



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES POLIMÉRICOS
BIODEGRADÁVEIS CONTENDO SIROLIMUS E AVALIAÇÃO DE
SUA ESTABILIDADE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE QUÍMICO

MICHELE SOARES TACCHI CAMPOS

VITÓRIA, ES

2016



Michele Soares Tacchi Campos

**CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES POLIMÉRICOS
BIODEGRADÁVEIS CONTENDO SIROLIMUS E AVALIAÇÃO DE
SUA ESTABILIDADE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE QUÍMICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Antonio de Oliveira.

VITÓRIA, ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

Campos, Michele Soares Tacchi, 1988 -

C198c Caracterização de implantes poliméricos biodegradáveis contendo
sirolimus e avaliação de sua estabilidade em condições de estresse
químico / Michele Soares Tacchi Campos – 2016.

108 f. : il.

Orientador: Marcelo Antonio de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Sirolimo. 2. Difração de Raios X. 3. Implantes Absorvíveis. 4.
Polímeros. 5. Cinética. I. Oliveira, Marcelo Antonio de.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

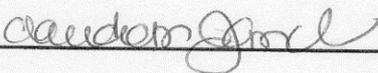
CDU: 615

Michele Soares Tacchi Campos

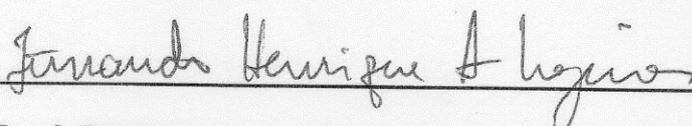
CARACTERIZAÇÃO DE IMPLANTES POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO SIROLIMUS E AVALIAÇÃO DE SUA ESTABILIDADE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE QUÍMICO.

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 18/03/2016 para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

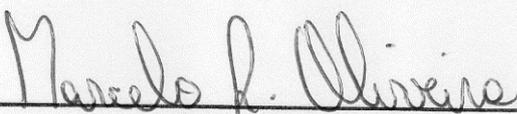
BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Claudia Masrouah Jamal / UFES



Prof. Dr. Fernando Henrique Andrade Nogueira / UFRN



Prof. Dr. Marcelo Antônio de Oliveira (orientador) / UFES

Vitória

2016

AGRADECIMENTOS

À Deus pela benção da vida, por me guiar pelos caminhos do conhecimento e por me manter firme na caminhada.

Aos meus pais por todo o apoio e amor incondicional, por todos os conselhos e pela presença constante, por torcerem, acreditarem e cuidarem de mim.

Aos meus irmãos e familiares por entenderem minha ausência em muitos momentos e torcerem sempre por mim.

Ao meu namorado por me incentivar, apoiar e ajudar, por todo carinho, paciência e amor.

Aos meus amigos por dividirem comigo as alegrias e os momentos difíceis desta caminhada.

Ao professor Dr. Marcelo Antonio de Oliveira por me orientar e partilhar comigo seus conhecimentos, por me incentivar e acreditar no meu trabalho, por todas as valiosas contribuições e discussões que engrandeceram este projeto. Agradeço também pela amizade e pelo exemplo de profissional.

À professora Dra. Maria Irene Yoshida, pelas análises térmicas realizadas e por toda ajuda e generosidade dividindo seu conhecimento para execução do experimento e interpretação dos resultados.

Ao professor Dr. Wagner da Nova Mussel pelas análises de DRX, pela disponibilidade e ajuda.

À pesquisadora Dra. Silvia Ligório Fialho pela confiança e pela oportunidade de realizar este projeto, por todo material fornecido e pela bondade de dividir projetos e conhecimentos. Agradeço também a FUNED e ao Dr. Bruno Gonçalves Pereira.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e a FAPES pelo apoio financeiro. Agradeço imensamente a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer	17
1.2 Sirolimus (Rapamicina)	19
1.3 Sistemas de liberação controlados de fármacos	23
1.4 Estabilidade intrínseca e determinação da cinética em solução	25
1.5 Estudo da formulação farmacêutica por meio de análises instrumentais	26
1.6 Cinética de degradação em estado sólido	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1 Materiais	31
3.2 Métodos	32
3.2.1 Obtenção dos implantes	32
3.2.2 Análise térmica	33
3.2.2.1 Termogravimetria / Termogravimetria derivada (TG/DTG)	33
3.2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	33
3.2.3 Difração de Raios X (DRX)	34
3.2.4 Análise por microscopia ótica	34
3.2.5 Estudos Cromatográficos	34
3.2.5.1 Estudo de degradação do fármaco em meio líquido (solução) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	35
3.2.5.2 Cinética de degradação do fármaco em meio líquido (solução)	37

3.2.6 Estudo de cinética de degradação em estado sólido.....	38
3.2.7 Análise dos pós liofilizados para obtenção dos implantes contendo sirolimus por CLAE.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Caracterização do fármaco SRL por análise térmica	42
4.2 Caracterização do fármaco SRL por DRX e microscopia.....	46
4.3 Caracterização dos polímeros por análise térmica	48
4.3.1 Quitosana	48
4.3.2 Policaprolactona (PCL).....	49
4.3.3 Copolímero derivado dos ácidos láctico e glicólico (PLGA 50:50)	50
4.3.4 Copolímero derivado dos ácidos láctico e glicólico (PLGA 75:25)	52
4.4 Caracterização dos polímeros por DRX	53
4.5 Estudos de compatibilidade do sirolimus com os polímeros.....	55
4.5.1 Estudo de compatibilidade por DSC.....	55
4.5.2 Estudo de compatibilidade por DRX.....	61
4.6 Estudos Cromatográficos	64
4.6.1 Estudo de degradação do fármaco em meio líquido (solução) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	64
4.6.2 Estudos de cinética de degradação em meio líquido (solução)	69
4.7 Estudos de cinética de degradação em meio sólido	81
4.8 Análise e determinação de teor nas amostras dos pós liofilizados para obtenção dos implantes poliméricos biodegradáveis	86
4.8.1 Análise dos pós liofilizados por CLAE	86
4.8.2 Determinação do teor do fármaco sirolimus nas amostras de pós liofilizados	89
6 REFERÊNCIAS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do sirolimus.	20
Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de ação do VEGF ativando mTOR.....	22
Figura 3 – Estruturas moleculares dos polímeros PLGA, PCL e quitosana. ...	32
Figura 4 - Curvas de DSC e de TG/DTG do SRL obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.	43
Figura 5 – Curvas de DSC e de TG/DTG do SRL obtidas a 20 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.	44
Figura 6 – Sobreposição de curvas de DSC do SRL obtidos com diferentes razões de aquecimento em atmosfera dinâmica de nitrogênio: (A) 10 °C min ⁻¹ e (B) 20 °C min ⁻¹	45
Figura 7 – Difrátograma de raios X do SRL ajustado pelo método de Rietveld.	46
Figura 8 – Célula unitária do SRL obtida pelo rearranjo de Rietveld (átomos de carbono em cinza, hidrogênio em branco e nitrogênio em azul).....	47
Figura 9 – Análise microscópica SRL com aumento de 40X.	47
Figura 10 – Curvas de DSC e de TG/DTG da quitosana obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	49
Figura 11 – Curvas de DSC e de TG/DTG do PCL obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.	50
Figura 12 – Curvas de DSC e de TG/DTG do PLGA 50:50 obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	51
Figura 13 – Curvas de DSC e de TG/DTG do PLGA 75:25 obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	52
Figura 14 – Difrátogramas de raios X dos polímeros: quitosana, PCL, PLGA 50:50 e PLGA 75:25.....	54

Figura 15 – Curvas de DSC obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, quitosana, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.	56
Figura 16 – Curvas de DSC obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PCL, mistura binária (1:1) e implante liofilizado... ..	57
Figura 17 – Curvas de DSC obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PLGA 50:50, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.	57
Figura 18 – Curvas de DSC obtidas a 10 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PLGA 75:25, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.	58
Figura 19 – Curvas de DSC obtidas a 20 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, quitosana, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.	58
Figura 20 – Curvas de DSC obtidas a 20 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PCL, mistura binária (1:1) e implante liofilizado... ..	59
Figura 21 – Curvas de DSC obtidas a 20 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PLGA 50:50, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.	59
Figura 22 – Curvas de DSC obtidas a 20 °C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PLGA 75:25, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.	60
Figura 23 – Difrátogramas de raios X de SRL; quitosana; mistura binária SRL - quitosana e implante liofilizado.	62
Figura 24 – Difrátogramas de raios X de SRL; PCL; mistura binária SRL – PCL e implante liofilizado.	62
Figura 25 – Difrátogramas de raios X de SRL; PLGA 50:50; mistura binária SRL – PLGA 50:50 e implante liofilizado.	63
Figura 26 – Difrátogramas de raios X de SRL; PLGA 75:25; mistura binária SRL – PLGA 75:25 e implante liofilizado.	63

Figura 27 – Tautômeros hemiacetal pirano e oxepano.....	64
Figura 28 – Cromatograma do SRL antes e após condições de estresse: exposição ao calor, hidrólise neutra, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, exposição à luz UV e exposição a metais, com T de 60 °C durante 240 min. .	66
Figura 29 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), da amostra após estresse por oxidação dos picos do SRL (t _R = 6,04 min), PD1 (t _R = 1,2 min), e PD2 (t _R = 4,1 min).	67
Figura 30 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), da amostra após estresse por hidrólise neutra dos picos do SRL (t _R = 6,106 min) e PD1 (t _R = 1,2 min).	67
Figura 31 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), da amostra após estresse por hidrólise básica dos picos do SRL (t _R = 6,090 min) e PD1 (t _R = 1,2 min).	68
Figura 32 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), do pico de SRL (t _R = 6,1 min).	68
Figura 33 – Cromatogramas do SRL antes e após exposição ao calor em temperatura de 50 °C e 60 °C nos tempos coleta de análise: 60 min; 120 min; 180 min e 240 min.....	70
Figura 34 – Cromatogramas do SRL antes e após exposição ao calor em temperatura de 70 °C nos tempos coleta de análise: 45 min; 90 min; 135 min e 180 min; e 80 °C nos tempos coleta de análise: 30 min; 60 min; 90 min e 120 min.....	71
Figura 35 – Cromatogramas do SRL antes e após teste de estresse em hidrólise básica com temperatura de 50 °C nos tempos coleta de análise: 60 min; 120 min; 180 min e 240 min e 60 °C nos tempos de coleta de análise: 45 min; 90 min; 135 min e 180 min.	72
Figura 36 – Cromatogramas do SRL antes e após teste de estresse em hidrólise básica com temperatura de 70 °C nos tempos coleta de análise: 30 min; 60 min; 90 min e 120 min; e 80 °C nos tempos coleta de análise: 15 min; 30 min; 45 min e 60 min.	73

Figura 37 – Cromatogramas do SRL antes e após teste de estresse em hidrólise neutra com temperatura de 50 °C e 60 °C nos tempos coleta de análise: 60 min; 120 min; 180 min e 240 min.	74
Figura 38 – Cromatogramas do SRL antes e após teste de estresse em hidrólise neutra com temperatura de 70 °C e 80 °C nos tempos coleta de análise: 60 min; 120 min; 180 min e 240 min.	75
Figura 39 – Gráfico da equação de Arrhenius - degradação forçada em calor do SRL.....	77
Figura 40 – Gráfico da equação de Arrhenius - Hidrólise básica do SRL.	78
Figura 41 – Gráfico da equação de Arrhenius - Hidrólise neutra do SRL.....	80
Figura 42 – Gráfico da fração decomposta pelo tempo	83
Figura 43 – Gráfico de Arrhenius construído a partir dos resultados obtidos nas isotermas para 10% de perda de massa do SRL.	84
Figura 44 – Gráfico de Arrhenius extrapolado para 10% de perda de massa do SRL.....	85
Figura 45 – Cromatogramas dos implantes liofilizados.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Testes adicionais de degradação forçada para cálculo de estabilidade intrínseca do fármaco.....	37
Tabela 2 – Equações utilizadas para descrever a cinética de degradação isotérmica	38
Tabela 3 – Equações cinéticas para a decomposição térmica em estado sólido	40
Tabela 4 – Faixas de temperatura de fusão e valores de calor de fusão do SRL em diferentes razões de aquecimento	45
Tabela 5 – Resultados dos modelos matemáticos de ajuste zero, primeira e segunda ordem, com valores de r e k para o teste de degradação forçada em calor do SRL	76
Tabela 6 – Resultados dos modelos matemáticos de ajuste zero, primeira e segunda ordem, com valores de r e k para o teste de degradação forçada em hidrólise básica do SRL	78
Tabela 7 – Resultados dos modelos matemáticos de ajuste zero, primeira e segunda ordem, com valores de r e k para o teste de degradação forçada em hidrólise neutra do SRL.....	79
Tabela 8 – Cálculo da cinética em estado sólido do SRL, valores calculados de r e k.....	82
Tabela 9 – Cálculo de teor do fármaco SRL nos implantes liofilizados	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α	Fração decomposta
ΔH	Entalpia de fusão
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE/UV-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjos de diodo
CYP3A4	Citocromo P3A4
DAD	Detector de arranjos de diodo
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Primeira derivada da curva TG
E_a	Energia de Ativação
FKBP12	Proteínas citosólicas de ligação FK-12
Funed	Fundação Ezequiel Dias
HIF-1	Fator induzido por hipóxia
HPMA	Copolímeros de N-(2- hidroxipropil)-metacrilato
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
k	Constante de velocidade de degradação
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
PCL	Policaprolactona
PD	Produto de degradação
PF	Ponto de fusão
PGA	Poliácido glicólico
PLA	Poliácido lático
PLGA	Copolímero derivado dos ácidos lático e glicólico

r	Coeficiente de regressão linear
SLC	Sistemas de liberação controlada
SRL	Sirolimus
T	Temperatura
t	Tempo
T _{endset}	Temperatura endset
T _g	Transição vítrea
TG	Termogravimetria
T _{onset}	Temperatura onset
t _R	Tempo de retenção
t ₉₀	Tempo para degradar 10% do fármaco
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

A utilização do sirolimus e seus análogos têm sido avaliados em estudos para combater diversos tipos de câncer, porém devido à baixa biodisponibilidade do fármaco é necessária a busca por novas formas de administração. Implantes poliméricos biodegradáveis contendo sirolimus foram avaliados como alternativa que viabilizaria a utilização do fármaco. Diferentes implantes contendo 25% do fármaco sirolimus foram elaborados empregando como matrizes poliméricas: quitosana, policaprolactona e o copolímero derivado dos ácidos lático e glicólico (PLGA) em duas proporções: PLGA 50:50 e PLGA 75:25. As técnicas de análise térmica, termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial, em conjunto com a difração de raios X e microscopia foram utilizadas na caracterização e avaliação da compatibilidade entre os constituintes da formulação, onde constatou-se não haver incompatibilidades, porém observou-se uma amorfização do fármaco nos implantes, confirmadas nas análises de DRX. Nos testes de estabilidade intrínseca, o sirolimus apresentou-se instável nas condições de exposição ao calor e hidrólises neutra e básica, na análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram detectados dois produtos de degradação após exposição ao calor e um produto de degradação após hidrólise básica e hidrólise neutra; os produtos de degradação apresentaram espectro de UV similares ao espectro do fármaco. Através do estudo cinético isotérmico em meio sólido, observou-se que a molécula do fármaco se degrada segundo modelo difusional tridimensional, apresentando prazo de validade igual a 6 anos. O pó liofilizado do implante confeccionado com o PLGA 75:25 mostrou-se com menor formação de produto de degradação e manteve o teor adequado de 24,6% após análise em solução por CLAE, e é o polímero de escolha para a elaboração do implante biodegradável contendo sirolimus para o tratamento de tumores malignos sólidos, porém faz-se necessário estudos adicionais dos efeitos do fármaco após amorfização do cristal quanto à estabilidade e solubilidade.

Palavras-chave: sirolimus, análise térmica, difração de raios x, implantes biodegradáveis, polímeros, cinética.

ABSTRACT

Characterization of biodegradable polymeric implants containing sirolimus and evaluation of its stability in chemical stress conditions.

The use of sirolimus and its analogs has been evaluated in studies aimed at combating several types of cancer; however, because of the limited bioavailability of the drug, the search for new forms of administration is required. Biodegradable polymeric implants containing sirolimus were assessed as an alternative method of drug administration. Distinct implants containing 25% (w/w) sirolimus were prepared employing the polymer matrices chitosan, polycaprolactone and Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) in two proportions: PLGA 50:50 and PLGA 75:25. Thermal analysis techniques such as thermogravimetry and differential scanning calorimetry, combined with x-ray diffraction and microscopy were used to characterize and evaluate the compatibility of the constituents of the formulation, no incompatibilities were found between the components, but drug amorphization was observed in all samples. Sirolimus was unstable when exposed to conditions: heat, neutral and basic hydrolysis, at the analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) were detected two degradation products after exposure to heat and detected one degradation product after basic hydrolysis and neutral hydrolysis, the degradations product showed similar UV spectrum to the drug's spectrum. Through the isothermal kinetic study on solid media, it was observed that the drug molecule degrades second diffusive three-dimensional model, with validity time to 6 years. HPLC analysis showed that the lyophilized powder for elaboration of the implant prepared with PLGA 75:25 did not present degradation products and maintained its appropriate drug content of 24,6%, after analysis in solution by HPLC, and represents the most suitable polymer for use in developed by biodegradable implants containing Sirolimus for the treatment of malignant solid tumors, however, is still necessary to further study the drug effects after amorphization of the crystal and also stability and solubility analysis.

Keywords: sirolimus, thermal analysis, x-ray analysis, biodegradable implants, polymers, kinetics.

1 INTRODUÇÃO

A realização deste trabalho surgiu como parceria entre pesquisadores da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, em que foram desenvolvidos quatro diferentes implantes poliméricos biodegradáveis contendo sirolimus na proporção de 25% do fármaco em cada implante. O sirolimus vem sendo testado contra os tipos mais prevalentes de câncer, porém fez-se necessário o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada, para atenuar os efeitos adversos oriundos da sua distribuição sistêmica e configurar uma alternativa viável para o tratamento dos tumores malignos sólidos. Este desenvolvimento demandou uma avaliação detalhada da formulação dos implantes quanto à estabilidade e cinética das reações, visto que os polímeros são macromoléculas sintéticas e naturais passíveis de sofrer reações físico-químicas, como a hidrólise, e incompatibilidades com o fármaco inviabilizando sua utilização. Para realização deste estudo, as análises térmicas DSC e TG associadas à DRX e a CLAE foram ferramentas de fundamental importância, por serem técnicas sensíveis que possibilitam a caracterização e detecção das incompatibilidades dos constituintes das formulações farmacêuticas; avaliação da estabilidade com determinação da cinética das reações em solução e estado sólido; detecção de produtos de degradação e determinação do teor do fármaco nas amostras.

1.1 Câncer

A palavra câncer deriva do grego *karkínos*, que significa caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez pelo pai da medicina Hipócrates (460 a.C – 377 a.C). O câncer é uma doença antiga, fato comprovado por ter sido encontrado em múmias egípcias, evidenciando que ele já comprometia o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo. Atualmente, a denominação câncer é universalmente aplicado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a alastrar-se pelos tecidos e órgãos vizinhos (INCA, 2011). As causas de câncer são inúmeras, podendo ser externas ou internas ao organismo e permanecendo inter-relacionadas. As

causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um indivíduo ou comunidade. As causas internas são, em grande parte, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2014).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer totalizando 8,2 milhões de mortes por câncer em 2012 no mundo. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%). Estima-se que os casos de câncer continuem crescendo, chegando a 26 milhões nas próximas duas décadas e perfazendo 17 milhões de mortes (WHO, 2012; INCA, 2015). No Brasil, a estimativa para o ano de 2016, válida também para o ano de 2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema de saúde pública que é o câncer no país, cujo controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões (INCA, 2015).

As células normais que constituem os tecidos do corpo humano se multiplicam por meio de um processo contínuo que é natural e requerido pelo organismo para manutenção do mesmo. A maioria das células normais cresce, multiplica-se e morre de maneira ordenada. No crescimento das células cancerosas o processo é diferente: em vez de morrerem de maneira ordenada, as células cancerosas continuam multiplicando-se incontrolavelmente, formando outras novas células anormais; estas células têm a tendência de ser muito agressivas e incontroláveis, levando à formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2011).

Inicialmente, o crescimento de um tumor é alimentado pelos vasos sanguíneos mais próximos. Uma vez que o tumor atinge um determinado tamanho, estes vasos sanguíneos não são mais suficientes e novos vasos sanguíneos são necessários para continuar o crescimento. A vascularização,

portanto, é uma das principais condições para que ocorra o crescimento do tumor, e o mesmo só é possibilitado pelo desenvolvimento de novos microvasos a partir de células endoteliais pertencentes a capilares adjacentes às células neoplásicas (PINHO, 2005). Uma das formas que um tumor usa para ativar as células endoteliais é por meio da secreção de fatores de crescimento pró-angiogênicos que, em seguida, se ligam a receptores no dormente das células endoteliais vizinhas, que conduzem à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade dos vasos. Em seguida, essas células endoteliais irão migrar e se proliferar formando uma nova vascularização. Os fatores de crescimento também podem atuar sobre as células mais distantes recrutando da medula óssea precursores derivados das células endoteliais e células endoteliais circulantes para migrar para o tumor e aumentar a vascularização (COOK & FIGG, 2010).

O tratamento do câncer se divide em três formas principais: quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Essas terapias podem ser aplicadas em conjunto ou não, de acordo com a evolução do tratamento. Até recentemente, poucas são as neoplasias malignas tratadas com apenas uma das terapias. Como as terapias são destinadas a eliminar células de rápido crescimento, elas também acabam acometendo células saudáveis, gerando assim efeitos adversos graves devido a não seletividade do tratamento, fazendo-se necessário a busca por novos agentes quimioterápicos mais seletivos ou novas formas de administração para os fármacos integrando eficácia com segurança (INCA, 2010; KAELIN, 2005).

1.2 Sirolimus (Rapamicina)

Nesta busca por novas alternativas para o tratamento de câncer, o fármaco sirolimus (SRL) e seus análogos têm mostrado grande potencial. No início de 1970, o fármaco foi descoberto como parte de um programa de triagem para novos agentes antifúngicos e foi nomeado primeiramente como rapamicina, porque foi isolado a partir de uma amostra de solo da ilha Rapa Nui no Chile (SEHGAL et al., 1975; HARTFORD e RATAIN, 2007). O SRL é uma lactona macrocíclica (Figura 1) produzida como metabólito secundário pelo fungo *Streptomyces hygroscopicus*, é um sólido cristalino branco a esbranquiçado com peso molecular de 914,17 g mol⁻¹. O SRL foi inicialmente descoberto como um

agente antifúngico contra *Candida albicans* e foram descobertas posteriormente potentes atividades imunossupressoras e antiproliferativa (GOODMAN e GILMAN, 2006; SEHGAL, 1995; PÓPULO, 2011).

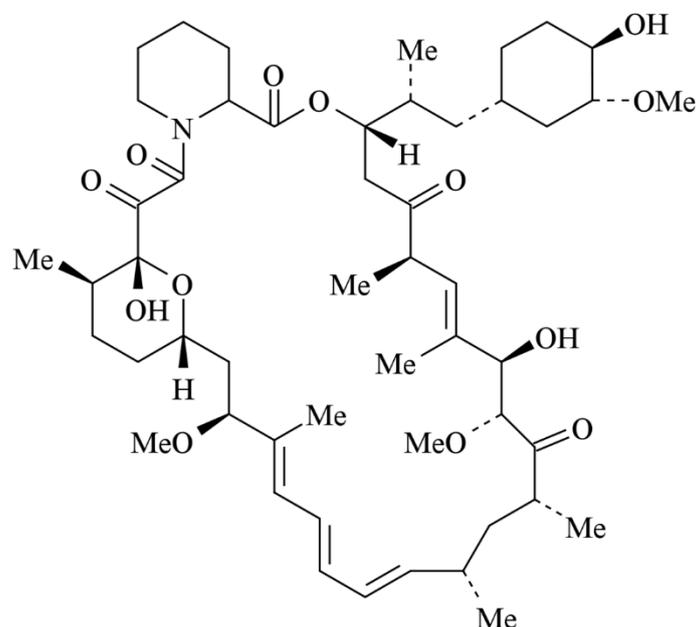


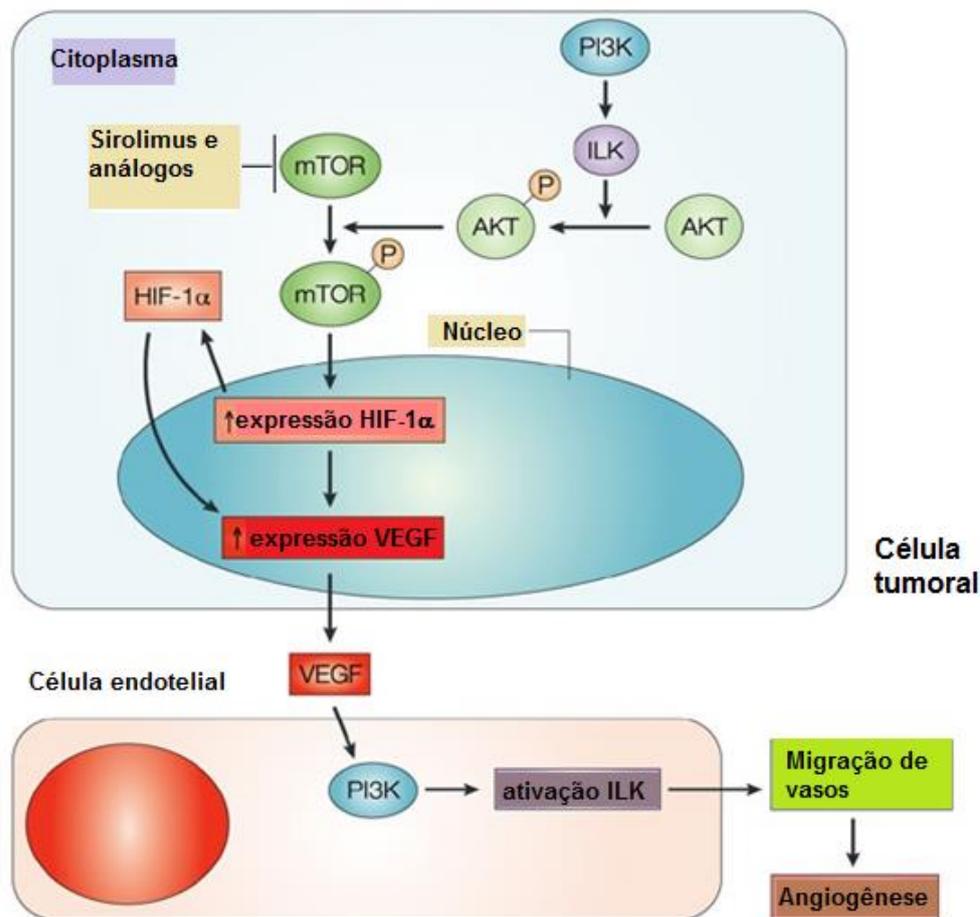
Figura 1 – Fórmula estrutural do sirolimus.

SRL é praticamente insolúvel em água; muito solúvel em etanol, clorofórmio, acetona e acetonitrila; e solúvel em metanol e tetrahydrofurano. A baixa solubilidade do composto é um dos fatores de limitação da absorção por via oral. A biodisponibilidade oral do composto ainda é limitada pelos vários processos ativos do metabolismo pela CYP3A4 e transporte pela glicoproteína-P (BAI et al., 2004; LUO et al., 2007; SOLYMOSI et al., 2015).

Após administração por via oral, a biodisponibilidade sistêmica do SRL é baixa, menor que 15% (YATSCOFF, 1996; NAPOLI e TAYLOR, 2001), e já foram identificados mais de 10 metabólitos, sendo a maior parte do fármaco excretada nas fezes. Os efeitos adversos mais evidenciados com sua utilização são hiperlipidemia, mielosupressão e artralgia (AUGUSTINE et al., 2007; BAHAESCU et al., 2006; GOODMAN e GILMAN, 2006; MAHALATI e KAHAN, 2001; SOLYMOSI et al., 2015).

Seu mecanismo de ação é diferente de outros agentes imunossupressores, uma vez que se liga a proteínas citosólicas de ligação FK-12 (FKBP12) para gerar um complexo imunossupressor (complexo FKBP-12-rapamicina) que irá se ligar e bloquear uma proteinocinase chamada de alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que é uma enzima fundamental na sobrevivência, crescimento e proliferação das células. Quando se avaliou a importância da mTOR no metabolismo e proliferação das células, pode-se prever a ligação da via de sinalização da mTOR com inúmeras doenças compreendendo entre elas o câncer. O fármaco também tem sido incorporado aos *stents* para inibir a proliferação celular local e a obstrução de vasos sanguíneos em cirurgias cardíacas (BAHN et al., 2007; GOODMAN e GILMAN, 2006; SEHGAL, 1995; PÓPULO, 2011; ONYESOM et al., 2013).

O SRL pode também inibir a proliferação endotelial das células, a expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além de inibir a angiogênese (Figura 2). O fator indutor de hipóxia controla diversos genes envolvidos na angiogênese e por este encontrar-se ativo em condições de hipóxia, ele está relacionado com o crescimento do tumor. A expressão de inúmeros fatores de crescimento, entre eles o VEGF é regulado pela hipóxia. Este fator é capaz de aumentar a permeabilidade vascular e gerar o crescimento das células endoteliais, porém, quando é secretado pelas células tumorais, o VEGF se liga a seu receptor, chamado de receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), e ativa diversas vias de sinalização incluindo a via PIK3/AKT/mTOR, estimulando a angiogênese e proliferação celular (COOK e FIGG, 2010). Fármacos capazes de bloquear a angiogênese têm se tornado importantes componentes na primeira linha de terapia em diversos tipos de câncer (CAO e LANGER, 2010).



Fonte: Adaptado de Flintoft (2004).

Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de ação do VEGF ativando mTOR.

A utilização do sirolimus e de seus análogos tem sido avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo* para combater diversos tipos de câncer, entre eles os tipos de câncer mais incidentes como de fígado, pulmão, mama e próstata (BOFFA et al., 2004; FACOMPRES et al., 2012; LIU et al., 2005; POEL et al., 2003; STIPPEL et al., 2005).

Após a administração do fármaco SRL, apenas uma pequena dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é perdida, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização antes mesmo de atingir o local de ação, como foi descrito anteriormente (YATSCOFF et al., 1996; NAPOLI e TAYLOR, 2001). Nesse sentido, a utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos, que tem como objetivo principal o controle temporal e espacial, *in vivo*, da concentração dos fármacos, seria uma opção viável para que o benefício

clínico da administração seja maximizado e os efeitos adversos da distribuição sistêmica atenuados (CAO e LANGER, 2010; COIMBRA, 2010; KOETZ e KOSMELLA, 2007).

1.3 Sistemas de liberação controlados de fármacos

Os sistemas de liberação controlada (SLC) compreendem a associação, química ou física, dos princípios ativos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, sejam capazes de controlar a taxa de liberação e entrega do fármaco e/ou dirigir o fármaco de maneira específica ao local em que este deve atuar. Materiais de natureza lipídica, inorgânica e polimérica têm sido empregados como matrizes de SLC. Dentre estes, os materiais poliméricos são os mais investigados, pois, quando são utilizados como matrizes dos sistemas de liberação, estes apresentam diversas vantagens, como o aumento na biodisponibilidade e eliminação das alterações cíclicas na concentração do fármaco, diminuição dos efeitos adversos devido à liberação progressiva e direcionada do fármaco a alvos específicos, possibilidade de redução da quantidade de fármaco e redução do número de doses administradas, o que leva à maior adesão do paciente ao tratamento (COIMBRA, 2010; De Azevedo, 2003; KANG et al., 2007; KOETZ & KOSMELLA, 2007; KUBOTA & SHIMODA, 2005; OZTURK et al., 2006; SHE et al., 2009; TSUCHIDA, 1994; VILLANOVA et al., 2010; WANG et al., 2009).

Os polímeros são macromoléculas compostas por unidades de repetição, unidas por ligações covalentes e intramoleculares, formando uma cadeia polimérica. Essas cadeias podem ser lineares, apresentar ramificações ou braços, ligações cruzadas ou em rede (CANEVAROLO et al., 2002, HASIRCI et al., 2001). O desenvolvimento de SLC de fármacos é um campo inovador quando se refere à utilização de polímeros que permitem a liberação sustentada e direcionada a um tumor, um tecido local ou até mesmo a um local específico da circulação sanguínea (SALIBA, 2011). Griffith (2000) já discutia a aplicabilidade futura destes sistemas para diversas terapias, colocação também reforçada por Pillai e Panchagnula (2001), ao considerarem os polímeros como materiais promissores para o desenvolvimento de diversos sistemas de liberação de fármacos. Os materiais poliméricos são ainda a classe de materiais mais

investigada no desenvolvimento de SLC pela sua variedade, versatilidade e propriedades. O desenvolvimento de sistemas mais sofisticados e eficientes são possíveis graças ao desenvolvimento de novos polímeros, desenhados para ter propriedades cada vez mais específicas (KANG et al., 2007).

Uma das principais propriedades na escolha de um determinado polímero para sua aplicação como SLC é a maneira com que este se degrada ou não *in vivo*, ou seja, se é biodegradável ou não biodegradável. O polímero biodegradável é aquele que sofre degradação química, podendo ser por hidrólise ou ação enzimática, gerando produtos biocompatíveis e não tóxicos ao organismo, capazes de serem metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais (YU et al., 2005). Os polifosfazenos, poliésteres, poliortoésteres, poliaminoácidos e as poliuretanas são alguns exemplos de polímeros biodegradáveis sintéticos. Quando o SLC utiliza polímeros biodegradáveis como matriz, o fármaco incorporado pode estar dissolvido ou disperso, e sua liberação é provocada pela desintegração da matriz, que é ocasionada por sua vez, pela biodegradação do polímero (COIMBRA, 2010).

Alguns sistemas poliméricos têm sido propostos como formulações para liberação prolongada, dentre eles as micro e nanopartículas e os implantes que podem ser preparados a partir de diversos polímeros, biodegradáveis ou não biodegradáveis. Os implantes poliméricos não desencadeiam respostas inflamatórias no local da aplicação uma vez que são constituídos de materiais poliméricos atóxicos, não cancerígenos e hipoalergênicos (ATHANASIOU et al., 1996; FIALHO et al., 2003; NAIR e LAURENCIN, 2007; VILLANOVA et al., 2010).

Atualmente, os polímeros mais utilizados para aplicações de SLC de fármacos incluem o copolímero derivado dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), poliácido láctico (PLA), poliácido glutâmico (PGA), policaprolactona (PCL), copolímeros de N - (2-hidroxipropil)-metacrilato (HPMA), polissacáridos e poli (aminoácidos). Devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradação, PLA, PLGA e PGA têm sido largamente aplicados em uma quantidade considerável de formulações (ACHARYA & SAHOO, 2011; SHIVE & ANDERSON, 1997). De acordo com o estudo de Merkli e colaboradores (1998) e Jain (2000), estes copolímeros possuem cadeias lineares, saturadas e

comportamento termoplástico, concedendo a eles a facilidade de serem moldados utilizando aquecimento. Os polímeros naturais constituem outra possibilidade de matriz que pode ser empregada na elaboração de SLC de fármacos dos quais são exemplos a quitosana, colágeno, ácido hialurônico, alginato, albumina e a gelatina (JAIN, 2000; PILLAI e PANCHAGNULA, 2001; COIMBRA, 2010).

A elaboração de implantes, assim como de todas as formas farmacêuticas necessitam de um estudo aprofundado de sua formulação com a finalidade de garantir a qualidade e aplicabilidade. A proposta do implante como forma farmacêutica deve ser avaliada quanto à compatibilidade fármaco-polímeros, a estabilidade intrínseca do fármaco, e possível formação de produtos de degradação (OLIVEIRA et al., 2010, YOSHIDA et al., 2011a; YOSHIDA et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011; YOSHIDA et al., 2010; BALESTRIERI et al., 1996; BAZZO e SEGATTO SILVA, 2005; CIDES et al., 2006).

1.4 Estabilidade intrínseca e determinação da cinética em solução

No desenvolvimento de uma formulação farmacêutica, é importante determinar a estabilidade intrínseca do fármaco para prever possíveis reações e produtos de degradação (ICH Q1A (R2), 2003; SILVA et al., 2009). A estabilidade intrínseca da substância deve ser avaliada quanto à temperatura, umidade, oxidação, exposição à luz, hidrólise e a íons metálicos (ICH Q1A (R2), 2003; SILVA et al., 2009; BRASIL, 2013). O teste de fotoestabilidade pode ser avaliado nas condições preconizadas pelo ICH Q1B (1996), submetendo a substância à irradiação ultravioleta. As amostras após submissão as condições de estresse são avaliadas utilizando técnicas analíticas de alta sensibilidade, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em que a formação de produtos de degradação podem ser identificadas, e a extensão desta degradação pode ser quantificada utilizando um padrão de referência. Alguns caminhos de degradação podem ser complexos. Nem sempre os produtos de decomposição formados nas condições de estabilidade intrínseca, mais drásticas, são observados nos medicamentos submetidos às condições oficiais dos estudos de estabilidade (UNITED, 2008; ICH Q1A (R2), 2003; BRASIL, 2005).

Além da avaliação de aspectos relacionados à estabilidade intrínseca do fármaco, o estudo do prazo de validade de uma forma farmacêutica é um dos principais fatores avaliados no desenvolvimento de um medicamento. Estes estudos são realizados rotineiramente pela indústria farmacêutica, porém, requerem longos períodos de armazenamento das amostras, sob condições controladas de temperatura e umidade (BRASIL, 2005).

A cinética de degradação também é utilizada para avaliar a estabilidade do fármaco, seja quanto à extensão da degradação, quanto ao t_{90} (tempo para degradar 10% do fármaco), quanto à velocidade, quanto à facilidade de degradação (que está relacionada com a energia de ativação da reação), e torna-se interessante na comparação das condições de estresse, estabelecendo uma lógica e proporcionalidade para as reações químicas. O cálculo para a cinética de degradação em solução pode ser obtido com os modelos de zero, primeira e segunda ordem de acordo com o coeficiente de regressão linear (r) da curva de degradação. Definido o melhor modelo de ajuste: zero, primeira ou segunda ordem, é possível calcular a constante de velocidade de degradação (k) para cada temperatura com auxílio da inclinação das retas e proceder aos demais cálculos cinéticos por meio da equação de Arrhenius (KIM, 2004; MACEDO et al., 2002; MACEDO & NASCIMENTO, 2002; RODRIGUES et al., 2005; MEDEIROS et al., 2001; SOUZA et al., 2003a; SOUZA et al., 2003b; CIDES et al., 2006; MACEDO et al., 2001; YOSHIDA et al., 2011a; YOSHIDA et al., 2010).

1.5 Estudo da formulação farmacêutica por meio de análises instrumentais

Embora não substituam os estudos convencionais, as técnicas termo analíticas, como Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), mostram-se extremamente úteis em estudos de estabilidade, possibilitando a escolha das formulações mais estáveis com extrema rapidez por meio dos estudos de compatibilidade. A DSC pode ser utilizada na caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos, estudos de estabilidade e compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismo com o aparecimento de múltiplos picos de fusão relacionados a cada forma cristalina. O polimorfismo pode ser identificado com o somatório de técnicas entre elas a Difração de raios X (DRX) em que pode-se observar a presença de picos de

difração em ângulos distintos para cada forma cristalina e se observam diferenças na intensidade, em planos específicos de reflexão, o que sugere cristais de mesma cela unitária com orientação preferencial para o desenvolvimento macroscópico dos cristalitos de formas diferentes; na curva DSC observa-se a presença de picos de fusão característicos de cada forma e na microscopia óptica com a visualização das diferentes formas espaciais dos cristais, sendo possível observar o polimorfismo. Outra constatação possível com o uso da DSC junto a análise por DRX, é a verificação de processos de amorfização de fármacos na presença de alguns excipientes através da observação dos picos de fusão nas curvas de DSC e dos picos de difração nos difratogramas de DRX (OLIVEIRA et al, 2010, YOSHIDA et al., 2011a; YOSHIDA et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011; YOSHIDA et al., 2010).

A termogravimetria (TG) é outra técnica termo analítica, sendo empregada para medir a variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento. Para fins farmacêuticos é utilizada na caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação isotérmica (OLIVEIRA et al, 2010, YOSHIDA et al., 2011a; YOSHIDA et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011; YOSHIDA et al., 2010).

1.6 Cinética de degradação em estado sólido

A cinética de degradação em meio sólido pode ser obtida através de dois métodos, sendo (i) isotérmico ou (ii) não isotérmico/dinâmico, estes métodos possuem modelos matemáticos específicos para ajuste, que consideram o processo de degradação e a ordem da reação; e também utilizam-se da equação de Arrhenius para os cálculo de t_{90} , energia de ativação e fator pré-exponencial. Os modelos cinéticos em estado sólido podem ser reduzidos entre três principais tipos: acelerantes, desacelerantes, e sigmoidais ou autocatalíticos. O modelo do tipo acelerante representa o processo em que a taxa de conversão aumenta continuamente à medida que se aumenta a extensão da reação e alcança seu máximo ao final do processo. O modelo desacelerante representa o processo cuja taxa tem um máximo no início do processo e diminui sucessivamente à

medida que a conversão aumenta. O modelo sigmoidal representa o processo cujo estados inicial e final demonstram respectivamente o comportamento acelerante e desacelerante, de modo que a taxa alcance seu máximo em algum valor intermediário da extensão de conversão (KHAWAM e FLANAGAN, 2006; GALWEY e BROWN, 1998). As equações cinéticas que delineiam a decomposição térmica são classificadas em tipos de processos distintos, sendo estes os processos controlados por nucleação, por mecanismos de difusão e por reações na fase limítrofe, abrangendo aspectos geométricos e físico-químicos, dependendo da etapa determinante da velocidade de reação (MATTOS et al., 1995).

Nos processos controlados por nucleação, a nucleação é seguida pelo crescimento nuclear, com ou sem sobreposição de núcleos, e são avaliadas as velocidades das duas etapas, sendo estas significativas na descrição cinética da decomposição (WENDLANT, 1986). As cinéticas de muitas reações no estado sólido foram descritas por modelos de nucleação baseados no modelo de Avrami (1939). Estas reações incluem cristalização, transição cristalográfica, desolvatação, adsorção e decomposição (CERCENA, 2013).

O processo de difusão (D) engloba diversos tipos de mudanças químicas envolvendo sólidos, sendo que a nucleação é instantânea e a continuidade da reação ocorre por interpenetração das partículas reagentes, que possivelmente constituem a etapa determinante da velocidade do processo (WENDLANT et al., 1973; SESTAK, 1979). Podem ser destacados dois importantes modelos de reação em que a cinética é controlada por difusão: (i) a decomposição de sólidos em que a taxa de reação é controlada pela liberação difusiva de um produto volátil; (ii) as reações entre sólidos em que um produto sólido é formado entre os reagentes, de modo que o progresso é mantido pelo transporte através da camada de barreira. A taxa de formação dos produtos diminui proporcionalmente com a espessura da camada de barreira do produto (GALWEY e BROWN, 1999).

No modelo de contração geométrica (R) a nucleação ocorre rapidamente na superfície do cristal que causa o impedimento da combinação dos reagentes. A velocidade da transformação é conduzida pelo movimento da interface, sendo

que as relações entre a fração decomposta e o tempo podem ser encontradas a partir de considerações geométricas (KHAWAM e FLANAGAN, 2006).

Os modelos baseados na ordem da reação (F) são os mais simples, similares àqueles utilizados em estudos de cinética homogênea. Nesses modelos, a taxa de reação é proporcional à concentração, quantidades ou frações restantes dos reagentes elevados a uma potência específica podendo ser inteira ou fracionada, que corresponde à ordem de reação (n) (CERCENA, 2013). Desta forma, a estabilidade intrínseca e os estudos de cinética são partes fundamentais na pesquisa de possíveis produtos de degradação dos fármacos; no entanto, estes produtos podem não serem formados nas condições normais de armazenamento dos medicamentos (YOSHIDA et al., 2011a; YOSHIDA et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar e analisar as formulações farmacêuticas de sirolimus com polímeros naturais e sintéticos na confecção de implantes biodegradáveis para o tratamento de tumores malignos sólidos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar as características térmicas do fármaco sirolimus e polímeros (PLGA 50:50, PLGA 75:25, policaprolactona e quitosana) por DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) e TG (termogravimetria);
2. Avaliar as características dos cristais no fármaco por difração de raios X (DRX) e microscopia ótica;
3. Avaliar a existência de características cristalinas nos polímeros por DRX;
4. Avaliar a compatibilidade das amostras liofilizadas para produção dos implantes constituídos com diferentes polímeros por DSC e DRX;
5. Avaliar a estabilidade intrínseca do fármaco em solução, após submissão às condições de estresse e determinar a cinética de possíveis reações de degradação;
6. Avaliar a estabilidade do fármaco em estado sólido e determinar a cinética de possíveis reações de degradação;
7. Analisar e determinar o teor do fármaco nas amostras liofilizadas para elaboração dos implantes por CLAE.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

O fármaco utilizado no desenvolvimento do trabalho, e os demais insumos e produtos finais analisados foram doados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

Para realização dos testes foram analisados:

- a) Fármaco sirolimus – fabricante Cristália, lote 09763/2009;
- b) Copolímero derivado dos ácidos láctico e glicólico PLGA 50:50 – fabricante Evonik, lote R1204000505;
- c) Copolímero derivado dos ácidos láctico e glicólico PLGA 75:25 – fabricante Evonik, lote 1036455;
- d) Policaprolactona – fabricante Aldrich, lote MKBH7023V;
- e) Quitosana – fabricante Aldrich, lote MKBF1336V;
- f) Amostras das quatro formulações com a concentração de 25% do fármaco após processo de liofilização para obtenção dos implantes biodegradáveis contendo Sirolimus.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção dos implantes

Os implantes biodegradáveis contendo sirolimus foram preparados utilizando PLGA 50:50, PLGA 75:25, PCL e quitosana como matrizes poliméricas, obtendo-se quatro implantes distintos. O fármaco sirolimus foi empregado na concentração de 25% para cada polímero nos implantes.

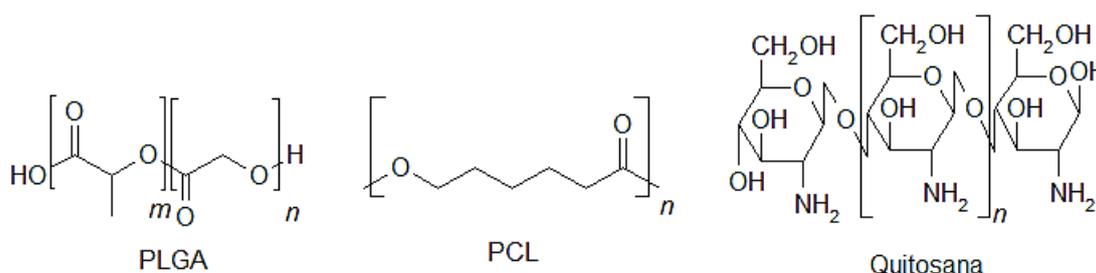


Figura 3 – Estruturas moleculares dos polímeros PLGA, PCL e quitosana.

As quatro formulações de implantes foram produzidos utilizando a técnica descrita por Fialho e Silva-Cunha (2005), sendo que cada polímero e o fármaco foram dissolvidos individualmente em volume mínimo do solvente acetonitrila, utilizando banho de ultrassom na temperatura de 40 °C por 10 minutos. Em seguida, um volume mínimo de água foi adicionado à solução anterior. A solução resultante foi congelada em nitrogênio líquido e, em seguida, as amostras foram liofilizadas para remoção do solvente. O pó liofilizado foi utilizado para o preparo dos implantes pelo método de moldagem a quente, utilizando placa antiaderente (Teflon) aquecida entre 80 °C e 100 °C. Foram cortados implantes em bastões, obtidos de 1 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento, posteriormente pesados e medidos com paquímetro.

Para a realização dos testes optou-se pela utilização das amostras dos pós após processo de liofilização, etapa anterior a obtenção dos implantes.

3.2.2 Análise térmica

3.2.2.1 Termogravimetria / Termogravimetria derivada (TG/DTG)

As curvas TG/DTG foram obtidas na termobalança modelo DTG 60 (Shimadzu, Japão), alocada no departamento de Química da UFMG, numa faixa de temperatura entre 25 e 700 °C, utilizando cadinhos de alumina contendo aproximadamente 3 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e 20 °C min⁻¹. A técnica foi empregada para análise do fármaco, polímeros e pós liofilizados, utilizando as mesmas condições de análise.

3.2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas na célula DSC-60 (Shimadzu, Japão) alocado no departamento de Química da UFMG, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹, cadinho de alumina parcialmente fechado e massa de amostra em torno de 1 mg, com razão de aquecimento inicial de 10 °C min⁻¹ numa faixa de temperatura entre 25 e 450 °C. O equipamento foi calibrado com índio (PF 156,6 °C; $\Delta H_{fus} = 28,5 \text{ J g}^{-1}$) e chumbo (PF 327,5 °C). A avaliação de pureza por DSC foi feita através da aplicação da Equação de Van't Hoff na faixa de fusão do fármaco, utilizando-se o software *Purity Determination Program version 2.20* da Shimadzu.

Realizando a avaliação de pureza absoluta utilizando o método da equação de Van't Hoff:

$$T_s = \frac{T_o - RT_o^2 X_1}{\Delta H_f} * \left(\frac{1}{F} \right) \quad (1)$$

Onde:

T_s = temperatura da amostra (K); T_o = temperatura de fusão teórico do analito puro (K); R = constante dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$); X_1 = fração molar da impureza; ΔH_f = calor de fusão do componente principal puro (J mol^{-1}); F = fração da amostra que fundiu em T_s .

3.2.3 Difração de Raios X (DRX)

As análises DRX para o fármaco foram obtidas em um difratômetro modelo XRD-7000 (Shimadzu, Japão), alocado no departamento de Química da UFMG, sob 40kV, 30mA, munido de um filamento de cobre e um monocromador de grafite, com radiação $K_{\alpha 1Cu}$ com $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$. O porta amostra foi submetido à rotação de 30 rpm para prevenir orientação preferencial e minimizar efeitos de rugosidade. As medidas foram realizadas sob a ótica paralela policapilar. Os dados foram obtidos na faixa de $4 - 70^\circ$ em 2θ , com incremento de $0,01^\circ 2\theta$ e constante de tempo de incremento de 5 segundos por incremento. A amostra do SRL foi submetida à análise segundo o algoritmo de Rietveld para a determinação precisa dos parâmetros de rede.

As análises DRX para os polímeros e pós liofilizados foram obtidas no mesmo equipamento.

3.2.4 Análise por microscopia ótica

Para a análise por microscopia ótica, foi utilizado o Microscópio Binocular Biológico, marca Coleman, modelo DN-107, alocado no laboratório de Controle de Qualidade da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES), com lente ocular WF 10X de grande campo e objetivas inferiores plana: PL 4X, PL 10X, PL 40X, PL 100X. O equipamento possui câmera de vídeo digital integrada ao cabeçote com resolução de 1.3 MP.

3.2.5 Estudos Cromatográficos

Os estudos cromatográficos foram realizados a fim de se determinar a estabilidade intrínseca do fármaco e analisar os implantes liofilizados. O Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência utilizado foi da marca Waters, com autoinjeter, detector de arranjo de diodos UV/DAD e forno de colunas, do

Laboratório de Controle de Qualidade em medicamentos no Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES).

Para realização das análises, foram testadas quatro diferentes colunas cromatográficas de fase reversa, C8 e C18 provenientes de distintos fabricantes, variando a temperatura da coluna em 30, 40 e 50°C, o comprimento de onda de detecção, e o volume de injeção das amostras, com a finalidade de otimizar a metodologia (RICCIUTELLI et al, 2006; ZECH et al, 2011; ISLAMBULCHILAR et al, 2012; SOBHANI et al, 2013).

A condição cromatográfica otimizada foi: coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm, Varian); fase móvel: metanol/água (80:20); com fluxo de 1,5 mL min⁻¹; volume de injeção de 20 µL; detecção por absorção no UV com $\lambda = 278$ nm; e temperatura de 50 °C.

3.2.5.1 Estudo de degradação do fármaco em meio líquido (solução) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

No estudo de degradação do fármaco em meio líquido para determinação da estabilidade intrínseca em solução, o SRL foi submetido a condições drásticas de estresse. As condições de estresse em hidrólise básica e ácida, foram adaptadas afim de se obter uma concentração destes agentes de estresse que permitisse a detecção dos produtos de degradação e do fármaco na amostra. Uma solução padrão estoque do fármaco sirolimus foi preparada na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ e solubilizada em metanol. A partir desta solução, foram preparadas as amostras que foram submetidas aos testes iniciais de estresse segundo a RDC 58/13 e o ICH (Q1A e Q1B) como segue abaixo:

- Exposição ao calor: Da solução inicial, uma alíquota de 20 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, e o volume completado com metanol. Em seguida a solução foi aquecida em banho maria a 60 °C durante 4 horas. Após esse tempo, a amostra foi diluída em metanol até a concentração de 0,01 mg mL⁻¹.
- Hidrólise neutra: Da solução inicial, uma alíquota de 20 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, com 20 mL de água destilada, e o volume do balão completado com metanol. Em seguida a solução foi

aquecida em banho maria a 60 °C durante 4 horas. Após esse tempo, a amostra foi diluída em metanol até a concentração de 0,01 mg mL⁻¹.

- Hidrólise alcalina: Da solução inicial, uma alíquota de 20 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, com 20 mL de hidróxido de sódio 0,0005 M (pH 10,7), e o volume do balão completado com metanol. Em seguida a solução foi aquecida em banho maria a 60 °C durante 4 horas. Após esse tempo, a amostra foi diluída em metanol até a concentração de 0,01 mg mL⁻¹.
- Hidrólise ácida: Da solução inicial, uma alíquota de 20 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, com 20 mL de ácido clorídrico 0,005 M (pH 2,3), e o volume do balão completado com metanol. Em seguida a solução foi aquecida em banho maria a 60 °C durante 4 horas. Após esse tempo, a amostra foi diluída em metanol até a concentração de 0,01 mg mL⁻¹.
- Oxidação: Da solução inicial, uma alíquota de 20 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, com 20 mL de peróxido de hidrogênio a 3%, e o volume do balão completado com metanol. Em seguida a solução foi aquecida em banho maria a 60 °C durante 4 horas. Após esse tempo, a amostra foi diluída em metanol até a concentração de 0,01 mg mL⁻¹.
- Exposição à luz ultravioleta: Da solução inicial, uma alíquota de 20 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, completado volume com metanol, e posteriormente foi submetida por 4 horas à exposição em câmara de radiação ultravioleta, a energia de uma lâmpada em 254 nm. Após esse tempo, a amostra foi diluída em metanol até a concentração de 0,01 mg mL⁻¹.
- Exposição a íons metálicos: Da solução inicial, uma alíquota de 20 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, com 20 mL de solução de Fe²⁺ 0,05 M, e o volume do balão completado com metanol. Em seguida a solução foi aquecida em banho maria a 60 °C durante 4 horas. Após esse tempo, a amostra foi diluída em metanol até a concentração de 0,01 mg mL⁻¹.

3.2.5.2 Cinética de degradação do fármaco em meio líquido (solução)

O SRL foi submetido às condições de estresse, segundo item 3.2.5.1. Estudos adicionais foram realizados com coletas em diferentes tempos e temperaturas, com amostras preparadas em quadruplicata, para possibilitar o cálculo de cinética de degradação do fármaco em solução. Os testes adicionais foram realizados conforme especificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Testes adicionais de degradação forçada para cálculo de estabilidade intrínseca do fármaco

Condição de estresse	Alíquotas coletadas	Temperatura			
		50°C	60°C	70°C	80°C
Calor	1	60 min	60 min	45 min	30 min
	2	120 min	120 min	90 min	60 min
	3	180 min	180 min	135 min	90 min
	4	240 min	240 min	180 min	120 min
Hidrólise Neutra	1	60 min	60 min	60 min	60 min
	2	120 min	120 min	120 min	120 min
	3	180 min	180 min	180 min	180 min
	4	240 min	240 min	240 min	240 min
Hidrólise Básica	1	60 min	45 min	30 min	15 min
	2	120 min	90 min	60 min	30 min
	3	180 min	135 min	90 min	45 min
	4	240 min	180 min	120 min	60 min

A avaliação da cinética de degradação do fármaco em solução foi realizada por meio de cálculos extrapolados utilizando a Equação de Arrhenius para a previsão de prazo de validade a 25 °C. Foram determinadas e estudadas as possíveis reações químicas do fármaco sob estresse, utilizando CLAE, e calculado a cinética de degradação. O melhor modelo de ajuste de degradação: zero, primeira ou segunda ordem, tabela 2, foi definido de acordo com o coeficiente de regressão linear (r) da curva de degradação, e posteriormente foi possível calcular a constante da velocidade de degradação (k) para cada temperatura com auxílio da inclinação das retas.

Com a constante de velocidade da reação (k) para cada temperatura, calculou-se a energia de ativação (E_a), a velocidade de degradação à 25°C ($k_{25^\circ\text{C}}$), e ao final estimou-se o tempo necessário para degradar 10% do fármaco (t_{90} do fármaco) em uma condição específica a 25 °C.

Tabela 2 – Equações utilizadas para descrever a cinética de degradação isotérmica

Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem
$C = -kT + C_0$	$\ln C = -kT + \ln C_0$	$1/C = kT + 1/C_0$
$t_{90} = (0,1 * C_0)/k$	$t_{90} = 0,105 / k$	$t_{90} = 1 / (9 * k * C_0)$

Em que temos:

C = concentração (%); k = constante de velocidade (s^{-1}); C_0 = concentração inicial; t = tempo (s^{-1}).

Equação de Arrhenius:

$$\ln k = \ln A - \frac{-E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad (2)$$

Em que temos:

k = constante de velocidade; E_a = energia de ativação; A = constante de Arrhenius ou fator pré - exponencial; T = temperatura absoluta em Kelvin; R = constante universal dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

O método gráfico da Equação de Arrhenius, $\ln k$ versus $1/T$ é o mais utilizado para os cálculos dos parâmetros cinéticos. A inclinação da reta é definida por $E_a \times R^{-1}$, onde a energia de ativação (E_a) foi calculada multiplicando-se a inclinação pela constante universal dos gases R ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). A E_a também expressa à estabilidade do fármaco, sendo diretamente proporcional à estabilidade.

3.2.6 Estudo de cinética de degradação em estado sólido

A cinética em estado sólido tem modelos matemáticos específicos para ajuste que consideram o processo de degradação e a ordem da reação, conforme descritos na tabela 3.

Utilizou-se o método isotérmico que é amplamente utilizado para acompanhar a cinética de uma reação de decomposição no estado sólido. Curvas TG isotérmicas do SRL foram obtidas em temperaturas (T) previamente estabelecidas levando-se em conta a parte inicial do processo de degradação do SRL, e gráficos de tempo (t) *versus* fração decomposta (α) confeccionados para avaliação da cinética.

A maioria das reações do estado sólido podem ser representadas por equações do tipo:

$$g(\alpha) = k(T) t \quad (3)$$

Em que:

α = fração decomposta no tempo t; g (α) = forma matemática integrada, que representa o modelo cinético da reação; k (T) = constante de velocidade específica dada pela equação de Arrhenius.

O delineamento matemático de cada curva cinética, consiste na determinação dos coeficientes de regressão linear das equações testadas. O melhor modelo será aquele que apresentar o maior coeficiente de regressão linear (r) para os valores experimentais, ou seja, valor mais próximo de 1,0000. Determinado o melhor modelo cinético que descreve a reação em estudo, a realização de outras análises em diferentes temperaturas irá permitir que se calcule a energia de ativação através da Equação de Arrhenius na forma linearizada (DANTAS, 2006).

Tabela 3 – Equações cinéticas para a decomposição térmica em estado sólido

Símbolo da função	Mecanismo	Forma integral $g(\alpha)$
Curvas α x t aceleratórias		
Pn	Lei da potência: crescimento uni, bi, ou tridimensional à velocidade constante, sem sobreposição de núcleos	$\alpha^{1/n}$
E1	Lei exponencial	$\ln \alpha$
Curvas α x t sigmoidais		
A2	Avrami-Erofeyev crescimento nuclear bidimensional	$[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$
A3	Avrami-Erofeyev crescimento nuclear tridimensional	$[-\ln(1-\alpha)]^{1/3}$
A4	Avrami-Erofeyev	$[-\ln(1-\alpha)]^{1/4}$
B1	Prout-Tompkins	$\ln[\alpha/(1-\alpha)]$
Curvas α x t desaceleratórias		
<i>Baseados nos modelos geométricos:</i>		
R2	Contração de área	$1 - (1-\alpha)^{1/2}$
R3	Contração de volume	$1 - (1-\alpha)^{1/3}$
<i>Baseados nos mecanismos de difusão:</i>		
D1	Difusão unidimensional	α^2
D2	Difusão bidimensional (equação de Valensi)	$((1-\alpha)\ln(1-\alpha)) + \alpha$
D3	Difusão tridimensional (equação de Jander)	$[1 - (1-\alpha)^{1/3}]^2$
D4	Difusão tridimensional (equação de Ginstling-Brounshtein)	$[1 - (2\alpha/3)] - (1-\alpha)^{2/3}$
<i>Baseados na "ordem da reação"</i>		
F0	Zero ordem	α
F1	Primeira ordem: nucleação caótica, único núcleo por partícula - Lei de decaimento unimolecular (Mampel)	$-\ln(1-\alpha)$
F2	Segunda ordem	$1/(1-\alpha)$
F3	Terceira ordem	$[1/(1-\alpha)]^2$

3.2.7 Análise dos pós liofilizados para obtenção dos implantes contendo sirolimus por CLAE

Para análise das amostras de pós liofilizados, etapa anterior a obtenção do implante por moldagem em chapa quente, foram preparadas amostras pesando-se 40 mg de um pool de amostra dos pós liofilizados de cada uma das quatro formulações, com concentração de 25% do fármaco, e diluídos com metanol em balões volumétricos de 100 mL obtendo uma concentração final de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ do fármaco para cada base polimérica, posteriormente as amostras foram diluídas até uma concentração final de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e foram injetadas no cromatógrafo nas condições descritas no item (3.2.5), para avaliação da presença do fármaco e determinação do seu teor nos implantes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do fármaco SRL por análise térmica

Na curva de TG do SRL (Figura 4), com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, observa-se que o fármaco é termicamente estável até a temperatura em torno $189\text{ }^{\circ}\text{C}$. A curva de DTG indica que o processo de decomposição térmica do SRL ocorre em duas etapas totalizando uma perda de $82,0\%$ de massa, sendo a primeira degradação endotérmica de $189,1$ até $208,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a segunda degradação exotérmica de $232,9$ até $470,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na curva de DSC do SRL (Figura 4) pode-se observar um pico endotérmico correspondente à fusão do fármaco em $186,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 181,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{\text{fus}} = 61,9\text{ J g}^{-1}$), com pureza de pico de $98,6\%$ determinada por meio da equação de Van't Hoff. Após a fusão é observado outro evento endotérmico próximo a $191,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, devido ao processo inicial de degradação do SRL, e posteriormente observa-se um evento exotérmico em temperatura por volta de $199,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, atribuído à decomposição do fármaco.

Para razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, Hu e colaboradores (2012) relataram uma temperatura de fusão semelhante à encontrada no presente trabalho, em torno de $185\text{ }^{\circ}\text{C}$; e Li e seus colaboradores (2015) encontraram uma temperatura de fusão em torno de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando uma vazão de nitrogênio de 10 mL min^{-1} .

Foram realizadas também pesquisas com razão de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Na curva de TG do SRL (Figura 5), com razão de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, observou-se que os eventos de degradação praticamente foram idênticos aos encontrados na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com as mesmas temperaturas e percentuais de perda de massa. Como registro destas informações cita-se para $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$: estabilidade do fármaco até aproximados $196\text{ }^{\circ}\text{C}$; decomposição térmica do SRL em duas etapas com perda de $81,9\%$ de massa; sendo a primeira degradação endotérmica ($196,3$ até $210,6\text{ }^{\circ}\text{C}$), e a segunda degradação exotérmica ($244,4$ até $489,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Na curva de DSC a $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ do SRL (Figura 6) pode-se observar um deslocamento no pico endotérmico correspondente à fusão do fármaco, que foi para $191,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} =$

187,8 °C; $\Delta H_{fus} = 64,1 \text{ J g}^{-1}$), quando comparado ao observado na razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} , que foi de 186,0 °C. Após a fusão é observado outro evento endotérmico próximo a 208,5 °C devido ao processo inicial de degradação do SRL e posteriormente observa-se um evento exotérmico, em temperatura por volta de 218,2 °C, atribuído à decomposição do fármaco.

Na literatura, Emami e seus colaboradores (2014) realizaram a curva de DSC com razão de aquecimento de 20 °C min^{-1} , e relatam a existência de dois picos endotérmicos, nas temperaturas de 191,4 e 205,3 °C.

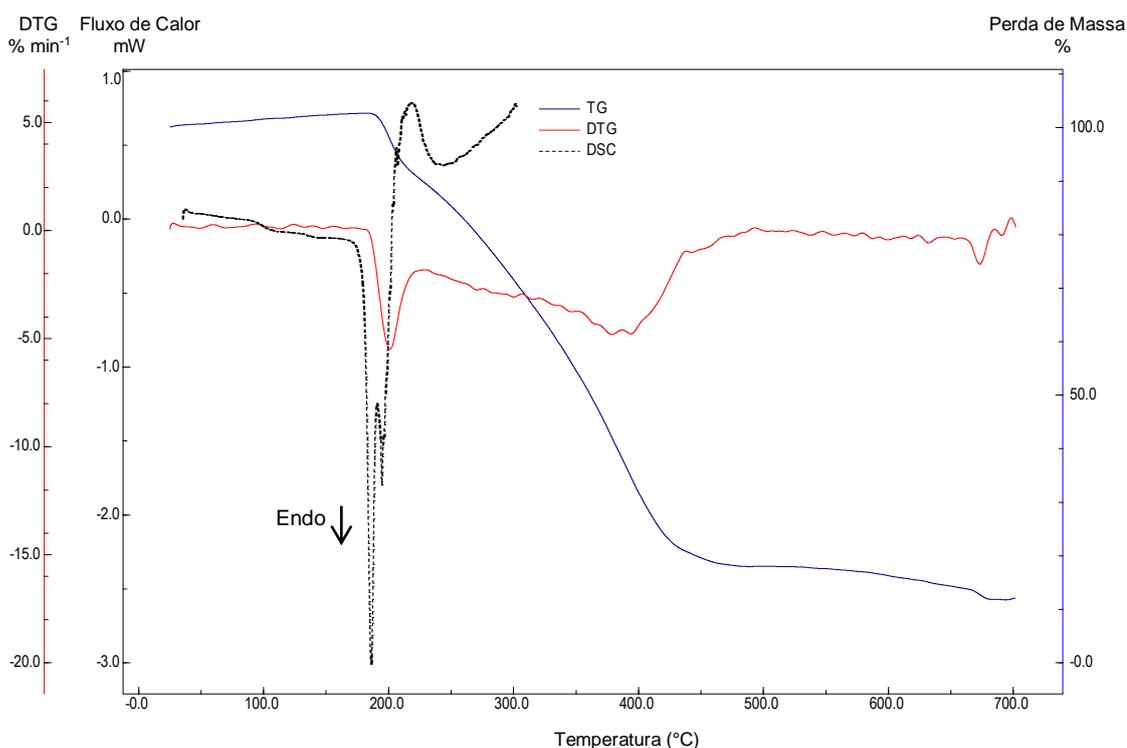


Figura 4 - Curvas de DSC e de TG/DTG do SRL obtidas a 10 °C min^{-1} sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

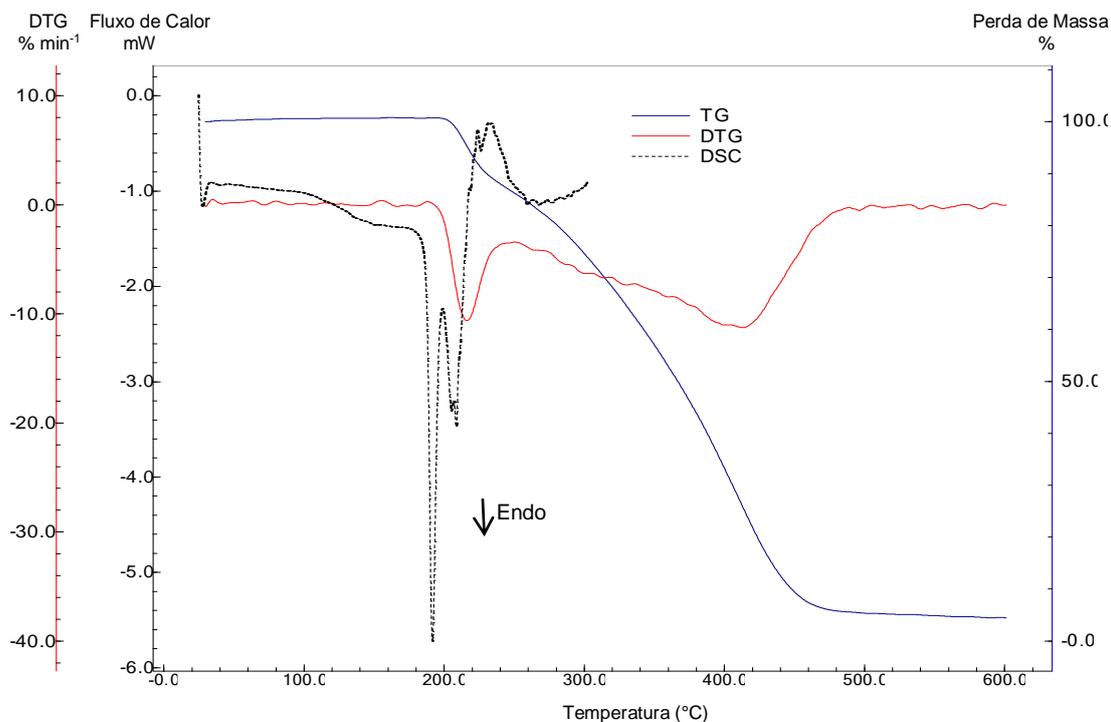


Figura 5 – Curvas de DSC e de TG/DTG do SRL obtidas a $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

Os dados das curvas de DSC do fármaco SRL, nas razões de aquecimento de 10 e $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ também podem ser visualizados na tabela 4 e Figura 6. Com o aumento da razão de aquecimento, pode-se observar um deslocamento na temperatura de fusão e um alargamento da faixa de fusão do fármaco, este comportamento pode ser atribuído ao fato da amostra ter menos tempo para absorver calor e fundir homogeneamente numa temperatura constante. Em vez disso, o dispositivo de calor pode aquecer bem acima da faixa real de fusão antes que o interior funda, assim a faixa de fusão observada pode ser em temperaturas mais elevadas para razões de aquecimento maiores. Este deslocamento devido ao aquecimento pode ser observado no SRL com o aumento da razão de aquecimento para $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Comportamento similar foi observado para a temperatura de fusão da α -D-glicose (MÁGON & PYDA, 2011).

Tabela 4 – Faixas de temperatura de fusão e valores de calor de fusão do SRL em diferentes razões de aquecimento

Razão de aquecimento (°C min ⁻¹)	T _{Onset} (°C)	T do pico (°C)	T _{Endset} (°C)	Faixa de Fusão (°C)	Energia de Fusão (J g ⁻¹)
10	181,5	186,0	189,0	7,5	61,9
20	187,8	191,5	195,4	7,6	64,1

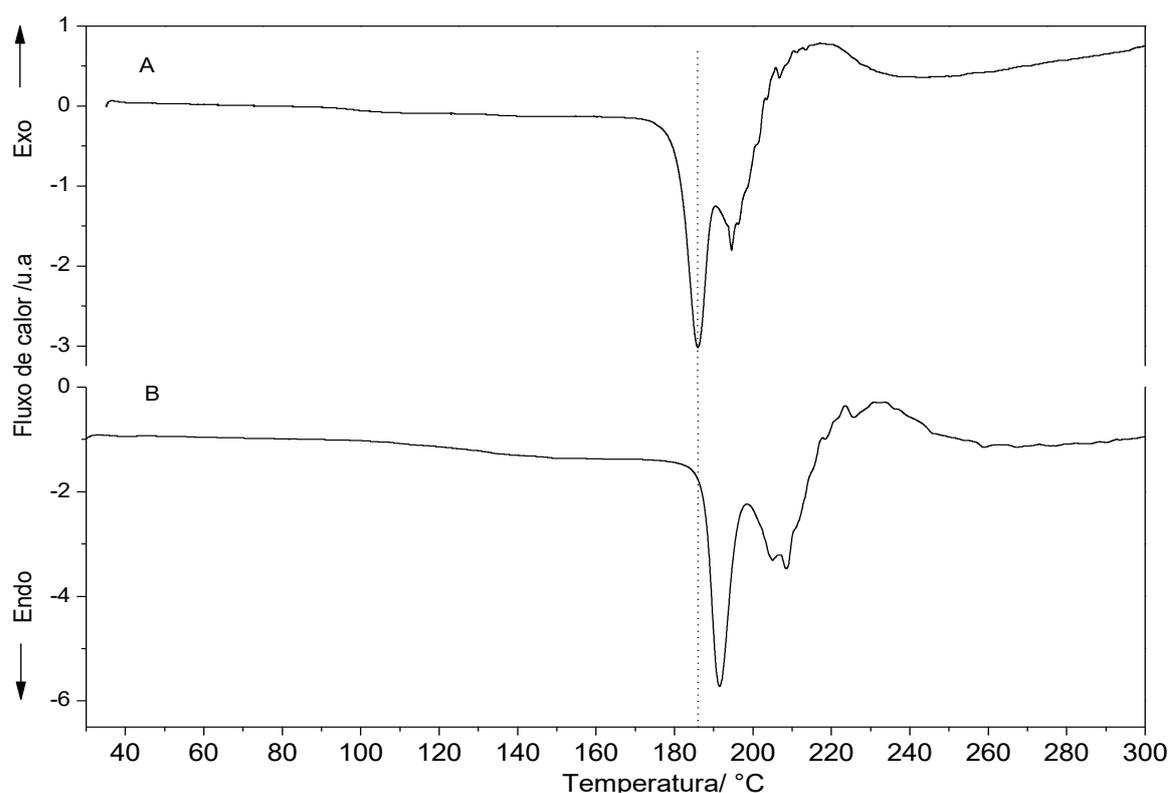


Figura 6 – Sobreposição de curvas de DSC do SRL obtidos com diferentes razões de aquecimento em atmosfera dinâmica de nitrogênio: (A) 10 °C min⁻¹ e (B) 20 °C min⁻¹.

Na realização dos testes de análise térmica de fármacos e excipientes, a razão de aquecimento utilizada como parâmetro para caracterização deve ser a 10 °C min⁻¹ (OLIVEIRA et al, 2011), pela confiabilidade dos acontecimentos térmicos na amostra. Os estudos adicionais realizados, com razão de aquecimento a 20 °C min⁻¹ foram necessários para melhor avaliação do estudo de compatibilidade do SRL com os polímeros e os pós liofilizados.

4.2 Caracterização do fármaco SRL por DRX e microscopia

No difratograma de raios X do SRL (Figura 7), observa-se um padrão de difração típico para o fármaco com diversos picos entre 5 e 27° (2θ), com 3 picos principais de alta intensidade em aproximadamente 7,2; 10,0 e em 14,6° (2θ). O SRL cristaliza-se segundo o grupo espacial $P2_12_12_1$ (Figura 8), com sistema ortorrômbico e na Figura 9 podemos observar suas características cristalinas em análise microscópica com aumento de 40X. Os parâmetros de rede ajustados segundo o algoritmo de Rietveld correspondem a: $a = 12,065 \pm 0,002\text{Å}$, $b = 12,838 \pm 0,001\text{Å}$ e $c = 34,263 \pm 0,002\text{Å}$. No pico em aproximadamente 45° (2θ), o excesso visto se deve somente ao alumínio (Al) do porta amostra.

Kim e colaboradores (2011) obtiveram resultados semelhantes com picos de alta intensidade em 7,2; 9,9; 10,2; 11,1; 12,5; 14,5; 15,3; 15,5; 16,2; 20,0; 20,4 e 21,8° (2θ), sendo os 3 picos principais em 7,2; 10,2 e 14,5°. Hu e colaboradores (2012) observaram o mesmo comportamento cristalino do fármaco com 3 picos principais de alta intensidade similares aos obtidos neste trabalho.

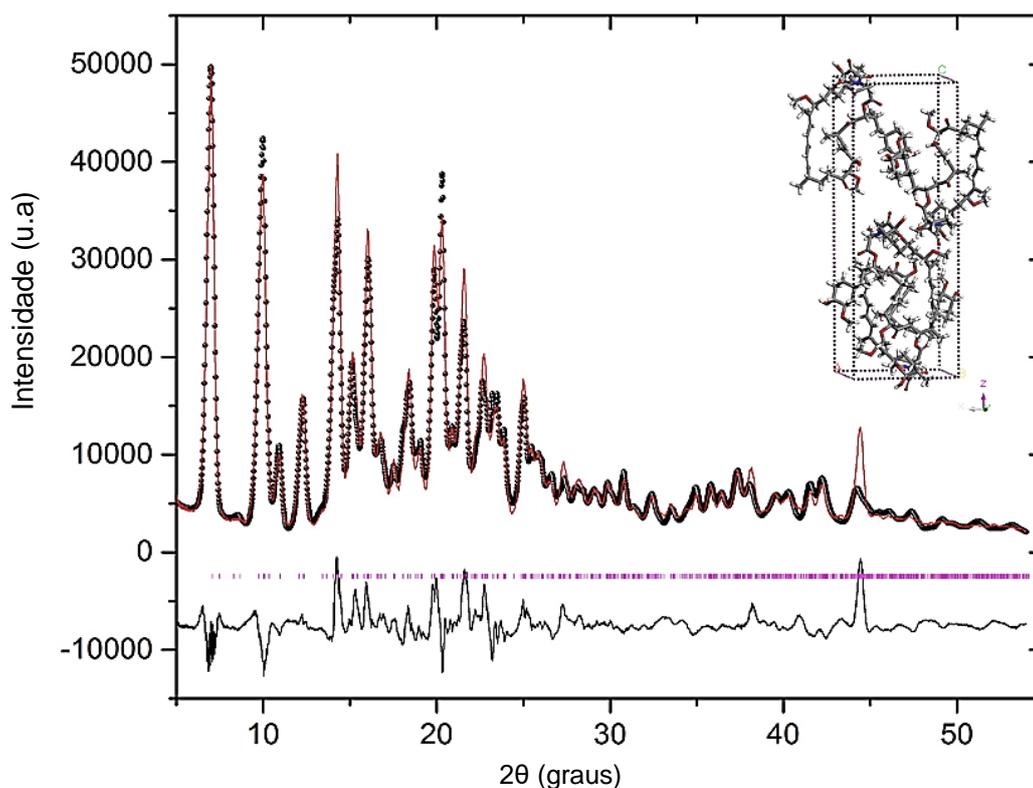


Figura 7 – Difratograma de raios X do SRL ajustado pelo método de Rietveld.

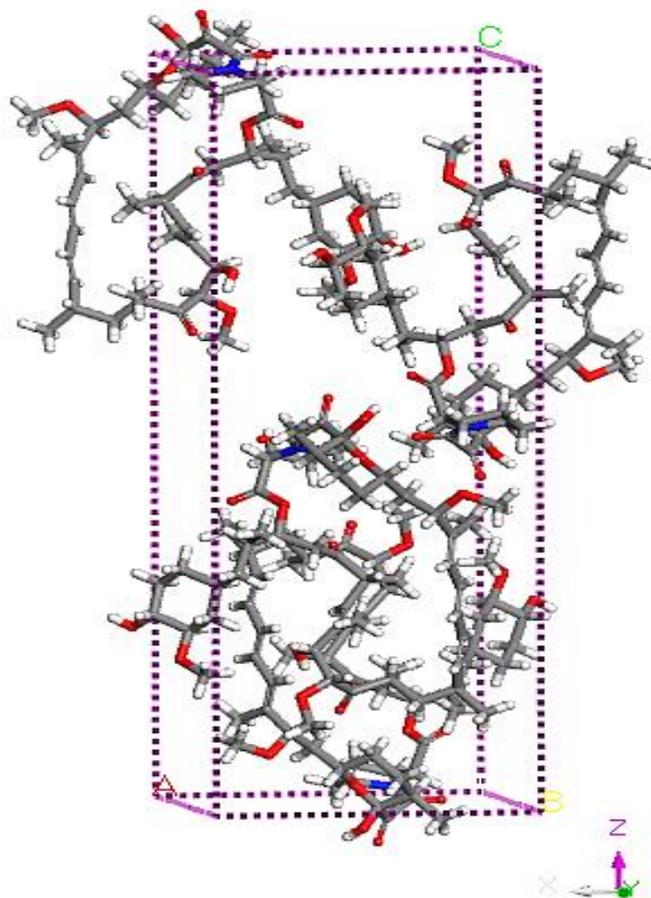


Figura 8 – Célula unitária do SRL obtida pelo rearranjo de Rietveld (átomos de carbono em cinza, hidrogênio em branco e nitrogênio em azul).

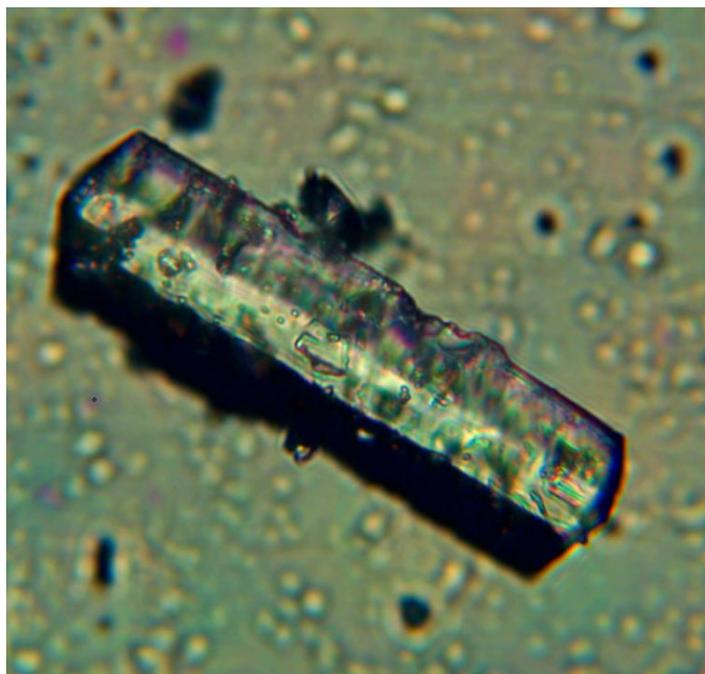


Figura 9 – Análise microscópica SRL com aumento de 40X.

4.3 Caracterização dos polímeros por análise térmica

4.3.1 Quitosana

Para a Quitosana, as curvas de TG/DTG (Figura 10) realizadas com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, demonstram a perda de massa em duas etapas, totalizando uma perda de 57,4 % de massa, sendo que a primeira degradação é endotérmica e ocorre com temperatura entre 48,1 e 68,2 $^{\circ}\text{C}$, resultando em perda de massa de 9,8 %, e a segunda degradação é exotérmica, ocorrendo entre 281,3 e 324,1 $^{\circ}\text{C}$ com perda de 47,6 % de massa.

Neto e colaboradores (2005) obtiveram resultados semelhantes e descreveram a perda de massa em duas etapas, a primeira iniciando por volta dos 60 $^{\circ}\text{C}$, com perda inicial de 10 % e a segunda etapa iniciando em 240 $^{\circ}\text{C}$ atingindo a máxima a 380 $^{\circ}\text{C}$ e com perda de massa de 41,4 %, o que totalizou uma perda final de 51,4 %. Outros estudos como os de Nieto et al. (1991), Tirkistani (1998), e Zawadzki e Kaczmarek (2010), obtiveram resultados similares e atribuem o primeiro evento constatado à perda de água pela molécula e a segunda perda sendo correspondente à decomposição da quitosana, vaporização e eliminação de produtos voláteis. Esta última fase predominante de degradação da quitosana também foi observada nos estudos de Bengisu e Yilmaz (2002); Pawlak e Mucha (2003); Wanjunn et al., (2005); Zawadzki e Kaczmarek (2010).

Na curva de DSC da quitosana (Figura 10), pode-se observar um pico exotérmico correspondente à decomposição térmica, em 306,6 $^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{onset}} = 292,2\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 118,4\text{ J g}$), resultado semelhante ao encontrado por Zohuriaan e Shokrolahi (2004), que relataram o pico exotérmico em temperatura inicial de 299,4 $^{\circ}\text{C}$, com energia absorvida no processo (ΔH) = 111,0 J/g, atribuindo-se esse gasto energético à natureza reticular da quitosana.

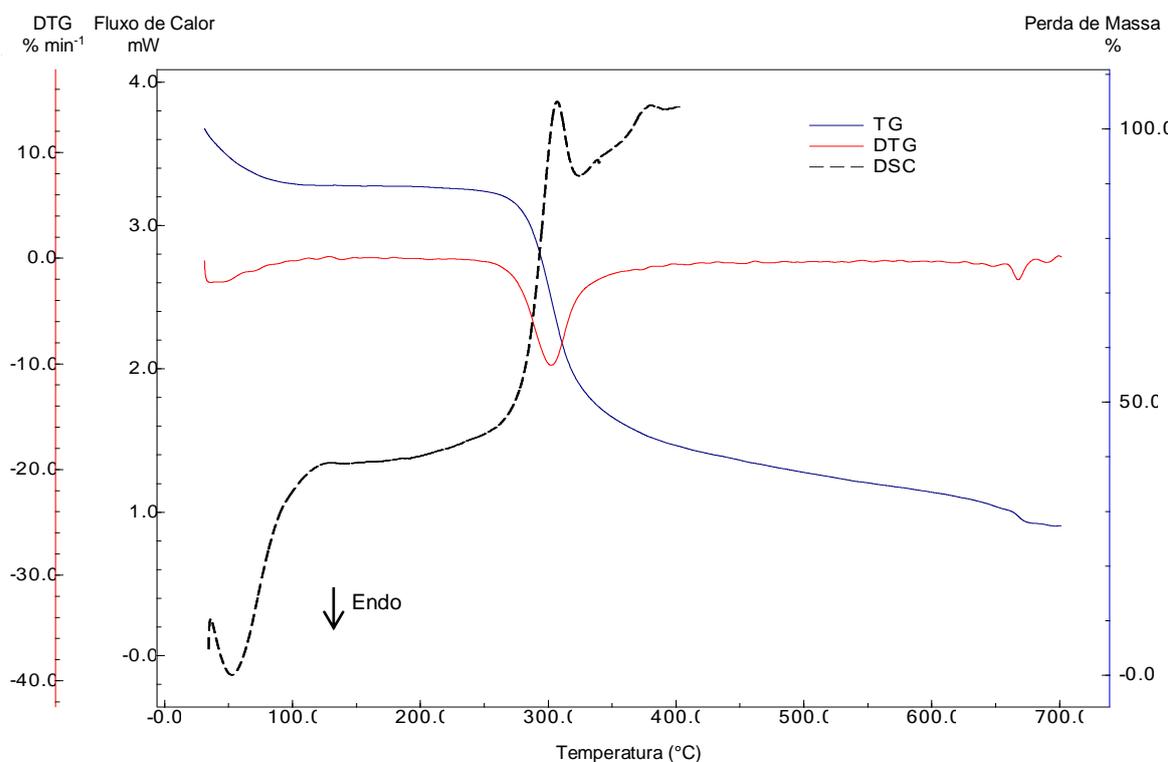


Figura 10 – Curvas de DSC e de TG/DTG da quitosana obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

4.3.2 Policaprolactona (PCL)

As curvas de TG/DTG da PCL obtidas com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ estão representadas na figura 11. A curva DTG da PLC indica que o processo de decomposição endotérmica ocorre em duas etapas endotérmicas, resultando em uma perda de 97,8 %, sendo a primeira perda de massa entre 287,9 e 300,7 $^{\circ}\text{C}$, e a segunda com temperaturas entre 389,2 e 421,7 $^{\circ}\text{C}$. Este mesmo comportamento de perda em duas etapas foi reportado por Khandanlou et al. (2014), em temperaturas entre 200,0 e 418,5 $^{\circ}\text{C}$. Mendes (2011) descreveu uma perda de massa de 97,7 % iniciando-se em 365,9 até 460,9 $^{\circ}\text{C}$, confirmados também pelos estudos de Campos et al. (2008), Fukushima et al. (2009), e Cai et al. (2014).

Na curva de DSC da PCL (Figura 11), pode-se observar um pico endotérmico em 64,2 $^{\circ}\text{C}$ correspondente à fusão do polímero ($T_{\text{onset}} = 60,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta H_{\text{fus}} = 212,6\text{ J g}^{-1}$). Cohn e Salomon (2005), Poletto et al. (2007), Fukushima et al. (2009), Mendes (2011), e Zaman e Beg (2015), obtiveram resultados semelhantes em seus estudos.

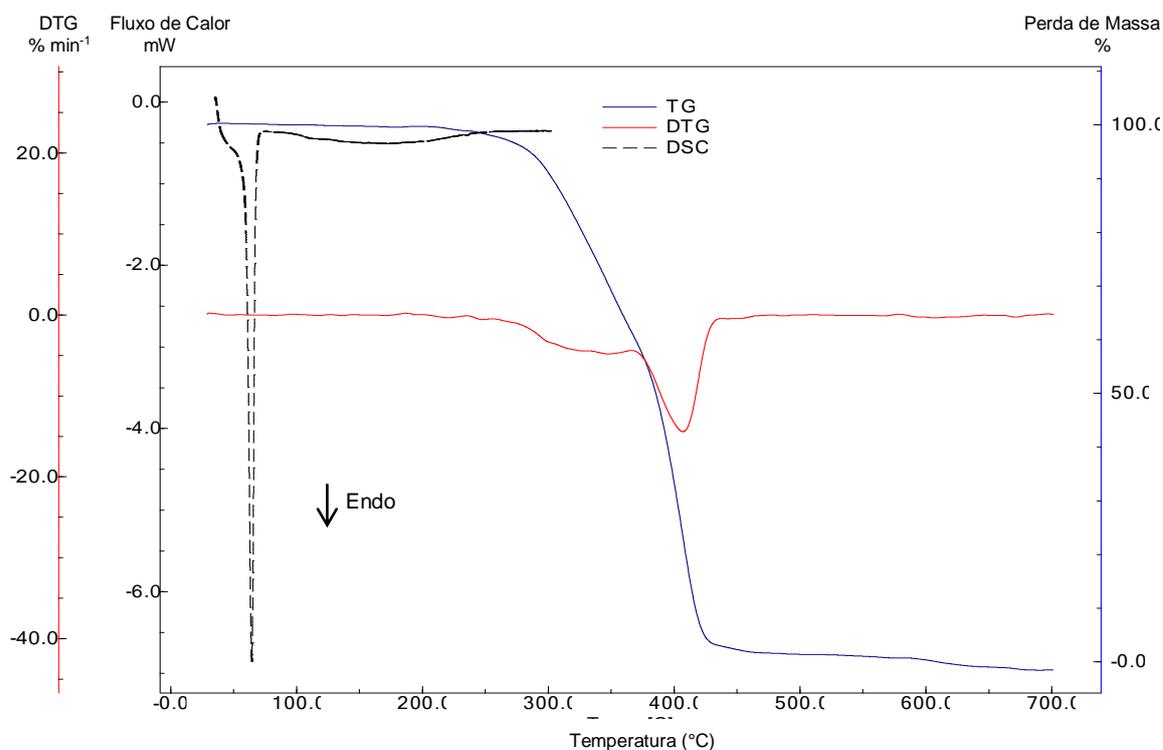


Figura 11 – Curvas de DSC e de TG/DTG da PCL obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

4.3.3 Copolímero derivado dos ácidos láctico e glicólico (PLGA 50:50)

As curvas de TG/DTG do PLGA 50:50, obtidas com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ estão representadas na Figura 12. Na curva de DTG do PLGA 50:50 pode-se observar que o processo de decomposição é endotérmico e ocorre em uma única etapa, iniciando com temperatura de $288,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ e finalizando em $347,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultando em uma perda de massa de 99,1 %. Erbetta e colaboradores (2011) reportaram uma perda de massa de 100,0 % iniciando-se em $252,0$ até $325,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Silva-Júnior et al., (2009) relatam a decomposição endotérmica com temperaturas de $309,2$ até $381,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ com perda de massa de 90,1 %. Estudos semelhantes são encontrados como os de Corrigan e Li (2009) e Silva-Júnior et al. (2008).

Na curva de DSC do PLGA 50:50 (Figura 12), pode-se observar as transições térmicas relacionadas com a transição vítrea do polímero, com temperatura entre $45,7$ e $52,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, com ponto médio em $49,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pôde-se observar também a presença de um pequeno pico de fusão aparente próxima à região onde ocorre a transição vítrea. Segundo Canevarolo (2007), este

fenômeno ocorre devido à relaxação molecular, que aparece como uma transição endotérmica próxima ao final da transição vítrea e pode estar relacionado as tensões acumuladas na amostra, que podem ser ocasionadas pelo seu processamento ou tratamento, ou ainda, pela sua história térmica e são liberadas quando o material é aquecido, gerando então um pico de “fusão aparente”.

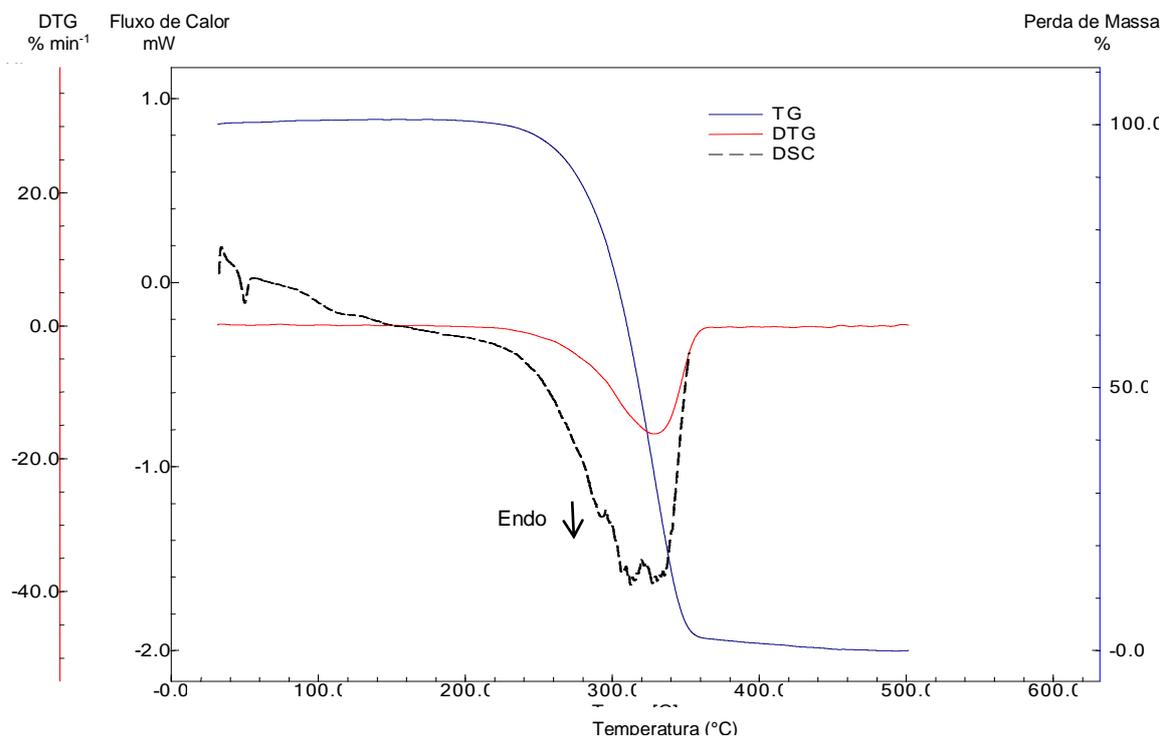


Figura 12 – Curvas de DSC e de TG/DTG do PLGA 50:50 obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

A ausência de evento de transição de fase referente à fusão pode ser justificada pelo fato que o PLGA é resultante da mistura de dois copolímeros e tratam-se de polímeros que podem ser semicristalinos ou amorfos, dependendo da proporção de cada copolímero acrescentado na mistura. Segundo Kumar e Banker (1993), copolímeros de PLGA contendo menos que 85 % de glicosídeo são amorfos, e como consequência não apresentam ponto de fusão. Este resultado é semelhante ao reportado por Silva-Júnior et al. (2009), que observaram a transição vítrea do polímero ocorrendo em temperaturas entre 45,5 e 52,4 $^{\circ}\text{C}$ com ponto médio em 43,1 $^{\circ}\text{C}$, e ao observado também no estudo de Erbetta e colaboradores (2011).

4.3.4 Copolímero derivado dos ácidos láctico e glicólico (PLGA 75:25)

As curvas de TG/DTG do PLGA 75:25, obtidas com razão aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ estão representadas na Figura 13. Na curva de DTG do PLGA 75:25, pode-se observar que o processo de decomposição é endotérmico e ocorre em uma única etapa, iniciando com temperatura de $302,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e finalizando em $357,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultando em uma perda de massa de $97,1\text{ }\%$.

Na curva de DSC do PLGA 75:25 (Figura 13), pode-se observar um evento térmico característico do copolímero e relacionado com a transição vítrea do polímero, com temperatura entre $54,9$ e $60,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com ponto médio em $58,3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este mesmo evento em temperatura por volta dos $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi constatado por Fialho e colaboradores (2007), Saliba (2007) e por Souza (2012). A presença do pico de “fusão aparente” próximo à área de transição vítrea, também pôde ser evidenciada para o PLGA 75:25 e as causas para a ocorrência deste fenômeno estão descritas na análise do PLGA 50:50.

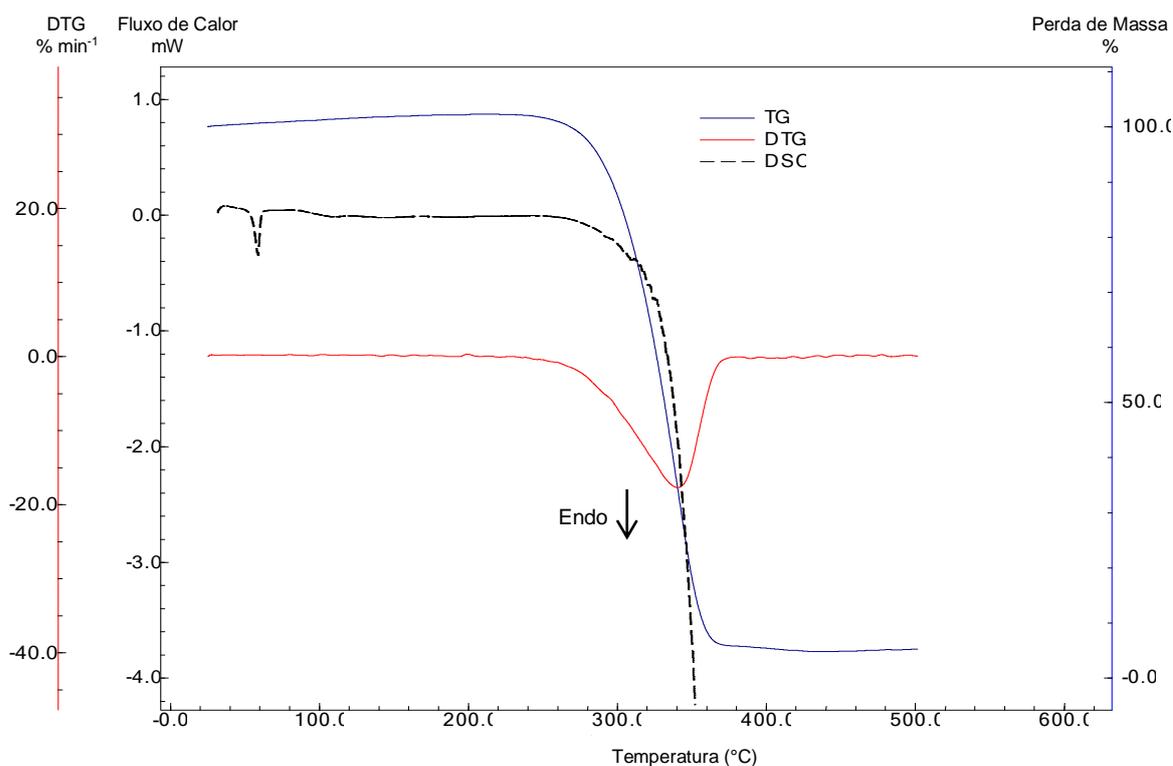


Figura 13 – Curvas de DSC e de TG/DTG do PLGA 75:25 obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

4.4 Caracterização dos polímeros por DRX

De acordo com os resultados das análises dos polímeros por DRX (Figura 14), pode-se observar que a quitosana apresenta-se na forma semicristalina com pico bem definido em 2θ aproximadamente igual a 20° e um outro pico menos definido em 2θ igual a $10,3^\circ$ e uma ampla faixa abaixo dos picos começando em aproximadamente 8° (2θ), onde predomina a forma amorfa do material, valores estes que corroboram com os obtidos por Ogawa (2004); Dallan (2005), Zhang et al. (2005), Kumirska et al. (2010), e Li e colaboradores (2013).

A quitosana pertence ao grupo dos polímeros hidrogeis, o que lhe confere a capacidade de absorver desde dezenas até centenas de vezes sua massa seca em água, sendo suas cadeias unidas por interações moleculares e/ou forças secundárias, destacando-se dentre as diversas interações intra e intermoleculares existentes as ligações de hidrogênio intermoleculares, que lhe conferem a estrutura semicristalina (KURITA, 2001; DALLAN, 2005).

No difratograma de raios X do PCL, são visualizados os picos cristalinos, bem desenvolvidos a 2θ aproximadamente em $21,3$; $21,8$ e $23,6^\circ$ atribuídos aos planos de reflexão 110, 111 e 200. Estes resultados condizem com os encontrados em diversos trabalhos como Khandanlou et al., (2014); Zing e Yang (2010); Agarwal e Speyerer (2010); Meng et al. (2010); Tamaro et al. (2009); Gonçalves (2009); Tokiwa e Calabia (2007) e Elzubair et al. (2006).

Nos difratogramas de raios X para os polímeros PLGA 50:50 e PLGA 75:25, observa-se o padrão característico para pós amorfos, o mesmo resultado foi observado por Silva – Júnior (2009) e Corrigan e Li (2009).

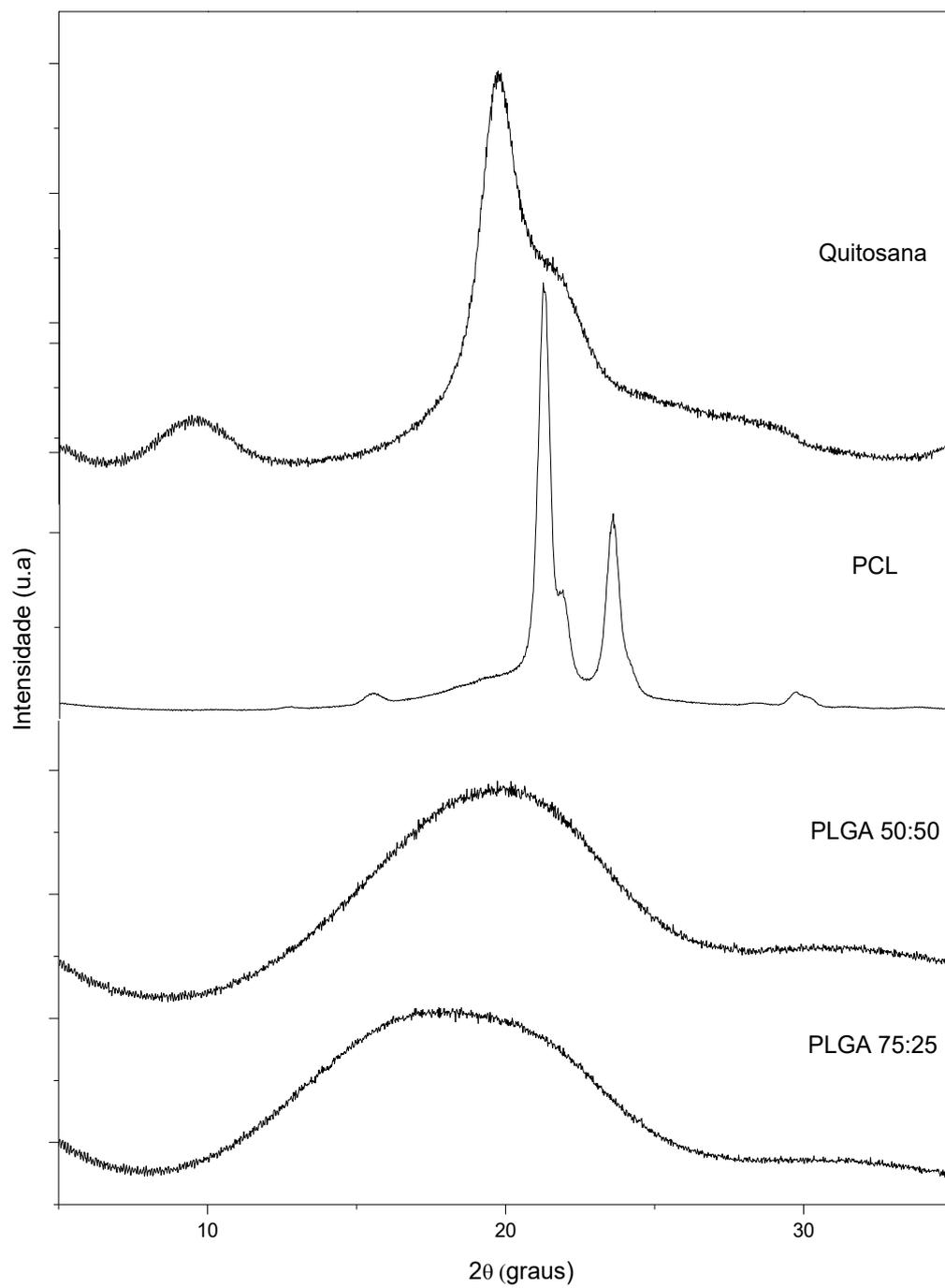


Figura 14 – Difratoogramas de raios X dos polímeros: quitosana, PCL, PLGA 50:50 e PLGA 75:25.

4.5 Estudos de compatibilidade do sirolimus com os polímeros

4.5.1 Estudo de compatibilidade por DSC

Para os estudos de compatibilidade do fármaco com os polímeros, foram obtidas as curvas de DSC inicialmente em razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, para o fármaco isolado, polímeros, misturas binárias (1:1) do fármaco e polímeros; e implantes finais liofilizados.

Nas Figuras 15,16,17 e 18, pode-se observar que os eventos térmicos mais significativos discutidos nas curvas de TG/DTG de cada componente individualmente, como a fusão do fármaco, fusão da PCL, transição vítrea dos PLGA's e desidratação com posterior decomposição da quitosana estão presentes nas misturas binárias, evidenciando, em princípio, que não há incompatibilidade entre os mesmos.

Para os resultados obtidos com os implantes confeccionados, pode-se observar a ausência do evento de fusão do fármaco, o que poderia estar relacionado à modificação da estrutura do SRL no processo de obtenção do implante.

Segundo Oliveira e colaboradores (2011), quando se avalia a compatibilidade de formulações por DSC, uma interação pode ser definida quando ocorre uma mudança no ponto de fusão, na forma, o aparecimento de uma transição, aparecimento ou desaparecimento de picos após mistura de componentes, entre outros. Porém, após mistura binária de dois componentes há invariavelmente o surgimento de uma alteração na temperatura de transição, na forma e área dos picos, e isso pode não ser uma interação prejudicial e deve ser interpretado com cuidado.

Diante da necessidade de tornar os eventos térmicos mais nítidos, decidiu-se trabalhar com a taxa de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As Figuras 19, 20, 21 e 22, mostram estes estudos de compatibilidade.

Os resultados das curvas de DSC obtidas com razão de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, para as misturas binárias do fármaco com cada polímero demonstram de maneira mais nítida não haver incompatibilidade entre os

constituintes da formulação, constando todos os eventos térmicos significativos citados e discutidos nas curvas de TG/DTG individuais, e sendo possível visualizar a fusão do SRL após ser misturado com os polímeros (misturas binárias).

A avaliação dos implantes por DSC não mostrou o pico de fusão do fármaco, fato que pode ser atribuído à amorfização que o fármaco sofreu após o processo de fabricação do implante, que apresenta etapas típicas para obtenção de pó amorfo, como solubilização e recristalização por liofilização. Para confirmação da possível amorfização do fármaco, estudos de DRX dos implantes foram necessários.

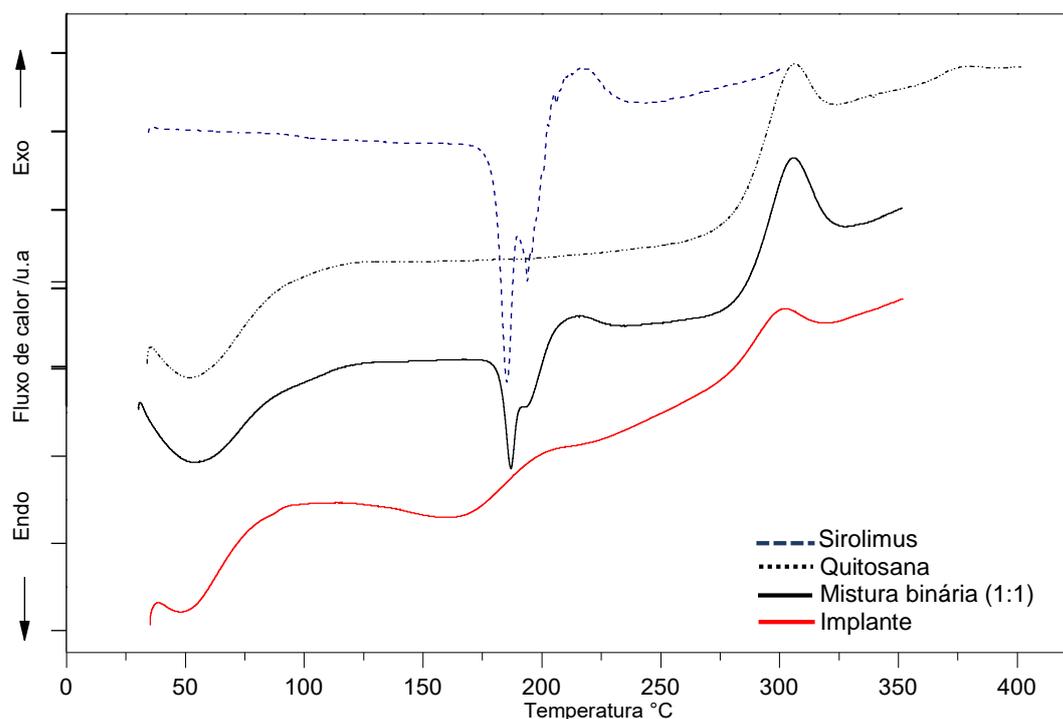


Figura 15 – Curvas de DSC obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, quitosana, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.

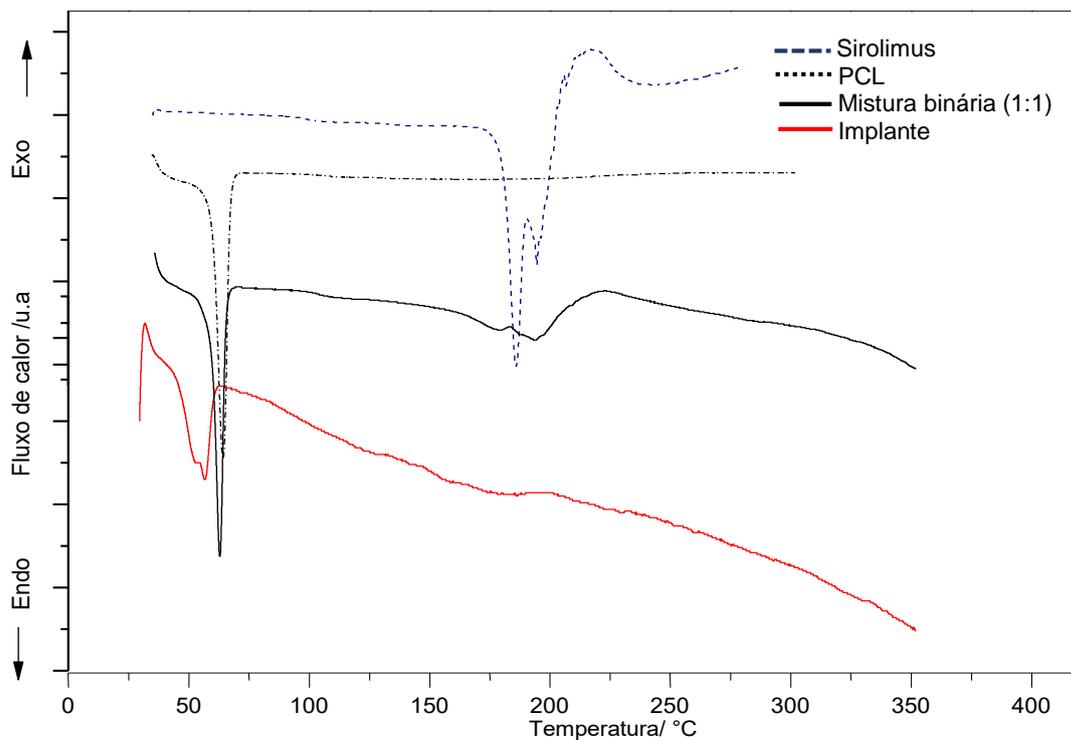


Figura 16 – Curvas de DSC obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PCL, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.

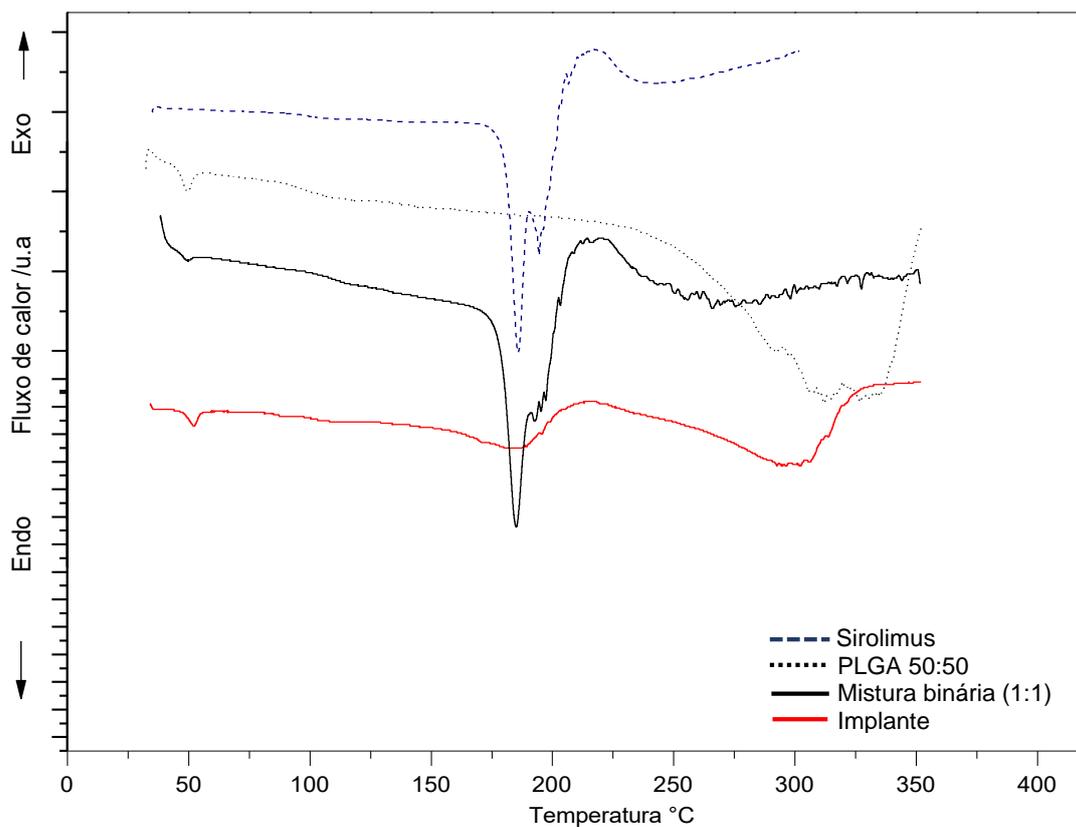


Figura 17 – Curvas de DSC obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PLGA 50:50, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.

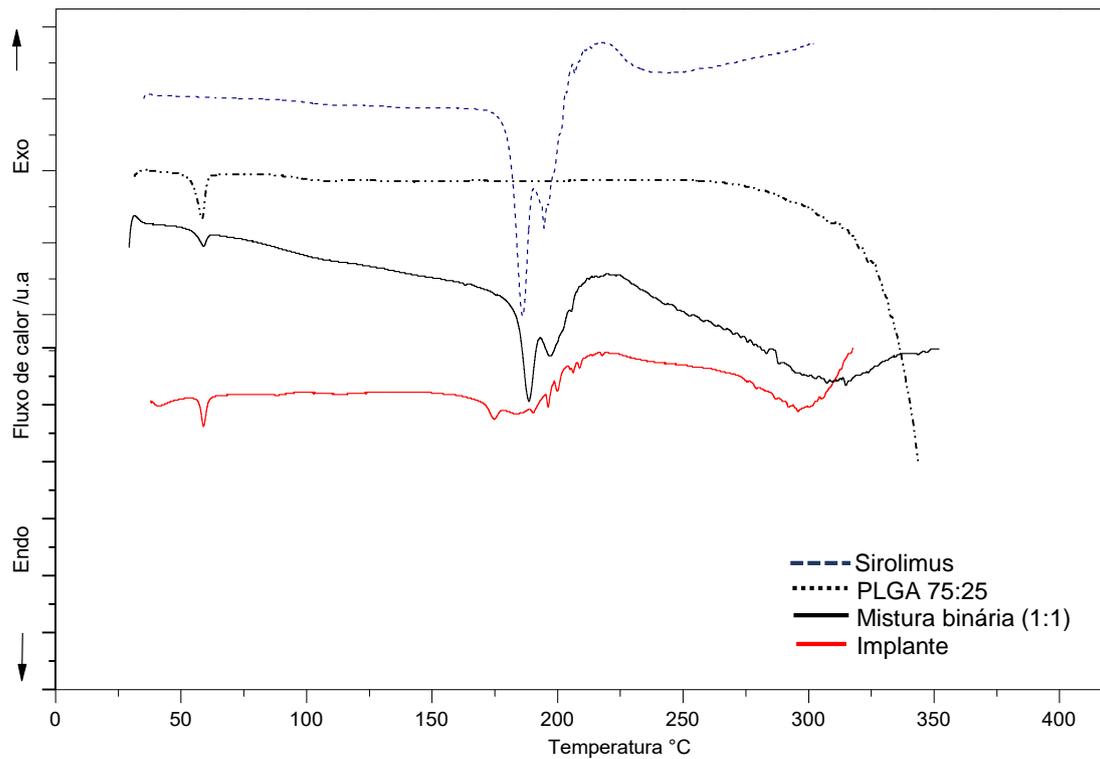


Figura 18 – Curvas de DSC obtidas a 10 °C min^{-1} sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PLGA 75:25, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.

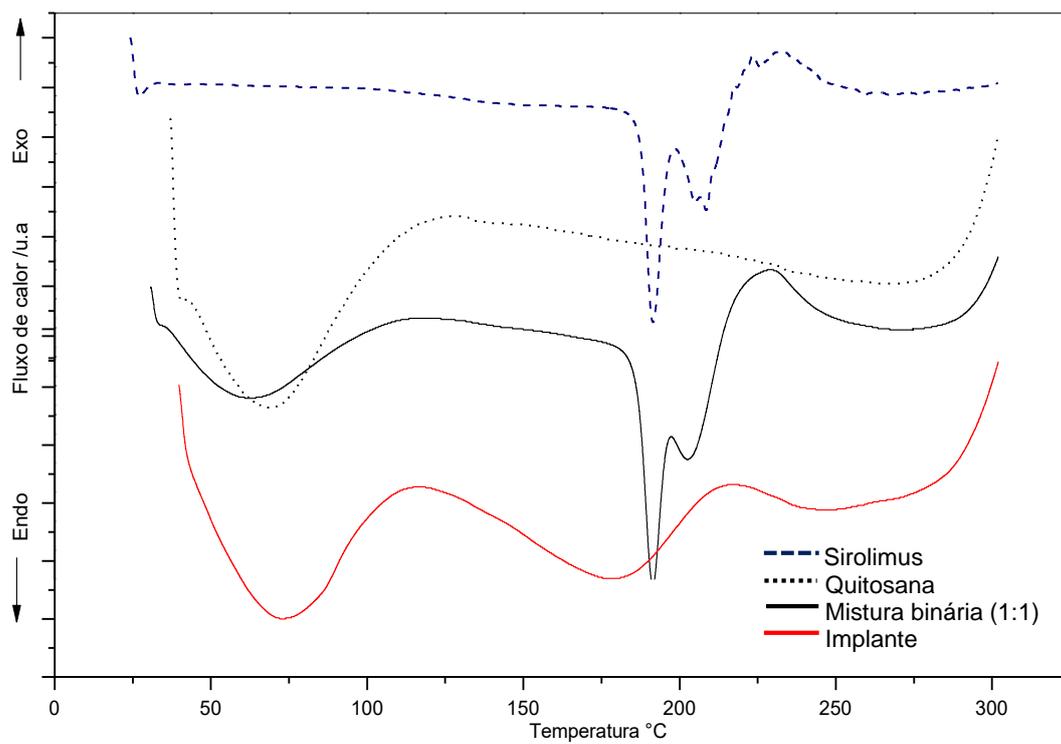


Figura 19 – Curvas de DSC obtidas a 20 °C min^{-1} sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, quitosana, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.

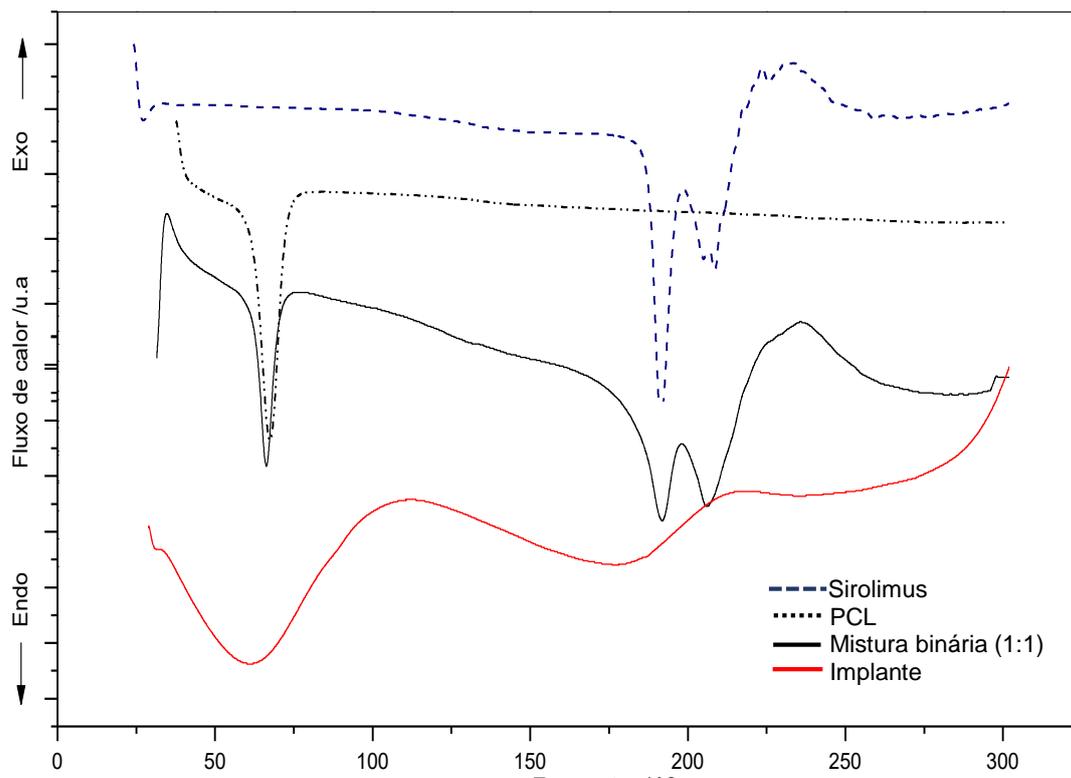


Figura 20 – Curvas de DSC obtidas a 20 °C min^{-1} sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PCL, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.

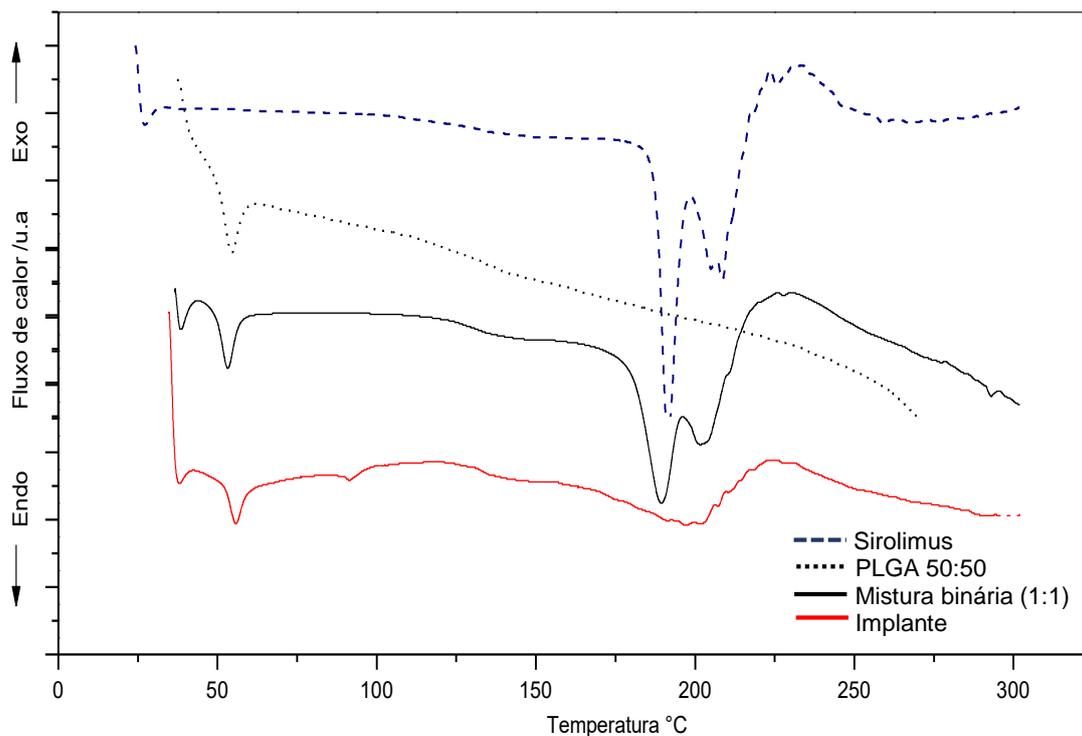


Figura 21 – Curvas de DSC obtidas a 20 °C min^{-1} sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PLGA 50:50, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.

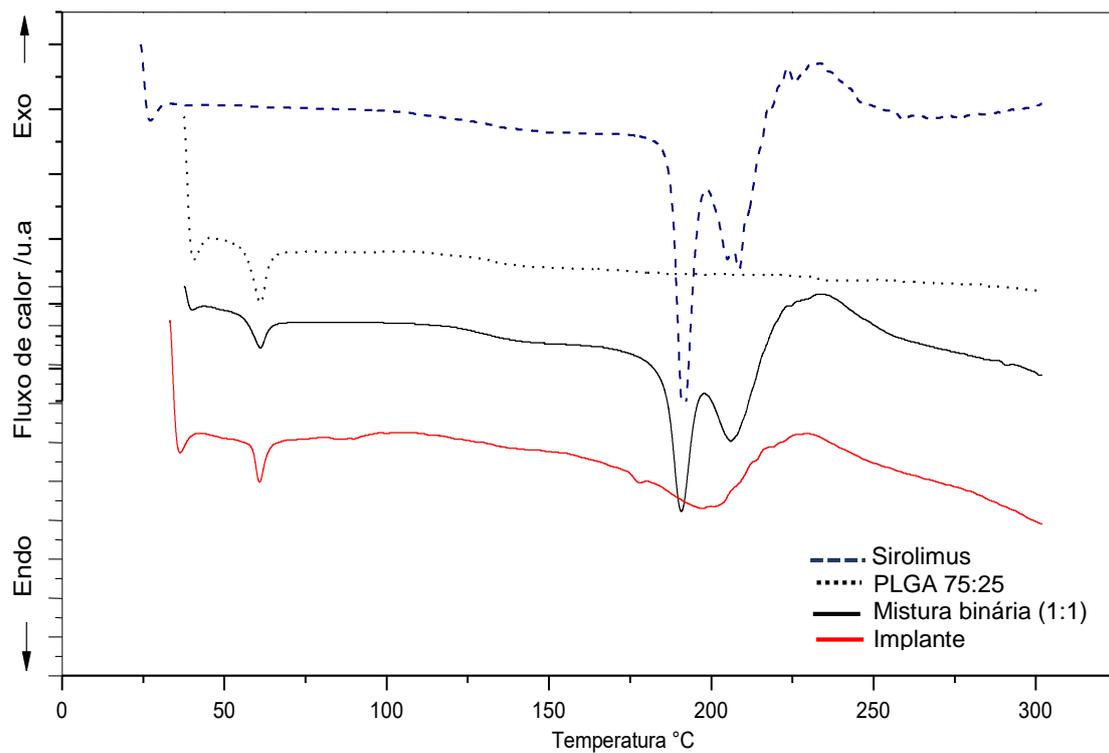


Figura 22 – Curvas de DSC obtidas a 20 °C min^{-1} sob atmosfera dinâmica de nitrogênio do fármaco SRL, PLGA 75:25, mistura binária (1:1) e implante liofilizado.

4.5.2 Estudo de compatibilidade por DRX

As análises térmicas são altamente sensíveis e de rápida resposta para identificar incompatibilidade de formulações farmacêuticas, sendo estas técnicas de primeira escolha para estudos de compatibilidade (YOSHIDA et al., 2011). No entanto, a DRX de pó também pode ser utilizada em estudos de compatibilidade, visto que são adequadas para identificar alterações na cristalinidade dos materiais, polimorfismos cristalinos e eventos de amorfização ocasionado pela mistura de excipientes com o fármaco. Moneghini e colaboradores (1998) observaram processo de amorfização para o atenolol; enquanto Sundaram et al. (2006) relatam na patente do fármaco sinvastatina a amorfização na presença de povidona.

Os difratogramas de raios X (Figuras 23, 24, 25 e 26) mostram que não há incompatibilidade do SRL com os polímeros, visto que a cristalinidade do fármaco pode ser visualizada nas amostras das misturas binárias. No entanto, quando se analisa os resultados dos implantes, observa-se uma ausência de traços de cristalinidade na amostra do implante de SRL, confirmando a hipótese de amorfização do fármaco.

Kim e colaboradores (2011) constataram o mesmo comportamento de amorfização do fármaco SRL no desenvolvimento de nanopartículas de dispersão sólidas, onde o fármaco apresentou-se na forma amorfa dentro das nanopartículas preparadas utilizando o excipiente polivinilpirrolidona (PVP K-30) e uma série de surfactantes, através do processo supercrítico de anti-solvente (SAS).

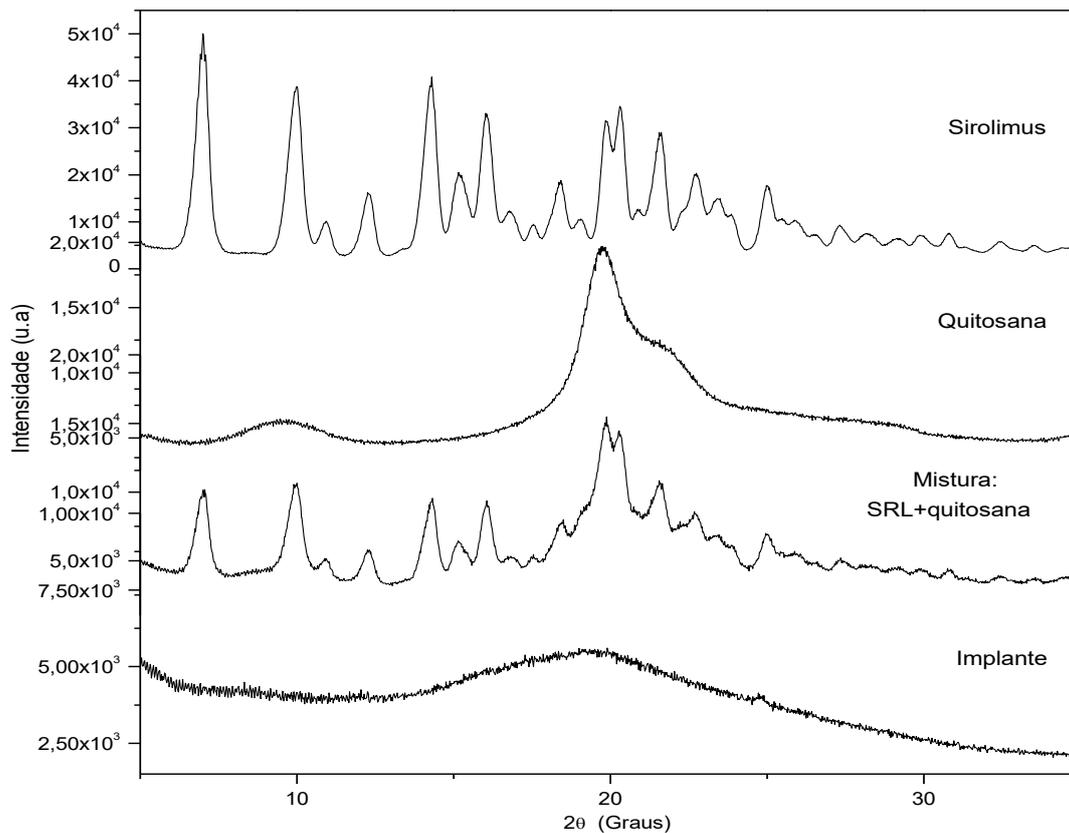


Figura 23 – Difratoigramas de raios X de SRL; quitosana; mistura binária SRL - quitosana e implante liofilizado.

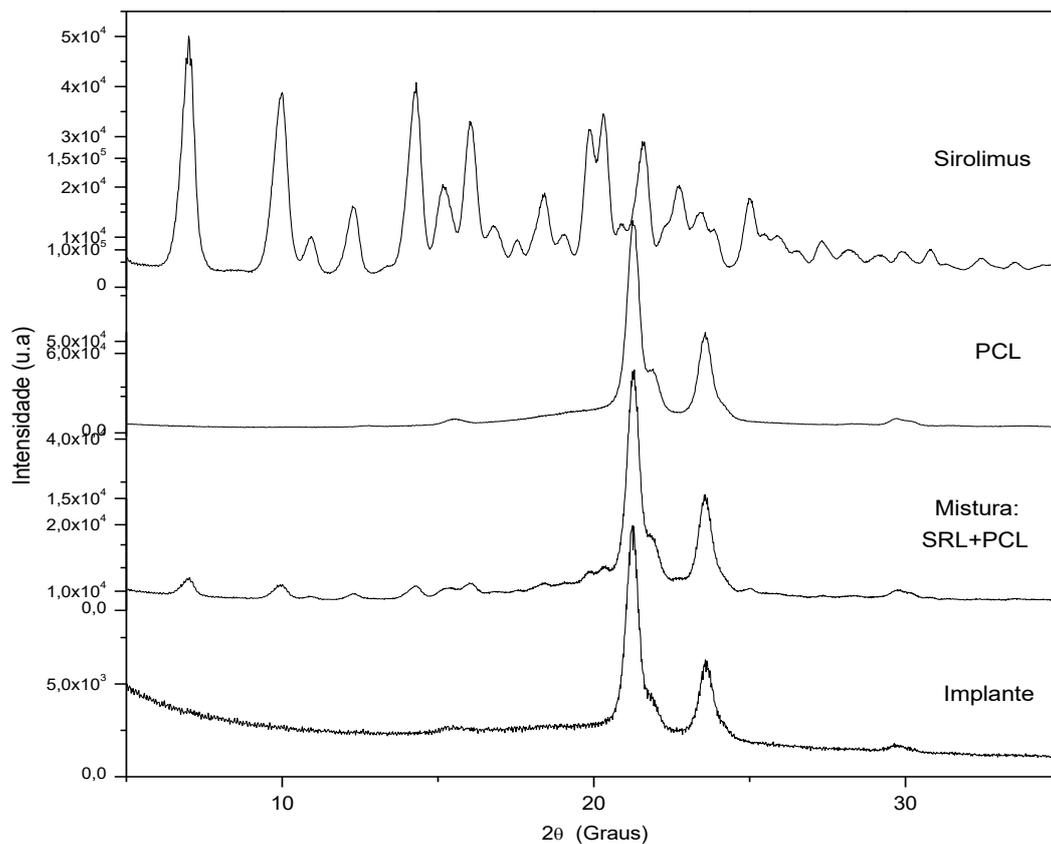


Figura 24 – Difratoigramas de raios X de SRL; PCL; mistura binária SRL – PCL e implante liofilizado.

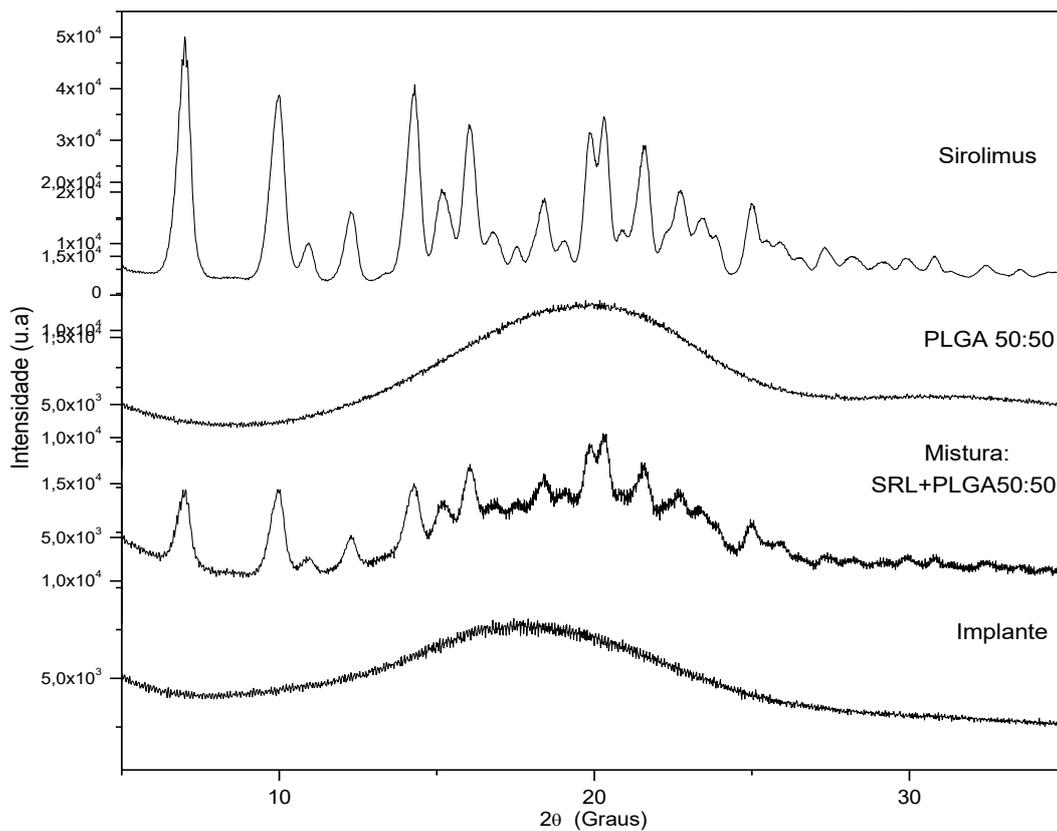


Figura 25 – Difrátogramas de raios X de SRL; PLGA 50:50; mistura binária SRL – PLGA 50:50 e implante liofilizado.

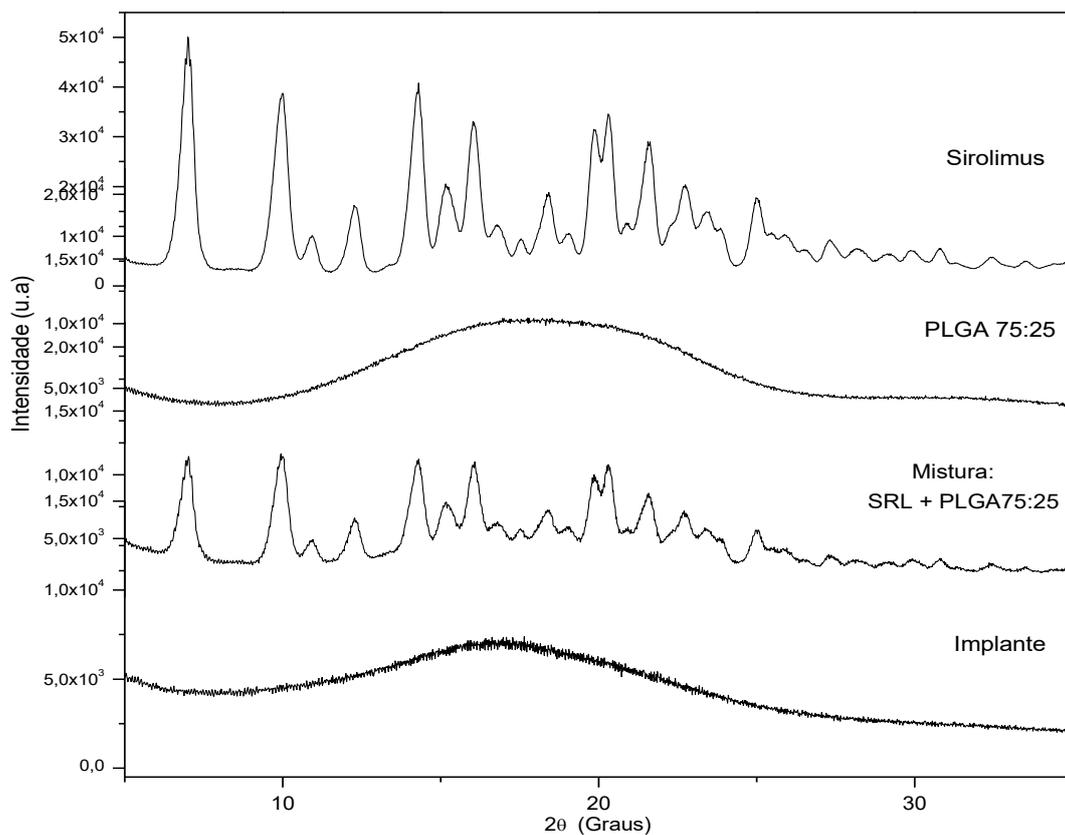


Figura 26 – Difrátogramas de raios X de SRL; PLGA 75:25; mistura binária SRL – PLGA 75:25 e implante liofilizado.

4.6 Estudos Cromatográficos

4.6.1 Estudo de degradação do fármaco em meio líquido (solução) utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A condição cromatográfica foi otimizada para análise do fármaco SRL e seus possíveis produtos de degradação, realizando-se uma validação parcial da metodologia, visto que a mesma foi validada pela FUNED. Os testes realizados para a validação parcial foram os especificados na RE n° 899 de 2003 sendo estes: especificidade, linearidade, exatidão e precisão.

Na Figura 27, podemos observar para o SRL os dois picos principais típicos, que são atribuídos aos tautômeros hemiacetal pirano ($t_R = 6,0$ min) e oxepano ($t_R = 7,5$ min), conforme resultados encontrados por Hughes e colaboradores (1992) e Zech e colaboradores (2011), em seus estudos.

Os parâmetros de performance encontrados para o SRL, na forma do tautômero hemiacetal pirano, foram $k' = 4,65$; $N = 4.520$ pratos/coluna; $As = 1,02$ e R_s entre os tautômeros foi de 5,6. Os resultados foram satisfatórios de acordo com os limites estabelecidos para cada parâmetro, que são: fator de retenção (k') maior que 0,5; pratos teóricos (N) maior que 2.000 pratos/coluna; assimetria do pico (As) menor ou igual 2; e Resolução (R_s) maior que 2 (RIBANI et al, 2004).

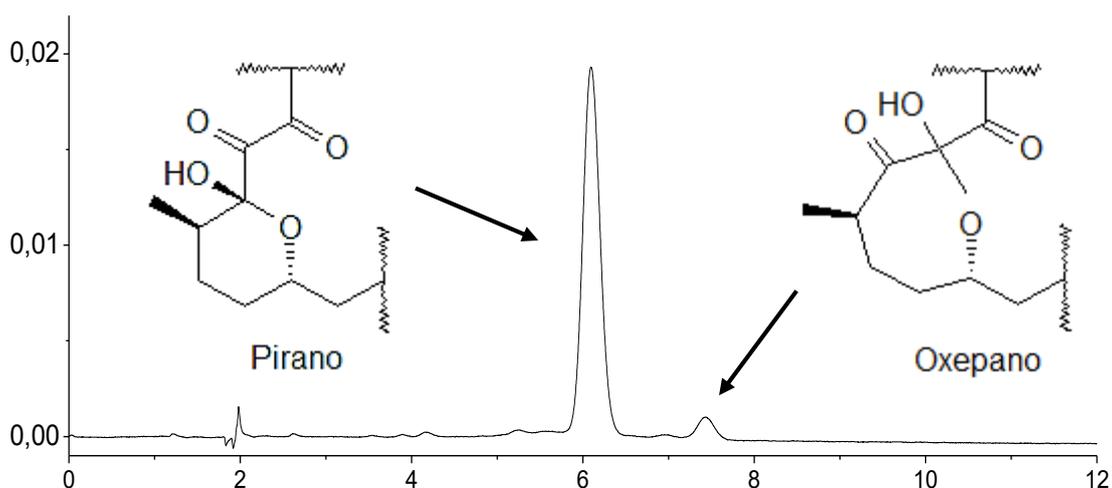


Figura 27 – Tautômeros hemiacetal pirano e oxepano.

Os cromatogramas do fármaco SRL antes e após a realização dos testes de estresse para a análise da estabilidade intrínseca podem ser observados na Figura 28. Nos cromatogramas das amostras após exposição ao calor, hidrólise neutra e hidrólise básica; o produto de degradação (PD) encontrado em $t_R = 1,2$ minutos apresenta um espectro de UV (Figuras 29, 30 e 31) similar ao do SRL (Figura 32) o que dá indícios de que a estrutura do cromóforo é mantida no PD. No cromatograma para o teste de degradação sob calor, observa-se ainda a formação de outro PD ($t_R = 4,1$ minutos), sendo que o espectro do mesmo (Figura 29) também apresenta uma similaridade com o espectro do SRL. No cromatograma para o teste de oxidação da Figura 28, observa-se um pico em $t_R = 2,0$ minutos que refere-se ao pico do peróxido de hidrogênio.

As amostras obtidas após exposição ao calor, hidrólise neutra e hidrólise básica foram submetidas a testes adicionais, variando o tempo de exposição ao estresse e temperaturas, para cálculo da cinética e do tempo que o fármaco degrada 10% do seu teor (t_{90}) em estado líquido (solução).

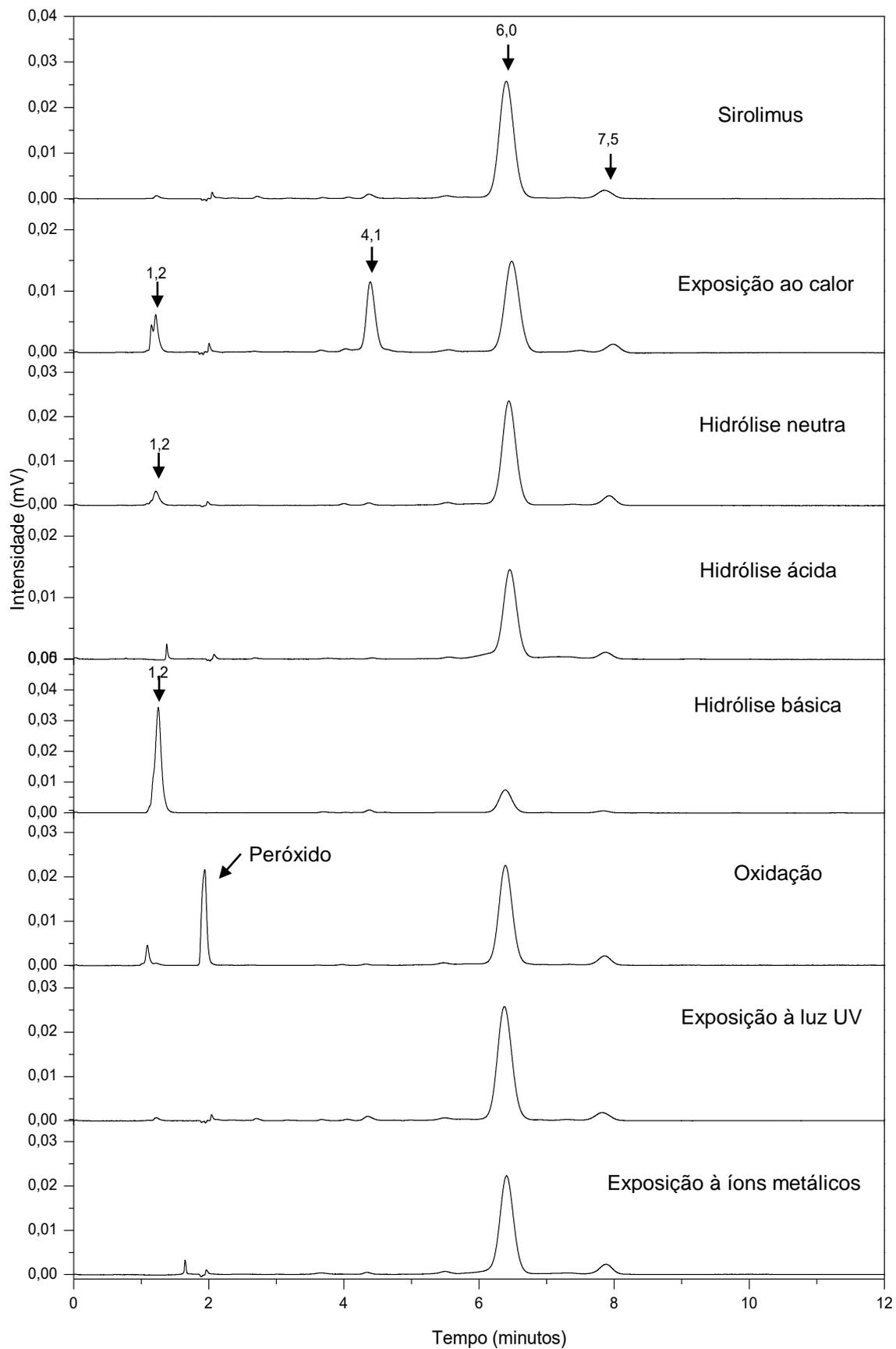


Figura 28 – Cromatograma do SRL antes e após condições de estresse: exposição ao calor, hidrólise neutra, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, exposição à luz UV e exposição a metais, com T de 60 °C durante 240 min.

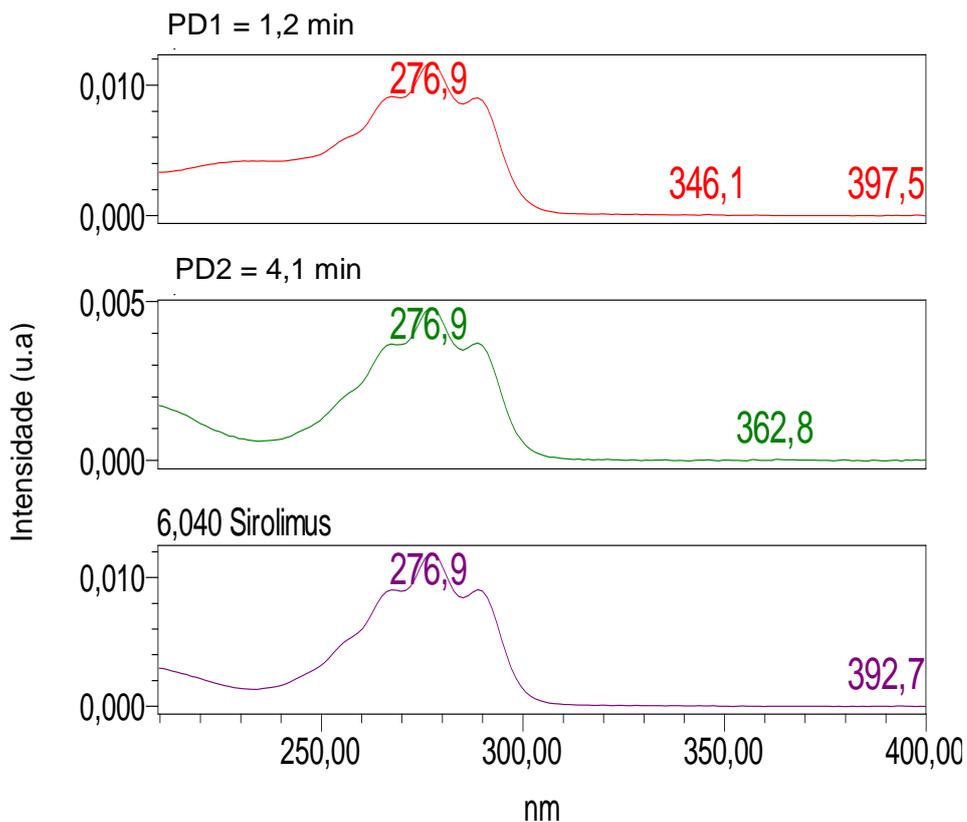


Figura 29 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), da amostra após estresse por oxidação dos picos do SRL ($t_R = 6,04$ min), PD1 ($t_R = 1,2$ min), e PD2 ($t_R = 4,1$ min).

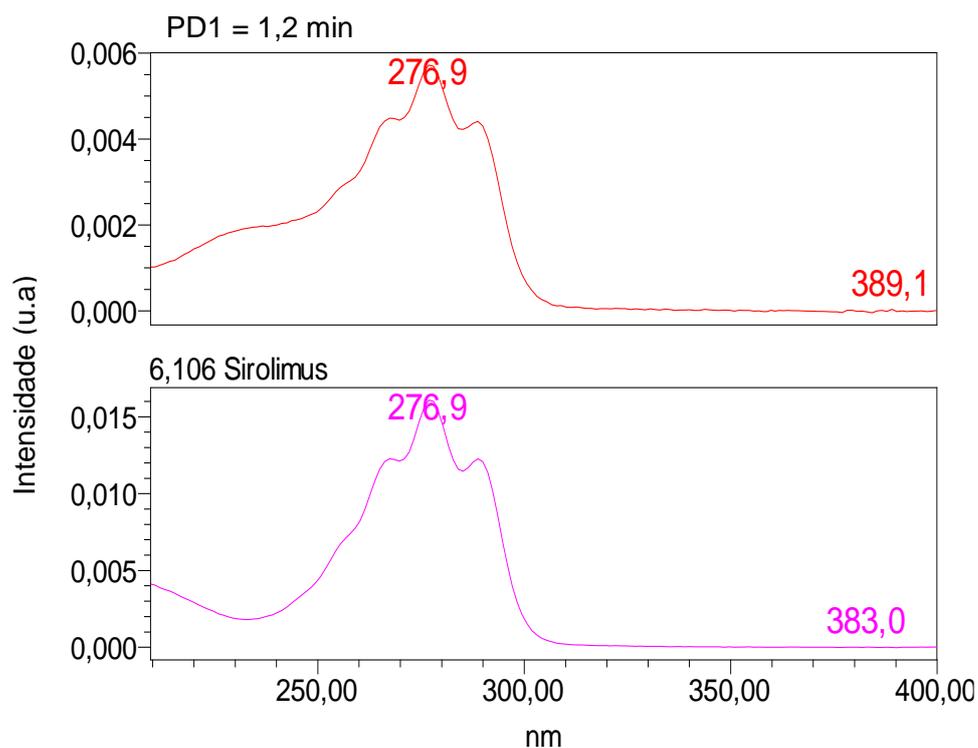


Figura 30 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), da amostra após estresse por hidrólise neutra dos picos do SRL ($t_R = 6,106$ min) e PD1 ($t_R = 1,2$ min).

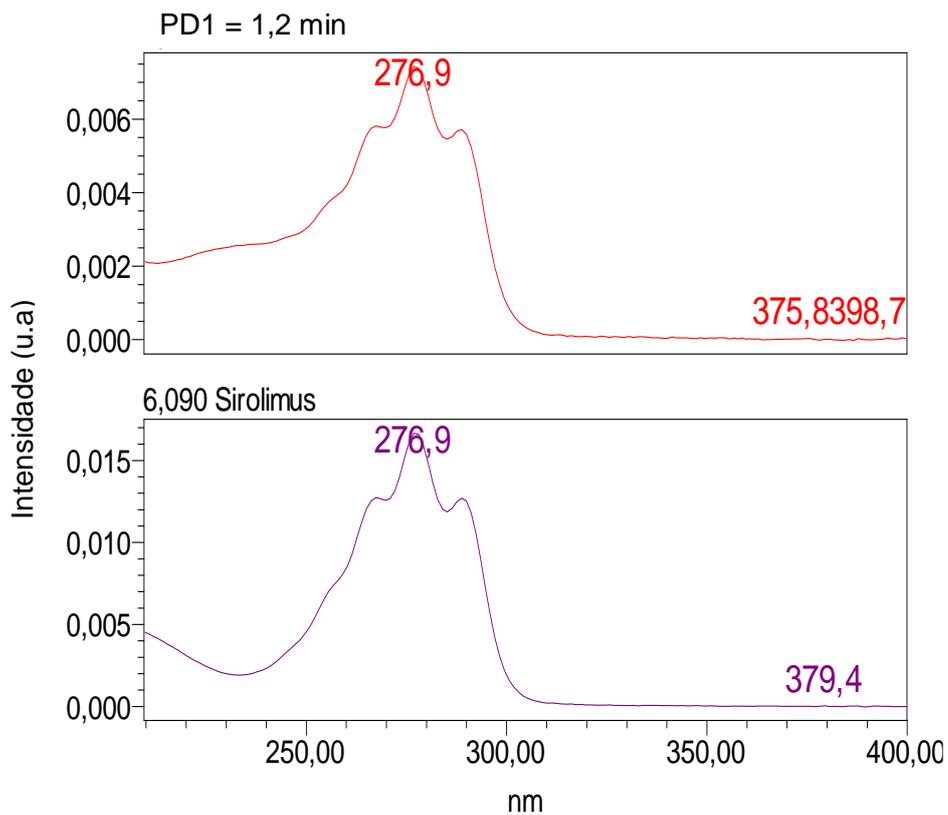


Figura 31 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), da amostra após estresse por hidrólise básica dos picos do SRL ($t_R = 6,090$ min) e PD1 ($t_R = 1,2$ min).

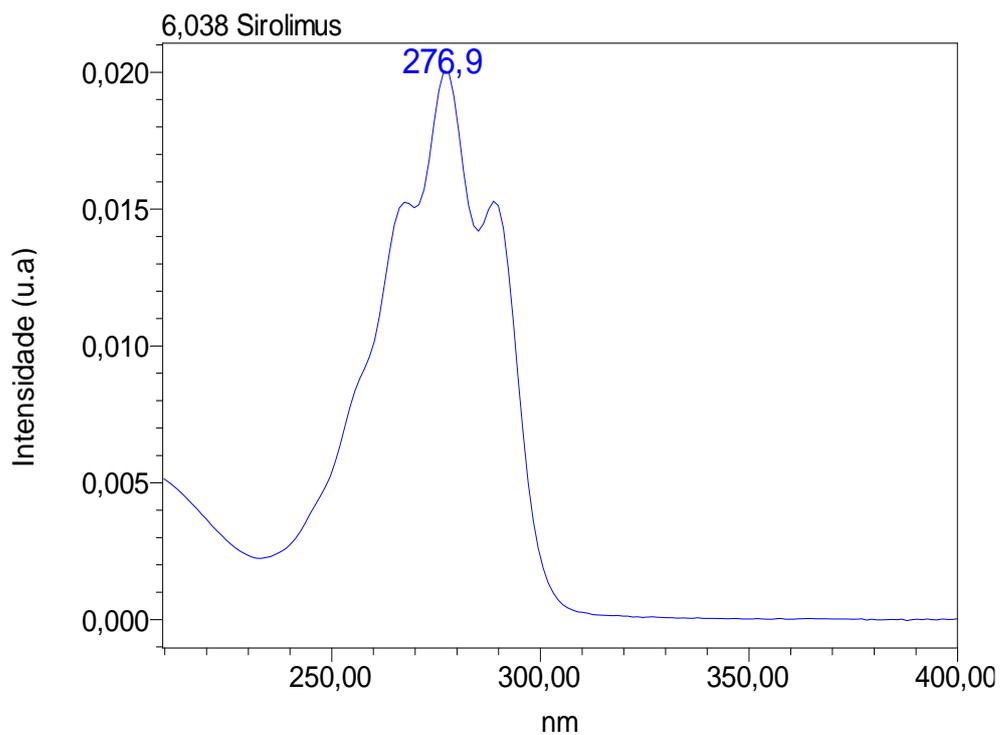


Figura 32 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), do pico de SRL ($t_R = 6,1$ min).

4.6.2 Estudos de cinética de degradação em meio líquido (solução)

O SRL apresentou degradação após exposição ao calor, hidrólises neutra e básica. Nos cromatogramas (Figuras 33 e 34) para o teste de estresse em calor, pode-se observar que, com o aumento da temperatura e tempo de exposição, ocorre a degradação do fármaco com formação de dois produtos de degradação PD1 ($t_R = 1,2$ min) e PD2 ($t_R = 4,3$ min). Para os testes de hidrólise neutra e básica (Figuras 35, 36, 37 e 38), evidencia-se a formação de apenas um PD em $t_R = 1,2$ minutos. Nos testes de degradação em hidrólise ácida, observa-se a formação de PD, também em $t_R = 1,2$ minutos, porém, em quantidade inferior aos encontrados para as demais hidrólises, sugerindo que a reação de formação de PD está ocorrendo preferencialmente nos pHs neutro e básico, não sendo importante neste estudo, portanto, a realização do cálculo da cinética de degradação em hidrólise ácida.

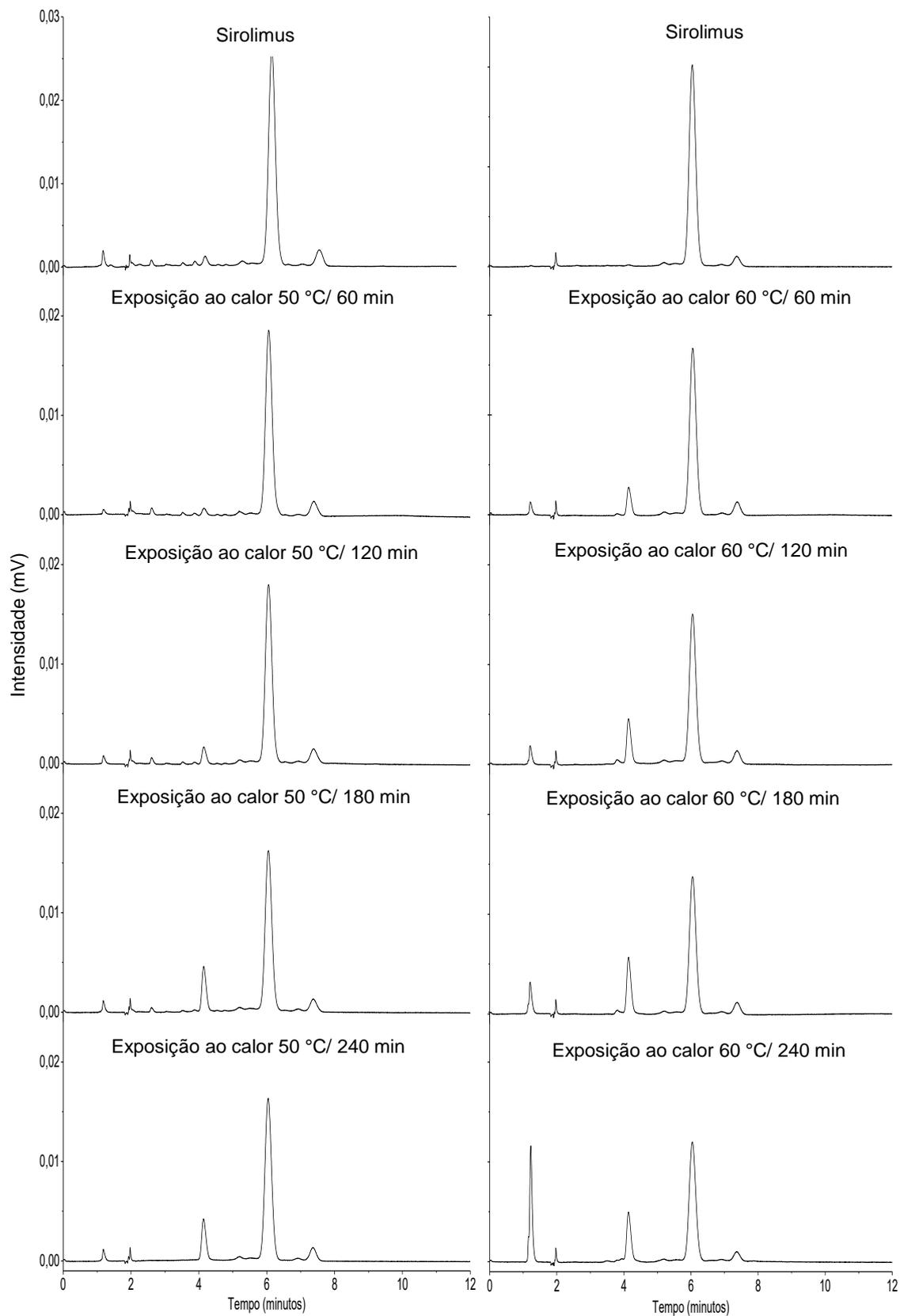


Figura 33 – Cromatogramas do SRL antes e após exposição ao calor em temperatura de 50 °C e 60 °C nos tempos coleta de análise: 60 min; 120 min; 180 min e 240 min.

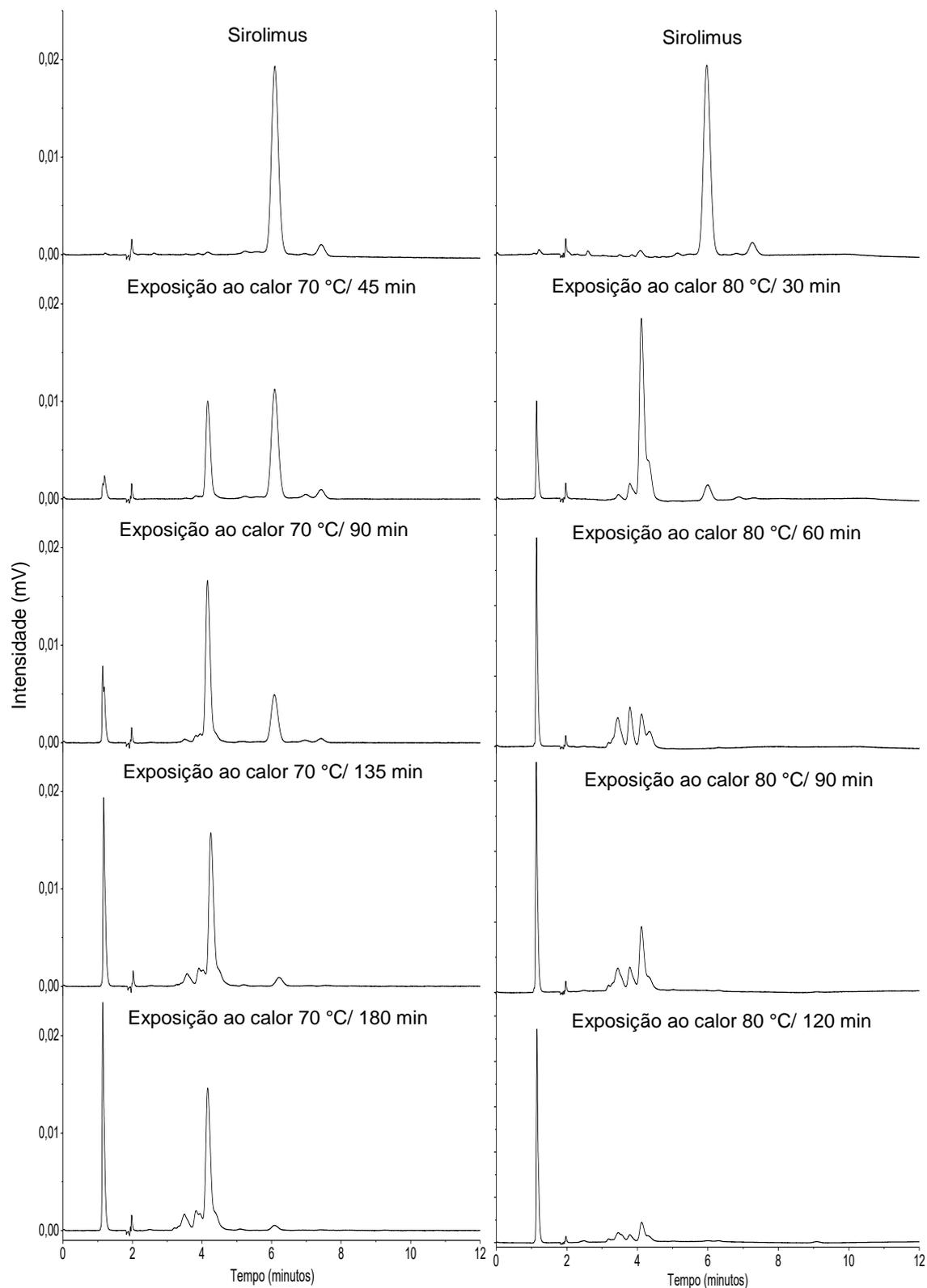


Figura 34 – Cromatogramas do SRL antes e após exposição ao calor em temperatura de 70 °C nos tempos coleta de análise: 45 min; 90 min; 135 min e 180 min; e 80 °C nos tempos coleta de análise: 30 min; 60 min; 90 min e 120 min.

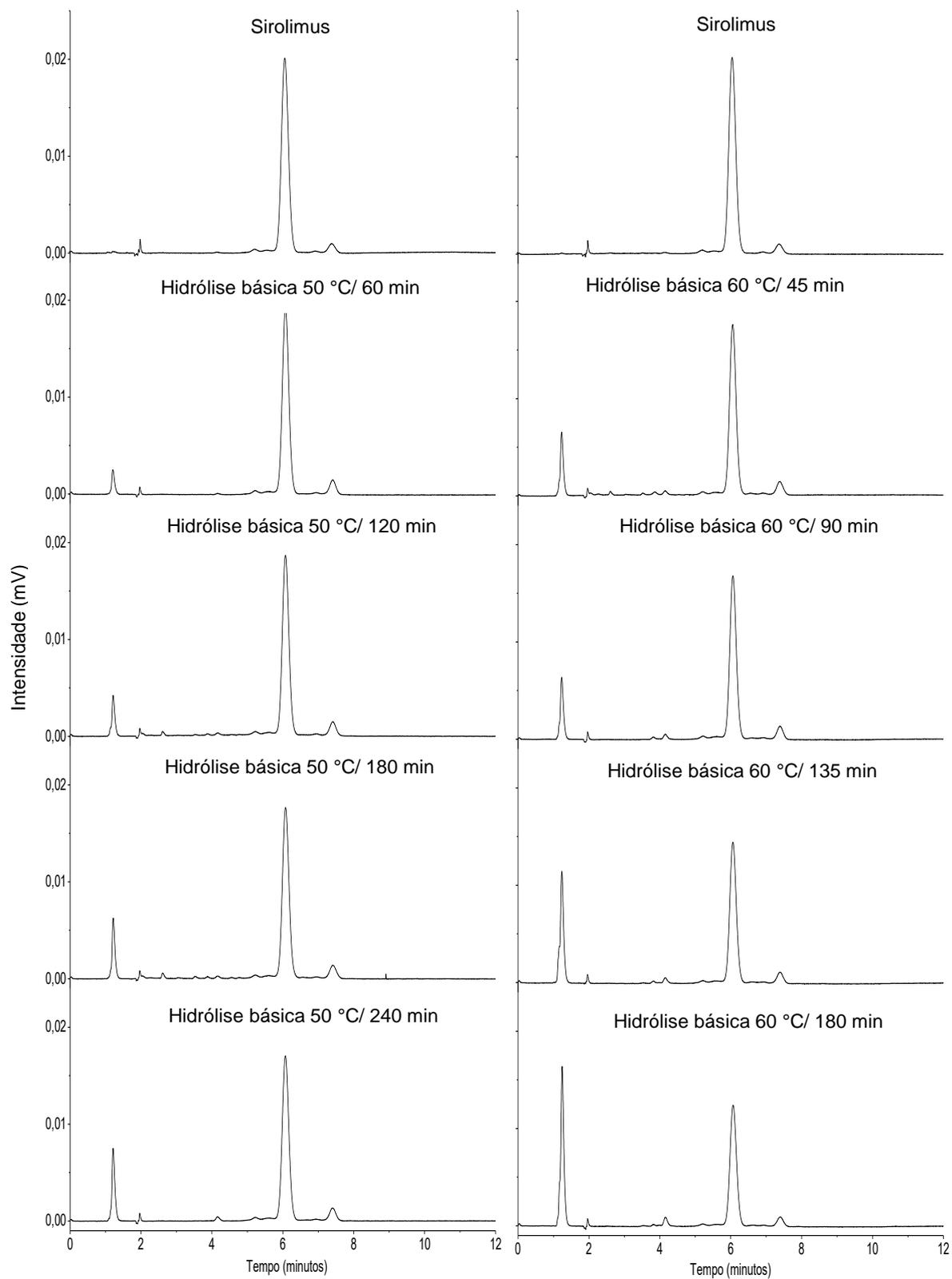


Figura 35 – Cromatogramas do SRL antes e após teste de estresse em hidrólise básica com temperatura de 50 °C nos tempos coleta de análise: 60 min; 120 min; 180 min e 240 min e 60 °C nos tempos de coleta de análise: 45 min; 90 min; 135 min e 180 min.

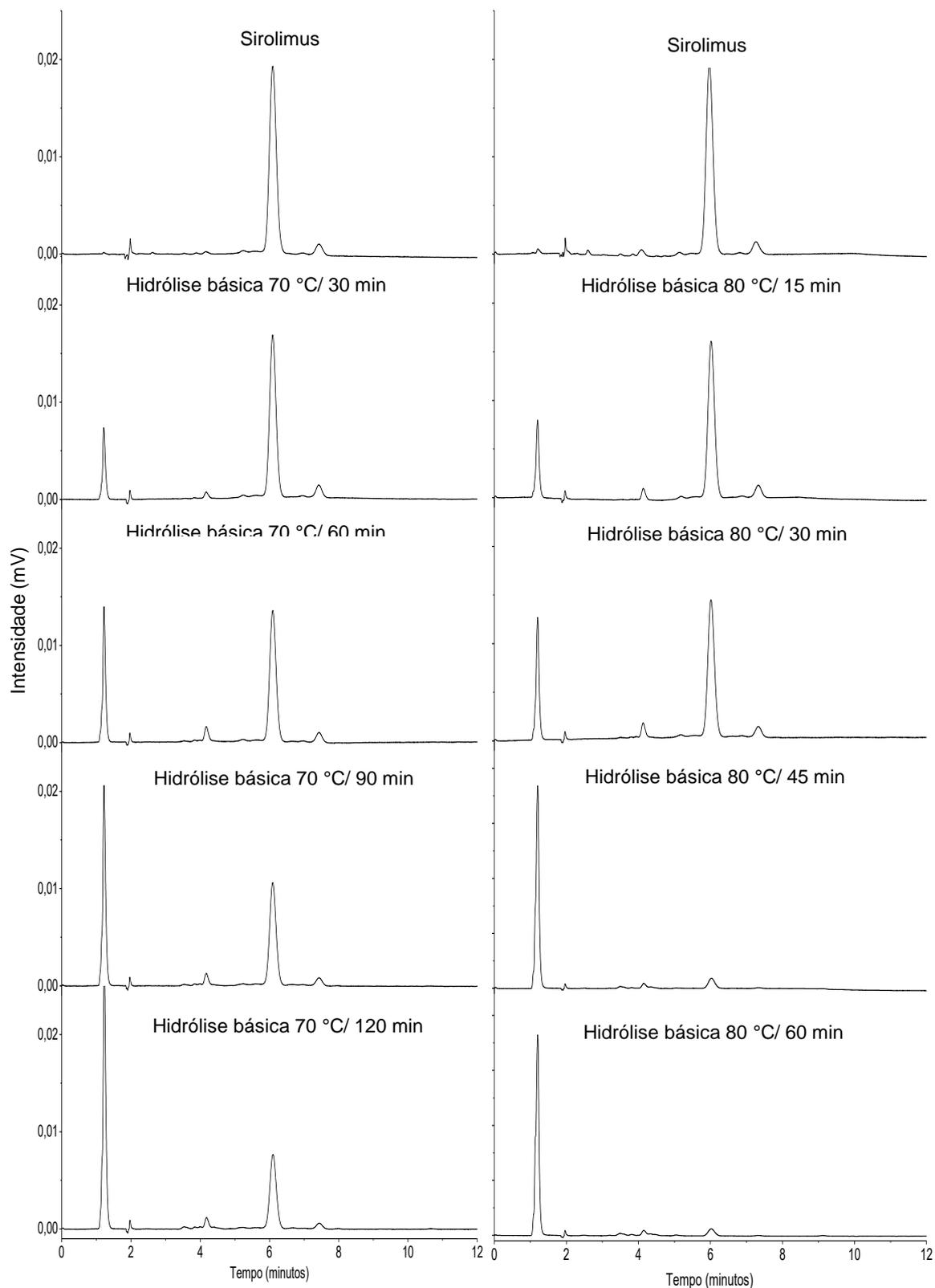


Figura 36 – Cromatogramas do SRL antes e após teste de estresse em hidrólise básica com temperatura de 70 °C nos tempos coleta de análise: 30 min; 60 min; 90 min e 120 min; e 80 °C nos tempos coleta de análise: 15 min; 30 min; 45 min e 60 min.

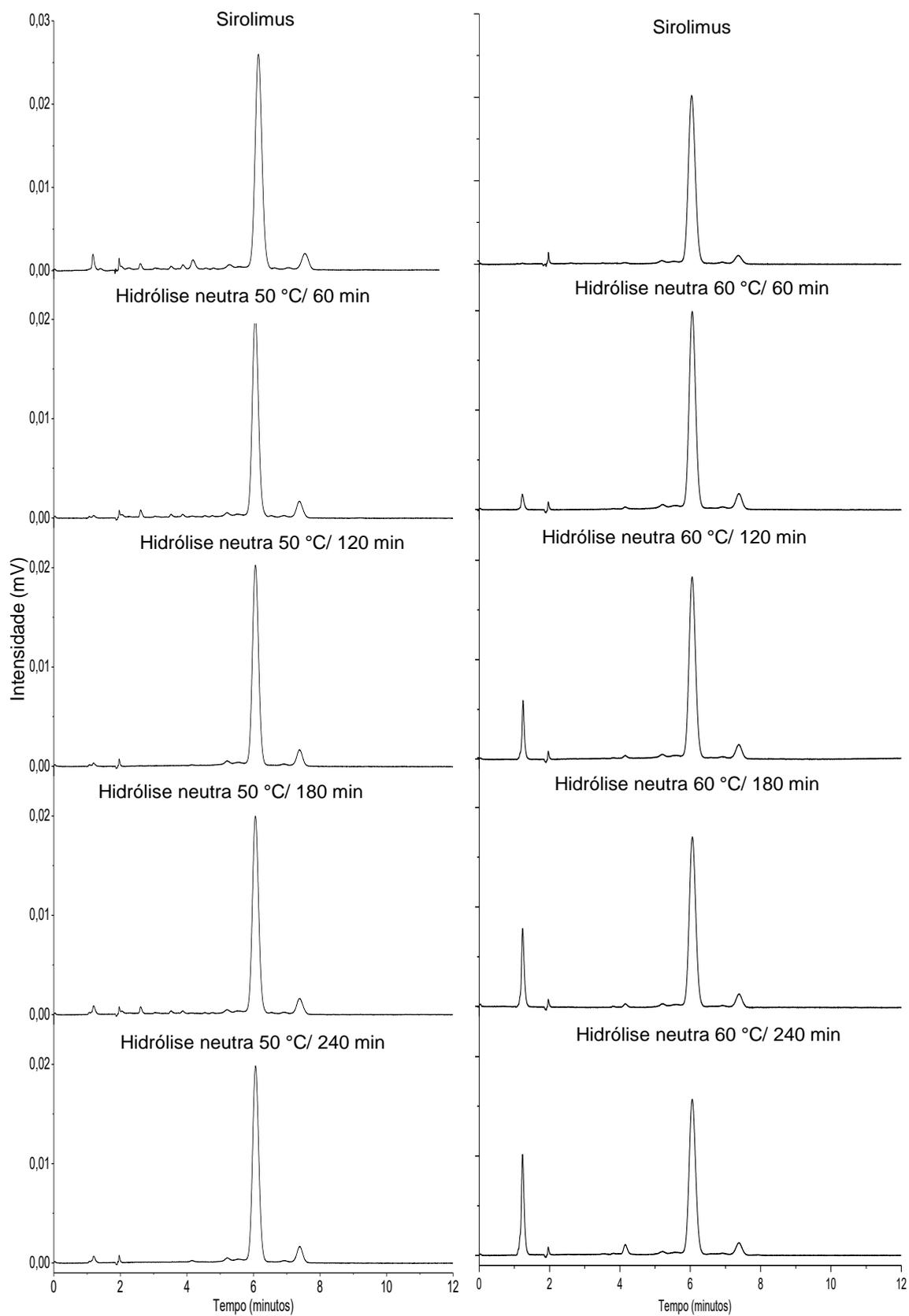


Figura 37 – Cromatogramas do SRL antes e após teste de estresse em hidrólise neutra com temperatura de 50 °C e 60 °C nos tempos coleta de análise: 60 min; 120 min; 180 min e 240 min.

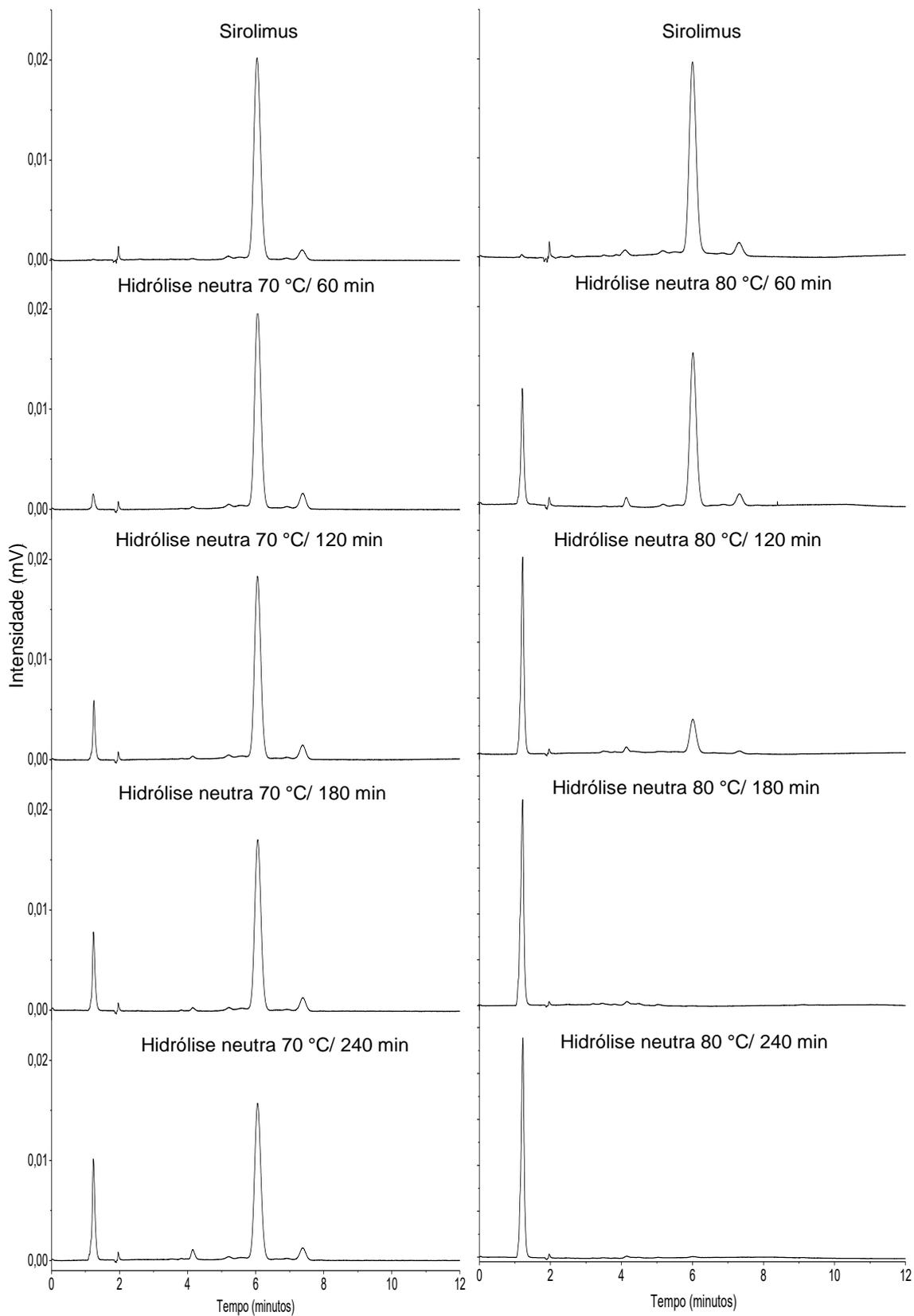


Figura 38 – Cromatogramas do SRL antes e após teste de estresse em hidrólise neutra com temperatura de 70 °C e 80 °C nos tempos coleta de análise: 60 min; 120 min; 180 min e 240 min.

4.6.2.1 Cálculo da cinética de degradação do SRL em meio líquido (solução)

Diante dos resultados obtidos com os testes adicionais descritos na tabela (1), calculou-se a estabilidade intrínseca e cinética de degradação do SRL sob exposição ao calor, hidrólises neutra e básica.

Os valores referentes aos ajustes matemáticos dos modelos de zero, primeira e segunda ordem para as temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C do fármaco SRL em solução sob **exposição ao calor** estão descritos na tabela 5. Analisando os coeficientes de regressão linear (r) obtidos, sugere-se que a cinética de reação que melhor descreve a degradação é a de primeira ordem, ou seja, a velocidade da reação depende de um fator, seja ele reagente ou produto envolvido na reação (BROWN, et al, 2005).

Após a determinação da ordem de reação, foram calculadas as constantes de velocidade de degradação para cada temperatura, sendo: $k_{50^{\circ}\text{C}}= 0,05383$, $k_{60^{\circ}\text{C}}= 0,12290$, $k_{70^{\circ}\text{C}}= 1,43017$, $k_{80^{\circ}\text{C}}= 5,32138$. Contudo também foi possível calcular $K_{25^{\circ}\text{C}}$, que foi de 0,000328507. Assim t_{90} foi de 319,62 horas ou 13 dias. Isto significa que o fármaco degrada 10% após 13 dias quando solubilizado e na temperatura de 25 °C. A Figura 39 mostra o gráfico da equação de Arrhenius, $\ln k$ versus $1/T$. A inclinação da reta é definida pela equação $E_a \times R^{-1}$, diante disso foi possível calcular a energia de ativação, sendo então $E_a = 153,53 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Tabela 5 – Resultados dos modelos matemáticos de ajuste zero, primeira e segunda ordem, com valores de r e k para o teste de degradação forçada em calor do SRL

Degradação forçada em calor do SRL				
Temperatura (°C)	Parâmetros	Ordem		
		Zero	Primeira	Segunda
50	r	- 0,97861	- 0,98376	0,98785
	k	4,81000	0,05383	0,00060
60	r	- 0,99264	- 0,99592	0,99173
	k	9,60300	0,12290	0,00160
70	r	- 0,95261	- 0,98146	0,89907
	k	33,46133	1,43017	0,17516
80	r	- 1,00000	- 1,00000	1,00000
	k	185,42000	5,32138	0,25435

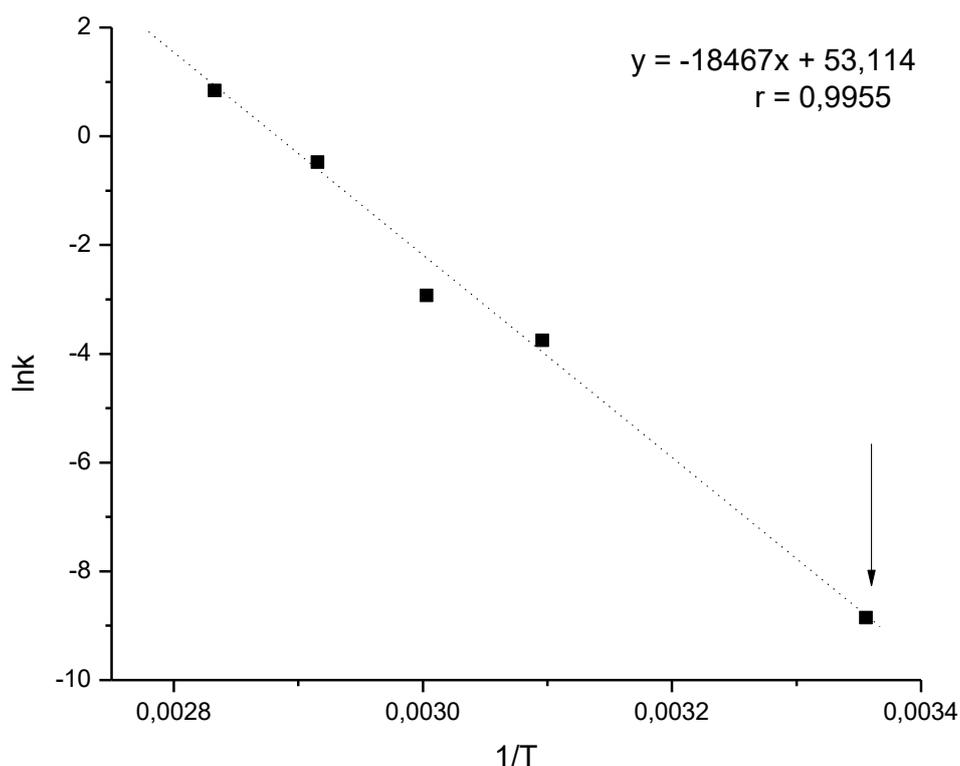


Figura 39 – Gráfico da equação de Arrhenius - degradação forçada em calor do SRL.

Os valores referentes aos ajustes matemáticos dos modelos de zero, primeira e segunda ordem para as temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C do fármaco SRL em solução sob **hidrólise básica (pH 10,7)** estão descritos na tabela 6. Analisando os coeficientes de regressão linear (r) obtidos, sugere-se que a cinética de reação que melhor descreve a degradação é a de zero ordem, ou seja, a velocidade da reação de degradação independe da concentração de reagentes ou produtos formados na reação (BROWN, et al, 2005).

Após a determinação da ordem de reação, foram calculadas as constantes de velocidade de degradação para cada temperatura, sendo: $k_{50^{\circ}\text{C}}=4,90400$, $k_{60^{\circ}\text{C}}=13,86667$, $k_{70^{\circ}\text{C}}=30,09000$, $k_{80^{\circ}\text{C}}=102,42400$. Calculou-se $K_{25^{\circ}\text{C}}$, que foi de 0,25357. Assim t_{90} foi de 39,436 horas ou 1,64 dias. Isto significa que o fármaco degrada 10% após 39,4 horas quando solubilizado em pH 13 e na temperatura de 25 °C. A Figura 40 mostra o gráfico da equação de Arrhenius, $\ln k$ versus $1/T$. A inclinação da reta é definida pela equação $E_a \times R^{-1}$, diante disso foi possível calcular a energia de ativação, sendo então $E_a = 93,64 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Tabela 6 – Resultados dos modelos matemáticos de ajuste zero, primeira e segunda ordem, com valores de r e k para o teste de degradação forçada em hidrólise básica do SRL

Hidrólise básica do SRL				
Temperatura (°C)	Parâmetros	Ordem		
		Zero	Primeira	Segunda
50	r	-0,96982	-0,97465	0,97880
	k	-4,90400	-0,02379	0,00061
60	r	-0,97403	-0,97432	0,96202
	k	-13,86667	-0,08078	0,00257
70	r	-0,99347	-0,99961	0,98765
	k	-30,09000	-0,20129	0,00758
80	r	-0,96746	-0,93220	0,90714
	k	-102,42400	-1,35481	0,16512

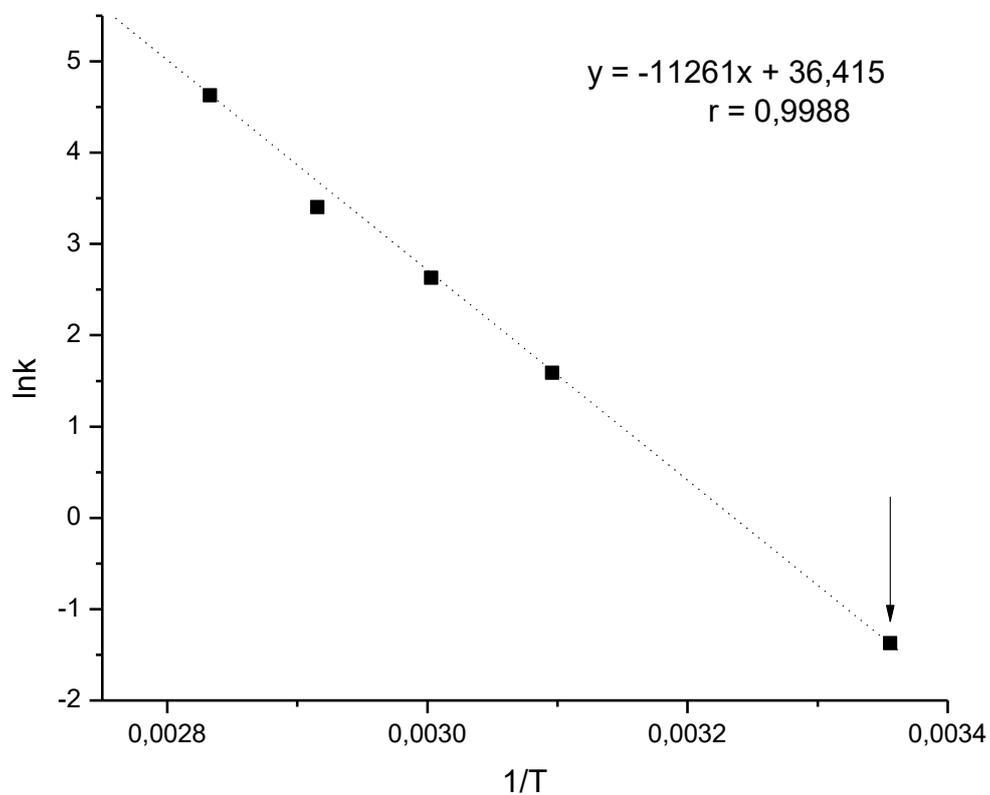


Figura 40 – Gráfico da equação de Arrhenius - Hidrólise básica do SRL.

Os valores referentes aos ajustes matemáticos dos modelos de zero, primeira e segunda ordem para as temperaturas de 50, 60, 70 e 80 °C do fármaco SRL em solução sob **hidrólise neutra** estão descritos na tabela 7. Analisando os coeficientes de regressão linear (r) obtidos, sugere-se que a cinética de reação que melhor descreve a degradação é a de segunda ordem, ou seja, a velocidade da reação de degradação depende de mais de um fator ou concentração de substâncias presentes (BROWN, et al, 2005).

Após a determinação da ordem de reação, foram calculadas as constantes de velocidade de degradação para cada temperatura, sendo: $k_{50^{\circ}\text{C}}=0,00042$, $k_{60^{\circ}\text{C}}=0,00075$, $k_{70^{\circ}\text{C}}=0,00104$, $k_{80^{\circ}\text{C}}=0,01482$. Calculou-se $K_{25^{\circ}\text{C}}$, que foi de 0,00001. Assim t_{90} foi de 101,24 horas ou 4,22 dias. Isto significa que o fármaco degrada 10% após 4,2 dias quando solubilizado em água e na temperatura de 25 °C. A Figura 41 mostra o gráfico da equação de Arrhenius, $\ln k$ versus $1/T$. A inclinação da reta é definida pela equação $E_a \times R^{-1}$, diante disso foi possível calcular a energia de ativação, sendo então $E_a = 103,54 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Tabela 7 – Resultados dos modelos matemáticos de ajuste zero, primeira e segunda ordem, com valores de r e k para o teste de degradação forçada em hidrólise neutra do SRL

Hidrólise neutra do SRL				
Temperatura (°C)	Parâmetros	Ordem		
		Zero	Primeira	Segunda
50	r	-0,99763	-0,99889	0,99966
	k	-3,55900	-0,01669	0,00042
60	r	-0,99384	-0,99519	0,99547
	k	-5,83200	-0,02867	0,00075
70	r	-0,99002	-0,99596	0,99916
	k	-7,26800	-0,03756	0,00104
80	r	-0,99650	-0,96909	0,93026
	k	-37,38500	-0,29904	0,01482

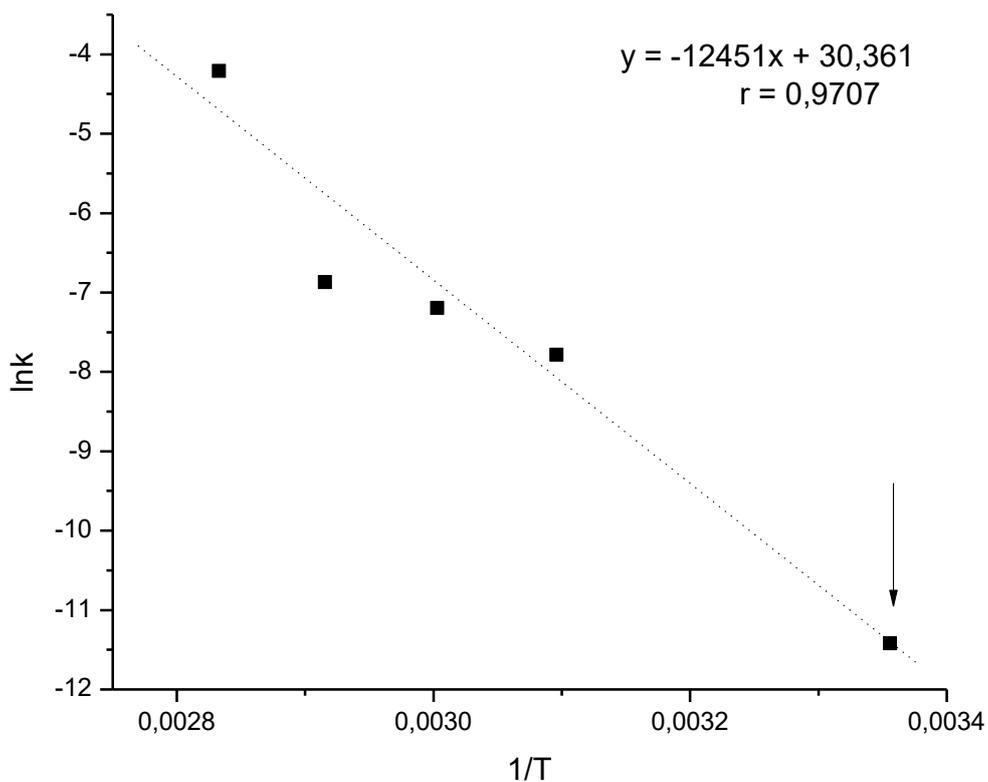


Figura 41 – Gráfico da equação de Arrhenius - Hidrólise neutra do SRL.

O fármaco SRL mostrou-se extremamente instável em solução de acordo com os resultados apresentados pelos valores de t_{90} e E_a . Mesmo com tamanha instabilidade em solução, pode-se fazer uma escala onde o SRL tende a aumentar a degradação quando em solução aquosa, comparada à solubilização em metanol. Além disso, a velocidade de degradação ainda é aumentada quando o meio aquoso tem pH mais alto (elevado).

4.7 Estudos de cinética de degradação em meio sólido

A cinética de degradação isotérmica foi realizada para avaliar a estabilidade do fármaco e prever o prazo de validade a 25 °C em estado sólido.

As curvas TG Isotérmicas foram realizadas na parte inicial do processo de degradação, nas temperaturas de 180, 182, 184, 186 e 188 °C. Foram realizados os cálculos da fração de decomposta (α) da amostra do fármaco pelo tempo (t) em todos os modelos matemáticos de ajuste para decomposição térmica de sólidos, conforme fórmulas descritas na tabela 3, e os resultados dos parâmetros calculados de coeficiente de regressão linear (r) e da velocidade de degradação (k), estão descritos na Tabela 8.

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que o SRL se degrada segundo o modelo difusional (D) apresentando melhores resultados para o modelo difusional tridimensional D3, pois neste modelo obteve-se o melhor valor do coeficiente de regressão linear em todas as temperaturas testadas. Este tipo de degradação ocorre nos processos em que a nucleação é instantânea e o prosseguimento da reação ocorre por interpenetração das partículas reagentes, que provavelmente é a etapa determinante da velocidade do processo.

A Figura 42 apresenta o gráfico do grau de conversão (α) pelo tempo dado em segundos. Pode-se observar que quanto maior a temperatura utilizada no experimento, mais rápido o SRL começa a se degradar e posteriormente podemos observar a desaceleração desta degradação com o aumento do tempo, o que condiz com o modelo de ajuste difusional (D3) que é um modelo cinético desacelerante.

Tabela 8 – Cálculo da cinética em estado sólido do SRL, valores calculados de r e k

Temperatura (°C)	Parâmetros	Modelos matemáticos de ajuste								
		A2	A3	A4	B1	R2	R3	D1	D2	D3
180	r	0,7772	0,7296	0,7006	0,5983	0,7656	0,7180	0,9392	0,9418	0,9443
	k	0,0001	0,0001	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
182	r	0,8158	0,7700	0,7418	0,6389	0,8070	0,7611	0,9649	0,9666	0,9682
	k	0,0001	0,0001	0,0001	0,0011	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
184	r	0,7987	0,7517	0,7229	0,6189	0,7897	0,7426	0,9553	0,9572	0,9590
	k	0,0001	0,0001	0,0001	0,0010	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
186	r	0,7816	0,7327	0,7030	0,5981	0,7710	0,7222	0,9495	0,9518	0,9540
	k	0,0001	0,0001	0,0001	0,0009	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000
188	r	0,7754	0,7246	0,6939	0,5852	0,7647	0,7139	0,9489	0,9512	0,9534
	k	0,0001	0,0001	0,0001	0,0008	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000

Temperatura (°C)	Parâmetros	Continuação – Modelos matemáticos de ajuste								
		D4	F0	F1	F2	F3	E1	P2	P3	P4
180	r	0,9427	0,8566	0,8672	0,8773	0,8869	0,5788	0,7656	0,7180	0,6892
	k	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000
182	r	0,9671	0,8923	0,9001	0,9076	0,9148	0,6236	0,8070	0,7611	0,7330
	k	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0002	0,0010	0,0001	0,0001	0,0001
184	r	0,9578	0,8780	0,8861	0,8939	0,9014	0,6033	0,7897	0,7426	0,7139
	k	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0009	0,0001	0,0001	0,0001
186	r	0,9525	0,8649	0,8747	0,8840	0,8929	0,5807	0,7710	0,7222	0,6927
	k	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0008	0,0001	0,0001	0,0001
188	r	0,9519	0,8619	0,8716	0,8810	0,8899	0,5673	0,7647	0,7139	0,6833
	k	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0001	0,0007	0,0001	0,0001	0,0001

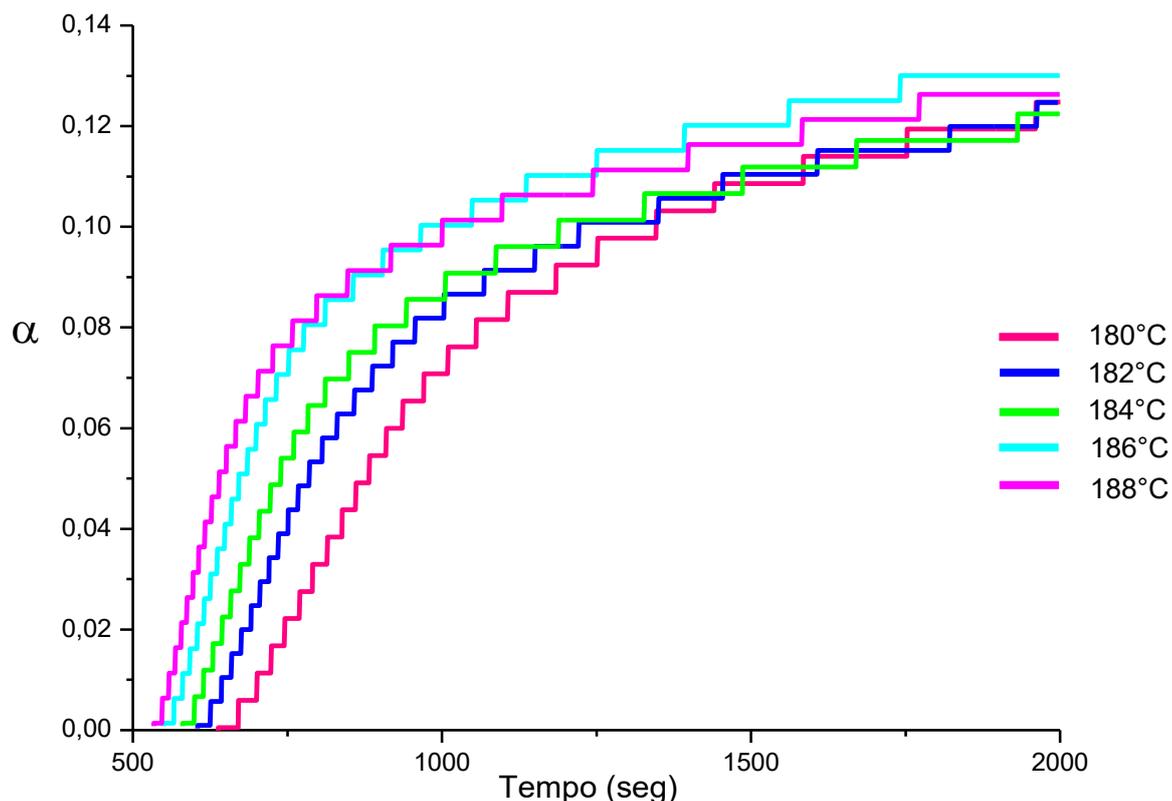


Figura 42 – Gráfico da fração decomposta pelo tempo

Para realização do cálculo de energia de ativação, foi utilizado o logaritmo natural do tempo em função da recíproca de temperatura ($\ln t$ (minutos) vs. $1/T$ (K^{-1})) para construção do gráfico de Arrhenius utilizando uma perda de massa fixa de 10% do fármaco. Este tipo de cálculo foi realizado pois o modelo de ajuste difusional não possui ordem de reação cinética descrita, necessitando por tanto a utilização de um método alternativo (COSTA, 2014; SALVIO NETO, 2010; BROWN, 2001). O cálculo da E_a é baseado na equação de Arrhenius e é resultante da multiplicação do coeficiente angular da equação de Arrhenius e a constante geral dos gases (R).

A Figura 43 apresenta o gráfico obtido com respectivo valor de angulação utilizado no cálculo, este valor pode ser utilizado pois os dados apresentaram uma correlação com valor de $r = 0,995$. O valor da E_a calculado foi de $90,42 \text{ kJ mol}^{-1}$.

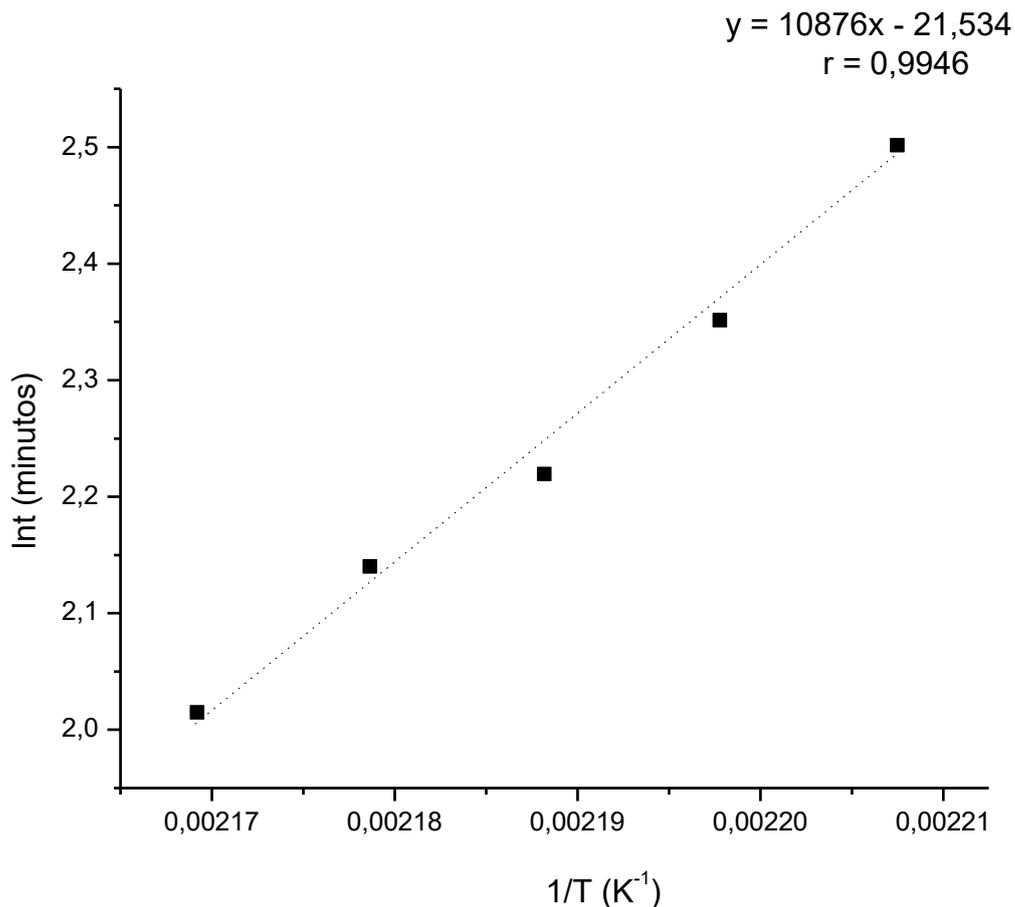


Figura 43 – Gráfico de *Arrhenius* construído a partir dos resultados obtidos nas isotermas para 10% de perda de massa do SRL.

Com os dados obtidos a partir do gráfico de Arrhenius, considerando o tempo para perda de massa de 10% do fármaco, foi realizada a extrapolação da reta para a temperatura de 25°C (Figura 44) e calculado o t_{90} . Como se trata de cálculo utilizando os ajustes matemáticos para degradação de estado sólido, não se pode adotar uma ordem clássica de reação sendo assim, as equações utilizadas para os cálculos de t_{90} nas degradações em solução (item 4.6.2.1) não são aplicadas e o cálculo foi realizado utilizando a equação de Arrhenius (Int (minutos) vs. $1/T$ (K^{-1})), onde Int é o logaritmo do tempo necessário para uma perda de massa igual a 10% em relação à massa inicial. O resultado obtido de Int a 25°C para perda de 10% do SRL, calculado por extrapolação, foi de 6 anos, como demonstrado nas equações abaixo:

$$\ln t (25^{\circ}\text{C}) = 14,9621789$$

$$t (25^{\circ}\text{C}) = 3147688,4 \text{ minutos}$$

ou seja, $t_{90} = 6$ anos.

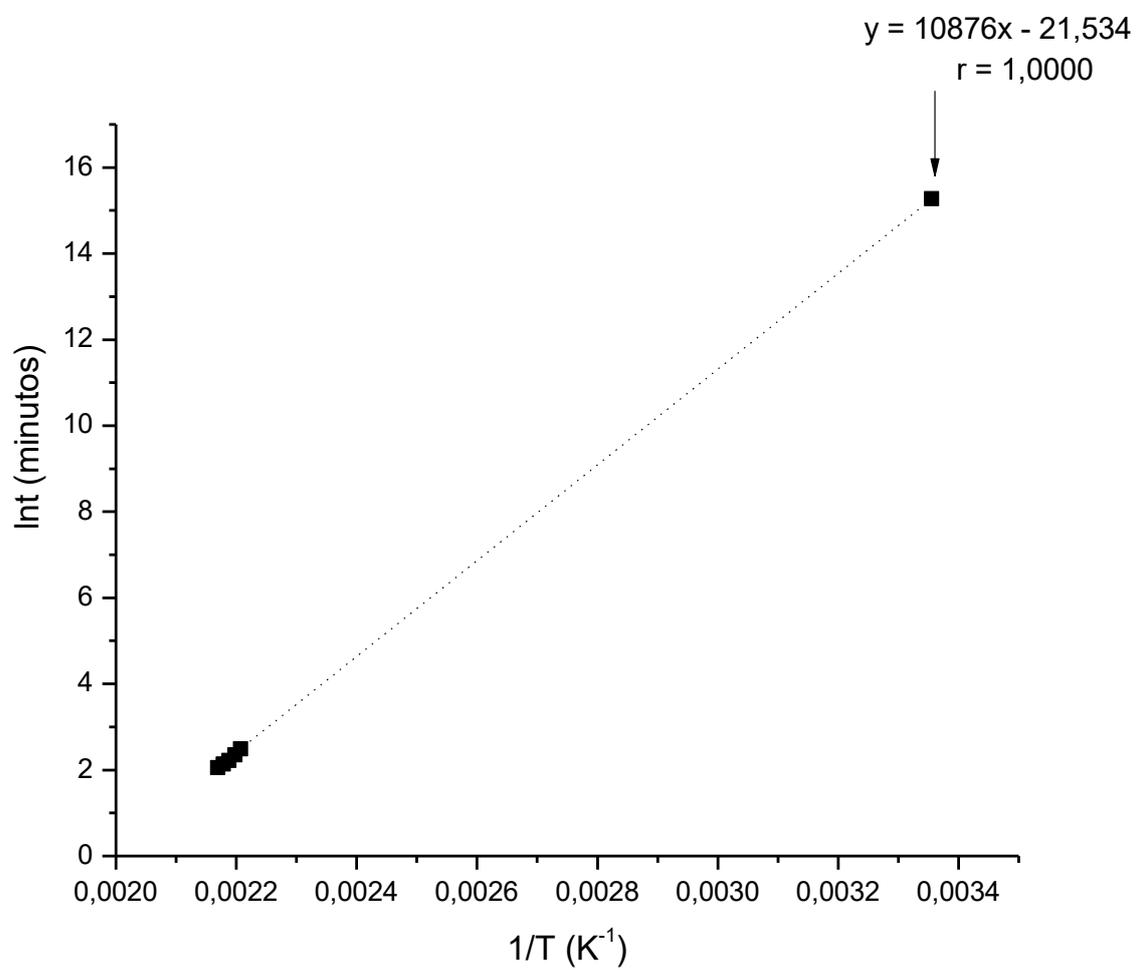


Figura 44 – Gráfico de Arrhenius extrapolado para 10% de perda de massa do SRL.

4.8 Análise e determinação de teor nas amostras dos pós liofilizados para obtenção dos implantes poliméricos biodegradáveis

4.8.1 Análise dos pós liofilizados por CLAE

Para avaliação da presença do fármaco nos pós liofilizados, estes foram injetados nas mesmas condições cromatográficas otimizadas: coluna C18 (250 x 4.6 mm; 5 μ m, Varian); fase móvel: metanol/água (80:20); 1,5 mL min⁻¹; injeção 20 μ L; detecção UV com $\lambda = 278$ nm; 50 °C.

A Figura 45 mostra os cromatogramas dos implantes. Como pode ser observado, o fármaco está presente em todas as formulações dos implantes, sendo que nos implantes liofilizados preparados com o polímero quitosana e PCL, nota-se a formação de um produto de degradação com o mesmo tempo retenção ($t_R = 1,2$ minutos) em relação aos PD's formados nos testes de estresse após exposição ao calor, hidrólise neutra e hidrólise básica.

Os espectros na região do UV, obtidos dos PD's das amostras dos implantes obtido com quitosana e PCL (Figuras 46 e 47) sugerem, de acordo com as Figuras 29, 30 e 31, que o PD de degradação formado seria o mesmo encontrado nos testes de estresse do fármaco em solução.

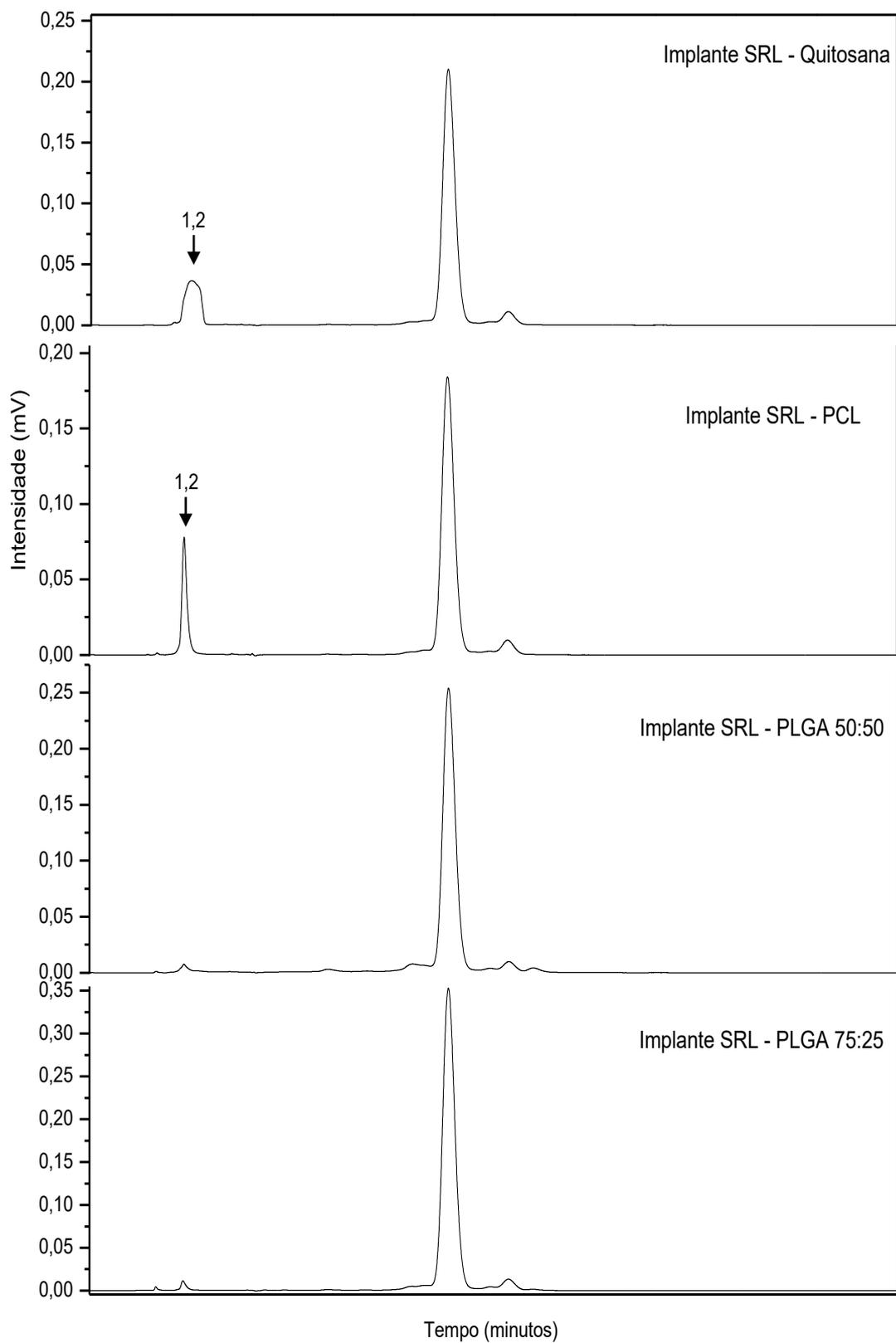


Figura 45 – Cromatogramas dos implantes liofilizados.

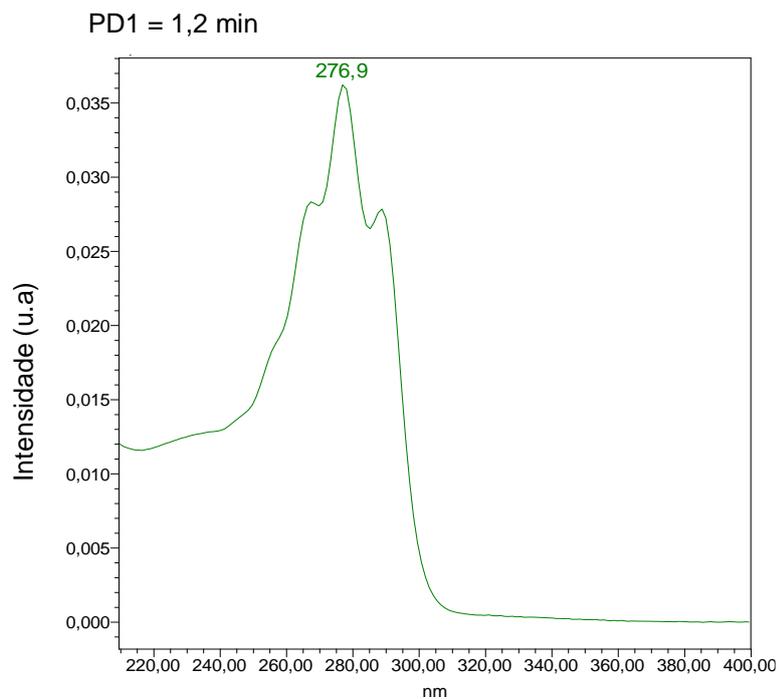


Figura 46 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), referente ao pico PD1 ($t_R = 1,2$ min) da amostra do implante SRL-quitosana.

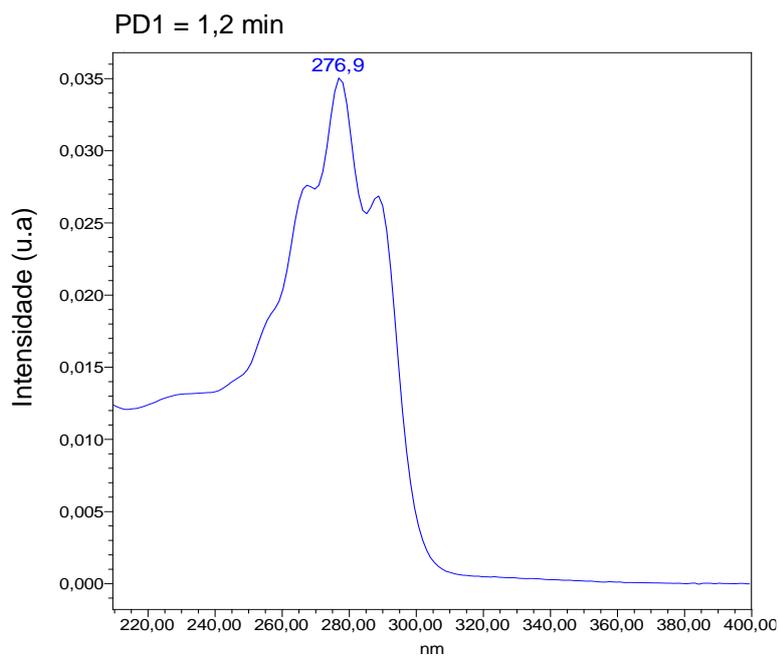


Figura 47 – Espectro de UV, obtido com detector de arranjos de diodo (UV-DAD), referente ao pico PD1 ($t_R = 1,2$ min) da amostra do implante SRL-PCL.

4.8.2 Determinação do teor do fármaco sirolimus nas amostras de pós liofilizados

Para determinação do teor do fármaco nas amostras de pós liofilizados, foram preparadas amostras com concentração final aproximada de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ do fármaco para cada base polimérica, havendo uma pequena variação que foi considerada nos cálculos, e padrão com concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os cálculos foram realizados corrigindo-se a área padrão para corresponder a cada amostra e os resultados estão descritos na tabela 8. Com os resultados obtidos no cálculo de teor, podemos observar que para os implantes confeccionados com quitosana e PCL, o teor do fármaco apresentou-se em menor quantidade devido a degradação do mesmo e formação de PD já descrito anteriormente. Para o PLGA 50:50 não houve a formação de PD porém, a quantidade de teor apresenta-se em menor quantidade quando comparado ao teor do implante produzido com PLGA 75:25. Na elaboração dos implantes utilizou-se um teor de 25% do fármaco, sendo que no pó liofilizado utilizado para confeccionar o implante com PLGA 75:25, o teor encontrado foi de 24,6% (Tabela 9), o que atesta a permanência quase total do fármaco no implante final liofilizado.

Nos testes de compatibilidade em estado sólido realizados por DSC e DRX constatou-se não haver incompatibilidade entre os polímeros e o SRL. No entanto, esta degradação do fármaco visualizada no ensaio de teor para os implantes confeccionados com Quitosana e PCL pode estar relacionada à solubilização do SRL associada à presença dos polímeros PCL ou quitosana, e temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do forno da coluna.

Este resultado indica que o SRL apresenta menor estabilidade em solução na presença de quitosana e PCL, quando comparado ao polímero PLGA.

Tabela 9 – Cálculo de teor do fármaco SRL nos implantes liofilizados

Implante	Área da amostra ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$)	Área do padrão ($\mu\text{V} \cdot \text{seg}$)	Teor (%)
Quitosana	2195553	154233632	14,2
PCL	1926769	154233632	12,5
PLGA 50:50	2651639	154233632	17,2
PLGA 75:25	3656716	14872788	24,6

5 CONCLUSÕES

Para os testes de compatibilidade através da técnica de DSC pôde-se constatar não haver incompatibilidades entre os polímeros e o SRL. Na avaliação dos implantes, porém, o pico de fusão do fármaco não foi observado, fato que se atribuiu a amorfização do mesmo após o processo de fabricação do implante, que apresenta etapas típicas para obtenção de pó amorfo e que se confirmou nos estudos de DRX.

No teste de estabilidade intrínseca e estudos cinéticos em solução, o fármaco SRL degradou-se após exposição ao calor, hidrólise neutra e hidrólise básica. A degradação do SRL apresentou cinética de degradação de primeira ordem para exposição ao calor, ordem zero para hidrólise básica e segunda ordem para hidrólise neutra. Os resultados obtidos mostraram uma E_a de 153,53 kJ mol^{-1} e t_{90} de 13,1 dias para a degradação em calor; E_a de 103,54 kJ mol^{-1} e t_{90} de 4,2 dias em meio neutro (hidrólise neutra); e E_a de 93,64 kJ mol^{-1} e t_{90} de 1,64 dias para hidrólise básica (pH 13). Este resultado demonstra a baixa estabilidade do fármaco em solução. O fármaco pode ser considerado muito instável após solubilização, e esta instabilidade pode ainda ser agravada diante da presença de água ou pH elevado.

Nos estudos de cinética em estado sólido, o SRL apresentou degradação segundo o modelo difusional tridimensional D3, com cinética desacelerante, a E_a calculada foi 90,42 kJ mol^{-1} e o t_{90} calculado utilizando uma perda de massa fixa de 10% da quantidade inicial do fármaco foi de 6 anos, o que pode ser considerado um bom resultado de estabilidade para um fármaco. Isto demonstra a baixa reatividade do SRL em estado sólido.

Na análise de teor dos pós liofilizados para confecção dos implantes, podemos concluir que o PD formado do SRL na presença de quitosana e PCL é o mesmo encontrado nos testes de estresse do fármaco em solução. Além disso, os resultados demonstraram que o SRL apresenta estabilidade reduzida em solução na presença de quitosana e PCL, quando comparado ao polímero PLGA.

Conclui-se através dos resultados obtidos que a formulação de implante polimérico contendo 25 % de SRL com a base polimérica PLGA 75:25 pode ser empregada, pois o teor do SRL foi mantido e não houve degradação do mesmo. Como perspectivas futuras, devem ser realizados estudos de estabilidade e liberação da forma farmacêutica visto que há amorfização do SRL.

6 REFERÊNCIAS

ACHARYA, S. SAHOO, S. K. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. **Advanced Drug Delivery**. v. 63, p. 170–83 2011.

AGARWAL, S.; SPEYERER, C. Degradable blends of semi-crystalline and amorphous branched poly(caprolactone): Effect of microstructure on blend properties. **Polymer**, v. 51, p. 1024 - 1032, 2010.

ATHANASIOU, K. A; NIEDERAUER, G.G.; AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, v.17, p.93-102, 1996.

AUGUSTINE, J. J., BODZIAK, K. A., HRICIK, D. E. Use of Sirolimus in Solid Organ Transplantation. **Drugs**, v. 63, p.369-391, 2007.

AVRAMI, M. Kinetics of Phase Change. I General Theory. **Journal of Chemical Physics**, v.7, p. 1103-1112, 1939.

BAHN, Y. S., XUE, C., IDNURM, A., RUTHERFORD, J. C., HEITMAN, J., CARDENAS, M. E. Sensing the environment: lessons from fungi. **Nature reviews. Microbiology**. v. 5, p. 57-69, 2007.

BAHAESCU, I. IZZEDINE, H., COVIC, A. Sirolimus – Challenging Current Perspectives. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 28, p.577-584, 2006.

BALESTRIERI, F.; MAGRI, A. D.; MAGRI, A. L.; MARINI, D.; SACCHINI, A. Application of differential scanning calorimetry to the study of drug-exipient compatibility. **Thermochemical Acta**, v. 285, p. 337-345, 1996.

BAI, S., STEPKOWSKI, S. M., KAHAN, B. D., BRUNNER, L. J. Metabolic interaction between cyclosporine and Sirolimus. **Transplantation**. v. 77, p. 1507–1512, 2004.

BAZZO, G. C.; SEGATTO SILVA, G. C. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria

exploratória diferencial (DSC). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 315-322, 2005.

BENGISU, M., YILMAZ, E. Oxidation and pyrolysis of chitosan as a route for carbon fiber derivation. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 165–175, 2002.

BOFFA, D. J., LUAN, F., THOMAS, D., YANG, H., SHARMA, K. V., LAGMAN, M., SUTHANTHIRAN, M. Rapamycin Inhibits the Growth and Metastatic Progression of Non-Small Cell Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p.293-300, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, 29 de julho de 2005. Publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de agosto de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de dezembro de 2013.

BROWN, M. E. **Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications**. 2 ed. New York: Kluwer Academic Publishers, 2001. 264 p.

CAI, J., XIONG, Z., ZHOU, M., TAN, J., ZENG, F., MEIHUMA, LIN, S., XIONG, H. Thermal properties and crystallization behavior of thermoplastic starch/poly(-caprolactone) composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 746–754, 2014.

CAMPOS, A., MARCONCINI, J. M., MARTINS-FRANCHETTI, S. M., MATTOSO, L. H. C. Comportamento térmico, mecânico e morfológico de blendas de amido termoplástico (TPS) e policaprolactona (PCL). Anais do 11º Congresso Brasileiro de Polímeros – Campos do Jordão, SP – 16 a 20 de outubro de 2011.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Artliber, p. 183, 2002.

CANEVAROLO, S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, p 238-239, 2007.

CAO, Y.; LANGER, R. Optimizing the Delivery of Cancer Drugs that Block Angiogenesis. **Science Translational Medicine**, v. 2, p.1-5, 2010.

CERCENÁ, R. **Preparação, caracterização, propriedades mecânicas e térmicas de sistemas EPDM/CAULIM e EPDM/NANOCAULIM**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 208, 2013.

CIDES, L. C. S.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. R. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 84, n. 2, p. 441-445, 2006.

COHN, D.; SALOMON, A. H. Designing biodegradable multiblock PCL/PLA thermoplastic elastomers. **Biomaterials**, v. 26, n.15, p. 2297-2305, 2005.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade de Coimbra, Coimbra, p. 242, 2010.

COOK, K.M.; FIGG, W.D. Angiogenesis Inhibitors: Current Strategies and Future Prospects. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, p. 222-243, 2010.

CORRIGAN, O. I., LI, X. Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 477–485, 2009.

COSTA, I.M. **Estudo de propriedades físico-químicas de metalofármacos de dirutênio com anti-inflamatórios não esteroídes**. Tese (Doutorado em Química), Universidade de São Paulo (USP). São Paulo – SP, p 127, 2014.

CRAIG, D. Q. M.; READING, M. **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. New York: CRC Press, 2007. 400 p.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas – SP, p. 212, 2005.

DANTAS, H. J. **Estudo termoanalítico cinético e reológico de biodiesel derivado do óleo de algodão (*Gossypium hisutum*)**. Dissertação, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa - PB, 2006. 86p.

DE AZEVEDO, M. M. M. **Nanoesferas e a liberação sustentada de fármacos**. Monografia, Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP, 2003.

DOROTHEE-SOPHIE, C.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **PSTT Resource Focus**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

ELZUBAIR, A.; ELIAS, C. N.; SUAREZ, J. C. M.; LOPES, H. P.; VIEIRA, M. V. B. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. **Journal of Dentistry**, vol. 34, n. 10, p 784–789, 2006.

EMAMI, S.; VALIZADEH, H.; ISLAMBULCHILAR, Z.; ZAKERI-MILANI, P. Development and Physicochemical Characterization of Sirolimus Solid Dispersions Prepared by Solvent Evaporation Method. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n.4, p. 369-374, 2014.

ERBETTA, C. D. C.; VIEGAS, C. C. B.; FREITAS, R. F. S.; SOUSA, R. G. Síntese e Caracterização Térmica e Química do Copolímero Poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo). **Polímeros**, vol. 21, n° 5, p. 376-382, 2011.

FACOMPRES, N. D. Remarkable inhibition of mTOR signaling by the combination of rapamycin and 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate in human prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 131, p.2134-2142, 2012.

FERGUSON, H. F.; FRURIP, D. J.; PASTOR, A. J.; PEEREY, L. M.; WHITING, L. F. A review of analytical applications of calorimetry. **Thermochimica Acta**, v. 363, p. 1-21, 2000

FIALHO, S. L.; SILVA-CUNHA, A. Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intraocular application. **Drug delivery**, v. 12, n. 2, p. 109-116, 2005.

FIALHO, S. L. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e implantes biodegradáveis para aplicação oftálmica**. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, p. 189, 2003.

FIALHO, S. L.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; SILVA-CUNHA, A. Biodegradable implants for ocular delivery of anti-inflammatory drug. **Journal of Drug Development Science and Technology**, v.17, n.1, p.93-97, 2007.

FLINTOFT, L. Going for the double. **Nature Reviews Cancer**. 4.3. Academic OneFile. p. 172, 2004.

FUKUSHIMA, K., TABUANI, D., CAMINO, G. Nanocomposites of PLA and PCL based on montmorillonite and sepiolite. **Materials Science and Engineering**, v.29, p. 1433–1441, 2009.

GABBOTT, P. **Principles and applications of thermal analysis**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. 464 p.

GALWEY, A. K.; BROWN, M. E. Kinetic Background to Thermal Analysis and Calorimetry. **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry: Principles and Practice**, v. 1, Cap. 3, 1998.

GALWEY, A. K.; BROWN, M. E. Analysis and Interpretation of Experimental Kinetic Measurement. **Thermal Decomposition of Ionic Solids: Chemical Properties and Reactivities**, Cap. 5, p. 139-171, 1999.

GONÇALVES, S. P. C. **Biodegradação de filmes de PHBV, PCL, PP e blendas pela ação de microrganismos de solo**. Tese (Doutorado em Biociências). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, p.140, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 1848, 2006.

GRIFFITH, L.G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v.48, p. 263-277, 2000.

HARTFORD, C. M., RATAIN, M. J. Rapamycin: Something Old, Something New, Sometimes Borrowed and Now Renewed. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n.4, 2007.

HASIRCI, V.; LEWANDROWSKI, K.; GRESSER, J.D.; WISE, D.L.; TRANTOLO, D.L. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. **Journal of Biotechnology**, v.85, p.135-150, 2001.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. **Thermal analysis: Fundamentals and applications to polymer science**, 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 180p.

HU, X.; LIN, C.; CHEN, D.; ZHANG, J.; LIU, Z.; WU, W.; SONG, H. Sirolimus solid self-microemulsifying pellets: Formulation development, characterization and bioavailability evaluation **International Journal of Pharmaceutics**, v. 438, p. 123 – 133, 2012.

HUGHES, P., MUSSER, J., CONKLIN, M.; RUSSO, R. The isolation, synthesis and characterization of an isomeric form of rapamycin. **Tetrahedron Letters**, v. 33,p. 4739–4742, 1992.

ICH Q1A (R2) - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2), 2003.

ICH Q1B - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use. Stability testing: photostability testing of new drug substances and products Q1B, 1996. .

ICH Q2 (R1) - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), 2005.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Incidência de Câncer no Brasil 2015. Rio de Janeiro, p. 124, 2015.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro. p. 128, 2011.

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

KAELIN, W. G., JR. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 9, p. 689-98, 2005.

KANG, H. S.; PARK, S. H.; LEE, Y. G.; SON, T. I., Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly(γ -glutamic acid) for biological application: Preparation, physical properties, and cytocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, n.1, p. 386-394, 2007.

KHANDANLOU, R., AHMAD, M. B., SHAMELI, K., SAKI, E., KALANTARI, K. Studies on properties of rice straw/polymer nanocomposites based on polycaprolactone and Fe_3O_4 nanoparticles and evaluation of antibacterial activity. **International Journal Molecular Science**, v. 15, p. 18466-18483, 2014.

KHAWAM, A.; FLANAGAN, D. R. Solid-State Kinetic Models: Basics and Mathematical Fundamentals. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.110, n. 35, p.17315-17328, 2006.

KIM, C. **Advanced pharmaceuticals: physicochemical principles**. New York: CRC PRESS, p. 498, 2004.

KIM, M. S., KIM, J. S., PARK, H. J., CHO, W. K., CHA, K. H., HWANG, S.J. Enhanced bioavailability of sirolimus via preparation of solid dispersion nanoparticles using a supercritical antisolvent process. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2997–3009, 2011.

KOETZ, J.; KOSMELLA, S., Eds. **Polyelectrolytes and Nanoparticles**. Springer: Berlin, 2007.

KUBOTA, N.; SHIMODA, K., Macromolecular Complexes of Chitosan. **In Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**, 2nd edition; Dumitriu, S., Ed. Marcel Dekker, NY, p. 679 – 706, 2005.

KUMAR, V., BANKER, G. S. Chemically-Modified Cellulosic Polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.19, p.1, 1993.

KUMIRSKA, J., CZERWICKA, M., KACZYŃSKI, Z., BYCHOWSKA, A., BRZOZOWSKI, K., THÖMING, J., STEPNOWSKI, P. Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, n.5, p. 1567–1636, 2010.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v.26, p.1921-1971, 2001.

LI, B., SHAN, C. L., ZHOU, Q., FANG, Y., WANG, Y. L., XU, F., SUN, G.C. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde. **Marine Drugs**, v. 11, n. 5, p. 1534 – 1552, 2013.

LI, G.; CAO, L.; ZHOU, Z.; CHEN, Z.; HUANG, Y.; ZHAO, Y. X. Rapamycin loaded magnetic Fe₃O₄/carboxymethylchitosan nanoparticles as tumor-targeted drug delivery system: Synthesis and in vitro characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.128, p. 379–388, 2015.

LIU, M., HOWES, A., LESPERANCE, J., STALLCUP, W.B., HAUSER, C.A., KADOYA, K., OSHIMA, R.G., ABRAHAM, R.T. Antitumor Activity of Rapamycin in a Transgenic Mouse Model of ErbB2-Dependent Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 65, p. 5325-5336, 2005.

LUO, P. C., CHENG, Y., JIN, Y., YANG, W. H., DING, J. S. Fast liquid mixing by crossflow impingement in millimeter channels. **Chemical Engineering Science**, v.62, p. 6178– 6190, 2007.

MACEDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G. Quality control of thiabendazole pre-formulation and tablets by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochimica Acta**, 392-393, p. 85-92, 2002.

MACEDO, R. O.; NASCIMENTO, T. G.; VERAS, J. W. E. Comparison of generic hydrochlorothiazide formulations by means of TG and DSC coupled to a photovisual system. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 64, p. 757-763, 2001.

MGÓN, A.; PYDA, M. Melting, glass transition, and apparent heat capacity of α -d-glucose by thermal analysis. **Carbohydrate Research**, v.346, n.16, p. 2558-2566, 2011.

MAHALATI, K., KAHAN, B.D. Clinical pharmacokinetics of Sirolimus. **Clinical Pharmacokinetics**, v.40, p. 573–585, 2001.

MATTOS, J. R.; BARRAK, E. R.; IONASHIRO, M. Análise Térmica (TG, DSC e DTA); USP, São Paulo, 1995.

MEDEIROS, A. C. D.; CERVANTES, N. A. B.; GOMES, A. P. B.; MACEDO, R. O. Thermal stability of prenisone drug and tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 64, p. 745-750, 2001.

MENDES, J. B. E. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo Resveratrol**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, p. 88, 2011.

MENG, Z.X.; ZHENG, W.; LI, L.; ZHENG, Y.F. Fabrication and characterization of three-dimensional nanofiber membrane of PCL–MWCNTs by electrospinning. **Materials Science and Engineering**, v. 30, p. 1014–1021, 2010.

MERKLI, A.; TABATABAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. **Progress of Polymers Science**, v.23, p. 563-580, 1998.

MONEGHINI, M.; CARCANO, A.; ZINGONE, G.; PERISSUTTI, B. Studies in dissolution enhancement of atenolol. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 177 – 183, 1998.

NAIR, L S; LAURENCIN, C T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymers Science**, v. 32, p.762-798, 2007.

NAPOLI, K.L., TAYLOR, P.J. From beach to bedside: history of the development of sirolimus. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 23, p. 559–586, 2001.

NETO, C.G.T., GIACOMETTI, J.A., JOB, A.E., FERREIRA, F.C., FONSECA, J.L.C., PEREIRA, M.R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 97–103, 2005.

NIETO, J. M., PENICHE-COVAS, C., PADRON, G. Characterization of chitosan by pyrolysis-mass spectroscopy, thermal analysis and differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**, v. 176, p. 63–68, 1991.

OGAWA, K. et al. Three D structures of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.34, p.1-8, 2004.

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

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011.

ONYESOM, I., LAMPROU, D. A., SYGELLOU, L., OWUSU-WARE, S. K., ANTONIJEVIC, M., CHOWDHRY, B. Z., DOUROUMIS, D. Sirolimus Encapsulated Liposomes for Cancer Therapy: Physicochemical and Mechanical Characterization of Sirolimus Distribution within Liposome Bilayers. **American Chemical Society**, v. 10, p.4281-4293, 2013.

OZTURK, E.; AGALAR, C.; KECECI, K.; DENKBAS, E. B., Preparation and characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as a wound dressing material. **Journal of Applied Polymer Science**, v.101, n.3, p. 1602-1609, 2006.

PAWLAK, A., MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, p. 153–166, 2003.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.447-451, 2001.

PINHO, M. S. L. Angiogênese: O Gatilho Proliferativo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 25, p.396-402, 2005.

POEL, H. G., HANRAHAN, C., ZHONG, H., SIMONS, J.W. Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. **Urological Research**, v. 30, p.380-386, 2003.

POLETTO, F. S.; JAGER, E.; RE, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Rate-modulating PHBHV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics** v. 345, p. 70-80, 2007.

PÓPULO, H. I. M. **Relevance of mTOR pathway in the initiation/progression of human tumours**. Tese (Doutorado em Biomedicina), Universidade do Porto, Porto. p. 163, 2011.

RIBANI, M., Bottoli, CBG; Collins, CH; Jardim, ICSF; Melo, L. FC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, 2004. RICCIUTELLI, M.; DI MARTINO, P.; BARBONI, L.; MARTELLI, S. Evaluation of rapamycin chemical stability in volatile-organic solvents by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.4, p.1070–1074, 2006.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p.383-7, 2005.

SALIBA, J. B. **Avaliação Biológica de implantes contendo *Ciclosporina A* de administração intravítrea**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte. p. 152, 2011.

SALIBA, J. B. **Sistemas biodegradáveis de administração intra-ocular contendo ciclosporina (A) para tratamento da uveíte posterior**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, p.118, 2007.

SALVIO NETO, H. **Estudo de compatibilidade fármaco/excipientes e de estabilidade do prednicarbato por meio de técnicas termoanalíticas, e encapsulação do fármaco em sílica mesoporosa do tipo SBA – 15**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo (USP). São Paulo – SP, p 206, 2010.

SEHGAL, S.N. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): An overview and mechanism of action, **Therapeutic Drug Monitoring**, v.17, p. 660–665, 1995.

SEHGAL, S.N., BAKER, H., VEZINA, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. **The Journal of Antibiotics**, v. 28, p. 727–732, 1975.

SESTAK, J. Philosophy of non-isothermal kinetics. **Journal of Thermal Analysis**, v. 2, n. 16, p. 503-520, 1979.

SHE, Z. D.; LIU, W. Q.; FENG, Q. L., Self-assembly model, hepatocytes attachment and inflammatory response for silk fibroin/chitosan scaffolds. **Biomedical Materials**, v. 4, p. 4, 2009.

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

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Journal Basic of Applied Pharmaceutical Science**, v. 30, n. 2, p. 1-8, 2009.

SILVA-JÚNIOR, A. A., SCARPA, M. V., PESTANA, K. C., MERCURI, L. P., MATOS, J. R., OLIVEIRA, A. G. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. **Thermochimica Acta**, v.467, p. 91–98, 2008.

SILVA-JUNIOR, A. A., MATOS, J. R., FORMARIZ, T. P., ROSSANEZI, G., SCARPA, M. V., EGITO, E. S. T., OLIVEIRA A. G. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone **International Journal of Pharmaceutics**, v. 368, p. 45–55, 2009.

SOBHANI, H.; SHAFATI, A.; NAFISSI-VARCHEH, N.; ABOOFAZELI, R. A Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Rapamycin. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.12 (supplement): 77- 81, 2013.

SOLYMOSI, T., ANGI, R., BASA-DÉNES, O., RÁNKY, S., ÖTVÖS, Z., GLAVINAS, H., FILIPCSE, G., HELTOVICS, G. Research Paper Sirolimus formulation with improved pharmacokinetic properties produced by a continuous flow method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 135–140, 2015.

SOUZA, F. S.; BASILIO JR, I. D.; OLIVEIRA, E. J.; MACEDO, R. O. Correlation studies between thermal and dissolution rate constants of cimetidine drug and tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 72, p. 549-554, 2003b.

SOUZA, M. C. M. **Desenvolvimento de sistemas poliméricos de implantação intraocular contendo Tacrolimus para o tratamento de uveítes crônicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, p.147, 2012.

SOUZA, N. A. B.; MEDEIROS, A. C. D.; SANTOS, A. F. O.; MACEDO, R. O. Thermal stability of metronidazole drug and tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 72, p. 535-538, 2003a.

STIPPEL, D. L., KASPER, H.U., SCHLEIMER, K., TÖX, U., BANGARD, C., HÖLSCHER, A. H., BECKURTS, K.T. Successful use of sirolimus in a patient with bulky ovarian metastasis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. **Transplantation Proceedings**, p. 2185-2187, 2005.

SUNDARAM, V.; KHARKAR, M. R.; YARRAGUNTLA, S. R.; GUDIPATI, S.; MANDAVA, V. N. B. R.; US pat 2006/0223882 A1, 2006.

TAMMARO, L.; RUSSO, G.; VITTORIA, V. Encapsulation of Diclofenac Molecules into Poly(ϵ - Caprolactone) Electrospun Fibers for Delivery Protection. **Journal of Nanomaterials**, v. 2009, p.1 - 8, 2009.

TIRKISTANI, F. A. A. Thermal analysis of some chitosan Schiff bases. **Polymer Degradation and Stability**, v. 60, p. 67–70, 1998.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B.P. Biodegradability and biodegradation of polyesters. **Journal of Polymer and the Environment**, v. 15, n. 4, p. 259-267, 2007.

TSUCHIDA, E., Formation of Polyelectrolyte Complexes and Their Structures. **Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry**, v.31, n.1, p. 1-15, 1994.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 31.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 3788, 2008.

VILLANOVA J. C. O., ORÉFICE, R. L., CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p.51-64, 2010.

WANG, Y.; QIU, D.; COSGROVE, T.; DENBOW, M. L., A small-angle neutron scattering and rheology study of the composite of chitosan and gelatin. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v.70, n.2, p. 254-258, 2009.

WANJUN, T., CUNXIN, W., DONGHUA, C. Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, p. 389–394, 2005.

WENDLANDT, W. W.; SESTÁK, J.; SATAVA, V.; **Thermochimica Acta**, v.7: p. 333, 1973.

WENDLANDT, W. W.; **Thermal Analysis**, 3a Edição, John Wiley & Sons, New York, 1986.

WHO - World Health Organization 2012. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/> >. Acesso em:12 de Julho 2014.

XING, Z.; YANG, G. Crystallization, Melting Behavior, and Wettability of poly (ϵ -caprolactone) and poly(ϵ -caprolactone)/poly (N-vinylpyrrolidone) blends. **Journal of Applied Polymers Science**, v. 115, p. 2747 – 2755, 2010.

YATSCOFF, R.W. Pharmacokinetics of rapamycin, **Transplantation Proceedings**, v. 28, p. 970–973. 1996.

YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. L.; VIANNA-SOARES, C. D.; CUNHA, A. F.; OLIVEIRA, M. A. Thermal analysis applied to verapamil hydrochloride characterization in pharmaceutical formulations. **Molecules**, v. 15, p. 2439-2452, 2010.

YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. L.; VIANNA-SOARES, C. D.; OLIVEIRA, M. A. Thermal behavior study and decomposition kinetics of amiodarone hydrochloride under isothermal conditions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, early online, p. 1-10, 2011a.

YOSHIDA, M. I.; OLIVEIRA, M. A.; LIMA GOMES, E. L.; MUSSEL, W. N.; CASTRO, W. V.; VIANNA-SOARES, C. D. Thermal characterization of lovastatin in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 657-664, 2011b.

YU, S. H.; MI, F. L.; WU, Y. B.; PENG, C. K.; SHYU, S. S.; HUANG, R. N., Antibacterial activity of chitosan-alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: Effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release. **Journal of Applied Polymer Science**, v.98, n.2, p. 538-549, 2005.

ZHANG, Y.; XUE, C.; XUE, Y.; GAO, R.; ZHANG, X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction, **Carbohydrate Research**, v.340, p. 1914–1917, 2005.

ZAMAN, H. U., BEG, M. D. H. Improvement of physico-mechanical, thermomechanical, thermal and degradation properties of PCL/gelatin biocomposites: Effect of gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.109, p.73–82, 2015.

ZAWADZKI, J., KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 394–400, 2010.

ZECH, S. G.; CARR, M.; MOHEMMAD, Q. K.; NARASIMHAN, N. I.; MURRAY, C.; ROZAMUS L. W.; DALGARNO, D. C. Identification of novel rapamycin derivatives as low-level impurities in active pharmaceutical ingredients. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 649–654, 2011.

ZOHURIAAN, M.J., SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, n. 5, p. 575–579, 2004.