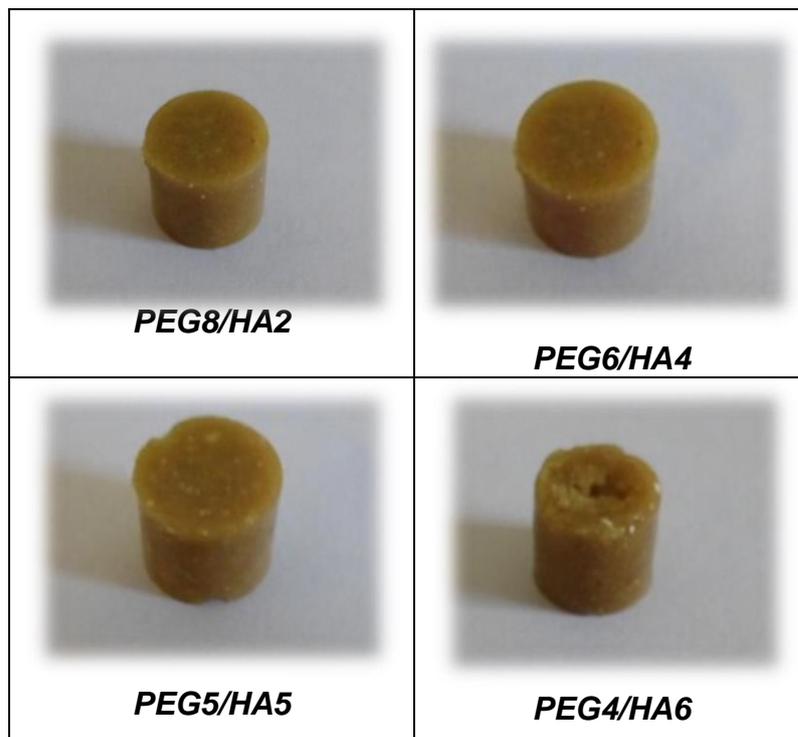
Fonte: Arquivo pessoal.

5.3. Obtenção das pastilhas de compósitos de PEG/HA com a adição da quercetina

As pastilhas dos compósitos foram obtidas com a introdução da quercetina de forma matricial. Todas as pastilhas apresentaram-se com coloração de tonalidade marrom amarelado (**Figura 11**).

Macroscopicamente foi possível perceber que as pastilhas foram bem homogeneizadas, porém, as pastilhas com proporção PEG4/HA6 demonstraram em sua estrutura elementos que possivelmente são compostos de aglomerados de hidroxiapatita, indicados pela observação de regiões puntiformes mais claras na superfície. Esse aspecto mais pronunciado e claramente evidenciado no referido compósito possivelmente ocorre devido a maior proporção de pó cerâmico. As pastilhas PEG4/HA6, também se demonstraram mais quebradiças ao serem retiradas dos moldes, possivelmente pelo excesso de hidroxiapatita em sua estrutura, pois a mesma em excesso pode conferir quebra de reticulação com o polietilenoglicol.

Figura 11. Pastilhas dos compósitos obtidos nas diferentes proporções de polietilenoglicol e hidroxiapatita com a presença da quercetina.



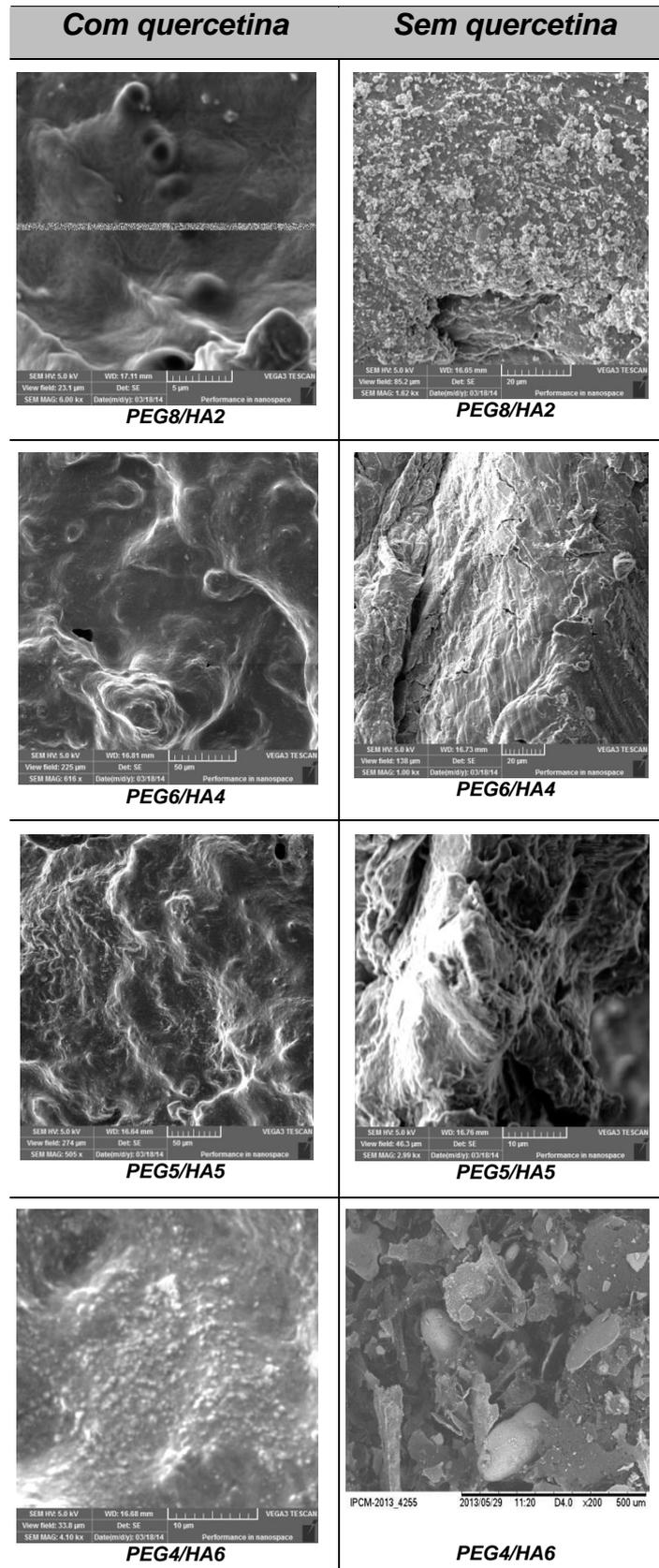
Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.1. Caracterização física dos compósitos

5.3.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica revelou pontos distintos nas imagens das estruturas analisadas. Entre os compósitos produzidos sem a presença de quercetina, pode-se observar certa alteração na superfície, relacionada à existência de coesão entre os polímeros e a uma maior quantidade de hidroxiapatita, a qual se intensifica na seguinte sequência: PEG8/HA2 > PEG6/HA4 > PEG5/HA5 > PEG4/HA6. Estes dados corroboram com as características macromorfológicas, onde ocorre também o aumento da irregularidade das superfícies na mesma sequência supracitada. Além disso, como observado, os compósitos possuem rugosidades que mudam de intensidade à medida que aumenta a proporção de hidroxiapatita, porém, a superfície do compósito que não possui a presença de fendas ou poros, pode indicar uma homogeneidade de distribuição de massa, caracterizando uma estrutura matricial mais homogênea (**Tabela 1**). Os compósitos com a presença de quercetina apresentaram em suas superfícies características muito distintas das que foram observadas nos seus correspondentes, com ausência de quercetina. Na pastilha PEG8/HA2 foi revelado uma superfície muito irregular, com a evidência da presença de aglomerados mais claros, indicando que a quercetina de certo modo pode ter quebrado o entrelaçamento entre o polímero e a cerâmica, como evidenciado no seu correspondente sem quercetina, como também pode ter sido intensamente adsorvida na superfície do compósito. Observou-se também o surgimento de fendas, as quais podem ter sido influenciadas por esta quebra da malha de entrelaçamento. Com o aumento da concentração de hidroxiapatita foi possível verificar irregularidades crescentes na morfologia dos compósitos, com o surgimento de fendas ainda maiores em PEG6/HA4 e PEG5/HA5. Em PEG4/HA6 ocorre à alteração completa da superfície da pastilha, indicando certa falta de coesão entre polímero e cerâmica (**Tabela 1**). A formação dessas fendas, de certo modo, podem ser benéficas para o desenvolvimento da formulação matricial, pois podem permitir a circulação dos fluídos biológicos como também a migração de células pra o local onde o biomaterial está inserido, permitindo possivelmente uma melhor distribuição do composto e favorecendo ainda o processo de biocompatibilidade da estrutura implantável.

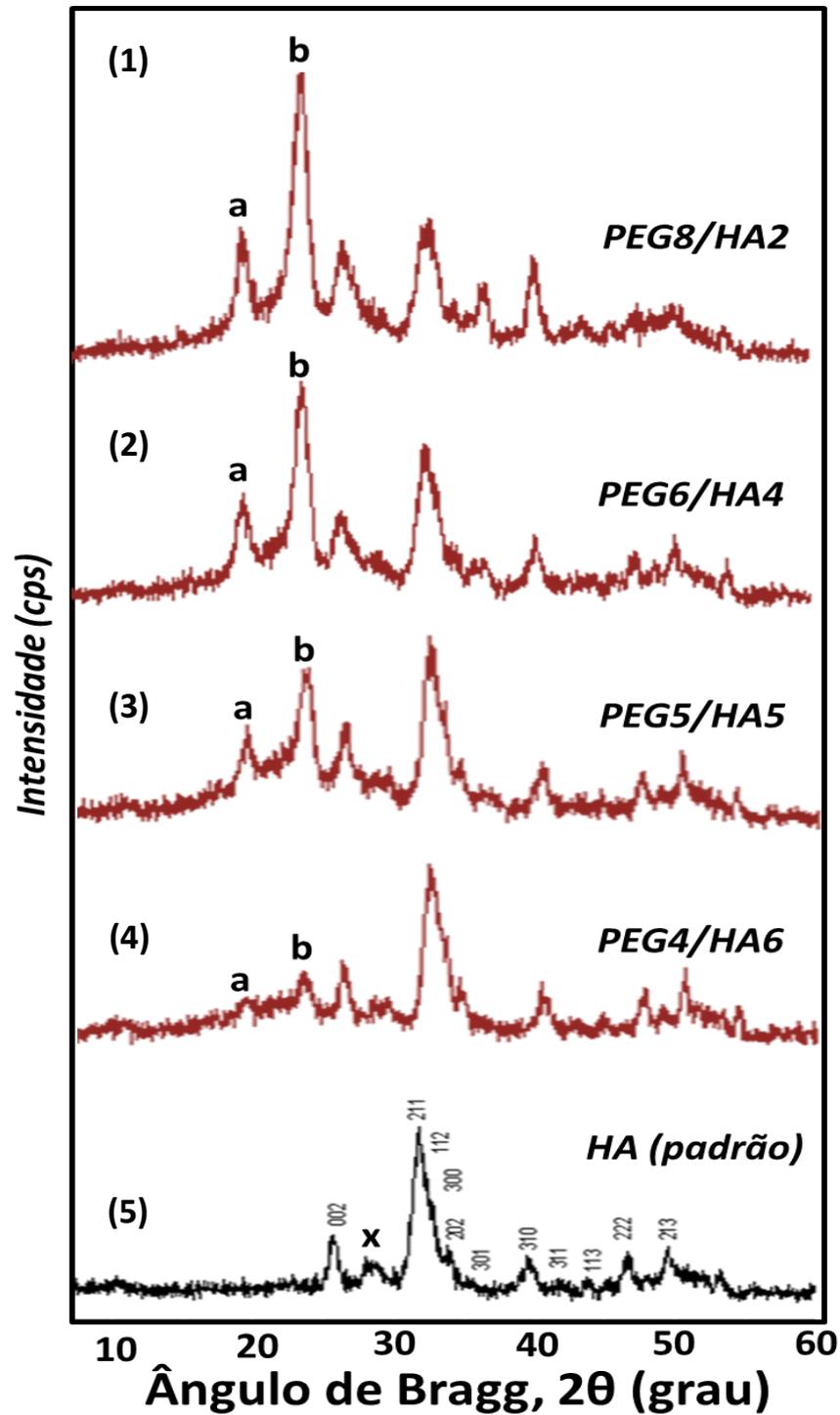
Tabela 1. Eletrofotomicrografias da superfície das pastilhas dos compósitos constituídos por PEG/HA com quercetina (a esquerda) e sem quercetina (a direita).
Fonte: Arquivo pessoal.



5.3.1.2. Difração de Raio-X (DRX)

A hidroxiapatita foi analisada por DRX, servindo assim como padrão para comparação com os compósitos de PEG/HA com quercetina incorporada. Os planos de reflexões que correspondem aos picos espectrais do DRX característicos da HA pura são mostrados na **Figura 12**. Os picos de difração observados foram identificados pelo padrão *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS), arquivo (09-0432). O padrão mostrou picos de difração com picos largos e de alta intensidade. O difratograma da hidroxiapatita mostrou picos particularmente nos planos 002, 211, 112 e 300, picos elevados e estreitos, conclusivos para cristais de hidroxiapatita. Ainda é possível observar no DRX da HA os picos em 2θ correspondentes 27° , $32,5^\circ$, 41° , 48° , 51° e 55° . É possível observar também, picos em $19,8^\circ$, 24° , e 37° , que são relacionados à presença de cristais de PEG no compósito, os quais elevam a intensidade à medida que o seu teor aumenta e, por outro lado, os picos referentes à hidroxiapatita reduzem sua intensidade de modo geral, havendo os desaparecimento completo, especificamente dos picos 48° , 51° e 55° no compósito PEG8/HA2. Isto mostra que houve mudança na cristalinidade do material com a influência da alternância dos teores de PEG e HA.

Figura 12. Difração de Raio-X dos compósitos constituídos por PEG/HA em suas diferentes proporções com quercetina incorporada (1 - 4), e da hidroxiapatita pura (5), atribuída como padrão de composto cristalino.

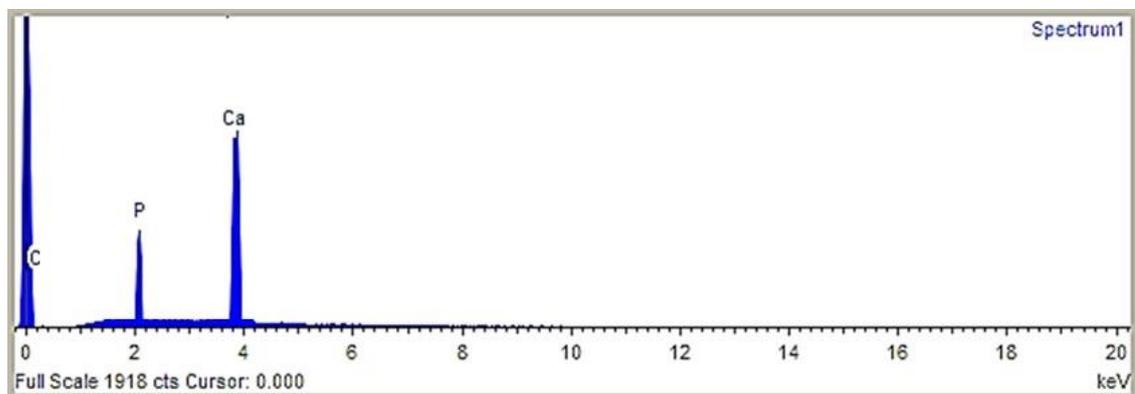


Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.1.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A caracterização quantitativa e qualitativa por EDS confirmou os principais átomos presentes na estrutura da hidroxiapatita, como também a proporção estequiométrica igual a 1,67 entre Ca/P (**Figura 13**). Esta é uma caracterização que indica a formação da hidroxiapatita. Sendo ele confirmado por meio do difratograma de raio-x da amostra de HA visto no item anterior (**ver Figura 12**). Além disso, a espectroscopia por energia dispersiva demonstrou apenas a presença dos átomos cálcio e fósforo como componentes, não revelando átomos estranhos à estrutura da hidroxiapatita, indicando pureza da cerâmica (**Figura 13**).

Figura 13. Espectro de EDS para a hidroxiapatita pura produzida neste trabalho.

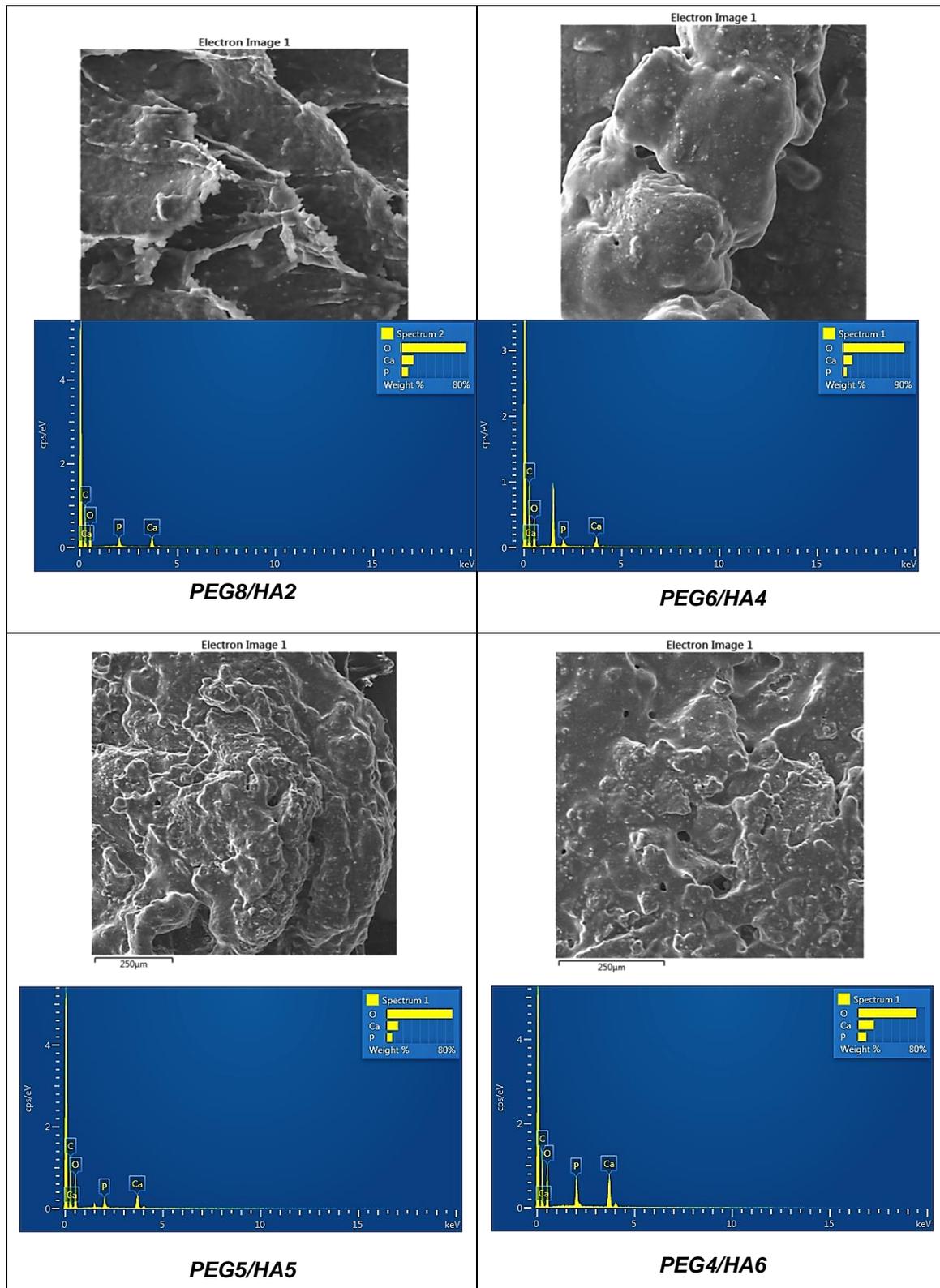


Element	Weight%
Phosphorus	39,69
Calcium	66,5

Fonte: Arquivo pessoal.

As pastilhas dos compósitos mostraram-se com composições muito similares entre si, quando analisadas por EDS, podendo-se evidenciar a presença de cálcio, fósforo, oxigênio e carbono, sendo este último possivelmente oriundo do polímero polietilenoglicol e do flavonóide quercetina (**Figura 14**).

Figura 14. Espectro de EDS dos compósitos mostrando a relação das massas dos átomos presentes no compósito.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.1.4. Testes de Dureza

O ensaio de dureza foi realizado em duplicata utilizando as pastilhas constituídas por diferentes proporções *PEG8/HA2/QUE*, *PEG6/HA4/QUE*, *PEG5/HA5/QUE* e *PEG4/HA6/QUE*.

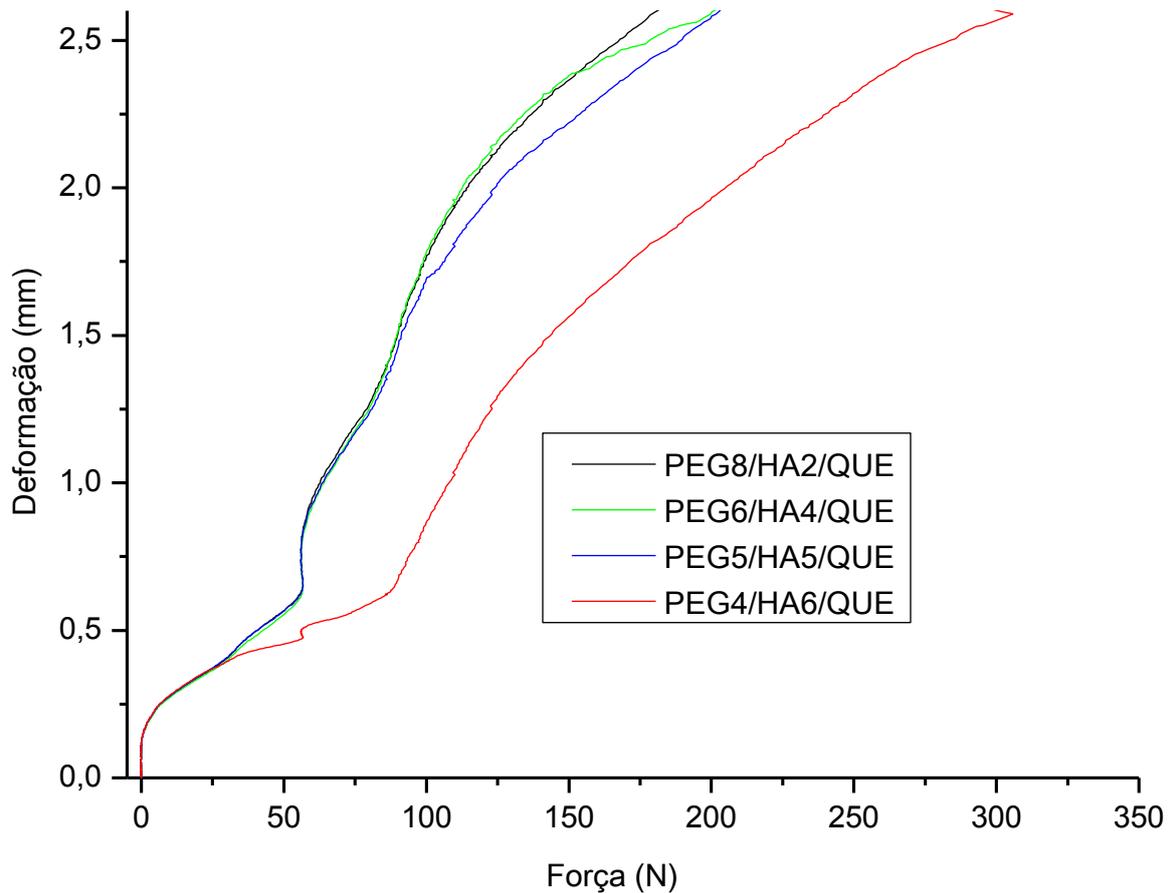
A partir do ensaio de dureza verificou-se que a pastilha *PEG4/HA6/QUE* demonstrou maior resistência mecânica com deformação acentuada iniciando apenas acima de uma força acima de 80 N, apesar de possuir uma superfície mais quebradiça, quando demonstrado ao ser retirada dos moldes de confecção, e aparentemente mais porosa, observado por meio do MEV.

As pastilhas com as proporções (*PEG8/HA2/QUE*, *PEG6/HA4/QUE* e *PEG5/HA5/QUE*) apresentaram perfis de dureza muito semelhantes entre si na faixa de força entre 25 e 50 N, correspondendo a uma acentuada elevação da deformação.

A pastilha com proporção *PEG5/HA5/QUE* apresentou um aumento da resistência a partir de 80 N, indicando uma elevação das propriedades mecânicas dos compósitos (**Figura 15**).

Outro fator interessante é que à medida que se aumenta a quantidade de hidroxiapatita na estrutura do material, ocorre um aumento da coesão entre os polímeros, o que provavelmente contribui para o aumento da resistência mecânica do compósito.

Figura 15. Ensaio de dureza para as diferentes pastilhas de PEG/HA/QUE.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.1.5. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Hidroxiapatita

A análise dos grupos funcionais com a finalidade de comparar e diferenciar as matérias primas dos compósitos foi obtida por meio do FTIR da hidroxiapatita, do polietilenoglicol, da quercetina, como também dos compósitos nas diferentes proporções entre PEG/HA com a presença de quercetina. As amostras foram analisadas na forma de pastilhas com KBr e a seguir temos o espectro de FTIR da hidroxiapatita produzida neste trabalho (**Figura 16**). O mesmo mostra bandas entre 1000 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} , correspondentes a vibrações de estiramento assimétrico do grupo fosfato PO_4^{3-} , bandas em torno de 570 cm^{-1} são referentes a vibrações de

estiramento P-OH do grupo HPO_4^{2-} . A banda larga na região de 3140 cm^{-1} é característica de íons hidroxilas ou adsorvidas na amostra (MELLO, V.J., 2001). A banda referente ao estiramento assimétrico do grupo CO_3^{2-} está em cerca de 820 cm^{-1} enquanto que a banda em torno 1370 cm^{-1} deve-se ao estiramento assimétrico desse mesmo grupo, que provavelmente foi incorporado durante a precipitação da cerâmica, já que a mesma foi sintetizada em ambiente aberto (BERTINETTI L, *et al.*, 2007). A banda mostrada em torno de 1570 cm^{-1} é possivelmente referente ao alongamento do grupo nitrato (NO_3^-) e a banda em 3450 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação N-H do grupo NH_4^+ (ANEE, T.K., 2003). Estas bandas podem ser provenientes da formação do NH_4NO_3 como sub-produto da síntese de HA, como mostrado na reação estequiométrica de síntese da mesma:

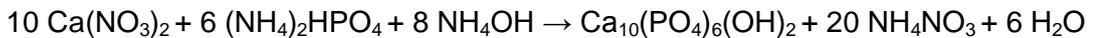
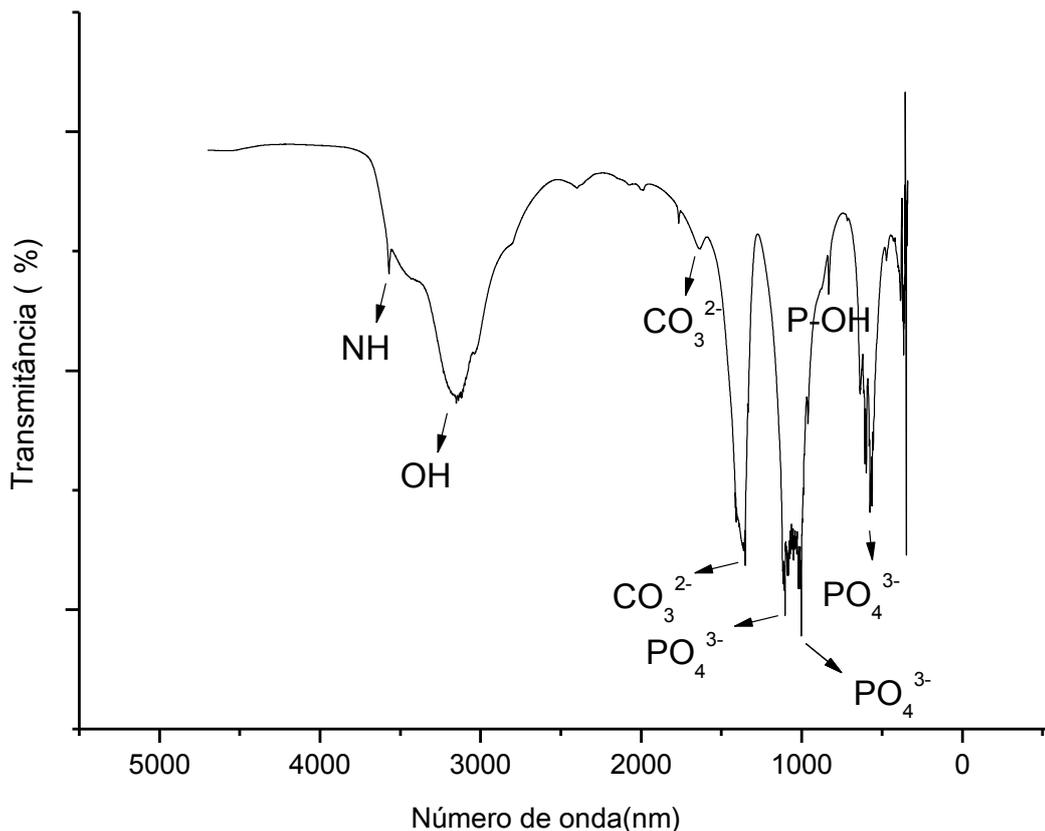


Figura 16. Espectro de FTIR da hidroxiapatita sintetizada neste trabalho.



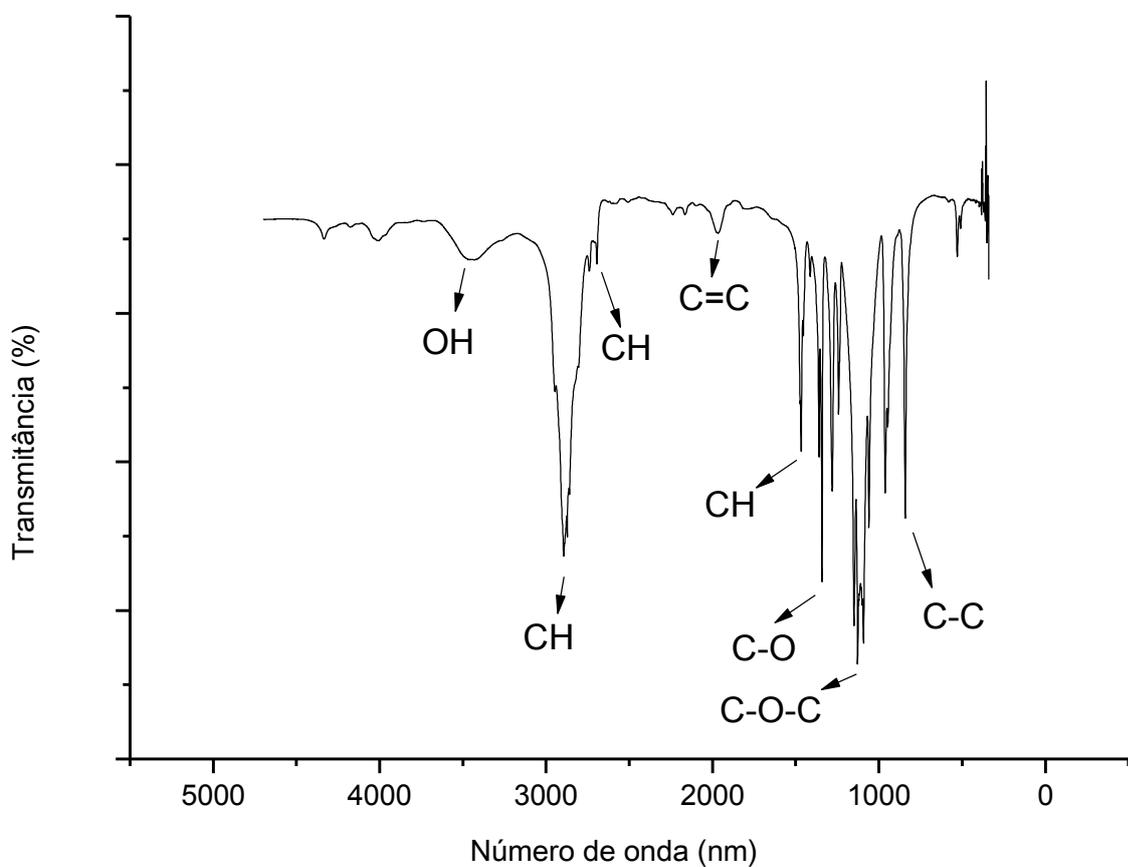
Fonte: Arquivo pessoal.

Polietilenoglicol

O polietilenoglicol foi obtido da Viafarma[®] e seu espectro de FTIR é mostrado a seguir (**Figura 17**). O mesmo mostra bandas entre 700 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} correspondentes às ligações simples entre carbonos (C-C). Em 1100 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-O-C da cadeia do polietilenoglicol. A banda fina em torno de 1500 cm^{-1} é referente à deformação de grupos C-H. A banda larga na região de 2760 cm^{-1} é característica do estiramento de grupamentos $-\text{CH}_2-$ alifáticos.

A banda larga em torno de 3450 cm^{-1} é referente à vibração (estiramento) do grupo OH⁻ provavelmente proveniente de moléculas de água, já que o PEG é bastante higroscópico.

Figura 17. Espectro de FTIR do polietilenoglicol (Viafarma[®]).



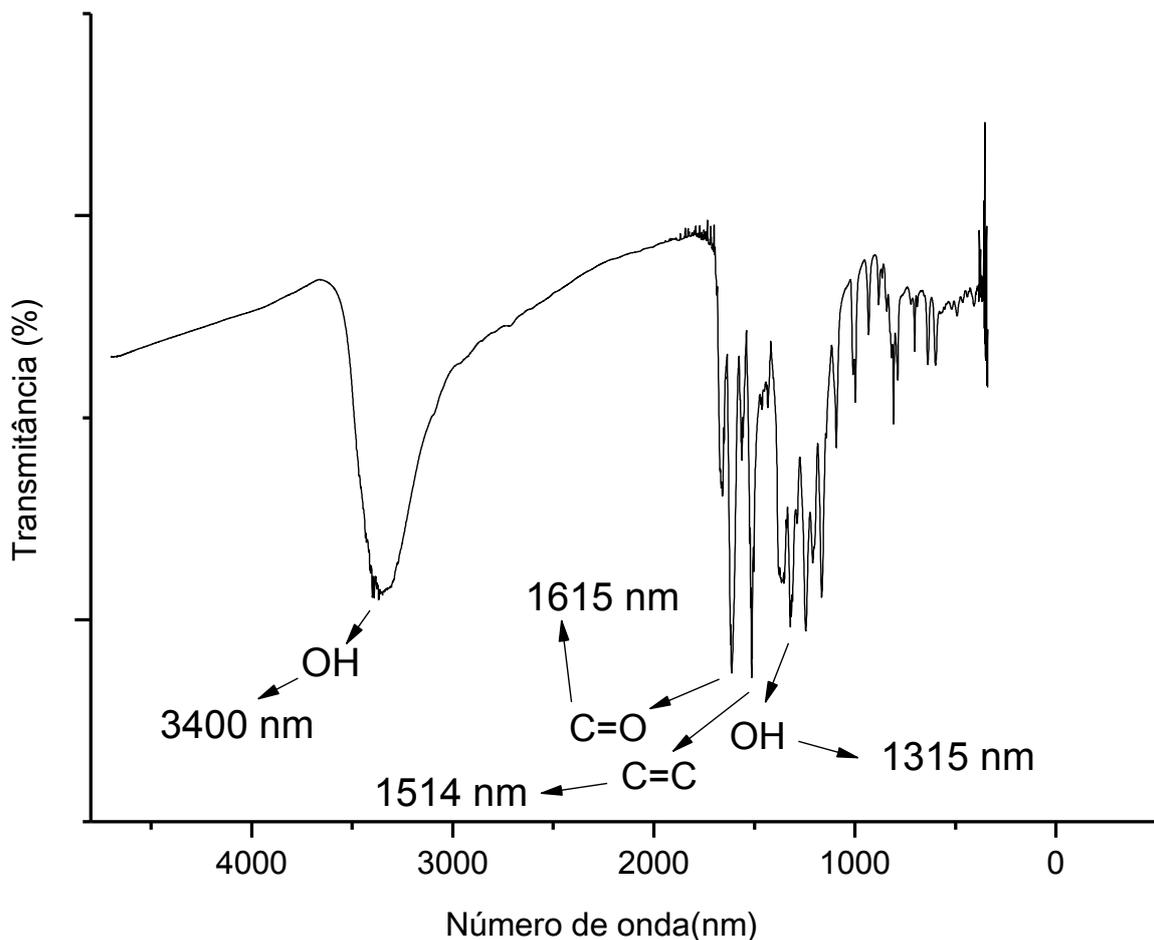
Fonte: Arquivo pessoal.

Quercetina

A quercetina foi obtida da Sigma-Aldrich® e seu espectro de FTIR é mostrado a seguir (**Figura 18**). O mesmo possui bandas em torno de 720 cm^{-1} a 1090 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação C-H do anel aromático. Entre 630 cm^{-1} e 900 cm^{-1} existem bandas referentes à deformação angular fora do plano da ligação C-H do anel aromático. Em 1160 cm^{-1} é mostrada uma banda característica da deformação axial assimétrica da ligação C-O-C e em entre 1000 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} é mostrada uma deformação axial correspondente à ligação C-O.

Em torno 1315 cm^{-1} é mostrada uma banda característica da hidroxila fenólica. Em torno 1650 cm^{-1} é mostrada uma banda referente à carbonila.

Figura 18. Espectro de FTIR da quercetina (Sigma-Aldrich®).



Fonte: Arquivo pessoal.

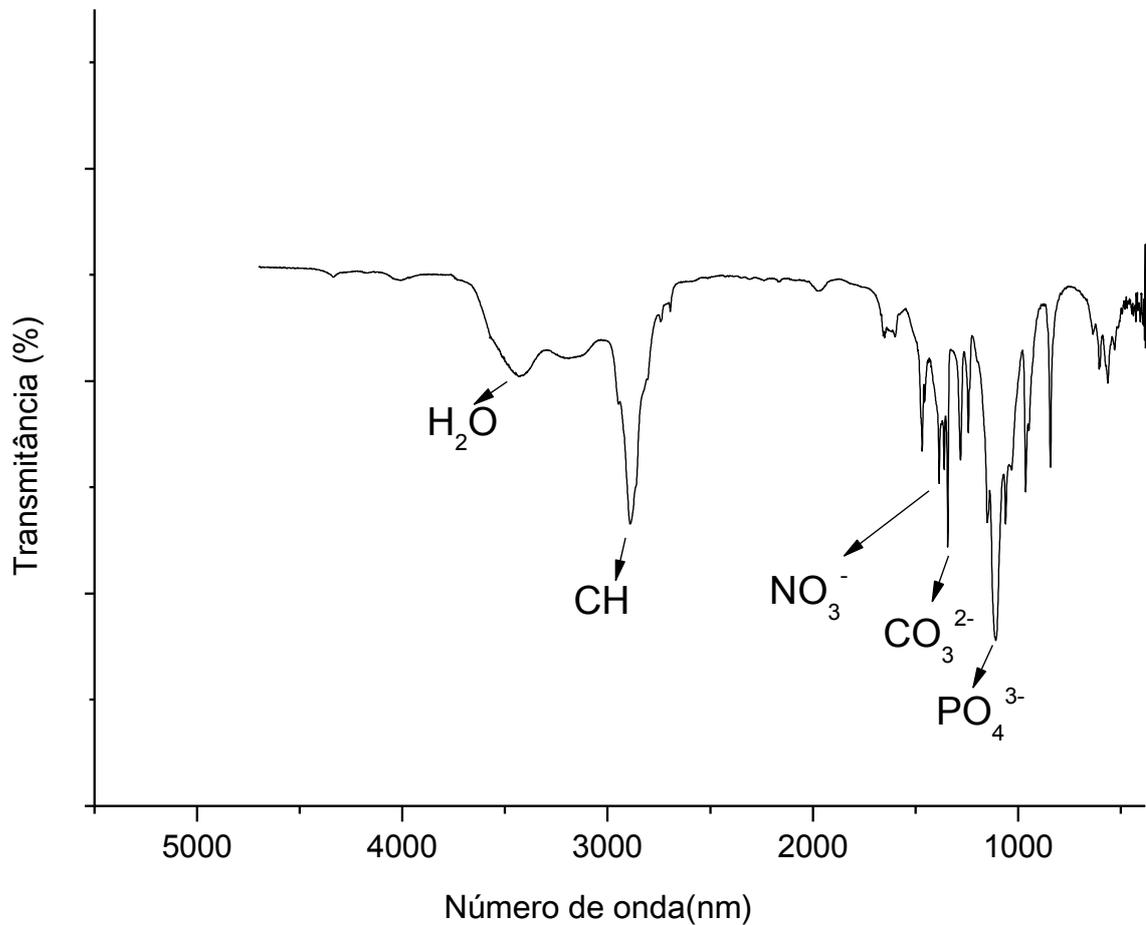
PEG8/HA2/QUE

O gráfico seguinte (**Figura 19**) apresenta o espectro de FTIR com as principais bandas de absorção do compósito PEG8/HA2/QUE. No mesmo podem-se notar bandas características das matérias primas utilizadas para o seu desenvolvimento, como a bandas que aparecem em torno de 840 cm^{-1} e 960 cm^{-1} provavelmente devido à ligação C=C da quercetina. A banda em torno de 560 cm^{-1} corresponde à deformação assimétrica da ligação P-OH do grupo HPO_4^{2-} (ELLIOTT, J.C., 1994). Uma banda observada em torno de 600 cm^{-1} corresponde à flexão do O-P-O (MA, M.-G., *et al.*, 2006). Outra banda é verificada em torno de 1100 cm^{-1} que pode ser atribuída para o modo de vibração de tetraedro regular do grupo PO_4^{3-} (YANBAO L, *et al.*, 2008). A banda observada em 1270 cm^{-1} possivelmente é devido ao estiramento do grupamento carbonato, que pode ter sido inserido ao sistema por meio da aquisição de ar durante a precipitação no processo de síntese de HA (BERTINETTI L, *et al.*, 2007). Uma banda é observada em torno de 1340 cm^{-1} e esta pode ser atribuída ao grupamento carbonato (CO_3^-) proveniente da hidroxiapatita que, como mencionado, foi sintetizada em um ambiente e não hermeticamente fechado. Observa-se outra banda em torno de 1470 cm^{-1} provavelmente devido a ligações C-H da quercetina. Outra banda é observada em torno de 1660 cm^{-1} provavelmente devida ao grupamento carbonila (C=O), derivado da quercetina. Há ainda bandas em torno de 2900 cm^{-1} provavelmente devido a adsorção de água pelo compósito (visto que o polietilenoglicol é higroscópico) e em torno de 3460 cm^{-1} devido aos íons OH^- estruturais.

Comparando-se o espectro de FTIR do compósito PEG8/HA2/QUE com o obtido com a HA, observa-se a redução das bandas correspondentes aos grupamentos fosfato, nitrato e carbonato, indicando que eles foram parcialmente consumidos no processo. Quando se compara esse mesmo resultado com o obtido do PEG, observa-se uma grande diminuição da banda correspondente ao grupamento C-H, forte indicativo desse do seu consumo.

Finalmente, ao se comparar o espectro de FTIR do referido compósito com o da quercetina, observa-se uma grande mudança nas bandas correspondentes aos grupamentos OH^- e da água e, indicando consumo e desidratação, respectivamente, durante o processo de síntese do compósito.

Figura 19. Espectro de FTIR do compósito PEG8/HA2/QUE.



Fonte: **Arquivo pessoal.**

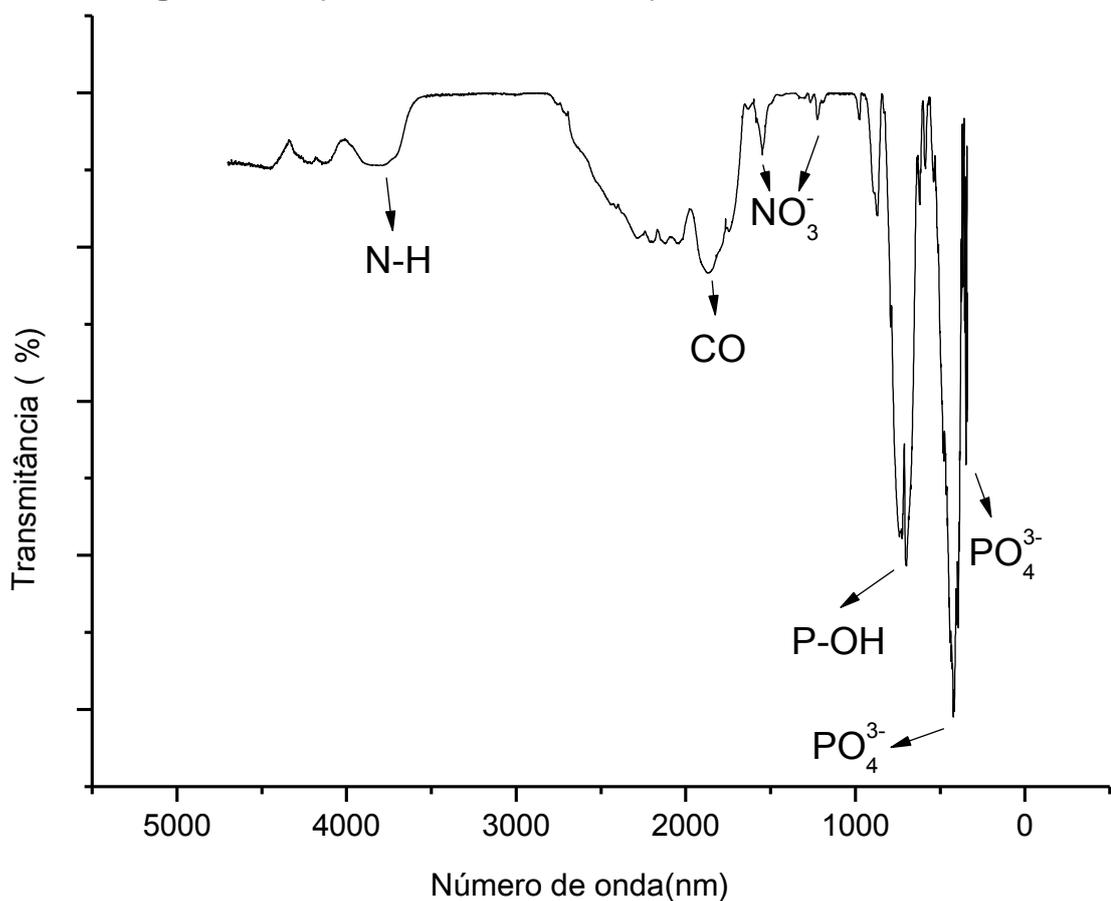
PEG6/HA4/QUE

A figura seguinte (**Figura 20**) mostra o espectro de FTIR do compósito PEG6/HA4/QUE. De forma semelhante, o mesmo também mostra bandas características das matérias primas utilizadas no seu desenvolvimento. Como o alongamento que aparece em 480 cm^{-1} corresponde ao grupamento fosfato (PO_4^{3-}) da hidroxiapatita. A banda referente à OH^- da ligação P-OH está em cerca de 740 cm^{-1} . Uma banda presente em torno de 880 cm^{-1} pode ser atribuída à ligação C-C da estrutura da quercetina. Existem bandas em torno de 1200 cm^{-1} possivelmente

devido a grupamentos nitrato (NO_3^-). Em de 870 cm^{-1} é observada uma banda que pode ser atribuída à ligação C=C da quercetina. Em 1200 cm^{-1} e em 1530 cm^{-1} observam bandas características do grupamento fosfato. Em torno 1700 cm^{-1} observa-se uma banda que pode ser atribuída à ligação C=O proveniente da quercetina. Bandas de 1800 cm^{-1} a 2190 cm^{-1} ocorrem possivelmente provenientes de algum tipo de interação química entre C e N, já que nesta região, essas bandas são características desse tipo de ligação. Uma banda larga em torno de 3600 cm^{-1} é característica de moléculas de água enquanto que outra banda em 4060 cm^{-1} pode ser atribuída aos íons OH^- .

Semelhantemente, ao se comparar o espectro de FTIR do compósito PEG6/HA4/QUE com o da HA, do PEG e da QUE, observa-se a diminuição das bandas correspondentes aos grupamentos fosfato, da hidroxiapatita, diminuição da banda referente à ligação C-H, do PEG e diminuição da quantidade de água de hidratação, da quercetina, respectivamente.

Figura 20. Espectro de FTIR do compósito PEG6/HA4/QUE.

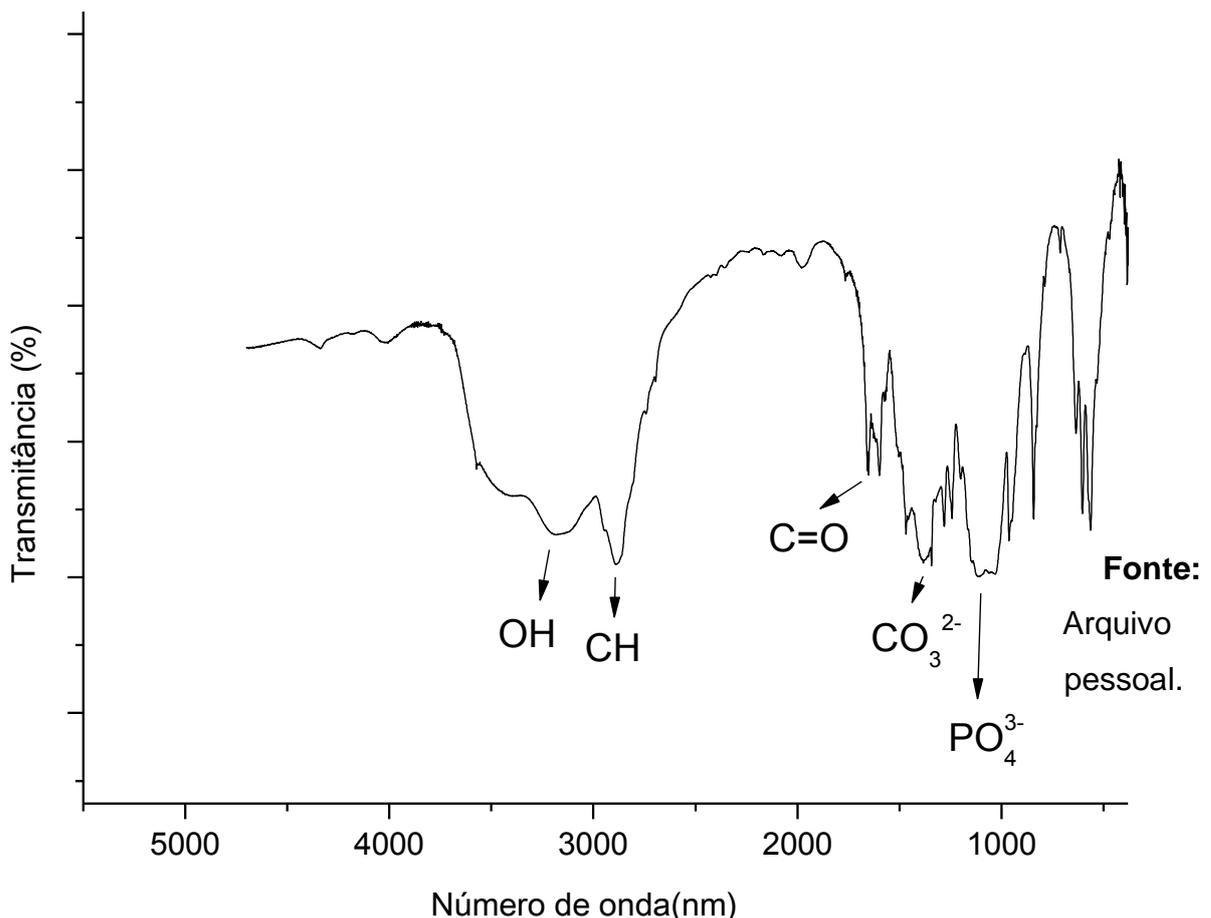


Fonte: Arquivo pessoal.

PEG5/HA5/QUE

O espectro de FTIR na figura seguinte (**Figura 21**) apresenta as principais bandas do compósito PEG5HA5/QUE. Em aproximadamente 570 cm^{-1} observa-se uma banda fina e estreita correspondente à deformação assimétrica da ligação P-OH do grupo HPO_4^{2-} (ELLIOTT, 1994). Uma banda observada em torno de 600 cm^{-1} corresponde à flexão do O-P-O (MA *et al.*, 2006). Outra banda é observada em 840 cm^{-1} que corresponde à ligação C=C proveniente da quercetina. Observa-se ainda a diminuição da banda em torno de 1080 cm^{-1} , correspondente ao grupamento PO_4^{3-} e alargamento da banda em 1400 cm^{-1} referente ao grupo CO_3^{2-} , ambas provenientes da hidroxiapatita. Em 1470 cm^{-1} observa-se a diminuição da banda referente à ligação C-H proveniente da quercetina e em 1660 cm^{-1} uma banda correspondente à ligação C=O. Em torno de 2900 cm^{-1} e em 3300 cm^{-1} visualizam-se bandas referentes à H_2O e a grupamentos OH^- , respectivamente.

Figura 21. Espectro de FTIR do compósito PEG5/HA5/QUE.

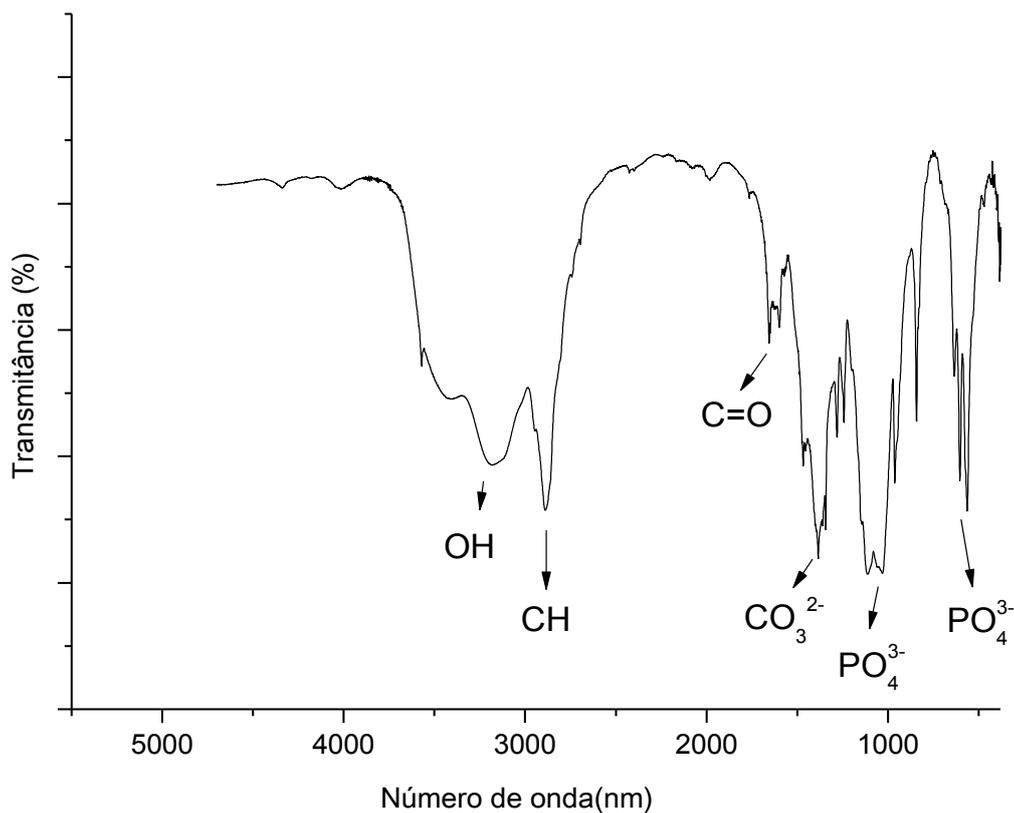


PEG4/HA6/QUE

As bandas referentes aos grupos funcionais do compósito PEG4HA6/QUE são evidenciados na **Figura 22**. Em suma, suas bandas de absorção são bem semelhantes ao compósito PEG5HA5/QUE. Em aproximadamente 565 cm^{-1} observa-se uma banda fina e estreita correspondente à deformação da ligação P-OH do grupo HPO_4^{2-} (ELLIOTT, 1994).

Outra banda observada em torno de 600 cm^{-1} corresponde ao grupo O-P-O (MA et al., 2006). Em 840 cm^{-1} observa-se uma banda que corresponde à ligação C=C proveniente da quercetina. Visualizam-se ainda duas bandas em torno de 1030 cm^{-1} e 1125 cm^{-1} , correspondentes ao grupamento PO_4^{3-} e alargamento da banda em 1390 cm^{-1} referente ao grupo CO_3^{2-} , ambas provenientes da hidroxiapatita. Em 1670 cm^{-1} observa-se uma banda correspondente à ligação C=O. Em 2920 cm^{-1} e em 3310 cm^{-1} visualizam-se bandas referentes à H_2O e a grupamentos OH, respectivamente.

Figura 22. Espectro de FTIR do compósito PEG4/HA6/QUE.



Fonte: Arquivo pessoal

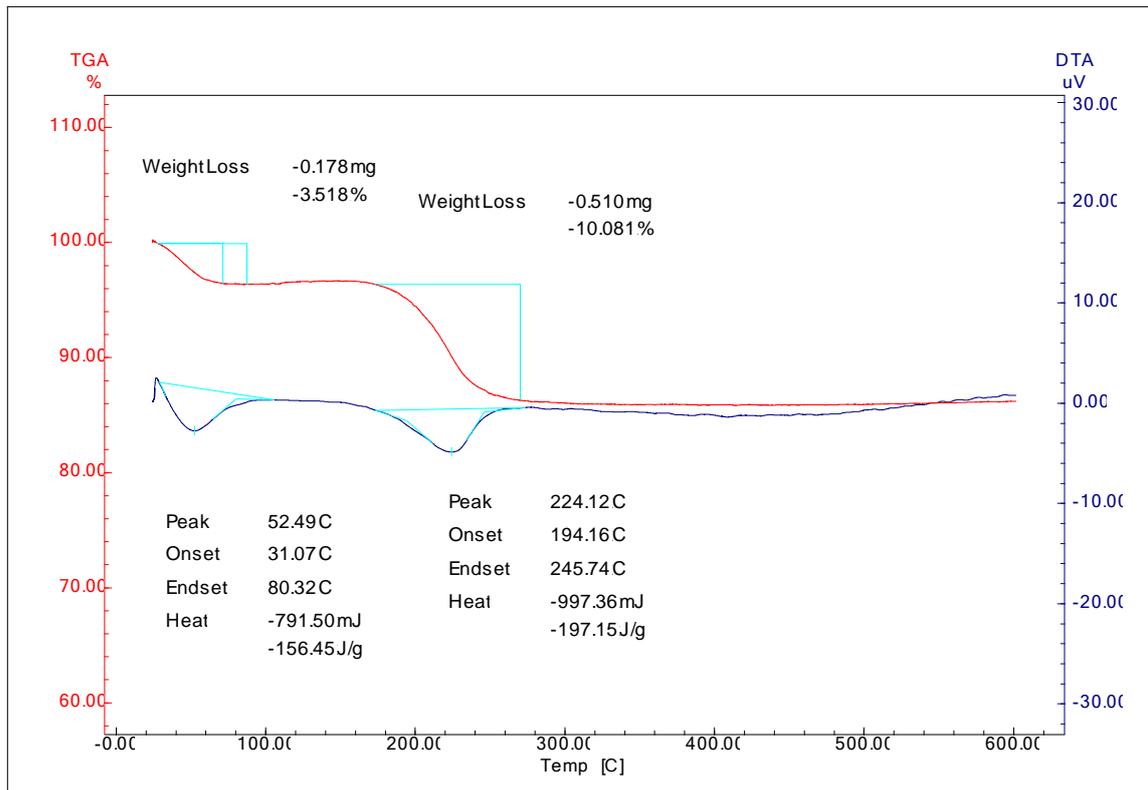
5.3.1.6. Termogravimetria (TG) associada à análise térmica diferencial (DTA)

Hidroxiapatita

A análise térmica das matérias primas e dos compósitos foi realizada utilizando a mesma metodologia e em cada análise utilizou-se entre 5 e 10 mg de cada amostra.

Verifica-se que as perdas de massas são acompanhadas de sucessivas variações de energia, com eventos endotérmicos e exotérmicos se alternando entre si, fato evidenciado por meio dos experimentos de TG/DTA (**Figura 23**).

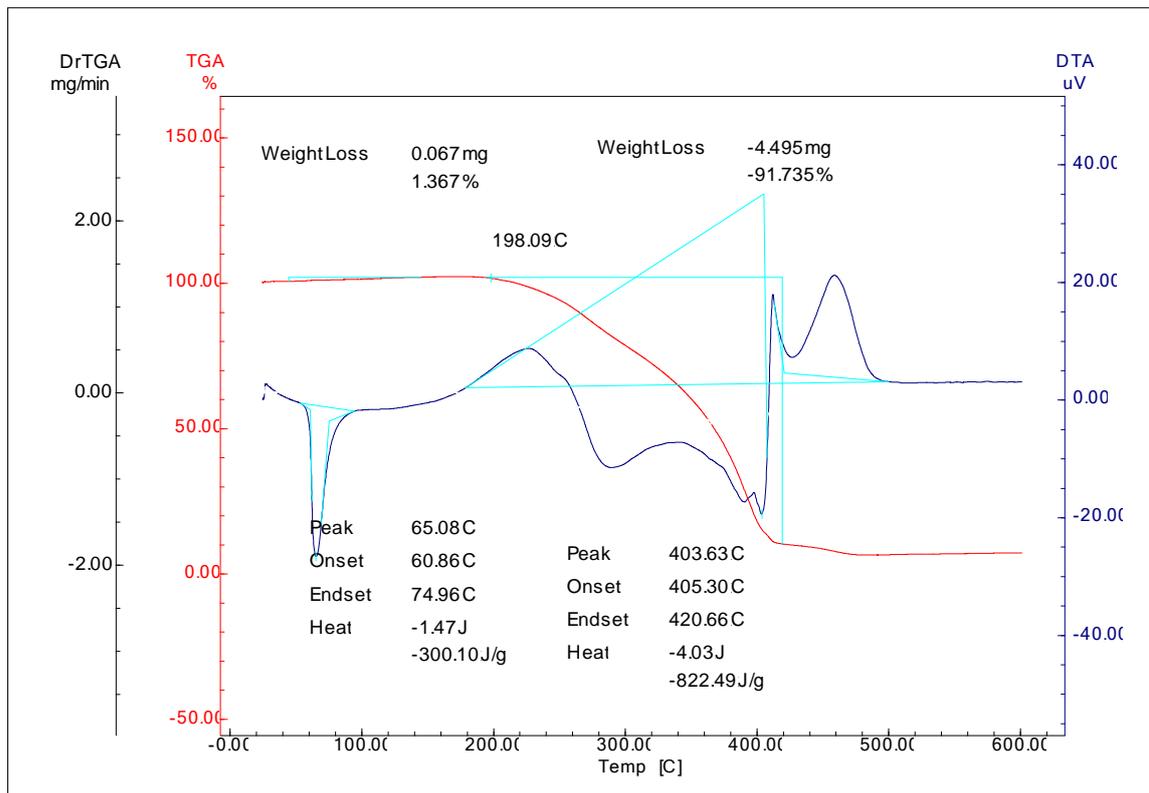
O aquecimento da hidroxiapatita geralmente provoca uma diminuição de peso e o TG/DTA da hidroxiapatita com essas variações é mostrado na **Figura 23**. No mesmo, é observado um evento que se inicia em 31,07°C e finaliza em 80,32°C com perda de massa igual a 3,51% (0,178 mg) possivelmente relacionado a perda de solvente ou água adsorvida à estrutura. Em 194,16°C inicia-se um evento endotérmico possivelmente relacionado à água intersticial agregada ao material. Esse evento finaliza em 245,74°C e é acompanhado por uma perda de massa de 10,08% (cerca de 0,510 mg). O gráfico mostra ainda que a partir de 270°C a taxa de perda de massa praticamente se mantém constante.

Figura 23. TG/DTA da hidroxiapatita produzida no laboratório.

Fonte: Arquivo pessoal.

Polietilenoglicol

O gráfico de TG/DTA do polietilenoglicol é apresentado na **Figura 24**. Em 60,86°C inicia-se um processo endotérmico referente ao ponto de fusão do polietilenoglicol com entalpia de fusão igual a 309,8 J/g. Esse evento ocorre com aumento de massa correspondente a 1,36% (cerca de 0,067 mg) possivelmente relacionado a adsorção de água ao polímero, já que o mesmo é bastante higroscópico. Outro evento endotérmico é iniciado em 198,09°C e finaliza em 420,66°C e é acompanhado com uma perda de massa de 91,73% (4,49 mg) e um resíduo de 8,27%, sugerindo que o mesmo é um composto orgânico relativamente puro. Esse evento está relacionado à decomposição do material. A curva da termogravimetria derivada (DTG) confirma essa decomposição principal, mas são observadas duas etapas de degradação, o que corrobora a curva de DTA.

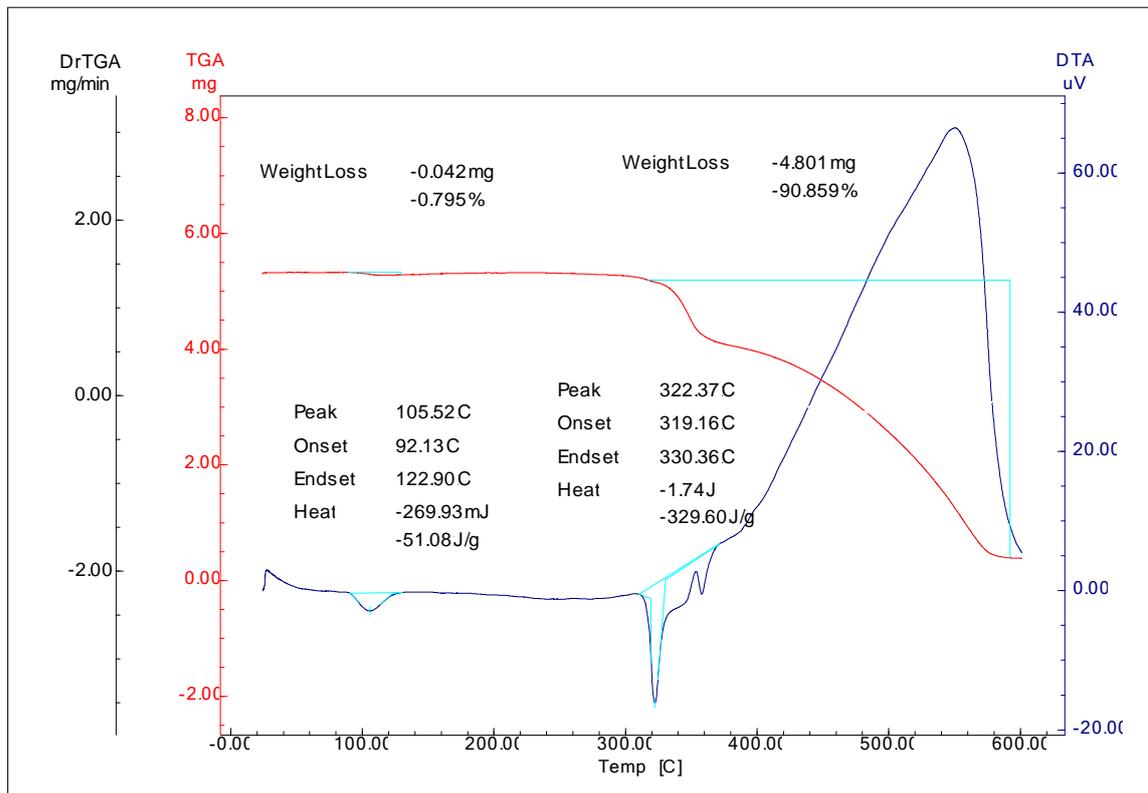
Figura 24. TG/DTA do polietilenoglicol.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quercetina

O gráfico a seguir mostra a curva de TG/DTG da quercetina (**Figura 25**) como também as degradações térmicas que ocorrem em algumas etapas significativas. Nessas curvas observam-se duas leves inclinações, uma que inicia em 92,13°C com diminuição de massa de 0,79% (correspondendo a 0,042 mg), possivelmente devido a perda de água de cristalização. Outra que se inicia em 319,16°C e termina em 330,36°C, correspondente a uma perda de massa de 90,85% (4,801 mg) facilmente explicada, uma vez que se sabe que a quercetina funde-se com decomposição, ou seja, a partir da temperatura em que se inicia a fusão, inicia a decomposição da substância (BUCKINGHAN, J., 1983; BUDAVARI, S., 1996).

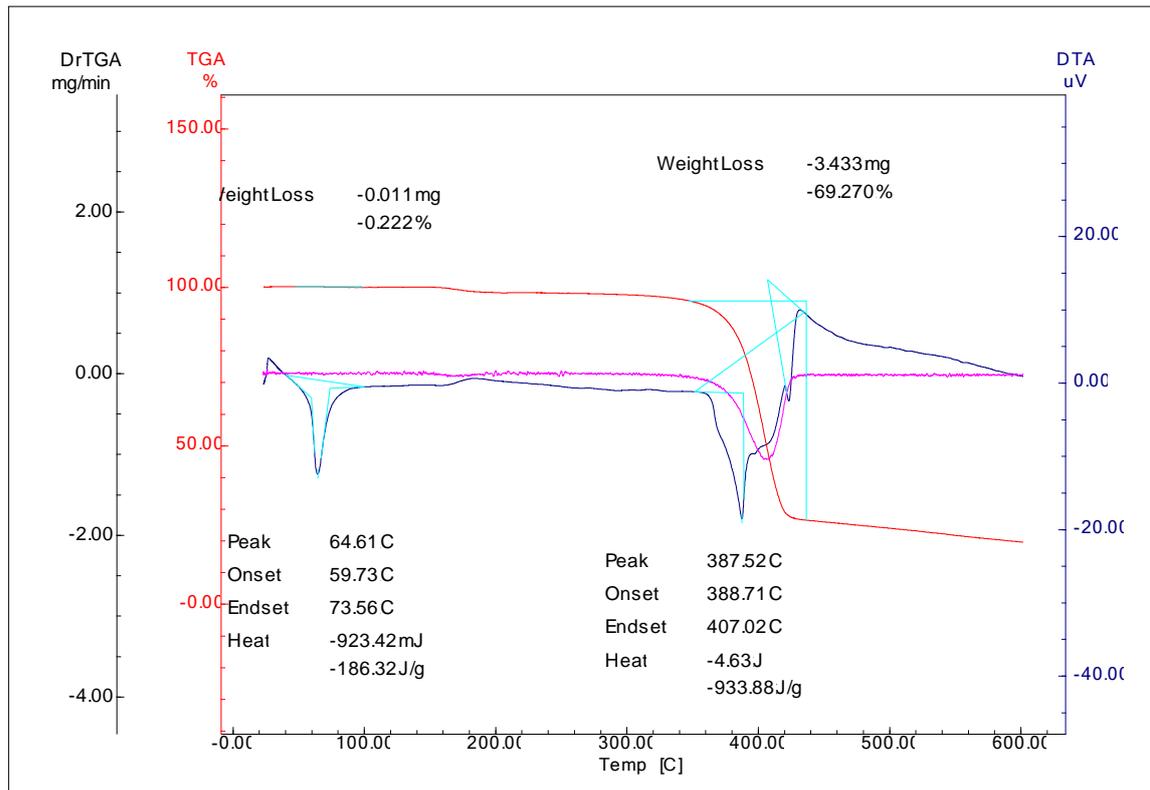
Figura 25.TG/DTA da quercetina.



Fonte: Arquivo pessoal.

PEG8/HA2/QUE

As figuras seguintes (**Figuras 26 a 29**) apresentam as curvas TG/DTG dos compósitos PEG8/HA2/QUE, PEG6/HA4/QUE, PEG5/HA5/QUE e PEG4/HA6/QUE como também as principais degradações térmicas. As curvas de TG/DTG do compósito PEG8/HA2/QUE são mostradas na figura 5.15. Um evento endotérmico é visualizado em 64,61°C possivelmente devido à fusão do polietilenoglicol. Outro evento é observado em 388,71°C possivelmente devido ao deslocamento do ponto de fusão (processo endotérmico) e degradação (processo exotérmico) da quercetina.

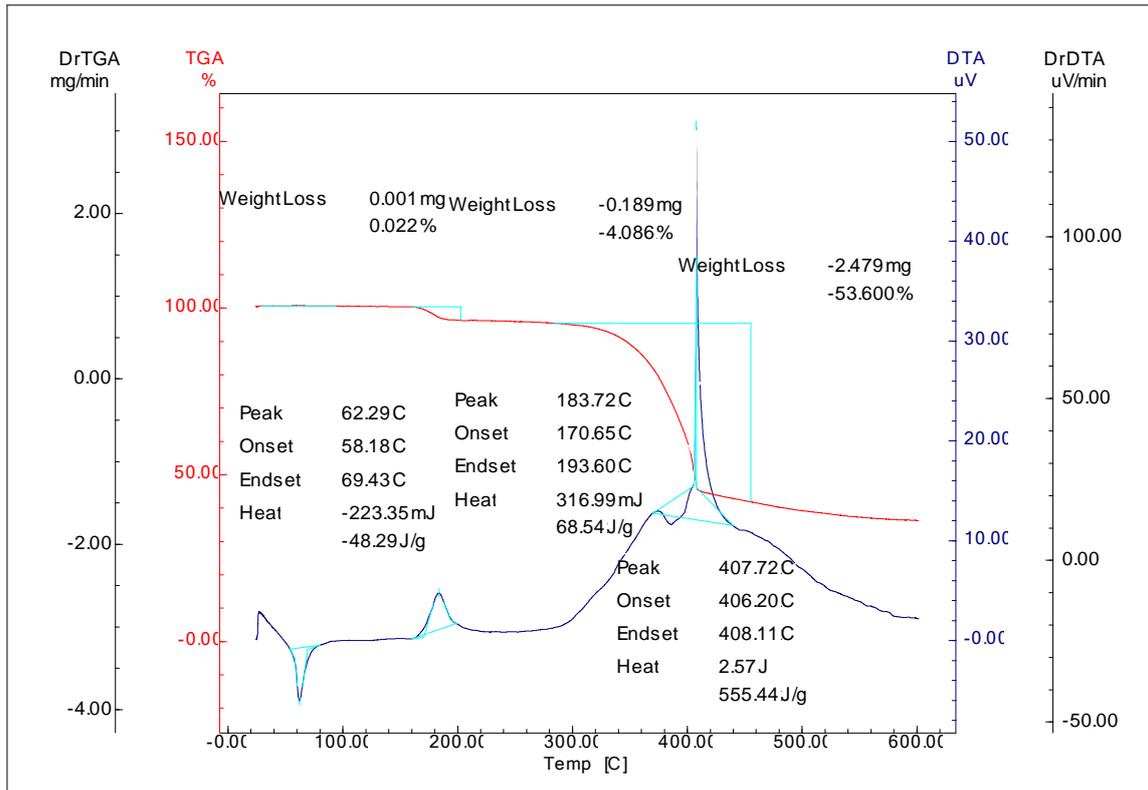
Figura 26. TG/DTA do compósito PEG8/HA2/QUE.

Fonte: Arquivo pessoal.

PEG6/HA4/QUE

As curvas de TG/DTG do compósito PEG6/HA4/QUE são mostradas na **Figura 27**. O mesmo evento endotérmico é visualizado em 62,29°C (fusão do PEG). Um evento exotérmico é observado em 183,72°C que é característico de uma possível desordem cristalina ou amorfização do fármaco. Em 407,72°C ocorre outro pico possivelmente devido ao deslocamento do ponto de fusão e degradação da quercetina.

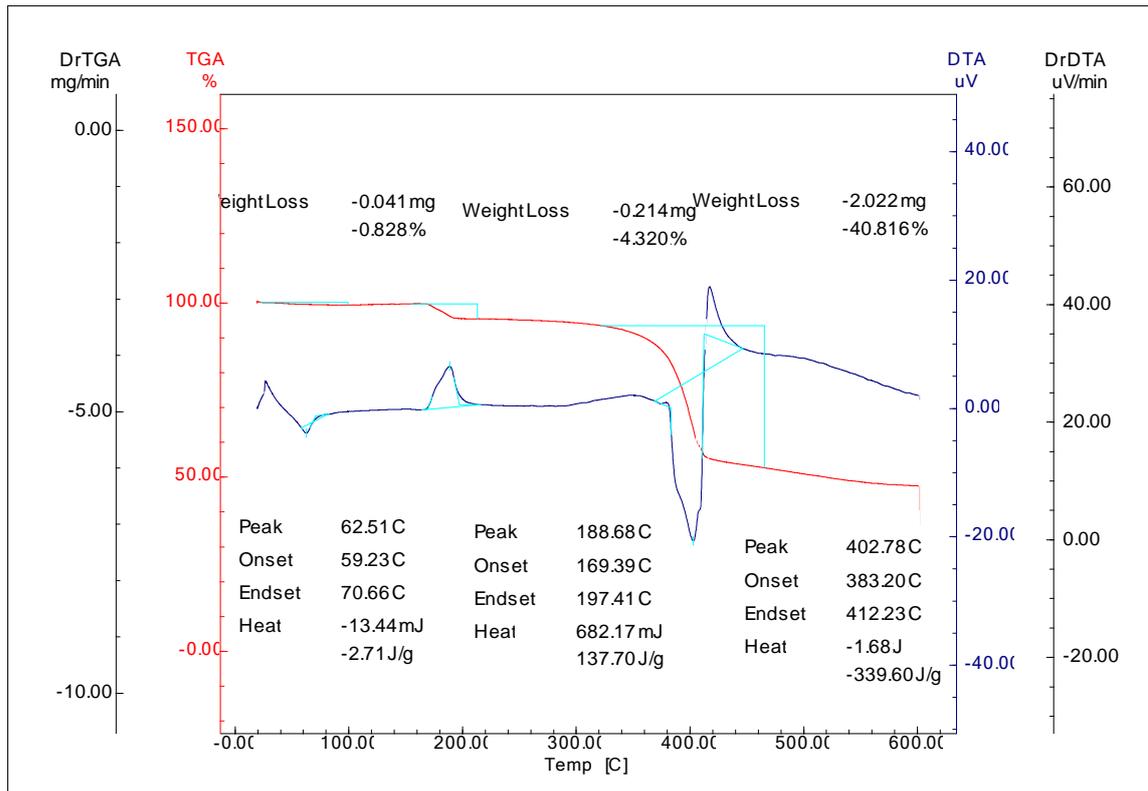
Figura 27. TG/DTA do compósito PEG6/HA4/QUE.



Fonte: Arquivo pessoal.

PEG5/HA5/QUE

As curvas de TG/DTG do compósito PEG5/HA5/QUE são mostradas na **Figura 28**. Como já é conhecido, ocorre a fusão do PEG em aproximadamente 62,51°C. O mesmo evento exotérmico é visualizado em 188,68°C (como mencionado, provavelmente devido à desordem cristalina ou amorfização). Um evento exotérmico é observado em 402,78°C que é possivelmente devido ao deslocamento do ponto de fusão e degradação da quercetina.

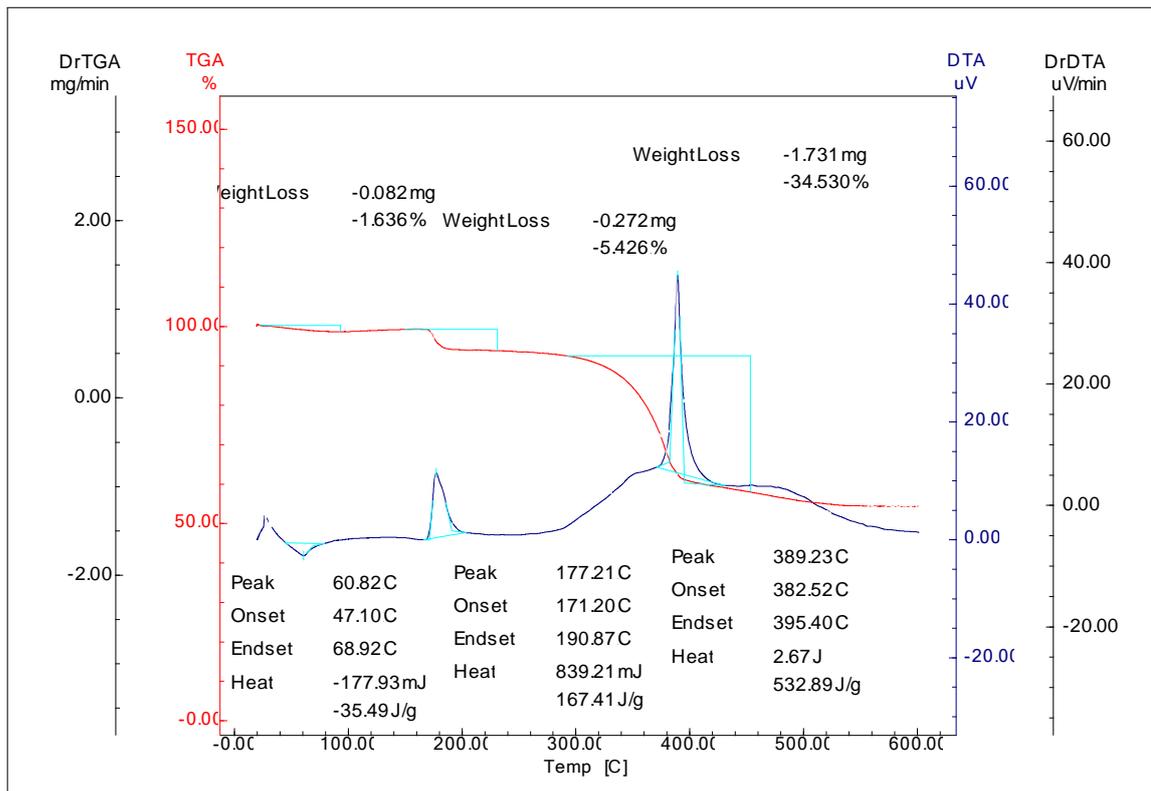
Figura 28. TG/DTA do compósito PEG5/HA5/QUE.

Fonte: Arquivo pessoal.

PEG4/HA6/QUE

Por fim, as curvas de TG/DTG do compósito PEG4/HA6/QUE são mostradas na **Figura 29**. A mesma apresenta eventos semelhantes aos já citados anteriormente, como fusão do polietilenoglicol em aproximadamente 60,82°C, desordem cristalina ou amortização do fármaco em aproximadamente 177,21°C e fusão e degradação da quercetina em aproximadamente 389,23°C.

Figura 29. TG/DTA do compósito PEG4/HA6/QUE.



Fonte: Arquivo pessoal.

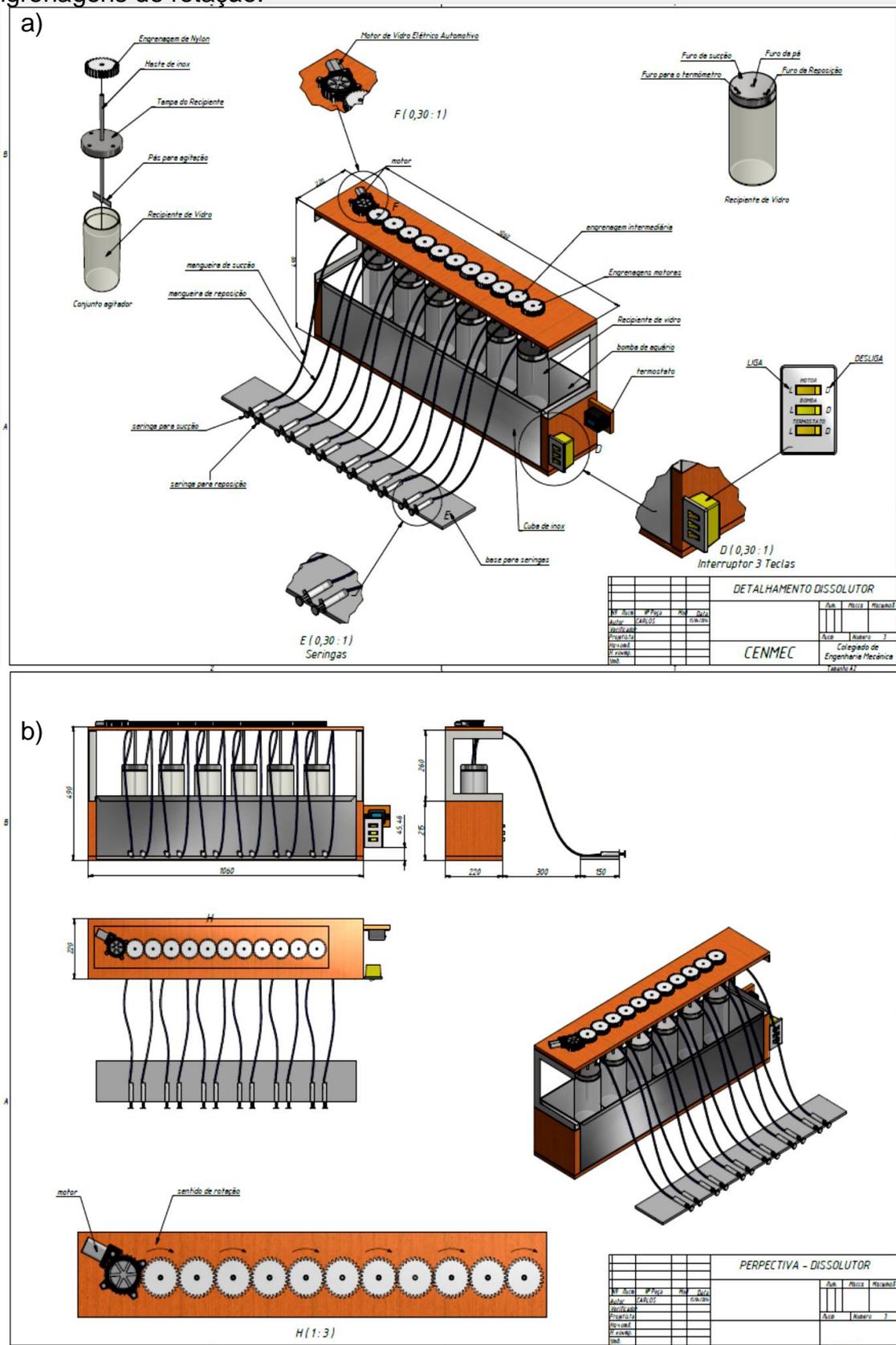
O compósito que apresentou maior deslocamento da temperatura de fusão/degradação foi a PEG5/HA5/QUE (aproximadamente 403°C). O deslocamento do ponto de fusão/degradação da quercetina é extremamente importante, pois indica que houve incorporação da mesma na estrutura do compósito polímero/cerâmica. Isso sugere que existe interação química entre a quercetina e os componentes da matriz de incorporação (hidroxiapatita e polietilenoglicol) uma vez que essas substâncias blindaram o cerne da quercetina.

Isso é muito interessante, pois contribui para que o sistema seja uma matriz de liberação prolongada, sendo que ocorre diminuição da solubilidade da matriz, aumentando assim, o tempo de degradação da mesma.

5.4. Construção do dissolutor *HM-RJ/CF01* para o ensaio de liberação *in vitro*

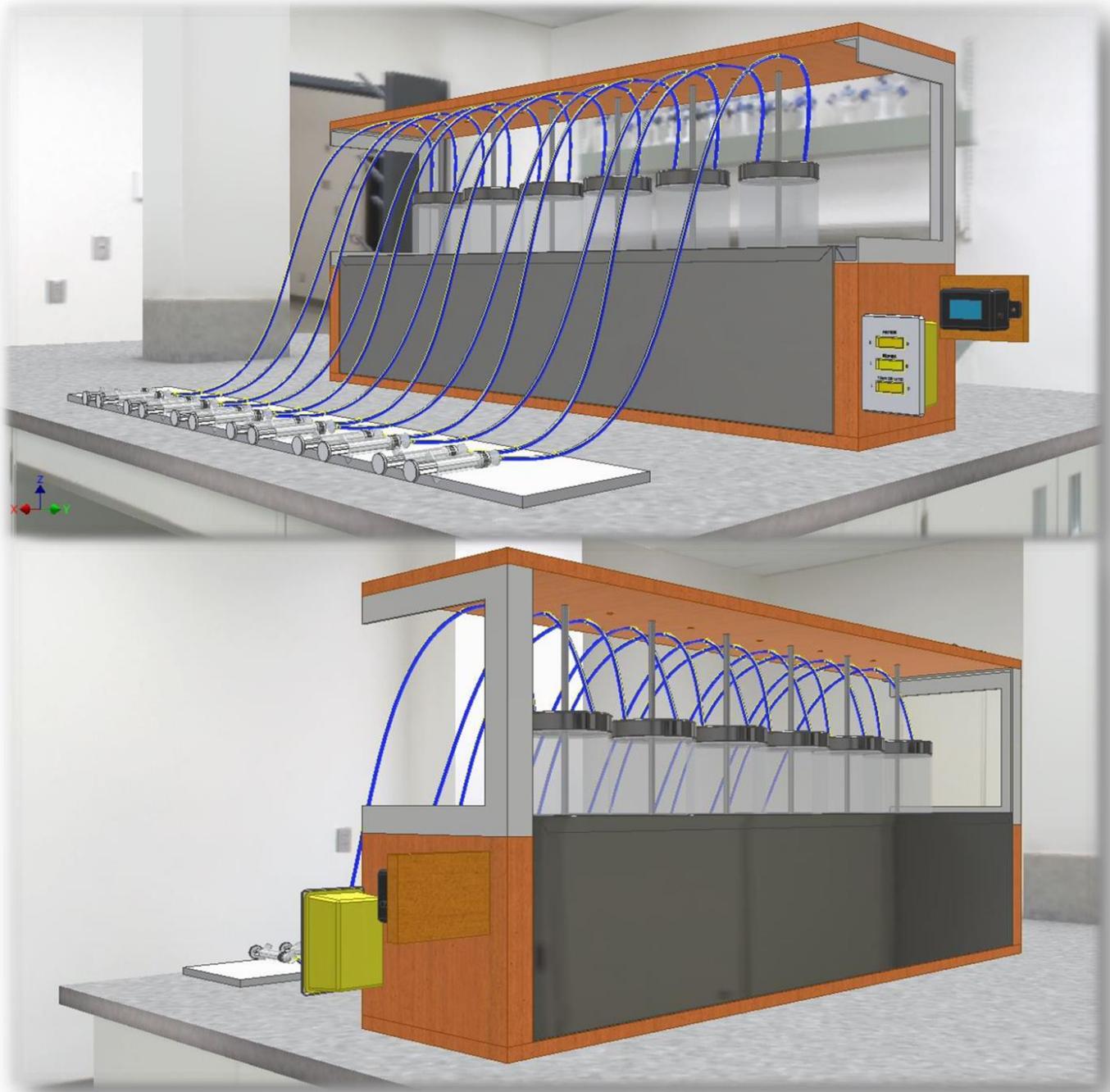
O dissolutor foi projetado seguindo um alinhamento com a aparência e funcionalidade de produtos comerciais disponíveis conhecidos e possibilidade de construção sem maiores problemas. A racionalização geral de funcionamento do equipamento projetado foi conseguida da seguinte maneira, evidenciado na **Figura 30 e 31**, a qual exhibe o projeto do dissolutor: Nele evidencia-se a presença de chaves de interruptores que acionam um motor (de vidro de carro) que por sua vez tracionam um conjunto de engrenagens de *nylon* resistentes, as quais são conectadas em hastes de inox cada uma com uma pá em uma das extremidades. Cada pá fica mergulhada em uma cuba individual que possui a solução de SBF com a formulação a ser analisada. O equipamento, conta ainda com um grande reservatório de inox que serve acondicionamento de água, a qual será aquecida a temperatura apropriada para os testes. Abaixo do compartimento de aço inox, foi instalado uma resistência elétrica em forma de U que é acionada por um termostato com faixa de trabalho que varia entre -15 °C e 70 °C. Esse termostato é regulado para manter a temperatura constante em 37 °C (+/- 0,5 °C). Para evitar um aquecimento não uniforme no dissolutor, acoplou-se ao mesmo uma bomba (de aquário) que tem como função manter água do reservatório em constante circulação. No projeto do aparelho existe um sistema de sucção/reposição de soluções que é composto por um conjunto de seringas de 20 mL conectadas e equipos (tubos de soro) que por sua vez, se conectam as cubas de dissolução. A tampa de cada cuba de dissolução possui 4 furos: 1 para a haste de agitação (eixo central). Outro para a passagem de um termômetro para monitoramento da temperatura e mais dois para os cateteres de sucção e reposição de soluções.

Figura 30. Projeto do dissolutor *HM-RJ/CF01* utilizado no ensaio de liberação *In vitro*. (a) detalhamento dos componentes e dimensões, (b) detalhamento das engrenagens de rotação.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 31. Dissolutor *HM-RJ/CF01*: (a) perspectiva da parte frontal (destaque para as cubas de dissolução, interruptores e seringas de sucção e reposição); (b) visualização da parte posterior.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.4.1. Construção do Dissolutor

A construção do dissolutor foi permitida com o investimento de R\$ 1.746,95 (**Tabela 2**), que representa cerca de 3,2 % do investimento em dissolutores comercialmente disponíveis (cotação nº 260922, da INTERCONTROL, para um aparelho com 6 cubas de dissolução, referência FM 00013), mostrando que é perfeitamente viável desenvolver esse como também outros tipos de equipamentos na própria Universidade para fins acadêmicos. Destaca-se ainda, que a construção do equipamento *HM-RJ/CF01* no sentido de se avaliar perfis de liberação de fármacos está aliado a um baixo custo e retornos científicos e tecnológicos valiosos.

Tabela 2. Relação entre as quantidades e valores que foram investidos na construção do dissolutor utilizado neste trabalho (gastos com materiais e mão de obra).

PRODUTO	QUANTIDADE	VALOR UNIT. (R\$)	VALOR TOTAL DO PRODUTO (R\$)	SERVIÇO (Mão de obra) (R\$)	VALOR TOTAL COM MÃO DE OBRA (R\$)
<i>Placas de madeira</i>	2	30,00	60,00	-	60,00
<i>Rolamentos</i>	12	5,40	64,80	-	64,80
<i>Hastes de inox</i>	1	49,25	49,25	-	49,25
<i>Nylon</i>	24 cm	68,00	68,00	-	68,00
<i>Pás</i>	6 pás	5,00	30,00	Soldagem das pás	30,00
<i>Potes de vidro</i>	8	18,00	144,00	-	144,00
<i>Motor</i>	1	50,00	50,00	-	50,00
<i>Resistência Elétrica</i>	1	67,00	67,00	-	67,00
<i>Cuba de inox</i>	1	500,00	500,00	-	500,00
<i>Madeira para calço</i>	1	5,00	5,00	-	5,00
<i>Tomada</i>	1	3,20	3,20	-	3,20
<i>Equipo</i>	14	1,50	21,00	-	21,00
<i>Seringas</i>	14	1,00	14,00	-	14,00
<i>Porcas</i>	10	0,35	3,50	-	3,50
<i>Contactora elétrica</i>	1	54,00	54,00	-	54,00
<i>Parafusos</i>	20	0,50	10,00	-	10,00
<i>Serra copo</i>	1	50,00	50,00	-	50,00
<i>Arruelas de borracha</i>	14	0,50	7,00	-	7,00
<i>Linha de nylon</i>	1	2,00	2,00	-	2,00
<i>Termômetro</i>	8	27,15	217,20	-	217,20
<i>Termostato</i>	1	136,90	136,90	-	136,90
<i>Bomba d'água</i>	1	45,00	45,00	-	45,00
<i>Interruptor</i>	3	2,35	7,05	-	7,05
<i>Tomadas</i>	3	6,35	19,05	-	19,05
<i>Caixinha de Luz</i>	2	0,50	1,00	-	1,00
<i>Tubos falcon</i>	100	1,18	118,00	-	118,00
<i>Serviços de Moto-taxi</i>				8 viagens: 40,00	40,00
INVESTIMENTO TOTAL					1.746,95

Fonte: Arquivo pessoal.

O aparelho desenvolvido no Laboratório de Ensaio de Materiais do Colegiado de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Vale do São Francisco mostrou-se equivalente aos modelos de equipamentos comumente utilizados para avaliar o perfil de liberação de fármacos em meios de dissolução com aparato do tipo pás, que são indicados para estes testes e respondem de forma mais genérica a diferentes tipos de formulações. É importante salientar que esse tipo de aparelho é precursor dos demais, utilizados na avaliação de perfis de liberação de fármacos. Na ausência e/ou inoperância dos mesmos, utiliza-se o aparelho preconizado pela monografia do teste para avaliar o perfil de dissolução, sendo que o mesmo deve simular, de maneira satisfatória, condições similares ao organismo humano, como sais tamponados, agitação e temperatura constante (**Figura 32**).

Neste sentido, o aparelho dissolutor construído para o ensaio de liberação *in vitro* de quercetina mostrou-se totalmente viável à proposta inicial, com temperatura e rotação de funcionamento semelhante às especificações que são preconizadas pela farmacopeia brasileira e americana (USP) (**Tabela 3**).

A taxa de aquecimento do meio de dissolução dentro das cubas de análise foi proporcional à quantidade de água colocada no reservatório, sendo que, quanto maior a sua quantidade, mais rapidamente o meio de dissolução chegava à temperatura desejada ($37 \pm 0,5$ °C), permanecendo constante nessa temperatura. O sistema de circulação de água (composto basicamente por uma bomba de aquário) também se mostrou perfeitamente eficaz, deixando o reservatório com temperatura homogênea em toda a sua extensão.

A rotação do mesmo foi de aproximadamente 50 rotações por minuto (rpm), condizente com a dos aparelhos utilizados para esse fim. A mesma rotação foi imposta a todas as cubas com os meios de dissolução, pois as engrenagens utilizadas no equipamento eram praticamente iguais em tamanho, forma e nas demais dimensões.

O sistema de sucção e de reposição do meio de dissolução também se mostrou eficaz, não apresentando vazamentos ou outras intempéries que porventura viessem a inviabilizar a coleta e/ou a reposição das soluções utilizadas no teste de dissolução. O mesmo é fácil de operar, robusto e não permite variações de rotação no meio de dissolução.

Figura 32. Dissolutor *HM-RJ/CF01* construído neste trabalho para o ensaio de liberação *In vitro*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 3. Especificações da Farmacopeia brasileira, americana (USP) e do dissolutor produzido neste trabalho para algumas peças (aparato 2, com valores em mm).

		FARMACOPÉIA BRASILEIRA	USP	DISSOLUTOR HM-RJ/CF01
CUBA DE DISSOLUÇÃO	DIÂMETRO (mm)	102 +/- 4	98 - 106	110
	ALTURA (mm)	185 +/- 25	160 - 210	180
PÁS DE AGITAÇÃO	ALTURA (mm)	19 +/- 0,5	19 +/- 0,5	14
	LARGURA (mm)	4 +/- 10	4 +/- 10	2
	COMPRIMENTO (mm)	74 - 75	74 - 75	65
	DISTÂNCIA PARA O FUNDO DA CUBA (mm)	25 +/- 2	25 +/- 2	25
HASTE DE AGITAÇÃO	DIÂMETRO (mm)	9,4 - 10,1	9,4 - 10,1	8
	COMPRIMENTO (mm)	Não especificado	Não especificado	250
CENTRO (mm)	-	Não especificado	+/- 2 mm da linha do centro	Não especificado
VELOCIDADE (rpm)	-	Monografia individual	25 - 75	50
TEMPERATURA DO VASO (°C)	-	37 +/- 0,5	37 +/- 0,5	37 +/- 0,5
PERPENDICULARIDADE DAS HASTES (°)	1	Não especificado	Não especificado	-0,1
	2			-0,2
	3			+0,2
	4			+0,3
	5			-0,1
	6			+0,1
BAMBOLEIO DAS HASTES (mm)	1	Não especificado	Não especificado	-0,3
	2			-0,2
	3			0,4
	4			-0,1
	5			0,3
	6			0,4
BAMBOLEIO DAS CUBAS (mm)	1	Não especificado	Não especificado	+0,2
	2			-0,1
	3			-0,4
	4			+0,1
	5			0,3
	6			0,2
INCLINAÇÃO DA BANCADA (°)	1	Não especificado	Não especificado	0,0
	2			0,0
	3			0,0
	4			0,0
	5			0,0
	6			0,0

Fonte: (TECHNOLOGY, P., 2007)

5.4.2. Qualificação do sistema de dissolução HM-RJ/CF01

5.4.2.1. Qualificação física do equipamento

O equipamento foi qualificado fisicamente por um engenheiro mecânico (Figura 33) através da medição de alguns parâmetros como rotação, perpendicularidade, profundidade e bamboleio das hastes, inclinação do dissolutor e da mesa que contém o dissolutor como também temperatura das cubas.

Figura 33. Laudo de validação do dissolutor HM-RJ/CF01 utilizado no ensaio de liberação *in vitro*.

CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO
<p><u>Legenda</u></p> <p>VR: Valor de Referência</p> <p>SMC: Sistema de Medição a Calibrar</p>
<p><u>Observações</u></p> <p>A incerteza expandida de medição (U) relatada é declarada como a incerteza padrão de medição multiplicada pelo fator de abrangência (k), o qual para uma distribuição t com V_{ref} graus de liberdade efetivos correspondem a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95%. A incerteza padrão da medição foi determinada de acordo com a publicação EA-4/02.</p>
<p>Petrolina, 05 de agosto de 2014.</p>
<p><i>João Bismarck de Azevedo</i> Engº Mecânico</p> <p>Prof. Dr. João Bismarck de Azevedo Docente Mat. 1204651 UNIVASF</p>

Fonte: Arquivo pessoal.

5.4.2.2. Avaliação de desempenho (Qualificação química)

Após a análise do teor do comprimido de prednisona dissolvido no tempo de 30 min, foi possível observar que 97,3% de prednisona encontrava-se dissolvida no meio, estando esses valores dentro do intervalo preconizado pela farmacopeia americana (USP 37, 2014). Assim sendo, aparelho de dissolução *HM-RJ/CF01* foi considerado qualificado sendo adequado para realização de ensaios de dissolução de produtos farmacêuticos.

5.5. Desenvolvimento do método de quantificação da quercetina no meio de liberação controlada

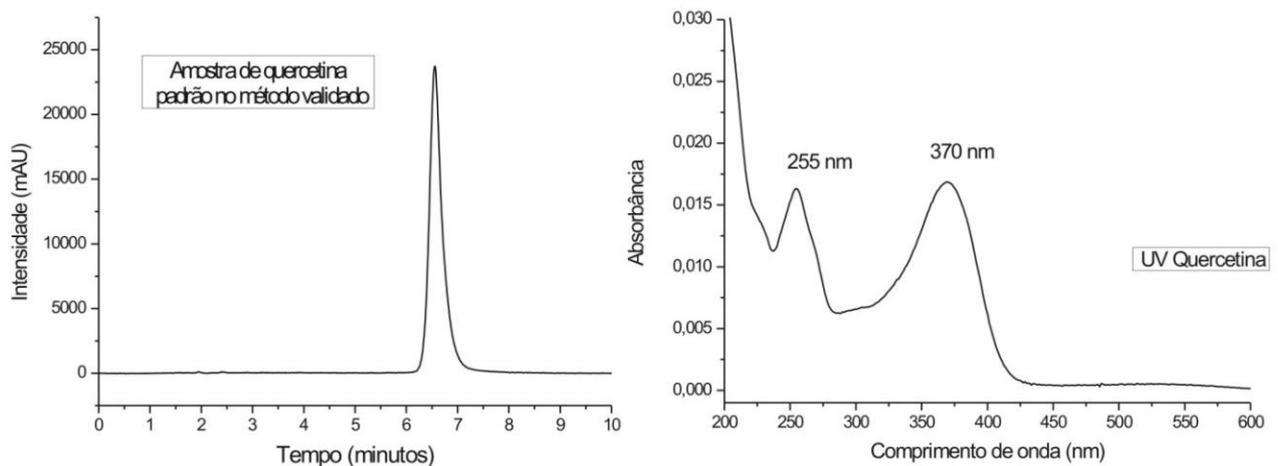
A performance do sistema cromatográfico escolhido foi avaliada de acordo com os parâmetros: fator de capacidade, resolução entre os picos, fator de assimetria e número de pratos. O valor da resolução média da quercetina nas amostras foi de 9,75 ($\pm 0,62$) para a concentração de 10 mg/L, 6,21 ($\pm 0,55$) para a concentração de 60 mg/L e 4,29 ($\pm 0,06$) para a concentração de 120 mg/L, sendo superiores a 2,00, indicando separação eficaz entre os constituintes. O fator médio de assimetria da quercetina foi de 1,38 ($\pm 0,02$) para a concentração de 10 mg/L, 1,35 ($\pm 0,02$) para a concentração de 60 mg/L e 1,003 ($\pm 0,016$) para a concentração de 120 mg/L, apresentando, portanto, valores inferiores a 1,5, descrito na literatura como aceitável para amostras de interesse, bem como o número de pratos teóricos médio foi 22604 (± 801) para a concentração de 10 mg/L, 21344 (± 802) para a concentração de 60 mg/L e 7844 (± 194) para a concentração de 120 mg/L (USP 37 – NF 32, 2014).

5.6. Validação do método de quantificação da quercetina no meio de liberação controlada

5.6.1. Especificidade e Seletividade

O cromatograma da quercetina apresentou picos sem sobreposição de interferentes, constituindo um método seletivo. A quercetina foi avaliada no comprimento de onda apropriado, indicado na literatura: 370 nm. O comprimento de onda é conhecido como lambda máximo ($\lambda_{\text{máx.}}$), o qual representa o comprimento de onda onde há maior absorção energética expressa pelo analito. O detector com arranjo de diodos possibilitou a observação do analito em seu lambda máximo e a quercetina apresentou um cromatograma com um único pico (**Figura 34**).

Figura 34. Cromatograma e espectro de UV da quercetina.

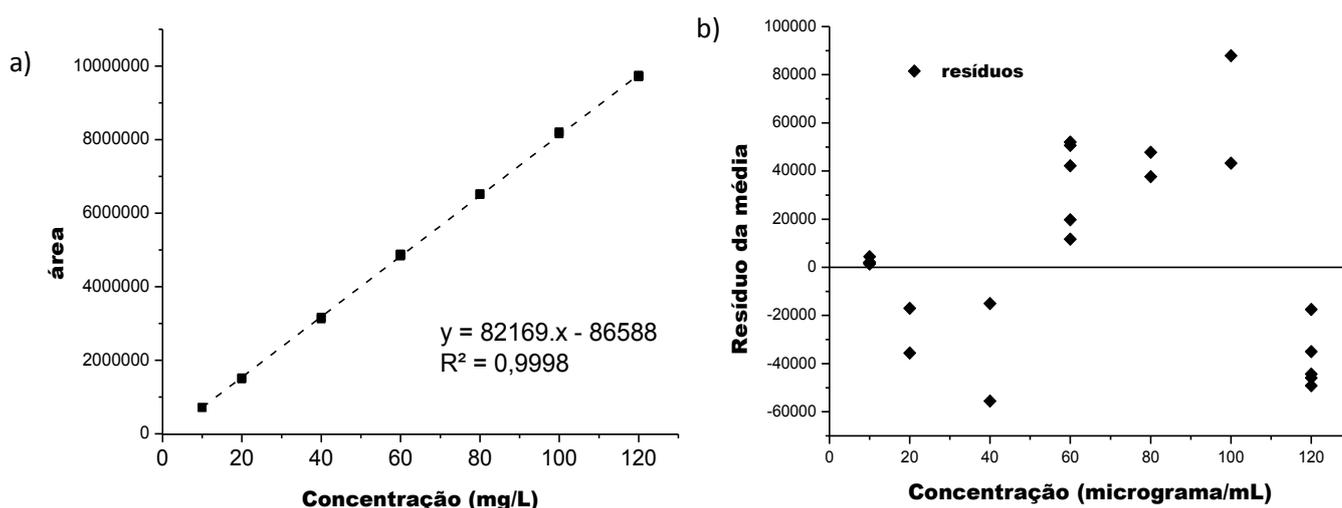


Fonte: Arquivo pessoal.

5.6.2. Linearidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A curva de calibração foi gerada e a faixa de concentração para produzir uma curva de correlação foi adequadamente estimada. Esta curva foi constituída por sete pontos de concentrações: 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 mg/L (**Figura 35**).

Figura 35. a) Regressão linear da média dos dados da curva nos três dias de análise. b) Gráfico de resíduos.



Fonte: Arquivo pessoal.

O coeficiente de correlação (r^2) para a linearidade foi de 0,9998, apresentando resíduos da média aleatórios (**Figura 34**), mostrando uma grande dispersão entre os dados, bem como, a análise de todas as concentrações obtiveram um coeficiente de variação entre 0,341 e 0,366%.

A resolução RE n° 899 de 29 de Maio de 2003 da ANVISA indica que os critérios mínimos aceitáveis do coeficiente de correlação (r^2) são de 0,99 em um estudo analítico, bem como o coeficiente de variação menor que 5%. Desta forma, constata-se que esse parâmetro, para o analito, está em concordância com a RE n°899.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da curva de linearidade, sendo eles: 0,9905 $\mu\text{g/mL}$ para o limite de detecção e 3,301 $\mu\text{g/mL}$ para o limite de quantificação, sendo que a concentração mínima utilizada neste trabalho, 10 mg/L (equivalente a 10 $\mu\text{g/mL}$) pode ser perfeitamente quantificável.

5.6.3. Exatidão

O teste de exatidão do método analítico descreveu a proximidade dos valores determinados nas amostras, com os seus valores nominais médios determinados. Esta foi medida usando cinco determinações para cada uma das concentrações, baixa, média e alta, as quais foram 10, 60 e 120 mg/L, respectivamente.

A exatidão intra-dia foi determinada em cada nível de concentração, usando-se a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. O valor de exatidão obtido foi 96,1 ($\pm 2,02\%$), para a concentração de 10 mg/L, 100,4 ($\pm 0,35\%$) para a concentração de 60 mg/L e 99,7 ($\pm 0,19\%$) para a concentração de 120 mg/L de quercetina.

Todos os valores de exatidão determinados encontraram-se dentro dos limites especificados pela RE n^o 899 da ANVISA, os quais estiveram no intervalo de 80 a 120 % para determinações intra-dia e inter-dias.

5.6.4. Precisão

A precisão do método analítico descreve a proximidade de medidas individuais de um analito, quando o procedimento foi aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de um único volume homogêneo da solução padrão. A precisão foi medida usando cinco determinações de áreas para cada uma das concentrações, baixa, média e alta, as quais foram 10, 60 e 120 mg/L, respectivamente.

A precisão intra-dia foi determinada usando-se o desvio padrão e concentração média determinada. Os valores de precisão obtidos para as concentrações da quercetina foi 1,10 ($\pm 0,2\%$) para a concentração de 10 mg/L, 0,76 ($\pm 0,49\%$) para a concentração de 60 mg/L e 0,22 ($\pm 0,08\%$) para a concentração de 120 mg/L de quercetina.

O coeficiente de correlação (r^2), tanto para os testes intra-dia, quanto inter-dia do analito, variou entre 0,9997 a 0,9999.

Todos os valores de precisão determinados ficaram dentro dos limites especificados pela RE n^o 899 de 2003 da ANVISA, os quais são de 5 e 15 % para precisão intra-dia e inter-dias, respectivamente.

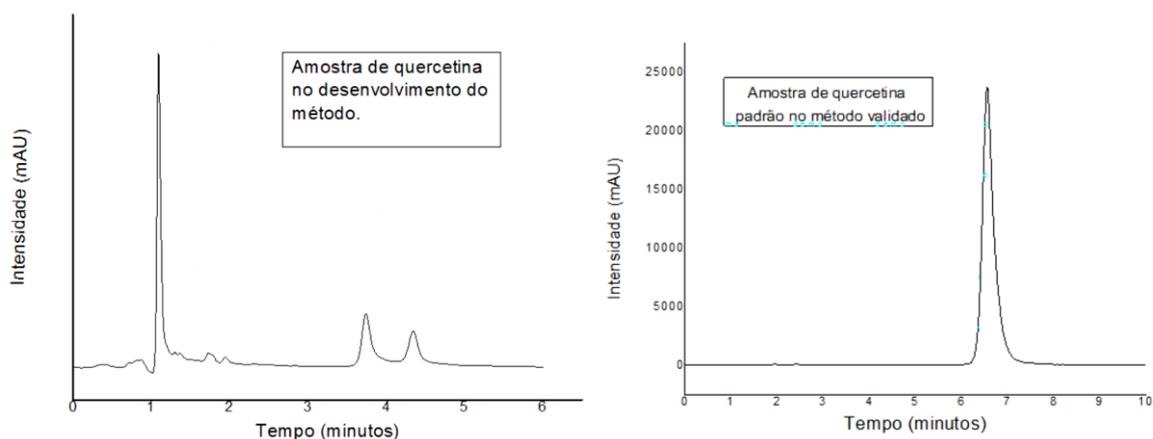
5.6.5. Considerações gerais sobre o método validado

O método analítico desenvolvido para quantificação de quercetina em amostras do meio de dissolução apresentou parâmetros de seletividade, especificidade, linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão adequados. Ainda mostrou-se específico e com boa separação, permitindo um tempo de análise relativamente curto, em torno de 8 minutos.

Os picos cromatográficos obtidos apresentaram-se simétricos e com excelentes resoluções de linha de base. A robustez do método foi expressa pela sua reprodutibilidade, quando houve a transferência do método cromatográfico de separação de um cromatógrafo para outro.

Em linhas gerais, o método é apropriado para ser aplicado na quantificação do analito em questão e foi similar a diversos métodos descritos na literatura.

Figura 36. Cromatogramas da quercetina durante e após o validação do método.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.7. Ensaio de dissolução da quercetina em compósito de polietilenoglicol e hidroxiapatita

5.7.1. Ensaio de liberação *In vitro*

Os resultados do perfil de dissolução, após 4 horas de experimento, estão representados na **Figura 37**, que mostra o perfil de dissolução de cada partilha de compósito em suas diferentes proporções: PEG8/HA2/QUE, PEG6/HA4/QUE, PEG5/HA5/QUE e PEG4/HA6/QUE.

O gráfico mostra um perfil de liberação da quercetina com um percentual máximo de liberação de 15, 31, 13 e 17%, respectivamente. Essa diferença na porcentagem da dissolução reforça o fato de ocorrer algum tipo de interação entre o polímero e a cerâmica, nas diferentes proporções, fato que é evidenciado pelas diferentes porcentagens de liberação. Outro detalhe é que a matriz formada entre o polímero e a cerâmica pode ter diferentes solubilidades frente ao meio de dissolução.

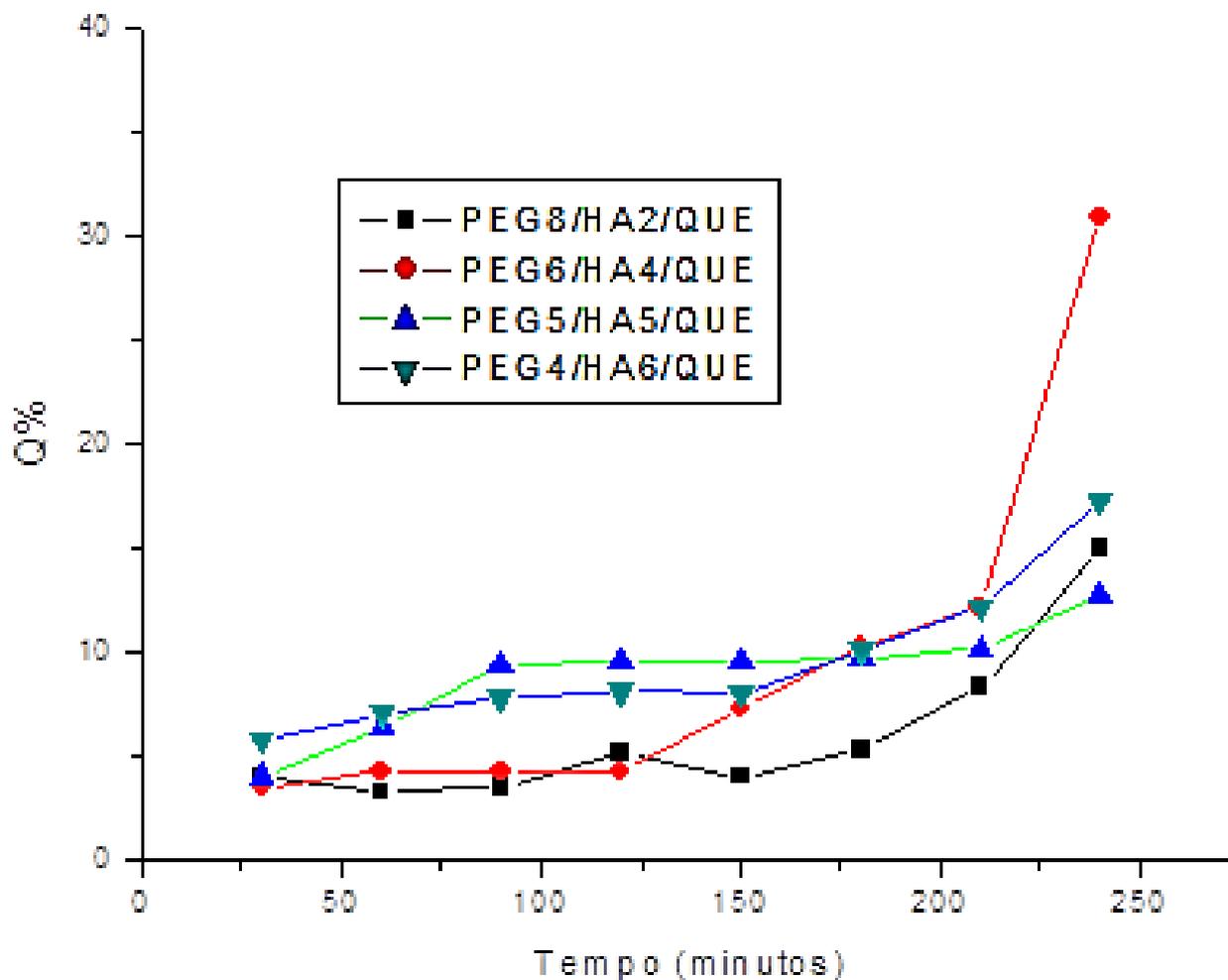
Os perfis de liberação obedeceram uma distribuição polinomial, de acordo com a equação empírica genérica descrita por Weibull, em 1951, adaptada para processos de dissolução/liberação de fármacos, por Langenbucher (1972) (MANADAS R, *et al.*, 2002).

A equação polinomial foi produzida com diferentes graus no estudo dos diferentes compósitos, sendo grau 4 para a pastilha PEG8/HA2/QUE, grau 6 para a pastilha PEG6/HA4/QUE e PEG5/HA5/QUE e grau 3 para a pastilha PEG6/HA4/QUE).

A eficiência de dissolução dos diferentes compósitos foi relacionada com os teores de PEG e HA (**Figura 36**). Nota-se que quanto maior a quantidade de polietilenoglicol, menor a eficiência de liberação da quercetina, isso indica que a quercetina está diretamente ligada ao PEG.

Essa diferença nas porcentagens de liberação pode ser atribuída às irregularidades na superfície das amostras utilizadas. Sabe-se que outros fatores afetam a liberação de drogas de biomateriais, tais como a porosidade do material utilizado e a quantidade de droga incorporada no mesmo.

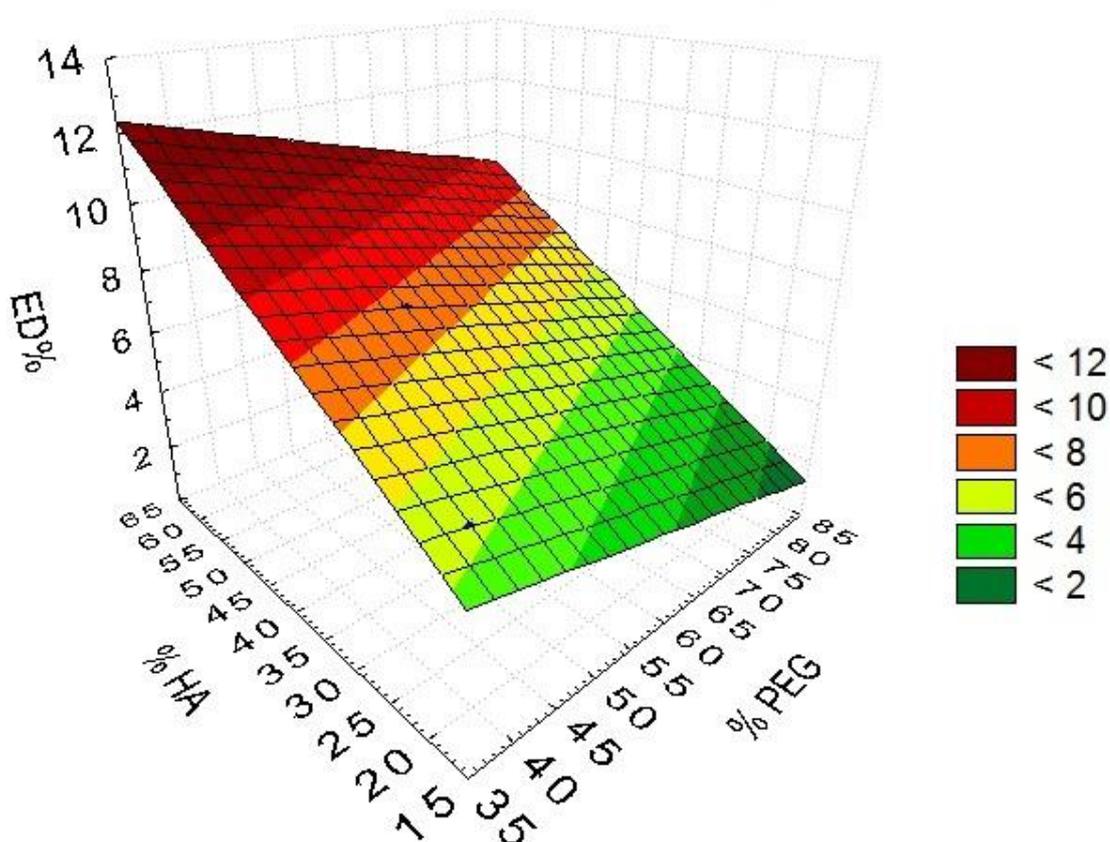
Figura 37. Perfil de liberação de todos os compósitos, em triplicata, depois de 4 horas de experimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

A natureza das curvas mostradas na Figura 37 sugere que nenhuma das matrizes tem liberação que siga taxa de liberação de ordem zero. Observa-se também que a liberação é lenta nos primeiros minutos do experimento, seguida de uma aproximadamente constante. No final do experimento, todas as proporções apresentam um maior taxa de liberação do fármaco, evidenciando que existe uma ruptura entre a matriz e o mesmo.

Figura 38. Eficiência de dissolução de todos os compósitos, em triplicata, depois de 4 horas de experimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

Apesar de a Farmacopeia Brasileira não estipular limites de tempo para desintegração de forma farmacêutica de liberação modificada, os resultados evidenciaram que a taxa de liberação da quercetina é menor à medida que se aumenta a quantidade de polímero (polietilenoglicol) na formulação do compósito. Esse fato pode ser justificado pela formação de uma camada gelificada mais espessa de polietilenoglicol com o aumento da sua proporção no impmante.

No gráfico do perfil de liberação das pastilhas percebe-se que a formulação que retém mais a quercetina é o PEG8/HA2/QUE (**Figuras 35 e 36**). Por outro lado, depois de 3,5 h de experimento, ela passa a liberar o fármaco a uma taxa maior do que a formulação PEG5/HA5/QUE.

A formulação PEG5/HA5/QUE começa o processo de liberação mais rápido que a PEG8/HA2/QUE e finaliza retendo mais o fármaco, levando vantagem em relação à formulação anterior. Adicionalmente, a formulação PEG5/HA5/QUE possui

características físicas melhores que a formulação PEG8/HA2/QUE, como dureza e estabilidade térmica. Sendo corroborado pelo fato de PEG8/HA2/QUE ser mais cerosa e mais instável frente a variações na temperatura.

As características morfológicas e físicas favorecem a formulação PEG5/HA5/QUE, como provável formulação para realização de um estudo piloto, de forma perspectiva, em processos de liberação controlada em modelos *in vivo*.

Outro detalhe é que existe uma relação estequiométrica de 1:1 entre PEG e HA para uma maior retenção de QUE, o que provavelmente produz uma maior interação entre a matriz e o fármaco.

6. CONCLUSÕES

A hidroxiapatita obtida pela rota úmida apresenta propriedades físicas, químicas e físico-químicas em conformidade com o descrito na literatura, confirmando a autenticidade e pureza da mesma, possibilitando sua utilização neste trabalho.

Não foi possível obter pastilhas de liberação com a proporção PEG2/HA8, devido ao elevado excesso do material cerâmico, o qual não permite uma união reticular entre o PEG e a HA.

As matrizes de liberação desenvolvidas pela união do polietilenoglicol 4000 e, hidroxiapatita apresentam características físicas estáveis, com exceção da proporção PEG8/HA2/QUE, que mostra-se um pouco mais cerosa por ter muito polímero em sua composição, e da proporção PEG4/HA6/QUE, que se mostra também mais quebradiça por ter mais cerâmica em sua composição.

A incorporação da quercetina foi eficaz, fato este que foi comprovado pela elevação do ponto de fusão da mesma em todas as proporções de compósitos avaliados.

Os testes de dureza apresentam características semelhantes para as quatro proporções propostas no presente estudo, com exceção do compósito PEG4/HA6/QUE, que mostra-se mais duro que os demais, provavelmente por apresentar uma maior quantidade de hidroxiapatita.

A Microscopia Eletrônica de Varredura da matriz de liberação composta apenas por PEG e HA mostra a existência de fendas e poros na sua superfície. Com a adição da quercetina na matriz, ocorre a diminuição dessas fendas e desses poros, aumentando a coesão do material. A existência de fendas e poros no compósito com quercetina é uma propriedade importante, pois pode permitir a passagem de fluídos biológicos pelo mesmo, além de permitir a migração de células para o local do implante, que influencia no aumento da biocompatibilidade.

Observa-se ainda a existência de pontos brancos no compósito, que provavelmente são aglomerados de cristais de hidroxiapatita intercalados na rede cerosa do polietilenoglicol.

A microanálise de energia dispersiva mostra a relação entre as porcentagens dos átomos que compõem a amostra, evidenciando a existência e a permanência dos mesmos na estrutura.

Os espectros de FTIR dos compósitos com quercetina mostram que as principais bandas características de grupos funcionais encontrados nos mesmos são decorrentes das matérias primas utilizadas no desenvolvimento do compósito, como os grupamentos PO_4^{3-} derivados da hidroxiapatita, CO derivados do PEG e -OH derivados da quercetina, confirmando a permanência dos grupos funcionais dos mesmos.

A difratometria de raios-X mostra o aparecimento de regiões cristalinas nos compósitos de PEG/HA/QUE em regiões diferentes dos planos observados na hidroxiapatita (utilizada como padrão de comparação), evidenciando que há interação química entre os componentes do compósito. Esses picos provavelmente são provenientes do PEG e da quercetina e essa cristalinidade provavelmente contribui para uma maior permanência do compósito implantado.

As análises de TG/DTA corroboram a existência de uma interação química entre o PEG, HA e quercetina, fato que é evidenciado pelo aumento do ponto de fusão da quercetina. Outro ponto importante a ser considerado é que o aumento do ponto de fusão do compósito diminui a sua solubilidade, isso aumenta a sua estabilidade e conseqüentemente aumenta o tempo de permanência do implante.

O dissolutor *HM-RJ/CF01* construído para o ensaio de liberação *in vitro* mostrou-se eficaz e cumpre as exigências pré-estabelecidas de funcionamento, sendo qualificado fisicamente e quimicamente, além de ter um custo extremamente reduzido, frente ao que há disponível no comércio.

O método analítico desenvolvido e validado por CLAE-DAD mostra-se rápido, seletivo, exato, reproduzível e preciso quando analisado em dias diferentes e por analistas diferentes. Além de ser robusto para as condições de fluxo e temperatura analisadas. O mesmo não é discriminativo para a detecção de produtos de degradação da quercetina.

Os resultados do estudo *In vitro* evidenciou que o compósito possui uma taxa de liberação controlada e prolongada. Outro fator observado é que o compósito libera a quercetina de maneira rápida nos primeiros minutos de imersão, que é uma vantagem, pois pode-se impedir uma concentração muito baixa do medicamento no sítio de ação no início do tratamento, evitando efeito terapêutico ineficiente e até mesmo uma possível resistência bacteriana à quercetina.

O gráfico da eficiência de dissolução mostra que o aumento da quantidade de PEG e a diminuição da quantidade de HA diminui a eficiência de dissolução. Isto

indica que a quercetina está provavelmente mais intensamente ligada ao polietilenoglicol.

Os perfis de liberação apresentam maior correlação com o modelo de Weibull (LANGENBUCHER, F., 1972; MANADAS R, *et al.*, 2002), indicando que a liberação do fármaco ocorre segundo um mecanismo complexo, no qual estão envolvidos a difusão, o intumescimento e a erosão.

O compósito com proporção mais estável fisicamente e que possui menor taxa de liberação, de 12,72% no final do experimento, foi o PEG5/HA5/QUE, podendo, dessa forma, ser produzido em maior escala para testes tecnológicos como também testes pré-clínicos e clínicos.

Diante disso, o material é bem promissor para estudos no desenvolvimento de formulações eficientes para o tratamento do câncer, visto que a quercetina é um importante antineoplásico, sendo bom ressaltar também, que tanto o polietilenoglicol como a hidroxiapatita são materiais já utilizados em organismos vivos, o primeiro, como veículo em vários medicamentos e em exames (como o exame do cólon retal) e o segundo como implante ósseo, pois favorece a migração de células ósseas (osteoblastos) para o local do implante, diminuindo o tempo de cicatrização.

7. PERSPECTIVAS

O presente trabalho mostra-se muito promissor em termos de aplicação industrial. Para tanto, testes adicionais ainda são necessários. O primeiro deles diz respeito à avaliação de processabilidade do compósito desenvolvido além de um estudo de estabilidade de longa duração.

Em seguida, é necessário efetuar testes tecnológicos como variação de peso, densidade geométrica, friabilidade, desintegração, viscosidade, entre outros.

Posteriormente, é necessário fazer testes em animais, incluindo a indução e o tratamento da neoplasia a partir da introdução do implante por meio cirúrgico, seguindo para ensaios pré-clínicos e finalmente testes clínicos buscando comprovar o benefício *in vivo* do compósito desenvolvido no instituto de pesquisa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIABADI HM; A., L. **Polymeric micelles for drug delivery.** Expert Opin Drug Deliv, 1, 139-162, 2006.

ANDERSON, D.G. **Combinatorial development of biomaterials for tissue engineering and drug delivery.** Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 8, 13-13, 2014.

ANEE, T.K. **A Novel Technique to Synthesize Hydroxyapatite at Low Temperature.** Materials Chemistry and Physics, 80, 3, 725-730, 2003.

AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite.** Japanese Association of Apatite Science, 1991.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. **Drug discovery from medicinal plants.** Life Sciences, 78, 5, 431-441, 2005.

BANAKAR, U.V. **Pharmaceutical Dissolution Testing.** New York: Marcel Dekker, 1992.

BARROUG, A.; GLIMCHER, M.J. **Hydroxyapatite crystals as a local delivery system for cisplatin: adsorption and release of cisplatin in vitro.** Journal of Orthopaedic Research, 20, 2, 274-280, 2002.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. **Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions.** . Alimentos e Nutricao, 15, 285-292, 2004.

BERTINETTI L; TAMPIERI A; LANDI E; DUCATI C; MIDGLEY PA; COLUCCIA S; G., M. **Surface structure, hydration and cationic sites**

of nanohydroxyapatite: UHR-TEM, IR, Microgravimetric studies. J Phys Chem C 111, 4027-4035, 2007.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N. **Hydroxyapatite-gelatin films: a structural and mechanical characterization.** Biomaterials, 19, 7-9, 739-744, 1998.

BOLBASOV, E.N.; RYBACHUK, M.; GOLOVKIN, A.S.; ANTONOVA, L.V.; SHESTERIKOV, E.V.; MALCHIKHINA, A.I.; NOVIKOV, V.A.; ANISSIMOV, Y.G.; TVERDOKHLEBOV, S.I. **Surface modification of poly(L-lactide) and polycaprolactone bioresorbable polymers using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target.** Materials Letters, 132, 281-284, 2014.

BORGES, A.P.B.; RIBEIRO, M.F.B.; REZENDE, C.M.D.F. **Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço**

proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec, 52, 6, 616-620, 2000.

BRAMBILLA E; PONTE M. A. D; MANZINI M; FELLINI R. T; BUFFON V. R; S., M.R.
Preparo de Cólon para Colonoscopia com

Polietilenoglicol versus Sulfato de Magnésio em Pacientes acima de 70 anos de Idade. Rev bras Coloproct, 28, 2, 204-209, 2008.

BRANDÃO A. **Sociedade brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade de Nefrologia.** Arq. Bras. Cardiol., 95, 1, 1-51, 2010.

BRITO D. H. A.; SILVA R. F.; OLIVEIRA C. P.; SEMIÃO L.; BEZERRA F. W. A.; RIBEIRO M. E. N. P.; CAVALCANTE I. M.; TREVISAN M. T. S.; S., R.N.M.P.
INFLUÊNCIA DO POLIETILENOGLICOL (PEG400, PEG 6K E PEG 35K) NA SOLUBILIZAÇÃO DA MANGIFERINA EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE PLURONIC F127®. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Ceará (CE), Brasil., 2012.

BUCKINGHAN, J. **Dictionary of Organic Compounds.** 1, 1983.

BUDAVARI, S. **The Merck Index.** 12, 1996.

CAI, X.; FANG, Z.; DOU, J.; YU, A.; ZHAI, G. **Bioavailability of Quercetin: Problems and Promises.** Current Medicinal Chemistry, 20, 20, 2572-2582, 2013.

CAI, Y.-Z.; SUN, M.; XING, J.; LUO, Q.; CORKE, H. **Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants.** Life Sciences, 78, 25, 2872-2888, 2006.

CAO, Z.; DOU, C.; DONG, S. **Scaffolding Biomaterials for Cartilage Regeneration.** Journal of Nanomaterials, 2014.

CARVALHO M. B. **Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino.** Rev Assoc Med Bras, 47, 3, 2001.

CATAURO, M.; BOLLINO, F.; PAPALE, F.; GALLICCHIO, M.; PACIFICO, S. **Synthesis and chemical characterization of new silica polyethylene glycol hybrid nanocomposite materials for controlled drug delivery.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, 24, 4, 320-325, 2014.

CHEN, J.; SPEAR, S.K.; HUDDLESTON, J.G.; ROGERS, R.D. **Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media.** Green Chemistry, 7, 2, 64-82, 2005.

COSTA-LOTUFO, L.V. **A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer:** . Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2010.

COSTA, P., LOBO, J. M. S. . **Formas farmacêuticas de liberação modificada.** Revista Portuguesa de Farmácia, 59, 4, 181-190, 1999.

CRAGG G. M.; M.R. BOYD; M.R. GREVER; T.D. MAYS; D.J. NEWMAN; SCHEPARTZ., S.A. **Natural product drug discovery and development at the National Cancer Institute. Policies for international collaboration and compensation.** . Missouri Botanical Garden Monograph Series, 48, 161-167, 1994.

DAVID J. M. ; ROBERT., P.P. **First cancer vaccine to eliminate tumors in mice.** 2009.

DHANALAKSHMI C. P; VIJAYALAKSHMI L; NARAYANAN, V. **Synthesis and preliminary characterization of polyethylene glycol (PEG)/hydroxyapatite (HAp) nanocomposite for biomedical applications.** International Journal of Physical Sciences, 7, 73, 2093 - 2101, 2012.

DU, C.; CUI, F.Z.; FENG, Q.L.; ZHU, X.D.; DE GROOT, K. **Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity.** Journal of Biomedical Materials Research, 42, 4, 540-548, 1998.

DUO, J.; YING, G.-G.; WANG, G.-W.; ZHANG, L. **Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation.** Molecular Medicine Reports, 5, 6, 1453-1456, 2012.

EANES, E.D. **Program Crystal Growth Characteristics.** 3, 3-15, 1980.

ELLIOTT, J.C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates.** . Amsterdam: Elsevier, 1994.

FARINHA, A.; PAIS, J.P.; BICA, A. **O ensaio de dissolução in vitro na avaliação da qualidade biofarmacêutica.** LEF, 4, 15, 1-7, 1997.

FATTAHI, P.; YANG, G.; KIM, G.; ABIDIAN, M.R. **A Review of Organic and Inorganic Biomaterials for Neural Interfaces.** Advanced Materials, 26, 12, 1846-1885, 2014.

FENG, B.; HONG, R.Y.; WANG, L.S.; GUO, L.; LI, H.Z.; DING, J.; ZHENG, Y.; WEI, D.G. **Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging.** Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 328, 1-3, 52-59, 2008.

FUJIBAYASHI, S.; NEO, M.; KIM, H.M.; KOKUBO, T.; NAKAMURA, T. **A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses.** Biomaterials, 24, 8, 1349-1356, 2003.

GALEGO, N.; ROZSA, C.; SANCHEZ, R.; FUNG, J.; VAZQUEZ, A.; TOMAS, J.S. **Characterization and application of poly(beta-hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials.** Polymer Testing, 19, 5, 485-492, 2000.

GEER, D.J.; SWARTZ, D.D.; ANDREADIS, S.T. **Biomimetic delivery of keratinocyte growth factor upon cellular demand for accelerated wound**

healing in vitro and in vivo. American Journal of Pathology, 167, 6, 1575-1586, 2005.

GIACCHETTI, S.; ITZHAKI, M.; GRUIA, G.; ADAM, R.; ZIDANI, R.; KUNSTLINGER, F.; BRIENZA, S.; ALAFACI, E.; BERTHEAULT-CVITKOVIC, F.; JASMIN, C.; REYNES, M.; BISMUTH, H.; MISSET, J.L.; LEVI, F. **Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery.** Annals of Oncology, 10, 6, 663-669, 1999.

GOHLKE, A.; INGELMANN, C.J.; NUERNBERG, G.; STARKE, A.; WOLFFRAM, S.; METGES, C.C. **Bioavailability of quercetin from its aglycone and its glucorhamnoside rutin in lactating dairy cows after intraduodenal administration.** Journal of Dairy Science, 96, 4, 2303-2313, 2013.

GUO, Y.-P.; LONG, T.; TANG, S.; GUO, Y.-J.; ZHU, Z.-A. **Hydrothermal fabrication of magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres: biocompatibility, osteoinductivity, drug delivery property and bactericidal property.** Journal of Materials Chemistry B, 2, 19, 2899-2909, 2014.

HANSON-RESEARCH-CORPORATION. **Dissolution: Past, Present & Future.** 2. Chatsworth: Hanson Research, 1996.

HARTWELL., J.L. **Plants Used Against Cancer.** Lawrence: Quaterman, 1982.

HENCH, L.L. **Bioceramics: Fron concept to clinic.** Journal of the American Ceramic Society, 74, 7, 1487-1510, 1991.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. **INTAKE OF POTENTIALLY ANTICARCINOGENIC FLAVONOIDS AND THEIR DETERMINANTS IN ADULTS IN THE NETHERLANDS.** Nutrition and Cancer-an International Journal, 20, 1, 21-29, 1993.

HOU, Y.C.; CHAO, P.D.L.; HO, H.J.; WEN, C.C.; HSIU, S.L. **Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, 55, 2, 199-203, 2003.

INFARMED. **Farmacopeia Portuguesa VI** Lisboa: 1997.

JING, X.; DENG, L.; GAO, B.; XIAO, L.; ZHANG, Y.; KE, X.; LIAN, J.; ZHAO, Q.; MA, L.; YAO, J.; CHEN, J. **A novel polyethylene glycol mediated lipid nanoemulsion as drug delivery carrier for paclitaxel.** Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 10, 2, 371-380, 2014.

JONES, D.S.; MCCOY, C.P.; ANDREWS, G.P. **Physicochemical and drug diffusion analysis of rifampicin containing polyethylene glycol-poly(epsilon-caprolactone) networks designed for medical device applications.** Chemical Engineering Journal, 172, 2-3, 1088-1095, 2011.

KABANOV, A.V.; BATRAKOVA, E.V.; ALAKHOV, V.Y. **Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery.** Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 223, U438-U438, 2002.

KEANE, T.J.; BADYLAK, S.F. **Biomaterials for tissue engineering applications**. *Seminars in Pediatric Surgery*, 23, 3, 112-118, 2014.

KELLER, J.H.; ENSMINGER, W.D. **STABILITY OF CANCER CHEMOTHERAPEUTIC-AGENTS IN A TOTALLY IMPLANTED DRUG DELIVERY SYSTEM**. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 39, 8, 1321-1323, 1982.

KHAN, K.A. **Concept of dissolution efficiency**. *J. Pharm. Pharmacol*, 27, 48-49, 1975.

KIM, J.K.; KIM, H.J.; CHUNG, J.-Y.; LEE, J.-H.; YOUNG, S.-B.; KIM, Y.-H. **Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery**. *Archives of Pharmacal Research*, 37, 1, 60-68, 2014.

KOHN, M.J. **Reviews in mineralogy and geochemistry – Phosphates – Geochemical, geobiological and materials important**. *Society of America Mineralogical*, 48, 2002.

KROK, M.; PAMULA, E. **Poly(L-lactide-co-glycolide) microporous membranes for medical applications produced with the use of polyethylene glycol as a pore former**. *Journal of Applied Polymer Science*, 125, E187-E199, 2012.

KUZUHARA, T.; SEI, Y.; YAMAGUCHI, K.; SUGANUMA, M.; FUJIKI, H. **DNA and RNA as new binding targets of green tea catechins**. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 25, 17446-17456, 2006.

LAMSON D; M., B. **Antioxidants and Cancer III: Quercetin**. *Alternative Medicine Review*, v.5, p.196-209, 2000.

LANGENBUCHER, F. **Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution**. *J. Pharm. Pharmacol.*, 24, 979-981, 1972.

LE GEROS, R.Z.L.G., J.P. . **Dense Hydroxyapatite in Handbook of Bioactive Ceramics**. CRC Press, II, 1990.

LE THI MAI HOA; TRAN THI DUNG; TRAN MAU DANH; NGUYEN HUU DUC; CHIEN., D.M. **Preparation and characterization of magnetic nanoparticles coated with polyethylene glycol**. *Journal of Physics*, 187, 2009.

LEE C. PEDERSON; DONALD J. BUCHSBAUM; VICKERS., S.M. **Molecular Chemotherapy Combined with Radiation Therapy Enhances Killing of Cholangiocarcinoma Cells in Vitro and in Vivo**. *Cancer Research*, 57, 4325-4332, 1997.

LEPRETRE, S.; CHAI, F.; HORNEZ, J.-C.; VERMET, G.; NEUT, C.; DESCAMPS, M.; HILDEBRAND, H.F.; MARTEL, B. **Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers**. *Biomaterials*, 30, 30, 6086-6093, 2009.

LI, S.-Z.; LI, K.; ZHANG, J.-H.; DONG, Z. **The Effect of Quercetin on Doxorubicin Cytotoxicity in Human Breast Cancer Cells**. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 2, 352-355, 2013.

LLOYD, G.R.; CRAIG, D.Q.M.; SMITH, A. **A calorimetric investigation into the interaction between paracetamol and polyethylene glycol 4000 in physical mixes and solid dispersions**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48, 1, 59-65, 1999.

LOGAN T. J.; MA Q.Y.; S.J., T. **Lead**

imobilization from Aqueous Solutions and Contaminated Soils Using Phosphate Rocks. *Environ. Sci. Technol*, 29, 1118-1126, 1995.

LOPES, C.; COSTA, P.; LOBO, J.M.S. **Avaliação das características de liberação de fármacos a partir de formas sólidas**. *Rev. Port. Farm*, 60, 1, 41-51, 2000.

MA, M.-G.; ZHU, Y.-J.; CHANG, J. **Monetite formed in mixed solvents of water and ethylene glycol and its transformation to hydroxyapatite**. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 29, 14226-14230, 2006.

MANADAS R; PINA M. E; F., V. **A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas**

farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38, 4, 2002.

MARQUES, M.R.C.; LOEBENBERG, R.; ALMUKAINZI, M. **Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing**. *Dissolution Technologies*, 18, 3, 15-28, 2011.

MAVROPOULOS, E. **A Hidroxiapatita como Removedora de Chumbo**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1999.

MELLO, V.J. **Efeitos Hipolipidêmicos e Toxicológicos de Complexos de Rutina com Organoestênicos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001.

METSGER, D.S.; RIEGER, M.R.; FOREMAN, D.W. **Mechanical properties of sintered hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic (vol 10, pg 9, 1999)**. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 10, 4, 253-253, 1999.

MISCH., C.E. **Biomateriais utilizados em implantes dentários: Implantes dentários contemporâneos**. 2ª. São Paulo: Santos, 2000.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C. **Capture of stealth nanoparticles by the body's defences**. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 18, 6, 527-550, 2001.

MOJICA PISCIOTTI, M.L.; LIMA, E., JR.; VASQUEZ MANSILLA, M.; TOGNOLI, V.E.; TROIANI, H.E.; PASA, A.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; SILVA, A.H.; GURMAN, P.; COLOMBO, L.; GOYA, G.F.; LAMAGNA, A.; ZYSLER, R.D. **In vitro and in vivo experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with**

DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: Magnetic targeting. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 102, 4, 860-868, 2014.

MOLLER, H.; SIEWERT, M. **FIP guidelines for dissolution testing of solid oral products.**

Pharm. Ind. 57, 5, 362-369, 1995.

MORLEY, N.; CLIFFORD, T.; SALTER, L.; CAMPBELL, S.; GOULD, D.; CURNOW, A. **The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage.** Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine, 21, 1, 15-22, 2005.

MUKHTAR, H.; KATIYAR, S.K.; AGARWAL, R. **GREEN TEA AND SKIN - ANTICARCINOGENIC EFFECTS.** Journal of Investigative Dermatology, 102, 1, 3-7, 1994.

MULLEN, L.M.; VIGNIERI, S.N.; GORE, J.A.; HOEKSTRA, H.E. **Adaptive basis of geographic variation: genetic, phenotypic and environmental differences among beach mouse populations.** Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 276, 1674, 3809-3818, 2009.

NAKAZAWA, T. **Inorganic Phosphate Materials.** Elsevier, 1989.

NARASARAJU T. S. B; PHEBE D. E. **Review: Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite.** journal of materials Science, 31, 1-21, 1996.

NASONGKLA, N. **Biodegradable Polymeric Implants as Drug Delivery Systems for Brain Cancer Therapy.** 2009.

NETO R. S; PAVONE C; FREITAS R. M. **Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica:**

revisão de literatura. Revista de Odontologia da UNESP, 37, 2, 155-161, 2008.

NETZ, D.J.A.; SEPULVEDA, P.; PANDOLFELLI, V.C.; SPADARO, A.C.C.; ALENCASTRE, J.B.; BENTLEY, M.; MARCHETTI, J.M. **Potential use of gelcasting hydroxyapatite porous ceramic as an implantable drug delivery system.** International Journal of Pharmaceutics, 213, 1-2, 117-125, 2001.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years.** Journal of Natural Products, 70, 3, 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. **Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.** Journal of Natural Products, 66, 7, 1022-1037, 2003.

NIKPOUR, M.R.; RABIEE, S.M.; JAHANSHAHI, M. **Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering applications.** Composites Part B-Engineering, 43, 4, 1881-1886, 2012.

NORIYUKI TAMAI; AKIRA MYOUI; MAKOTO HIRAO; TAKASHI KAITO; TAKAHIRO OCHI; JUNZO TANAKA; TAKAOKA, K.; YOSHIKAWA., H. **A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral**

implantation of a composite of interconnected porous

hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone

morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). Osteoarthritis and Cartilage, 13, 405-417, 2005.

OGAWA C. A; PLEPIS A. M. G. **Estudos preliminares de**

liberação de ciprofloxacina

em compósito hidroxiapatita:

colágeno. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, 17, 3, 123-130, 2001.

OLIVEIRA, P.M. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos de matriz polimérica de PHB reforçados com HAP-91®.** Ouro preto: Universidade Federal de Ouro Preto, 2005.

OLIVEIRA, R.B.L., E.M. . **Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos.** Revista eletrônica de Farmácia, 3, 29-35, 2006.

OSAKA, A.; MIURA, Y.; TAKEUCHI, K.; ASADA, M.; TAKAHASHI, K. **CALCIUM APATITE PREPARED FROM CALCIUM HYDROXIDE AND ORTHOPHOSPHORIC ACID.** Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2, 1, 51-55, 1991.

PAN, Y.; XIONG, D. **Friction properties of nano-hydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel composites as an articular cartilage.** Wear, 266, 7-8, 699-703, 2009.

PARK, J. **BIOMATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING.** New York: Plenum Press, 1984.

PETER J. PHOTOS; LUCIE BACAKOVA; BOHDANA DISCHER; FRANK S. BATES; DISCHER., D.E. **P olymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular**

weight. Journal of Controlled Release, 90, 323–334, 2003.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.D.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.D. **Current status, challenges and trends on natural products in Brazil.** Quimica Nova, 25, 45-61, 2002.

PREECHAGOON, D.; UDOMPRATEEP, A.; MANWIWATTANAGUL, G. **Improved dissolution rate of poorly soluble drug by incorporation of buffers.** Drug Development and Industrial Pharmacy, 26, 8, 891-894, 2000.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine.** Academic Press, 1996.

RHEE, S.H.; TANAKA, J. **Hydroxyapatite coating on a collagen membrane by a biomimetic method**. Journal of the American Ceramic Society, 81, 11, 3029-3031, 1998.

RIBEIRO, C.C.; BARRIAS, C.C.; BARBOSA, M.A. **Preparation and characterisation of calcium-phosphate porous microspheres with a uniform size for biomedical applications**. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 17, 5, 455-463, 2006.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids**. Free Radical Biology & Medicine, 20, 7, 933-956, 1996.

RODRIGUEZ, L.; CAVALLARI, C.; PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.L.; FINI, A. **Preparation and characterization by morphological analysis of diclofenac/PEG 4000 granules obtained using three different techniques**. International Journal of Pharmaceutics, 242, 1-2, 285-289, 2002.

ROSENBERG, S.A.; AEBERSOLD, P.; CORNETTA, K.; KASID, A.; MORGAN, R.A.; MOEN, R.; KARSON, E.M.; LOTZE, M.T.; YANG, J.C.; TOPALIAN, S.L.; MERINO, M.J.; CULVER, K.; MILLER, A.D.; BLAESE, R.M.; ANDERSON, W.F. **GENE-TRANSFER INTO HUMANS - IMMUNOTHERAPY OF PATIENTS WITH ADVANCED MELANOMA, USING TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES MODIFIED BY RETROVIRAL GENE TRANSDUCTION**. New England Journal of Medicine, 323, 9, 570-578, 1990.

ROWE R. C; SHESKEY, P.J.; WELLER, P.J. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 4. London: Pharmaceutical Press, 2003.

ROY, D.; DUCHER, F.; LAUMAIN, A.; LEGENDRE, J.Y. **Determination of the aqueous solubility of drugs using a**

convenient 96 well plate based assay. Drug Dev. Ind.

Pharm., 27, 1, 107-109, 2001.

SANTOS, C.; ROVATH, C.F.; FRANKE, R.P.; ALMEIDA, M.M.; COSTA, M.E.V. **Spray-dried hydroxyapatite-5-Fluorouracil granules as a chemotherapeutic delivery system**. Ceramics International, 35, 1, 509-513, 2009.

SANTOS, M.L.; FLORENTINO, A.O.; SAEKI, M.J.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L.; GUASTALDI, A.C. **Síntese de hidroxiapatita pelo método**

sol-gel utilizando precursores alternativos:

nitrito de cálcio e ácido fosfórico. Eclética

Química, 30, 3, 29-35, 2005.

SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F.O.; PANICI, P.B.; PIANTELLI, M.; BONANNO, G.; DEVINCENZO, R.; FERRANDINA, G.; PIERELLI, L.; CAPELLI, A.; MANCUSO, S.

QUERCETIN INHIBITS THE GROWTH OF A MULTIDRUG-RESISTANT ESTROGEN-RECEPTOR-NEGATIVE MCF-7 HUMAN BREAST-CANCER CELL-LINE EXPRESSING TYPE-II ESTROGEN-BINDING SITES. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 28, 4, 255-258, 1991.

SHISHATSKAYA, E.I. **Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media.** *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, 16, 5, 643-657, 2005.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F.; FLORENCE, A.T. **Local controlled drug delivery to the brain: Mathematical modeling of the underlying mass transport mechanisms.** *International Journal of Pharmaceutics*, 314, 2, 101-119, 2006.

SOUZA, A. **Materiais mesoporosos ordenados aplicados como sistemas para liberação controlada de drogas.** Comissão Nacional da Energia Nuclear, 2006.

TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; SPRIO, S.; DELCOGLIANO, A.; FRANZESE, S. **Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone.** *Biomaterials*, 22, 11, 1365-1370, 2001.

TECHNOLOGY, P. **Encyclopedia of PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY.** North Carolina, USA: Pinehurst, 2007.

USP 37. **The United States Pharmacopeia , The National Formulary 32.** Rockville MD, 2014.

USP. **U.S. Pharmacopeia 24.** 24. 2000.

VENKATASUBBU, G.D.; RAMASAMY, S.; AVADHANI, G.S.; RAMAKRISHNAN, V.; KUMAR, J. **Surface modification and paclitaxel drug delivery of folic acid modified polyethylene glycol functionalized hydroxyapatite nanoparticles.** *Powder Technology*, 235, 437-442, 2013.

VENKATESAN, J.; KIM, S.-K. **Nano-Hydroxyapatite Composite Biomaterials for Bone Tissue Engineering-A Review.** *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10, 10, 3124-3140, 2014.

VERONESE, F.M.; PASUT, G. **PEGylation, successful approach to drug delivery.** *Drug Discovery Today*, 10, 21, 1451-1458, 2005.

VIDEAU, J.J.D., V. **Phosphate and biomaterials.** *European Journal of Solid State and Inorganic Chemistry*, 18, 303- 343, 1991.

VIEGAS C.; V. S. BOLZANI; E. J. BARREIRO; FRAGA., C.A.M. **“New Anti-Alzheimer Drugs from Biodiversity: The role of the Natural Acetylcholinesterase Inhibitors”.** *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5, 915-926, 2005.

WALSH, W.R.; CHAPMAN-SHEATH, P.J.; CAIN, S.; DEBES, J.; BRUCE, W.J.M.; SVEHLA, M.J.; GILLIES, R.M. **A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model.** *Journal of Orthopaedic Research*, 21, 4, 655-661, 2003.

WANG, M.; LI, Y.; WU, J.; XU, F.; ZUO, Y.; JANSEN, J.A. **In vitro and in vivo study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite.** Journal of Biomedical Materials Research Part A, 85A, 2, 418-426, 2008.

WANG, S.; WANG, X.; XU, H.; ABE, H.; TAN, Z.; ZHAO, Y.; GUO, J.; NAITO, M.; ICHIKAWA, H.; FUKUMORI, Y. **Towards sustained delivery of small molecular drugs using hydroxyapatite microspheres as the vehicle.** Advanced Powder Technology, 21, 3, 268-272, 2010.

WEIJ, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. **Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity.** Cancer Treatment Reviews, 23, 4, 209-240, 1997.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. **Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity.** Cancer Treatment Reviews, 23, 4, 209-240, 1997.

WEINBERG, B.D.; BLANC, E.; GA, J. **Polymer implants for intratumoral drug delivery and cancer therapy.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 97, 5, 1681-1702, 2008.

WHITE, E.; SHORS, E.C. **BIOMATERIAL ASPECTS OF INTERPORE-200 POROUS HYDROXYAPATITE.** Dental Clinics of North America, 30, 1, 49-67, 1986.

WILLIAMS, S.D.; R. BIRCH; L.H. EINHORN; L. IRWIN, F.A.G.; LOEHRER., P.J. **Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin and either vinblastine or etoposide.** New England J. Med, 316, 1435-1440, 1987.

WITTIG, J.; HERDERICH, M.; GRAEFE, E.U.; VEIT, M. **Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, 753, 2, 237-243, 2001.

WULFF, M.; ALDEN, M. **Solid state studies of drug-cyclodextrin inclusion complexes in PEG 6000 prepared by a new method.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, 8, 4, 269-281, 1999.

XING N.; C. YI; S. H. MITCHELL; YOUNG., C.Y.F. **Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells.** Carcinogenesis, 22, 3, 409-414, 2001.

YAMAMURA, K.; IWATA, H.; OSADA, T.; YOTSUYANAGI, T.; NABESHIMA, T. **ANTICANCER EFFECTS OF ADRIAMYCIN-LOADED HYDROXYAPATITE IMPLANTS DETERMINED IN A SWARM RAT CHONDROSARCOMA MODEL.** Japanese journal of pharmacology, 65, 3, 289-291, 1994.

YANBAO L; DONGXU L; W., W. **Preparation of nano carbonatesubstituted hydroxyapatite from an amorphous precursor.** Appl Ceram Technol 5, 5, 442-448, 2008.

YANG, P.; QUAN, Z.; LI, C.; KANG, X.; LIAN, H.; LIN, J. **Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier.** Biomaterials, 29, 32, 4341-4347, 2008.