

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Desenvolvimento e Caracterização de Sistema de Liberação Controlada
Contendo Piriproxifem para Controle das Formas Imaturas de *Haematobia*
irritans em Bovinos.**

Melina Cardilo Campos Alves

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMA DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA CONTENDO PIRIPROXIFEM PARA
CONTROLE DAS FORMAS IMATURAS DE *HAEMATOBIA IRRITANS*
EM BOVINOS.**

MELINA CARDILO CAMPOS ALVES

Sob Orientação do Professor
Luiz Henrique Guerreiro Rosado

e Co-orientação da Professora
Yara Peluso Cid

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração Tecnologia Química.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca Central / Seção de
Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474d Alves, Melina Cardilo Campos , 1993-
Desenvolvimento e caracterização de sistema de
liberação controlada contendo piriproxifem para
controle das formas imaturas de Haematobia irritans
em bovinos. / Melina Cardilo Campos Alves. - 2019.
90 f.: il.

Orientador: Luiz Henrique Guerreiro Rosado.
Coorientador: Yara Peluso Cid.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Engenharia Química, 2019.

1. Piriproxifem. 2. Haematobia irritans. 3.
Sistema de liberação controlado. I. Guerreiro Rosado,
Luiz Henrique , 1981-, orient. II. Peluso Cid, Yara ,
1892-, coorient. III Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Engenharia
Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MELINA CARDILO CAMPOS ALVES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no curso de Pós Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/02/2019

Prof. Dr. Luiz Henrique Guerreiro Rosado, UFRRJ.
(Orientador)

Prof. Dra. Renata Nunes Oliveira, UFRRJ.

Dra. Ana Paula Duarte Moreira, UFRJ.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que acompanham e incentivam os meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família que é o combustível para todas as minhas escolhas e desafios. Muito obrigada por todo o apoio, confiança e esforços que fazem por mim. À minha mãe Rocely, meu pai Sérgio e meu irmão Vinícius dedico todas minhas conquistas.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo crescimento e amadurecimento nessa jornada, junto com a família que escolhi, meus amigos.

Ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária, por direcionar meu caminho e por me tornar amante do meu trabalho. E por todos profissionais que ali atuam em conjunto para o desenvolvimento do laboratório.

Ao meu orientador Luiz Henrique Guerreiro, pelo desafio de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da universidade e por todas oportunidades concedidas.

À minha co orientadora, Yara Peluso Cid, minha inspiração profissional. Obrigada por todo apoio e motivação essenciais para a realização do trabalho.

À minha grande amiga Gabriela Martins, companheira de laboratório e vida. Obrigada por tornar leve e possível.

À minha amiga Isabela Hastenreiter, companheira de projeto e de momentos prazerosos.

Aos meus mestres de laboratório, Thais Paes e Viviane Magalhães por toda dedicação, ensinamento e principalmente, apoio ao longo dessa jornada.

À professora Renata Nunes pelo acompanhamento e apoio ao trabalho.

À Gabriela Oliveira, pelo envolvimento e participação do trabalho no âmbito veterinário.

Aos técnicos e professores, José, Arthur Valbon e Bruno Lobato pela disponibilidade na realização dos ensaios físicos.

Aos meus amigos da pós-graduação, que juntos me ajudaram a enfrentar todas as dificuldades do programa, Beatriz, Rodrigo, Alessandra, Edson, Hugo, Débora e Júlio.

À minha família escolhida por amor e companheirismo, Alexandra, Diego, Durval e Amanda, obrigada por serem meu alicerce todos os dias.

À secretaria do programa, em especial Renata, que me auxiliou em toda essa etapa de conclusão, se mostrando sempre disponível.

À banca examinadora do trabalho, Renata Nunes e Ana Paula, pela participação e contribuição ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, a todos meu amigos e familiares que dividiram comigo o peso e a responsabilidade dessa jornada.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

*“Acima de tudo ame
Como se fosse a
Única coisa que você sabe fazer
No fim do dia isso tudo
Não significa nada
Esta página
Onde você está
Seu diploma, seu emprego
O dinheiro
Nada importa
Exceto o amor
E a conexão entre as pessoas
Como tocou as pessoas à sua volta
E quanto você se doou a elas.”*

Rupi Kaur

RESUMO

ALVES, Melina Cardilo Campos. **Desenvolvimento e Caracterização de Sistema de Liberação Controlada Contendo Piriproxifem para Controle das Formas Imaturas de *Haematobia irritans* em Bovinos**. 2019. 90p Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A pecuária brasileira se destaca no cenário internacional representando o maior rebanho bovino mundial. Neste contexto, os custos das atividades pecuárias são elevados, principalmente o investimento em produtos de saúde animal, como os antiparasitários, a fim de controlar os prejuízos ligados aos efeitos deletérios dos parasitas, com maior relevância para infestações por carrapatos e *Haematobia irritans*, conhecida como mosca dos chifres. Atualmente, o controle tradicional deste parasito constitui-se do uso indiscriminado de pesticidas convencionais com amplo espectro, expondo animais, seres vivos e o meio ambiente à riscos tóxicos, acelerando o processo de resistência. No entanto, o Piriproxifem pertencente à classe de inibidores do crescimento de insetos (IGR), trata-se de um parasiticida bioracional, com mecanismo de ação seletivo para insetos, sendo altamente seguros para o controle das formas imaturas de *H.irritans*. A eficácia oral do Piriproxifem permite o desenvolvimento de uma forma farmacêutica administrada via oral, apropriando-se da tecnologia farmacêutica para corroborar estratégias de controle do perfil de liberação dos ativos, como a utilização de matrizes poliméricas impregnadas em suporte celulósico, à fim de aumentar o tempo de residência do fármaco no rúmem, e conseqüentemente prolongar o tempo de ação do controle do inseto. O sistema de liberação controlado possui como principal proposta o aumento da segurança do produto e a extensão da ação farmacológica quando associadas aos polímeros PEG, PCL e PLGA, promovendo a dissolução gradual do fármaco. A formulação foi caracterizada físico-quimicamente através da avaliação por espectroscopia de infravermelho (FTIR), ensaios morfológicos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise térmica pelo ensaio termogravimétrico (TGA). Foram avaliadas as metodologias utilizadas para o desenvolvimento do sistema de liberação e o perfil de dissolução *in vitro*. Os resultados demonstraram que foi possível desenvolver uma formulação de liberação controlada contendo piriproxifem pela avaliação do estudo cinética de dissolução, e as metodologias de incorporação não se diferenciaram significativamente no perfil de liberação. As análises espectrais elucidaram as ligações e as atribuições características de cada polímero. A maior fração volumétrica do fármaco incorporado encontrada nas micrografias dos polímeros PCL, PLGA e PEG foi de 96,02%, 76,24% e 86,88% representada através do método de incorporação mergulhado, ao passo que, a menor fração volumétrica foi de 94,85%, 75,84% e 84,84%, correspondente ao método impregnado. A TGA e DTG demonstraram os resultados de perda mássica inicial ($6,9 \pm 0,02$), sendo possível avaliar a temperatura de degradação de cada formulação.

Palavras Chaves: Piriproxifem. *Haematobia irritans*. Sistema de Liberação Controlado.

ABSTRACT

ALVES, Melina Cardilo Campos. **Development and characterization of a controlled release system containing pyriproxyfen for control of immature forms of *Haematobia irritans* in bovine.** 2019. 90p Dissertation (Master in Chemical engineering) Institute of Technology, Department of Chemical Engineering, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Brazilian livestock stands out in the international scenario representing the largest cattle herd in the world. In this context, the costs of livestock activities are high, especially the investment in animal health products, such as antiparasites, in order to control the damages associated with the deleterious effects of the parasites, with greater relevance for tick infestations and *Haematobia irritans*, known as fly of the horns. Currently, the traditional control of this parasite uses indiscriminate conventional pesticides with broad spectrum, exposing animals, living beings and the environment to toxic risks, accelerating the resistance process. However, Piriproxifem belonging to the class of insect growth inhibitors (IGR), is a biorational parasiticide, with selective action mechanism for insects, being highly safe for the control of the immature forms of *H.irritans*. The oral efficacy of Piriproxifem allows the development of an oral dosage form, appropriating the pharmaceutical technology to corroborate strategies for the control of the asset release system, such as the use of polymer matrices impregnated, in order to increase the residence time of the drug in rumen, and consequently prolong the time of action of the insect control. The main purpose of the controlled release system is to increase the safety of the product and to extend the pharmacological action when associated to the polymers PEG, PCL e PLGA, promoting the gradual dissolution of the drug. The formulation was physico-chemically characterized by infra-red spectroscopy (FTIR), morphological assays by scanning electron microscopy (SEM) and thermal analysis by thermogravimetric (TGA) assays. The methodologies used for the development of the release system and the in vitro dissolution profile were evaluated. The results demonstrated that it was possible to develop a controlled release formulation containing pyriproxyfen by the evaluation of the dissolution kinetic study, and the incorporation methodologies did not differ significantly in the release profile. The spectral analyzes elucidated the structures and their characteristic attributions of each polymer. The highest volumetric fraction found in the micrographs of the PCL, PLGA and PEG polymers was 96.02%, 76.24% and 86.88% represented by the dipped incorporation method, whereas the lowest volumetric fraction was 94, 85%, 75.84% and 84.84% corresponding to the impregnated method. TGA and DTG demonstrated the results of initial mass loss (6.9 ± 0.02), and it was possible to evaluate the degradation temperature of each formulation.

Keywords: Pyriproxyfen. *Haematobia irritans*. Controlled Release System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico da mosca-dos-chifres. (1) Parasitismo; (2) Oviposição; (3) Desenvolvimento Larval. (Ilustração: Melina Alves. Adaptado de PIRES, 2015).....	05
Figura 2. Estrutura química da molécula de Piriproxifem (A) e do Hormônio Juvenil III (B).(Fonte: Pubchem)	07
Figura 3. Perfis plasmáticos em diferentes condições de administração (Fonte: adaptado de VEIGA, 1988). (1) Liberação convencional, (2) Liberação sustentada, (3) Liberação Retardada, (4) Liberação Repetida e (5) Liberação Prolongada.....	11
Figura 3. Estrutura química do monômero etilenoglicol (Fonte: Pubchem)	13
Figura 5. Estrutura química do copolímero de PLGA e seus respectivos monômeros (x,y). (x: ácido lático; y: ácido glicólico) (Fonte: Pubchem)	14
Figura 6. Estrutura química do monômero (n) do polímero PCL. (Fonte: Pubchem)...	15
Figura 7. Cálculo da eficiência de dissolução (%)	17
Figura 8. Equação matemática para fração volumétrica	22
Figura 9. Etapas de desenvolvimento do protótipo do sistema polimérico contendo piriproxifem	23
Figura 10. Curva de calibração do Padrão Secundário de Piriproxifem	24
Figura 11. Formulações desenvolvidas	25
Figura 12. Curva de calibração Piriproxifem	26
Figura 13. Solubilidade do Piriproxifem nos diferentes meios	28
Figura 14. Porcentagem dissolvida das formulações poliméricas PEG contendo piriproxifem em função do tempo (h) nas duas diferentes metodologias: mergulhado (PEGm) e impregnado (PEGi). Inset: Perfil de liberação das formulações em até 24 horas	29
Figura 15. Porcentagem dissolvida das formulações poliméricas PLGA contendo piriproxifem em função do tempo (h) nas duas diferentes metodologias: mergulhada (PLGAm) e impregnada (PLGai). Inset: Perfil de liberação das formulações em até 24 horas	30
Figura 16. Porcentagem dissolvida das formulações poliméricas PCL contendo piriproxifem em função do tempo (h) nas duas diferentes metodologias. Mergulhado (PCLm) e impregnado (PCLi). Inset: Perfil de liberação das formulações em até 24 horas	31

Figura 17. Espectro de infravermelho do suporte celulósico.	35
Figura 18. Espectro do infravermelho do IGR Piroxicam.	36
Figura 19. Espectro de infravermelho do polímero PEG puro.	37
Figura 20. Sobreposição de espectros de FTIR do fármaco Piroxicam, do polímero PEG puro, Suporte Celulósico e formulações PEG mergulhada (PEGm) e PEG impregnada (PEGi).	38
Figura 21. Espectro de infravermelho do polímero PLGA puro.	39
Figura 22. Sobreposição de espectros de FTIR do fármaco Piroxicam, do polímero PLGA puro, das formulações PLGA mergulhada (PLGAm) e PLGA impregnado (PLGAi).	40
Figura 23. Espectro de infravermelho do polímero PCL puro.	41
Figura 24. Sobreposição de espectros de FTIR do fármaco Piroxicam, do polímero PCL puro e das formulações PCL mergulhada (PCLm) e PCL impregnado (PCLi). ..	42
Figura 25. Micrografias da formulação contendo PEG nas diferentes metodologias. (1) PEGm placebo; (2) PEGi placebo; (3) Formulação PEGm; (4) Formulação PEGi. Eletrões secundários (SE). Aumento de 300x.	43
Figura 26. Histograma do diâmetro das fibras (n=100) das formulações de PEG em ambas metodologias.	44
Figura 27. Micrografias da formulação contendo PLGA nas diferentes metodologias. (1) PLGAm placebo; (2) PLGAi placebo; (3) Formulação PLGAm; (4) Formulação PLGAi. Eletrões secundários (SE). Aumento de 300x.	45
Figura 28. Histograma do diâmetro das fibras das formulações de PLGA em ambas metodologias.	46
Figura 29. Micrografias da formulação contendo PCL nas diferentes metodologias. (1) PCLm placebo; (2) PCLi placebo; (3) Formulação PCLm; (4) Formulação PCLi. Eletrões secundários (SE). Aumento de 300x.	47
Figura 30. Histograma do diâmetro das fibras das formulações de PCL em ambas metodologias.	48
Figura 31. Micrografias da formulação pós-liberação contendo PEG nas diferentes metodologias. (1) PEGm placebo pós-liberação.; (2) PEGi placebo pós-liberação.; (3) Formulação pós-liberação. PEGm; (4) Formulação pós-liberação. PEGi. Eletrões secundários (SE). Aumento de 300x.	49
Figura 32. Histograma do diâmetro das fibras das formulações pós-liberação de PEG em ambas metodologias.	50

Figura 33. Micrografias da formulação pós-liberação contendo PLGA nas diferentes metodologias. (1) PLGAm placebo pós-liberação.; (2) PLGAi placebo pós-liberação.; (3) Formulação pós-liberação. PLGAm; (4) Formulação pós-liberação. PLGAi. Eletróns secundários (SE). Aumento de 300x.	51
Figura 34. Histograma do diâmetro das fibras das formulações pós-liberação de PLGA em ambas metodologias.	52
Figura 35. Micrografias da formulação pós-liberação contendo PLGA nas diferentes metodologias. (1) PCLm placebo pós-liberação.; (2) PCLi placebo pós-liberação.; (3) Formulação pós-liberação. PCLm; (4) Formulação pós-liberação. PCLi. Eletróns secundários (SE). Aumento de 300x.	53
Figura 36. Histograma do diâmetro das fibras das formulações pós-liberação de PCL em ambas metodologias.	54
Figura 37. Curva TG (—)/DTG (—) da formulação pré-liberação PEGm (A) e PEGi (B)	55
Figura 38. Curva TG (—)/DTG (—) da formulação pré-liberação PLGAm (A) e PLGAi (B).	56
Figura 39. Curva TG (—)/DTG (—) da formulação pré-liberação PCLm (A) e PCLi (B).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do ensaio de teor da matéria prima.....	24
Tabela 2. Peso em miligramas das formulações pré-liberação.	25
Tabela 3. Resumo dos dados estatísticos do peso das formulações utilizando métodos de incorporação diferentes.....	25
Tabela 4. Teor das formulações de Piriproxifem em diferentes metodologias de incorporação.	26
Tabela 5. Resultados do ensaio de solubilidade	27
Tabela 6. Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação (n=6) das formulações poliméricas em diferentes metodologias.	32
Tabela 7. Resumo dos dados estatísticos do Fluxo (J) após estudo de liberação <i>in vitro</i> das formulações utilizando metodologias diferentes.	33
Tabela 8. Eficiência de dissolução das formulações nas diferentes metodologias.	33
Tabela 9. Resumo dos dados estatísticos de eficiência de dissolução (%ED) após estudo de liberação <i>in vitro</i> das formulações utilizando metodologias diferentes.	34
Tabela 10. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do suporte celulósico.	35
Tabela 11. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do fármaco piriproxifem.	36
Tabela 12. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do polímero PEG.	37
Tabela 13. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do polímero PLGA.	39
Tabela 14. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do polímero PCL.	41

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
Aa	Fração da área
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variâncias
Aret	Área do retângulo
AUC	Área sobre a curva
C	Carbono
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por detecção Ultra Violeta
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTG	Termogravimetria Derivada
ED	Eficiência de Dissolução
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
g	Gramas
H	Hidrogênio
h	hora
<i>H.irritans</i>	<i>Haematobia irritans</i>
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGR	Insect Growth Regulator
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
J	Fluxo
LQEPV	Laboratório de Quimioterapia Experimental e Parasitologia Veterinária
M	Molar (concentração molar)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	miligramas
min	Minutos

mL	Mililitro (10^{-3} L)
mm	Milímetro
MP	Matéria Prima
N	Nitrogênio
NM	Nanomêtros
O	Oxigênio
PCL	Policaprolactona
PCLi	Policaprolactona impregnado
PCLm	Policaprolactona mergulhado
PEG	Polietilenoglicol
PEGi	Polietilenoglicol impregnado
PEGm	Polietilenoglicol mergulhado
pH	Potencial de Hidrogênio
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PLGAi	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) impregnado
PLGAm	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) mergulhado
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SECEX	Secretaria do Comércio Exterior
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
t	Tempo
tg	Transição vítrea
TG	Termogravimetria
TGA	Termogravimetria
UV	Ultravioleta
Vv	Fração Volumétrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Impacto Econômico na Pecuária Brasileira	3
2.1.1 Perdas econômicas nas atividades pecuaristas	3
2.2 <i>Haematobia irritans</i>: Aspectos Biológicos, Importância Econômica e Controle	4
2.3 Insect Growth Regulator (IGR): Piriproxifem	6
2.4 Segurança e Desenvolvimento de Novos Produtos Veterinários	8
2.5 Sistemas de Liberação Modificado	10
2.6 Polímeros	12
2.6.1 Polietilenoglicol (PEG)	13
2.6.2 Poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA)	14
2.6.3 Policaprolactona (PCL)	15
2.7 Ensaios Químicos de Controle de Qualidade	16
2.7.1 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	16
3 MATERIAS E MÉTODOS	18
3.1 Material	18
3.1.1 Reagentes	18
3.1.2 Matérias-primas	18
3.1.3 Substâncias químicas de referência: Piriproxifem	18
3.1.4 Equipamentos e acessórios	18
3.2 Determinação do Teor de Piriproxifem na Matéria Prima	19
3.3 Desenvolvimento da Formulação de Liberação Controlada	19
3.4 Ensaios Químicos de Controle de Qualidade	19
3.4.1 Ensaio de doseamento da formulação	20
3.4.2 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	20
3.4.2.1 Estudo da solubilidade do Piriproxifem e escolha do meio de dissolução.	20
3.4.2.2 Desenvolvimento do meio de dissolução	20
3.4.2.3 Estudo de cinética de liberação e análise do fluxo de liberação <i>in vitro</i> ...	21
3.4.2.4 Cálculo da eficiência de dissolução	21
3.5 Ensaios Físicos de Caracterização	21

3.5.1 Análises estruturais: Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier FTIR	21
3.5.2 Análise morfológicas: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ...	21
3.5.3 Análises térmicas: Termogravimetria (TGA)	22
4 RESULTADOS	24
4.1 Determinação do Teor de Piriproxifem na matéria prima	24
4.2 Desenvolvimento da formulação de liberação controlada	24
4.3 Ensaios Químicos de Controle de Qualidade	26
4.3.1 Ensaio de doseamento da formulação	26
4.3.2 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	27
4.3.2.1 Estudo da solubilidade do Piriproxifem e escolha do meio de dissolução..	27
4.3.2.2 Ensaio de Liberação <i>in vitro</i>	28
4.3.2.3 Estudo de cinética de liberação e análise do fluxo de liberação <i>in vitro</i> ...	32
4.3.2.4 Cálculo da eficiência de dissolução	33
4.4 Ensaios Físicos de Caracterização	34
4.4.1 Análises estruturais: FTIR	34
4.4.2 Análise morfológicas: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..	42
4.4.2.1 Análise das formulações pré-liberação	42
4.4.2.2 Análise das formulações pós-liberação	48
4.4.3 Análise Térmica: Termogravimetria (TGA)	54
5 CONCLUSÕES	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7 ANEXOS	83
Anexo A: Procedimento para utilização do Image J	67
Anexo B: Procedimento para análise do diâmetro das fibras no Image J	72

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino apresenta relevância no mercado mundial, sendo um dos principais pilares da economia nacional atualmente. O impacto econômico causado por parasitas, principalmente carrapatos e mosca dos chifres, reduz a rentabilidade das atividades pecuárias brasileiras. Adaptar produtos veterinários à demanda do rebanho, assegura a saúde animal e reduz as perdas econômicas geradas por parasitoses, garantindo a sanidade, a segurança do gado de corte, da produção de leite e couro.

Os bovinos da raça nelore apresentam baixa incidência de carrapatos, e consequentemente, a *H. irritans*, passa a ser o parasita mais prejudicial para a saúde desses animais. Estes animais no Brasil são criados de forma extensiva e semi extensiva, o que dificulta o controle e tratamento de doenças, portanto, é necessário o investimento e desenvolvimento de uma formulação oral de liberação controlada, que permitirá a cobertura do tratamento por um intervalo de tempo maior. Compreender o ciclo biológico da mosca dos chifres, viabiliza a atuação dos pesticidas em etapas críticas da morfogênese.

O Piriproxifem da classe dos IGR é um composto bioracional, seletivo à insetos e surge no mercado com o propósito de apresentar menor efeito residual e baixa toxicidade, em comparativo aos pesticidas convencionais utilizados atualmente para o controle de *H.irritans*. Este composto é utilizado atualmente para o controle de pragas agrícolas, de insetos em águas residenciais e pets com efeito carrapaticida e puguicida. À partir da eficácia oral recentemente comprovada deste pesticida em bovinos pela administração de cápsulas, espera-se que o desenvolvimento do sistema de liberação controlado tenha aplicabilidade na prevenção e tratamento de *H.irritans*.

O desenvolvimento de formas farmacêuticas inovadoras e adequadas para diferentes necessidades é um desafio para os farmacêuticos. As formas farmacêuticas para administração oral de fármacos são as mais utilizadas pela conveniência que proporcionam, constituindo uma via de administração não invasiva e com uma dose fixa, diferente dos pulverizadores e sprays utilizados atualmente.

A associação do ativo Piriproxifem com os polímeros Polietilenoglicol (PEG), Policaprolactona (PCL) e Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), através do aprisionamento do fármaco em suas matrizes poliméricas, irá controlar a liberação deste no bolo fecal, para que ocorra de forma gradual e lenta, resultando em um tempo de cobertura maior do tratamento. O desenvolvimento dessa nova formulação farmacêutica contendo piriproxifem poderá minimizar os impactos causados pelos pesticidas convencionais no ambiente, assim como proteger a saúde dos seres humanos. Estima-se que a aquisição de produtos de liberação controlada destinado à saúde animal seja mais vantajosa frente aos produtos convencionais, uma vez que prolonga a ação do fármaco sobre o controle das formas imaturas do inseto, otimizando o tratamento e minimizando impactos econômicos e prejuízos no que se diz a respeito ao bem-estar animal.

O sistema de liberação controlado é a proposta de uma formulação inovadora, com o objetivo de otimizar o controle da mosca dos chifres por um intervalo de tempo maior, reduzindo os impactos negativos na saúde do animal e no ambiente por possuir efeito residual menor quando comparado aos pesticidas convencionais.

O desenvolvimento da formulação ocorre com a incorporação do polímero em associação com o piriproxifem em um suporte celulósico. Esta etapa propõe avaliar duas metodologias que se diferem, a mergulhada e impregnada, e identificar as vantagens e limitações destas técnicas nos ensaios físico químicos do produto final. Os ensaios químicos têm como objetivo quantificar o piriproxifem nas formulações e avaliar o perfil

de liberação, e as possíveis relações entre as técnicas de incorporação e a cinética, fluxo e eficiência de dissolução. Enquanto o ensaio físico permite elucidar as estruturas presentes, a interferência do polímero na superfície das amostras e a compatibilidade do sistema polimérico como um todo.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar através de ensaios físico químicos, morfológicos e térmicos o sistema de liberação prolongado à base de diferentes polímeros contendo Piroxicam para o controle das formas imaturas de *Haematobia irritans* em bovinos. É discutida, no decorrer do trabalho, a influência destes polímeros no perfil de liberação controlada através dos estudos de liberação *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Impacto Econômico na Pecuária Brasileira

A pecuária brasileira apresenta cerca de 221,81 milhões de cabeças de gado distribuídos em 164,96 milhões de hectares, representando o maior rebanho e exportação de carne bovina e o segundo maior produtor de carne mundial, com 2.032,1 e 9,71 milhões de toneladas exportadas e produzidas, respectivamente, no ano de 2017. (ABIEC, 2018) Esta representatividade da pecuária nacional no comércio mundial movimentou em 2017, cerca de 523,25 bilhões de reais, apresentando aumento de 3,6% em comparativo ao ano de 2016. (ABIEC, 2018) O abate de bovinos no ano de 2017 foi de 30,83 milhões de cabeças, sendo o primeiro crescimento anual após três quedas consecutivas na pesquisa de abate de bovinos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (IBGE, 2018) O fato do Brasil representar o maior rebanho bovino comercial gera oferta abundante de matéria-prima, sendo um dos fatores que explica o bom desempenho do comércio de leite e couro.

O Brasil possui relevância na produção de leite global, ocupando o quarto lugar com 23 milhões de vacas ordenhadas em 2014. (EMBRAPA, 2018) A aquisição brasileira de leite no terceiro trimestre do ano de 2017 foi de 6,44 bilhões de litros, representando um aumento significativo em relação aos três últimos anos. Este resultado é devido a melhoria nas condições de pastagens com a chegada das chuvas nas principais regiões produtoras em comparativo com o primeiro trimestre do ano. (IBGE, 2018)

A Pesquisa Trimestral de Couro realizada em dezembro do ano de 2017 pelo IBGE relatou que houve um aumento da aquisição de couro de 8,75 milhões peças inteiras. Esta é considerada a maior evolução desde o ano de 2013. (IBGE, 2018) Em relação ao mercado internacional, as Exportações de Couros e Peles apresentadas pela SECEX (Secretaria de Comércio Exterior) registraram no mês de dezembro de 2018, o valor de US\$105,9 milhões. (CICB, 2018)

O desenvolvimento da pecuária brasileira e seu desempenho mundial está assentado em três fatores fundamentais, tais como, boas práticas de manejo e alimentação, animais de boa genética e a sanidade animal. Este último fator é afetado por agentes que causam doenças em bovinos, destacando-se os parasitas. A intensificação da pecuária no ano de 2017 gerou crescimento nos lucros, em consequência do aumento da produtividade a fim de manter a oferta da carne no mercado mundial. Portanto, com maior densidade de cabeças por hectares são necessárias medidas preventivas para manutenção da sanidade dos animais. Neste cenário, a carga parasitária é um dos fatores alterados pelo aumento do rebanho brasileiro. (HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, 1990)

2.1.1 Perdas econômicas nas atividades pecuaristas

O aumento do rebanho em associação ao clima tropical, eleva as condições de parasitoses nos animais, e este fator gera gastos elevados e possíveis prejuízos na rentabilidade das atividades pecuárias no Brasil, principalmente quando associados ao efeito dos parasitas (helminthos e ectoparasitos), com maior relevância para infestações por carrapatos e mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), com perda anual que podem chegar à R\$ 14 bilhões. (GRISI, 2014)

A pecuária bovina brasileira é predominantemente da raça Nelore, somando 65,0% dos bovinos de corte. (BIANCHIN *et al.*, 2004) Os ectoparasitas causam prejuízos à bovinicultura de corte, pois ocasionam a perda de peso, danificam o couro e predisõem os animais a infecções secundárias, resultando um impacto econômico negativo no agronegócio. (SILVA *et al.*, 2010) Em estudos realizados, o gado nelore apresentou maior

suscetibilidade à infestações por *H. Irritans* do que infestações por carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e conseqüentemente, a mosca dos chifres passa a ser o parasita mais prejudicial para o gado de corte. (SILVA *et al.*, 2010)

Devido esta representatividade da pecuária brasileira no mercado mundial e a diminuição significativa dos lucros associados aos parasitas, os investimentos e o desenvolvimento de medicamentos veterinários são crescentes. (MAGALHÃES, 2016) O faturamento da indústria de produto para saúde animal foi de R\$ 5,3 milhões no ano de 2017, e a espécie animal que representou a maior fatia do mercado foram os ruminantes, com 55,3% do faturamento, e associado a classe terapêutica antiparasitários com 27,2% da distribuição por classe. (SINDAN, 2017)

As perdas econômicas ligadas aos efeitos deletérios dos carrapatos e da mosca dos chifres, justificam a maior porcentagem de produtos para saúde animal de ruminantes com predominância da classe antiparasitária.

Segundo o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA) a pecuária bovina é um dos grandes pilares econômicos do Brasil, oferecendo carne de qualidade para o país e gerando excedentes exportáveis que chegam a mais de 170 países. Portanto, a pecuária bovina de corte demanda cuidado e prevenção das possíveis doenças que podem gerar danos ao rebanho, e conseqüentemente, afetar a economia do setor. (CEPEA, 2017)

2.2 *Haematobia irritans*: Aspectos Biológicos, Importância Econômica e Controle

Haematobia irritans é o nome científico da mosca-dos-chifres, sendo descrita pela primeira vez pelo professor médico e biólogo Linnaeus (1758), e foi reconhecida como praga de bovinos em 1830 na França. A denominação “mosca do chifres” foi atribuída pelos hábitos de aglomerar-se na base do chifre dos bovinos, sendo observados em regiões brasileiras mais frias, como o sul. (HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, 1990) Foi introduzida em países que estavam em processo de expansão do rebanho bovino, tornando-se, um dos principais agentes parasitários da pecuária na atualidade. (BRITO *et al.*, 2005)

A presença da mosca-dos-chifres no Brasil foi constatada no ano de 1976 em Roraima, originária da Guiana. (VALÉRIO; GUIMARÃES, 1983) A dispersão da mosca no território brasileiro foi bastante rápida devido às condições favoráveis da região de Roraima, como o clima tropical e a criação do gado bovino de forma extensiva, permitindo a movimentação do animal por grandes áreas de pastagens facilitando a disseminação da mosca. (BRITO *et al.*, 2005)

H. irritans é um parasita hematófago obrigatório de bovinos, que no ato da hematofagia gera picadas dolorosas que promovem uma irritação e estresse local na região das costas ou pernas. A denominação em latim “*irritans*”, é esclarecido pelo principal efeito que este parasito ocasiona, que é a irritação causada ao hospedeiro, deixando-o extremamente agitado e estressado. Como resultado, gera um impacto negativo sobre a produção e desempenho do gado, como a perda de apetite e conseqüentemente, corpórea, diminuição da produção de leite e comprometimento com a qualidade do couro, e queda dos índices reprodutivos. (BYFORD; CRAIG; CROSBY, 1992) Acredita-se que os prejuízos observados nos rebanhos infestados sejam mais em conseqüência do estresse provocado do que pela perda de sangue em si. (MCLINTOCK; DEPNER 1954; HARRIS *et al.* 1974)

A mosca dos chifres possui como classificação taxonômica ordem díptera e pertencente à família Muscidae, e possui características como porte pequeno, medindo cerca de 2 a 4mm e dependência do hospedeiro durante seu ciclo biológico. (TAYLOR,

2010) O ciclo biológico deste inseto inclui a permanência dos adultos sobre os hospedeiros, preferencialmente bovinos, e em condições favoráveis de temperatura e umidade, a fêmea faz a oviposição nas fezes frescas do animal, na interface do bolo fecal com o solo, onde irá ocorrer o desenvolvimento larvar e pupação, até a emergência dos adultos. (BRITO et al. , 2005; MEDEIROS DE BARROS 2002). A Figura 1 representa o ciclo biológico de *Haematobia Irritans*.

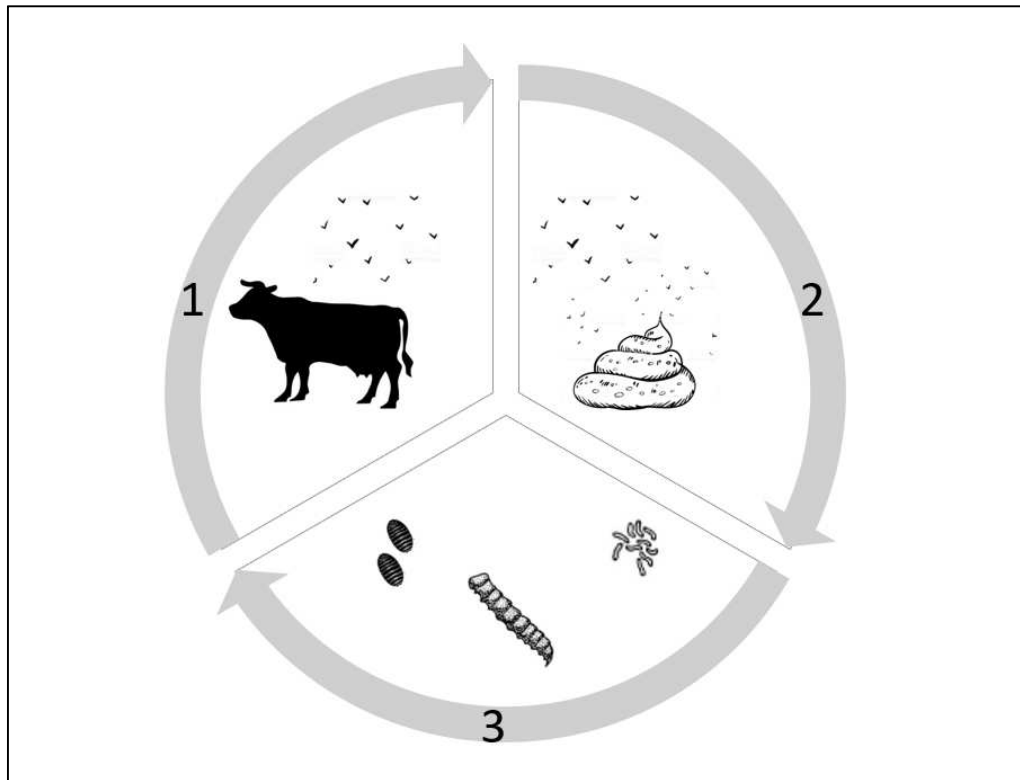


Figura 1. Ciclo biológico da mosca dos chifres. (1) Parasitismo; (2) Oviposição; (3) Desenvolvimento Larval. (Ilustração: Melina Alves. Adaptado de PIRES, 2015).

O ciclo biológico da mosca-dos-chifres tem duração de no mínimo 10 dias e máximo 50 dias. A primeira etapa (1) do ciclo é representada pelo processo de parasitismo, onde as moscas irão realizar o ato de hematofagia nos bovinos causando irritação local e estresse. Estas só se afastam do animal no momento da oviposição, ilustrada na etapa (2). A fêmea deposita seus ovos no bolo fecal fresco dos bovinos, e em condições de temperatura e umidade favoráveis, ocorre o desenvolvimento dos ovos à mosca. Na terceira etapa (3) ocorre o processo de metamorfose dos ovos à larvas (L1, L2 e L3) que penetram mais profundamente a massa fecal para se proteger da luminosidade e procurar locais mais úmidos. Esta etapa é dependente dos hormônios responsáveis pelo crescimento, como o análogo do hormônio juvenil e ecdisona. De larva do primeiro instar até a pupação são necessários em média 4 a 5 dias, e após, ocorre a emergência dos adultos. (FRANCISCA, 2009) O ciclo pode ocorrer durante o dia ou noite. (KUNZ *et al*, 1970) O termo ínstar é utilizado para definir o período de transição entre um estágio e outro, após o último ínstar ocorre o encapsulamento numa pupa.

As características que interferem no ciclo estão relacionadas à fatores bióticos, como a predação, competição e parasitismo, e fatores abióticos como a dessecação ou liquidez da massa fecal e baixas temperaturas. As condições climáticas correlacionadas

ao parasitismo são a umidade, precipitação e temperatura do ambiente. (MACEDO *et al*, 2003)

A picada dolorosa da mosca gera uma hipersensibilidade no hospedeiro, resultando no estresse do animal. Estima-se que uma infestação média de cerca de 500 moscas pode acarretar perda de aproximadamente 40kg de peso vivo anual. (HONER; GOMES, 1990) Deste modo, o Brasil que possui uma relevância no mercado mundial de carnes e na economia interna, é preciso controlar o parasitismo por mosca dos chifres, a fim de evitar estas perdas da qualidade da carne, leite e couro.

Brethour *et al.* (1987) observaram que o ganho de peso foi superior à 6% nos bovinos que utilizavam fármacos mosquicidas impregnados em brincos em comparativo àqueles animais que não foram submetidos a nenhum método de controle de *Haematobia irritans*. O êxito no controle populacional de qualquer parasita está associado ao conhecimento da sua epidemiologia. Portanto, com base no seu ciclo evolutivo, a forma de controle mais efetiva deverá estar concentrada em atuar nas fezes, a fim de evitar o desenvolvimento do ovo e larvas.

O Programa de Controle das Moscas dos Chifres do Brasil publicado em 1990, visa duas metas, reduzir as infestações da mosca e evitar o processo de resistência do inseto aos pesticidas utilizados. Portanto, é imprescindível a utilização racional destes produtos químicos, como também buscar outros meios de controle o qual retarde a resistência. Devido à esses fatores, a utilização do besouro *Onthophagus gazela* foi associado como uma opção mais segura para auxiliar no controle das moscas, que ao destruir o bolo fecal dos bovinos, torna desfavoráveis as condições para o desenvolvimento do inseto (HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, 1990), sendo uma estratégia natural e sem ação de produtos químicos.

Porém, com o tempo e a utilização indiscriminada de pesticidas em rebanhos, haveria necessidade de importação de outras espécies do besouro para atuar em outras condições biológicas da região. Técnicos australianos estimam ser necessária a importação de 100 espécies distintas do besouro para um controle efetivo da mosca dos chifres. (HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, 1990)

Domingues *et al.* (2009) avaliaram a susceptibilidade do besouro rola-bosta (*Onthophagus gazela*) a pesticidas da classe Reguladores de Crescimento de Insetos, e notaram que ativos testados não determinaram na morte destes besouros adultos expostos, mas interferiram na produção de descendentes. A extensão territorial brasileira e a utilização indiscriminada de pesticidas no rebanho afetariam a manutenção da reprodução do besouro e dificultaria a disseminação destas espécies em quantidades suficientes para efetivação do programa.

Atualmente, medidas de controle de moscas-dos chifres em bovinos são pautadas no controle químico, com a utilização de pesticidas na forma de imersão, pulverização, *pour on*, *spot on* e brincos impregnados. A estratégia preconizada é a de rotação das classes inseticidas, com mecanismo de ação diferentes, à fim de evitar o processo de resistência. A classe piretróides e organofosforado são as mais significativas do mercado (MEDEIROS DE BARROS, 2005).

Resultante a esse processo de resistência e devido a amplitude e toxicidade desses pesticidas, surgem os Insect Growth Regulator (IGR), uma classe de compostos bioracionais, com propriedades bem similares ao composto natural (WILLIAMS, 1967; STAAL, 1975).

2.3 Insect Growth Regulator (IGR): Piriproxifem

Os IGR, conhecidos como pesticidas da terceira geração, surgiram pra diminuir

os efeitos dos pesticidas que possuíam amplo espectro e maior toxicidade para parasitos e outros insetos. Além disso, outra dificuldade apresentada era a persistência destes inseticidas no meio ambiente, e por conseguinte, a presença destes na cadeia alimentar, culminando no risco para outros organismos, inclusive o homem. (WILLIAMS, 1967)

A classe IGR, atua como análogo do hormônio juvenil de insetos, inviabilizando seu crescimento e desenvolvimento, principalmente nos estágios imaturos. Os IGR's presentes no mercado para controle de *H. irritans*, são as benzilfenilureias, triazina, metoprene e piriproxifem. (TAYLOR, 2001)

O piriproxifem é classificado como regulador do crescimento de insetos, de amplo espectro, com baixa toxicidade, com atividade inseticida contra *M. domestica*, mosquitos e baratas. Como análogo do hormônio juvenil, interfere na metamorfose dos insetos (WHO, 2006; WHO 2008). Foi registrado para uso em pesticidas pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) desde 1995. É utilizado na forma de grânulo para controle de insetos em água residenciais, e pets com efeito carrapaticida e puguicida. (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; KOCISOVA *et al.*, 2004; MEOLA *et al.*, 1996)

O hormônio juvenil é exclusivo dos insetos e este regula a metamorfose e reprodução. O processo de muda e metamorfose em insetos são reguladas por dois hormônios principais: ecdisona e hormônio juvenil (HJ). A ecdisona atua no crescimento através da sua ação nas mudas, ou seja, quando ocorre a troca exoesqueleto quitinoso do inseto. O hormônio juvenil é responsável por manter o organismo em seus estágios larvais entre mudas, induzindo genes e proteínas necessárias para inibir a metamorfose. Por estímulos ambientais e hormonais, quando o inseto tiver preparado pra realizar a muda, as concentrações de ecdisona na hemolinfa se elevam e as concentrações de HJ diminuem, favorecendo a ocorrência do processo. (RIDDIFORD, 2012; BELLES, 2011)

O piriproxifem atua mimetizando a ação do hormônio juvenil, portanto, tem como mecanismo de ação a inibição do processo de morfogênese dos insetos. A Figura 2 ilustra as estruturas químicas da molécula de Piriproxifem e do seu análogo, hormônio juvenil III.

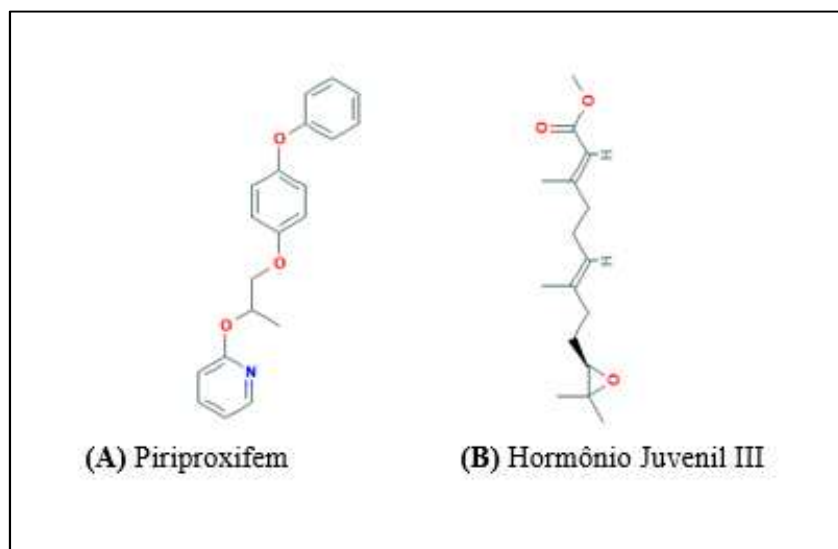


Figura 2. Estrutura química da molécula de Piriproxifem (A) e do Hormônio Juvenil III (B). Fonte: Pubchem.

A nomenclatura da IUPAC para o ativo piriproxifem é 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy)propyl ether; 2-,pyridine, de fórmula molecular $C_{20}H_{19}NO_3$ e que possui

como característica estrutural o anel piridínico, composto por um anel aromático de seis membros contendo o átomo de nitrogênio como heteroátomo, (PUBCHEM, 2019).

As características físico-químicas do Piriproxifem incluem baixa pressão de vapor, dificultando a dispersão pelo ar, apresenta solubilidade baixa em água, temperatura de fusão de 48-50°C e propenso à fotólise lenta no solo. Piriproxifem é o único inseticida recomendando pela Organização Mundial da Saúde para adição em água com finalidade de saúde pública. (SULLIVAN; GOH, 2008) Portanto, a OMS concluiu que o piriproxifem não representa risco carcinogênico, teratogênico e genotóxico em humanos e animais em doses normais. (WHO, 2008).

O estudo realizado de hidrólise do piriproxifem em três diferentes meios com pH 5,0, 7,0 e 9,0 mostraram que é mais estável em pH mais básicos. (KATAGI; TAKAHASHI, 1994) Além disso, é susceptível a fotodegradação na água. (SULLIVAN; GOH, 2008)

Os estudos de eficácia do Piriproxifem contra *H. irritans* foram conduzidos por Bull e Meola (1996), pelo teste de toxicidade tópica, administrando topicamente no dorso torácico de cada inseto uma solução acetônica contendo Piriproxifem nas concentrações de 2,5; 5,0 e 20,0 µL/inseto. Houve um pequeno índice de mortalidade após 24 horas. Outros estudos incluindo Piriproxifem para controle de vetores avaliaram o potencial do ativo, em *M. domestica* em bezerros e controle de pulgas *C. felis* em cães e gatos. Ambos estudos comprovaram a eficácia do Piriproxifem como regulador de crescimento dos insetos. (KOCISOVA *et al.*, 2004; MEOLA *et al.*, 1996)

A Organização Mundial da Saúde avaliou ainda o Piriproxifem para uso como larvicida em mosquitos na água potável armazenada. (WHO, 2008) Para este fim, houve o desenvolvimento de uma formulação de liberação controlada, contendo Piriproxifem 5% . Estas foram testadas em caixas d'água domésticas em Camboja, visando a inibição da emergência de mosquitos *A. aegypti* em adultos. Os resultados de inibição de emergência de adultos foram na faixa de 90% por 20 dias e continuaram com percentual acima dos 80% até o final do estudo com 34 semanas. (SENG *et al.*, 2008)

Recentemente, foi realizado um estudo que avalia o potencial de Piriproxifem administrado por via oral para controle de formas imaturas de *H. irritans* em fezes de bovinos. A análise da massa fecal e do plasma dos animais tratados oralmente elucidou que não ocorre metabolização do Piriproxifem no organismo nas doses utilizadas, sendo excretado de forma inalterada pelas fezes. A concentração do ativo no plasma dos bovinos ficou abaixo dos limites mínimos de detecção e sua presença nas fezes comprovam a eliminação fecal da molécula de Piriproxifem. Desta forma, Piriproxifem empregado por via oral nas doses de 2,5 e 40,0 mg/animal, manifestou atividade IGR sobre *H. irritans*, pela mortalidade das pupas, e consequente, inibição da emergência em adultos. (OLIVEIRA, 2017)

A partir destes estudos associado com o aumento da demanda pública e da relevância do gado de corte no Brasil, vê-se a necessidade de desenvolver produtos veterinários que diminuam os riscos para organismos que não são o alvo do controle e para o meio ambiente. Além da seletividade do IGR a insetos, esta característica também atua desfavorecendo o processo de resistência e diminuindo os riscos relacionado à segurança alimentar.

2.4 Segurança e Desenvolvimento de Novos Produtos Veterinários

No cenário atual, é considerável o número de populações resistentes de *H. irritans* contra os piretróides e organofosforados, o que remete à necessidade de buscar por alternativas atualmente eficazes para o controle deste parasito. Principalmente, quando

trata-se do controle e efeito residual do gado de corte. O Brasil lidera o ranking de exportações para fins comerciais, consumo e produção de carne bovina, e neste contexto, a importância da qualidade da carne está intimamente ligada ao uso de produtos que deixam resíduos. Vale ressaltar, que estes produtos sofrerão restrição cada vez mais intensa. (FILHO, 2000)

A presença de resíduos nos alimentos, destacando os pesticidas que são aplicados no rebanho bovino no combate ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), pode afetar a qualidade do leite e da carne comercializada, comprometendo a saúde da população se estiverem em níveis acima dos permitidos pela legislação (Food and Agriculture Organization - FAO e Organização Mundial da Saúde - OMS), além de poder inibir as relações de exportação/importação entre países. (HENRIQUE *et al.*, 2003)

A gestão da saúde animal é idealizada para otimizar a saúde física, comportamental e o bem-estar do rebanho bovino. Inclui a prevenção, tratamento, controle de doenças e transtornos que afetam o rebanho. (MAPA, 2014) A pecuária extensiva no Brasil, representa 93% do rebanho bovino, tendo a criação a pasto como principal cultivo do gado de corte. (DIAS FILHO, 2007) As condições acerca do pasto, a carência da suplementação alimentar e o controle de parasitoses são algumas desvantagens deste tipo de cultivo.

O desenvolvimento de uma formulação com perfil de liberação controlado aplicada a pecuária extensiva se faz necessário, a fim de reduzir as administrações de produtos veterinários para controle de doenças, uma vez que, neste tipo de criação o gado é criado de forma livre, sendo reunido poucas vezes ao ano, tornando difícil o controle de parasitoses. (PARANHOS DA COSTA, 2000) Atualmente, o controle de ectoparasitas, principalmente, *H. Irritans* é feito com sistemas de liberação controlada sob a forma de brincos mosquicidas, permitindo uma liberação lenta do diazinon, da classe organofosforado. (OURO FINO SAÚDE ANIMAL, 2005)

Os organofosforados possuem efeito acumulativo e podem gerar efeitos neurotóxicos na saúde humana e, quando utilizado de forma irracional, contaminam cursos de água e geram resíduos agrícolas (MELLO; DA SILVEIRA, 2012), sendo pontuado como problema para a segurança alimentar e contaminação ambiental. Os compostos bioracionais, surgem justamente dessa necessidade de reduzir estes efeitos negativos dos pesticidas convencionais. (RESENDE; GAMA, 2006)

O setor de sanidade animal enfrenta desafios diários em relação à doenças, resistência e efeitos residuais acometido no gado. Acredita-se que a longo prazo, a tendência das economias do setor veterinário é se fundamentar na ciência, tecnologia e inovação. (OECD, 2005).

A América Latina ocupa o 5º lugar do mercado global de produtos veterinários e representa 8% do mercado. O primeiro lugar é ocupado pela América do Norte, com representação de 38% da fatia do mercado. (SINDAN, 2018) A fiscalização de produtos veterinários no Brasil é regida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Por definição, o produto de uso veterinário é toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou adicionada à alimentos, direcionadas para fins de diagnóstico, prevenção, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais. Incluem-se aditivos, antissépticos, medicamentos, vacinas, suprimentos promotores, pesticidas e todos os produtos utilizados nos animais ou no habitat. (MAPA, 2012)

Todos os produtos de uso veterinário, nacionais ou importados, incluindo vacinas, devem ser devidamente registrados e aprovados pela Coordenação de Fiscalização de

Produtos Veterinários (CPV) do Departamento de Defesa Animal (DDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Além disso, a ANVISA encarrega-se do controle e da fiscalização de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal e define o limite máximo de resíduo (LMR).

O Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) é responsável por assegurar a qualidade de produtos de origem animal comestíveis e não comestíveis destinados ao mercado consumidor, tanto interno e externamente. (MAPA, 2017) Estas fiscalizações são de extrema importância para o Brasil, visto que atualmente é um dos maiores produtores e exportadores de carne mundial.

Os produtos e medicamentos destinados à saúde animal ganham cada vez mais espaço no mercado, uma vez que são necessárias formas mais efetivas de prevenção, controle e melhoria do bem-estar dos animais. Em específico para bovinos, o desenvolvimento de novas formulações inovadoras associadas à tecnologia farmacêutica, reduziria as ações de parasitoses no gado por um período de tempo maior e asseguraria a qualidade da carne, leite e couro, sendo importantes para indicadores da economia brasileira. Dentre as estratégias farmacêuticas para este fim, tem-se os sistemas de liberação controlado que têm surgido como alternativa promissora para a terapêutica veterinária.

2.5 Sistemas de Liberação Modificado

Na medicina veterinária há uma preocupação com o uso racional de produtos destinados à animais de produção. O cuidado está intimamente relacionado ao uso indiscriminado e excessivo de fármacos que podem acarretar o acúmulo e deposição de substâncias nos tecidos dos animais, elevando o risco de contaminação humana. (FREITAS FILHO *et al*, 2011) O consumo de produtos de origem animal contendo estes resíduos pode culminar em reações alérgicas, resistências a determinados fármacos e toxicidade. (VAN DEN BOGAARD; STOBBERINGH, 2000)

As estratégias farmacêuticas utilizadas para diminuir estes riscos, são as formulações inovadoras desenvolvidas com o compromisso de otimizar a entrega do fármaco no local de ação, melhorar a biodisponibilidade mantendo-a dentro da janela terapêutica, reduzindo o risco de subdosagem e toxicidade, facilitar a administração, reduzindo o número de intervenções, otimizando e garantindo a eficiência do tratamento. (FREITAS FILHO *et al*, 2011) Portanto, o principal objetivo dessas formulações é aumentar a segurança do produto farmacêutico e prolongar a sua ação farmacológica. (FALCARE, 2006), e são denominadas de liberação modificada de fármacos.

As formas farmacêuticas de liberação modificada possuem uma metodologia que permite ajustar o perfil de liberação do fármaco, controlando, retardando ou prolongando a liberação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos (The United States Pharmacopeia XXV, USP) por definição, os sistemas de liberação controlada possuem características de liberação da droga em relação ao tempo, para alcançar um resultado terapêutico que não é plausível obter com formas farmacêuticas convencionais. São reconhecidos apenas dois tipos de perfis de liberação: a prolongada e a retardada.

A liberação prolongada é caracterizada por reduzir a frequência de dosagem ou aumentar positivamente a adesão ou a performance terapêutica em comparativo com as formas farmacêuticas convencionais. E a liberação retardada é a forma de dosagem que após a administração do fármaco, a liberação não se inicia imediatamente. (USP, 2000) Além destas, foi descrito por Veiga (1988) outros perfis de liberação modificado, e estes estão representados na Figura 3.

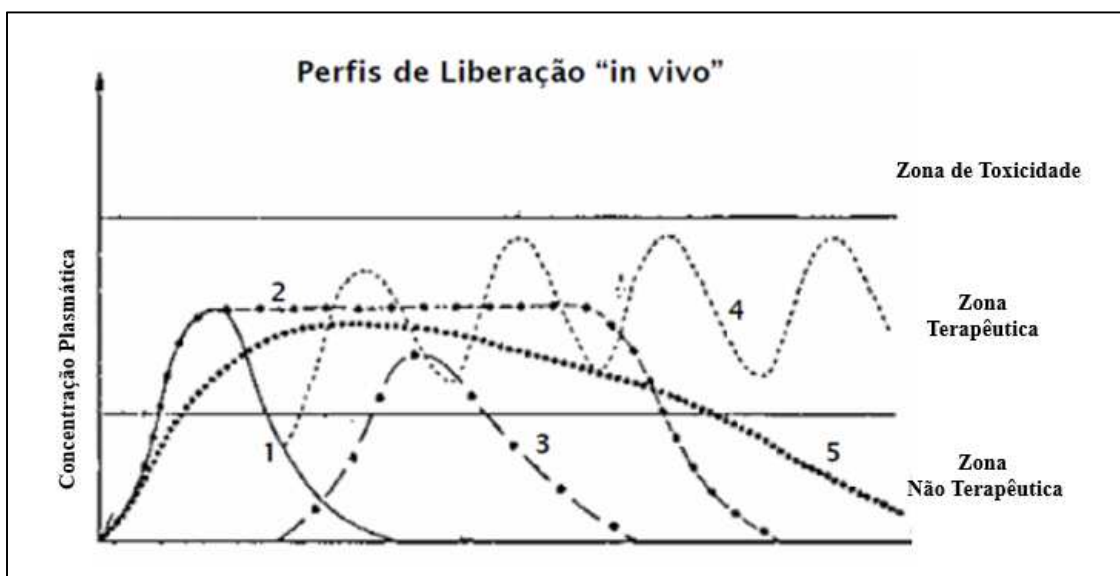


Figura 3. Perfis plasmáticos em diferentes condições de administração (Fonte: adaptado de VEIGA, 1988). (1) Liberação convencional, (2) Liberação sustentada, (3) Liberação Retardada, (4) Liberação Repetida e (5) Liberação Prolongada.

A liberação convencional ou imediata (1), destina-se após a administração do fármaco a absorção de forma rápida, sendo de 75% da substância ativa em 45 minutos. (ANVISA, 2010) A manutenção da concentração plasmática constante por um período de tempo caracteriza um sistema de liberação sustentado (2), ocorre uma prévia liberação do fármaco, suficiente para atingir o efeito terapêutico com seguinte sustentação do efeito, pela liberação gradual do fármaco. (COLLETT; MORETON, 2005; LORDI, 2001) A liberação retardada (3) adia o intervalo entre o tempo de administração e a absorção do fármaco. (MARANHO, 2000) Na liberação repetida (4), ocorre a liberação de uma dosagem individual após a administração e por possuírem baixas dosagens ou excreções rápidas, uma segunda ou terceira dose são liberadas. (MARANHO, 2000; OJOE, 2003) Por fim, no sistema de liberação prolongado (5) são liberadas duas dosagens: a primeira para atingir o efeito farmacológico esperado e a segunda como dose de manutenção deste efeito, liberada de forma gradual com o objetivo de prolongar a resposta farmacológica. (ANSEL *et al.*, 2007)

A vantagem do sistema de liberação controlado de fármacos é a diminuição da administração frequente do medicamento frente as formas farmacêuticas convencionais, além de possuírem tempo de circulação prolongado, vida útil aumentada, depuração reduzida e aumento do tempo médio de residência no trato gastrointestinal. (LIN *et al.*, 2017) Estas características propulsionam o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada voltado para o mercado veterinário, a fim de facilitar o controle de parasitoses na pecuária extensiva, pela diminuição da administração de medicamentos veterinários, assegurando a dosagem e o efeito terapêutico por tempo maior.

As formas farmacêuticas de liberação modificada presentes no mercado para ruminantes são os dispositivos intraruminais (Paratect Flex® Bolus, Ivomec® SR, Panacur® SR, Captec®, Time Capsule®), dispositivos *bypass*, sistemas orais destinados à passarem intactos pelo rumem, como exemplo comercial o Megalac E® e Smartamine®, dispositivos implantáveis (Compudose®, Ralgro®, SABER™, Atroban®), dispositivos transdérmicos (Formoped®) e dispositivos tópicos, como pour on Acatak®. Em sua grande maioria, são processados por polímeros biodegradáveis.

(PRIETSCH et al., 2014)

O produto comercial Paratect Flex® é um exemplo de filme polimérico com liberação controlada, de proporção 50:50 do ativo morantel e acetato de vinil de etileno para tratamento anti-helmíntico em bovinos. Após a entrada no rúmem, o filme adesivo se dissolve e desenrola, impedindo a regurgitação, promovendo a liberação do ativo pelo gradiente de concentração. (ROTHEN-WEINHOLD et al., 2000)

Os polímeros estão dentre os excipientes mais utilizados para a obtenção de formas farmacêuticas de liberação controlada do fármaco. (RIOS, 2005) O estudo da ciência de polímeros com a ciência farmacêutica permitiu o avanço na inovação e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. (OLIVEIRA; LIMA, 2006)

2.6 Polímeros

No século XX, foram descobertos um grupo de produtos que consistiam em moléculas com alto peso molecular que apresentavam unidades estruturais repetitivas (poli), denominada meros, constituindo uma cadeia longa designado polímero. (MANO, 1991) O termo *polímero* foi inventado pelo químico alemão J. Berzelius no ano de 1832. (MORAWETZ, 1985)

A indústria de polímeros se desenvolveu basicamente com o domínio da tecnologia no processo de vulcanização da borracha natural. (AKAY, 2012) Atualmente, estes materiais possuem vasta aplicação, em especial na área de biomateriais. (RUAN *et al*, 2017) Os polímeros são desenvolvidos nos dias atuais para agirem como moduladores e direcionadores da liberação de fármacos com ação específica no organismo. Podem ser, polímeros biodegradáveis, bioadesivos, bioativos ou biomiméticos. (VILLANOVA; OREFICE; CUNHA, 2010)

Os polímeros podem ser classificados de acordo com a sua origem, sendo natural ou sintético. Os de origem natural são moléculas participantes de organismos vivos como os polissacarídeos e polinucleotídeos. Os de origem sintética são desenvolvidos em laboratórios e em sua maioria são derivados de materiais do petróleo. Embora os polímeros naturais excedam a quantidade dos sintéticos desenvolvidos pela indústria, os polímeros naturais reduziram sua importância econômica com a ciência e tecnologia dos polímeros. (SILVA E SILVA, 2003) Para otimizar estruturalmente estas moléculas, surgiram os polímeros semissintéticos, originados de modificações químicas dos polímeros naturais. (CHIELLINI *et al*, 2003)

Para utilização de polímeros em formulações farmacêuticas, certas propriedades do material precisam ser definidas, para garantir a funcionalidade do polímero. Alguns parâmetros abrangem: temperatura de transição vítrea, distribuição de massa e massa molecular, que são fundamentais para a determinação da cristalinidade e da capacidade de penetração do solvente, como a solubilidade e coeficiente de difusão. (FLORENCE & ATTWOOD, 2011)

Outra propriedade que precisa ser estudada para o desenvolvimento de sistemas poliméricos é a temperatura de transição vítrea (t_g), definida como a temperatura em que o material passa do estado vítreo para um estado maleável. A t_g será aumentada quando qualquer fator possa elevar as forças intermoleculares presentes na cadeia polimérica, resultando na rigidez da mesma. Estes fatores são:

- (a) Grupamentos polares: interferem aproximando as cadeias entre si, aumentando as forças secundárias conferindo uma rigidez maior a cadeia e conseqüentemente, elevação da t_g ;
- (b) Grupo lateral: os grupamentos laterais tendem ancorar a cadeia e, portanto, necessitam de maiores níveis de energia para conferirem maleabilidade.

- (c) Ramificações: atuam diretamente na rigidez na cadeia polimérica, resultando em cadeias mais livres e maleáveis. O empacotamento é dificultado pela presença destes grupos.
- (d) Massa molecular: o aumento da massa molecular é relacionado ao comprimento da cadeia, quanto maior o tamanho, será necessária mais energia para que ocorra a transição energética de um estado para outro. Esta massa também sofre interferência pelas unidades monoméricas de copolímeros. (CANEVAROLO, 2006)

O desenvolvimento de uma formulação polimérica inovadora de liberação prolongada segue de acordo com os polímeros e princípios ativos selecionados, a fim de atingir o mecanismo de liberação pretendido. (RIOS, 2005) As propriedades físico-químicas do fármaco, principalmente, solubilidade e permeabilidade inferem bastante na escolha do polímero da formulação. (ZHU, 2002; RIOS 2005) Estes sistemas de liberação são direcionados para atingir um controle da liberação do fármaco em relação ao tempo (LI, 1999) e, atualmente, são ferramentas e estratégias utilizadas na tecnologia farmacêutica.

Os polímeros utilizados no desenvolvimento do sistema de liberação controlado proposto pelo trabalho, são o polietilenoglicol (PEG), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA 75:25) e policaprolactona (PCL).

2.6.1 Polietilenoglicol (PEG)

Os polietilenoglicóis são compostos utilizados como adjuvantes farmacêuticos no desenvolvimento de formulações parenterais, tópicas, oftálmicas e orais. A polimerização deste ocorre através do método de polimerização catalítica heterogênea, tendo como precursor monômeros de óxido de etileno na presença do iniciador (álcool, etileno glicol, água) e catalisador. Estas características do processo de polimerização definem a massa molecular do polímero. Pela IUPAC é denominado poli(oxietileno), e possui como unidade repetitiva o etilenoglicol, representado pela Figura 4.

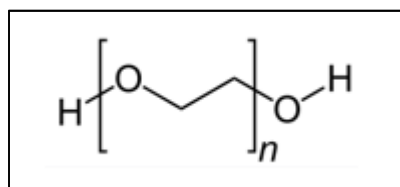


Figura 4. Estrutura química do monômero etilenoglicol.

A repetição deste monômero (n) diversas vezes (poli) ao longo da cadeia carbônica, dão origem ao polietilenoglicol, que possui baixa toxicidade, por ser quimicamente inerte e biodegradável, portanto, o descarte de PEG não é uma problemática para o meio ambiente. (LI, 2001) Os PEGs de baixo peso molecular (menor que 1.000 g/mol) são comercializados na forma de soluções incolores. Os de massa molecular maiores são encontrados na forma sólida. (RIBEIRO, 2001) O PEG 400 é um líquido higroscópico claro, viscoso e quase incolor, já os de elevadas massa são sólidos brancos ou levemente amarelados com aparência cerosa. (PUBCHEM, 2012)

Dentre suas características físico químicas tem-se a alta solubilidade em água e em metanol, mas insolúvel em benzeno, clorofórmio e óleos. A solubilidade em água diminui com o aumento da temperatura. Possui uma elevada estabilidade química, porém a ação do calor prolongado pode induzir à separação em duas fases (líquida + sólida) em

compostos com alto peso molecular. A solução de PEG pode precipitar com o calor, porém um processo simples de agitação é capaz de reverter este efeito. (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2012)

Com o objetivo de gerar um composto ordenado, as cadeias moleculares do polímero tendem a se organizar e empacotar, e estas alterações influenciam na cristalinidade destes materiais. Devido à esta complexidade, os polímeros podem ser classificados em cristalinos ou semicristalinos. Logo, o grau de cristalinidade está intimamente relacionado com a flexibilidade das cadeias. (CANEVAROLO, 2006) O polietilenoglicol no estado sólido é parcialmente cristalino e confere uma conformação Zig-Zag. As cadeias se empacotam de formas mais simples, conferindo uma flexibilidade parcial do polímero. A temperatura de transição vítrea é -60°C .

As aplicações farmacêuticas estão relacionadas à formulações que contêm fármacos insolúveis em água e, portanto, este funciona como carreador. Por isso, é usado em formulações parenterais em concentrações até 50% como agente solubilizante, e em formulações orais com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade em drogas lipofílicas. (HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 2012) Além disso, possuem ampla utilização (agente emulsificante, umectante, lubrificante, plastificante e detergente) em diversos setores (alimentício, farmacêutico, médico, odontológico, cosmético, têxtil, industrial, entre outros). Ressaltando, PEG foi aprovado para consumo interno pelo FDA (Food and Drug Administration). (LI, 2001) O polietilenoglicol utilizado para o desenvolvimento do sistema de liberação controlado foi o 4000, considerado de alto peso molecular.

2.6.2 Poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA)

Por volta da década de 70 foi introduzido no mercado o primeiro copolímero denominado Vicril® composto por unidades de ácido lático e do ácido glicólico, o poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA). A modificação deste copolímero pela razão entre os dois monômeros, alteram as propriedades mecânicas e o tempo de degradação, gerando um grande interesse comercial. (SOARES *et al.*, 2005, JI *et al.*, 2012) O copolímero é composto por cadeia linear e saturada e sua estrutura química do PLGA composta por seus dois monômeros, conforme ilustrado na Figura 5.

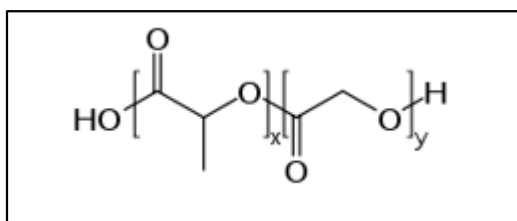


Figura 5. Estrutura química do copolímero de PLGA e seus respectivos monômeros (x,y). (x: ácido lático; y: ácido glicólico).

A proporção de ácido lático para ácido glicólico utilizados no processo de polimerização origina diferentes composições e formas do PLGA, relacionada a proporção molar dos monômeros. As unidades monoméricas repetitivas são ligadas por ligações de éster. Estes fatores influenciam nas propriedades deste polímero, como a cristalinidade, variando de amorfo à cristalino dependendo da estrutura química. (SAMADI, 2013) A massa molecular e o grau de cristalinidade pode interferir nas

propriedades mecânicas, na capacidade de hidrólise e na velocidade de degradação do polímero. (FIALHO *et al.*, 2003)

Foi aprovado pela U.S Food and Drug Administration (FDA) para uso em humanos com finalidades terapêuticas, devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e por ser atóxico. (SOPPIMATH, 2001) As propriedades físico-químicas são baixa solubilidade em água, temperatura de transição vítrea (T_g) na faixa de 40 a 60°C. (GOMES, 2011) Esta condição o mantém na forma vítrea com uma estrutura relativamente rígida, conferindo uma resistência mecânica significativa, sendo ideal para sistema de liberação de fármacos. (BARBANTI *et al.*, 2005)

As ligações de éster podem ser degradadas pelo processo de hidrólise, e seus respectivos monômeros são absorvíveis pelos organismos através do Ciclo de Krebs. Contudo, a estimativa do tempo de degradação depende da proporção das unidades monoméricas e da massa molecular do PLGA. (PANDEY, 2016) Acredita-se que o polímero sofre a conversão de uma substância inicialmente insolúvel em meio aquoso para uma substância solúvel em água, não sendo obrigatoriamente um processo de degradação química. (KIMURA; OGURA, 2011)

A maior hidrofobicidade conferida ao PLGA é referente ao grupo metila, portanto, quanto maior a razão de ácido lático, maior será a hidrofobicidade do copolímero. Desta forma, por apresentar esta característica, menor será a quantidade de água absorvida pelo polímero, tendo a velocidade de degradação diminuída. (JAIN, 2000) Esta característica é essencial para sistemas de liberação controlado.

2.6.3 Policaprolactona (PCL)

A policaprolactona é um polímero sintético, biodegradável, pertencentes a família dos poliésteres alifáticos. Obtido a partir do processo de polimerização da molécula percussora caprolactona, resultando em um produto alifático com a presença do grupo éster. (ROSA; PÂNTANO, 2003). A Figura 6 ilustra a estrutura química do monômero de PCL.

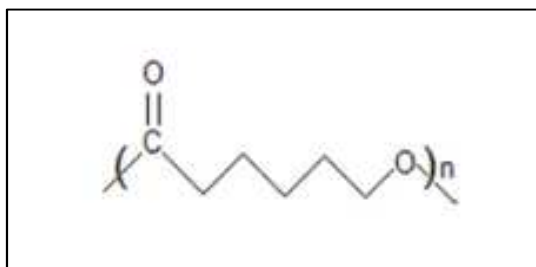


Figura 6. Estrutura química do monômero (n) do polímero PCL.

É denominado pela IUPAC 1,7-polioxepan-2-ona com características semicristalina, maleável devido sua baixa temperatura de transição vítrea na faixa de -60 a -70°C, fundindo-se à 60°C, proporcionando boas propriedades mecânicas e potencial para uso em formulações farmacêuticas (COOMBES, 2004). A solubilidade em água, e nos solventes etanol e éter é baixa, porém em clorofórmio e diclorometano é elevada (BALLISTERI, 2003). A presença do grupo éster aumenta a polaridade da cadeia, proporcionando maior rigidez a mesma.

Sua biocompatibilidade torna seu uso possível nos campos biomédicos e farmacêuticos (CHANDRA; RUSTI, 1998). É utilizado por ser também biodegradável, atóxico, sendo excretado facilmente pelo organismo humano (RUSU; URSO, 2006). O processo de degradação ocorre pelo processo de hidrólise das ligações de ésteres,

resultando em produtos solúveis (HUANG *et al.*, 2004). Estas características conferem propriedades importantes para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, e podem ser elucidadas através do estudo de liberação *in vitro*.

2.7 Ensaios Químicos de Controle de Qualidade

Para garantir a qualidade e eficácia, todas as formas farmacêuticas devem atender um número de especificações que estão relacionadas às características físicas, químicas e biológicas, contidas nas farmacopeias, sendo as mais importantes para formulação administrada via oral, doseamento, uniformidade de conteúdo e estudo do perfil de liberação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O sistema polimérico proposto neste trabalho se adequou as normativas estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira para formulação sólida via oral.

Os ensaios químicos realizados foram doseamento e estudo de liberação *in vitro*. O doseamento por sua vez tem como objetivo quantificar o teor da substância ativa nas formulações. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Os estudos de dissolução *in vitro* são importantes para as várias etapas dos processos de desenvolvimento de medicamentos, para controle de qualidade e correlação *in vitro/in vivo*.

2.7.1 Estudo de liberação *in vitro*

No delineamento de formas farmacêuticas de liberação controlada, o estudo de liberação *in vitro* é relevante, pois permite a caracterização do sistema de liberação a partir da determinação da cinética de liberação. Os estudos de liberação *in vitro* promovem a avaliação da liberação da substância ativa através da formulação desenvolvida. No caso das formulações sólidas com administração via oral, estes estudos são elucidados pelo ensaio de dissolução em condições de temperatura, rotação e do meio adequados.

A eficácia do Piriproxifem já foi descrita por Oliveira (2017) por administração via oral para o controle da mosca dos chifres em bovinos, sendo excretado de forma inalterada nas fezes em níveis detectáveis suficientes capazes de assegurar o controle das formas imaturas de *H. Irritans* presente no bolo fecal (OLIVEIRA, 2017). As condições do ensaio de dissolução para ruminantes são pautadas em parâmetros que mimetizem o meio intra ruminal, com o objetivo de avaliar a influência da formulação no pH básico, na faixa de $6,5 \pm 0,2$ (APLEY *et al.*, 2015).

O critério de aceitação do perfil de dissolução nos intervalos de tempo especificados devem ser estudados e estabelecidos por cada caso, a fim de promover, bioequivalência *in vitro/in vivo*, considerando a eficiência do processo de produção e o teor, na faixa de 95 a 105% para o teor médio rotulado do produto final (FARINHA *et al.*, 1997).

A avaliação do perfil de dissolução sugerido por Khan (1975) é através do cálculo da eficiência de dissolução (%ED), a qual determina a área sobre a curva (AUC) de dissolução até um tempo determinado (t) e considera um retângulo correspondente a 100% de dissolução no mesmo intervalo de tempo (t) e a diferença destes dois casos, resulta na AUC do perfil de dissolução, segundo a Figura 7:

$$(\%)ED = \frac{AUC}{Aret} \times 100$$

Figura 7. Cálculo da Eficiência de Dissolução (%).

Onde, (%)ED é a eficiência de dissolução, AUC é a área sobre a curva de dissolução em função do tempo (t) e Aret é a área correspondente a 100% do retângulo em função do tempo (t). Desta forma, à partir desta equação é possível determinar a cinética de liberação ao longo do período em questão. Esta definição é vantajosa pois teoricamente pode ser relacionado com os testes *in vivo* (BANAKAR, 1992; FARINHA *et al.*, 1997; KHAN, 1975).

Com base em todas as vantagens e as necessidades do controle da mosca-dos-chifres no impacto da rentabilidade do agronegócio, o desenvolvimento e investimento de formas farmacêuticas inovadoras de liberação controlada contendo Piriproxifem são necessárias para assegurar a saúde animal e a segurança alimentar do gado de corte no Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes

Foram empregados os seguintes reagentes de grau analítico e pureza:

- Lauril sulfato de sódio (Dodecil sulfato de sódio), Vetec, lote 1107519;
- Metanol, Sigma-Aldrich, grau HPLC $\geq 99,9\%$, lote SHBF8238V;
- Ácido clorídrico P.A, Vetec 0506099;
- Acetato de Sódio, Merk, lote 106267;
- Fosfato de sódio dibásico, Vetec, lote 1102792;
- Fosfato de sódio monobásico Vetec, lote DCBC2256;
- Diclorometano, Sigma-Aldrich, grau HPLC $\geq 99,9\%$, lote SE150520151218.

3.1.2 Matérias-primas

Foram empregadas as seguintes matérias-primas, de grau farmacêutico de pureza, no preparo da formulação:

- Polietilenoglicol 4000, Fagron, lote 14010257A;
- Poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) 75:25, Purac, lote 5004A;
- Policaprolactona (PCL) 70 KDa, Sigma-Aldrich, lote 440744;
- Piriproxifem Matéria Prima, Ourofino, lote 131114;
- Papel Filtro Qualy, diâmetro 9,0.

3.1.3 Substâncias químicas de referência: Piriproxifem

A substância química de referência é um padrão secundário, Sigma-Aldrich, lote SZBB060XV, de teor declarado 99,1%, foi empregada como substância química de referência nas determinações analíticas.

3.1.4 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica Tecnal, modelo 210;
- Incubadora Shaker Digital Cienlab, modelo CE-720;
- Cromatógrafo líquido Dionex, modelo Ultimate 3000, equipado com duas bombas quaternárias, válvula de sete vias, forno para coluna, detector UV-VIS ULTIMATE 3000RS DIONEX e software CHROMELEON 6.80 DIONEX;
- Coluna cromatográfica Inovation Chromoliter C18 100 x 4,6 mm x 3,5 μ m;
- Filtro Millex 0,45U, membrana durapore 13mm;
- Bomba à vácuo – Tecnal – modelo Eco;
- Peagâmetro Quimis, modelo Q400MT;
- Ultrapurificador acoplado ao sistema de purificação por osmose reversa OS 10 LZ (Gehaka);
- Vórtex Go Mixer MX-5;
- Pipeta automática 1000 μ L
- Cetrífuga refrigerada Cientec, CT- 6000 R.
- MEV HITACHI, TM-1000; Microscópio Eletrônico de Varredura.
- FTIR, VERTEX 70; Espectrômetro de infravermelho.
- TGA-50 Shimadzu Thermogravimetric Analyzer.

3.2 Determinação do Teor de Piriproxifem na Matéria Prima

O Piriproxifem matéria-prima (MP) foi quantificado frente a substância química de referência (S.Q.R.) com teor conhecido (98,7%) doado pela empresa Labfor®, lote BCBT3748 do fabricante Sigma Aldrich., por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Ultravioleta (CLAE-UV), utilizando a metodologia desenvolvida seguindo as seguintes condições cromatográficas: Coluna Inovation Chromoliter C18 100 x 4,6 mm (3,5µm); Fase móvel MeOH:H₂O (80:20); Fluxo de 1,0 mL/min; λ: 254nm; Volume de injeção 10,00 µL.

Para o preparo da solução estoque (SE) de Piriproxifem foram pesados com precisão analítica quantidades equivalentes de 25,00 mg de Piriproxifem padrão com teor 98,7% e transferidos para um balão volumétrico de 25,00 mL cujo o volume foi completado com diluente metanol (MeOH), resultando em uma solução de 1,00 mg/mL, denominada solução estoque (SE).

Para o preparo da curva padrão, a partir da SE de 1,00 mg/mL foram feitas diluições para obtenção de soluções com concentrações de 5,0; 20,0; 60,0; 100,0; 150,0; e 250,0 µg/mL, utilizando como diluente MeOH.

3.3 Desenvolvimento da Formulação de Liberação Controlada

A formulação foi desenvolvida utilizando-se três diferentes polímeros: poli(ácido láctico-co ácido glicólico) (PLGA), polietilenoglicol (PEG) e policaprolactona (PCL), com o objetivo de avaliar as diferentes propriedades poliméricas no controle da liberação do fármaco. As formulações foram obtidas por duas diferentes metodologias: mergulhado e impregnado, resultantes da combinação do polímero, do ativo Piriproxifem e do diluente diclorometano e secos por 24 horas em estufa à temperatura ambiente, até o peso da formulação fosse mantida estável.

O suporte da formulação era um papel de filtro (diâmetro 9.0) com dimensões 5cm x 2cm, que foi incorporado a solução polimérica contendo o ativo. A solução polimérica era composta de aproximadamente 25,00 mg de Piriproxifem e 500,0 mg do polímero, solubilizados no volume de 10 mL do diluente diclorometano. O suporte celulósico era pesado antes da incorporação e após, para fins de cálculo da massa incorporada ao final da formulação.

A técnica mergulhada, consistiu na imersão do suporte celulósico na solução polimérica contendo o ativo por cinco vezes, com intervalo de 5 minutos para secagem. O objetivo deste método foi criar monocamadas na superfície da formulação que fosse capaz de retardar a liberação da substância ativa. A técnica incorporada, foi auxiliada pelo uso da pipeta automática P1000 (1000µL), com volume fixado de 800 µL, distribuídos em 400 µL em cada face do suporte. No final de ambas as metodologias, as formulações foram deixadas na capela para secagem de 24hrs em temperatura ambiente.

Os mesmos procedimentos foram realizados para as amostras placebos onde, na solução polimérica tinham-se a ausência do ativo Piriproxifem, sendo composta somente por polímero e o diluente diclorometano.

3.4 Ensaios Químicos de Controle de Qualidade

Para garantir a eficácia, todas as formas farmacêuticas devem atender um número de especificações e ensaios que estão relacionadas às características físicas, químicas e biológicas. As formulações devem conter características que garantam sua integridade, homogeneidade, dose, aspecto e liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica.

3.4.1 Ensaio de doseamento da formulação

O ensaio de doseamento teve por objetivo quantificar o teor da substância ativa em formulações. A formulação final, foi dividida em três partes de forma aleatória no suporte celulósico em 1cm² e adicionadas no balão de 10 mL avolumada com MeOH. Para completa solubilização e extração do ativo da formulação, colocou-se no ultrassom por 30 minutos. As alíquotas foram avolumadas, filtradas e transferidas para o vial pra análise e quantificação por CLAE-UV. As amostras preparadas no ensaio de doseamento e a curva padrão foram analisadas por CLAE-UV, seguindo as condições cromatográficas descritas no item 3.2.

3.4.2 Estudo de liberação *in vitro*

3.4.2.1 Estudo da solubilidade do Piriproxifem e escolha do meio de dissolução

O estudo de solubilidade foi realizado segundo a metodologia de *shake flask*, em plataforma de agitação onde foram avaliados os seguintes meios: HCl 0,1 (pH 1,2), tampão acetato de sódio (pH 4,5) e tampão fosfato de sódio (pH 6,8). Também foram avaliadas a solubilidade na ausência do tensoativo (SDS) e na presença deste em diferentes concentrações (0,10; 0,50; e 1,0 %).

O ensaio foi realizado seguindo as recomendações da Norma Técnica 003/2013 da ANVISA. Um excesso de Piriproxifem foi adicionado em erlenmeyers contendo 50 mL de cada meio a ser avaliado. Os erlenmeyers foram colocados sob agitação constante por um período de 24 horas a temperatura de 38°C. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana 0,45 µm e analisados por CLAE-UV utilizando as mesmas condições cromatográficas do 3.2. A análise estatística para a solubilidade em cada meio foi realizada através do teste One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey) com intervalo de confiança de 95% pelo software estatístico Minitab® 16.

3.4.2.2 Desenvolvimento do meio de dissolução

A escolha do meio de dissolução levou em consideração a solubilidade do fármaco obtido no ensaio *Shake Flask* e o pH fisiológico do animal ruminante, na faixa de $6,5 \pm 0,2$ como descrito por Apley (2015). O volume do ensaio de dissolução foi de 100 mL para uma amostra com aproximadamente 1,50 mg de piriproxifem, de tal forma que após a total liberação deste, o sistema ainda permanecesse nas condições *sink*. As coletas foram realizadas nos tempos de 0h, 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 1d, 2d, 3d, 4d, 7d, 9d, 11d, 15d, 21d e 28d. Em cada tempo de dissolução, foi retirada e filtrada uma alíquota de 0,5 mL de cada erlenmeyer, com reposição do meio de dissolução. Para o meio de dissolução utilizando o tampão fosfato com pH na faixa de $6,5 \pm 0,2$, a concentração foi determinada por CLAE-UV utilizando metodologia analítica citada no item 3.2. Os parâmetros velocidade de rotação e temperatura foram seguidos conforme a literatura para formulações orais pra bovinos (APLEY et al, 2015), sendo 100 rpm, 38°C, pH (5,10-7,5) Tampão fosfato. A análise estatística para avaliar a porcentagem dissolvida em cada meio de dissolução foi realizada através do teste One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey) com intervalo de confiança de 95%.

3.4.2.3 Estudo de cinética de liberação e análise do fluxo de liberação *in vitro*

A determinação da cinética de liberação foi realizada através de análise de regressão linear do gráfico de dispersão xy, aplicando três modelos:

- Ordem zero: quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ *versus* tempo (min);
- Higuchi: quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ *versus* raiz do tempo (min);
- Primeira ordem: log da quantidade liberada em $\mu\text{g/mL}$ *versus* tempo (min).

A partir da análise do coeficiente linear (r) obtido para cada um dos modelos, determinou-se a cinética de liberação. O modelo que apresentou maior valor de r foi o escolhido. O valor de fluxo de liberação (J) corresponde a inclinação (a) da porção linear da curva de liberação para cada formulação. O fluxo foi calculado em triplicata (n=3) e o valor foi expresso pela média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do teste One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey) pelo software Minitab® 16 com intervalo de confiança de 95%.

3.4.2.4 Cálculo da eficiência de dissolução

A eficiência da dissolução (ED%) foi calculada de acordo com a metodologia desenvolvida por Khan (1975), através da razão entre a área sob a curva de dissolução (AUC) do fármaco no intervalo de tempo de dissolução total e a área total do retângulo (ATR) definido pela ordenada (% de dissolução) e pela abscissa. A ED% também permitirá comparar adequadamente os perfis de dissolução de fármacos (KHAN, 1975). Esta variável está relacionada com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvida no meio e, desta forma, pode-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo*.

3.5 Ensaios Físicos de Caracterização

As propriedades poliméricas determinam as características físicas fundamentais da formulação que influencia no perfil de liberação, como as análises térmicas, morfológicas e estruturais. Os ensaios de variância de peso, ensaios físicos (morfologia, estrutural e térmico) foram realizados para todas as formulações, inclusive as amostras placebo.

3.5.1 Análise estrutural: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada Fourier (FTIR) é considerada uma das técnicas experimentais mais importantes para a caracterização de polímeros, em termos de identificação estruturais e grupos funcionais da formulação. Os espectros foram analisados na faixa de $4000\text{-}500\text{cm}^{-1}$ a temperatura ambiente e resolução de 300x, no modo ATR. O equipamento utilizado foi VERTEX 70 do Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. O ensaio não foi destrutivo e as amostras não sofreram alteração para análise. Os espectros foram gerados pelo software ACD® 6.0 e Origin® 6.0.

3.5.2 Análise morfológica: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi possível ter um melhor detalhamento da microestrutura através de imagens de alta ampliação e

resolução, e assim, diferenciar certos aspectos dos polímeros e das duas metodologias empregadas para o desenvolvimento das amostras. O equipamento utilizado foi um MEV HITACHI, modelo TM-1000, com tensão de aceleração de 15kV, e aumento 3000x do Laboratório de Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As imagens foram geradas através do software OIM Data Collection 5.1.

As frações volumétricas foram determinadas pelas frações das áreas das fases analisadas nas micrografias, através da relação apresentada na Equação 2 (RUSS e DEHOFF, 1999).

$$V_v = A_a$$

Figura 8. Equação matemática para fração volumétrica.

Onde V_v é a fração volumétrica e A_a é a fração da área.

A quantificação da fração da área das micrografias foi realizada com auxílio do programa Image J. O procedimento foi descrito com maiores detalhes no Anexo A. Com o intuito de realizar uma abordagem estatística foram enumeradas 100 fibras das micrografias de regiões distintas de cada formulação. Os conjuntos de dados obtidos para cada amostra, foram tratados e analisados com o auxílio do programa estatístico MiniTab®.

3.5.3 Análises térmicas: Termogravimetria (TGA)

A termogravimetria (TGA) consiste em uma técnica de análise térmica onde se avalia a variação de massa da amostra ocorre em função da temperatura. Torna-se possível verificar as alterações que o aquecimento gera nas cadeias poliméricas. O equipamento utilizado foi TGA-50 Shimadzu Thermogravimetric Analyzer com faixa de 20°C-700°C a uma vazão de nitrogênio por 50mL.min⁻¹ em porta amostra de platina do Laboratório de Catálise do curso de Engenharia Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A massa das amostras foi de aproximadamente (6,00±1,00) mg por amostra. Os resultados foram transferidos para o programa T.A Acquisitions Status que faz a representação gráfica da variação de massa em função da temperatura. Ao atingir a temperatura final de 700°C o equipamento é resfriado para iniciar outra análise. Os gráficos de taxa de degradação x temperatura foram gerados pelo software Origin® 6.0.

Estes ensaios térmicos foram realizados para fins comparativos entre as temperaturas de degradação dos três polímeros utilizados, com o objetivo de elucidar a degradação das cadeias poliméricas.

A Figura 9 representa o fluxograma de todas as etapas envolvidas no desenvolvimento da formulação de liberação controlada e seus ensaios físico-químicos.

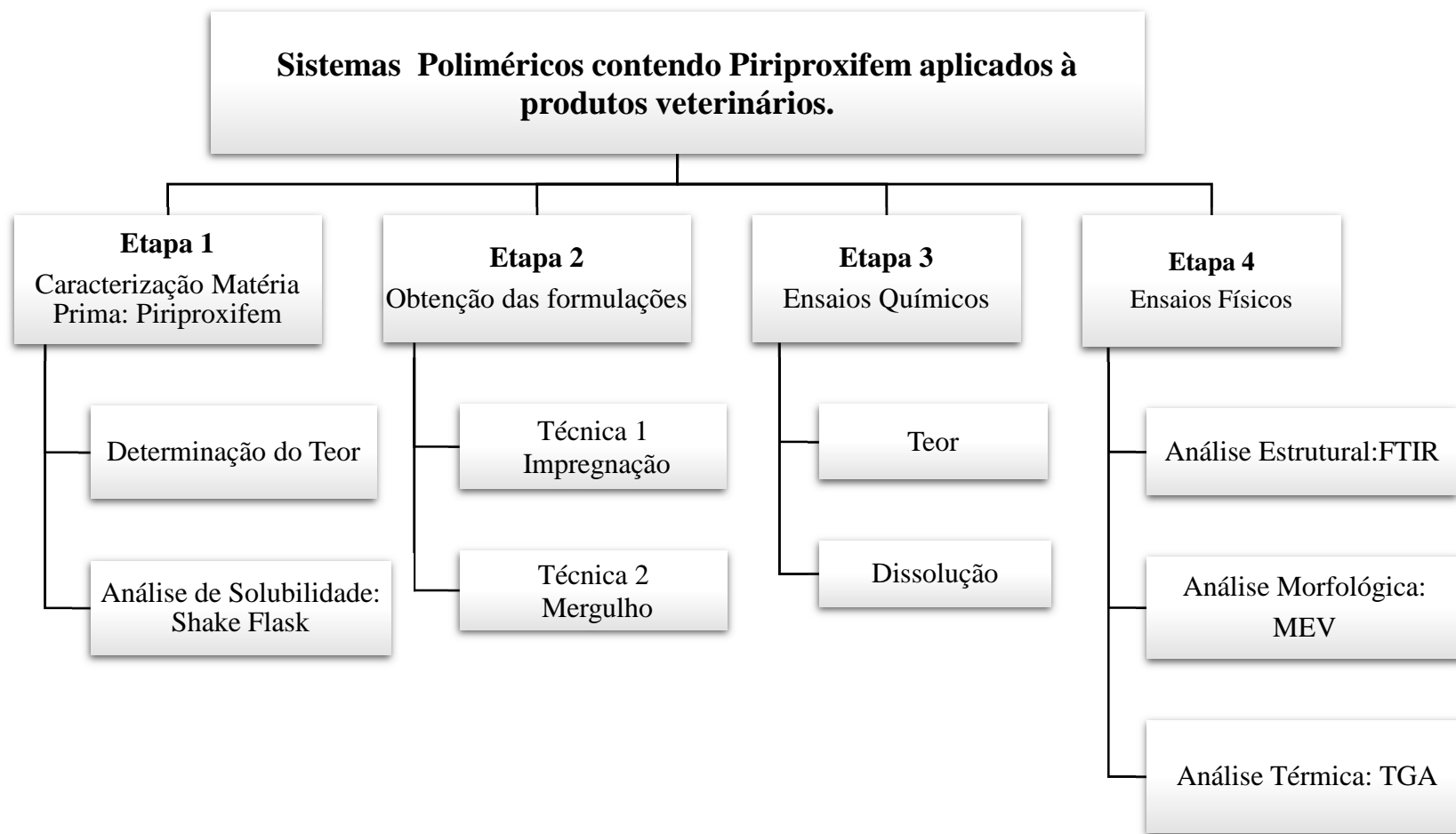


Figura 9. Etapas de desenvolvimento do protótipo do sistema polimérico contendo Piriproxifem.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação do Teor de Piriproxifem na matéria prima

A análise da matéria prima Piriproxifem utilizado no desenvolvimento das formulações foi comparado com o padrão secundário, para ensaio de teor e solubilidade. O teor do Piriproxifem MP utilizada para o desenvolvimento das formulações foi determinado por CLAE-UV. A Figura 10 representa a curva de calibração obtida a partir do padrão secundário do Piriproxifem. A equação da reta é $y = 0,1444x - 0,7909$ e o coeficiente de correlação $r^2 = 0,9988$.

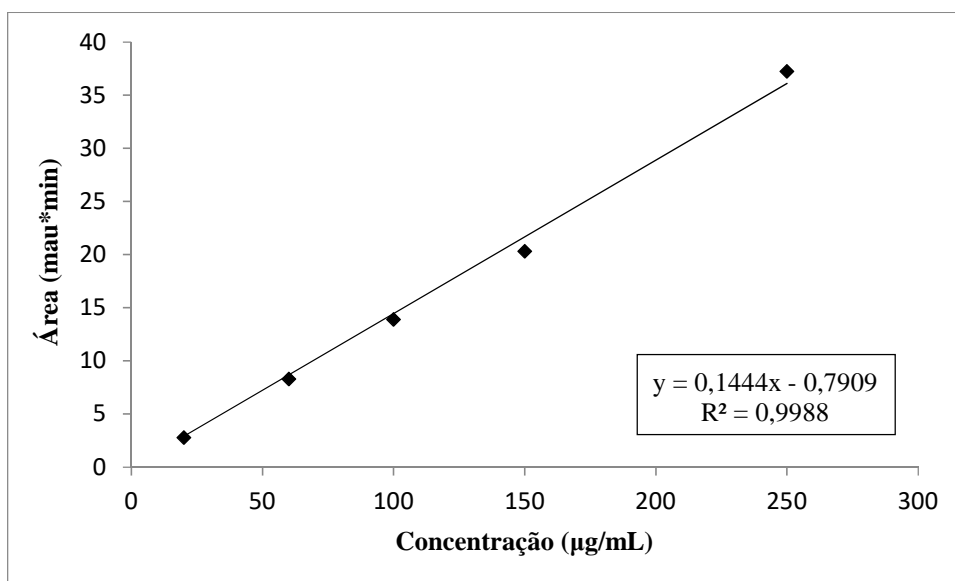


Figura 10. Curva de calibração do padrão secundário de Piriproxifem.

A Tabela 1 mostra os resultados de teor de Piriproxifem obtido na matéria-prima utilizada para o desenvolvimento das formulações. De acordo com a Farmacopéia Brasileira, a faixa aceitável no ensaio é de 90 à 110%.

Tabela 1. Resultados do ensaio de teor da matéria prima.

Amostras	Teor (%)	Teor Médio (%)	DPR
MP1	103,421		
MP2	99,565	102,683	0,0274
MP3	105,06		

dpr: desvio padrão relativo

A matéria prima utilizada apresentou um teor de 102,68%.

4.2 Desenvolvimento da formulação de liberação controlada

Os resultados dos ensaios físico-químicos juntamente com a dissolução, predisseram qual melhor método para o desenvolvimento do sistema de liberação

prolongado, conforme as especificações vigentes. A Figura 11 representa as formulações finais.



Figura 11. Formulações desenvolvidas.

O suporte celulósico foi pesado antes da adição da solução polimérica com ativo e após, a fim de confirmar a eficiência das metodologias utilizadas, pela diferença de peso, conforme a Tabela 2. Aplicou-se o teste estatístico One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey) para avaliar se houve diferença estatística entre os métodos de incorporação.

Tabela 2. Peso em gramas das formulações pré-liberação.

Polímeros	Diferença Média Massa (mg)*	
	<i>Impregnado</i>	<i>Mergulhado</i>
PEG	44,2 ± 0,8	25,8 ± 0,2
PLGA	54,5 ± 0,7	31,8 ± 0,4
PCL	49,1 ± 0,8	57,4 ± 0,14

*Diferença média de massa em miligramas ± dp

Na Tabela 3 estão apresentados o resumo dos resultados estatísticos da diferença das metodologias utilizadas no desenvolvimento das formulações.

Tabela 3. Resumo dos dados estatísticos do peso das formulações utilizando métodos de incorporação diferentes.

Comparação metodologias na formulação	Significância ^a
PEG impregnado x PEG mergulhado	P < 0,05
PLGA impregnado x PLGA mergulhado	P < 0,05
PCL impregnado x PCL mergulhado	P < 0,05

(a) Significativo para P < 0,05. Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

As metodologias de incorporação do polímero e ativo foram diferentes significativamente utilizando os polímeros PEG, PLGA e PCL, sendo a impregnação o método com maior peso final das formulações.

4.3 Ensaios Químicos de Controle de Qualidade

4.3.1 Ensaio de doseamento da formulação

O teor de Piriproxifem nas formulações foi determinado por CLAE-UV. A equação da reta é $y = 0,145x + 0,660$ e o coeficiente de correlação $r^2 = 0,997$. A Figura 12 representa graficamente a curva de calibração.

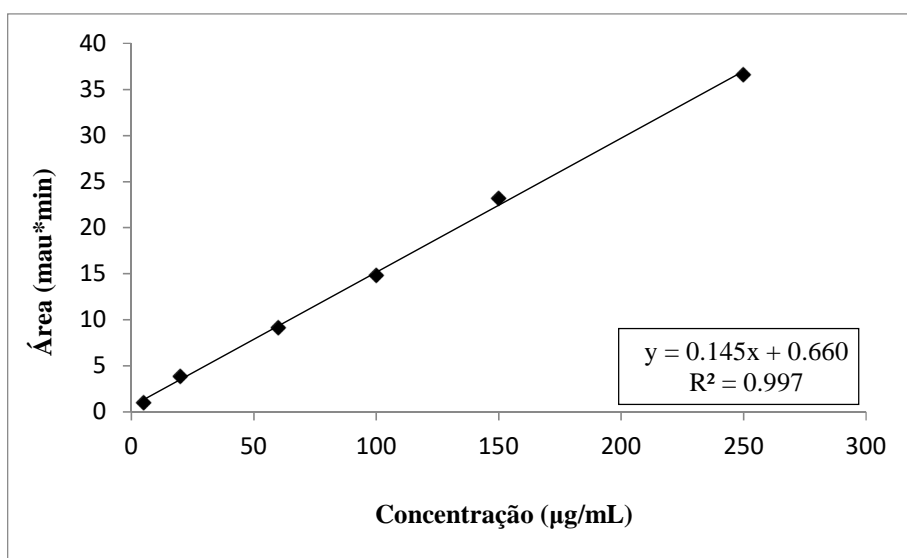


Figura 12. Curva de calibração Piriproxifem.

A faixa do ensaio de teor preconizado pela Farmacopeia Brasileira para formulações orais é de 90-110%. A Tabela 4 representa os resultados do ensaio de teor das formulações nos dois métodos de incorporação diferentes: impregnado e mergulhado.

Tabela 4. Teor das formulações de Piriproxifem em diferentes metodologias de incorporação.

Metódo	Formulação	Teor Médio (%)	DP	DPR
<i>Impregnação</i>	PEG	86,45	3,20	0,4
	PLGA	81,39	2,13	0,2
	PCL	78,09	1,89	0,6
<i>Mergulho</i>	PEG	63,44	2,64	0,6
	PLGA	60,92	1,55	1,2
	PCL	61,06	1,23	0,8

dp: desvio padrão; dpr: desvio padrão relativo

Os valores de teor médio obtido nas formulações estão abaixo desta faixa, sendo que o método de incorporação impregnado obteve os resultados mais promissores. Portanto, a metodologia de incorporação obteve diferença e esta interferiu significativamente no ensaio de teor. Além disso, o método de mergulho teve uma dispersão dos resultados maiores do que o impregnado.

4.3.2 Estudo de liberação *in vitro*

4.3.2.1 Estudo da solubilidade do Piroproxifem e escolha do meio de dissolução

A Tabela 5 representa a solubilidade ($\mu\text{g/mL}$) do Piroproxifem nos diferentes meios de dissolução, variando a faixa de pH (1,2-6,8) como recomendado pela nota técnica 003/2013, da ANVISA, na ausência e na presença de tensoativo em diferentes concentrações. Aplicou o teste estatístico Teste estatístico: One-way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey) para avaliar as diferenças estatísticas entre os meios de dissolução.

Tabela 5. Resultados do ensaio de solubilidade.

Meio	% SDS	Solubilidade $\mu\text{g/mL}$
HCl 0,1 M pH 1,2	--	43,07 ^d
	0,5	45,98 ^d
	1,0	386,48 ^a
Acetato pH 4,5	--	1,86 ^e
	0,5	112,17 ^c
	1,0	333,22 ^b
Fosfato pH 6,8	--	0,5481 ^e
	0,5	121,89 ^c
	1,0	394,87 ^a

*Letras diferentes se diferem significativamente $P < 0,05$

** Letras iguais não se diferem significativamente entre si. $P > 0,05$

A solubilidade do Piroproxifem é influenciada pelo pH ácido, já que apresentou valores superiores na condição sem tensoativo. O Piroproxifem no meio ácido sofre hidrólise, logo, a solubilidade no meio HCl é maior na ausência do tensoativo, sendo mais estável em tampões com faixa de pH de 4,0 à 9,0. (TAKASHI *et al*, 1989). Esse aumento pode ser justificado pela hidrólise já que esta apresentou baixos valores em todos meios testados. A adição de tensoativo aumentou significativamente a solubilidade. Os meios de dissolução HCl e Tampão Fosfato não apresentaram diferença significativa entre si quando comparados com a mesma concentração de tensoativo 1%, como ilustra a Figura 13.

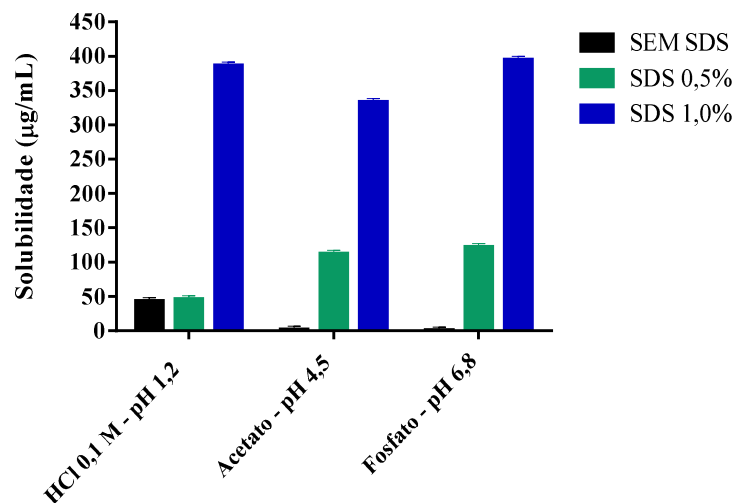


Figura 13. Solubilidade do Piriproxifem nos diferentes meios.

O uso do tensoativo (surfactante) em meios de dissolução é uma das principais estratégias para aumentar a solubilidade de fármacos insolúveis. O aumento da solubilidade está diretamente relacionada com o aumento da concentração de SDS nos meios básicos, sendo a concentração 1% a que apresentou maior solubilidade nos três meios. Portanto, é possível prever que a solubilidade do Piriproxifem é dependente do pH, uma vez que este sofre hidrólise em meio ácido.

4.3.2.2 Ensaio de Liberação *in vitro*

Foram comparadas as condições de pH e concentração de tensoativo, para determinação de um método que fosse mais discriminativo para o perfil de liberação do Piriproxifem. Foi possível observar que a maior porcentagem dissolvida foi encontrada na condição Tampão Fosfato com 1,0% de SDS e HCl 0,1M 1% de SDS.

Para prever qual seria o melhor meio de dissolução para o desenvolvimento de formulações orais em bovinos, foi preciso um estudo da fisiologia do rumem do animal. E, para este perfil, existe na literatura um guia de formulações orais descrito por Apley et al 2013, o qual determina o meio, o pH e a rotação do ensaio para animais de grande porte. Portanto, com os resultados da solubilidade do ensaio *Shake Flask* e respaldado por este guia, o meio de dissolução selecionado foi o Tampão Fosfato 1% SDS. As comparações dos ensaios de perfil de dissolução estão demonstradas nas figuras abaixo.

A Figura 14 representa o perfil de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas com o polímero PEG contendo piriproxifem.

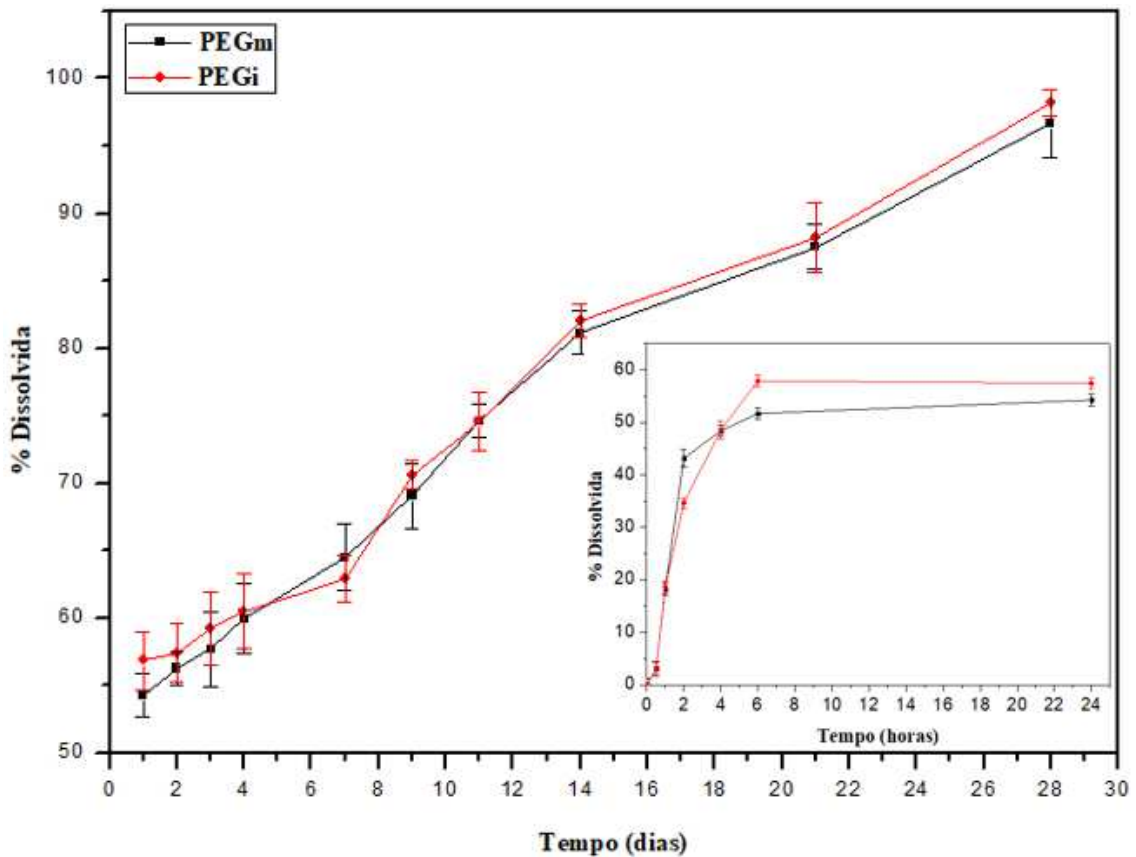


Figura 14. Porcentagem dissolvida das formulações poliméricas PEG contendo piroxicam em função do tempo (h) nas duas diferentes metodologias: mergulhado (PEGm) e impregnado (PEGi). Inset: Perfil de liberação das formulações em até 24 horas.

O perfil de dissolução da Figura 14 corresponde ao polímero PEG, e a liberação do piroxicam se inicia após 0,5 hora do ensaio, totalizando ao final de 24 horas uma porcentagem dissolvida acima de 50%. À partir do segundo dia até o 28º, houve uma liberação de frações menores quando comparadas ao início da dissolução. Este efeito é conhecido como “burst effect”, onde ocorre a dissolução rápida do fármaco contido na superfície da formulação e, associado a este, tem-se a elevada solubilidade do polímero em meio aquoso. Analisando a estrutura química do polímero PEG, pode-se prever que o empacotamento das cadeias ocorre de forma menos efetiva, permitindo uma maior maleabilidade, promovendo a permeação do meio tampão aquoso nas cadeias, e logo, pelo processo de difusão, ocorre a liberação da substância ativa do interior para o meio. Além disso, o PEG possui característica semicristalina, portanto, a rigidez da cadeia polimérica é comprometida. De forma geral, a formulação de PEG pelo método impregnado, por possuir maior diferença de peso, como demonstrado na Tabela 2, obteve as porcentagens dissolvidas maiores nas primeiras 24 horas, em comparativo com a metodologia mergulhada. A Figura 15 representa o perfil de liberação *in vitro* do polímero PLGA nas diferentes metodologias.

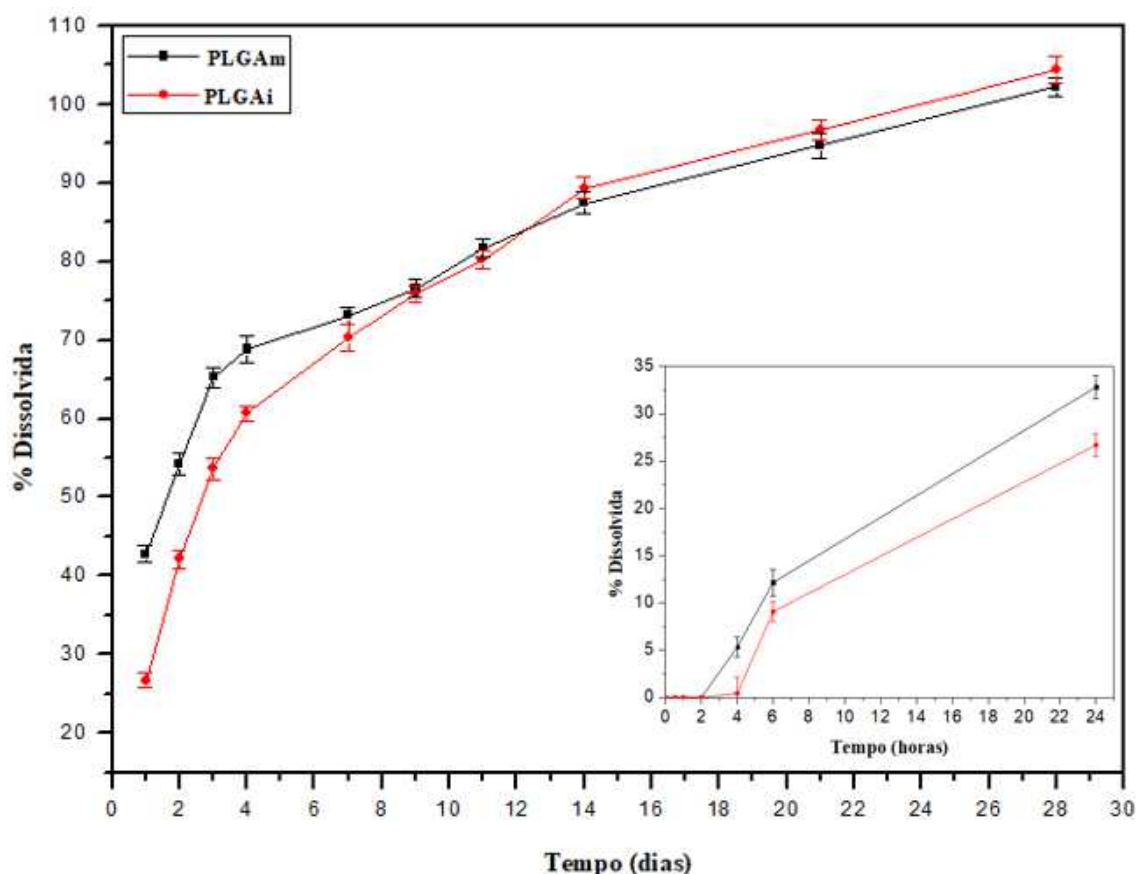


Figura 15. Porcentagem dissolvida das formulações poliméricas PLGA contendo piroxicam em função do tempo (h) nas duas diferentes metodologias: mergulhado (PLGAm) e impregnado (PLGAi). Inset: Perfil de liberação das formulações até 24 horas.

A Figura 15 é referente ao polímero PLGA, obteve um perfil de dissolução retardado, com o início da liberação no tempo de 4h para a metodologia impregnada e 2h para a mergulhada. Primeiramente, o polímero absorve o meio aquoso, o qual penetra na região amorfa e altera a conformação que antes eram estabilizadas pelas forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio, promovendo a clivagem das ligações covalentes da cadeia polimérica. Estas etapas justificam o perfil retardado da formulação de PLGA. Após esse processo de hidrólise e degradação do polímero, a porcentagem dissolvida é aumentada significativamente à partir de 6h. A degradação do polímero desempenha um papel importante no mecanismo de liberação, uma vez que é responsável pela liberação gradual do fármaco remanescente no interior da matriz. Além disso, a proporção do ácido lático na estrutura de PLGA 75:25 por ser maior, aumenta a hidrofobicidade, e possivelmente, corrobora para a retardar os tempos iniciais do ensaio de dissolução. O PLGA pelo método mergulhado obteve o mesmo efeito do “burst effect”, liberando o piroxicam contido na superfície da formulação antes da formulação pelo método impregnado. A Figura 16 representa o perfil de liberação *in vitro* do polímero PCL nas diferentes metodologias.

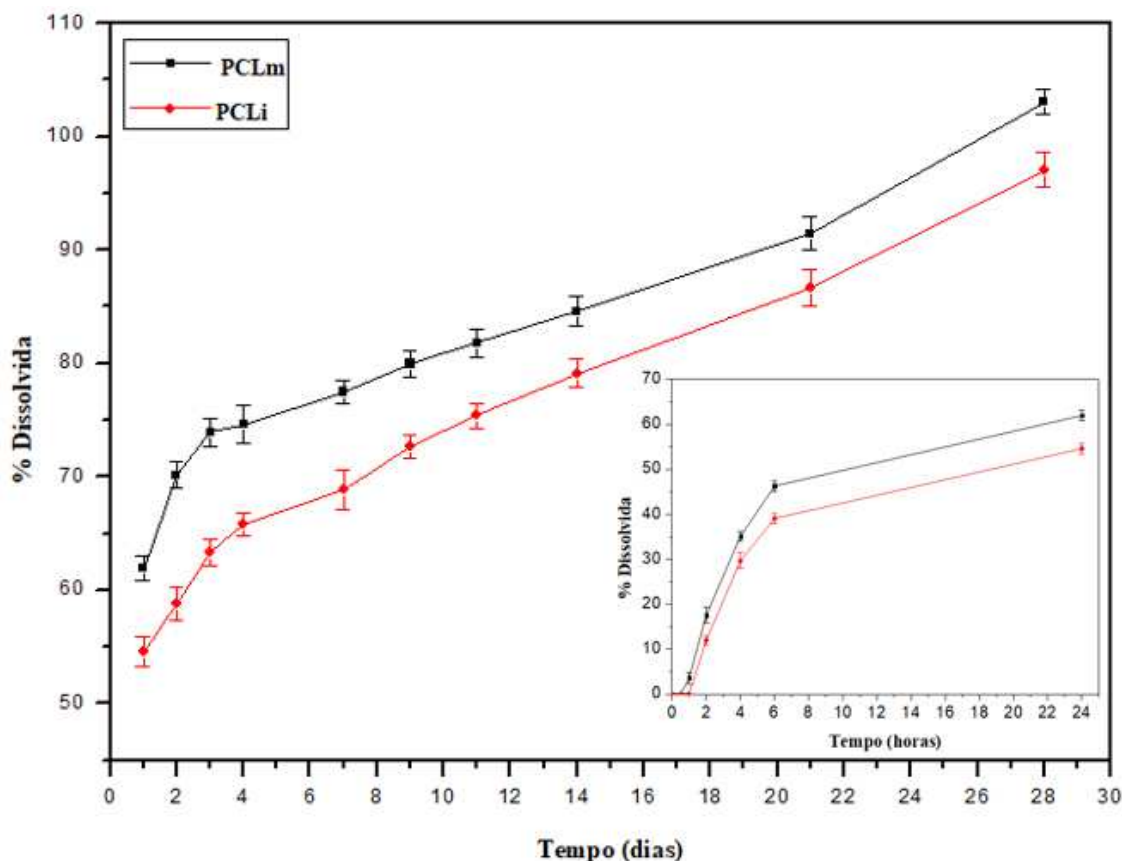


Figura 16. Porcentagem dissolvida das formulações poliméricas PCL contendo piroxicam em função do tempo (h) nas duas diferentes metodologias: mergulhado (PCLm) e impregnado (PCLi). Inset: Perfil de liberação das formulações até 24 horas.

A Figura 16, referente ao polímero PCL apresentou frações dissolvidas à partir do tempo de 1 hora, elucidando retardamento pequeno da liberação no tempos iniciais. A estrutura do PCL contém o grupamento éster, que por sua vez, aumenta a polaridade da cadeia e interfere aumentando a rigidez. A partir disso, pode-se justificar este retardo dos tempos iniciais. Com o aumento da rigidez, a permeação do meio aquoso nas cadeias poliméricas fica comprometida, dificultando as clivagens das ligações e a liberação da substância química piroxicam. A estrutura do PCL é semicristalina, com t_g (-60°C) baixo e, portanto, após as quebras das ligações de éster, a flexibilidade da cadeia é comprometida e aumentada significativamente, que caracteriza os teores mais elevados de piroxicam em curto espaço de tempo (DALL'AGNOL, 2016).

De forma geral, os polímeros PLGA e PCL apresentaram um perfil retardado de liberação, iniciando-a após 1 horas de ensaio. O polímero PEG apresentou um perfil de liberação controlado, obtendo frações dissolvidas após 24 horas menores em comparativo com a formulação de PLGA. Em 24 horas de ensaio, os polímeros PEG e PCL já apresentavam valores de porcentagens dissolvidas acima de 50%, enquanto o polímero PLGA apresentou metade destes valores de porcentagens.

Através da análise deste perfil de liberação *in vitro*, pode-se inferir que o polímero PLGA foi o que apresentou os melhores resultados para um sistema de liberação controlado.

4.3.2.3 Estudo de cinética de liberação e análise do fluxo de liberação *in vitro*

Os estudos de liberação *in vitro* visam a avaliação da liberação/cedência do fármaco a partir da formulação desenvolvida. A partir do perfil de liberação pode-se determinar a cinética para cada formulação. Para isso, escolheu-se a porção mais linear de cada perfil e aplicou-se os três modelos cinéticos (item 3.4.2.3) para determinação da equação da reta de regressão linear ($y = ax + b$). O modelo que apresentou maior valor de correlação linear (mais próximo de 1) foi escolhido como modelo cinético do estudo. O valor de fluxo (J) corresponde ao valor de inclinação da equação da reta de regressão linear. Os valores de fluxo (J) e correlação linear (r) das formulações analisadas estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Determinação do fluxo (J) e cinética de liberação ($n=6$) das formulações poliméricas em diferentes metodologias.

Polímero	Metodologia	Fluxo (J)*	Correlação linear (r)	Modelo Cinético
PEG	Impregnado	$2,316 \pm 0,075$	0,904	Pseudo-primeira ordem
	Mergulhado	$2,269 \pm 0,349$	0,911	
PLGA	Impregnado	$3,871 \pm 0,150$	0,961	
	Mergulhado	$3,194 \pm 0,281$	0,926	
PCL	Impregnado	$2,698 \pm 0,489$	0,907	
	Mergulhado	$2,636 \pm 0,047$	0,905	

* Valores expressos em média \pm dp.

Os estudos de liberação *in vitro* revelaram uma cinética de pseudo-primeira ordem, caracterizando um sistema de liberação controlada por difusão. A metodologia utilizada para o desenvolvimento das formulações (impregnado e mergulhado) não influenciaram no perfil cinético. A Tabela 7 apresenta o resumo dos dados estatísticos para os valores de fluxo obtidos a partir dos estudos de cinética de liberação para as metodologias testadas.

Tabela 7. Resumo dos dados estatísticos do Fluxo (J) após estudo de liberação *in vitro* das formulações utilizando metodologias diferentes.

Comparação metodologia das formulações	Significância ^a
PEGm x PEGi	0
PLGAm x PLGAi	0
PLGAm x PEGm	1
PLGAm x PEGi	1
PLGAi x PEGm	1
PLGAi x PEGi	1
PCLm x PLGAm	0
PCLm x PLGAi	1
PCLm x PEGm	0
PCLm x PEGi	0
PCLm x PCLi	0
PCLi x PLGAm	0
PCLi x PLGAi	1
PCLi x PEGm	0
PCLi x PEGi	0

(a) Significância igual a 1 indica que a diferença de média é significativa no nível 0,05. Significância igual a 0 indica que a diferença de média não é significativa no nível 0,05. Teste estatístico: One- Way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

Os métodos de incorporação das formulações de PEG, PLGA e PCL não apresentaram diferença significativa no valor de fluxo entre si para cada polímero.

4.3.2.4 Cálculo da eficiência de dissolução

A Tabela 8 apresenta os dados de eficiência de dissolução para ambas formulações nos diferentes ensaios.

Tabela 8. Eficiência de dissolução das formulações nas diferentes metodologias.

Polímero	Método	% ED	dp
PEG	Impregnado	77,4	7,9
	Mergulhado	76,7	8,7
PLGA	Impregnado	80,5	7,0
	Mergulhado	81,9	7,9
PCL	Impregnado	77,0	3,9
	Mergulhado	83,9	5,2

A Tabela 9 apresenta o resumo dos dados estatísticos para os valores de eficiência de dissolução (%ED) obtidos a partir da área sobre a curva dos perfis de dissolução para todos as formulações nas duas diferentes metodologias.

Tabela 9. Resumo dos dados estatísticos de eficiência de dissolução (%ED) após estudo de liberação *in vitro* das formulações utilizando metodologias diferentes.

Comparação metodologia para (%ED)	Significância ^a
PEGm x PEGi	0
PLGAI x PEGi	0
PLGAI x PEGm	0
PLGAm x PEGi	0
PLGAm x PEGm	0
PLGAm x PLGAI	0
PCLi x PEGi	0
PCLi x PEGm	0
PCLi x PLGAI	0
PCLi x PLGAm	0
PCLm x PEGi	0
PCLm x PEGm	0
PCLm x PLGAI	0
PCLm x PLGAm	0
PCLm x PCLi	0

(a) Significância igual a 1 indica que a diferença de média é significativa no nível 0,05. Significância igual a 0 indica que a diferença de média não é significativa no nível 0,05. Teste estatístico: One- Way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey).

Aplicando o Teste estatístico: One- Way Anova (teste de múltiplas comparações de Tukey) para os valores de eficiência de dissolução em metodologias diferentes, foram obtidos dados estatísticos de significância para as médias igual a 0, indicando que a diferença de média não é significativa. Portanto, as formulações poliméricas e as metodologias utilizadas não influenciam na eficiência de dissolução.

4.4 Ensaios Físicos de Caracterização

4.4.1 Análises estruturais: FTIR

A técnica de espectroscopia FTIR pode ser utilizada para a caracterização de polímeros (REIS *et al*, 2006), e para a análise dos espectros das amostras placebos e formulações em diferentes metodologias. Foram realizadas as correlações entre as bandas principais observadas na faixa de 4000-500 cm^{-1} . Todas as análises foram realizadas com auxílio do Spectra Database for Organic Compounds SDBS. O espectro do suporte celulósico é ilustrado na Figura 17.

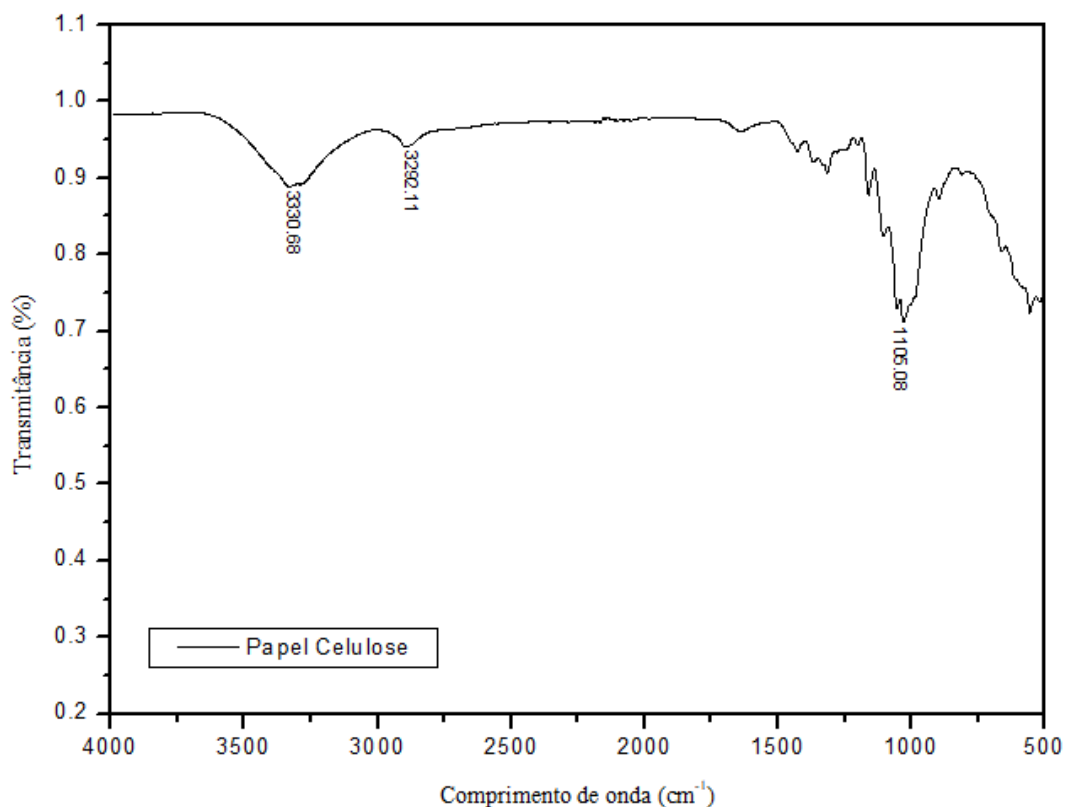


Figura 17. Espectro de infravermelho do suporte celulósico.

Na Figura 17, o espectro possui três principais bandas características das fibras de celulose contidas no suporte das amostras. A banda de absorção presente em 3330 cm^{-1} indica a presença do grupamento OH das fibras. A banda em 3200 cm^{-1} refere-se ao estiramento das cadeias alifáticas de alcanos e em 1105 cm^{-1} , vibrações das ligações químicas do grupo OH. A banda de absorção e suas respectivas atribuições estão ilustrados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do suporte celulósico.

Atribuição	Banda de absorção (cm^{-1})
Grupo OH	3330.69
CH (CH_2 e CH_3 - estiramento)	3232.11
CH_3 – OH (deformação)	1105.08

O espectro da Figura 18 representa o ativo Piriproxifem.

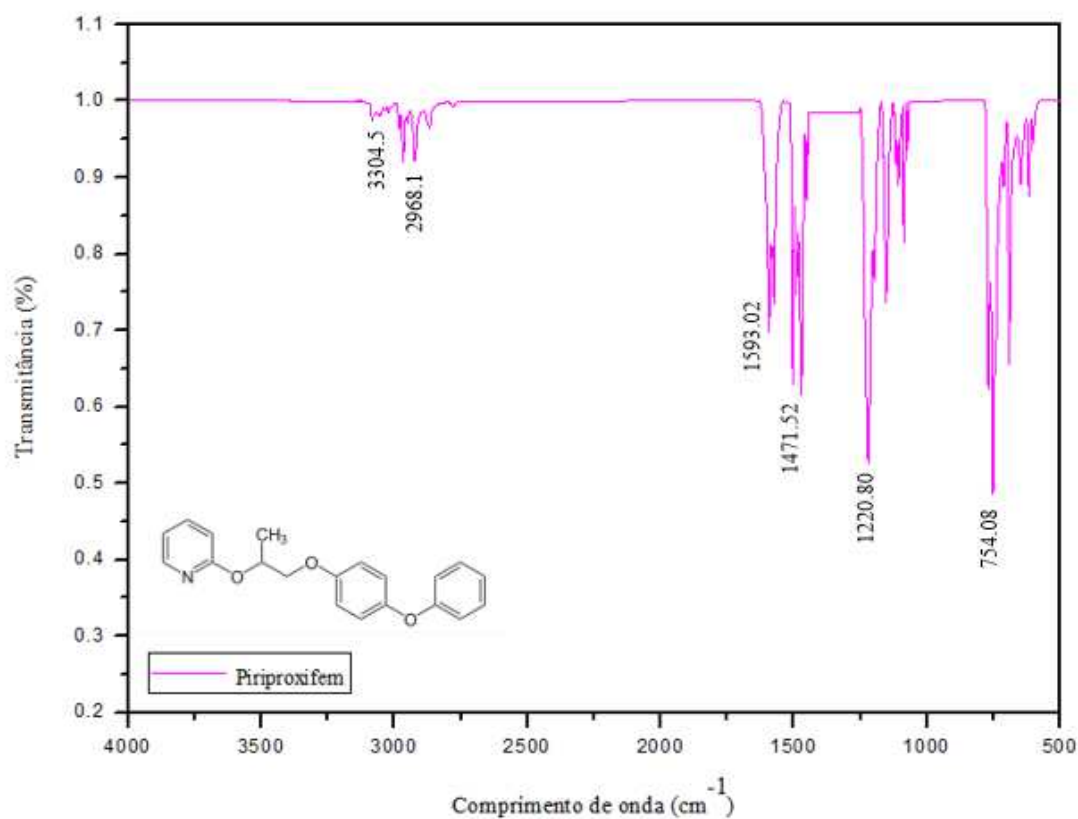


Figura 18. Espectro do infravermelho do IGR Piriproxifem.

Na Tabela 11 estão representadas as bandas de absorção e seus respectivos comprimentos de ondas e atribuições estruturais.

Tabela 11. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do fármaco piriproxifem.

Atribuição	Banda de absorção (cm ⁻¹)
N-H (estiramento)	3304.05
Anel aromático (C-H)	2968.10 – 2889.03
C-O e N-H (deformação)	1593.02 – 1471.52
C=C, C=N (anel)	1220.80
Cadeias alifáticas (CH)	754.08

A piridina presente no anel da estrutura do Piriproxifem pode ser elucidada no comprimento de onda de 3304 cm⁻¹ e confirmada pelas bandas de estiramento em 1471 cm⁻¹ e pela ligação C=N do anel na banda de absorção 1220.80 cm⁻¹. O anel aromático está representado na faixa de 2880-2968 cm⁻¹ e as cadeias alifáticas e ligações CH da estrutura da piridina em 754 cm⁻¹.

O espectro representado na Figura 19 refere-se ao polímero PEG.

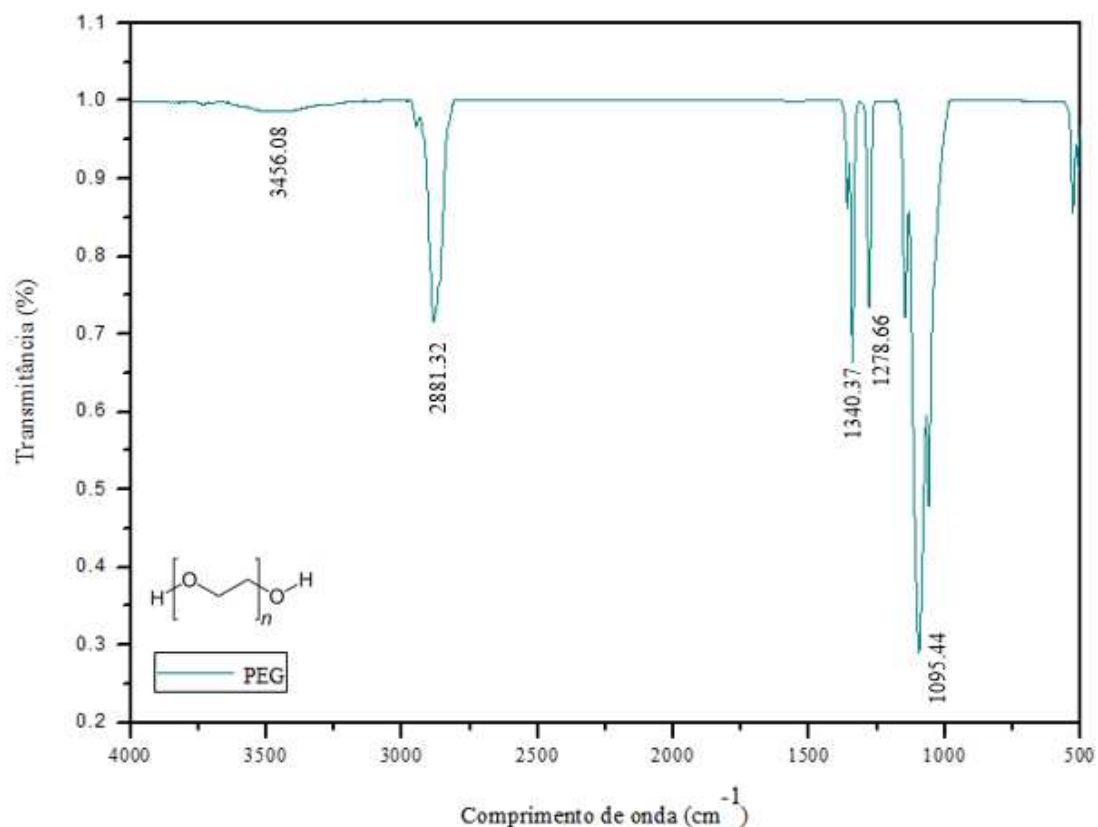


Figura 19. Espectro de infravermelho do polímero PEG puro.

No espectro de infravermelho do PEG (Figura 19) as bandas do modo de estiramento C-H são expressas na região 2800 cm^{-1} . Além disto, uma banda larga na região de 3400 cm^{-1} representa o grupo OH terminais do polímero, e devido a isso, a intensidade é baixa, e confirmada, pelas bandas em 1340 cm^{-1} e 1278 cm^{-1} . A banda significativa em 1095 cm^{-1} é a característica de éteres presentes nos monômeros da estrutura do polímero PEG. Na Tabela 12 estão os valores de cada banda de absorção observada na Figura 17 e suas atribuições.

Tabela 12. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do polímero PEG.

Atribuição	Banda de absorção (cm^{-1})
Grupo OH	3456.08
CH (CH_2 e CH_3 - estiramento)	2881.32
CH_3 - OH (deformação)	1340.37 e 1278.66
CH_3 - O - CH_3 (deformação)	1095.44

A Figura 20, representa a sobreposição das formulações pré-liberação nas duas metodologias de incorporação, o fármaco piroproxifem, o polímero puro PEG e o suporte celulósico.

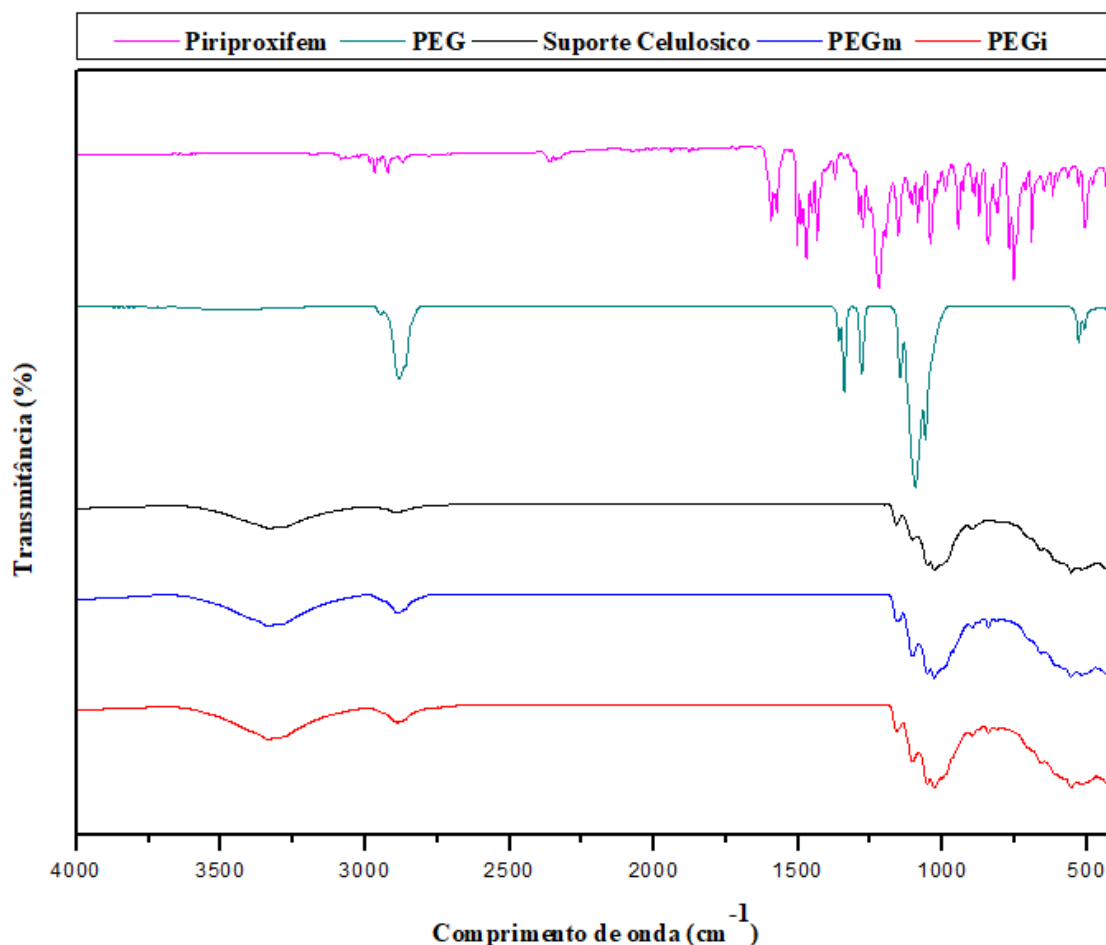


Figura 20. Sobreposição de espectros de FTIR do fármaco Piriproxifem, do polímero PEG puro, Suporte Celulósico e formulações PEG mergulhada (PEGm) e PEG impregnada (PEGi).

Na Figura 20, a banda larga de absorção em $3400 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ é referente aos grupos terminais de hidroxila do polímero, e sua intensidade é aumentada nas formulações, devido a presença do suporte de celulose que contém grupos OH. O ensaio do PEG puro foi realizado na sua forma pó. A diferença de metodologia não interferiu nos espectros de infravermelho do polímero. A banda característica na faixa de 2800 cm^{-1} no polímero puro e nas formulações são os estiramentos da cadeia alifática C-H.

A análise espectral indicou que os grupos funcionais específicos do polímero PEG na superfície da formulação não foram visíveis, pois as concentrações utilizadas por estarem diluídas não foram detectáveis no ensaio.

Abaixo, a Figura 21 representa o espectro de infravermelho do polímero PLGA puro.

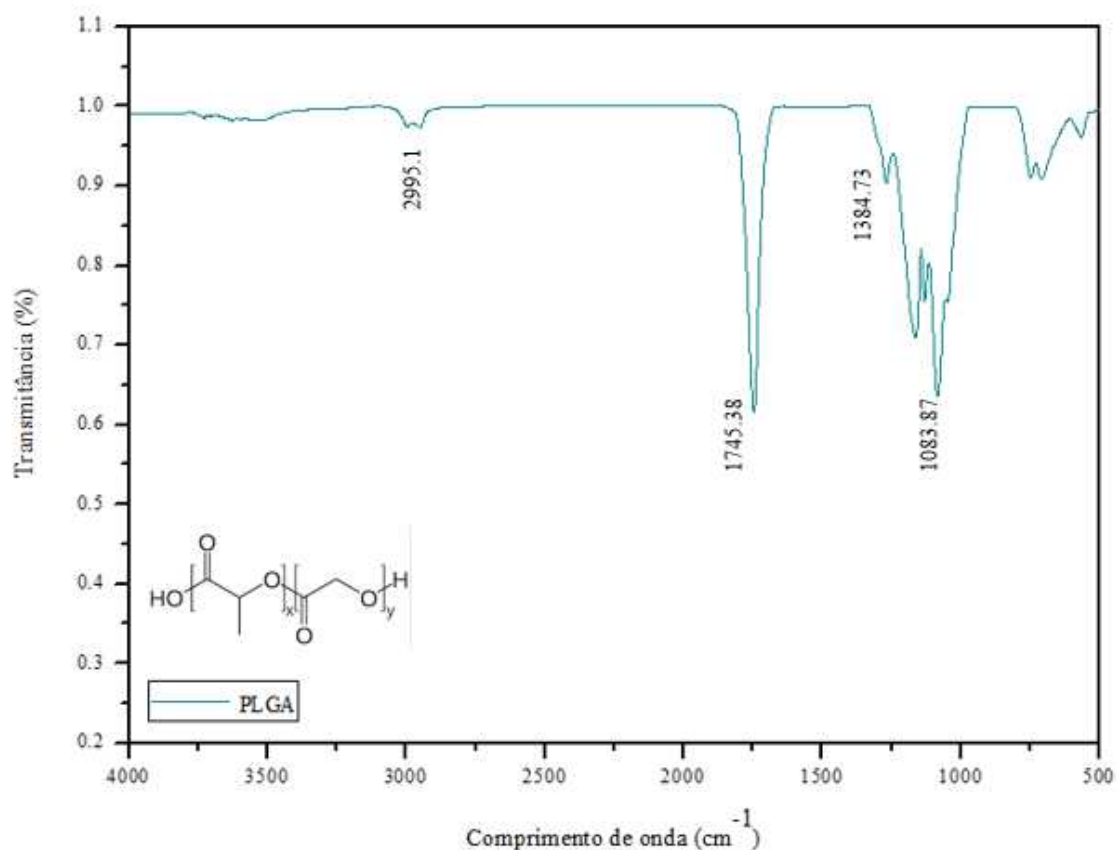


Figura 21. Espectro de infravermelho do polímero PLGA puro.

A Figura 21 apresentou bandas de -CH , -CH_2 , -CH_3 em 2995 cm^{-1} , uma banda característica em 1745 cm^{-1} representando o alongamento da carbonila (C=O), e alongamento de C-O do grupo hidroxila em 1083 cm^{-1} . Na Tabela 13 estão descritas as bandas de absorção observadas na Figura 21 e seus grupos funcionais.

Tabela 13. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do polímero PLGA.

Atribuição	Banda de absorção (cm^{-1})
CH (CH_2 e CH_3 - estiramento)	2995.1
C=O	1745.38
CH_3	1384.73
C - OH	1083.87

Os espectros da Figura 22 são referentes a sobreposição das formulações de PLGA pré-liberação nas duas metodologias de incorporação, o fármaco piroproxifem, o polímero puro PLGA e o suporte celulósico.

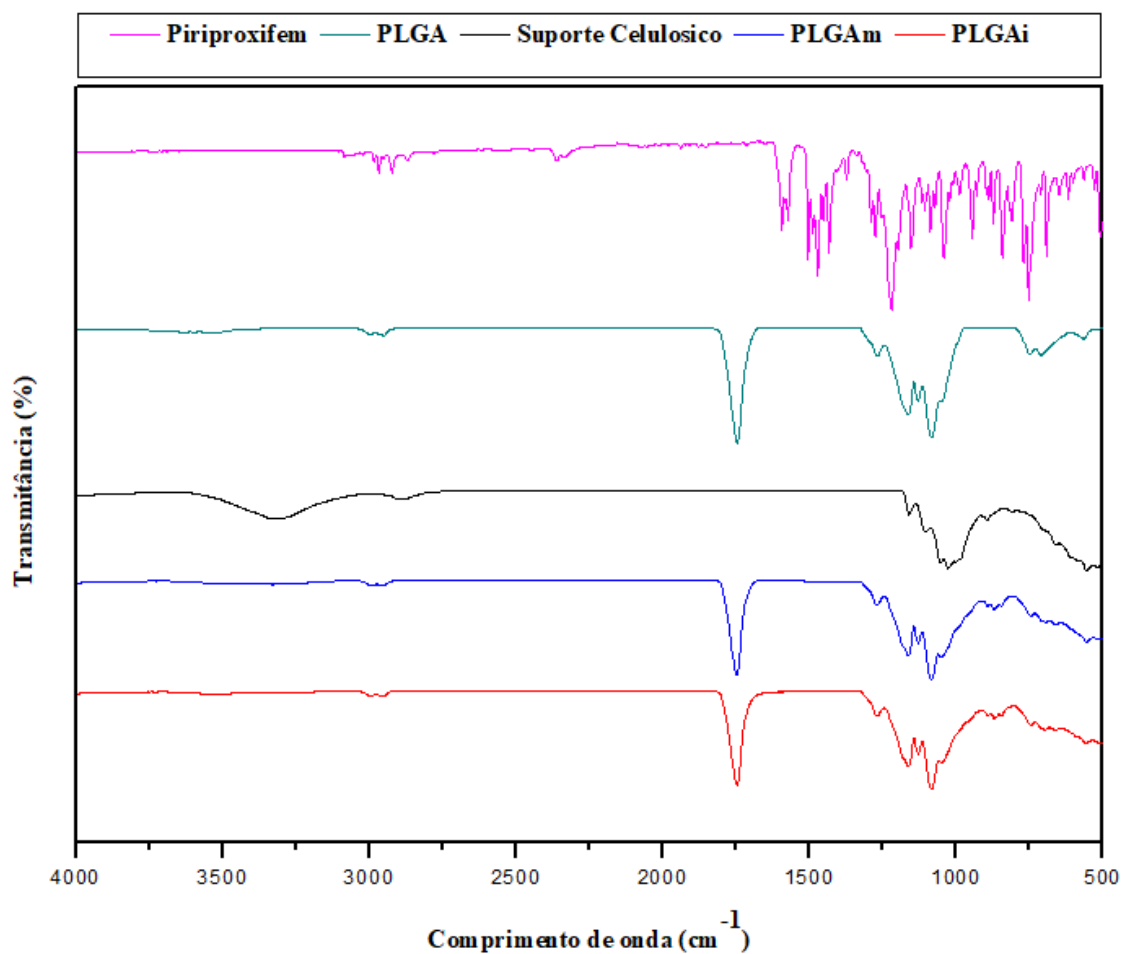


Figura 22. Sobreposição de espectros de FTIR do fármaco Piriproxifem, do polímero PLGA puro, das formulações PLGA mergulhado (PLGAm) e PLGA impregnado (PLGAi).

A banda característica do PLGA na faixa de $1720-1740\text{ cm}^{-1}$ pode ser observado nos espectros das formulações, tanto mergulhado quanto impregnado. Porém, as vibrações de alongamento OH entre 3400 cm^{-1} não foram representativas.

Na Figura 23 representa-se o espectro de infravermelho do polímero PCL puro.

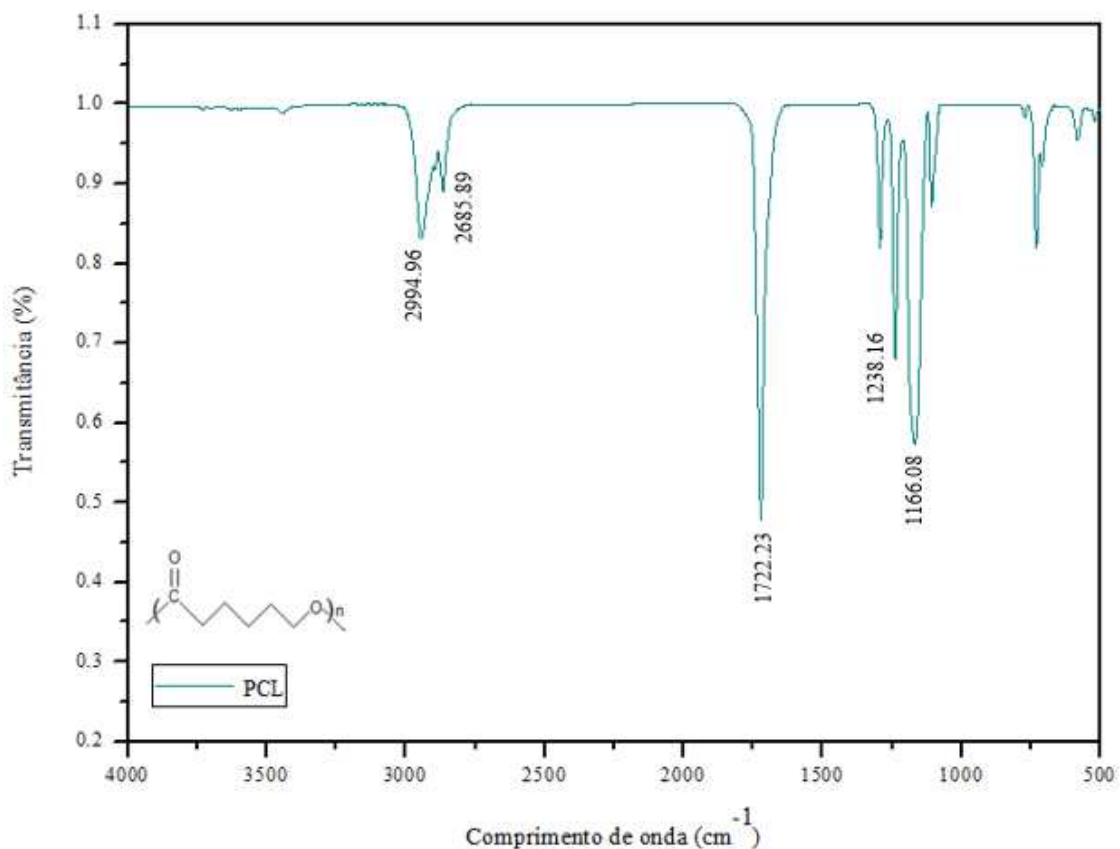


Figura 23. Espectro de infravermelho do polímero PCL puro.

A banda de absorção na faixa de 2600-2900 cm⁻¹ evidencia as ligações C-H da cadeia alifática do polímero. A banda característica na região de 1700 cm⁻¹ representa as deformações das ligações carbonílicas, no caso do PCL, a presença do éster, confirmadas pela banda em 1238cm⁻¹ e 1166cm⁻¹. A Tabela 14 apresenta as principais bandas de absorção do espectro do infravermelho e as suas atribuições.

Tabela 14. Valores descritivos do comprimento de onda e suas respectivas atribuições do polímero PCL.

Atribuição	Banda de absorção (cm ⁻¹)
CH (CH ₂ e CH ₃ - estiramento)	2994.96 – 2685.89
C=O (deformação)	1722.23
C=O (estiramento)	1238.16
C-O	1166.8

Os espectros da Figura 24 são referentes a sobreposição das formulações de PCL pré-liberação nas duas metodologias de incorporação, o fármaco piroproxifem, o polímero puro PCL e o suporte celulósico.

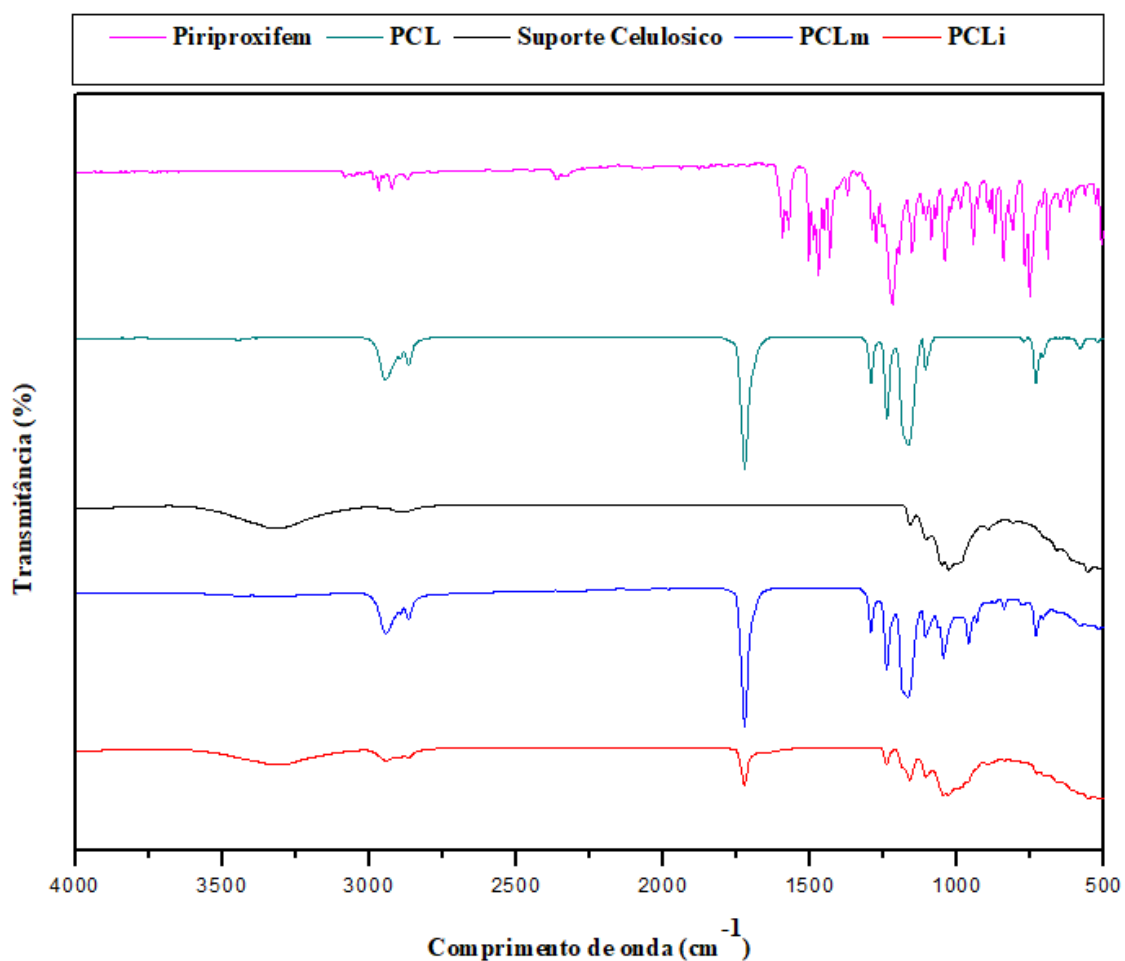


Figura 24. Sobreposição de espectros de FTIR do fármaco Piriproxifem, do polímero PCL puro e das formulações PCL mergulhado (PCLm) e PCL impregnado (PCLi).

A banda característica do PCL na faixa de 1700 cm^{-1} pode ser observada nos espectros das formulações, tanto mergulhado quanto impregnado. Porém, foi mais expressivo no método mergulhado, enquanto que no método impregnado, houve a presença do alongamento da banda de OH referente ao suporte celulósico em 3400 cm^{-1} .

Pelas análises espectrais foi possível notar a presença de bandas características dos polímeros nas formulações e avaliar que não houve surgimento de novas bandas, caracterizando algum processo de degradação.

4.4.2 Análise morfológicas: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4.4.2.1 Análise das formulações pré-liberação

Apesar da análise visual das formulações poliméricas ser uma técnica qualitativa comum para estimar a miscibilidade e compatibilidade da mistura (CIEMNIECKI; GLASSER, 1998), o MEV é uma técnica descrita na literatura (EL-SAYED *et al*, 2015) para análise morfológica de formulações contendo polímeros.

As frações volumétricas foram determinadas pelas frações das áreas das fases analisadas nas micrografias, obtendo um valor de preenchimento do suporte, considerado como a porcentagem da fração volumétrica dos métodos de incorporação e dos polímeros utilizados.

Primeiramente, todas as formulações obtidas apresentavam visualmente uma aparência esbranquiçada, com a presença de um pó fino na superfície do suporte celulósico. Somente as formulações desenvolvidas com o polímero PCL, apresentavam uma camada maior do pó, resultando em uma curvatura do suporte celulósico pelo aumento da incorporação do polímero na formulação e isto pode ser observada na Tabela 2, na qual, as formulações com o polímero PCL apresentavam maior peso final das amostras.

Nas Figuras 25, 26 e 27 são apresentadas as micrografias geradas por elétrons secundários e retroespalhados para as formulações de PEG, PLGA e PCL respectivamente. As micrografias foram tratadas e analisadas do programa Image J.

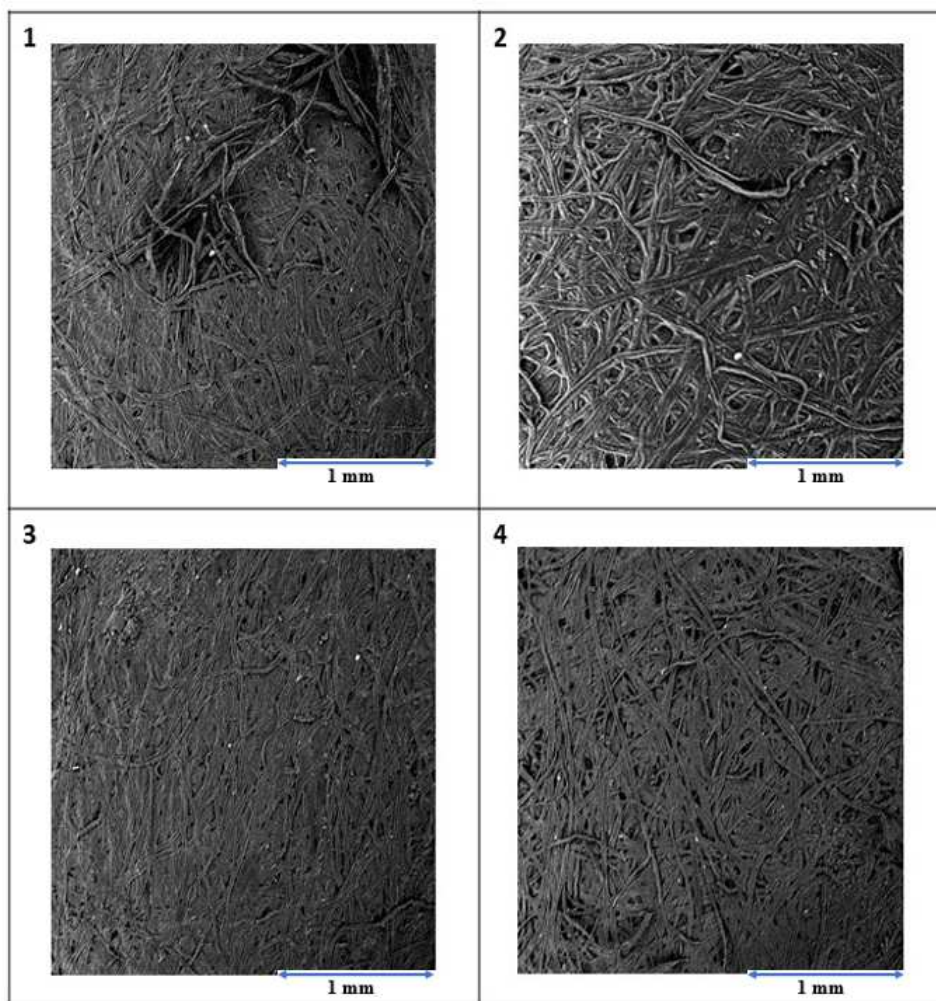


Figura 25. Micrografias da formulação contendo PEG nas diferentes metodologias. (1) PEGm placebo; (2) PEGi placebo; (3) Formulação PEGm; (4) Formulação PEGi. Eletróns secundários (SE). Aumento de 300x.

Na Figura 25 é possível diferenciar as morfologias de acordo com as metodologias utilizadas. As micrografias 1 e 2 representam os placebos mergulhado e impregnado, respectivamente, e em comparativo com as formulações abaixo mostradas, pode-se afirmar que as amostras se apresentaram homogêneas, pois não houve deposição de material na superfície na porção analisada, demonstrando a solubilidade total dos polímeros e do ativo piroxicam pela técnica de preparo das formulações. A formulação

PEGm (3) apresentou visualmente um preenchimento entre as fibras de celulose maior, de 86,88%, em comparativo com a formulação PEGi (4) que apresentou área de 81,84%.

Em contrapartida, o método impregnado aumentou o diâmetro das fibras na formulação, e estas extrapolações são confirmadas a partir do cálculo da fração volumétrica e medição das fibras de celulose pelo programa Image J, no anexo A e B.

A Figura 26 elucida o diâmetro das fibras em ambas metodologias, com as respectivas médias e desvio padrão. O diâmetro das fibras entre as duas metodologias de incorporação teve diferença significativa.

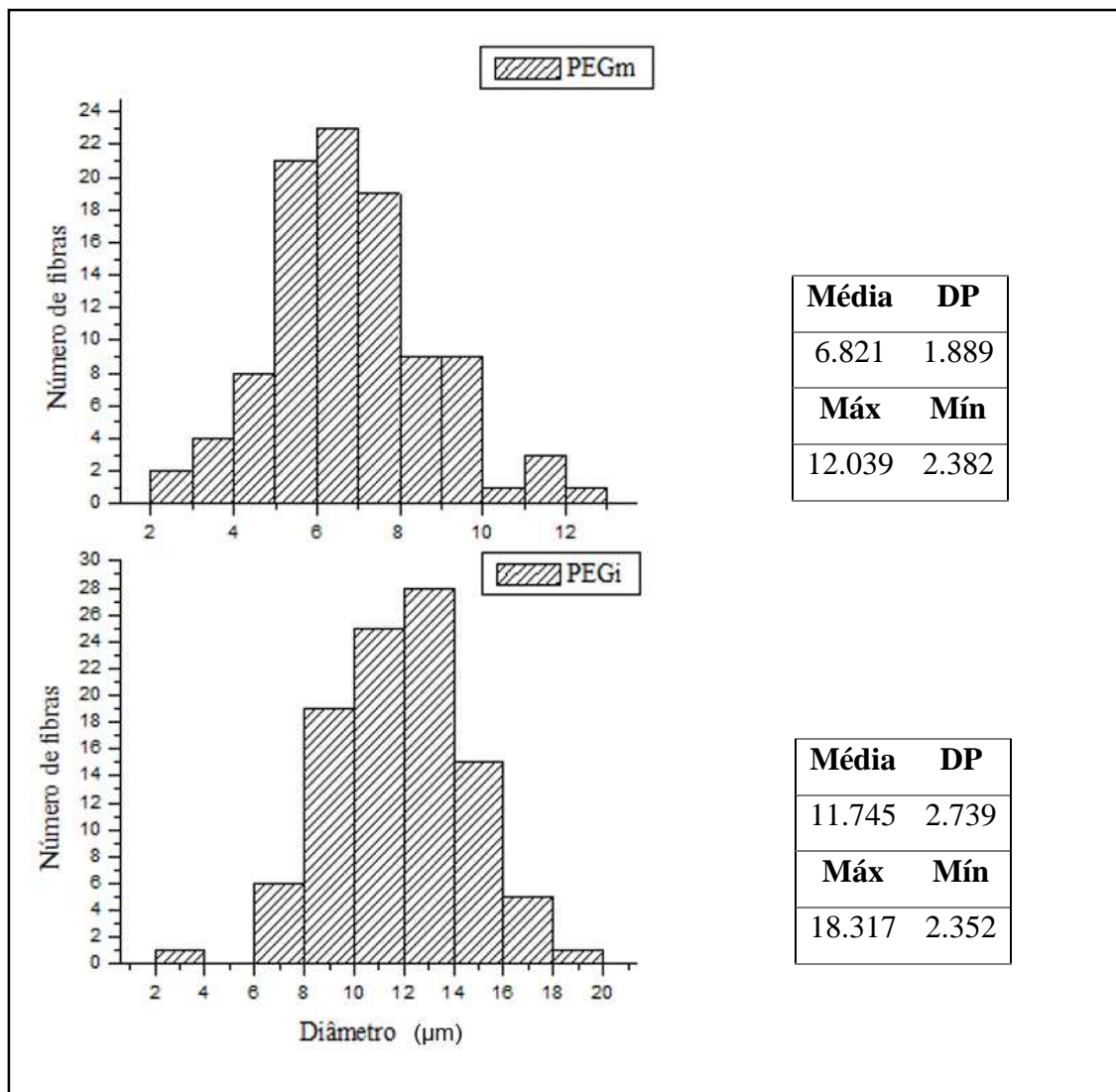


Figura 26. Histograma do diâmetro das fibras (n=100) das formulações de PEG em ambas metodologias.

As fibras de celulose da formulação PEGm apresentaram médias menores de diâmetro em comparativo com as fibras da formulação PEGi. Portanto, o maior preenchimento do suporte foi observado pela formulação com método de incorporação mergulhado, enquanto o aumento do diâmetro das fibras, pelo método impregnado. Aplicando o Teste estatístico One-wayAnova os valores foram significativamente diferentes. A Figura 27 retrata as micrografias das formulações com PLGA.

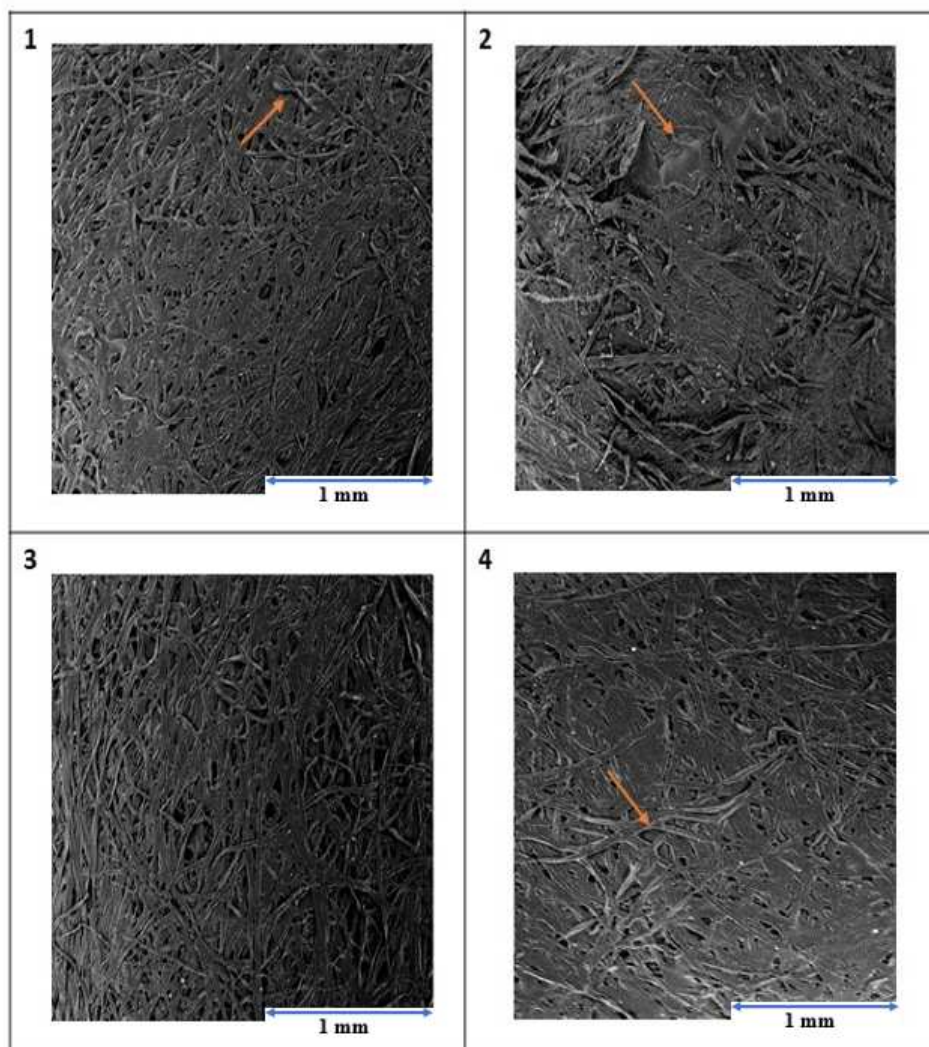


Figura 27. Micrografias da formulação contendo PLGA nas diferentes metodologias. (1) PLGAm placebo; (2) PLGAi placebo; (3) Formulação PEGm; (4) Formulação PEGi. Eletróns secundários (SE). Aumento de 300x.

As micrografias 1 e 2 da Figura 27 representam o placebo mergulhado e impregnado e a 3 e 4 as formulações mergulhado e impregnado, respectivamente. Foi observado uma aglomeração do material indicado pelas setas em vermelho, caracterizando prejuízo na solubilização da mistura polimérica PLGA tanto na amostra placebo, quanto na formulação em ambas metodologias de incorporação. Esta característica pode ocorrer pela imiscibilidade do polímero no solvente orgânico diclorometano, resultando em um acúmulo de polímeros na superfície das amostras.

A formulação PLGAm apresentou maior preenchimento da área total da formulação em comparativo com a formulação PLGAi, sendo de 76,24% e 75,84%, respectivamente. A Figura 28 compara os resultados obtidos do diâmetro das fibras das formulações PLGA para as duas metodologias de incorporação.

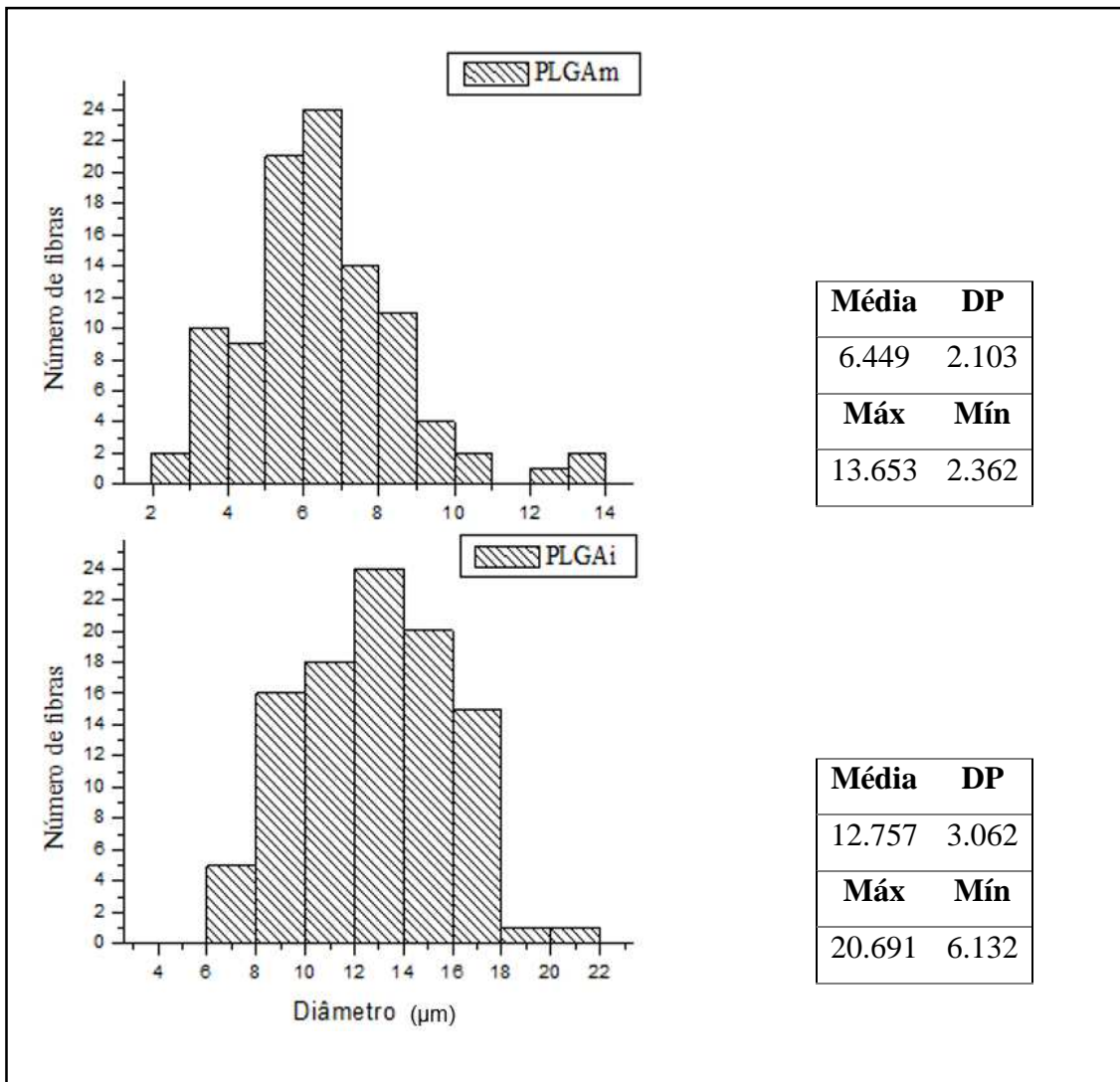


Figura 28. Histograma do diâmetro das fibras das formulações de PLGA em ambas metodologias.

As fibras de celulose da formulação PLGA_i possuem, aproximadamente, o dobro de diâmetro do que PLGA_m, e aplicando o Teste estatístico One Way Anova, estas médias foram significativamente diferentes entre si.

A Figura 29 retrata as micrografias da formulação com polímero PCL.

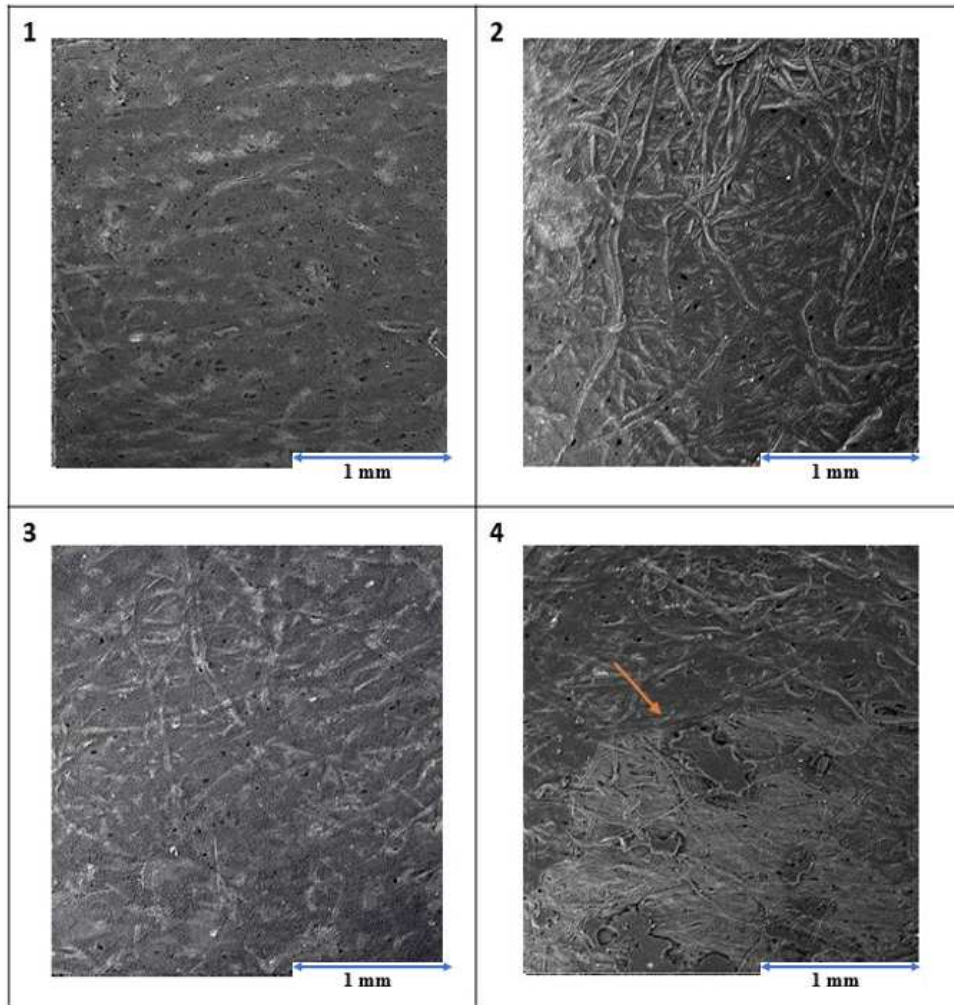


Figura 29. Micrografias da formulação contendo PCL nas diferentes metodologias. (1) PCLm placebo; (2) PCLi placebo; (3) Formulação PCLm; (4) Formulação PCLi. Eletróns secundários (SE). Aumento de 300x.

O polímero PCL em todas as amostras apresentou a mesma característica, um preenchimento quase total do suporte celulósico, sendo de 94,85% na metodologia mergulhada e 96,02% na impregnada. Na amostra 4 é possível observar uma aglomeração de material na superfície da formulação, caracterizando dano na solubilização da mistura polimérica no preparo de amostras. Esta interferência é causada pelo chamado efeito residual do solvente, quando em preparações poliméricas após a evaporação do solvente, no caso o diclorometano, ocorre um agrupamento do polímero na superfície da formulação (CALDERINI, 2011).

A Figura 30 compara os resultados dos métodos de incorporação e a influência do diâmetro das fibras das formulações de PCL.

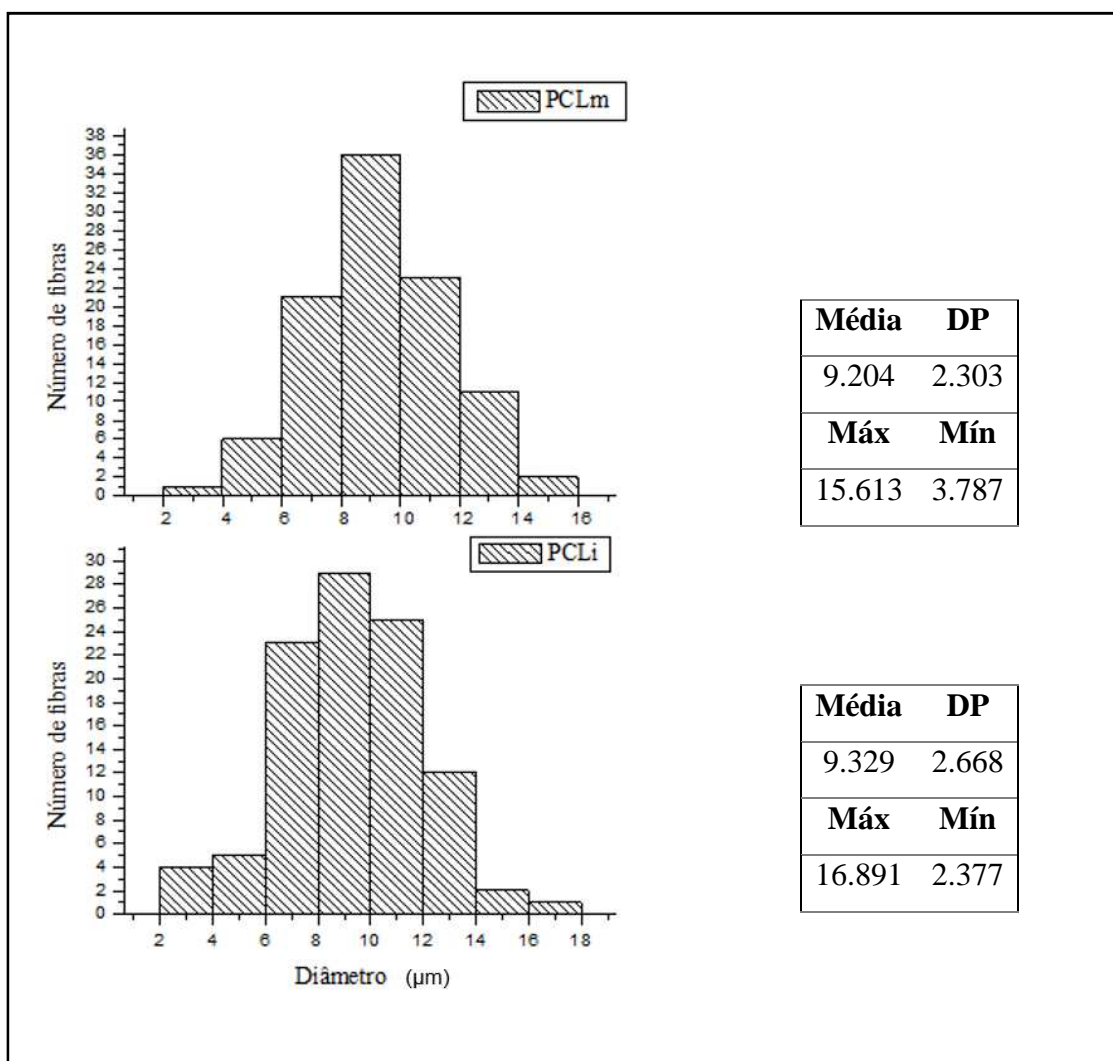


Figura 30. Histograma do diâmetro das fibras das formulações de PCL em ambas metodologias.

A metodologia de incorporação não influenciou no diâmetro das fibras e fração volumétrica das formulações contendo PCL, não houve diferença significativa.

Por meio desta análise, foi possível avaliar a uniformidade da superfície das formulações e o indicativo de compatibilidade entre os componentes da solução polimérica.

4.4.2.2 Análise das formulações pós-liberação

As análises morfológicas das formulações pós-liberação são descritas para ilustrar se houve alguma diferença significativa a superfície das formulações e no diâmetro das fibras quando comparadas com as formulações pré-liberação.

A Figura 31 retrata as micrografias das formulações pós-liberação do polímero PEG.

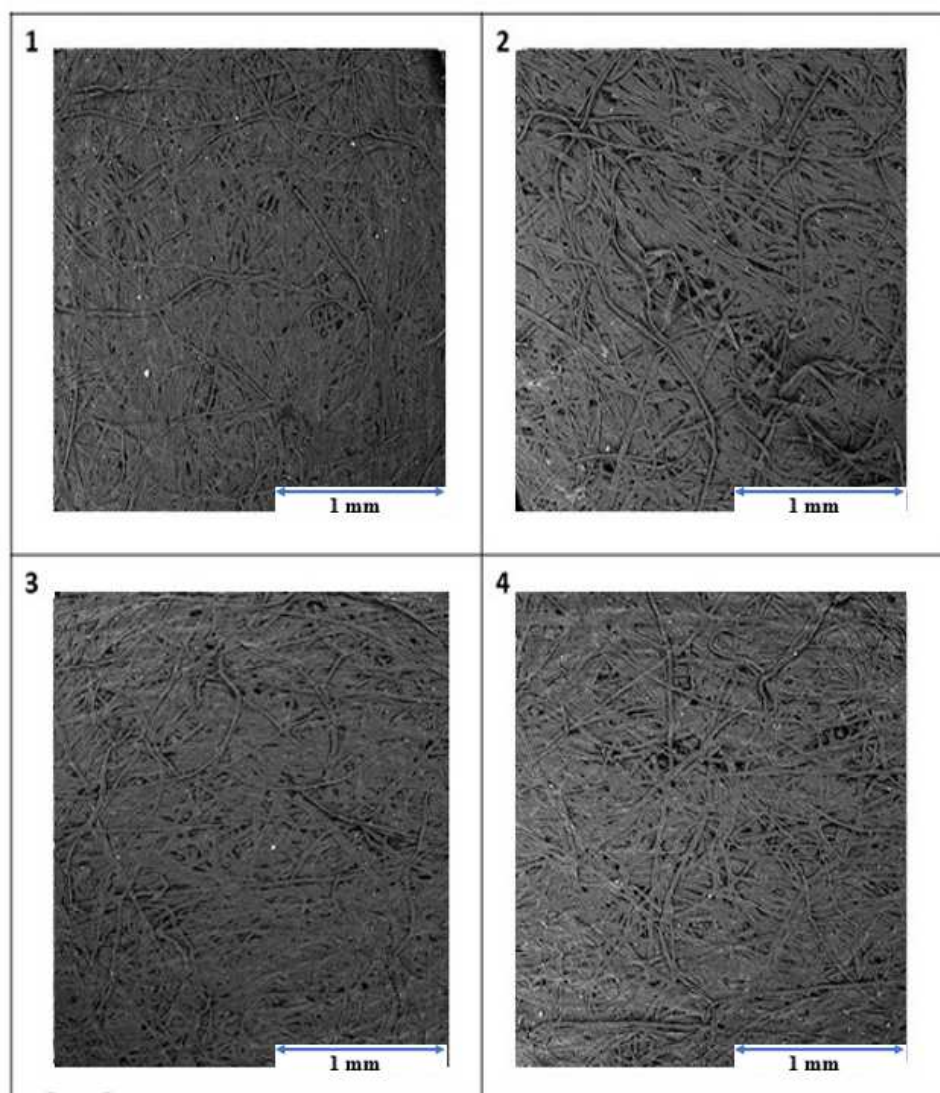


Figura 31. Micrografias da formulação pós-liberação contendo PEG nas diferentes metodologias. (1) PEGm placebo pós-liberação; (2) PEGi placebo pós-liberação; (3) Formulação pós-liberação PEGm; (4) Formulação pós-liberação. PEGi. Eletróns secundários (SE). Aumento de 300x.

Na Figura 31, as morfologias de acordo com as metodologias utilizadas não foram tão diferentes visualmente. As micrografias 1 e 2 representam os placebos mergulhado e impregnado após o processo de liberação *in vitro*, respectivamente e, em comparativo com as formulações pós liberação abaixo mostradas, pode-se afirmar que as amostras não se diferenciaram expressivamente e não houve deposição de material na superfície. A formulação pós-lib PEGm (3) apresentou visualmente o preenchimento entre as fibras de celulose de 19,19%, em comparativo com a formulação PEGi (4) que apresentou área de 20,87%. Não houve diferença significativa entre as metodologias e ambas possuem área de preenchimento inferior as formulações pré-liberação do polímero PEG. Portanto, o contato com o meio aquoso interferiu no processo de difusão do fármaco no ensaio de liberação.

A Figura 32 elucidada o diâmetro das fibras em ambas metodologias das formulações pós liberação, com as respectivas médias e desvio padrão.

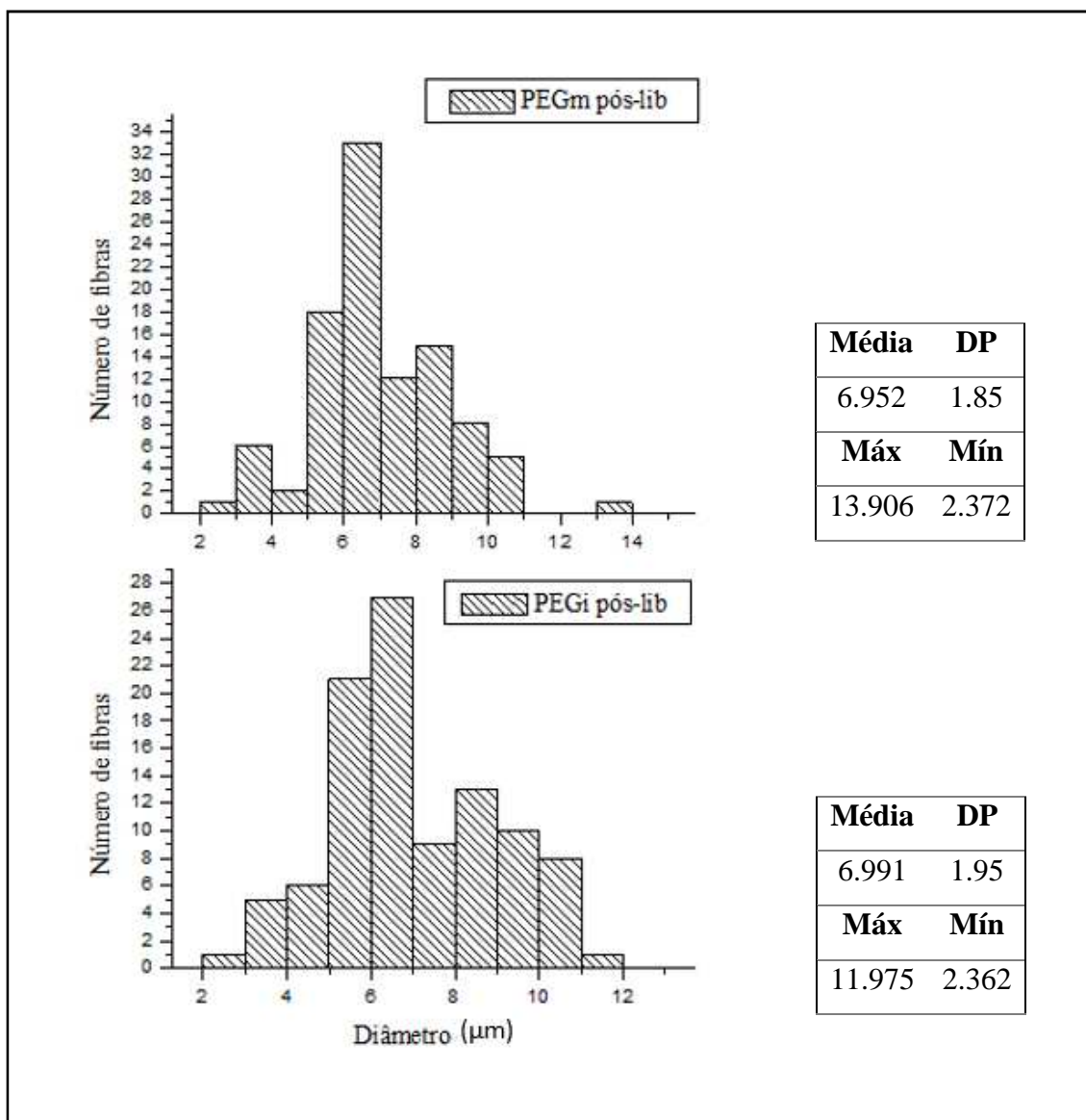


Figura 32. Histograma do diâmetro das fibras das formulações pós-liberação de PEG em ambas metodologias.

O diâmetro das fibras após a liberação diminuiu em relação as formulações pré-liberação do polímero PEG, porém não houve diferença significativa entre as duas metodologias, ambas obtiveram as mesmas características, tanto em relação as frações volumétricas quanto ao diâmetro das fibras. A Figura 33 retrata as micrografias das formulações pós-liberação do polímero PLGA.

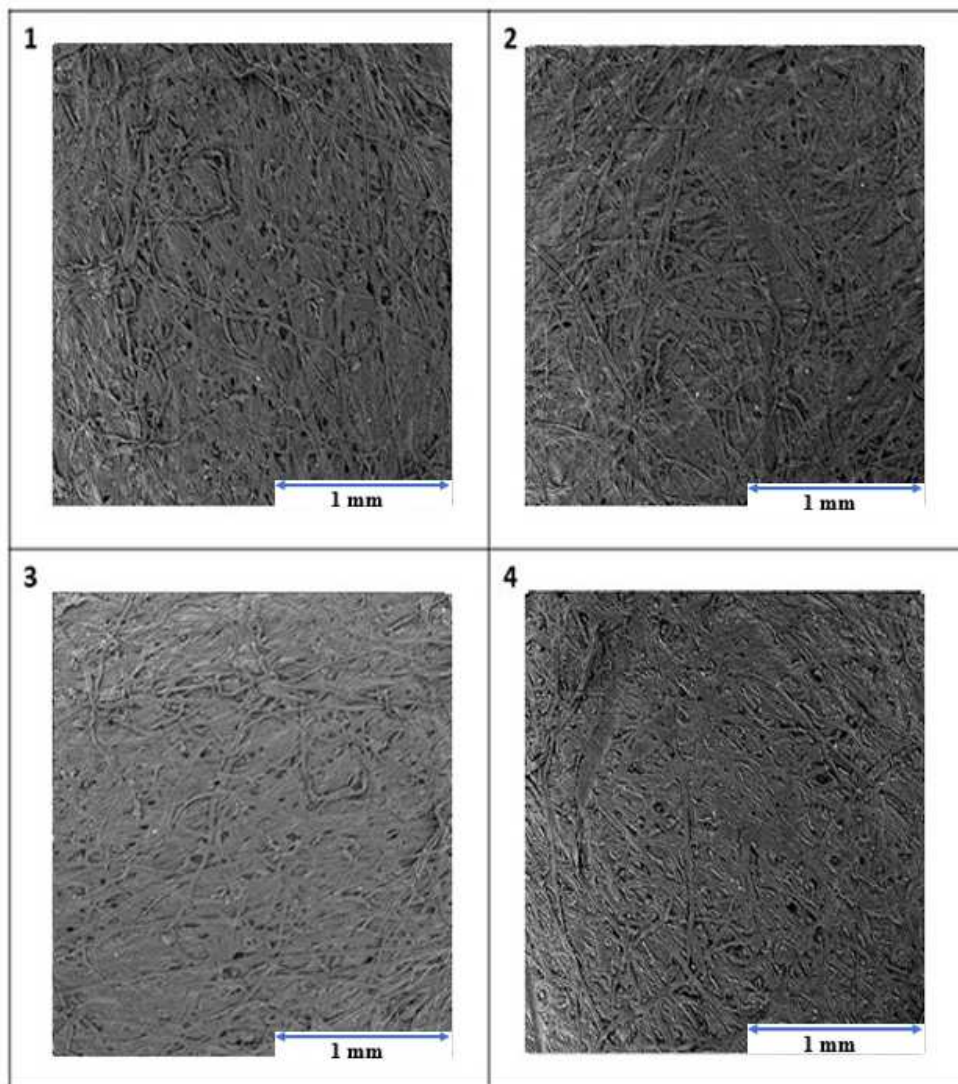


Figura 33. Micrografias da formulação pós-liberação contendo PLGA nas diferentes metodologias. (1) PLGAm placebo pós-liberação.; (2) PLGAi placebo pós-liberação.; (3) Formulação pós-liberação. PLGAm; (4) Formulação pós-liberação. PLGAi. Eletróns secundários (SE). Aumento de 300x.

Na Figura 33 observa-se que as formulações pós liberação permanecem visualmente preenchidas, pela análise de superfície, embora não seja observado nenhuma aglomeração polimérica residual. A análise do preenchimento da área do suporte apresentou resultados de 32,65% e 28,42% para as formulações PLGAm pós-liberação e PLGAi pós-liberação, respectivamente. Apresentaram valores menores em comparativo às análises pré-liberação. A Figura 34 ilustra o histograma referente ao diâmetro das fibras das formulações de PLGA pós-liberação.

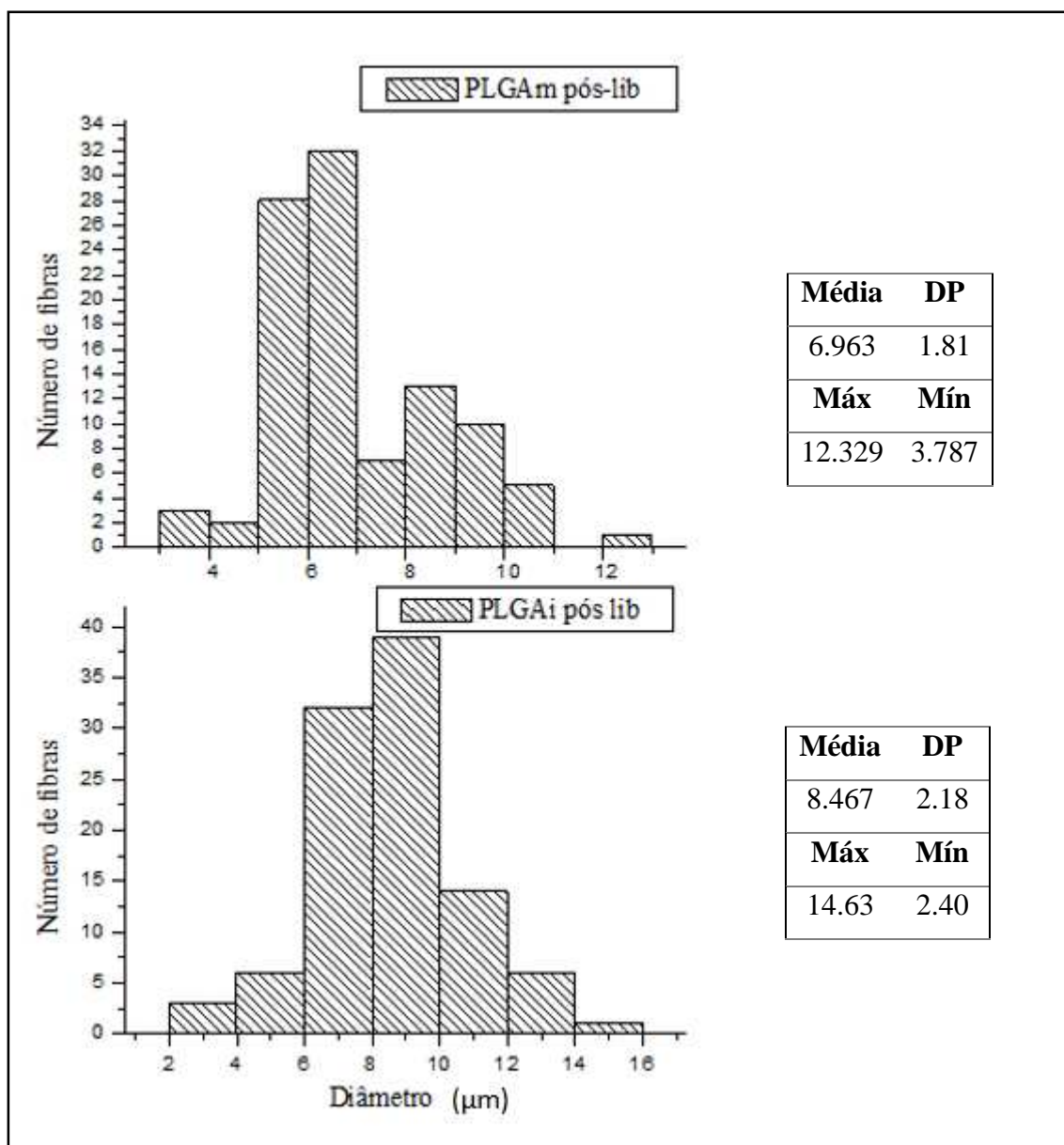


Figura 34. Histograma do diâmetro das fibras das formulações pós-liberação de PLGA em ambas metodologias.

Para o resultado da análise do diâmetro para as formulações PLGA m pré e pós-liberação não houve diferença significativa. Porém, as formulações de PLGA i pós-liberação reduziram o diâmetro das fibras em comparativo com as formulações pré-liberação.

A Figura 35 retrata as micrografias das formulações pós-liberação do polímero PCL.

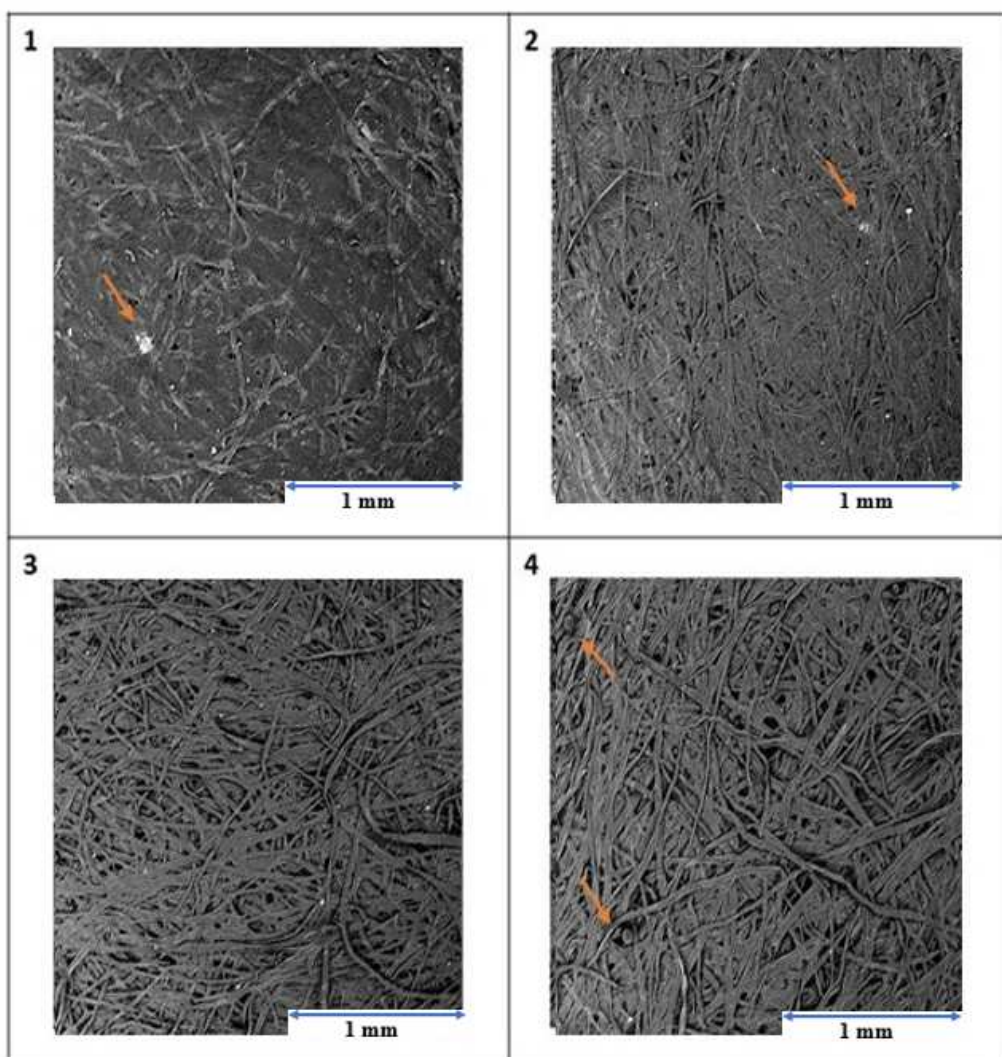


Figura 35. Micrografias da formulação pós-liberação contendo PCL nas diferentes metodologias. (1) PCLm placebo pós-liberação.; (2) PCLi placebo pós-liberação.; (3) Formulação pós-liberação. PCLm; (4) Formulação pós-liberação. PCLi. Eletróns secundários (SE). Aumento de 300x.

Na Figura 35, referente ao polímero PCL pós-liberação, foi possível identificar na superfície das formulações aglomerados esbranquiçados nas micrografias 1 e 2. Na micrografia 4 a superfície da formulação apresenta partículas esféricas sinalizadas pelas setas. Pela análise das frações volumétricas, a formulação PCLm pós-lib. obteve 27,25% de preenchimento total, enquanto o PCLi pós-liberação uma área equivalente a 33,42%. Ambos valores são menores que as formulações pré-liberação.

O histograma com o diâmetro das fibras está representado nas Figura 36.

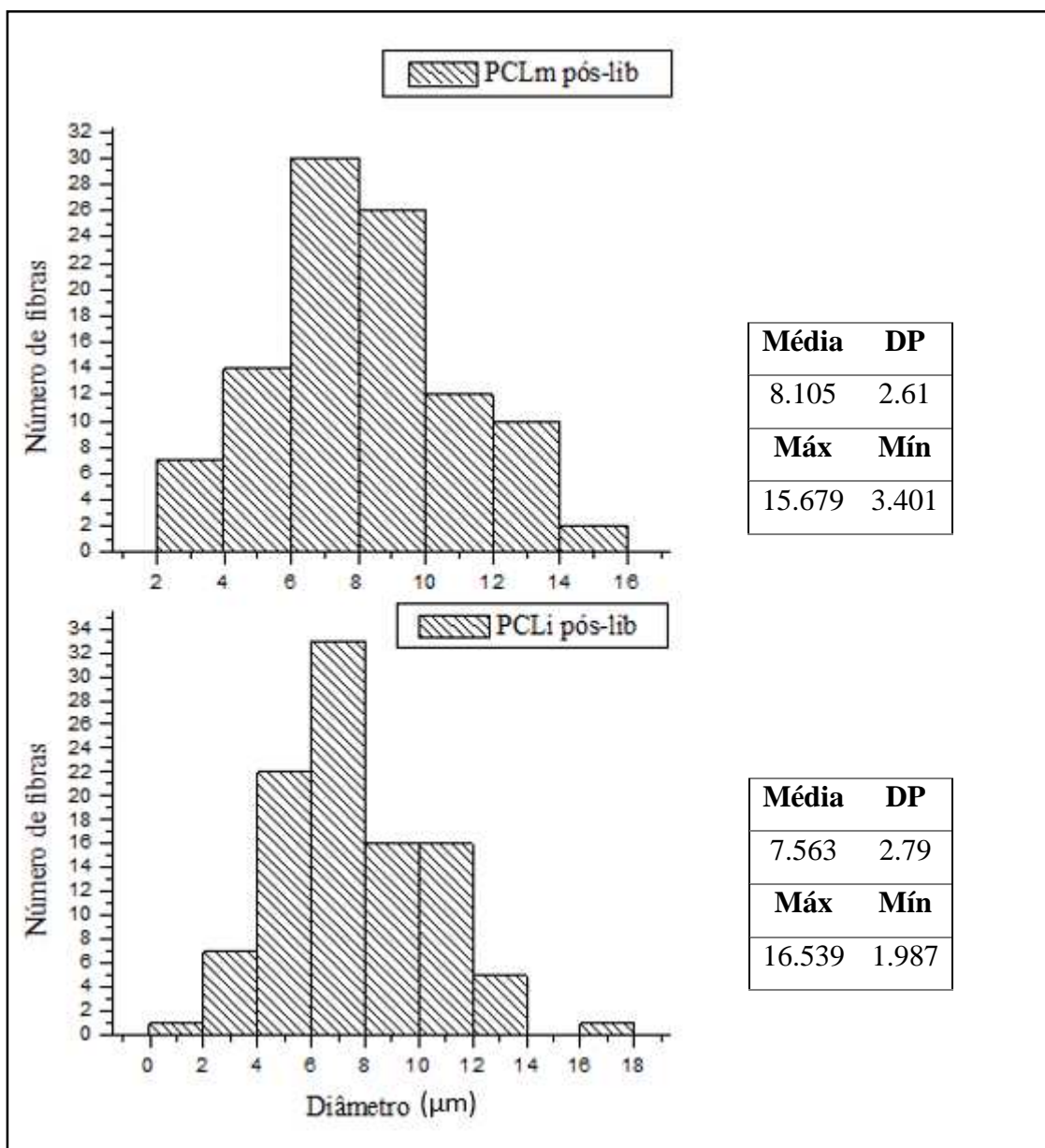


Figura 36. Histograma do diâmetro das fibras das formulações pós-liberação de PCL em ambas metodologias.

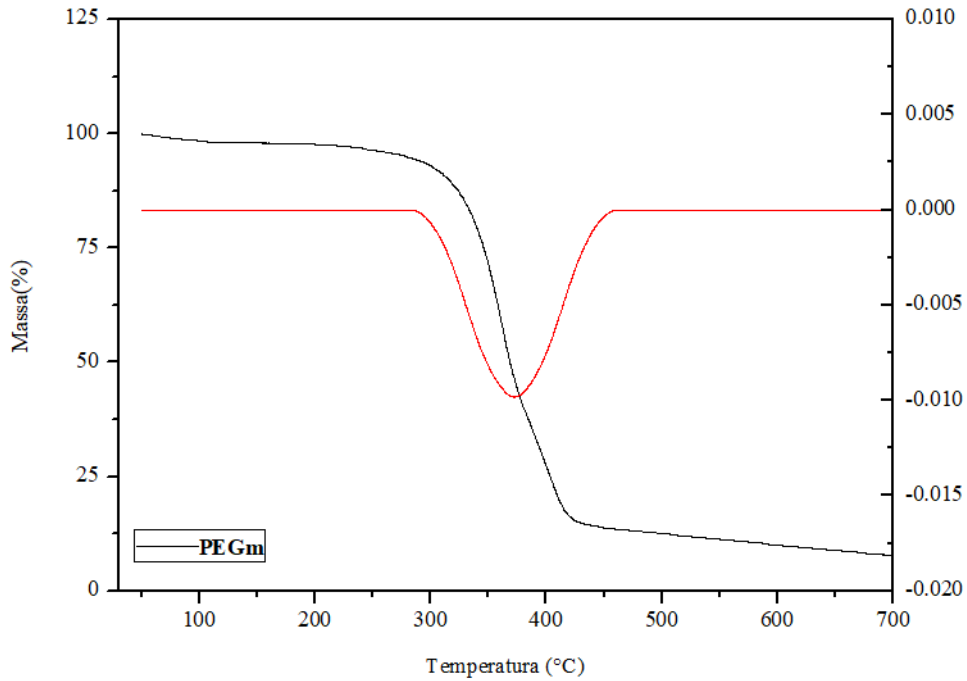
Não houve diminuição do diâmetro das fibras das formulações pré-liberação em comparativo à pós liberação do polímero PCL. De forma geral, com a análise da morfologia das formulações pré e pós liberação pode-se dizer que o contato com o meio aquoso durante o ensaio de dissolução *in vitro* interferiu no processo de difusão do fármaco, reduzindo em todas as formulações pós-liberação a área de fração volumétrica da superfície.

4.4.3 Análise Térmica: Termogravimetria (TGA)

Esta análise foi utilizada para verificar a estabilidade térmica das formulações pré-liberação. As curvas referentes aos resultados das análises TG/DTG encontram-se nas Figuras 37 a 39. A degradação das formulações de PEG e PCL ocorrem em somente uma etapa, como mostrado nas curvas de TG, com início de degradação diferente para cada amostra.

A estabilidade térmica pode ser resultado da interação entre as cadeias poliméricas. O que indica maior número de interações intermoleculares via ligações de hidrogênio que o polímero realiza em suas amostras, aumentando a estabilidade térmica da formulação. As Figuras 37, 38 e 39, refletem a TG dos polímeros PEGm, PEGi, PLGAm, PLGAi, PCLm e PCLi, respectivamente.

(A)



(B)

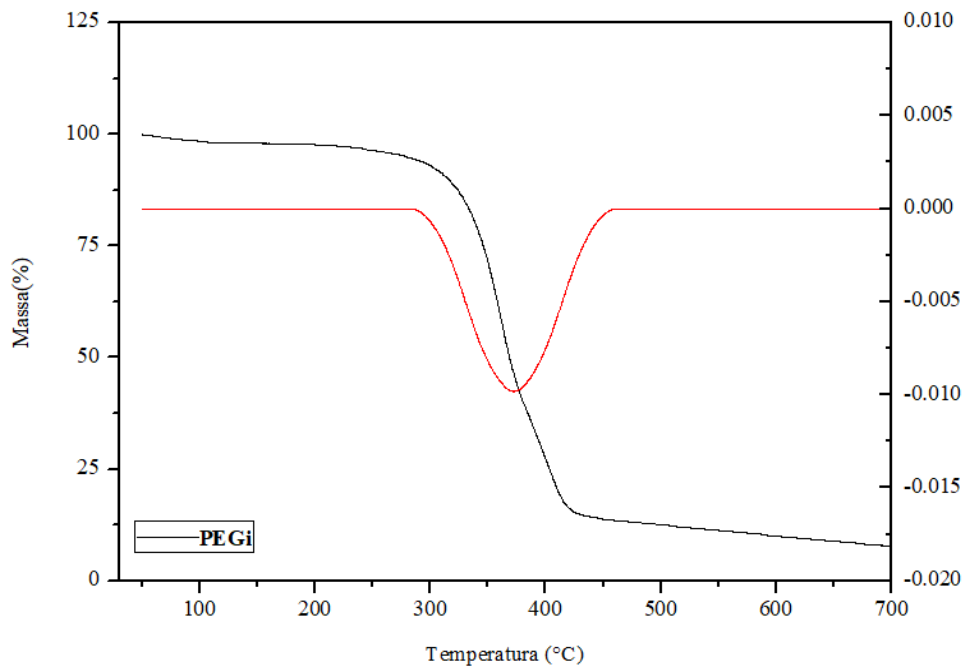
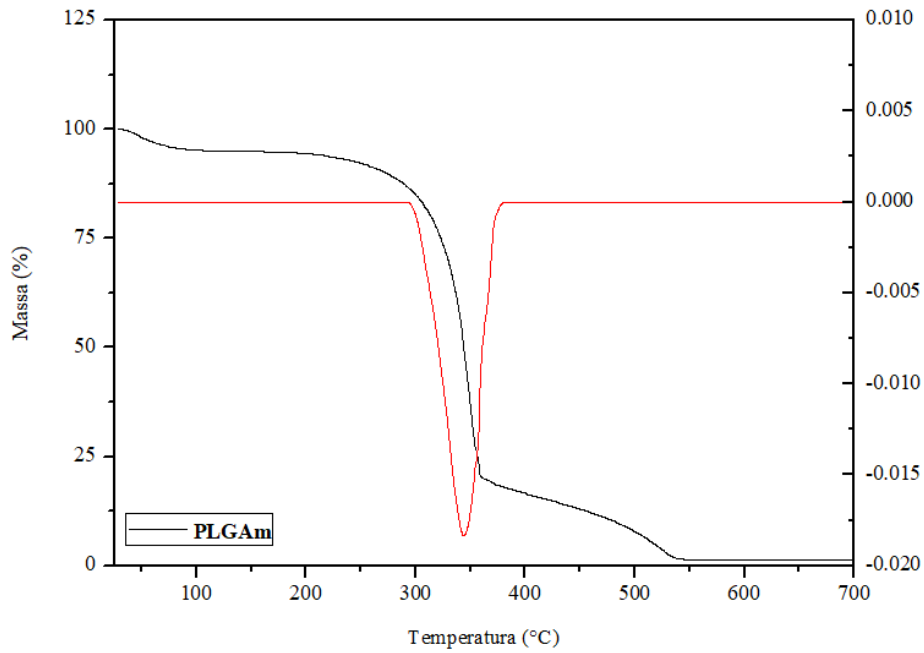


Figura 37. Curva TG (—)/DTG (—) da formulação pré-liberação PEGm (A) e PEGi (B).

Através das análises termogravimétricas, é possível prever a temperatura de degradação de cada formulação. Nota-se que o desenvolvimento da formulação é realizado pela presença de um suporte celulósico, do polímero em questão, e de solventes orgânicos onde espera-se que este tenha sido evaporado nas temperaturas iniciais do ensaio. Na curva de TG do polímero PEG, nas duas formas de incorporação (mergulhada e impregnada) não houve diferença na temperatura de degradação observada pela curva de DTG, ambas, obtiveram a mesma temperatura (378,6°C). O erro aceitável é de até 2°C considerando o erro do instrumento. Os dados de análise térmica por TG do polímero PLGA estão ilustrados na Figura 38.

(A)



(B)

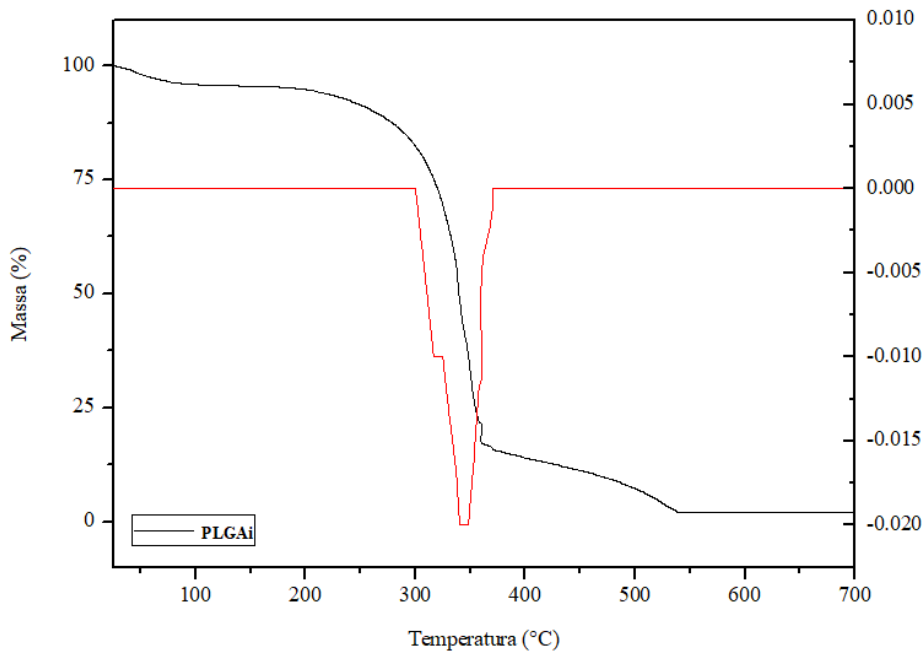
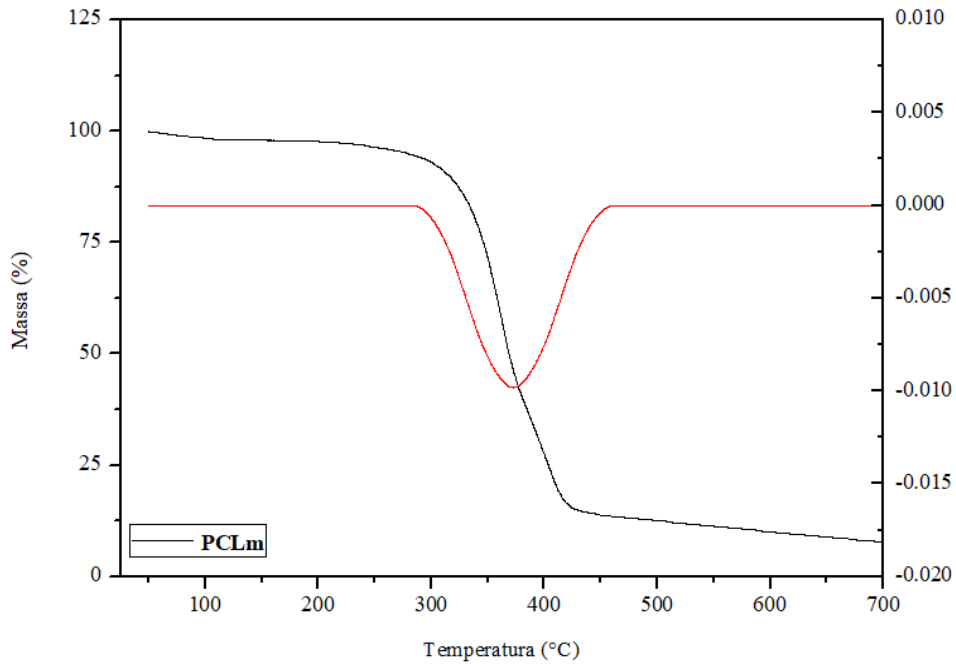


Figura 38. Curva TG (—)/DTG (—) da formulação pré-liberação PLGAm (A) PLGAi (B).

As análises de TG/DTG do polímero PLGA e ambas metodologias apresentaram diferença nas temperaturas de degradação, e isto pode ser observado pela curva de DTG. No método mergulhado a temperatura de degradação foi de 342,5°C e no impregnado de 321,2°C e 348,6°C de acordo com os dois picos de degradação.

A Figura 39 é referente as curvas do polímero PCL mergulhado e impregnado.

(A)



(B)

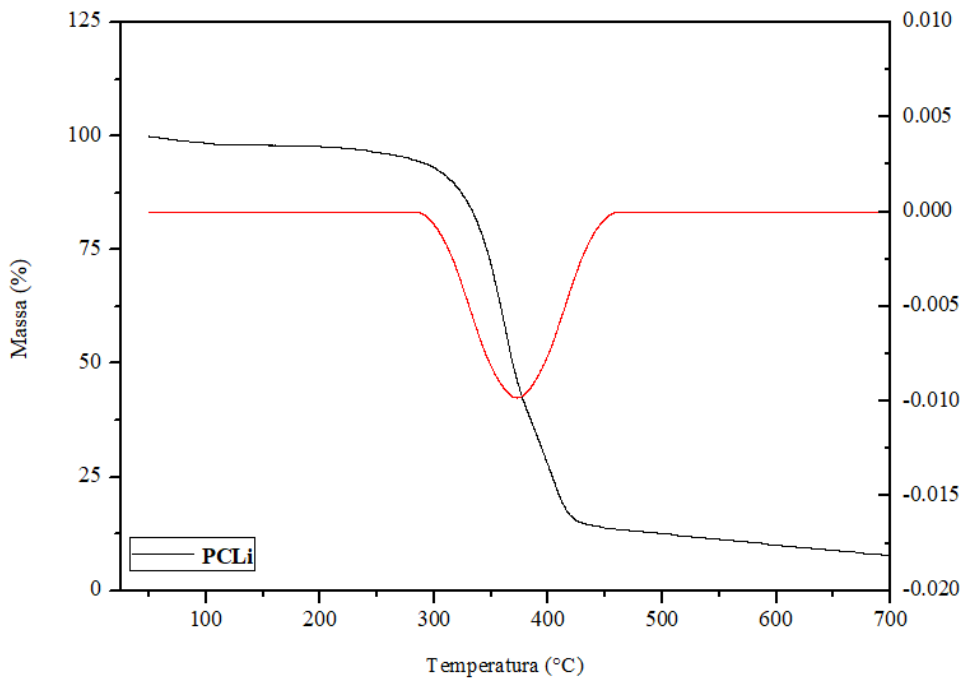


Figura 39. Curva TG (—)/DTG (—) da formulação pré-liberação PCLm (A) e PCLi (B).

Comparando as formulações, nota-se que os valores de temperatura de degradação assim como a análise do gráfico, apresentaram as mesmas características. A temperatura

de degradação na formulação PCLm é de 376,2° e PCLi de 372,7°C, não resultando em uma análise discriminatória das metodologias utilizadas.

De forma geral, os gráficos das formulações de PEG e PCL apresentaram o mesmo perfil e temperaturas próximas, embora o polímero usado e os valores de *tg* presente na literatura se difiram entre estes polímeros. Portanto, vale ressaltar que o resultado plotado tenha referência ao suporte celulósico em si e não aos polímeros, uma vez que, este encontra-se em uma proporção (1:20) bem inferior à do suporte.

5 CONCLUSÃO

- O teor das formulações foi alterado pela metodologia de incorporação, sendo o impregnado a melhor faixa dentro do aceitável para formulações sólidas via oral (90-110%) estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira.
- A diferença de massa impregnada em ambas metodologias não se diferiu significativamente nas formulações nos respectivos grupos de polímeros, PEG, PLGA e PCL.
- A solubilidade do Piroxicam é aumentada na presença do tensoativo e dependente do pH, apresentando maior estabilidade em pH básico.
- O estudo da cinética de liberação, mostrou um perfil de pseudo-primeira ordem, caracterizando um perfil de liberação controlado, em ambas as formulações de PEG, PLGA e PCL.
- O Fluxo (J) e a Eficiência de Dissolução (%ED) não se diferenciou significativamente entre os métodos de incorporação.
- A análise espectral das formulações elucidou as estruturas presentes, embora tenha sido interferido por concentrações baixas do fármaco piroxicam.
- A análise morfológica permitiu analisar a miscibilidade e compatibilidade da formulação com o solvente orgânico diclorometano, assim como, inferir nas diferenças de diâmetro e fração volumétrica das formulações pré e pós liberação.
- A formulação pré-liberação de PCL contendo piroxicam foi a que obteve maior valor de fração volumétrica em ambas as metodologias de incorporação, sendo de 94,85% mergulhada e 96,02%.
- A análise térmica TGA acoplada a curva de derivação, mostra a primeira temperatura de degradação de cada polímero em função da perda de massa (%). E nota-se que devido as temperaturas próximas esta pode ser característica do suporte celulósico.
- O método de obtenção das formulações é simples, reprodutível, passível de escalonamento, aplicável à indústria, seletivo para ruminantes. É seguro e gera como produto de degradação monômeros biodegradáveis e celulose

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Relatório Anual da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC) - Perfil da Pecuária no Brasil. Disponível em: <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf> >. Acesso em: 20 nov2018.

AKAY, M., Introduction to Polymer Science and technolog. Mustafa Akay & Ventus Publishing ApS. Disponível em <http://197.14.51.10:81/pmb/CHIMIE/introduction-to-polymer-science-adn-technology.pdf>. Acesso em: 19 jan, 2019.

ALBUQUERQUE, M. F. P. M. et al. Pyriproxyfen and the microcephaly epidemic in Brazil - an ecological approach to explore the hypothesis of their association. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. December, p. 774–776, 2016.

ANSEL HC, POPOVICH NG, ALLEN-JR LV. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007. P. 775.

APLEY, M.; CRIST, M.A.G.; GONZALEZ, ROBERT, P.H.; MARLIN, N.M.; SANJA, M.; MARK, G.P.; ALAN, F.P.; JIM, E. R.; MARGARETH. R. C. M. Solubility Criteria for Veterinary Drugs. **Stimuli to the reversion process**. 2013.

BALLISTRERI, A.; BARBUZZI, T.; GIUFFRIDA, M. & IMPALLOMENI, G. - “Maldi-Tof and ESI mass spectrometry of biodegradable copolymers obtained by exchange reactions”, in: XVI Convegno Italiano di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Pisa-Itália (2003).

BANAKAR, U. V. *Pharmaceutical Dissolution Testing*. DEKKER, M., ed., New York: Marcel Dekker, 1992. p.55-100.

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

BELLES, Xavier. Origin and Evolution of Insect Metamorphosis. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi:10.1002/9780470015902.a0022854. Consultado em 24 de dezembro de 2018.

BIANCHIN, I. *et al*. Mosca do chifre e ganho de peso em Nelore. p. 885–890, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010^a

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº. 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U.** Agosto 2010.

BRITO, L. G. et al. Mosca-dos-chifres: aspectos bio-ecológicos, importância econômica, interações parasito-hospedeiro e controle. Comunicado Técnico 302 EMBRAPA, 2005.

BULL, D. L.; MEOLA, R. W. Effect and Fate of the Insect Growth-Regulator Pyriproxyfen After Application to the Horn Fly (Diptera, Muscidae). *Journal of economic entomology*, v. 86, n. 6, p. 1754–1760, 1 dez. 1993

BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E.; CROSBY, B. L. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *Journal of animal science*, v. 70, n. 2, p. 597–602, 1992.

CATTLE. *JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY*, v. 72, n. 4, p. 516–518, 1979.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.*, London, v.23, p. 1273-1335, 1998.

CHIELLINI, E et al. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science*, v 28, p 963-1014, 2003.

COLLETT, John; MORETIN, Chris. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, Michael E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 298-313.

COOMBES, A. G. A.; RIZZI, S. C.; WILLIAMSON, M.; BARRALET, J. E.; DOWNES, S. & WALLACE, W. A. - *Biomaterials*, 25, p.315 (2004).

CUNHA, V. R. R.; FERREIRA, A. M. da C.; CONSTANTINO, V. R. L.; TRONTO, J.; VALIM, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. *Quím. Nova*, vol.33, no.1, São Paulo, 2010.

DIAS-FILHO, M.B. *Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação*. 3.ed. Belém:Embrapa Amazônia Oriental, 2007.

EMBRAPA. Indicadores Leite e derivados. **Indicadores Leite e derivados**, v. 9, n. 81, p. 19, 2018.

FALCARE, R. S.; HENRIQUE, J. S. Sistemas de liberação controlada. *Pharmacia Brasileira*, São Paulo, v. 56, p. 22, 2006. Disponível em: Acesso em: 07 set. 2018.

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

FDA, Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations, 2002.

FDA. Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville: Food and Drug Administration, 1997b. p. 17.

FDA. Guidance for industry. Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations. Rockville: Food and Drug Administration, 1997a. p. 1-24

FIALHO, S.L.; REGO, M.G.B.; CARDILLO, J.A. *et al.* Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. *Arq. Bras. Oftalmol.*, v.66, p.891-896, 2003.

- FILHO, K. E. Gado de Corte Divulga. v. 36, p. 13, 2000.
- FLORENCE, A.T., ATWOOD, D. Polímeros e Macromoléculas, In: Princípios físico-químicos em farmácia. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, p 377-452, 2011.
- FRANCISCA, M. Haematobia Irritans : Revisão Literária. p. 12–15, 2009.
- GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol., v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.
- HANDBOOK of pharmaceutical excipients. Washington: American Pharmaceutical Association; London: Pharmaceutical Society of Great Britain, 1994.
- HARRIS, R. L.; CHAMBERLAIN, W. F.; FRAZAR, E. D. Horn flies and stable flies: freechoice feeding of methoprene mineral blocks to cattle for control. Journal of economic entomology, v. 67, n. 3, p. 384–6, 1974.
- HARVEY, T. L.; BRETHOUR, J. R. Effect of Horn Flies on Weight Gains of Beef
- HENRIQUE, C. et al. Pesticidas e os seus respetivos. p. 53–58, 2003.
- HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, A. Programa de Controle de Mosca-dos-chifres. **Comunicado Técnico Embrapa**, p. 3, 1990.
- HUANG, M. H.; LI, S.; HUTMACHER, D. W.; SCHANTZ, J. T.; VACANTI, C. A.; BRAUD, C. & VERTt, M. J. Biomed. Mater. Res., v: 69A, p.417, 2004.
- IBGE. Abate de animais. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/abate/brasil>>. Acesso em: 11 nov. 2018.
- IBGE. Contas Nacionais - Indicadores de Volumes e Valores Correntes. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Contas_Nacionais/Contas_Nacionais_Trimestrais/Fasciculo_IndicadoresIBGE/pib-vol-val_201604caderno.pdf>. Acesso em: 21 dez 2018.
- IBGE. Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couroovos_201604caderno.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2019.
- JAIN, R.A., "The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) Devices", *Biomaterials*, v. 21, pp. 2475-2490, 2000.
- KATAGI, T., TAKAHASHI, N. Hydrolysis of S-31183 in Buffered Aqueous Solutions. Sumitomo Chemical Company, 1994.
- KHAN, K. A. Concept of dissolution efficiency. J. Pharm. Pharmacol., London, v. 27, p. 48-49, 1975.

KIMURA, H.; OGURA, Y.; MORITERA T. *et al.* Injectable microspheres with controlled drug release for glaucoma filtering surgery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v.33, p.3436-3441, 1992.

KOCISOVA, A. *et al.* The potential of some insect growth regulators in housefly (*Musca domestica*) control. *Biologia*, v. 59, n. 5, p. 661–668, 2004.

KUNZ, S. E. *et al.* Biological and Ecological Investigations of Horn Flies in Central Texas: Influence of Time of Manure Deposition on Oviposition. *Journal of Economic Entomology*, v. 63, n. 3, p. 930–933, 1970.

Li J. Synthesis of polyethyleneglycols (PEGs): derivatives and applications in biomaterials. *BME* 2001; 430. LI, S.M; CHEN, X.H; GROSS, R.A; McCARTHY, S.P., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v: 11, p: 227-233, 2000.

LI, S; VERT, M. Biodegradable polymers: polyesters. In *Encyclopaedia of Controlled Drug Delivery*. Edited by Mathowitz E. New York: John Wiley and Sons; 1999, v. 1, p. 71-93.

LIN, S. Y., YANG, J. C. In-vitro dissolution behavior of some sustained-release theophylline dosage forms. *Pharm. Acta Helv.*, Amsterdam, v. 64, n. 8, p. 236-240, 1989.

MACEDO, D. M.; BRITO, L. G.; BORJA, G. E. M. Emergência de *Haematobia irritans* em fezes bovinas no município de Seropédica, Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n. 2, p. 77–80, 2001.

MAGALHÃES, V. S. Fipronil Injetável para Bovinos: Farmacocinética e Eficácia no Controle de *Haematobia irritans* e *Dermatobia hominis*. 2016

MANO, J., SOUSA, R., BOESEL, L., NEVES N., "Bioinert, Biodegradable and Injectable Polymeric Matrix Composites for Hard Replacement: State of the Art and Recent Developments", *Composites Science and Technology*, v. 64, pp. 789–817, 2004.

MARANHO, D. Estudo comparativo “in vitro” de formas farmacêuticas sólidas de liberação controlada contendo diclofenaco sódico. 2000. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MEDEIROS DE BARROS, A. T. Desenvolvimento de *Haematobia irritans* em massas fecais de bovinos mantidas em laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 217–221, 2002.

MELLO, I. N. K.; DA SILVEIRA, W. F. Resíduos de agrotóxicos em produtos de origem animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 94–104, 2012.

MEOLA, R. W.; PULLEN, S.; MEOLA, S. M. Toxicity and histopathology of the growth regulator Pyriproxyfen to adults and eggs of the cat flea (*Siphonaptera: Pulicidae*). *Journal of medical entomology*, v. 33, n. 4, p. 670–679, 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. Bem-Estar Animal E Sistemas De Produção De Gado De Corte. v. 7.9, 2014.

OJOE, E. Desenvolvimento e avaliação “*in vitro*” de comprimidos de liberação controlada de teofilina. 2003. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

OLIVEIRA RB, LIMA EM. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. Revista Eletrônica de Farmácia. 2006; 3(1):29-35.

OLIVEIRA, G. F. D. E.; SCOTT, F. B. . AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PIRIPROXIFEN ADMINISTRADO POR VIA ORAL NO CONTROLE DAS FORMAS IMATURAS DE *Haematobia irritans* EM FEZES DE BOVINOS . Tese. 97p 2017.

OURO FINO SAÚDE ANIMAL. **Ficha Técnica Brinco Mosquicida NA MOSCA.**

PANDEY, A. Formulation, Optimization, , characterization and in vitro drug release kinetics of atenolol loaded PLGA nanoparticles using 3 3 factorial design for oral delivery. Materials Discovery, v.5 , p 1-13,2016.

PARANHOS DA COSTA, M. J. R. Ambiência na produção de bovinos de corte a pasto. **Anais de Etologia**, v. 18, p. 26–42, 2000.

PRIETSCH, R. DA F. et al. Formas farmacêuticas de liberação modificada utilizadas em ruminantes: uma revisão. **Science and Animal Health**, v. 2, n. 1, p. 3–26, 2014.

RIBEIRO MZ. Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) Universidade de São Paulo 2001; 138 p.

RIDDIFORD, L. M. Juvenile hormone action: A 2007 perspective. Journal of Insect Physiology, v. 54, n. 6, p. 895–901, 2008.

RIOS, M. Polymers for Controlled Release: Formulation Follows Function. Pharm. Technol., New York, v. 29, n. 6, p. 42-50, 2005

ROSA, D. S.; PANTANO, R. F. Biodegradação: Um Ensaio com Polímeros. Itatiba: Editora Moara, 2003. 112 p.

ROTHEN-WEINHOLD, A.; GURNY, R.; DAHN, M. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. Pharmaceutical Science & Technology Today, v. 3, n. 7, p. 222-231, 2000.

RUSU, M., URSU, M. and RUSU, D.; J. Thermoplastic Composite Materials, v: 19, p: 173, 2006.

S. V. CANEVAROLO JR. Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. Artliber, 1th edition, 2002.

SENG, C. M. et al. Six months of *Aedes aegypti* control with a novel controlled-release formulation of pyriproxyfen in domestic water storage containers in Cambodia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 39, n. 5, p. 822–826, 2008.

SILVA, A. M. et al. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1477–1482, 2010.

SINDAN. Mercado veterinário por classe terapêutica. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

SINDAN. Mercado veterinário por classe terapêutica. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em: 21 jan 2019

SOPPIMATH, K.S.; Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Controlled release*, v 70, p 1-20, 2001.

STAAL, G. B. Insect Growth Regulators with Juvenile Hormone Activity. *Annual Review of Entomology*, v. 20, n. 21, p. 417–460, 1975.

SULLIVAN, J. J.; GOH, K. S. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. *Journal of Pesticide Science*, v. 33, n. 4, p. 339–350, 2008.

TAYLOR, M. A. Recent Developments in Ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*, v. 161, n. 3, p. 253–268, 2001

UNITED STATES PHARMACOPEIA USP 30 – NF 25. Rockville: The United States Pharmacopeial Convection, 2000

VALÉRIO, J. R.; GUIMARÃES, J. H. Sobre a ocorrência de uma nova praga, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera, Muscidae), no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 1, n. 4, p. 417– 418, 1983.

VEIGA, F. J. B. Medicamentos orais de liberação controlada: comprimidos matriciais hidrófilos. *Bol. Fac. Farm. Coimbra, Coimbra*, v. 12, n. 2, p. 17-87, 1988.

VILLANOVA, J. C. O., ORÉFICE, R. L., & CUNHA, A. S. (2010). Pharmaceutical applications of polymers. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 20(1), 51-64. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000009>. 18.

WHO. Pyriproxyfen in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. p. 5, 2008.

WHO. WHO specifications and evaluations for public health pesticides pyriproxyfen. p. 1–19, 2006.

WILLIAMS, C. M. Third-Generation Pesticides. *Scientific American*, v. 217, p. 13–17, 1967

YANG, A., YANG, L., LIU, W., LI, Z., XU, H., & YANG, X. (2007). Tumor necrosis factor alpha blocking peptide loaded PEGPLGA nanoparticles: Preparation and in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(1), 123-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.015>. PMID:17097246.

ZHU, Y. Properties of polymeric drug delivery systems prepared by hot-melt extrusion. 2002. Tese (Doutorado)Faculty of the Graduate School of the University of Texas, Austin, 2002.

7 ANEXOS

Anexo A: Procedimento para utilização do Image J

Após abrir o Image J, tem-se a janela do programa conforme Figura 1.

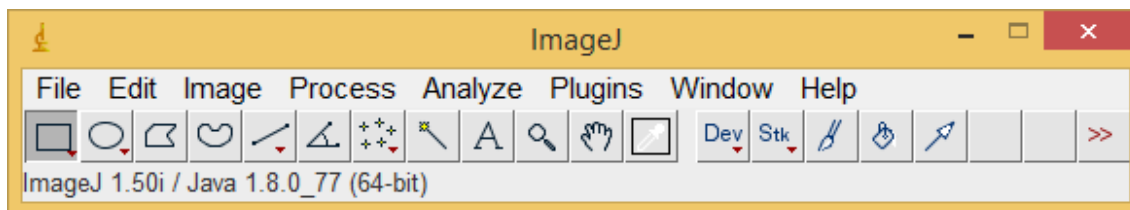


Figura 1 – Tela inicial do Image J.

Para abrir uma imagem clique em “File” e em seguida em “Open”. Selecione a imagem desejada na caixa de diálogo e clique em “abrir”.

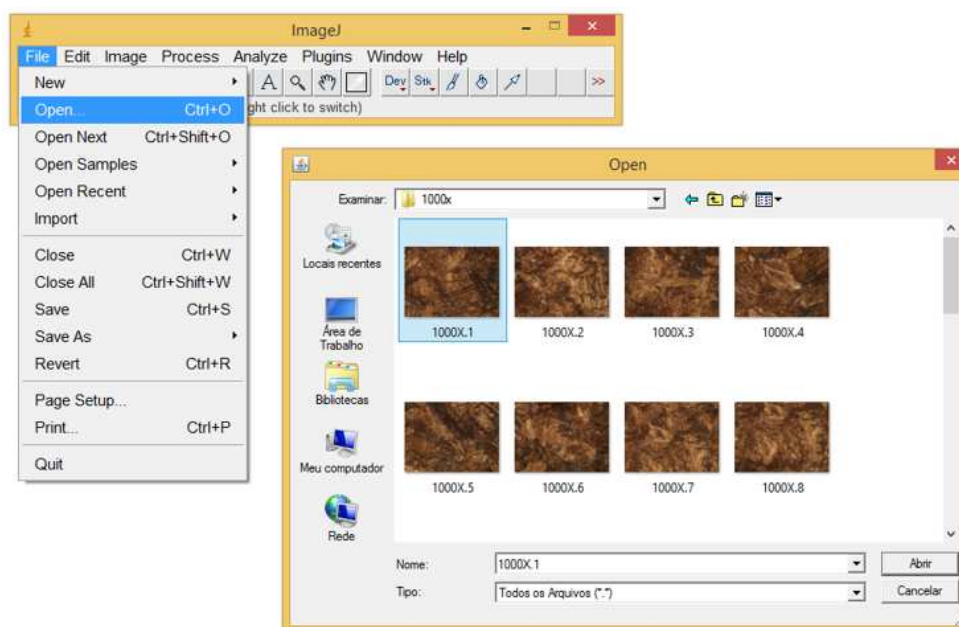


Figura 2 – Abrindo uma imagem no Image J.

A imagem estará disposta em uma caixa de diálogo independente.

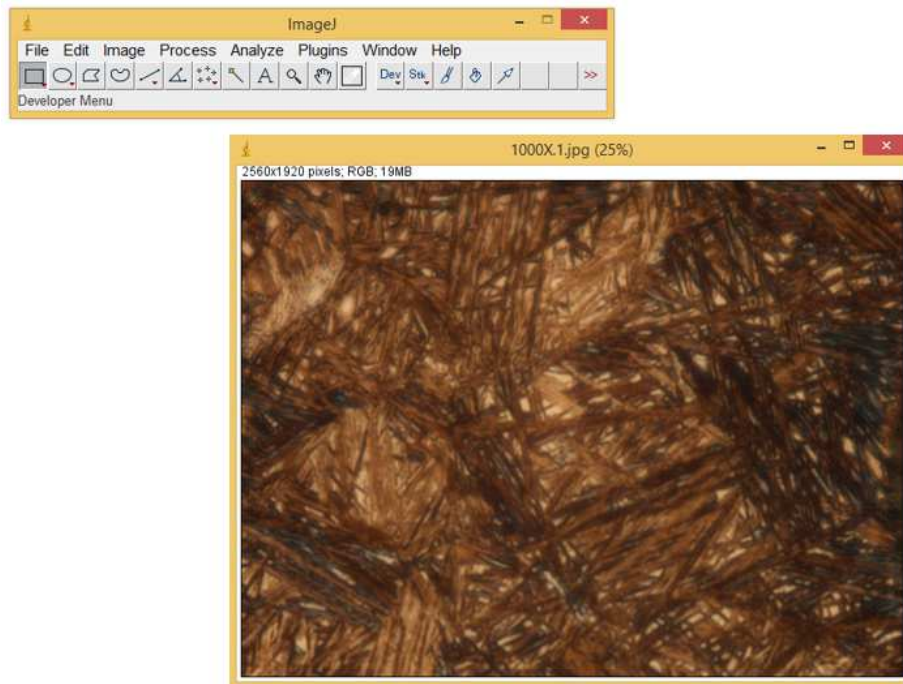


Figura 3 – Imagem aberta com Image J.

Para facilitar as próximas etapas, a imagem deve ser convertida em escala de cinza, para isso clique em “Image”, em seguida em “Type” e por fim “8-bit”.

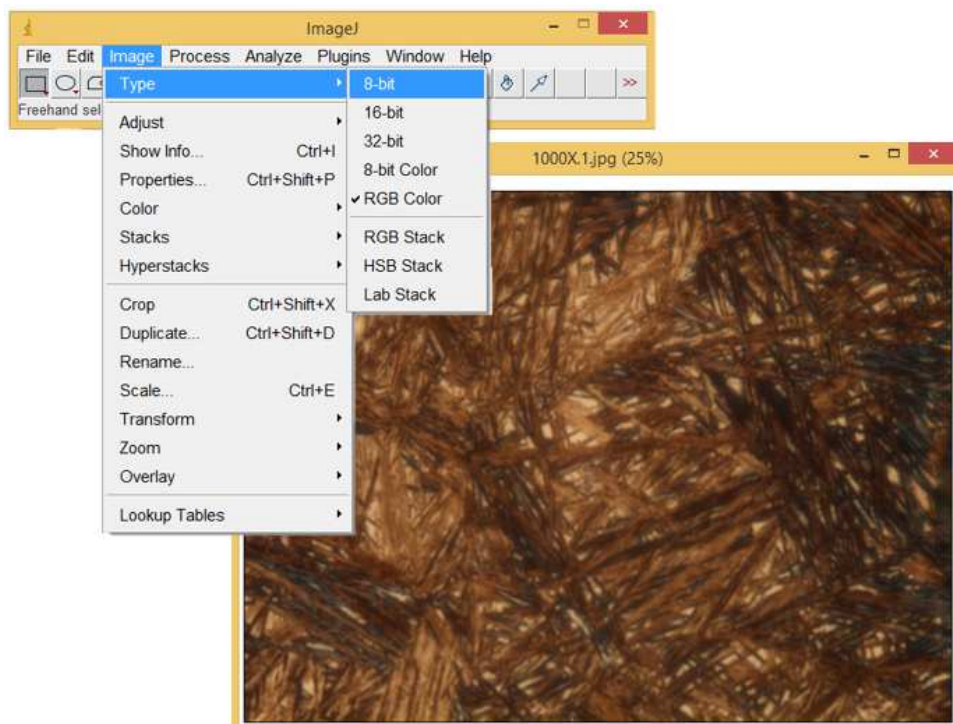


Figura 4 – Convertendo a imagem em escala de cinza.

A etapa seguinte, conhecida como limiarização, transforma a imagem em preto e branco, sem tonalidades intermediárias de cinza. Clique em “Image”, em seguida em “Adjust” e “Threshold”.

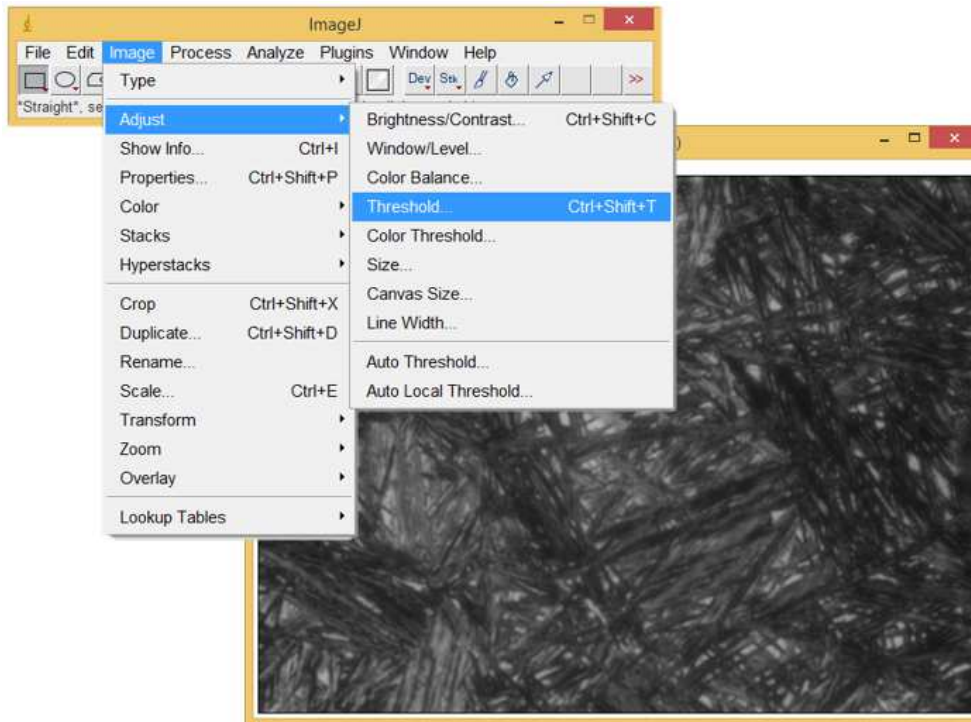


Figura 5 – Etapa de limiarização da imagem.

Nesta etapa a fase de interesse da amostra aparecerá marcada em vermelho. A opção “Dark background” serve para inverter as fases a serem marcadas. Além da determinação automática do limiar, o Image J também permite ajuste manual, que podem ser realizado movendo a barra de rolagem, como mostra a Figura 6. Para aceitar o ajuste realizado, clique em “Apply”. A caixa de diálogo “*Threshold*” poderá ser fechada após esse procedimento.

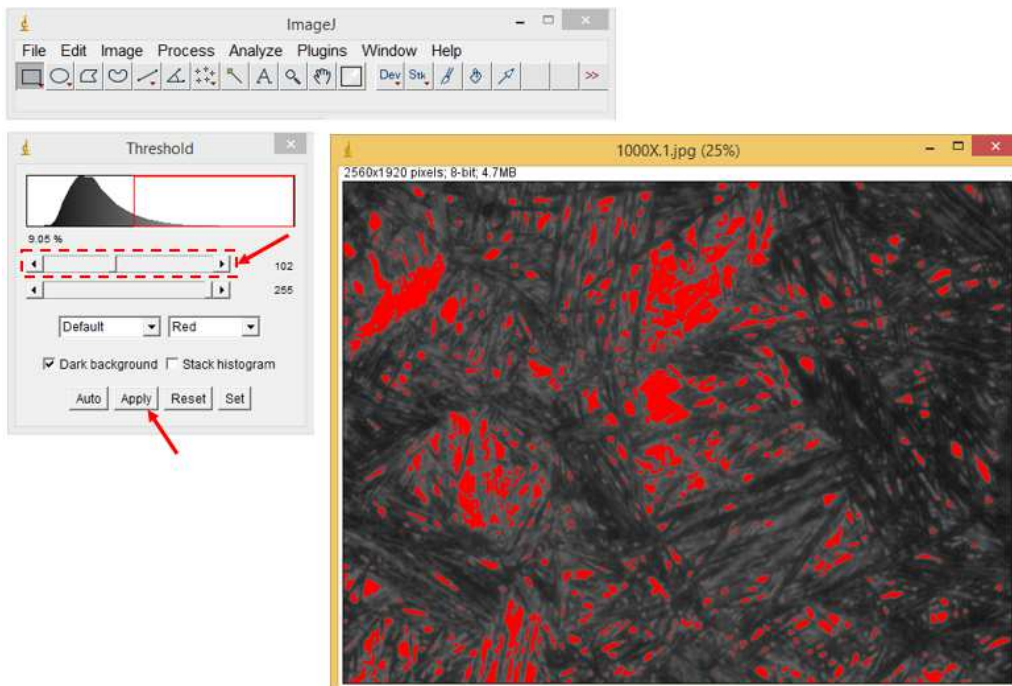


Figura 6 – Etapa de limiarização da imagem.

Em seguida, faz-se necessário selecionar os parâmetros a serem analisados pelo programa. Para isso clique “Analyze”, em seguida em “Set measurements” e deixe somente as opções “Area” e “Area fraction” marcadas. Finalize clicando em OK.

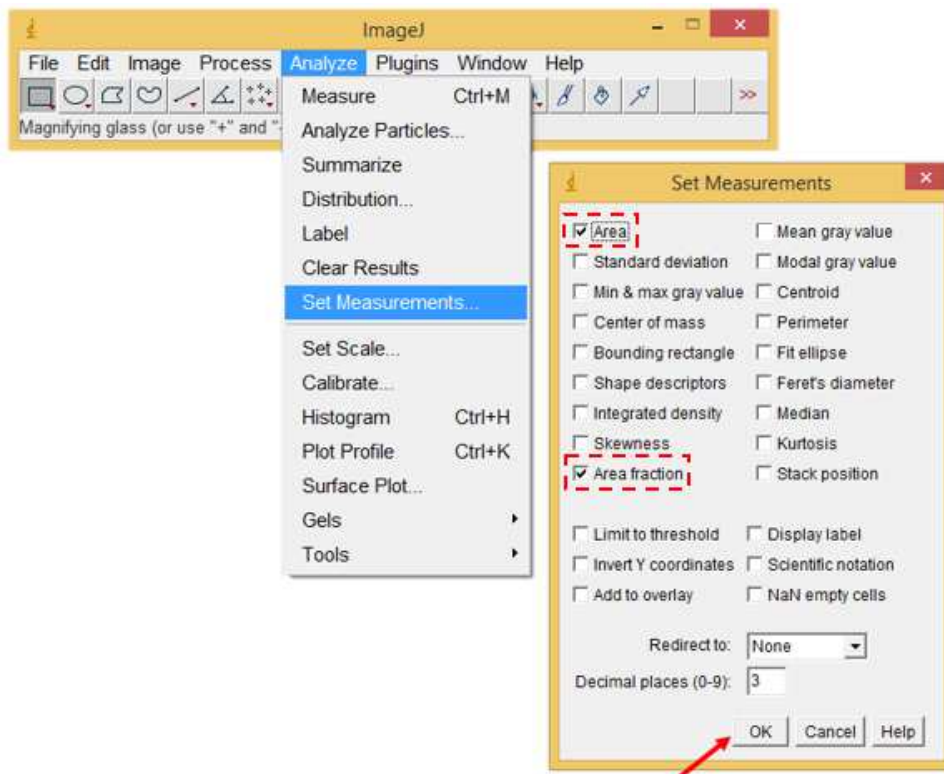


Figura 7 – Ajustando os parâmetros a serem analisados pelo Image J.

Para realizar a análise, clique em “Analyze” e em seguida em “Measure”. A caixa de diálogo “Results” irá apresentar a fração da area da imagem marcada de preto e a contagem de pixels associada. Neste caso foi encontrada uma fração da area de 9,048%.

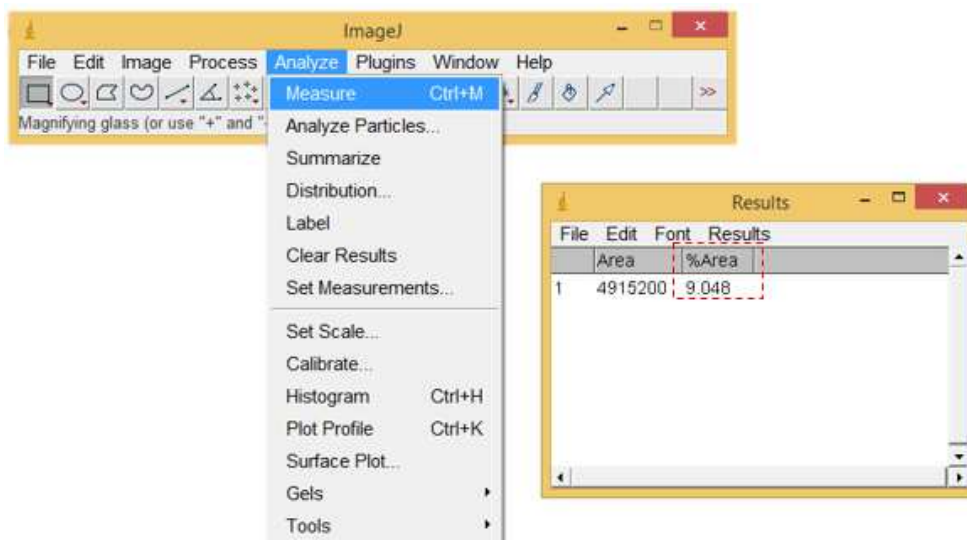


Figura 8 – Realizando as análises.

Para salvar a imagem limiarizada, clique em “File” e em “Save as”. Para não salvar por cima da imagem original, outro nome deve ser dado para o arquivo.

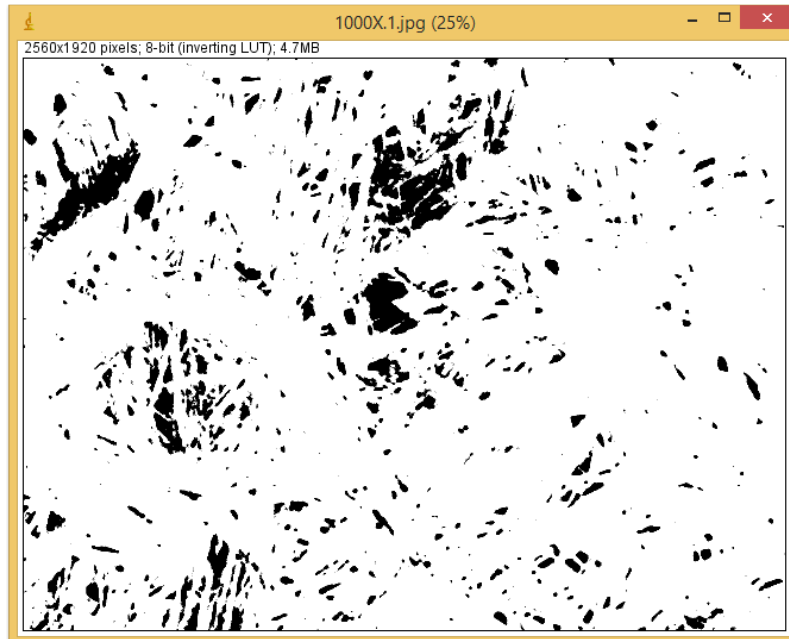


Figura 9 – Imagem limiarizada.

Anexo B: Procedimento para análise do diâmetro das fibras no Image J

Para mensurar o diâmetro das fibras da amostra de interesse, é necessário seguir as etapas 1,2 e 3 do anexo acima. Após a seleção da imagem a ser analisada, clicar com o cursor sobre o ícone demonstrado na Figura 1 abaixo.

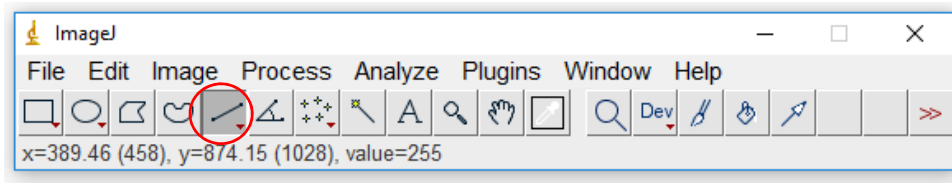


Figura 1. Seleção do ícone.

Em seguida, medir a escala de 2mm indicada pela imagem. Ao clicar CTRL+M o valor da distância será mensurado em uma janela inferior.

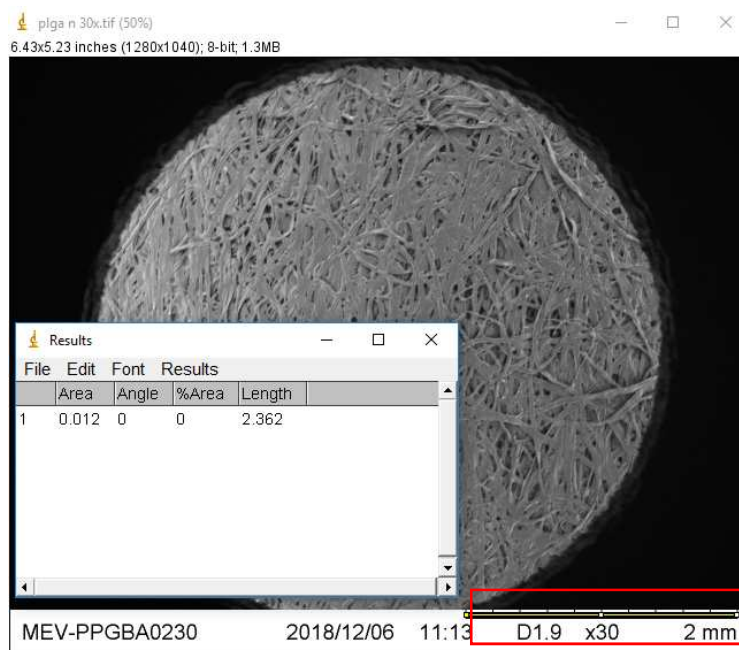


Figura 2. Janela com a distância medida da escala.

O ajuste da escala será feito em “Analyze” na tela inicial do programa, na opção “Set Scale”, conforme Figura 3.

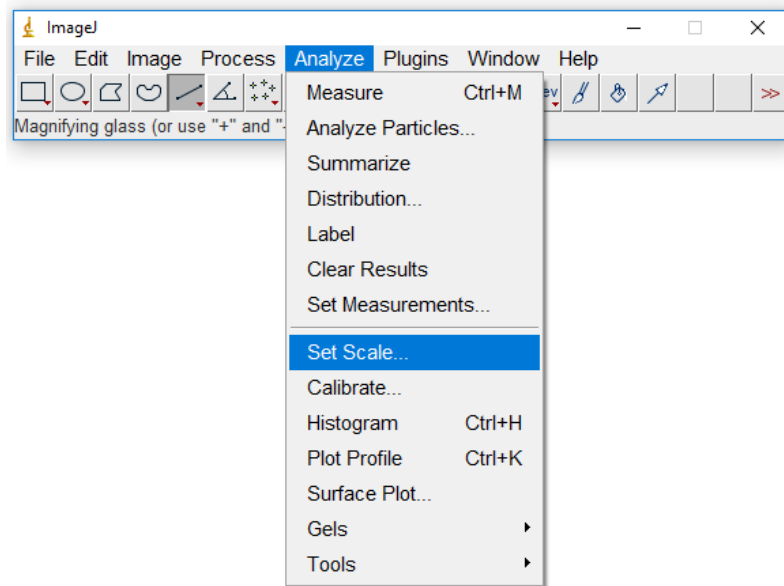


Figura 3. Ajuste da escala.

A janela para ajuste de escala será aberta conforme a Figura 4. Preencher conforme os valores medidos, ajustando para mm.

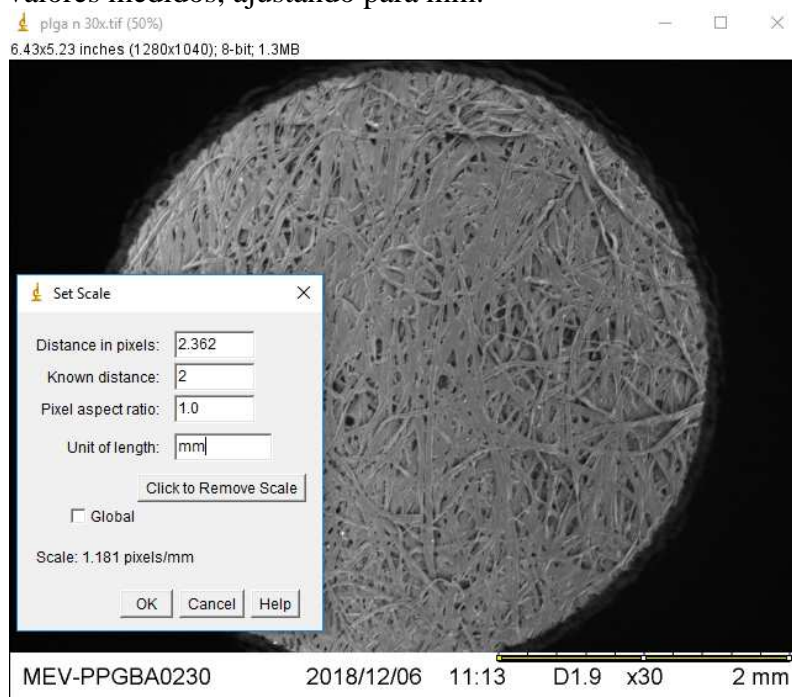


Figura 4. Preenchimento das opções de escala conforme a medição realizada na Figura 2.

Após definida a escala, medir as fibras presentes na amostra com o mesmo ícone selecionado na Figura 1. A cada medição repetir o CTRL+ M, e no fim de 100 amostras, selecionar dos dados e tratar no histograma.

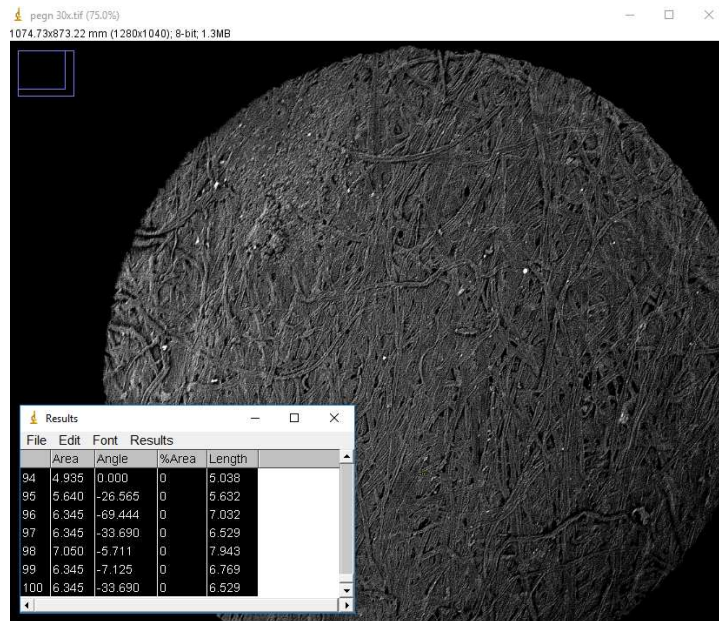


Figura 5. Contagem e o diâmetro de 100 fibras da amostra analisada.