

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

Wallace José Maia

**Caracterização de nanopartículas blenda de biopolímeros (PHBV, PCL e PLLA)
contendo progesterona**

Trabalho de Conclusão de Curso

Campo Mourão

2014

Wallace José Maia

**Caracterização de nanopartículas blenda de biopolímeros (PHBV, PCL e PLLA)
contendo progesterona**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado a disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Fernanda Vitória Leimann

Campo Mourão

2014



TERMO DE APROVAÇÃO

Caracterização de nanopartículas blenda de biopolímeros (PHBV, PCL e PLLA) contendo progesterona

por

Wallace José Maia

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 08 de Agosto de 2014 como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O candidato foi avaliado pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **Aprovado**.

Membro 1 – Prof^a. Dra. Marianne Ayumi Shirai
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR-CM
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos

Membro 2 – Prof^a. Dra. Mirela Vanin dos Santos Lima
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR-CM
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos

Orientadora – Prof^a. Dra. Fernanda Vitória Leimann
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR-CM
Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Coordenação de Tecnologia e Engenharia de Alimentos da UTFPR Campus Campo Mourão.

*Ao meu nonno Antoninho Luiz Guadagnin (in memoriam) por estar
ao meu lado em todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado tantas conquistas e alegrias sempre. Pelo amparo nos momentos difíceis, pela força interior para superar as dificuldades e por me mostrar o caminho certo nas horas difíceis.

Aos meus pais Vanilde Guadagnin Maia e José Maia pelo apoio, compreensão e por não terem medido esforços para me ajudar em todas as circunstâncias, à minha irmã Bianca Vanilde Maia pelo apoio e ajuda e a toda a minha família pelo amor e carinho.

À minha professora orientadora Dra. Fernanda Vitória Leimann por toda a paciência e ajuda incondicional nesse projeto e por toda a dedicação que com certeza foram fundamentais tanto para elaboração desse trabalho como também para o meu crescimento e desenvolvimento pessoal.

Aos meus amigos Tiago Faquineti de Aragão, Thaynara Ferrari, Isabela de Souza Celloni, Jessica Caroline Vitória, Jéssica de Souza e Mayara de Oliveira Shork pela ajuda e por todos os momentos que passamos juntos.

E agradeço a minha amiga Camila Carolina Veiga, por ter me ajudado em todas as etapas do curso, me apoiando em minhas decisões e sempre me mostrando o melhor a ser feito.

Agradeço também a minha banca examinadora pelos sábios conselhos e a todos os professores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por todos os ensinamentos durante o curso.

*Não podemos acrescentar dias à nossa vida, mas
podemos acrescentar vida aos nossos dias".*

Cora Coralina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estabilidade de suspensões em função do potencial zeta.	20
Tabela 2. Formulações das nanopartículas contendo progesterona.....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura esquemática de (a) nanocápsulas e (b) nanoesferas.	15
Figura 2 - Formação de nanopartículas biodegradáveis por miniemulsificação evaporação do solvente.	16
Figura 3 - Diagrama esquemático da dupla eléctrica na superfície de nanopartículas em solução.	19
Figura 4 - Potencial zeta em função do pH da solução.	20
Figura 5 - Espectros de Infravermelho dos componentes puros utilizados na preparação das nanopartículas.	25
Figura 6 - Estruturas moleculares: (a) progesterona e (b) lecitina.	25
Figura 7 - Estruturas moleculares dos polímeros (a) PCL, (b) PHBV e (c) PLLA com destaque para a ligação éster.	26
Figura 8 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas do experimento NP4-1 (PHBV) e das nanopartículas “branco”.	27
Figura 9 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas blenda de PHBV/PLA contendo progesterona (NP4-2) e das nanopartículas “branco”.	28
Figura 10 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas de PHBV/PCL contendo progesterona (experimento NP4-3) e das nanopartículas “branco”.	29
Figura 11 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas de PLA contendo progesterona (NP4-4) e das nanopartículas “branco”.	30
Figura 12 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas de PCL contendo progesterona (NP4-5) e das nanopartículas “branco”.	31
Figura 13 - Ensaio de determinação do ponto isoelétrico: (a) NP4-1 (PHBV), (b) NP4-2 (PHBV/PLA), NP4-3 (PHBV/PCL), NP4-4 (PCL), NP4-5 (PLA).	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ζ – Potencial Zeta

FTIR - Fourier transform infrared spectroscopy (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier);

M_w - Massa molar ponderal média (g/mol);

NP4 - Nanopartículas de progesterona;

P4 - Progesterona;

PCL - Poli(caprolactona);

PHB - Poli(hidroxibutirato);

PHBV - Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato);

PLA - Poli(ácido lático);

PLLA - Poli(L-ácido lático);

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 NANOPARTÍCULAS	15
2.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	15
2.3 POLÍMEROS ENCAPSULANTES	16
2.3.1 Poli(hidroxi butirato-co-hidroxi valerato)	16
2.3.2 Poli(ácido láctico)	17
2.3.3 Poli(caprolactona).....	17
2.4 BLENDDAS POLIMÉRICAS	18
2.5 INTERAÇÕES ENTRE COMPONENTES DAS NANOPARTÍCULAS.....	18
2.6 ANÁLISE PONTO ISOELÉTRICO DAS NANOPARTÍCULAS.....	19
3 OBJETIVOS	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 MATERIAIS	23
4.2 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO DA PROGESTERONA COM A CASCA POLIMÉRICA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY- FTIR)	23
4.3 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DAS NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DO COMPORTAMENTO EM DIFERENTES MEDIDAS DE PH.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	25
5.2 PONTO ISOELÉTRICO	32
6 CONCLUSÕES	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

MAIA, Wallace José. Caracterização de nanopartículas blenda de biopolímeros (PHBV, PCL e PLLA) contendo progesterona. 2014. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

A liberação de progesterona em bovinos é realizada com o objetivo de sincronizar o cio. Atualmente isso é feito utilizando dispositivos intravaginais, contudo a liberação controlada utilizando nanopartículas biocompatíveis é uma alternativa que merece ser investigada. O emprego dessas nanopartículas seria interessante para facilitar o manejo em relação à sincronização do cio nos bovinos. O polímero controla a liberação do fármaco (no caso, a progesterona) e o protege de efeitos nocivos da radiação ultravioleta, umidade e do contato com oxigênio. Diferentes polímeros têm sido estudados para encapsulação de fármacos, porém destacam-se os que apresentam propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Este presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar as nanopartículas blenda de polímeros naturais (PHBV e PLLA) e polímero sintético (PCL) contendo progesterona. Para essa caracterização das nanopartículas foram feitas as análises de FTIR e ponto isoelétrico. Com base nos resultados obtidos é possível observar que todas as formulações de nanopartículas poliméricas tiveram interações devido às alterações nos espectros e a formulação que apresentou maiores alterações no espectro foi a formulação composta pela blenda de PHBV/PCL, conforme observado na análise FTIR. Em relação à análise do ponto isoelétrico das nanopartículas, pode-se observar que o pH 1 levou à maior precipitação das nanopartículas, que pode significar que as mesmas atingiram o seu ponto isoelétrico. Assim, pode-se concluir que a administração oral das nanopartículas não seria muito adequada, pois o pH do fluido gástrico está em torno de 1,2, que pode ocasionar um equilíbrio de cargas levando à desestabilização das nanopartículas e a consequente precipitação das mesmas.

Palavras-chave: Progesterona; Nanopartículas; Biopolímeros; FTIR; Ponto Isoelétrico; Liberação Controlada.

ABSTRACT

MAIA, Wallace José. Characterization of blend nanoparticles composed by biopolymers (PHBV, PCL and PLLA) containing progesterone. 2014. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

The release of progesterone in cattle is performed in order to synchronize estrus. Currently this is done using intravaginal devices, yet the controlled release using biocompatible nanoparticles is an alternative that should be investigated. The use of these nanoparticles would be interesting to facilitate the management regarding the synchronization of estrous in cattle. The polymer controls the release of the drug (in this case, progesterone) and protects it from harmful ultraviolet radiation, humidity and contact with oxygen. Different polymers have been studied for encapsulation of drugs, but major attention can be given to those that present properties of biodegradability and biocompatibility. This study aims to characterize the blend nanoparticles composed by natural polymers poly(L-lactic acid) (PLLA) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) and the synthetic polymer poly(ϵ -caprolactone) (PCL) containing progesterone. The nanoparticles were analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and the isoelectric point of nanoparticles suspensions were determined. Based on the results it was observed that all formulations of polymeric nanoparticles presented interactions between the polymers and the drug due to changes in FTIR spectra. The formulation which showed larger changes in the spectra was the blend of PHBV / PCL. Regarding to the isoelectric point analysis of the nanoparticles dispersions, pH 1 led to a more pronounced precipitation of nanoparticles, indicating that the isoelectric point was reached. Thus, it can be concluded that oral administration of nanoparticles would not be appropriate due to the pH of the gastric fluid (1.2), which may cause a destabilization and consequent precipitation of nanoparticles.

Key-words: Progesterone; Nanoparticles; Biopolymers; Isoelectric Point; Controlled Release.

1 Introdução

A progesterona (preg-4-eno-3,20-diona) é um esteróide progestogênico e sua liberação controlada, a partir de dispositivos intravaginais de nylon recobertos com silicone, é utilizada para alcançar a sincronização do cio para inseminação artificial de bovinos. Apesar de apresentarem biocompatibilidade, estes polímeros não são biodegradáveis. Estudos já foram realizados com sucesso para substituição desses polímeros por outros que além de biocompatíveis fossem biodegradáveis, como o PHB poli (hidroxibutirato) e a PCL poli (ϵ -caprolactona) (PIMENTEL, 2006). Porém, apesar de serem biodegradáveis ainda há a necessidade de remoção destes dispositivos após o período de sincronização do cio (OURO FINO, 2012).

O uso de nanopartículas com progesterona encapsulada para esta aplicação é uma alternativa interessante já que não haveria necessidade da sua remoção após a liberação da progesterona. Além disso, a técnica de obtenção dessas nanopartículas deve ser flexível ao ponto de produzir nanopartículas com diferentes propriedades quanto à velocidade de liberação da progesterona. Para tanto, modificações da composição das nanopartículas (polímero puro, blendas ou híbridos) podem possibilitar a modulação tanto da liberação da progesterona quanto da degradação por hidrólise das nanopartículas (BAJPAI *et al.*, 2008; CAN *et al.*, 2011).

O uso de polímeros naturais biodegradáveis tem sido atraente devido a sua abundância na natureza, boa biocompatibilidade e capacidade de ser facilmente modificados (MAIA, SANTANA e RÉ, 2004). Quando comparados com polímeros sintéticos utilizados na liberação controlada de fármacos, os polímeros naturais biodegradáveis, conhecidos como biodegradáveis, apresentam vantagens devido à sua fácil processabilidade, excelente biocompatibilidade e propensão à biodegradação sob diferentes condições ambientais (ERRICO *et al.*, 2009).

Este presente trabalho tem como objetivo principal caracterizar as interações dos componentes e também definir as melhores vias de administração das nanopartículas blenda de polímeros naturais (PHBV e PLLA) e polímero sintético (PCL) contendo progesterona.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Nanopartículas

Nanopartículas e micropartículas poliméricas são muito utilizadas na liberação controlada de fármacos e podem ser classificadas como esferas ou cápsulas, de acordo com sua estrutura. De acordo com Anton *et al.* (2008) quando o fármaco incorporado encontra-se disperso no interior da partícula polimérica, essa estrutura é chamada de nanoesfera ou microesfera. No caso das nanocápsulas ou microcápsulas, o fármaco encontra-se em um núcleo líquido, geralmente oleoso, confinado pela parede polimérica, como apresenta a Figura 1.

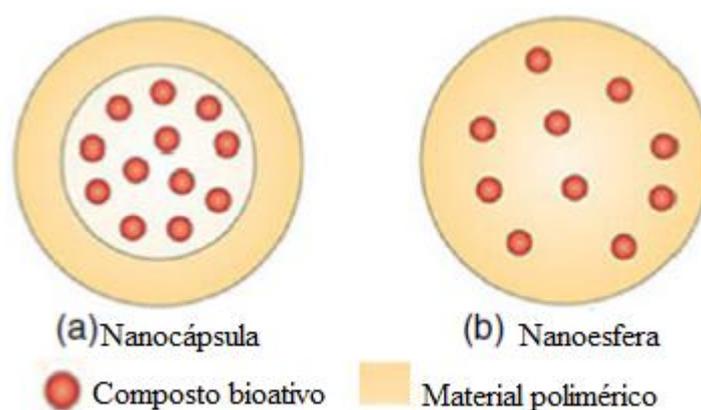


Figura 1 - Estrutura esquemática de (a) nanocápsulas e (b) nanoesferas.

Adaptado de Ezhilarasi et al. (2013).

Sistemas poliméricos têm sido amplamente aplicados para a encapsulação e a liberação de compostos ativos. As partículas poliméricas são uma das estratégias mais atraentes para este fim devido às suas propriedades controláveis, flexível no processamento para sua produção e reprodutibilidade (EZHILARASI *et al.*, 2013).

2.2 Síntese de nanopartículas poliméricas

Segundo Mishra *et al.*, (2010), existem vários métodos para a obtenção de nanopartículas, entre eles destacam-se os métodos de homogeneização de alta pressão, métodos de coacervação complexa, método de co-precipitação, método de *salting out*, método de nanoprecipitação, método de emulsificação e difusão do solvente, métodos de fluido supercrítico e métodos de automontagem (*self assembly*).

A técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente tem sido utilizada para encapsular drogas lipofílicas (VAUTHIER e BOUCHEMAL, 2009; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008) e pode ser utilizada para encapsulação de progesterona em nanopartículas de PCL, PHBV e PLLA (LEIMANN, 2011; KAUFMANN *et al.*, 2012).

De acordo com Musyanovych e Landfester (2012) o processo de miniemulsificação/evaporação do solvente consiste em uma emulsão composta por uma fase aquosa e uma fase orgânica, como apresentado na Figura 2. Esta última é imiscível em água e contém o polímero. Para estabilizar a emulsão podem ser utilizados surfactantes hidrofílicos (presentes na fase aquosa, ex.) ou hidrofóbicos (presentes na fase orgânica). A miniemulsão é obtida usando altas taxas de cisalhamento para formar nanogotas monodispersas com tamanhos variando entre 50 a 500 nm de diâmetro. Subsequentemente, o solvente orgânico é evaporado a partir do sistema fazendo com que o polímero precipite formando partículas sólidas esféricas de tamanho controlado.

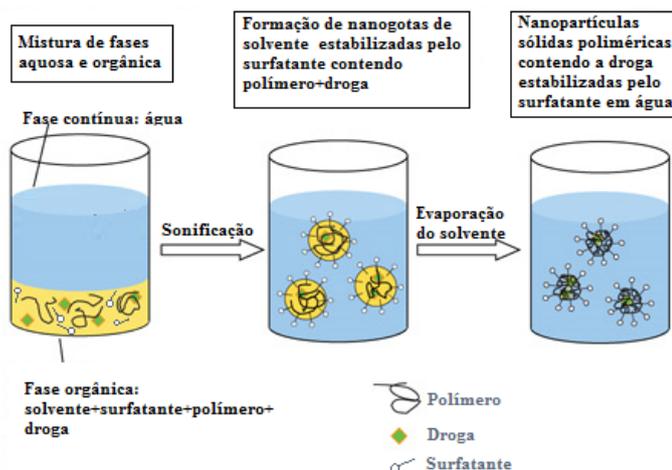


Figura 2 - Formação de nanopartículas biodegradáveis por miniemulsificação evaporação do solvente (adaptado de: Musyanovych e Landfester, 2012).

2.3 Polímeros encapsulantes

2.3.1 Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

O poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) é um poliéster copolímero de hidroxibutirato e hidroxivalerato (3HV), pertencente ao grupo dos poli(hidroxi alcanos) (PHAs) naturalmente sintetizados e acumulados por microorganismos na forma de grânulos intracelulares (GRAGE *et al.*, 2009).

De acordo com Huang *et al.*, (2010) em aplicações de *scaffolds* porosos utilizados para reparar defeitos ósseos, as interações entre o PHBV e queratinócitos humanos, condrócitos alogênicos, células gliais, de fibroblastos e osteoblastos, foram estudadas e sendo provado que o PHBV pode suportar as células, aderindo-as e permitindo sua proliferação. Além disso, não provoca inflamação aguda, necrose ou tumor maligno dentro de 1 ano. Esses resultados mostram que o PHBV apresenta excelente biocompatibilidade sem efeitos tóxicos aos organismos.

O PHBV por apresentar menor rigidez e cristalinidade que o PHB, o torna mais aplicável como meio de proteção na encapsulação e na liberação controlada de carotenoides em alimentos bem como para produtos farmacêuticos (MACHADO Jr. *et al.*, 2014).

2.3.2 Poli(ácido lático)

Dentre os componentes da família dos poliésteres biodegradáveis, os polilactídeos (como o PLA) têm sido o foco de muita atenção, pois são produzidos a partir de recursos renováveis, tais como o amido, são biodegradáveis e compostáveis, além de apresentarem muito pouca ou nenhuma toxicidade e elevado desempenho mecânico, comparável aos polímeros comerciais (YU; DEAN e LI, 2006).

A presença de um átomo de carbono quiral assimétrico na estrutura polilactídeo leva à existência de estéreo isômeros. Polilactídeos estéreo regulares resultam da polimerização de lactídeos oticamente puros: poli(L-ácido lático) (PLLA) e poli(D-ácido lático) (PDLA) (SARASUA *et al.*, 2005). O homopolímero PLLA, poli(L-ácido lático), é um polímero semicristalino com ponto de fusão em torno de 180 °C e cristalinidade por volta de 70% e dentre os poli(lactídeos), é o que possui a menor taxa de degradação (MOTTA, 2002).

2.3.3 Poli(caprolactona)

O PCL (poli- ϵ -caprolactona) é degradado por hidrólise das suas ligações éster, em condições fisiológicas (por exemplo, no corpo humano) e, portanto, tem recebido muita atenção para o uso na liberação de fármacos. Em particular, é especialmente interessante para a preparação de dispositivos implantáveis de longo prazo, devido à sua degradação mais lenta do que do PLLA. Nanopartículas de PCL foram preparadas na

sua maioria por nanoprecipitação, deslocamento de solvente e evaporação do solvente (KUMARI *et al.*, 2010).

2.4 Blendas poliméricas

De acordo com Sionkowska (2011) uma das formas de utilização de materiais para o campo biomédico são as blendas de polímeros sintéticos e polímeros naturais, que vêm sendo chamados de materiais biosintéticos ou bioartificiais. Os biopolímeros apresentam biocompatibilidade enquanto os polímeros sintéticos apresentam boa estabilidade térmica e mecânica. Além disso, a biodegradação das blendas pode ser modulada em função da composição (LEIMANN, 2011).

Blendas de polímeros podem exibir propriedades ópticas e mecânicas que um único polímero não apresenta, especialmente se a mistura é formada em escalas submicrométricas. Além disso, modificações podem ser feitas para que haja maior biocompatibilidade, bio-reconhecimento e integração com sistemas biológicos (KIETZKE *et al.*, 2003; WEST; HALAS, 2000).

2.5 Interações entre componentes das nanopartículas

Quase todo composto que possui ligações covalentes (orgânico ou inorgânico) absorve diversas frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Quando as moléculas absorvem radiação infravermelha estas são excitadas a um estado de energia mais elevado. Cada frequência de absorção corresponde a frequência de vibração de parte da molécula (PAVIA *et al.*, 2013). Para que o comprimento de onda seja separado é necessário modular o sinal fonte e passa-lo através da amostra de forma que o mesmo possa ser gravado como um interferograma. O interferograma é posteriormente decodificado por Transformada de Fourier, operação matemática que é convenientemente realizada pelo computador (software acoplado ao equipamento analítico) (SKOOG *et al.*, 1996). Para extrair a informação estrutural da molécula a partir de um espectro de infravermelho são usadas tabelas e mapas ou cartas de correlação (PAVIA *et al.*, 2013). De acordo com Skoog *et al.*, (1996) a análise de FTIR apresenta as vantagens de alta sensibilidade, resolução e rapidez de aquisição de dados, sendo que esses podem ser coletados para uma amostra em menos de 1 segundo.

A caracterização das interações entre o polímero encapsulante e a droga encapsulada pode ser realizada por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR). A importância dessa avaliação se dá por fornecer informações de miscibilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2013), localização da droga nas nanopartículas e interações químicas entre ambos (CALVO, VILA-JATO; ALONSO, 2000; LI *et al.*, 2008) que podem afetar a liberação da droga durante a aplicação das nanopartículas.

2.6 Análise Ponto Isoelétrico das Nanopartículas

Cada superfície de um material tem tendência para absorver cargas elétricas. O estado elétrico de uma superfície depende da distribuição espacial das cargas livres na sua vizinhança. Esta distribuição é geralmente idealizada como uma dupla camada eletroquímica (LAMEIRAS *et al.*, 2008). Na Figura 3 pode ser observado um esquema da dupla camada elétrica.

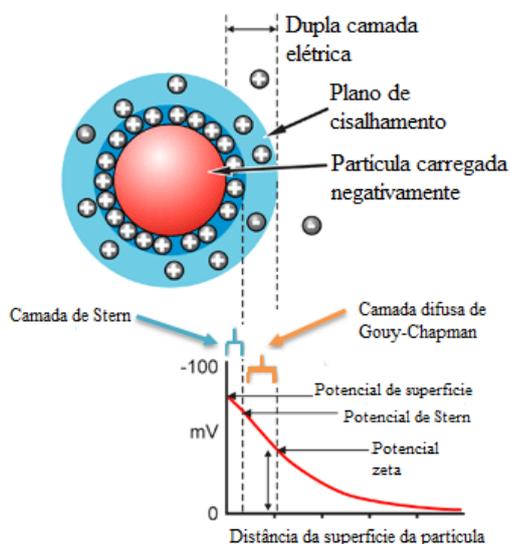


Figura 3 - Diagrama esquemático da dupla eléctrica na superfície de nanopartículas em solução (Adaptado de: NANOCOMPOSIX).

A dupla camada elétrica é formada pelas camadas de Stern e pela difusa ou de Gouy-Chapman (plano de cisalhamento). A Camada de Stern apresenta cargas adsorvidas à superfície carregada da partícula e conforme a distância da superfície da partícula aumenta, há uma diminuição na densidade de cargas (camada difusa). O potencial zeta é dado pelo potencial no limite da camada difusa (METCALF; EDDY, 2003).

A magnitude do potencial zeta (ζ) proporciona informações sobre o grau de estabilidade das partículas, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Estabilidade de suspensões em função do potencial zeta (METCALF; EDDY, 2003).

Z (mV)	Característica da suspensão
0-5	Partículas tendem a aglomerar ou agregar
5-20	Partículas apresentam estabilidade mínima
20-40	Partículas apresentam estabilidade moderada
> 40	Partículas apresentam alta estabilidade

Por definição, no ponto isoelétrico a carga líquida superficial é zero (potencial zeta) e a carga total é máxima. Na Figura 4 é apresentada a dependência do potencial zeta com o pH da suspensão.

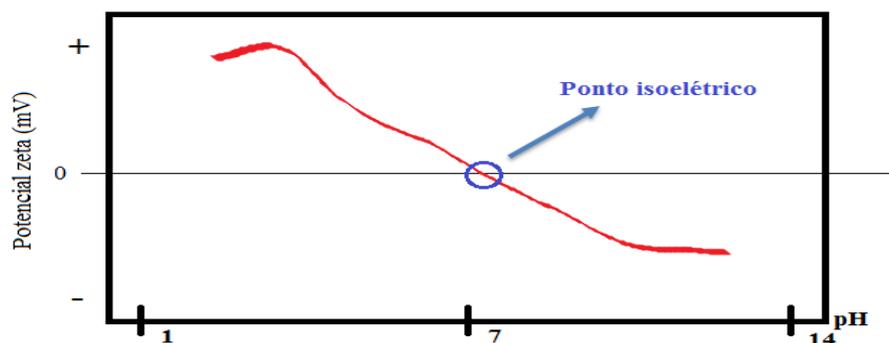


Figura 4 - Potencial zeta em função do pH da solução.

Com aumento ou diminuição do pH da dispersão há uma tendência em aumentar a carga líquida até um dado valor máximo, enquanto a carga total sempre se torna menor que a do ponto isoelétrico. Ou seja, o ponto isoelétrico é dependente dos íons presentes na dispersão e de sua concentração (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Quando se ajusta o pH a partir do ponto isoelétrico para valores mais ácidos, a concentração excessiva de íons H^+ produz cargas eletrostáticas superficiais positivas. Ao contrário, quando se ajusta o pH a partir do ponto isoelétrico para valores mais básicos, a concentração excessiva de íons OH^- produz cargas eletrostáticas superficiais negativas (DINGER, 2006).

O potencial zeta é de grande importância científica e tecnológica em muitos campos, como a nanotecnologia, biologia, alimentos, cerâmica e processamento de minério. Tem uma forte correlação com o desenvolvimento de processos bioquímicos e físico-químicos na superfície do material (LAMEIRAS *et al.*, 2008). Além disso, existe a importância de conhecer o comportamento de nanopartículas em diferentes meios no caso da administração de fármacos, já que são possíveis diferentes vias de administração, tais como a inalação, ingestão ou por injeção via intravenosa que possuem características particulares de pH.

De acordo com Elsabahy e Wooley (2012) selecionar a via de administração apropriada é de extrema importância para a síntese de nanopartículas. O conhecimento dos diferentes tipos de barreiras e desafios a serem superados em cada via de administração é imperativo para o projeto adequado de nanocarreadores. Por exemplo, o pH do pulmão e do muco nasal é neutro, ao passo que na mucosa ocular a característica é ligeiramente básica (pH 7,8) e na secreção vaginal é ácida (pH 3,5-4,5).

3 Objetivos

Este trabalho de conclusão de curso tem como objetivo principal caracterizar as nanopartículas blenda de polímeros naturais (PHBV e PLLA) e polímero sintético (PCL) contendo progesterona.

Objetivos específicos:

- Determinar a interação da progesterona com a casca polimérica por FTIR.
- Determinar o ponto isoelétrico das nanopartículas.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

As nanopartículas blenda foram produzidas anteriormente de acordo com o procedimento descrito por Leimann (2011) utilizando a técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Posteriormente as amostras foram liofilizadas e armazenadas sob refrigeração (10 °C). As amostras que foram analisadas no presente trabalho de conclusão de curso estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Formulações das nanopartículas contendo progesterona.

Experimento	Polímero	Polímero (g)	Progesterona (mg)	Lecitina (g)	CHCl ₃ (g)	H ₂ O (g)
NP4-1	PHBV	0,3011	5	0,1766	10,0050	24,0020
NP4-2	PHBV/PLLA	0,1515 / 0,1765	5	0,1765	10,0050	24,0020
NP4-3	PHBV/PCL	0,1501 / 0,1756	5	0,1756	10,0050	24,0100
NP4-4	PLLA	0,3007	5	0,1757	10,0072	24,0180
NP4-5	PCL	0,3100	5	0,1754	10,0130	24,0436

Os polímeros utilizados para preparação das nanopartículas foram o PHBV (Mw = 255.660 g/mol; 8,2% HV) e poli (ϵ -caprolactona) (PCL) foram gentilmente cedidos pela PHB Industrial S.A. Lecitina (Alfa Aesar) foi utilizada como surfatante. O poli (ácido láctico) (PLA, Mw = 15000 g/mol) foi sintetizado por Inhoato (2012). A progesterona encapsulada foi fornecida pela INDEX Farmacêutica (99,98 % de pureza).

4.2 Determinação da interação da progesterona com a casca polimérica por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy- FTIR)

Brometo de potássio (100 mg, KBr) e as nanopartículas (10 mg) foram moídos em almofariz e em seguida a mistura foi inserida no pastilhador. O pastilhador foi levado para uma prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST) e submetido a 7 kgf. As pastilhas foram então analisadas em espectrômetro Shimadzu (IR AFFINITY-1). Os espectros foram obtidos na faixa de 4000-400 cm⁻¹ utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm⁻¹. Para comparação foram analisados os polímeros puros, a progesterona, as nanopartículas “branco” (sem progesterona) e as nanopartículas contendo progesterona.

4.3 Determinação do ponto isoelétrico das nanopartículas através do comportamento em diferentes medidas de pH

Foram preparados 50 tubos de ensaio, 10 para cada formulação de nanopartículas. Em cada tubo foram colocados aproximadamente 1,5 ml da solução de nanopartículas e 8,5 ml de água destilada. Finalmente o pH de cada tubo de ensaio foi alterado com HCl (1 mol/L) ou NaOH (1 mol/L) para pHs variando de 1 a 10. As dispersões permaneceram nesta condição por um período de 24 horas e então a análise visual do comportamento das nanopartículas nas soluções foi realizado. Considerou-se o pH do ponto isoelétrico aquele no qual houve maior precipitação das nanopartículas.

5 Resultados e Discussões

5.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Espectros de FTIR foram obtidos de cada componente utilizados para formular as nanopartículas para identificar as bandas características de seus grupamentos específicos. Na Figura 5 são apresentados os espectros de infravermelho dos componentes puros das nanopartículas e as setas indicadas na Figura localizam as bandas discutidas no texto. As estruturas moleculares da lecitina e da progesterona são apresentadas na Figura 6.

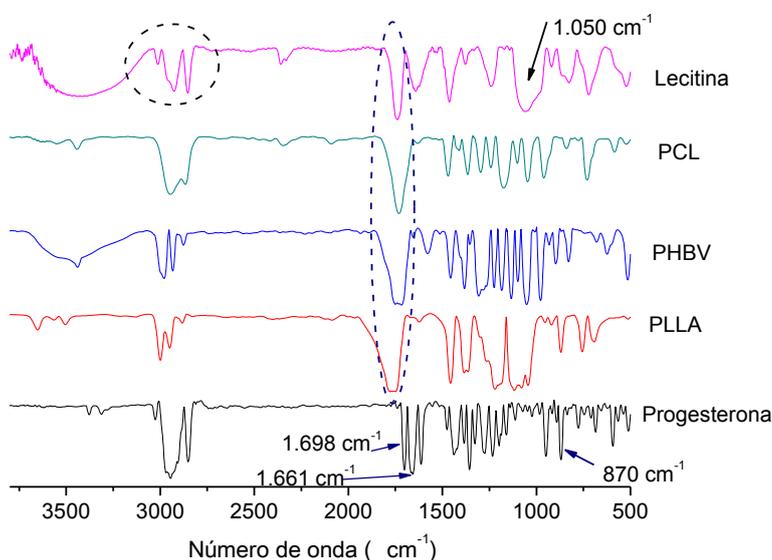


Figura 5 - Espectros de Infravermelho dos componentes puros utilizados na preparação das nanopartículas.

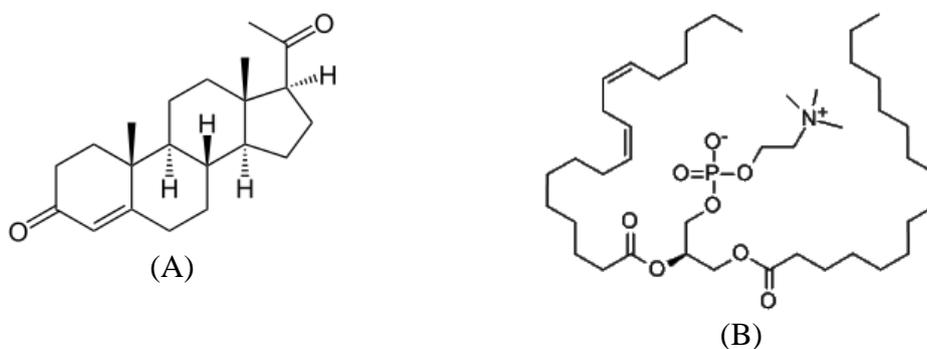


Figura 6 - Estruturas moleculares: (a) progesterona e (b) lecitina.

Cavallaro *et al.*, (1995) analisando microemulsões de ciclohexano e lecitina em água por FTIR observou o seguinte padrão nos espectros devido aos modos do estiramento C-H da lecitina: uma banda maior localizada em 2.855 cm^{-1} , uma banda localizada em 2.930 cm^{-1} com um ombro em 2.956 cm^{-1} e uma pequena banda em 3.010 cm^{-1} . O mesmo padrão pode ser observado na Figura 5, na área destacada em pontilhado no espectro da lecitina. Além disso, Ruggirello e Liveri (2003) também indicam que os grupamentos P-O-C e PO_4^- da lecitina apresentam bandas na região de 1.050 cm^{-1} , que também pode ser observado no espectro da Figura 5.

Cerchiara *et al.*, (2003) descrevem que a progesterona apresenta bandas características localizadas em 1.661 cm^{-1} e 1.698 cm^{-1} e que correspondem respectivamente as carbonilas localizadas nos carbonos C3 (cíclico) e C20 (ligado a radical metil). No espectro da Figura 5 estas bandas estão localizadas respectivamente em 1.656 cm^{-1} e em 1.703 cm^{-1} . Lancaster *et al.*, (2007) indicam que a banda característica da dupla ligação da progesterona se localiza entre 850 e 900 cm^{-1} . Sibaja (2012) analisaram progesterona por FTIR e localizaram a banda em 870 cm^{-1} , no presente trabalho a banda está localizada no espectro da Figura 5 na mesma posição.

Ainda na Figura 5 é possível observar para os três polímeros as bandas referentes ao estiramento C=O (aproximadamente 1.700 cm^{-1} , região circulado em pontilhado) característico dos poliésteres (POLETTO *et al.*, 2007). Na Figura 7 são apresentadas as estruturas moleculares do PCL, PHBV e PLLA com destaque para a ligação éster.

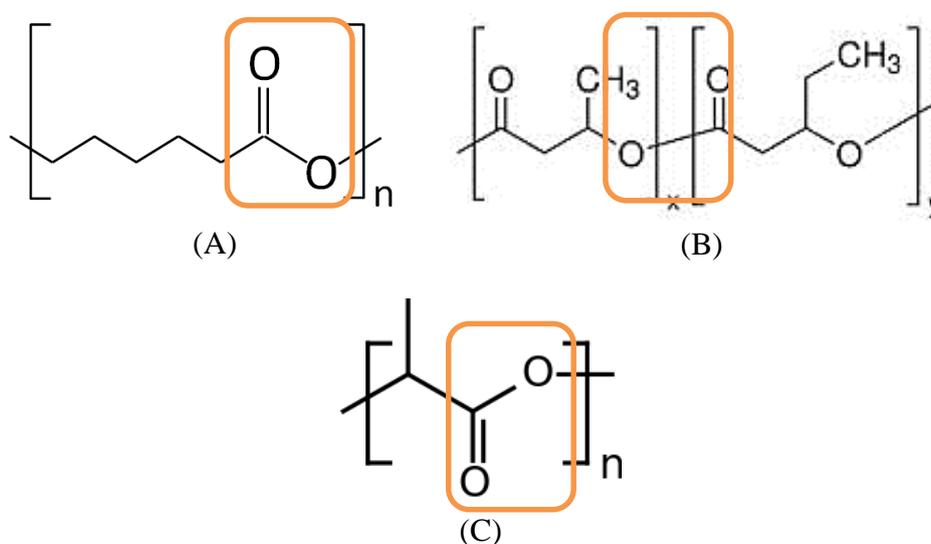


Figura 7 – Estruturas moleculares dos polímeros (a) PCL, (b) PHBV e (c) PLLA com destaque para a ligação éster.

Os espectros das nanopartículas branco (sem progesterona) e com progesterona para cada formulação foram obtidos e são apresentados a seguir. Na Figura 8 são apresentados os espectros de infravermelho das nanopartículas do experimento onde o polímero encapsulante utilizado foi o PHBV (NP4-1) e respectivas nanopartículas “branco” sem progesterona.

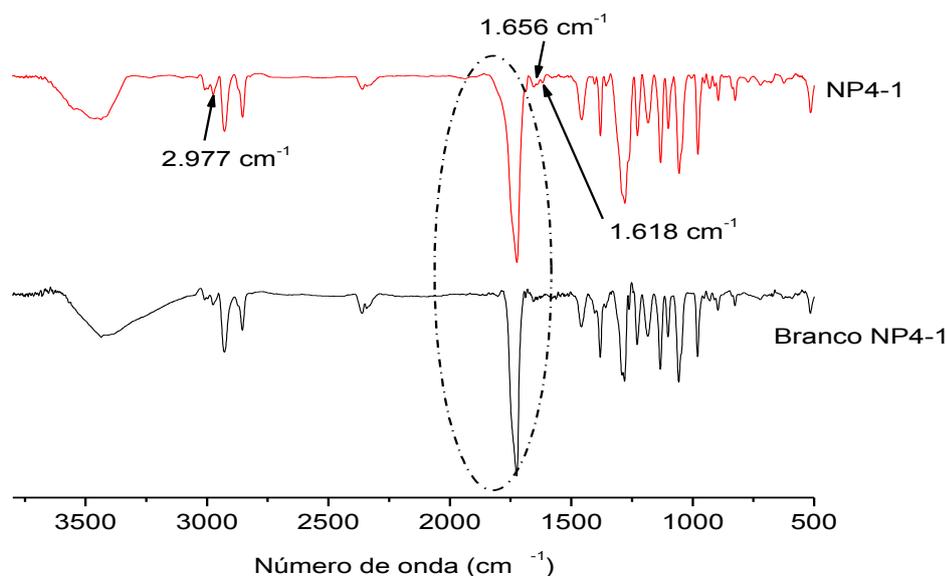


Figura 8 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas do experimento NP4-1 (PHBV) e das nanopartículas “branco”.

É possível observar que a região característica do estiramento CH da lecitina nos dois espectros se apresenta semelhante. O ombro localizado originalmente em 2.956 cm^{-1} (Figura 4) na amostra branco se localiza em 2.971 cm^{-1} e na amostra contendo progesterona em 2.977 cm^{-1} . Edwards, Bush e Matingly (1993) destacam que a banda localizada em 2.930 cm^{-1} é particularmente sensível à variação de interações intermoleculares da cadeia de lecitina e pode ser utilizada como uma indicação do grau de empacotamento lateral das cadeias alquila da lecitina localizadas na camada paliçada das micelas. Os autores indicam que uma diminuição da relação entre a intensidade da banda 2.930 cm^{-1} e da banda 2.855 cm^{-1} indica um aumento do grau de empacotamento da cadeia lateral alquílica da lecitina. É possível observar na Figura 8 que com a encapsulação da progesterona há um aumento da intensidade do ombro (2.977 cm^{-1}) indicando o maior empacotamento.

As bandas localizadas em 1.654 cm^{-1} e em 1.614 cm^{-1} referentes as carbonilas C3 e C20 da progesterona podem ser observada no espectro das nanopartículas contendo progesterona (NP4-1). Provavelmente a progesterona está dentro da matriz polimérica e existe forte interação com o polímero (PHBV) e a lecitina. Dev *et al.*, (2010) encapsularam a droga lamivudina, utilizada com anti-HIV, em nanopartículas de PLA e quitosana e comparando os espectros de FTIR das nanopartículas branco com as nanopartículas contendo a droga observaram um alargamento da banda localizada entre 1.000 e 1.100 cm^{-1} . Os autores concluíram que este comportamento indica a interação entre a droga e os polímeros bem como confirma sua incorporação nas nanopartículas poliméricas. O mesmo comportamento foi observado no presente trabalho, na região de 1.700 cm^{-1} a banda da amostra NP4-1 apresenta um alargamento quando comparado ao branco. Este comportamento pode ser decorrente de interação entre o estiramento C=O (região circulada em pontilhado) do polímero com a progesterona encapsulada.

As nanopartículas blenda de PHBV e PLLA (experimento NP4-2) branco e contendo progesterona têm seus espectros apresentados na Figura 9.

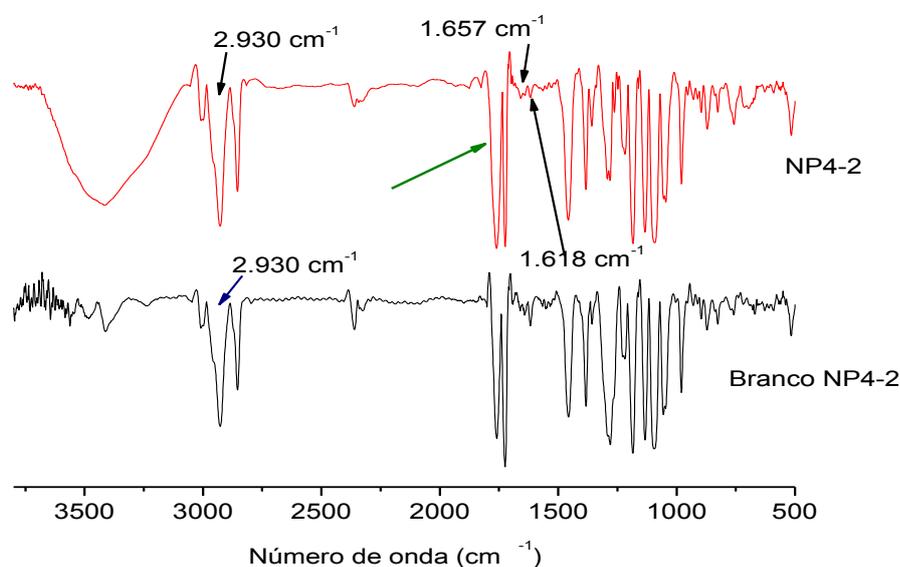


Figura 9 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas blenda de PHBV/PLLA contendo progesterona (NP4-2) e das nanopartículas “branco”.

Comparando os espectros apresentados na Figura 9 é possível observar que o ombro da região característica do grupamento CH da lecitina (2.956 cm^{-1}) aumentou em intensidade de forma a sobrepôr à banda de 2.930 cm^{-1} , tanto na amostra branco quanto da amostra contendo progesterona. Apesar disso as bandas localizadas em 3.010 , 2.855

e 2.930 cm^{-1} permaneceram sem deslocamento. Analisando a Figura 9 nota-se que esta região apresenta uma intensidade muito maior na Figura 8. Possivelmente a lecitina está interagindo de forma diferente com o PHBV e que com a mistura PHBV/PLLA. As bandas características da progesterona podem ser observadas no espectro da amostra contendo a droga e também pode-se notar um aumento na intensidade da banda situada em 1.762 cm^{-1} (estiramento C=O, região indicada com a seta verde).

Na Figura 10 são apresentados os espectros de infravermelho das nanopartículas do experimento onde os polímeros encapsulantes empregados foram o PHBV e o PCL (NP4-3) e das nanopartículas “branco” sem progesterona.

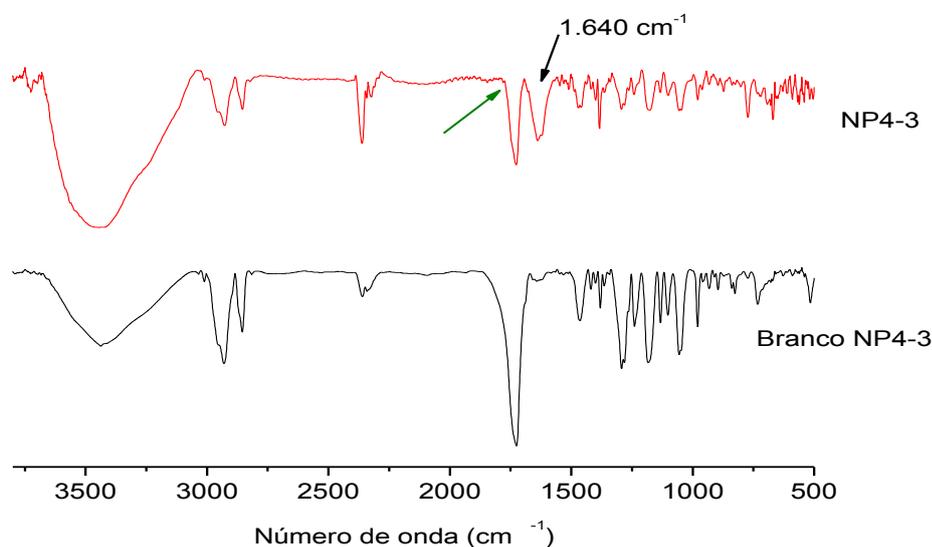


Figura 10 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas de PHBV/PCL contendo progesterona (experimento NP4-3) e das nanopartículas “branco”.

No caso das nanopartículas blenda de PHBV/PCL é possível observar o mesmo comportamento para a região referente ao grupamento CH da lecitina que foi observado anteriormente na Figura 9. Na região do estiramento C=O dos polímeros encapsulantes (indicado com a seta verde) houve um estreitamento da banda. A banda com maior alteração de intensidade no espectro foi a referente as carbonilas da progesterona (1.640 cm^{-1}). A banda localizada em 1.614 cm^{-1} originalmente (Figura 4) referente à dupla ligação da progesterona foi sobreposta.

Na Figura 11 são apresentados os espectros de infravermelho das nanopartículas do experimento onde o polímero encapsulante utilizado foi o PLLA (NP4-4).

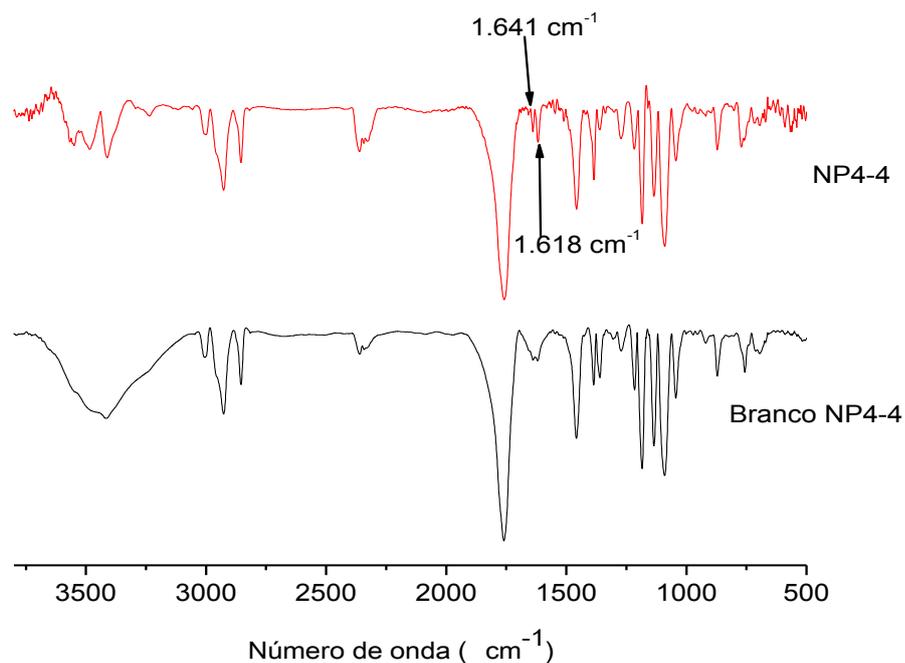


Figura 11 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas de PLA contendo progesterona (NP4-4) e das nanopartículas “branco”.

Quando o polímero encapsulante utilizado foi o PLLA o aumento da intensidade do ombro da banda característica da lecitina (CH) também pode ser observado. As bandas características da progesterona podem ser observadas na amostra NP4-4. Além desta diferença não foram observadas mais alterações do espectro branco para o espectro das nanopartículas de progesterona. Isso pode indicar uma menor interação entre a droga e o PLLA do que com os demais polímeros.

Na Figura 12 são apresentados os espectros de infravermelho das nanopartículas do experimento onde PCL foi utilizado como polímero encapsulante da progesterona (NP4-5) e das respectivas nanopartículas “branco”.

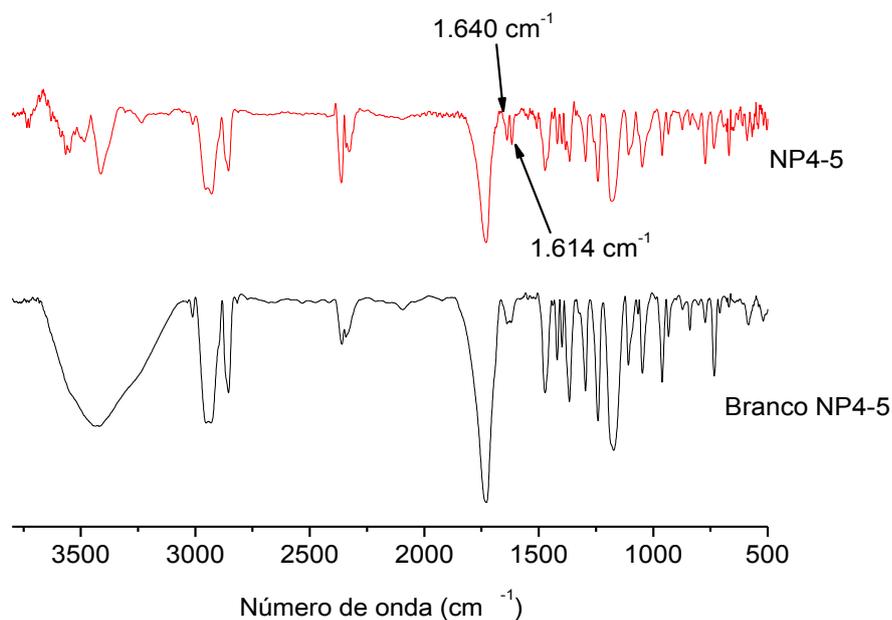


Figura 12 - Espectros de Infravermelho das nanopartículas de PCL contendo progesterona (NP4-5) e das nanopartículas “branco”.

Novamente o ombro referente à ligação CH da lecitina teve sua intensidade aumentada sobrepondo à banda de 2930 cm^{-1} . As bandas da carbonila da progesterona apresentaram uma intensidade maior que para as demais nanopartículas de polímeros puros (Figuras 8 e 10).

De acordo com Liu, Xiao e Allen (2003) a presença de mudanças ou alterações nos espectros de polímero-droga é uma indicação de que existe interação entre o polímero e a droga. Das, Kasoju e Bora (2010) determinaram por FTIR interações potenciais entre os componentes de nanopartículas (alginato, quitosana e pluronic) contendo curcumina. Foram observadas mudanças de localização das bandas características dos componentes quando comparados os espectros puros e nanopartículas sem curcumina e com curcumina. Ainda, Barzegar-Jalali *et al.*, (2012) ao encapsularem diclofenaco de sódio em nanopartículas de Eudragit® RS-100 observaram interações eletrostáticas fracas entre o grupo carboxílico da droga e o grupo amino do polímero pela redução da intensidade da banda localizada em 1.572 cm^{-1} (estiramento C=O). Sawant *et al.*, (2010) demonstraram pelo espectro de FTIR que não há nenhuma interação entre a droga lidocaína encapsulada com o polímero hidrofóbico Eudragit, já que o espectro não apresentava nenhuma alteração com relação aos

componentes puros. Esse resultado foi confirmado pela análise de liberação da droga que apresentou o comportamento tipo *burst release*. Este tipo de liberação ocorre de forma brusca levando a um maior fornecimento do medicamento no período inicial do tratamento e também reduz o tempo de vida do dispositivo de liberação controlada, esgotando a droga encapsulada rapidamente (HUANG; BRAZEL, 2001).

De forma geral é possível concluir que para todas as formulações de nanopartículas poliméricas houve interação devido às alterações nos espectros. A formulação que apresentou maiores alterações no espectro foi a composta pela blenda de PHBV/PCL. Este resultado está em concordância com os resultados de análise de liberação controlada encontrados por Pimentel (2010). O autor avaliou a liberação de progesterona a partir de micropartículas de PHBV e de blendas de PHBV/PCL e observou que as nanopartículas de PHBV apresentaram uma liberação de até 95% da droga em 12 horas de análise enquanto que as blendas de PHBV/PCL liberaram até 77% da droga no mesmo período. Esse resultado sugere que para que a liberação possa ser sustentada por um período de tempo maior o ideal seria utilizar como encapsulante a blenda de PHBV/PCL.

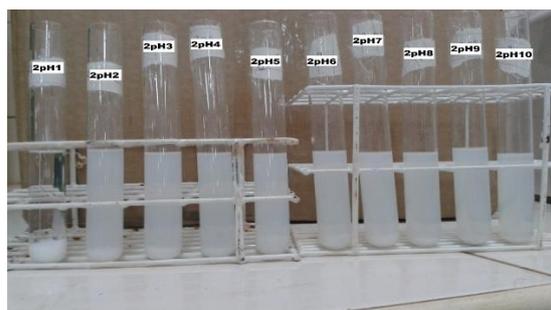
5.2 Ponto Isoelétrico

Para determinar o pH ideal de liberação da progesterona e definir a melhor via de administração, o ponto isoelétrico das dispersões de nanopartículas foi determinado. Na Figura 13 são apresentadas as imagens dos tubos de ensaio contendo as dispersões de nanopartículas (NP4-1, NP4-2, NP4-3, NP4-4 e NP4-5) em pHs variando de 1 a 10.

Em todos os casos é possível observar que o pH 1 levou à maior precipitação das nanopartículas, que pode significar que as mesmas atingiram o seu ponto isoelétrico. De acordo com Legrand *et al.*, (1999) os poliésteres e a lecitina fornecem um potencial negativo à interface, isso está de acordo com os resultados obtidos já que com o fornecimento de cargas positivas (íons H^+ referentes ao pH reduzido) houve equilíbrio de cargas levando à desestabilização das nanopartículas e a consequente precipitação. Isso indica que a administração oral não seria uma alternativa adequada uma vez que o pH do fluido gástrico está em torno de 1,2 (ZHANG *et al.*, 2011).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 13 - Ensaio de determinação do ponto isoelétrico: (a) NP4-1 (PHBV), (b) NP4-2 (PHBV/PLLA), NP4-3 (PHBV/PCL), NP4-4 (PCL), NP4-5 (PLLA).

6 Conclusões

Com base nos resultados apresentados e na revisão bibliográfica é possível concluir que para todas as formulações de nanopartículas poliméricas houve interação devido às alterações nos espectros. A formulação que apresentou maiores alterações no espectro foi a formulação composta pela blenda de PHBV/PCL, conforme observado na análise FTIR.

Esta blenda de PHBV/PCL por ser a formulação que teve o melhor encapsulamento, demonstra ser uma possibilidade para que a liberação da progesterona possa ser sustentada por um período de tempo maior.

Em relação à análise do ponto isoelétrico das nanopartículas, foi possível observar que o pH 1 levou à maior precipitação das nanopartículas, que pode significar que as mesmas atingiram o seu ponto isoelétrico. Assim, pode-se concluir que a administração oral das nanopartículas não seria muito adequada, pois o pH do fluido gástrico está em torno de 1,2, que pode ocasionar um equilíbrio de cargas levando à desestabilização das nanopartículas e a consequente precipitação das mesmas. Uma boa alternativa para a administração das nanopartículas, poderia ser a via intravenosa.

7 Referências Bibliográficas

ANTON, N; BENOIT, J-P; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, 2008.

BARZEGAR-JALALI, M.; ALAEI-BEIRAMI, M.; JAVADZADEH, Y.; MOHAMMADI, G.; HAMIDI, A.; ANDALIB, S.; ADIBKIA, K. Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium–eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. **Powder Technology**, 219, 211-216, 2012.

BELITZ, Hans-Dieter; GROSCHE, Werner; SCHIEBERLE, Peter. Cereals and cereal products. **Food Chemistry**, p. 670-745, 2009.

CALVO, P.; VILA JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 2000.

CAN, E.; UDENIR, G.; KANNECI, A. I.; KOSE, G.; SEYDA, B. Investigation of PLLA/PCL Blends and Paclitaxel Release Profiles. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, p. 1442–1453, 2011.

CAVALLARO, G.; LA MANNA, G., LIVERI, V. T., ALIOTTA, F., FONTANELLA, M. E. Structural investigation of water/lecithin/cyclohexane microemulsions by FT-IR spectroscopy. **Journal of colloid and interface science**, v. 176, n. 2, p. 281-285, 1995.

CERCHIARA, T.; LUPPI, B., BIGUCCI, F., ZECCHI, V. Effect of chitosan on progesterone release from hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes. **International journal of pharmaceutics**, v. 258, n. 1, p. 209-215, 2003.

DAS, R. K.; KASOJU, N.; BORA, U. Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 153-160, 2010.

DEV, A.; BINULAL, N. S.; ANITHA, A.; NAIR, S. V.; FURUIKE, T.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Preparation of poly (lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications. **Carbohydrate polymers**, v. 80(3), p. 833-838, 2010.

DINGER, D. Medidas de pontos isoelétricos sem o uso de analisador de Potencial Zeta. **Cerâmica Industrial**, v. 11, n. 3, p. 23-24, 2006.

EDWARDS, W. L.; BUSH, S. F.; MATIINGLY, T. W. Raman spectroscopic study of boundary lipid in 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine/apolipoprotein A-I recombinants. **Spectrochimica Acta**, v. 49A, n. 13114, p. 2027-2038, 1993.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2545-2561, 2012.

ERRICO, C.; BARTOLI, C.; CHIELLINI, F.; CHIELLINI, E. Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2099, p. 1-10, 2009.

- EZHILARASI, P. N.; KARTHIK, P.; CHHANWAL, N.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 628-647, 2013.
- GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. A. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 660-669, 2009.
- HUANG, W.; SHI, X.; REN, L.; DU, C.; WANG, Y. PHBV microspheres–PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 15, p. 4278-4285, 2010.
- HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2, p. 121-136, 2001.
- INHOATO, L. A. Influência de parâmetros experimentais na Síntese de Poli (l-ácido láctico). 2012.
- KAUFMANN, K.; BIZ, M. H.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. de; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V. **Influência do polímero na eficiência de encapsulação de progesterona em nanopartículas biocompatíveis**. IV SIMTEA – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2012.
- KIETZKE, T.; NEHER, D.; LANDFESTER, K.; MONTENEGRO, R.; GÜNTNER, R.; SCHERF, U. Novel approaches to polymer blends based on polymer nanoparticles. **Nature Materials**, v. 2, n. 6, p. 408-412, 2003.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LAMEIRAS, F. S.; SOUZA, A. L. D.; MELO, V. A. R. D.; NUNES, E. H. M.; Braga, I. D. Measurement of the zeta potential of planar surfaces with a rotating disk. **Materials Research**, v. 11, n.2, p. 217-219, 2008.

LANCASTER, R. W.; KARAMERTZANIS, P. G.; HULME, A. T.; TOCHER, D. A.; LEWIS, T. C.; PRICE, S. L. The polymorphism of progesterone: Stabilization of a 'disappearing' polymorph by co-crystallization. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 12, p. 3419-3431, 2007.

LASSALLE, V.; FERREIRA, M. L. PLA Nano-and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 6, p. 767-783, 2007.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. **STP pharma sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LEIMANN, F.V. **Nanopartículas híbridas de polímero natural (phbv)/polímero sintético**. 2011. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina. SC, 2011.

LI, Y.; WONG, H. L.; SHUHENDLER, A. J.; RAUTH, A. M.; WU, X. Y. Molecular interactions, internal structure and drug release kinetics of rationally developed polymer–lipid hybrid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 1, p. 60-70, 2008.

LIU, J.; XIAO, Y.; ALLEN, C. Polymer–drug compatibility: a guide to the development of delivery systems for the anticancer agent, ellipticine. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 93, n. 1, p. 132-143, 2003.

MAIA, J. L.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2004.

MACHADO, Jr., FRANCISCO, R.S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERTA, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERTA, C. A. V. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17-21, 2014.

METCALF, I. N. C.; EDDY, H. **Wastewater engineering; treatment and reuse**. 2003.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine**, v. 6, n. 1, p. 9-24, 2010.

MOTTA, A. C. - "**Síntese e caracterização do poli(L-ácido láctico) - PLLA e poli(L-ácido láctico - co-ácido glicólico) - PLGA, estudo da degradação in vitro**", Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil ,2002.

MUSYANOVYCH, A.; LANDFESTER, K. Innovative Polymers Engineered for Drug Delivery and Tissue Engineering. **Material Matters**, v. 7, n. 3, p. 27-54, 2012.

MUSYANOVYCH, A.; SCHMITZ-WIENKE, J.; MAILÄNDER, V.; WALTHER, P.; LANDFESTER, K. Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, p. 127-139, 2008.

NANOCOMPOSIX. Disponível em: <<http://nanocomposix.com/>>. Acesso em 10 mai. 2014.

OLIVEIRA, J. E.; MEDEIROS, E. S.; CARDOZO, L.; VOLL, F.; MADUREIRA, E. H.; MATTOSO, L. H. C.; ASSIS, O. B. G. Development of poly (lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals. **Materials Science and Engineering: C**, 2013.

OURO FINO. Sincrogest®. Disponível em: <<http://www.ourofino.com/saude-animal/ruminantes/produtos/reproducao/sincrogest.html>>. Acesso em 13 nov. 2013.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. **Introduction to Spectroscopy**. 5th edition, Cengage Learning 2013.

PIMENTEL, J. R. V. **Emprego de matriz polimérica biodegradável em dispositivos vaginais para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: testes in vitro e in vivo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.

PIMENTEL, J. R. V. **Liberção sustentada de progesterona em micro partículas de PHB-V e PHB-V/PCL produzidas em meio super-critico**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

POLETTO, F. S.; JÄGER, E.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Rate-modulating PHBHV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 345, n. 1, p. 70-80, 2007.

RUGGIRELLO, A.; TURCO LIVERI, V. FT-IR investigation of the urea state in lecithin and sodium bis (2-ethylhexyl) phosphate reversed micelles. **Journal of colloid and interface science**, v. 258, n. 1, p. 123-129, 2003.

SAWANT, P. D.; LUU, D.; YE, R.; BUCHTA, R. Drug release from hydroethanolic gels. Effect of drug's lipophilicity (log P), polymer–drug interactions and solvent lipophilicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396 p. 45–52, 2010.

SIBAJA, A. M. A. **Estudo físico-químico dos polimorfos da progesterona e estabilização da forma metaestável sobre matrizes poliméricas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós - Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. SC, 2012.

SKOOG, D.; HOLLER, F. J.; NEIMAN, T. A. **Principios de análisis instrumental**. 5 ed. Madrid: McGraw Hill, 1996.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 9, p. 1254-1276, 2011.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.

WEST, J. L.; HALAS, N. J. Applications of nanotechnology to biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 215-217, 2000.

YUA, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Prog. Polym. Sci.**, v.31., p. 576–602, 2006.

ZHANG, Y.; WEI, W.; LV, P.; WANG, L.; MA, G. Preparation and evaluation of alginate–chitosan microspheres for oral delivery of insulin. **European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 11-19, 2011.