Universidade de São Paulo - USP
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ

PATRÍCIA HELENA PAIVA MIGUEZ

Cinética de liberação de progesterona em dispositivos confeccionados a partir de blendas com PCL (Poli-ε-caprolactona) + PHB (Poli-hidroxibutirato)

São Paulo
2011

PATRÍCIA HELENA PAIVA MIGUEZ

Cinética de liberação de progesterona em dispositivos confeccionados a partir de blendas com PCL *(Poli-ε-caprolactona)* + PHB *(Poli-hidroxibutirato)*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento
Reprodução Animal

Área de Concentração
Reprodução Animal

Orientador
Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

8/6/11
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2449
FMVZ

Miguez, Patrícia Helena Paiva
Cinética de liberação de progesterona em dispositivos confeccionados a partir de blendas com PCL (Poli-ε-caprolactona) + PHB (Poli-hidroxibutirato) / Patrícia Helena Paiva Miguez. -- 2011.
100 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira.

1. Dispositivo. 2. Progesterona. 3. Bovino. 4. Farmacocinética. 5. Polímeros. 6. Biodegradáveis. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Cinética de liberação de progesterona em dispositivos confeccionados a partir de blendas poliméricas", utilizando 27 (vinte e sete) bovinos, protocolado sob o nº1767/2009, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/10/09.

We certify that the Research "Pharmacokinetics of progesterone insert with polymer blend", utilizing 27 (twenty seven) bovine, protocol number 1767/2009, under the responsibility Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/14/09.

São Paulo, 16 de outubro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

1934 | 2009 USP 75 FMVZ

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MIGUEZ, Patrícia Helena Paiva

Título: Cinética de liberação de progesterona em dispositivos confeccionados a partir de blendas com PCL *(Poli-ε-caprolactona)* + PHB *(Poli-hidroxibutirato)*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

A persistência é o caminho do êxito...

(Charles Chaplin)

Dedicatória

A ti senhor meu Deus, agradeço pela sabedoria que me concedeu durante esse tempo. Sou grata pela tua constante presença, que me manteve firme mesmo nas dificuldades. Concedei-me senhor, serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar aquela que posso e sabedoria para distinguir umas das outras.

Ao meu querido marido... Erlon... Foram muitas conversas para me confortar e apoiar ... Obrigada pela sinceridade, amor, carinho e apoio nas horas felizes e também nas horas tristes... Adoro saber que tenho alguém muito especial ao meu lado...

À minha mãe que ao longo deste caminho sempre me ouviu, apoiou e sonhou comigo. Sempre com muita sabedoria... me orientou e aconselhou... Obrigada por te sentir sempre ao meu lado...

Aos meus irmãos, Bia e Marinho, e ao meu pai José Mario, que mesmo de longe me apoiaram sempre...

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira pela orientação, amizade e ensinamentos...

Aos professores Mario Binelli, Rubens Paes de Arruda e Anneliese de Souza Traldi, pela amizade, confiança e ensinamentos...

Ao professor Edson, por me acolher em seu laboratório...

À minha vó Bendita Juraci pelo apoio em toda a minha vida...

À minha linda Aloé pela companhia que mesmo de longe é sentida até hoje...

Aos colegas do VRA Juliana Nascimento, André Furugen, Ju Naves, Daniela Franco, Moana, Kleber, Henrique, José Rodrigo, Fernando Pardo, Fernando Braga, Fabian, Andres.... muito obrigada pela ótima companhia... conversas... e ajuda de sempre.....

Ao meu amigo Milton que desde o começo do doutorado sempre me ajudou com muito comprometimento e dedicação... Você sempre será lembrado pelas conversas engraçadas... os churrascos.. as musicas no violão... as danças... mas acima de tudo será lembrado por estar sempre a disposição quando precisei. Obrigada!

Às minhas roommates, Aline, Carolzita, Lindsay, e Sarinha !!!!!! Sentirei saudades das muiiiiiitas conversas e risadas que sempre demos juntas!!!!! Dizem que amigos verdadeiros podem passar longos períodos sem se falar e jamais questionar essa amizade. Quando eles se encontram, independente do tempo e da distância, parecem que se viram ontem, e nunca guardam mágoas/rancor. Entendem que a vida é corrida, mas que você os amará PARA SEMPRE....

À Aliny Ladd que me ajudou muito, sem perder o animo de pesquisadora sempre.....

Ao funcionário do laboratório de Cromatografia VNP/FMVZ/USP, Ari, por toda ajuda, dedicação e trabalho durante este tempo.

A Universidade de São Paulo (USP), e à faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), assim como o Departamento de Reprodução Animal (VRA), pela oportunidade de aprendizagem.

Ao Cleiton, secretário do VRA de Pirassununga, por toda a ajuda, principalmente nos assuntos burocráticos.

As secretárias Harumi e Thaís, pela ajuda em varias ocasiões.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), do VRA/FMVZ/USP, João, Márcio, José Maria, Elaine, Sonia, Tai por toda ajuda e vivência durante todo este tempo.

A prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), pelo apoio e disponibilização dos animais para realização dos experimentos.

A FAPESP, pelo apoio financeiro e o incentivo na área de pesquisa acadêmica.

A todos que de alguma forma ajudaram e participaram na concretização deste trabalho.

À todos muito obrigada...

RESUMO

MIGUEZ, P. H. **Cinética de liberação de progesterona em dispositivos confeccionados a partir de blendas com PCL *(Poli-ε-caprolactona)* + *PHB (Poli-hidroxibutirato)*.** [Release kinetics of progesterone in devices made from blends with PCL (Poly-ε-caprolactone) + PHB (poly-hydroxybutyrate)]. 2011. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

No Brasil, o uso da Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) vem crescendo rapidamente, uma vez que elimina a necessidade de observação do cio e induz a ciclicidade de vacas em anestro (MADUREIRA et al., 2004). Na maioria dos protocolos de IATF, empregam-se dispositivos de liberação sustentada de progesterona (P_4) introduzidos na cavidade vaginal. Estes dispositivos são, na sua grande maioria, importados e confeccionados com uma armação de nylon, recoberta com silicone e progesterona. Visando a diminuição dos custos de produção e impacto ambiental, Pimentel (2006) confeccionaram dispositivos vaginais de liberação sustentada de progesterona, empregando uma mistura biopolimérica de PHB (Poli-hidroxibutirato) e PCL (poli-ε-caprolactona), para utilização no controle farmacológico do ciclo estral de vacas. No presente trabalho, foi estudado o mecanismo pelo qual, a progesterona é liberada da mistura biopolimérica (PHB46%+PCL46%+$P_4$8%). Para o estudo da cinética de liberação de P_4 foram utilizados dispositivos (n=21) para experimento *in vivo*, onde foram introduzidos na cavidade vaginal das vacas e coletados a cada 24 horas durante 7 dias. Para experimentos *in vitro* foram utilizados 12 dispositivos que foram colocados em dissolutor de comprimidos e foram retirados em triplicata a cada 24 horas por 4 dias. Foi realizado experimento para avaliação da distribuição e quantidade de P_4 em dispositivos de duas partidas diferentes em diversos pontos. A cinética de liberação de 4 tipos de dispositivos compostos de PHB+PCL+P4+ IrganoxB215® adicionados ou não de um protetor anti raios ultra violeta (Tinuvin®) foi avaliada. Foi observado que a cinética de liberação de P_4 se comportou de forma diferente entre sistemas *in vivo* e *in vitro*; em sistema *in vivo* foi de forma linear (R^2=0,929), sugerindo que a progesterona possa ser liberada de acordo com o mecanismo de ordem zero e *in vitro* a liberação pode ser explicada pelo modelo matemático de Higuchi (R^2=0,99) com o coeficiente de difusão calculado conforme a segunda lei de Fick foi de 2,09 x10^{-8} (cm^2/s). Observou-se que a P_4 no dispositivo está distribuída uniformemente (P= 0,519) e que aditivos e diferentes proporções de PHB+PCL não influenciaram a liberação de P_4 por um período de 96 horas de testes *in vitro*.

Palavras–chave: Dispositivo. Progesterona. Bovino. Farmacocinética. Polímeros. Biodegradáveis.

ABSTRACT

MIGUEZ, P. H. **Release kinetics of progesterone in devices made from blends with PCL (Poly-ε-caprolactone) + PHB (poly-hydroxybutyrate).** [Cinética de liberação de progesterona em dispositivos confeccionados a partir de blendas com PCL *(Poli-ε-caprolactona)* + *PHB (Poli-hidroxibutirato)*]. 2011. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In Brazil, the use of fixed-time artificial insemination (TAI) has been growing rapidly since it eliminates the need for estrus detection and induce cyclicity in anestrous cows (MADUREIRA et al., 2004). In most TAI protocols, devices are employed for the sustained release of progesterone (P_4) introduced into the vaginal cavity. These devices are mostly imported and made with a nylon frame, covered with silicone and progesterone. Seeking to reduce production costs and environmental impact, Pimentel (2006) crafted devices for the sustained release vaginal progesterone, using a mixture biopolymer PHB (poly-hydroxybutyrate) and PCL (poly-ε-caprolactone), for use in pharmacological control estrous cycle of cows. In the present work was to study the mechanism by which the progesterone is released from the mixture biopolymers (PHB46 PCL46% +% +% P48). To study the kinetics of release of P_4 device was used (n = 21) for *in vivo* experiment, where they were introduced into the vaginal cavity of cows and collected every 24 hours for 7 days. For *in vitro* experiments were used 12 devices were placed in dissolutor tablets and were taken in triplicate every 24 hours for 4 days. Experiment was conducted to assess the distribution and amount of P_4 in two matches and different devices on several points. The release kinetics of four types of devices composed of PHB + PCL + P4 + IrganoxB215 ®, added to a protective anti ultraviolet rays (Tinuvin ®) was evaluated. It was observed that the kinetics of release of P_4 behaved differently between systems *in vivo* and *in vitro*, the *in vivo* system was linear (R^2 = 0.929), suggesting that progesterone may be released according to the mechanism of order zero and *in vitro* release can be explained by the mathematical model of Higuchi (R^2 = 0.99) with the diffusion coefficient calculated according to Fick's second law was 2.09 x10-8 (cm2 / s). It was noted that a P_4 is evenly distributed on the device (P = 0.519) and additives that different proportions of PHB and PCL + did not influence the release of P_4 for a period of 96 hours of *in vitro* tests.

Keywords: Device. Progesterone. Cattle. Pharmacokinetics. Polymers. Biodegradable.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do (a) ácido-3-hidroxi-butirato e (b) poli-ácido-3-hidroxi-butirato (PHB) ... 38

Figura 2 - Fórmula estrutural poli-ε-caprolactona (PCL) ... 40

Figura 3 - Formula estrutural IrganoxB215® ... 41

Figura 4 - Formula estrutural Tinuvin® ... 42

Figura5 - Dispositivos confeccionados com blendas poliméricas (46%PCL+46%PHB+8%P_4). (Progestar®) ... 45

Figura 6 - Dissolutor de comprimidos (NOVA ÉTICA 2004), LFER, FMVZ-USP campos de Pirassununga ... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Recuperação de P_4 – Analise por HPLC 47

Tabela 2 - Eficiência de recuperação de P_4 – Análise por Espectrofotometro..... 48

Tabela 3 - Progesterona contida no dispositivo por dia (g/dia) (n=24), (X±EP)..... 54

Tabela 4 - Concentrações Plasmáticas de progesterona (ng/mL) (X±EP)..... 60

Tabela 5 - Progesterona contida no dispositivo por dia (g/dia) (n=21), (X±EP)... 70

Tabela 6 - Liberação diária de progesterona (g/horas)..... 75

Tabela 7 - Pontos coletados ao longo do dispositivo, e valores de *P*..... 79

Tabela 8 - Médias de concentração de P_4 nos tempos de incubação (X±EP)..... 84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva padrão de P_4 48

Gráfico 2 - Liberação *in vivo*, perfil de progesterona contida no dispositivo por dia (g/dia) (n=24) 55

Gráfico 3 - Liberação *in vivo* - P_4 por dispositivo em dias (g/dia/dispositivo), (n=21) 55

Gráfico 4 - Concentração Plasmática de Progesterona em 192 h (8 dias) 60

Gráfico 5 - Concentração plasmática de progesterona 0-24horas (ng/mL) 61

Gráfico 6 - Concentração de P_4 no dispositivo por hora (g/dispositivo/Hora) 71

Gráfico 7 - Média das quantidades acumuladas de P_4 liberadas por cm^2 em função da raiz quadrada do tempo 72

Gráfico 8 - Porcentagem de P_4 nos pontos coletados das partidas 2009 (1) e 2010 (2) 80

Gráfico 9 - P_4 acumulada pela liberação por cm2 de dispositivos com formulações diferentes, em função da raiz quadrada do tempo. **DISP1** formulação PHB:PCL:IRGANOXB215:P_4 na proporção de 45,65:45,65:0,70:8,00 respectivamente ◆, DISP2 PHB:PCL:IRGANOXB215:TINOVIN:P_4 na proporção de 45,50:45,50:0,70:0,30:8,00 respectivamente ■ ; DISP3 PHB:PCL:IRGANOXB215:P_4 na proporção de 40,65:50,65:0,70:8,00 respectivamente ▲; DISP 4 PHB:PCL:IRGANOXB215:TINOVIN:P_4 na proporção de 40,50:50,50:0,70:0,30:8,00 respectivamente X 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APEX- Agência brasileira de promoção de exportação e investimentos

ASBIA- Associação Brasileira de Inseminação Artificial

BE- Benzoato de Estradiol

Cm^2 – Centímetro quadrado

Cm - centímetro

CO_2- Dióxido de Carbono, Gás Carbônico

CH_4- Metano

CL- Corpo Lúteo

D- Dia

E_2- Estradiol

GNRH- Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

g - grama

HPLC - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

H_2O- Água

IA- Inseminação Artificial

IATF- Inseminação Artificial em Tempo Fixo

Kg – Kilograma

LH- Hormônio Luteinizante

MGA- Acetato de Melengestrol

mm- milímetros

mL – mililitros

mg – miligramas

MGA - acetato de melengestrol

PHBV - Poli (acido3-hidróxibutírico-co-hidróxivalérico)

P_4- Progesterona

PHB - Poli-hidroxibutirato

PCL - Poli-ε-caprolactona

PGF2α- Prostaglandina F2α

t ½ - raiz quadrada do tempo

RIA- Radioimunoensaio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 HIPÓTESE 25

3 OBJETIVOS 27

4 REVISÃO DE LITERATURA 29

4.1 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO 29

4.2 PROGESTERONA E PROGESTÁGENO 30

4.3 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE P_4 *IN VITRO* 32

4.4 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE P_4 *IN VIVO* 35

4.5 POLÍMEROS E BIOPOLÍMEROS 36

4.5.1 PHB – Polímero ambientalmente degradável 37

4.5.2 PCL - Polímero ambientalmente degradável 39

4.6 ADITIVOS 40

4.6.1 Estabilizante Antioxidante Fenólico 40

4.6.2 Estabilizante Absorvedor de UV 41

5 MATERIAL E MÉTODO 44

5.1 LOCAL 44

5.2 ANIMAIS 44

5.3 DISPOSITIVOS 44

5.4 METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE P_4 46

5.4.1 Metodologia 1 - Extração de P_4 para dosagem da progesterona na blenda PHB e PCL 46

5.4.2 Metodologia 2: Dosagem da progesterona na blenda PHB e PCL – Espectrofotômetro 47

5.5 TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO – HPLC 49

5.6 RADIO-IMUNO-ENSAIO 49

Estudo 1

6 ENSAIO *IN VIVO* - DETERMINAÇÃO DE P_4 LIBERADA PELO DISPOSITIVO PROGESTAR® POR 7 DIAS 51

6.1 OBJETIVOS 51

6.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *IN VIVO* 51

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 52

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 52

6.5 CONCLUSÃO 56

Estudo 2

7 *IN VIVO* - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE P_4 POR 8 DIAS 58

7.1 OBJETIVO 58

7.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 58

7.2.1 Amostras de sangue 58

7.3 ANÁLISE ESTATISTICA 59

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 59

7.5 CONCLUSÃO 66

Estudo 3

8 ENSAIO *IN VITRO* - DETERMINAÇÃO DE P_4 LIBERADA PELO DISPOSITIVO PROGESTAR® POR 96 HORAS 68

8.1 OBJETIVOS 68

8.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *IN VITRO* 68

8.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 69

8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 70

8.5 CONCLUSÃO 75

Estudo 4

9 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE P_4 NO DISPOSITIVO PROGESTAR® 77

9.1 OBJETIVO 77

9.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 77

9.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 78

9.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 79

9.5 CONCLUSÃO 80

Estudo 5

10 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE UM NOVO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE PROGESTERONA 82

10.1 OBJETIVO 82

10.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 82

10.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 83

10.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 84

10.5 CONCLUSÃO 87

11 CONCLUSÕES GERAIS 89

REFERÊNCIAS 92

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador mundial de carne bovina desde 2004 (APEX, 2006). Biotecnologias como a Inseminação Artificial (IA) possuem um grande impacto de seleção no melhoramento genético de um rebanho, visto que um reprodutor pode obter milhares de descendentes no período de um ano contribuindo com características genéticas superiores.

Entretanto, no Brasil de aproximadamente de 70 milhões de fêmeas bovinas em idade reprodutiva, somente cerca de 6 a 7% são inseminadas artificialmente (ASBIA, 2004).

Para obtenção de resultados satisfatórios, é necessário compreender as limitações do emprego desta biotécnica. Baixas taxas de serviço em bovinos são causadas principalmente por ineficiência na detecção de estro e baixa ciclicidade ovariana no período pós-parto (CAVALIERI et al., 1997; MADUREIRA et al., 2004).

Frente a estas dificuldades, o uso da Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) vem incrementando os resultados obtidos, uma vez que elimina a necessidade de observação de estro e induz a ciclicidade de vacas em anestro pós-parto. Com taxa de serviço de 100% (número de animais disponíveis para reprodução que são efetivamente inseminados/cobertos) e mesmo que as fêmeas não estejam ciclando, podem muitas vezes, fornecer taxas de prenhes bastante aceitáveis (ao redor de 50%) (MADUREIRA et al., 2004).

A técnica de IATF consiste em sincronizar a ovulação da fêmea através da utilização combinada de fármacos, preparando a fêmea para ser inseminada em tempo pré-determinado.

Nos protocolos de IATF utilizados, empregam-se dispositivos de liberação sustentada de progesterona (P_4), que são, em sua maioria, constituídos de um esqueleto de nylon, recoberto com uma camada de silicone impregnada com P_4. O silicone usado nestes dispositivos é biocompatível, mas não é biodegradável. Com rara exceção estes produtos são importados aumentando o custo dos protocolos de IATF.

Rathbone et al. (2002a) propuseram modificações na engenharia de um dispositivo comercialmente disponível no mercado CIDR® (1.9g de progesterona), caracterizaram *in vitro* e *in vivo* as propriedades farmacocinéticas de liberação de P_4 deste dispositivo e o processo de modificação na engenharia do dispositivo resultou na redução inicial de carga da droga no dispositivo e na redução da carga residual, mantendo o mesmo desempenho biológico do produto.

Em experimentos recentes, Pimentel (2006) confeccionou dispositivos vaginais de progesterona, empregando uma mistura de PHB (poli-ácido-3-hidroxi-butirato) e PCL (Poli-caprolactona), para serem utilizados em programas de controle farmacológico do ciclo estral de vacas. Neste trabalho foram encontrados valores de liberação de P_4 semelhantes a um dispositivo comercialmente disponível à base de silicone (DIB®) utilizando um dispositivo contendo 46:46:8 de PHB, PCL e P_4 respectivamente.

Contudo torna-se importante caracterizar a cinética de liberação da progesterona através do dispositivo empregando uma mistura de PHB e PCL propondo experimentos *in vivo* e *in vitro* para conhecer como e quanto esta P_4 é liberada ao longo do tempo, explicar matematicamente a cinética de liberação da P_4 e com isso propor a diminuição da quantidade deste hormônio usada na sua confecção com conseqüente diminuição no custo do dispositivo e impacto ambiental.

2 Hipótese

2 HIPÓTESE

O dispositivo composto por PCL+PHB+P_4 (46%+46%+8%) libera P_4 de forma sustentada por pelo menos 7 dias. A progesterona contida no dispositivo está uniformemente distribuída e sua liberação *in vitro* obedece a equação de Higuchi, segundo a qual a quantidade de P_4 liberada por cm^2 ocorre em função da raiz quadrada do tempo. Após 7 dias de uso, ainda há um resíduo de P_4 no implante (RATHBONE et al., 2002a).

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

- Estudar a cinética de liberação da progesterona (P_4) nos dispositivos produzidos a partir de misturas poliméricas em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* propondo-se um modelo matemático para explicá-la.
- Avaliar as concentrações plasmáticas de P_4 em vacas ovariectomizadas durante o período de tratamento de 8 dias.
- Avaliar a distribuição de P_4 no dispositivo (PHB46%+PCL46%+$P_4$8%).
- Avaliar a cinética de liberação de P_4 a partir de dispositivos contendo anti-UV (Tinuvin®) e antioxidante (Irganox B215®) e diferentes proporções de PHB:PCL.

4 Revisão de Literatura

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO

O controle endógeno do ciclo estral e a sincronização do estro em bovinos envolvem a secreção inter-relacionada de hormônios hipotalâmicos, da hipófise anterior, dos ovários e do útero. O principal mecanismo de regulação do ciclo estral bovino é a regressão do corpo lúteo, que ocorre em fêmeas cíclicas normais ao redor do dia 17-18. Desta forma, o CL (corpo lúteo) – considerado uma glândula endócrina temporária, com função de produzir P_4 – constitui-se no elemento-chave de vários processos reprodutivos, incluindo a ovulação e a duração do ciclo estral (MILVAE et al., 1996).

As formas de controle do ciclo estral em bovinos são baseadas na extensão ou redução da fase luteínica – uso de progestágenos ou prostaglandinas – e em modificação dos padrões da onda folicular através da administração de E_2 ou hormônio liberador de gonadotrofinas (GNRH). No entanto ambos os métodos agem diretamente no estado funcional do CL e são limitados a produzir grau de sincronia ovariana perfeito. Além disso, apresentam variabilidade de respostas, que estão sempre associadas à redução na taxa de fertilidade e ao aumento na duração do processo que por sua vez, interferem na IATF (MACMILLAN; BURKE, 1996).

O uso de dispositivos de progesterona juntamente com benzoato de estradiol (BE) tem sido amplamente utilizado em programas de sincronização da ovulação para IATF, tanto em vacas de corte quanto em vacas de leite (MACMILLAN; PETERSON, 1995; MACMILLAN; BRUKE, 1996; BÓ et al., 2002; BÓ; CUTAIA; TRIBULO, 2002). Assim como os programas com uso de progesterona, GNRH E PGF2α, também amplamente usados em programas de IATF em vacas de corte (BARREIROS et al., 2003; BARUSELLI et al., 2003) e em vacas de leite (COSTA et al., 2008). Esta associação GNRH + P_4 + PGF2α parece ser benéfica principalmente para as vacas anovulatórias (SARTORI, 2007).

Assim os protocolos hormonais de indução e sincronização do estro servem como ferramenta para aumentar os índices reprodutivos. Dentre as principais vantagens destaca-se a possibilidade de viabilizar a inseminação artificial de vacas, reduzir os intervalo entre parto/concepção, concentrar os partos, antecipar a prenhes na estação de monta, padronizar os lotes de bezerros e aumentar a eficiência no índice de desmame (peso ao desmame e número de animais desmamados), refletindo diretamente na racionalização da mão-de-obra e no custo/beneficio da atividade (BARTOLOMEU et al., 2003; GONÇALVES et al., 2004)

4.2 PROGESTERONA E PROGESTÁGENO

Progestágenos e progesterona (P_4) têm sido utilizados desde a década de 60 com o objetivo de simular uma fase lúteal por período que permita a regressão espontânea do CL, levando a uma sincronização de estro dentro de aproximadamente 4 dias após a remoção do agente progestacional (RATHBONE et al., 2001).

A P_4 foi uma das primeiras drogas a serem utilizadas para controlar o ciclo estral de ruminantes (CHRISTIAN; CASIDA, 1948). Os tratamentos por meio de administrações diárias de P_4 resultaram em altas taxas de sincronização do estro (MACMILLAN; PETERSON, 1993).

Posteriormente o acetato de melengestrol (MGA), um progestágeno administrado por via oral, substituiu a P_4 para a sincronização do estro, obtendo também resultados insatisfatórios (ZIMBELMAN; SMITH, 1966).

Nos tratamentos com progesterona ou progestágenos geralmente são empregados acetato de melengestrol pela via oral, a progesterona e a medroxiprogesterona na forma de dispositivos vaginais e o norgestomet em implantes auriculares (MADUREIRA; PIMENTEL, 2005).

De modo geral, os progestágenos se ligam aos receptores de progesterona, mas não possuem respostas biológicas idênticas (STANCZYK, 2003). A habilidade da progesterona e do norgestomet de reprogramar o eixo hipotálamo-hipofisário

parece ser maior do que a do MGA (PERRY et al., 2004). Numa comparação direta entre os dois progestágenos, Perry et al. (2004) concluíram que a progesterona é mais eficiente para induzir a ovulação e eliminar a ocorrência de ciclos curtos do que o MGA.

Os usos de implantes progestágenos oferecem alta porcentagem de animais em estro, num período bastante curto, o que possibilita a realização da IATF entre 48 e 60 horas após a retirada do implante. Se isto ocorre é porque o "status" folicular, no final do tratamento é bastante homogêneo entre os animais, o que possibilita a sincronização da ovulação mediante a aplicação de drogas que desencadeiam um pico pré–ovulatório de LH (MADUREIRA, 2000).

Atualmente existem no mercado, diversos dispositivos liberadores de P_4 e progestágenos com a finalidade de sincronizar a ovulação para a IATF. Como exemplo temos: DIB® - 1,0g de P_4, dispositivo intra-vaginal (BÓ; BARUSELLI, MARTINEZ, 2003); CIDR® - 1,9g de P_4, dispositivo intra-vaginal (MACMILLAN et al., 1991); PRID® - 1,55g de P_4, dispositivo intra-vaginal (WINKLER et al., 1977); CRESTAR® - 3,0mg de progestágeno (norgestomet), dispositivo auricular; e CRONIPRES® - 1,0 a 1,3g de P_4, dispositivo intra-vaginal. Inserido por um determinado período irá manter concentrações subluteais de P_4, evitando assim a ovulação e permitindo o crescimento folicular.

Níveis supraluteais de progesterona (>1ng mL^{-1}) são obtidas num curto espaço de tempo depois da inserção do implante, devido a rápida absorção do hormônio através da parede vaginal seguida de uma complexa, mas rápida distribuição no sistema circulatório (RATHBONE et al., 2002a)

Níveis elevados de P_4 parece ser pré-requisito para uma expressão do estro e para uma fase luteínica normal (YAVAS; JOHSON; WALTON, 1999; BÓ; ADAMS; NAPLETOFT, 2000; LUCY et al., 2001). A exposição à P_4 exógena (priming de P_4) seguida por sua diminuição aumenta a freqüência de pulsos de LH, a produção de E_2 folicular, os receptores para LH e melhora a luteinização das células foliculares de animais em anestro (CROWE et al., 1993). Os tratamentos com P_4 e progestágenos são apontados como indutores de ciclicidade ovariana no período pós-parto (MIHM, 1999).

A exposição à progesterona, por período de 5 a 9 dias, pode induzir ciclicidade em vacas em anestro fisiológico. O tratamento com progesterona aumentou a secreção de LH durante o período de exposição a este hormônio em vacas leiteiras (RHODES et al., 2002) e de corte (GARCIA-WINDER et al., 1986) em anestro no pós parto. Roche et al. (1981) reportaram que a secreção de LH aumenta durante as 71 h que se seguem à suspensão do tratamento com progesterona em vacas em anestro.

De maneira bastante semelhante, a exposição aos progestágenos aumenta a secreção de LH durante e após o tratamento em novilhas pré púberes (ANDERSON et al., 1996; HALL et al., 1997).

Entre os protocolos para sincronização da ovulação e IATF, os mais utilizados, principalmente para animais em anestro pós-parto e com boa condição corporal, são aqueles que associam uma fonte de progesterona/progestágeno à aplicação de estrógenos e/ou outros hormônios (BÓ et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004).

Almeida et al. (2005) utilizaram implantes auriculares de norgestomet novos e usados em programas de IATF em vacas multíparas amamentando e observaram taxas de prenhes bastante satisfatórias.

4.3 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE P_4 *IN VITRO*

Bunt et al. (1997) adaptaram metodologia indicada na USP 23 (United States Pharmacopeia) para dosar progesterona em implantes vaginais humanos para dispositivos de liberação sustentada veterinários.

Costa (2000) revisou vários modelos matemáticos de liberação como, Zero Order, First Order, Hixson-Crowell, Weibull, Higuchi, especificando a sua utilização no estudo farmacocinético das drogas.

Citada por diversos autores, Higuchi, a equação da raiz quadrada do tempo, tem sido usada sucessivamente para descrever a taxa da liberação *in vitro* de

progesterona de dispositivos vaginais (HIGUCHI, 1961; WINKLER et al., 1977; KALIA; GUY, 2001; RATHBONE et al., 1998b, 2002a; MARIANO et al., 2010). Hoje em dia há adaptações para esta equação em experimentos relacionados comliberação de P_4 *in vivo* (MARIANO et al., 2010).

Em ensaios *in vitro*, quando comparados dois dispositivos de composição (PHB+PCL), com diferentes concentrações (8-10%) de progesterona, em relação ao dispositivo comercialmente disponível no mercado, DIB® (1g de P_4), os dispositivos vaginais empregados seguiram o modelo matemático da equação de Higuchi ($Q_t=K_H t$), onde a quantidade de P_4 liberada por cm^2 se deu em função da raiz quadrada do tempo (PIMENTEL (2006) em fase de elaboração)[1].

Bunt et al. (1997) estudaram a liberação *in vitro* de dispositivos CIDR®, e obtiveram coeficientes angulares (slope) médios de 1.228.52 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$. Estes autores também observaram que a velocidade de liberação aumentou em função da raiz quadrada do dobro da quantidade inicial de P_4, contida no dispositivo.

Rathbone et al. (2002b) compararam coeficientes angulares de dispositivos confeccionados em PCL+10% de P_4, com o do CIDR® e verificaram que eles foram semelhantes e se mantiveram ao redor de 1.300 $\mu g/cm_2/t^{1/2}$.

Em outro estudo, Burggraaf et al. (1997) compararam em ensaios *in vitro* e *in vivo* a liberação entre dispositivos CIDR® (Iner Ag. New Zealand) contendo P_4 micronizada e não micronizada. Eles não encontraram diferenças entre os tratamentos no ensaio *in vivo,* de 12 dias, realizado por radioimunoensaio de fase sólida, porém houve diferença no ensaio *in vitro* e concluíram que o teste *in vitro* é mais eficiente para identificar pequenas diferenças entre os dispositivos testados.

A modelagem matemática do processo de liberação de drogas fornece informações relevantes ao transporte de massa, bem como permite analisar parâmetros e variáveis no projeto, tais como: geometria de dispositivo, distribuição e

[1] PIMENTEL, J. R. V.; ANDRADE, A. F. C.; BELTRAN, M. P.; PARDO, F. J. D.; BRAGA, F. A.; SILVA, E. A.; CARDOSO-FILHO, L.; MADUREIRA, E. D. Emprego de matriz polimérica biodegradável em dispositivos vaginais para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: Testes *in vitro* e *in vivo.* **Journal of Controlled Release**.

concentração inicial da droga, mecanismo de liberação da droga (ARIFIN et al., 2006).

O primeiro exemplo de um modelo matemático desenvolvido com o objetivo de descrever a liberação de droga, numa matriz, foi proposto por Higuchi[2] (1961 apud GRASSI; GRASSI, 2005, p. 98). Este modelo faz diversas aproximações e, inicialmente, foi desenvolvido para sistemas de geometria plana, e então estendido a outras geometrias e matrizes porosas (SIEPMAN; PEPPAS, 2001). O modelo prevê que a liberação da droga é proporcional à raiz quadrada do tempo, que está de acordo com o previsto pela solução analítica da segunda Lei de Fick, para os casos em que a quantidade liberada seja inferior a 60 por cento (SIEPMAN; PEPPAS, 2001).

Nos processos em que a matriz polimérica não se degrada, a difusão controla o processo de transferência de massa. O perfil de liberação da droga é obtido resolvendo a segunda Lei de Fick da difusão. O coeficiente de difusão de uma substância numa matriz é função de vários fatores, tipo de material da matriz, temperatura, concentração inicial e geometria (PIMENTEL, 2006(em fase de elaboração)).

Rathbone et al. (2002a) utilizaram cortes seqüenciais, com 100 µm de espessura, do dispositivo CIDR®, submetido ao teste de liberação *in vitro,* por diferentes períodos de tempo. Dosaram a concentração de P_4 nestes cortes e verificaram uma zona de depleção do fármaco que aumentou à medida que a liberação ocorreu. A formação desta zona de depleção no dispositivo é sugestiva da liberação em função da raiz quadrada do tempo, como pode ser confirmada pela equação de regressão obtida.

---

[2] HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-876, 1961.

4.4 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE P_4 *IN VIVO*

Segundo Hollenstein et al. (2005), animais ovariectomizados podem apresentar baixos teores circulantes de P_4 e atribuíram a síntese desta P_4 à supra renal. Estes mesmos autores encontraram teores de P_4 da ordem de 1,2 $\pm$ 0,15 ng/mL, nas vacas ovariectomizadas, submetidas ao estresse.

Pimentel (2006) analisaram os perfis séricos de P_4 em vacas ovariectomizadas e observaram uma rápida elevação de teores plasmáticos de P_4, que atingiram um pico cerca de 4 horas após a colocação do dispositivos intravaginais e um gradual declínio das concentrações até o final do período experimental.

Rathbone et al. (2002a) realizaram experimento bastante semelhante e compararam o perfil plasmático de P_4, em vacas ovariectomizadas, tratadas por CIDR®, ou por um novo dispositivo, cuja matriz polimérica foi composta exclusivamente por poli-$\in$-caprolactona (PCL). Também observaram o mesmo padrão de perfil plasmático, com significante elevação inicial e um gradual declínio das concentrações até o final do período experimental. Este também foi o perfil observado por Valentin (2004), em vacas ovariectomizadas, tratadas com CIDR®, DIB®, ou com outros dois tipos de dispositivos vaginais, confeccionados com silicone.

De fato, Rathbone et al. (2002a) analisaram a quantidade de P_4 liberada *in vitro* contra a raiz quadrada do tempo e obtiveram uma curva de aparência linear e alto valor de R^2 (R^2=0,992). Também obtiveram fatias seqüenciais, com 100 µm de espessura, de dispositivos CIDR®, previamente deixados na cavidade vaginal por vários dias. Observaram um gradiente de concentração de P_4, desde as partes mais profundas até as mais superficiais. Isto é sugestivo de que a liberação de P_4 se dá por um mecanismo de ordem zero. Estes dados foram matematicamente descritos por uma equação linear e o alto valor de R^2 obtido (R^2 = 0,989) sugere que um mecanismo de ordem zero poderia ser utilizado para demonstrar a liberação *in vivo* de P_4 do CIDR®.

Mariano et al. (2010) adaptaram a equação da raiz quadrada do tempo (equação de Higuchi) que tem sido usada para discriminar a liberação de P_4 em experimentos *in vitro* (HIGUCHI, 1961; WINKLER et al., 1977; RATHBONE et al., 1998b, 2002a; KALIA; GUY, 2001) para experimentos *in vivo* de liberação de P_4 a partir de dispositivos intra vaginais, e relataram que esta equação tem capacidade de descrever este fenômeno em vacas com 2 níveis de produção de leite diária, não prenhes e não lactantes.

Os níveis de P_4 encontrados na circulação também estão sujeitos à metabolização deste hormônio nos animais. A meia vida da P_4 nos bovinos é de apenas 22 a 36 minutos nas vacas (SPINOSA, 2006). Sabe-se que os esteróides são metabolizados no fígado de bovinos (SANGSRITAVONG, 2002) e com isto, sempre que houver um aumento de fluxo sanguíneo a este órgão, poderá haver um aumento na metabolização da P_4. Em vacas de leite mantidas em pastagens e tratadas com fonte de progesterona exógena (CIDR®), as concentrações de P_4 são mais baixas nas vacas com alimentação *ad libitum,* do que nas que estiverem sofrendo restrição alimentar (RABIEE et al., 2001). Porém, nas vacas tratadas com CIDR®, com diferentes níveis de produção de leite, não houve diferença na concentração de progesterona circulante.

4.5 POLÍMEROS E BIOPOLÍMEROS

O uso de polímeros tem se tornado cada vez mais freqüente na sociedade. O aumento substancial do uso de polímeros de origem petroquímica em diversas aplicações nas últimas décadas é pauta de diversas discussões atuais, pois estes polímeros são descartados muito rapidamente, gerando um sério impacto ambiental (LOU et al., 2003).

Os plásticos convencionais, tais como polipropileno, poliestireno, polietileno e policloreto de vinila, apresentam taxas extremamente baixas de degradação (CHIELLINI et al., 1996), demorando em média 100 anos para se decomporem totalmente (HUANG; SHETTY; WANG, 1990; CHIELLINI; SOLARO, 1998).

Diversas alternativas têm sido buscadas para minimizar o impacto ambiental causado pelos polímeros convencionais. Como uma solução para este problema, surge os polímeros de origem bacteriana, genericamente denominados polihidroxialcanoatos ou PHAS (CHIELLINI; SOLARO, 1998).

Os biopolímeros são materiais poliméricos classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres e poliamidas. A matéria prima principal para sua manufatura é uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado de plantios comerciais de larga escala como a cana de açúcar, milho, batata, trigo e beterraba; ou óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma ou outra planta oleaginosa (PRADELLA, 2006).

No Brasil a produção de polímeros biodegradáveis é realizada principalmente a partir da cana-de-açúcar, produto abundante no país, tornando assim o produto mais competitivo, sobretudo no mercado internacional (SOUZA et al., 2000).

A biodegradação dos biopolímeros é resultado da ação de bactérias, fungos e algas de ocorrência natural (RAGHAVAN, 1995), variando de seis meses a um ano e meio (SOUZA et al., 2000) e derivando deste processo CO_2, CH_4, H_2O, componentes celulares microbianos e outros produtos (ABR, 1999).

Polímeros biodegradáveis têm sido amplamente estudados em sistemas de liberação de drogas tanto no campo da medicina humana como da medicina veterinária. Como exemplo destes sistemas na medicina veterinária, podemos citar os implantes intravaginais e também os produtos injetáveis (WINZENBURG et al., 2004).

4.5.1 PHB – Polímero ambientalmente degradável

De grande relevância para o usuário de artigos feitos de PHB ou seus copolímeros Poli (acido3-hidróxibutírico-co-hidróxivalérico) – PHBV, são as taxas de degradação destes artigos sob várias condições ambientais. Com a mesma utilidade que os plásticos convencionais, o PHB se presta à fabricação de diversos materiais

como embalagens de alimentos, vasilhames, copos, filmes, dispositivos hormonais, entre outros.

O motivo que os torna aceitos como potenciais substitutos biodegradáveis dos polímeros sintéticos se deve à sua completa biodegradabilidade em ambientes aeróbios e anaeróbios para produzir CO_2/H2O/CH4/biomassa, respectivamente, pela mineralização biológica natural. Um estudo realizado com biopolímeros mostrou que o PHB foi o polímero que mais sofreu a biodegradação, provavelmente por causa de sua estrutura química que pode ser atacada mais facilmente (ROSA et al., 2002).

O PHB apresenta propriedades mecânicas similares ao polipropileno (ANDERSON; DAWES, 1990). Devido a sua origem natural, o PHB tem uma excepcional regularidade estereoquímica; suas cadeias são lineares com interações tipo van der Waals entre os oxigênios da carbonila e os grupos metila e interações por pontes de hidrogênio devido à presença de hidroxilas (LUO et al., 2003).

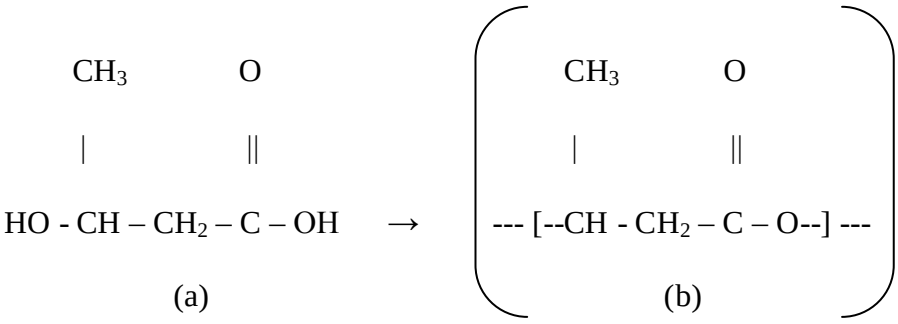


Figura 1 – Fórmula estrutural do (a) ácido-3-hidroxi-butirato e (b) poli-ácido-3-hidroxi-butirato (PHB)

O PHB é obtido a partir da sacarose, oriunda da industrialização da cana-de-açúcar. O *Bacillus megaterium* é a principal bactéria envolvida neste processo (SOUZA et al., 2000).

A perspectiva de viabilidade econômica do PHB a partir do açúcar é promissora, uma vez que o Brasil tem larga experiência em processos de

produção biotecnológica nesta área, e é o maior produtor mundial de açúcar (ABR, 1999).

4.5.2 PCL - Polímero ambientalmente degradável

Para que seja atingido um relacionamento específico processamento-estrutura-propriedade –custo, a composição polimérica, além do PHB e/ou de seus copolímeros, deve conter teores variáveis do polímero biodegradável Poli-(caprolactona) – PCL. Este é também outro biopolímero, é muito estudado como substrato para biodegradação e como matriz em sistemas de liberação de drogas (PITT et al., 1980; PITT et al., 1981; RATHBONE et al., 2002a).

Demonstrou-se a possibilidade da fabricação de um dispositivo intravaginal para bovinos, a partir do biopolímero PCL, possuindo uma mesma eficiência quando comparado com o dispositivo à base de silicone CIDR® (Pfizer, Brasil) (RATHBONE et al., 2002a).

A biodegradação deste polímero se dá através da hidrólise enzimática, por fungos (CHANDRA; RUSTGI, 1998), os polímeros biodegradáveis sofrem mais facilmente a ação de microorganismos, por conterem funções orgânicas em suas cadeias alifáticas: carbonilas, hidroxilas, ésteres, hidroxiácidos, mais suscetíveis à ação enzimática, entretanto, esta ação depende de fatores, tais como tipos de microorganismos presentes, condições do meio (temperatura, umidade, pH, luz, O_2) e propriedades do polímero (massa molar, cristalinidade, etc (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

O PCL (Figura 2) surge da abertura do anel de polimerização do caprolactona (CHANDRA; RUSTGI, 1998; DERVAL et al., 2002).

$$\left(- (CH_2)_5 - \overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C} - O - \right)$$

Figura 2 – Fórmula estrutural poli-ε-caprolactona (PCL)

4.6 ADITIVOS

Durante o processamento um material polimérico este pode sofrer alterações na sua estrutura química, ou seja, degradações conseqüentes de cisões de cadeias, reticulação, oxidação, recombinação, despolimerização que afetam as propriedades físicas e/ou químicas finais do material (EHRING, 1992; RABELLO, 2000).

Geralmente, ao ser processado, um polímero está exposto ao cisalhamento e à alta temperatura, necessários para sua total fusão, e em algumas situações exposto conjuntamente à altas temperaturas e à presença de oxigênio. Para evitar a degradação e ou conferir um prolongamento à vida útil de um material polimérico são adicionados aditivos denominados estabilizantes, tem a função de reduzir, ou até cessar a formação de reações indesejáveis para que se possam manter as propriedades originais do polímero após o processamento (EHRING, 1992; RABELLO, 2000).

4.6.1 Estabilizante Antioxidante Fenólico

Irganox B215® - Antioxidante

Este produto é uma blenda de 67% de Irgafos® 168 e 33% de Irganox® 1010 (Figura 3). Com pesos moleculares 646,9(Irgafos®) e 1178 (Irganox®).

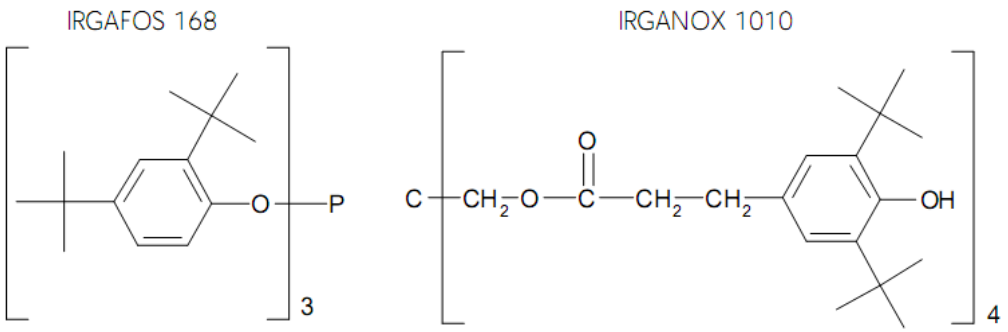


Figura 3 - Formula estrutural IrganoxB215®

Possui a função de manter o cheiro, a cor e a estabilidade térmica do polímero.

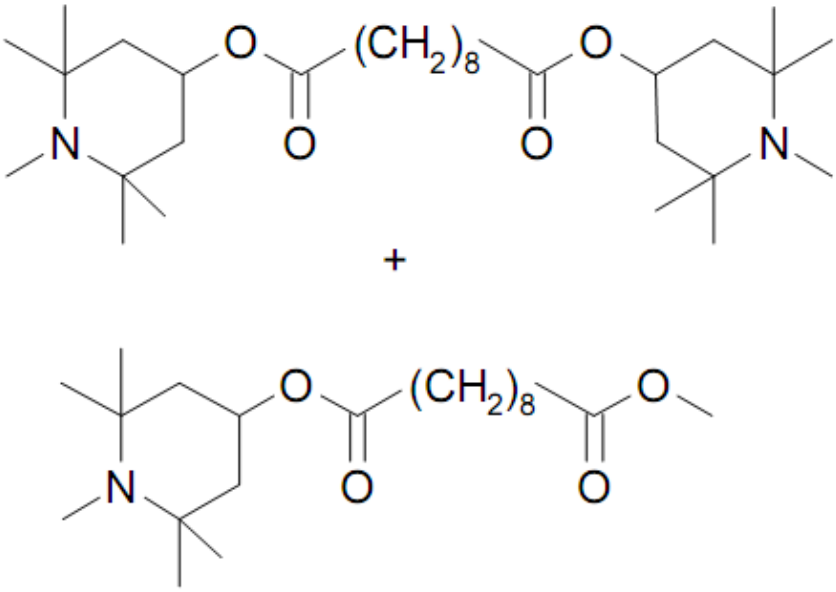
Irgafos 168 é um organofosfato de baixa volatilidade e particularmente resistente a hidrolise - protegendo durante o processo de polímeros orgânico os quais são inclinados para oxidação.

Irganox 1010 contribui sinergicamente para estabilização do polímero durante o processo e promove longa estabilidade termal por prevenir degradação termo oxidativa durante a sua vida útil.

4.6.2 Estabilizante Absorvedor de UV

Tinuvin®

É um absorvedor de luz ultravioleta (UVA) da classe hidroxifenol benzotriazole, transmitindo boa estabilidade de luz para uma larga variedade de polímeros (Figura 4).



The active substance is a mixture of:
Bis(1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidinyl)-sebacate
and
1-(Methyl)-8-(1,2,2,6,6-pentamethyl-4-piperidinyl)-sebacate

Figura 4 - Formula estrutural Tinuvin®

5 Material e Método

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 LOCAL

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução (LFER), nas dependências do Centro de Biotecnologia da Reprodução (CBRA), do departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ USP), campus Pirassununga.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizadas vacas da raça Nelore (n=21), ciclando, com idade em torno de 36 meses, provenientes do campus da Universidade de São Paulo Campus de Pirassununga (experimento 1) e mais vacas cruzadas (n=6), *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*, ovariectomizadas, provenientes do laboratório LFER- Laboratório de Farmacologia e Endocrinologia da Reprodução para realização do experimento 2 (*In vivo* - Determinação da concentração plasmática de P_4 por 8 dias).

5.3 DISPOSITIVOS

Foram utilizados dispositivos (n=45) confeccionados com misturas poliméricas na proporção 46:46:8 de PHB-V:PCL:P_4, respectivamente (Figura 5).

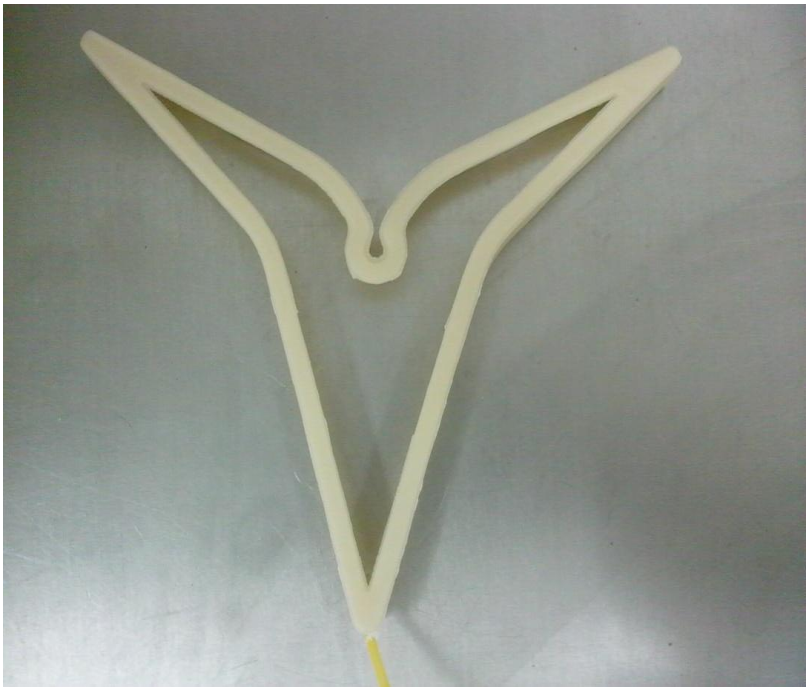


Figura 5 - Dispositivos confeccionados com blendas poliméricas (46%PCL+46%PHB+8%P_4). (Progestar®)

Para o experimento 5, foram utilizados os seguintes dispositivos:

- **DISP1** (dispositivo vaginal de PHB: PCL:IRGANOXB215:P_4 na proporção de 45,65:45,65:0,70:8,00 respectivamente)(n=3);

-**DISP2** (dispositivo vaginal de PHB:PCL:IRGANOXB215:TINUVIN:P_4 na proporção de 45,50:45,50:0,70:0,30:8,00 respectivamente)(n=3);

-**DISP3** (dispositivo vaginal de PHB:PCL:IRGANOXB215:P_4 na proporção de 40,65:50,65:0,70:8,00 respectivamente)(n=3);

-**DISP 4** (dispositivo vaginal de PHB:PCL:IRGANOXB215:TINUVIN:P_4 na proporção de 40,50:50,50:0,70:0,30:8,00 respectivamente)(n=3).

5.4 METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE P_4

5.4.1 Metodologia 1 - Extração de P_4 para dosagem da progesterona na blenda PHB e PCL

- A amostra controle foi constituída por ½ dispositivo sem uso, onde se conhece a concentração de P_4, foi picado, pesado e colocado em um frasco com tampa de rosca (250mL).
- Cada amostra coletada constituiu-se de ½ implante, este foi picado, pesado e colocado em um frasco com tampa de rosca (250mL).
- Acrescentaram–se 250mL de clorofórmio no tubo que continha a amostra.
- O tubo foi colocado em um sonicador durante 2 horas para diluição do polímero.
- Após a diluição, foram retirados 50 µL de solução (polímero+clorofórmio+P_4) e este foi passado para um novo tubo limpo (10mL).
- No tubo limpo com 50 µL foram acrescentados 5 mL de álcool (álcool etílico absoluto-PA).

Após o acréscimo de álcool, o polímero precipitou, a solução foi agitada e foi retirado 1 mL de solução para análise em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho – HPLC.

Foram realizados testes para avaliar a eficiência de recuperação de P_4 com amostras de dispositivos s/ uso. Pode-se observar que esta técnica foi capaz de recuperar 100% da progesterona acrescentada (controle) (Tabela 1).

Tabela 1 - Recuperação de P_4 – Analise com HPLC

	P_4(g) obtida	**P_4(g) esperada**	**% de P_4 obtida**
Controle (disp s/ uso)	1,90	1,84	103%
Controle (disp s/ uso)	1,95	1,84	105%
Controle (disp s/ uso)	1,83	1,85	98%

5.4.2 Metodologia 2: Dosagem da progesterona na blenda PHB e PCL – Espectrofotômetro

A técnica estabelecida para a extração de P_4 da blenda PHB+PCL consistiu - se de:

- A amostra controle foi constituída de concentração conhecida de P_4 (5 mg/mL) e dois cilindros: um com 4 e outro com 5 mm de diâmetro. Ambos com 2 mm de espessura, sem P_4 , foi pesada e colocada em tubo de vidro transparente (10mL).
- Cada amostra coletada constitui-se de dois cilindros: um com 4 e outro com 5 mm de diâmetro. Ambos com 2 mm de espessura, com P_4, foi pesada e colocada em tubo de vidro transparente (10mL).
- Acrescentaram-se 3mL de clorofórmio no tubo que continha a amostra.
- O tubo foi colocado em um sonicador durante 1 hora e 30minutos para diluição do polímero.
- Após a diluição foram retirados 10µL deste polímero (polímero+clorofórmio+P_4) e este foi passado para um novo tubo limpo.
- No tubo limpo com 10µL foram acrescentados 5mL de álcool (álcool etílico absoluto-PA).

- Após o acréscimo de álcool, o polímero precipitou, a solução foi agitada e foi retirado 1 mL de solução para análise em Espectrofotometria.
- Foi realizada dosagem por espectrofotometria no comprimento de onda de 240nm e a absorbância da amostras foi convertida à concentração de progesterona com base em uma curva padrão (Gráfico 1).

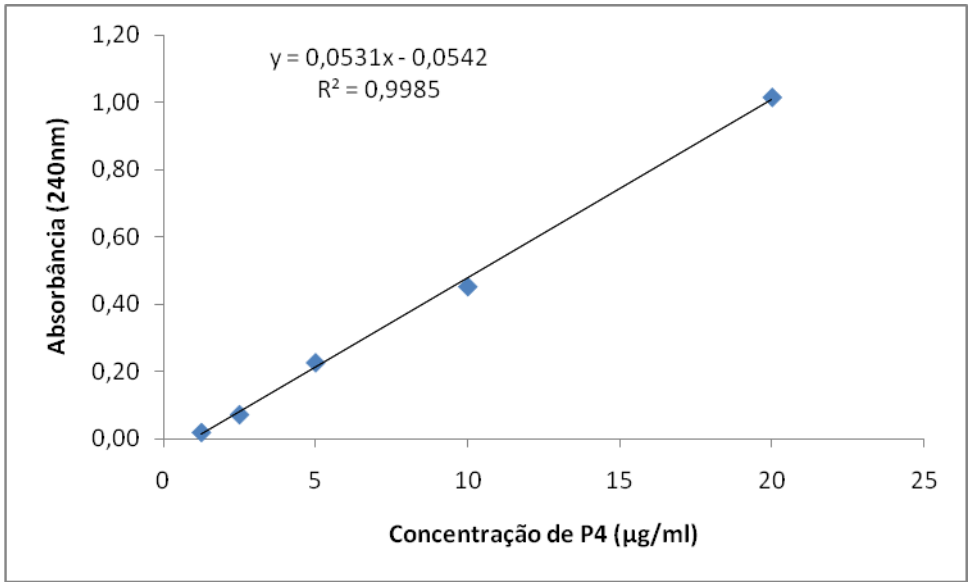


Gráfico1 - Curva padrão de P_4

Foram realizados testes para avaliar a eficiência de recuperação de P_4 nas amostras enriquecidas. Pode-se observar que esta técnica foi capaz de recuperar 100% da progesterona acrescentada (controle) (Tabela 2).

A seguir tabela da recuperação de P_4:

Tabela 2 - Eficiência de recuperação de P_4 – Analise por Espectrofotometro

	P_4 (mg/mL) Obtida	**P_4(mg/mL)esperada**	**% de P_4 obtida**
Controle	5,3	5mg	105%
Controle	5,3	5mg	105%
Controle	5,4	5mg	106%

5.5 TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO – HPLC

Foi empregada dosagem por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) como se segue:

A fase estacionária foi uma coluna C18 ODS (Shin Pack CLC ODS, 0,15mm x 6.0 mm ∅). A fase móvel foi acetonitrila/água na proporção 60:40, em um fluxo de 2 mL/min.

A detecção foi feita em comprimento de onda de 240 nm. As amostras (20 µL) foram injetadas automaticamente (ISS-200, Perkin Elmer).

O tempo esperado de retenção de progesterona é de 1,6 – 4,4 min aproximadamente.

A curva de calibração foi preparada com base na medida do pico de base.

O intervalo de linearidade foi entre 0,01 e 54,5 µg/mL (R^2 =0,9999).

5.6 RADIO-IMUNO-ENSAIO

As amostras foram centrifugadas por 1500rpm a 4ºC por 15 minutos (Sorvall® RC3 Plus, EUA) e o plasma foi congelado à -20˚C até o momento das análises por RIA, utilizando o kit (coat a count®, Kit, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA).

Estudo 1

6 ENSAIO *IN VIVO* - DETERMINAÇÃO DE P_4 LIBERADA PELO DISPOSITIVO PROGESTAR® POR 7 DIAS

6.1 OBJETIVOS

- Quantificar a P_4 residual contida no dispositivo após período de utilização. Com isso, calcular a quantidade de P_4 liberada por dia e no período total de 7 dias.

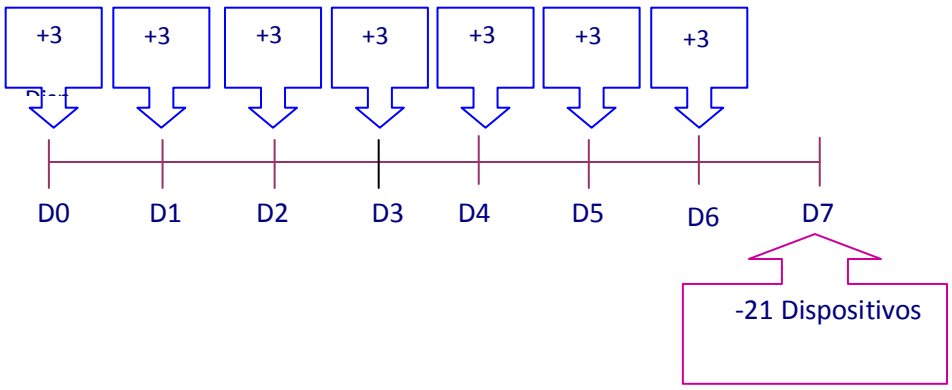
- Com o resultado deste experimento, propor re-engenharia do dispositivo diminuindo a quantidade de P_4 na confecção e por conseqüência diminuindo a P_4 residual do dispositivo.

- Propor um modelo matemático para liberação de P_4 *in vivo.*

6.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Foi empregado um delineamento totalmente casualizado, adicionado de medidas repetidas no tempo.

No dia 0 (D0) antes dos dispositivos serem inseridos em cada vaca (n = 24), os dispositivos foram pesados. A cada 24 horas, os dispositivos de três vacas foram inseridos, de modo que foram obtidos, em triplicata/dia, dispositivos do D0 ao D7. No D7 todos os dispositivos foram lavados e posteriormente secos a temperatura ambiente, todos da mesma forma. Modelo Esquemático do delineamento:



6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram avaliadas as concentrações de P_4 contidas nos dispositivos de acordo com tempo, utilizando Proc mixed, pelo programa SAS, versão 9.2 (2010).

As equações de regressão foram obtidas utilizando-se o PROC REG do SAS, num modelo linear y=ax+b, onde se obtiveram os coeficientes de determinação (R^2) e a probabilidade de efeito linear.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados dispositivos da partida (confecção) feita em Julho 2010.

As amostras de polímero foram submetidas à extração de progesterona pela metodologia de extração 1, descrita na seção Material e Método, e após foram analisadas por HPLC - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho.

Pelo conhecimento da massa de progesterona extraída das amostras, calculou-se a percentagem de P_4 nas amostras. Multiplicando-se a porcentagem pela massa dos dispositivos (23,1g), obteve-se a massa de P_4 no dispositivo em cada dia (considerando a distribuição de P_4 ser uniforme no dispositivo).

Observou-se um aumento de liberação de P_4 nos dois primeiros dias sendo esta liberação 1/3 de toda a P_4 liberada no período, seguida da diminuição de P_4 liberada por dia e esta liberação de P_4 foi constante até o fim do período (Tabela 3 e Gráfico 2). Isto é esperado quando se trata de sistemas de liberação controlada, o fato é que a P_4 contida dentro do dispositivo está na superfície propiciando a fácil liberação. Com o passar do tempo, esta progesterona tem que “caminhar” pelo interior do dispositivo para chegar à superfície e ser liberada, assim não há este “burst” nos dias seguintes à inserção do dispositivo.

A respeito desta liberação exacerbada nos primeiros dias, em sistemas de liberação controlada, inúmeros trabalhos estão sendo realizados a fim de conter e estudar esta liberação inicial. Malcolm et al. (2003) observaram este fenômeno no estudo no qual estudaram a solubilidade e difusividade de silicone em anéis vaginais, e descreveram que a liberação da droga é dependente, primariamente, da difusividade do material em que ela está impregnada, ou seja, a matriz e também da solubilidade da própria droga.

Com isto, podem-se associar os resultados obtidos neste experimento com os resultados do experimento *in vivo* no qual, foi estudada a liberação de P_4 nos animais, onde se observou um aumento de P_4 no plasma no 1° dia e seguida de uma liberação/dia diminuída e constante de P_4 até o fim do período. Embora se leve em conta que os dispositivos utilizados neste experimento não são os mesmos dos utilizados no experimento 2, este fenômeno tanto acontece no dispositivo quanto nos animais.

A quantidade total de P_4 liberada no período de 7 dias foi de 0,57g (Tabela 3 e Gráfico 2), corroborando com o resultados obtidos por Rathbone et al. (2002a). Os mesmos autores estudaram a liberação de P_4 a partir do dispositivo CIDR®, e observaram que dispositivos com concentrações de P_4 1,92g de P_4 liberaram 0,61g de P_4 no período de 7 dias, uma liberação igualmente proporcional a do dispositivo estudado neste experimento, onde o CIDR® libera 32,1% da P_4 contida no dispositivo e o dispositivo estudado neste experimento libera 31,6% da P_4 total no período de 7 dias.

Contudo, o dispositivo, no sétimo dia, ainda contém 70% da quantidade inicial de progesterona. Esta quantidade residual de P_4 pode ser explicada pelo fato de que a P_4 difunde-se por somente uma determinada profundidade da matriz. Rathbone et al. (2002a) realizaram um experimento, onde fizeram cortes longitudinais na matriz de silicone do dispositivo CIDR® e observaram que a P_4 migra por, no máximo 1mm na matriz de silicone.

Esta liberação pode ser modulada por vários fatores, entre os quais se incluem, além da matriz polimérica propriamente dita, a difusividade da droga na matriz, a solubilidade da droga, o meio no qual esta droga está sendo liberada, a quantidade de droga inicial.

Portanto, considerando-se que apenas 31% da quantidade inicial de P_4 é, efetivamente, liberada, deixa-se em aberto a possibilidade de diminuição da quantidade inicial de P_4 nos dispositivos. Entretanto, é fundamental a realização de um experimento proposto para FAPESP, no qual serão analisados cortes horizontais no dispositivo, com o objetivo é estudar até que profundidade a P_4 é liberada do polímero, para que se possa definir a espessura ideal que o dispositivo deve possuir, além de experimentos para observação da bioequivalência e eficácia do produto.

Rathbone et al. (2002a) estudaram um dispositivo com 1,34g de P_4 inicial e observaram a mesma bioequivalência e eficácia do produto já comercialmente disponível CIDR® com 1,92g de P_4.

Tabela 3 - Progesterona contida no dispositivo por dia (g/dia) (n=24), (X±EP)

Dias de uso	**Progesterona (g)**
S/ uso	1,82±0,03
1 dia	1,87±0,03
2 Dias	1,65±0,02
3 Dias	1,57±0,05
4 Dias	1,57±0.03
5 Dias	1,53±0,01
6 Dias	1,43±0,01
7 Dias	1,35±0,03

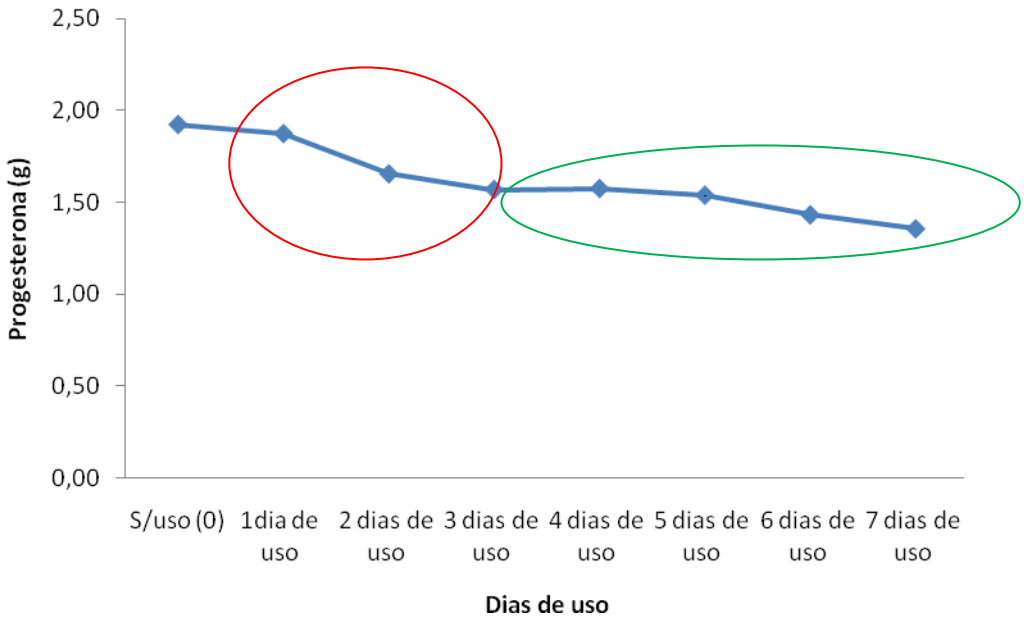


Gráfico 2 - Liberação *in vivo*, perfil de progesterona contida no dispositivo por dia (g/dia) (n=24)

As quantidades remanescentes de P_4 no dispositivo plotadas em função de tempo geraram uma reta, com alto valor de R^2 (R^2=0,929), sugerindo que a progesterona, liberada *in vivo,* pode ocorrer pelo mecanismo de ordem zero (Gráfico 3). Rathone et al. (2002a) observaram perfil semelhante de liberação, quando estudaram a liberação *in vivo* do dispositivo CIDR®.

Mecanismos de liberação assim são comuns em sistemas poliméricos de liberação controlada, nos quais os dispositivos vaginais estão classificados em sistemas de liberação controlada por difusão (LANGERS; PEPPAS, 1981).

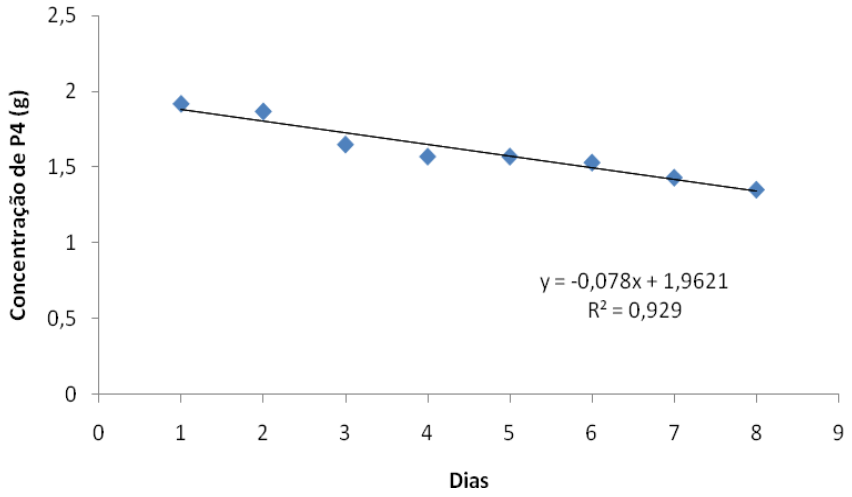


Gráfico 3 - Liberação *in vivo* - P_4 por dispositivo em dias (g/dia/dispositivo), (n=21)

6.5 CONCLUSÃO

- Dispositivos vaginais com blenda PHB+PCL podem liberar P_4 de forma sustentada por 7 dias e em sistemas *in vivo* foram liberados 31% da P_4 inicial do dispositivo ao longo de 7 dias;

- A liberação de P_4 *in vivo* tem aparência linear, sugerindo que a progesterona, liberada *in vivo,* pode ocorrer pelo mecanismo de ordem zero.

Estudo 2

7 *IN VIVO* - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE P_4 POR 8 DIAS

7.1 OBJETIVO

Determinar as concentrações plasmáticas de P_4, em vacas ovariectomizadas, durante o período de tratamento de 7 dias.

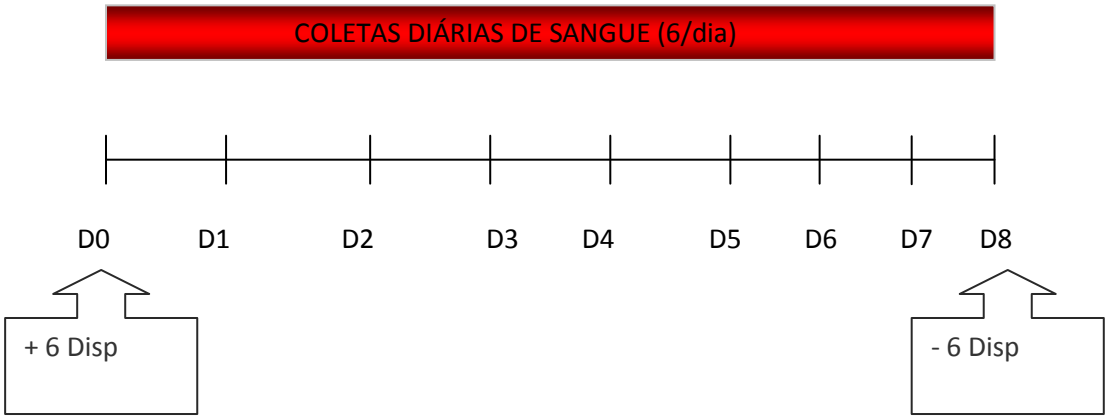
7.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No Dia 0 (D0) foi inserido um dispositivo em cada vaca (n=6), sendo coletada uma amostra por animal antes desta inserção. Foram colhidas amostras de sangue à cada 24 horas, de cada vaca, por um período de 8 dias (D0-D8). Estas amostras foram analisadas por Radio-imuno-ensaio utilizando o kit comercial da Siemens®.

7.2.1 Amostras de sangue

Durante os procedimentos deste experimento, foram tomados alguns cuidados para que não houvesse contaminação dos frascos de colheita das amostras tais como: a pessoa que introduziu o dispositivo, em momento algum segurou as amostras; durante todo o ensaio, houve a preocupação de que a pessoa que fosse manejar os animais (tocar, fechar, soltar) não coletaria as amostras; para evitar que houvesse contaminação de progesterona (P_4) na colheita, as punções foram realizadas na veia jugular.

Modelo esquemático do delineamento:



7.3 ANÁLISE ESTATISTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS, 1985), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE).

As probabilidades de interações com tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). As médias das amostras foram analisadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado um experimento com 6 vacas ovariectomizadas oriundas do campus de Pirassununga da USP, as amostras de sangue foram coletadas durante 8 dias após a implantação do implante.

A média das concentrações plasmáticas de P_4 nas 192 horas (8 dias) de ensaio foi de 5,09 ng/mL (Tabela 4 e Gráfico 4).

Tabela 4 - Concentrações Plasmáticas de progesterona (ng/mL) (X±EP)

Horas	Concentração Plasmática (ng/mL) ± EP
0	0,91 ± 0,19
2	8,27 ± 1,21
4	9,23 ± 1,15
8	9,18 ± 0,72
12	7,42 ± 0,64
24	5,65 ± 0,56
48	3,86 ± 0,31
96	2,58 ± 0,10
144	1,93 ± 0,16
192	1,89 ± 0,13

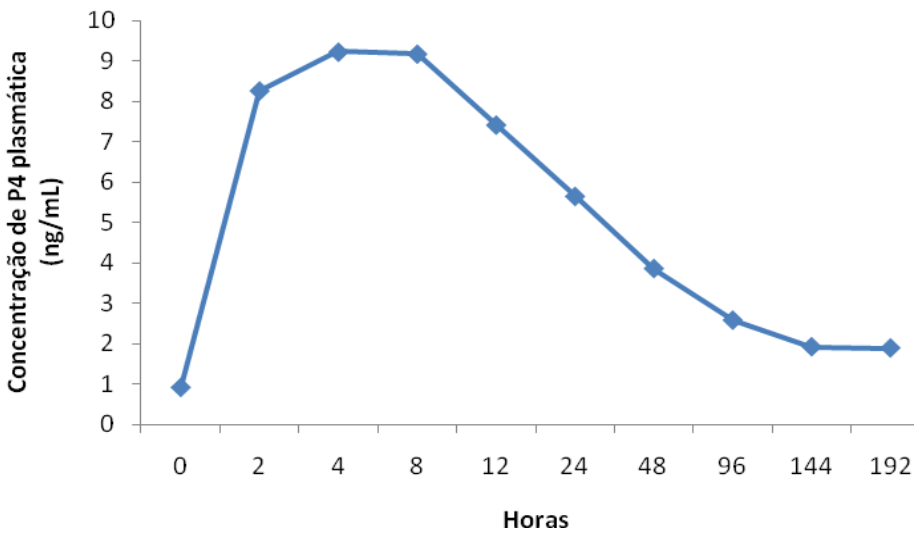


Gráfico 4 - Concentração Plasmática de Progesterona em 192 h (8 dias)

No gráfico 5, encontram-se as médias das concentrações de P_4 nas primeiras 24 horas após a colocação dos dispositivos.

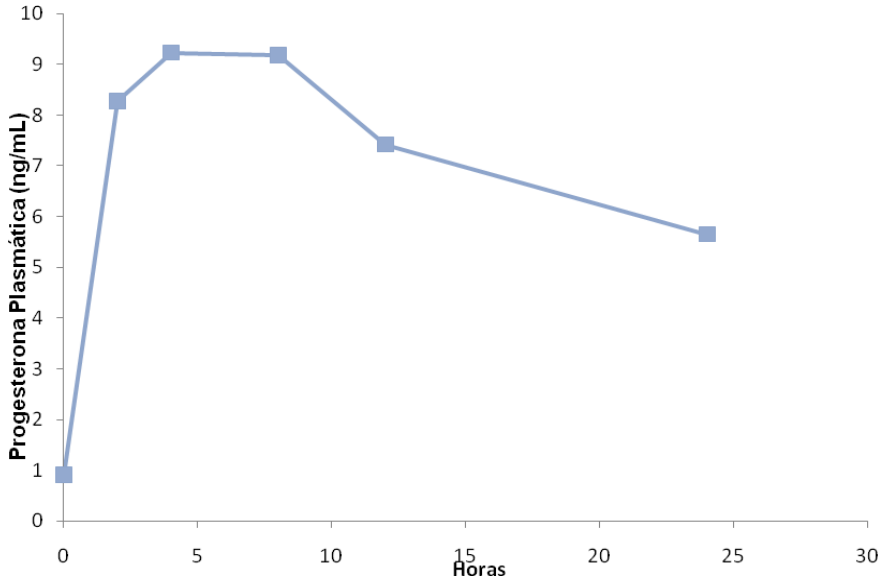


Gráfico 5 - Concentração plasmática de progesterona 0-24horas (ng/mL)

A concentração máxima de P_4 (9,23 ± 1,15ng/mL) ocorreu 4 horas após a colocação dos dispositivos.

Teores basais de P_4 em vacas ovariectomizadas

Imediatamente antes da colocação dos dispositivos nas vacas ovariectomizadas, o teor médio de P_4 encontrado foi de 0,91 ± 0,19 ng/mL.

Em estudo conduzido por Hollenstein et al. (2005) em vacas holandesas, foram encontrados teores de 0,3 ± 0,04 ng/mL de P_4. Pode-se observar que os teores plasmáticos de P_4 no tempo zero foram maiores do que os encontrados por Hollenstein et al. (2005). Além disto, o desvio padrão também foi muito grande, o que expressa a grande variação que houve nos teores de P_4 no tempo zero, em vacas ovariectomizadas. De fato, estes teores variaram de 0,11 a 1,96 ng/mL de P_4.

Segundo Hollenstein et al. (2005), animais ovariectomizados podem apresentar baixos teores circulantes de P_4 e atribuíram a síntese desta P_4 a supra-

renal. Estes mesmos autores encontraram teores de P_4 da ordem de 1,2 ± 0,15 ng/mL, nas vacas ovariectomizadas, submetidas ao estresse. No presente estudo, foram utilizadas vacas zebuínas, que possuem temperamento mais agressivo e, portanto, mais sujeitas ao estresse. Isto pode, ao menos em parte, explicar o porquê da ocorrência de teores relativamente elevados de P_4 em vacas ovariectomizadas.

Aspectos gerais dos perfis de P_4

De um modo geral, analisando-se os perfis, durante todo o período experimental, observou-se que ocorreu rápida elevação dos teores plasmáticos de P_4, que atingiram um pico, cerca de 4 horas após a colocação. Este período foi seguido por uma queda constante, porém lenta dos teores de P_4 (Tabela 4 e Gráfico 4).

Alguns pesquisadores sugerem que os níveis supraluteais de progesterona (>1ng/mL^{-1}) em curto espaço de tempo depois da inserção do dispositivo é devido a fácil ultrapassagem da progesterona na parede vaginal, seguida por um complexo, mas rápido sistema de distribuição (RATHBONE et al., 2002a,b; MARIANO et al., 2010).

Rathbone et al. (2002a) compararam o perfil plasmático de P_4, em vacas ovariectomizadas, tratadas por CIDR®, ou por um novo dispositivo, cuja matriz foi composta por PCL. Também observaram o mesmo padrão de perfil plasmático, com significante elevação inicial e um gradual declínio das concentrações até o final do período experimental.

Este também foi o perfil observado por Valentin (2004), em vacas ovariectomizadas, tratadas com CIDR®, DIB®, ou com outros dois tipos de dispositivos vaginais, confeccionados com silicone (50 cm^2 de área com 1,5g ou 1,0 g de P_4).

Portanto, os perfis de P_4 plasmática obtidos pelo emprego de vários dispositivos vaginais são semelhantes e seguem um padrão bastante dependente da velocidade de liberação, que em última análise é uma propriedade inerente às matrizes utilizadas.

Entretanto, as concentrações de P_4 no plasma sangüíneo dependem de vários fatores além da velocidade de liberação, entre os quais se destacam: a área e a espessura da matriz polimérica, a concentração de P_4 nesta matriz, grupo genético dos animais empregados nos testes, distribuição da P_4 nos demais compartimentos corpóreos e a capacidade de biotransformação de P_4.

Mariano et al. (2010) confirmaram a importância dos principais fatores de variação para um modelo matemático farmacocinético *in vivo*, os quais são: carga inicial de progesterona, solubilidade da progesterona, difusividade da progesterona em determinada matriz (polímero) e superfície do dispositivo, além das diferenças fisiológicas descritas a anteriormente.

Rathbone et al. (2002a) concluíram que as diferenças nos teores de P_4 verificadas poderiam ser explicadas pelas diferenças de área e concentração de P_4 dos dois dispositivos testados. Valentim (2004) encontrou uma forte relação entre os teores plasmáticos de P_4 e a área e a concentração de P_4 na matriz de silicone. Apresentou uma equação de regressão na qual para cada cm^2 de aumento na área, houve um acréscimo de 0,0343 ng/mL as 24 horas e de 0,00056 ng/mL após sete dias de inserção. Entretanto, no momento da retirada dos implantes, as concentrações parecem ser mais influenciadas pela concentração de P_4 na matriz do que pela superfície de contato.

Os níveis de P_4 encontrados na circulação também estão sujeitos à metabolização deste hormônio nos animais. A meia vida da P_4 nos bovinos é de apenas 22 a 36 minutos nas vacas (MCDONALD, 1983). Sabe-se que os esteróides são metabolizados no fígado (SANGSRITAVONG, 2002) e, com isto, sempre que houver um aumento de fluxo sanguíneo a este órgão, poderá haver um aumento na metabolização da P_4.

Em vacas de leite mantidas em pastagens e tratadas com fonte de progesterona exógena (CIDR®), as concentrações de P_4 são mais baixas nas vacas com alimentação *ad libitum,* do que nas que estiverem sofrendo restrição alimentar (RABIEE et al., 2001). Porém, nas vacas tratadas com CIDR®, com diferentes níveis de produção de leite, não houve diferença na concentração de progesterona circulante. Similarmente, o aumento do plano alimentar em marrãs

ovariectomizadas, aumentou proporcionalmente a taxa de metabolização da P_4 e o fluxo sanguíneo no sistema porta hepático (PRIME; SYMONDS, 1993).

Teores de P_4 no momento de pico

No presente estudo, os teores máximos atingidos pelos dispositivos foram de 9,2 ng/mL a concentração máxima de P_4 foi atingida 4 horas após terem sido colocados na cavidade vaginal.

Rathbone et al. (2002), ao compararem os teores plasmáticos de P_4 de vacas que receberam um dispositivo confeccionado com PCL (2,2g de P_4 e área de 142 cm2) ou CIDR® (1,9 g d P_4 e 120 cm2 de área), verificaram que as concentrações máximas foram menores e o tempo para atingí-las foi maior do que os encontrados neste estudo. O CIDR® atingiu concentração máxima de 5,1 ng/mL, 14,4 h após ter sido colocado, enquanto que o dispositivo à base de PCL atingiu a concentração máxima de 5,3 ng/mL após 9,6 horas.

Santos et al. (2004) realizaram um estudo para determinar os perfis plasmáticos de P_4, proporcionados por vários dispositivos comercialmente disponíveis. Compararam o CIDR® com 1,38 g de P_4, CIDR® com 1,9 g de P_4, Cronipres®, DIB® e PRID®, em animais cíclicos, previamente sincronizados para o D7 do ciclo estral, quando todas as vacas receberam uma aplicação de $PGF2_{\alpha}$. Os dispositivos foram colocados no D0 e as amostras de sangue colhidas 0,1,4,8,12 horas e de 2 em 2 dias até 25 dias após a inserção dos dispositivos. Na primeira hora após a inserção já foram obtidas as concentrações máximas, com exceção do PRID® (6,3±0,63 ng/mL) que só atingiu a concentração máxima decorridas 8 horas da colocação. As concentrações máximas encontradas em ng/mL foram de 10,2±1,01 para o CIDR® 1,38; 6,8±0,86 para o CIDR® 1,9; 6,4±0,86 para o CRONIPRES® e 6,4±0,80 para o DIB®.

No estudo realizado por Valentin (2004), o DIB® atingiu 4,5 ng/mL após 24 horas de inserção. Entretanto, Valentin (2004) iniciou as colheitas, 24 h após a colocação dos dispositivos e, portanto, não há informação sobre os teores de P_4 que ocorreram antes de 24 h.

Apesar das diferenças encontradas entre dispositivos e entre os diferentes experimentos, pode-se afirmar que todos eles, inclusive o dispositivo testado, proporcionaram elevados teores de P_4, rapidamente após o início dos tratamentos.

Teores de P_4 no D8

Nos programas de IATF, geralmente se empregam tratamentos com duração de 7 ou 8 dias, portanto uma preocupação bastante pertinente diz respeito à capacidade dos dispositivos proporcionarem teores de P_4 de pelo menos 1ng/mL no D8, importante teor de P_4 que controla os teores de LH (ovulação).

Segundo Erb et al. (1976), Durante os dias em que a progesterona se mantém alta (acima de 2,5 ng/ml) os teores de LH permanecem inalterados, subindo à medida que as concentrações de progesterona diminuem para valores menores de 1,5 ng/ml. A queda na progesterona (< 0.75 ng/ml) deve ocorrer em período menor que 32h antes do pico de LH para que ocorram taxas normais de concepção.

Outros autores concluíram que um dia antes do estro e nos dois dias após este, os teores de P_4 foram menores que 1ng/ml tanto para *Bos taurus* quanto para *Bos indicus* (WETTEMANN, 1972; ADEYEMO; HEATH, 1980).

No presente estudo, a concentração de P_4 no D8 foi de 1,89 ± 0,13. Dados semelhantes foram encontrados por Valentin (2004) que produziu dispositivos com concentrações diferentes (1,5 e 1,0 g de P_4, P50-1,5 e P50-1,0 respectivamente) e comparou com o CIDR® 1,9 g e DIB® e obteve teores plasmáticos de P_4 no dia 8 de 3,3±0,7 ng/mL para o CIDR®; 2,6±2,0 ng/mL para o DIB®; 3,0±2,4 ng/mL para o P50-1,5 e 1,1±0,27 ng/mL para o P50-1,0.

Rathbone et al. (2002b) encontraram teores em torno de 2,0 ng/mL para o CIDR® com 1,9g de P_4, e no mesmo ano, em outro experimento detectaram 2,5 ng/mL, também utilizando o CIDR® com 1,9g de P_4. Burggraff et al. (1997), trabalhando com dois diferentes tipos de silicone na manufatura do CIDR® com 1,9g de P_4, encontraram teores em torno de 2,0 ng/mL. Macmilam et al. (1991) detectaram teores em torno de 3,2 ng/mL de P_4, no dia 8, utilizando CIDR® com 1,9g

de P_4, porém neste caso, a técnica de RIA utilizada para dosar a P_4 foi diferente, o que pode impedir comparações diretas, com os resultados do presente estudo.

Segundo Rathbone et al. (2002b), seria recomendável que um dispositivo proporcionasse pelo menos um teor de P_4 de 2,0 ng/mL no momento de sua retirada. Neste sentido, o dispositivo utilizado neste estudo, atenderia aos requisitos sugeridos. Entretanto, com base nos resultados de Carvalho (2004), novilhas tratadas com CIDR®, tiveram taxa geral de ovulação relativamente baixa (65,7%). Isto é sugestivo de que teores de P_4 proporcionados pelo CIDR® parecem ser superiores ao realmente necessário, para maximizar o desenvolvimento do folículo, sem prejudicar a taxa de concepção. Neste mesmo experimento, a aplicação de PGF2α, no momento da colocação do CIDR®, diminuiu os teores de P_4 no D8, de 4,9±3,1 para 2,7±1,6 ng/mL e elevou as taxas de ovulação de 52,7% para 79,4%. Além disso, novilhas zebuínas apresentaram teores de P_4 significativamente maiores do que os das novilhas taurinas e cruzadas no D8. É interessante ressaltar que as taxas de ovulação também foram significativamente inferiores entre as novilhas zebuínas (39,1%) do que entre as taurinas (72,7%) ou cruzadas (84,0%). Carvalho (2004) atribuiu esta diferença entre grupo genético a uma menor capacidade de biotransformação da P_4, ou a uma maior velocidade de absorção por parte de animais zebuínos. Ambas as hipóteses precisam de análise mais aprofundada.

7.5 CONCLUSÃO

- Dispositivos vaginais confeccionados com uma blenda dos polímeros PHB +PCL+P4, 46:46:8, liberam P_4 de maneira sustentada por 8 dias;

- Dispositivo manteve o teor de P_4 acima de 1ng/mL pelos 8 dias de duração do tratamento.

Estudo 3

8 ENSAIO *IN VITRO* - DETERMINAÇÃO DE P_4 LIBERADA PELO DISPOSITIVO PROGESTAR® POR 96 HORAS

8.1 OBJETIVOS

-Quantificar a P_4 total contida no dispositivo por dia e com isso, calcular a quantidade de P_4 liberada por dia e no período total de 7 dias.

- Propor um modelo matemático para liberação de P_4 *in vitro*

8.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Foram utilizados 12 dispositivos com a mesma constituição dos dispositivos descritos na seção Material e Método, confeccionados em julho de 2010.

Foi empregado um delineamento totalmente casualizado, adicionado de medidas repetidas no tempo.

Utilizou-se um dissolutor de comprimidos, com 6 cubas e capacidade para 1000mL por cuba (Nova Ética mod. 299) (Figura 6). As cubas foram preenchidas com uma mistura de álcool e água na proporção de 60: 40. O ensaio foi realizado à temperatura de 38°C, com velocidade de agitação de 150 RPM, metodologia descrita por Bunt et al. (1997).

Foi introduzido um dispositivo em cada cuba e, à cada 24 horas, dispositivos de três cubas foram retirados (triplicata), nos tempos 24;48;72;96 horas. Logo após a retirada, os dispositivos foram secos e metade destes foi picada, pesada e diluída em clorofórmio de acordo com a metodologia 1 descrita em material e método, para ser dosada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). A outra metade foi destinada a cortes longitudinais com o objetivo de conhecer a forma pela qual esta P_4 está sendo liberada.

Figura 6 - Dissolutor de comprimidos (NOVA ÉTICA 2004), LFER, FMVZ-USP campos de Pirassununga

8.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram avaliadas as médias de concentrações de P_4 contidas nos dispositivos e no álcool de acordo com o tempo, utilizando Proc GLM, para melhor ajuste das matrizes em função do tempo pelo programa SAS, versão 9.2 (2010).

Utilizou-se o PROC REG para gerar uma equação descritiva das liberações de P_4 por implante por tempo, testando modelos lineares, quadráticos e desvio, que determinou um valor de R^2 (coeficiente de determinação).

O coeficiente foi indicativo da velocidade de liberação de P_4 dos dispositivos e foram expressos em g de P_4 por cm^2, em função da raiz quadrada do tempo.

8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado um experimento, com dispositivos descritos na seção Material e Método, da confecção de julho 2010.

Neste experimento foram analisados os dispositivos que foram retirados nos seguintes tempos 24h, 48h, 72h e 96h.

As amostras de polímero foram submetidas à extração de progesterona pela metodologia 1 descrita anteriormente e após foram analisadas por HPLC-Cromatografia Líquida de Alto Desempenho.

Através do conhecimento da massa de P_4 extraída das amostras de polímero, calculou-se a percentagem de P_4 nas amostras. Multiplicando-se a porcentagem pela massa dos dispositivos (23,2g), obteve-se a massa de P_4 no dispositivo em cada dia (considerando a distribuição de P_4 ser uniforme no dispositivo).

Houve diminuição da massa de P_4 contida no implante em função do tempo (Tabela 5 e Gráfico 6), dados esperados já que a P_4 foi liberada do dispositivo ao decorrer do tempo.

Tabela 5 - Progesterona contida no dispositivo por dia (g/dia) (n=21), (X±EP)

Dias de uso	**Progesterona (g) ± EP**
S/uso	1,82±0,03
24h	1,11±0,008
48h	0,77±0,03
72h	0,63±0,03
96	0,45±0,006

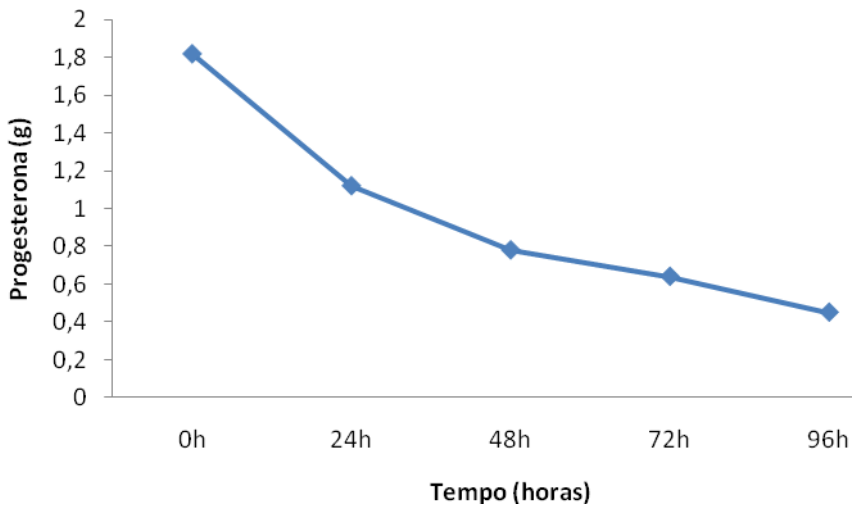


Gráfico 6 - Concentração de P_4 no dispositivo por hora (g/dispositivo/Hora)

A liberação total de P_4 no período de 4 dias foi de 1,37g, portanto foi referente a 75% da progesterona contida no dispositivo. Fenômeno diferente do que ocorreu com a liberação de P_4 *in vivo*, onde a progesterona liberada foi referente apenas a 31,6% da progesterona contida no dispositivo, lembrando que o dispositivo usado nos dois experimentos foi de composição igual (46PCL+46%PHB+8%P_4).

Os dados do presente experimento podem ser descritos tanto por equações quadráticas quanto por equações lineares (R^2=0,99). Concluiu-se que os dispositivos empregados seguiram o modelo matemático da equação de Higuchi ($Q_t=K_H\sqrt{t}$), onde a quantidade de P_4 liberada por cm^2 se deu em função da raiz quadrada do tempo (Gráfico 7).

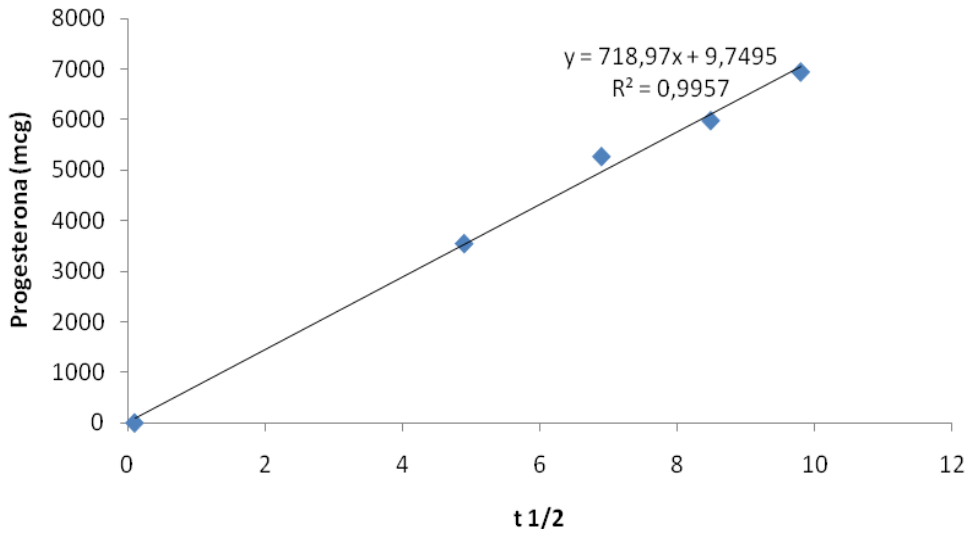


Gráfico 7 -Média das quantidades acumuladas de P_4 liberadas por cm^2 em função da raiz quadrada do tempo

O coeficiente angular do presente dispositivo foi de 718,97 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$. Estes dados corroboram com dados obtidos por Pimentel (2006) que estudou a liberação de P_4 de diferentes dispositivos feitos com matriz biopolímerica (PCL46%+PHB46%+8%P_4) e obteve os seguintes coeficientes angulares: 774 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$ para dispositivos com 10% de P_4 e 566 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$ para dispositivos com 8% de P_4.

Bunt et al. (1997) estudaram a liberação *in vitro* de dispositivos CIDR®, em condições muito semelhantes às do presente estudo e obtiveram coeficiente angular médio de 1.228±52 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$, velocidade esta, maior que a observada neste estudo.

Rathbone et al. (2002a) compararam os coeficientes angulares dos dispositivos confeccionados com PCL, e 10% de P_4, com o do CIDR® e verificaram que eles foram semelhantes e se mantiveram ao redor de 1.300 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$ e, concluíram que apesar das limitações, a simplicidade do método *in vitro* e o fácil uso têm significativa repetibilidade e confiabilidade para rotina de controle de qualidade, determinando reprodutibilidade dentro da indústria.

A modelagem matemática do processo de liberação de drogas fornece informações relevantes ao transporte de massa, bem como permite analisar variáveis no projeto, tais como: geometria de dispositivo, distribuição, concentração

inicial da droga e mecanismo de liberação da droga (ARIFIN et al., 2006). O primeiro exemplo de um modelo matemático desenvolvido com o objetivo de descrever a liberação de droga numa matriz foi proposto por Higuchi[3] (1961 apud GRASSI; GRASSI, 2005, p. 97). Este modelo foi inicialmente desenvolvido para sistemas de geometria plana, e depois então foi estendido a outras geometrias e matrizes porosas (SIEPMAN; PEPPAS, 2001). O modelo prevê que a liberação da droga é proporcional à raiz quadrada do tempo que está de acordo com o previsto pela solução analítica da segunda lei de Fick (SIEPMAN; PEPPAS, 2001).

Nos processos em que a matriz polimérica não se degrada, a difusão controla o processo de transferência de massa. O perfil de liberação da droga é obtido resolvendo a segunda lei de Fick da difusão. No sistema de coordenadas cilíndricas, cujos gradientes de concentração nas direções angulares e axial são negligenciáveis, a segunda lei de Fick é representada pela seguinte equação:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = D_e \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial} \left(r \frac{\partial q}{\partial r} \right)$$

Sendo que : q é a concentração da progesterona no dispositivo (mg/g); D_e é o coeficiente de difusão da progesterona no dispositivo (cm^2 /s); t é o tempo (s); r é a direção radial (cm).

Pimentel et al. (2006)[4], em fase de elaboração, estudou a liberação de P_4 em dispositivos com blendas de PCL+PHB com 8 e 10% de P_4 e calculou o coeficiente de difusão para estes dispositivos: $1{,}36 \times 10^{-8}$ (cm^2/s) para disp 10% de P_4 e $1{,}12 \times 10^{-8}$ (cm^2/s) para disp 8% de P_4. Os valores de coeficiente de difusão obtidos neste trabalho ficaram dentro da faixa 0,5-22 x 10^{-8} cm^2/s obtida por Valenzuela-Calahorro et al. (2003), que determinaram a difusividade da progesterona em quatro materiais carbonáceos.

---

[3] HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-876, 1961.

[4] PIMENTEL, J. R. V.; ANDRADE, A. F. C.; BELTRAN, M. P.; PARDO, F. J. D.; BRAGA, F. A.; SILVA, E. A.; CARDOSO-FILHO, L.; MADUREIRA, E. D. Emprego de matriz polimérica biodegradável em dispositivos vaginais para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas: Testes *in vitro* e *in vivo.* **Journal of Controlled Release**

Como Pimentel (2006), neste experimento submeteram-se os dados encontrados ao modelo matemático da segunda lei de Fick, para a determinação do coeficiente de difusão dos dispositivos PCL+PHB+P_4, e neste experimento obteve-se o coeficiente de difusão de 2,09 x10^{-8} (cm^2/s).

Burggraff et al. (1997) compararam CIDRs com formulações diferentes em testes *in vitro* e *in vivo* e concluíram que o teste *in vitro* é mais eficiente para identificar pequenas diferenças entre os dispositivos testados, visto que no ensaio *in vivo*, realizado por estes autores, não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Neste estudo foram utilizados biopolímeros como plataforma de liberação sustentada de P_4 e o mecanismo pelo qual a P_4 se move no polímero ou silicone parecem ser devido às diferenças no gradiente de concentração. Entretanto, a liberação de esteróide em biopolimero não pode ser considerada de maneira simplista, pois trata-se de moléculas com estruturas químicas complexas.

Além da difusão entre os sólidos do dispositivo, que talvez possa ser desconsiderada, existe a difusão dos mesmos no meio usado no ensaio *in vitro* (álcool 60% / água 40%) ou na corrente sanguínea do animal, no qual o dispositivo foi inserido.

Assumindo a hipótese mais simples, em que o único sólido que se difunde no meio é a P_4, pode-se considerar que a lei de difusão de Fick (BIRD et al., 2004) seja válida.

Essa lei é válida para qualquer mistura binária sólida, líquida ou gasosa, desde que o soluto (progesterona) mova-se bem devagar e a sua concentração seja muito pequena, de modo que, durante o processo de difusão possa ser considerado não nulo.

A liberação diária de P_4 obteve-se pela subtração da massa obtida no dia anterior pela do dia seguinte. A seguir, tabela 6 com a quantidade de P_4 liberada por dia.

Tabela 6 - Liberação diária de progesterona (g)

Intervalo - Horas	**Liberação de P_4 (g)**
S/ uso – 24h	0,70
24h – 48h	0,34
48h – 72h	0,14
72h – 96h	0,19

Observou-se a diminuição de P_4 sendo liberada ao passar do tempo, Fato esperado já que a P_4 contida no implante não está em grande quantidade na superfície com o passar do tempo, e tem que ser transportada através da matriz.

8.5 CONCLUSÃO

- Em sistema *in vitro* liberaram-se 75% da P_4 inicial ao longo dos 4 dias.

- A liberação de P_4 *in vitro* pode ser enquadrada no modelo matemático da equação de Higuchi ($Q_t=K_H\sqrt{t}$), onde a quantidade de P_4 liberada por cm^2 se deu em função da raiz quadrada do tempo.

- O coeficiente de difusão da P_4 na blenda PHB+PCL foi 2,09 $x10^{-8}$ (cm^2/s), nas presentes condições experimentais.

Estudo 4

9 DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE P_4 NO DISPOSITIVO PROGESTAR®

9.1 OBJETIVO

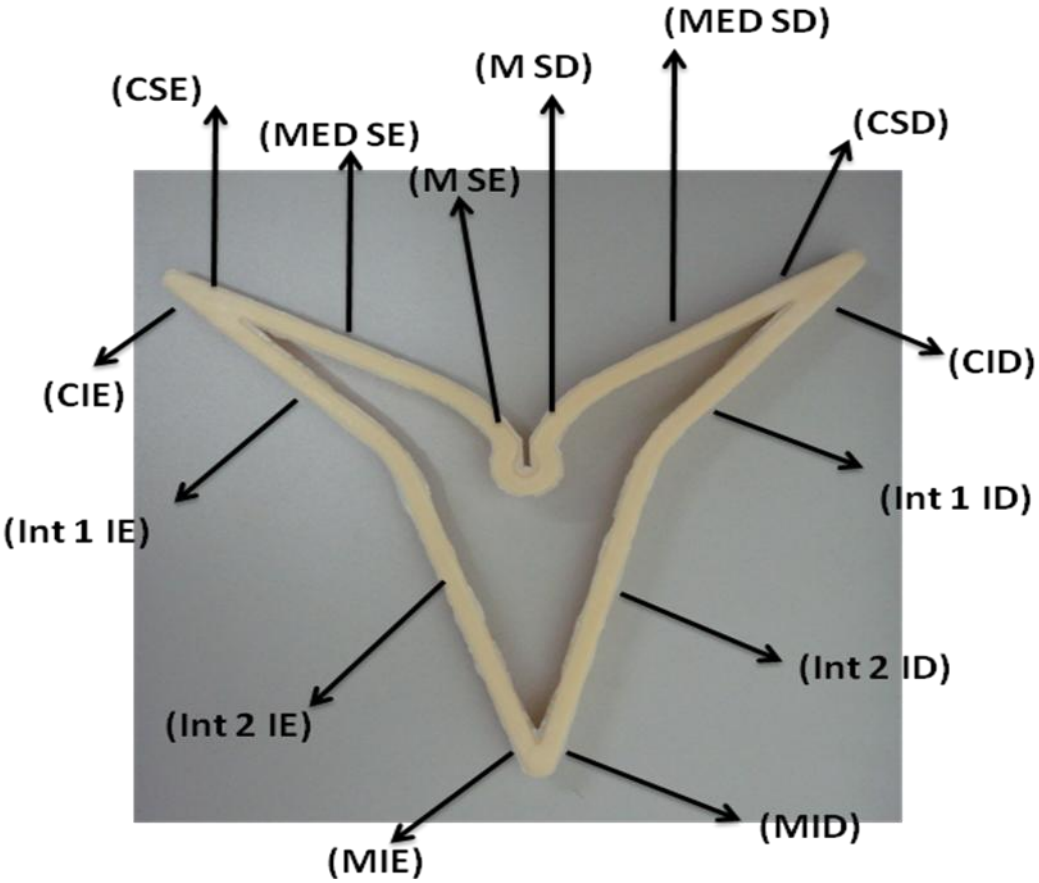
Tornou-se importante o conhecimento da distribuição de P_4 dentro do dispositivo. Contudo, o objetivo deste experimento foi determinar a distribuição de P_4 no dispositivo Progestar®.

9.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 4 dispositivos (PCL+PHB+P_4 – 46%+46%+8%) sem uso, dois da partida 2009 que foi denominada de partida 1 e dois da partida 2010 e que foi denominada de partida 2.

Foram retiradas amostras (dois cilindros: um com 4 e outro com 5 mm de diâmetro. Ambos com 2 mm de espessura) de pontos diferentes do dispositivos. Estes pontos foram denominados da seguinte forma: Canto superior direito (CSD), Médio Superior direito (MED SD), Meio superior Direito (MSD), Canto inferior direito (CID), Intermediário 1 inferior direito (Int 1 ID), Intermediário 2 inferior direito (Int 2 ID), Meio inferior direito (MID). Canto superior esquerdo (CSE), Médio Superior esquerdo (MED SE), Meio superior esquerdo (MSE), Canto inferior esquerdo (CIE), Intermediário 1 inferior esquerdo (Int 1 IE), Intermediário 2 inferior esquerdo (Int 2 IE), Meio inferior esquerdo (MIE). Portanto, foram coletadas 14 amostras de pontos diferentes de cada dispositivo. Após a retirada as amostras, estas foram pesadas e submetidas à metodologia de extração 2 para análise por espectrofotometria.

Esquema de coleta de amostras:



9.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise de variância pelo proc GLM e a homogeinidade dos resíduos foi feita pelo teste de Shapiro Wilk pelo proc univariate, SAS, versão 9.2, 2010.

As médias foram testadas pelo teste de Dunkan, utilizando o nível de 5% ($P \leq 0,05$) de significância.

9.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações e análises de progesterona nas amostras foram realizadas de acordo com a metodologia 2 descrita na seção Material e Método.

Os dispositivos da partida 2010 apresentaram 8,1% de P_4 total. Já os dispositivos da partida 2009 apresentaram 7,79% de P_4, podendo ser explicada pela degradação de P_4 ao longo do tempo.

Foram comparadas a porcentagem de P_4 dos específicos pontos dos dispositivos da partida 2009 e 2010 e observaram-se diferenças estatísticas entre os pontos coletados das duas partidas (Gráfico 8 e Tabela 7).

Tabela 7 - Pontos coletados ao longo do dispositivo, e valores de *P*

Pontos Coletados	Valor de *P*
CSD	0,38
Med S D	0,92
Meio S D	0,5
C I D	0,4
Inter.1 I D	0,19
Inter.2 I D	0,75
Meio I D	0,15
CSE	0,08
Med S E	0,79
Meio S E	0,53
C I E	0,67
Inter.1 I E	0,91
Inter.2 I E	0,93
Meio I E	0,07

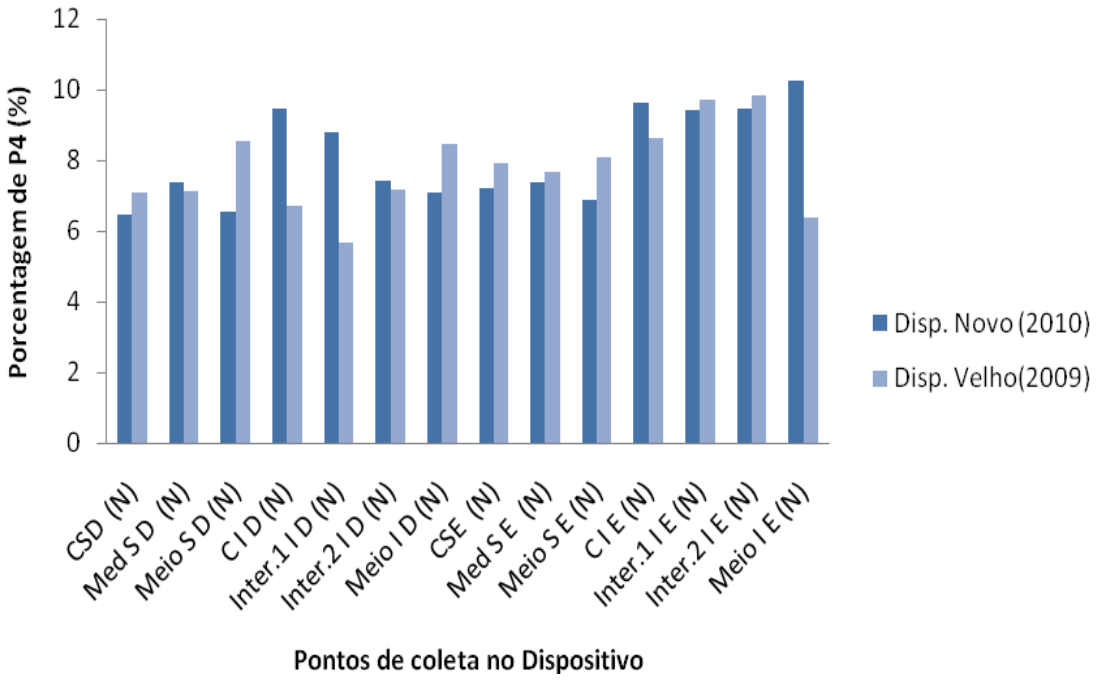


Gráfico 8 - Porcentagem de P_4 nos pontos coletados das partidas 2009 (1) e 2010 (2)

9.5 CONCLUSÃO

Os dispositivos confeccionados a partir da blenda PHB+PCL+P_4, independente da partida, não contém diferença na porcentagem de P_4 e esta P_4 está distribuída uniformemente.

Estudo 5

10 EXPERIMENTO 5 - AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE UM NOVO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE PROGESTERONA

Com o tempo e a experiência no manuseio do dispositivo confeccionado a partir de PHB + PCL, observou-se um gradual endurecimento do polímero, levando-o a se tornar quebradiço. Numa tentativa de correção deste problema, confeccionaram-se dispositivos com adição de estabilizantes anti-UV (Tinuvin®) e antioxidante (Irganox B215®). Além disto, testaram-se duas diferentes proporções entre os polímeros PBH e PCL.

10.1 OBJETIVO

Avaliar a eficiência de liberação de progesterona, *in vitro*, de dispositivos à base de polímeros biodegradáveis (PHB+PCL) em diferentes formulações com 2 tipos de aditivos (IRGANOXB215®,TINUVIN®).

10.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um estudo *in vitro* para avaliar a cinética de liberação dos dispositivos confeccionados a partir das matrizes biodegradáveis poliméricas de PHB- PCL, com diferentes concentrações de P_4 com adição de estabilizantes na formulação IrganoxB215® e Tinuvin®.

O delineamento foi de arranjo fatorial do tipo 2x2: 2 proporções de polímeros e com e sem Tinuvin®, porém todos com Irganox®.

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com medidas repetidas no tempo. Foram realizados 2 experimentos, com 4 tipos de dispositivos em triplicata: DISP1 (dispositivo vaginal de PHB:PCL:IRGANOXB215®:P_4 na proporção

de 45,65:45,65:0,70:8,00 respectivamente); DISP2 (dispositivo vaginal de PHB:PCL:IRGANOXB215®:TINUVIN®:P_4 na proporção de 45,50:45,50:0,70:0,30:8,00 respectivamente); DISP3 (dispositivo vaginal de PHB:PCL:IRGANOXB215®:P_4 na proporção de 40,65:50,65:0,70:8,00 respectivamente); DISP 4 (dispositivo vaginal de PHB:PCL:IRGANOXB215®:TINUVIN®:P_4 na proporção de 40,50:50,50:0,70:0,30:8,00 respectivamente). Cada dispositivo utilizado, foi considerado uma unidade experimental e cada medida repetida no tempo como uma sub-parcela do modelo.

O Teste foi realizado em um dissolutor de comprimidos, modelo 299 (Nova Ética) (Figura 6), com 6 cubas e capacidade de 1000 mL por cuba. As cubas foram preenchidas com uma mistura de álcool e água 60:40.

Os dispositivos foram cortados e fixados nas hastes giratórias do dissolutor.

A temperatura do teste foi de 38 °C e a velocidade de agitação de 1500RPM, conforme descrito por Bunt et al. (1997). Os dispositivos presos às hastes foram introduzidos nas cubas e amostras de 1 mL foram colhidas nos seguintes momentos: 2 minutos, 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras foram acondicionadas em tubos âmbar de 2 mL, vedadas com Parafilm® e mantidas em geladeira à 4°C, até o momento das dosagens em HPLC.

10.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo do programa Statistical Analysis System (SAS). Para que fossem submetidos à estatística de inferência foram testados quanto à normalidade dos resíduos através do PROC UNIVARIATE, teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias pelo PROC MEANS, teste de Bartlett.

Foi realizada a análise de homogeneidade das variâncias, pelo PROC ANOVA do SAS versão 9.2 (2010) e as medidas repetidas no tempo foram analisadas pelo PROC MIXED do SAS versão 9.2 (2010).

Após isso, utilizou-se o PROC REG para gerar uma equação descritiva das liberações de P_4 por implante por tempo, testando modelos lineares, quadráticos e desvio, que determinou um valor de R^2 (coeficiente de determinação). Para cada coeficiente angular foi gerado um valor de P pelo PROC GLM. Foram testadas liberações acumuladas, em função de tempo e também liberações diárias. O nível de significância adotado foi de 5%.

10.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como não houve interação entre bloco e dispositivo, nem efeito significativo de bloco, os resultados dos dois ensaios foram agrupados.

As médias das quantidades de P_4 por tempo encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Médias de concentração de P_4 nos tempos de incubação

	2 min	**24h**	**48h**	**72h**	**96h**
DISP 1	87,61 ± 3,21	715,92 ± 6,89	909,18 ± 8,11	1000,2±11,59	1045,45±11,3
DISP2	98,56 ± 2,98	757,23 ± 2,4	924,93 ± 4,34	1007,45±6,82	1060,82±5,38
DISP 3	119,38 ± 6,91	771,4 ± 3,77	930,66 ± 3,37	1011,48±3,57	1056,73±6,44
DISP 4	100,66 ± 3,17	755,43 ± 1,21	916,21 ± 1,78	992,03±2,29	1038,18±3,45

As médias das quantidades de P_4 liberadas por cm^2 de área superficial dos dispositivos, em função da raiz quadrada do tempo encontram-se no gráfico 9 .

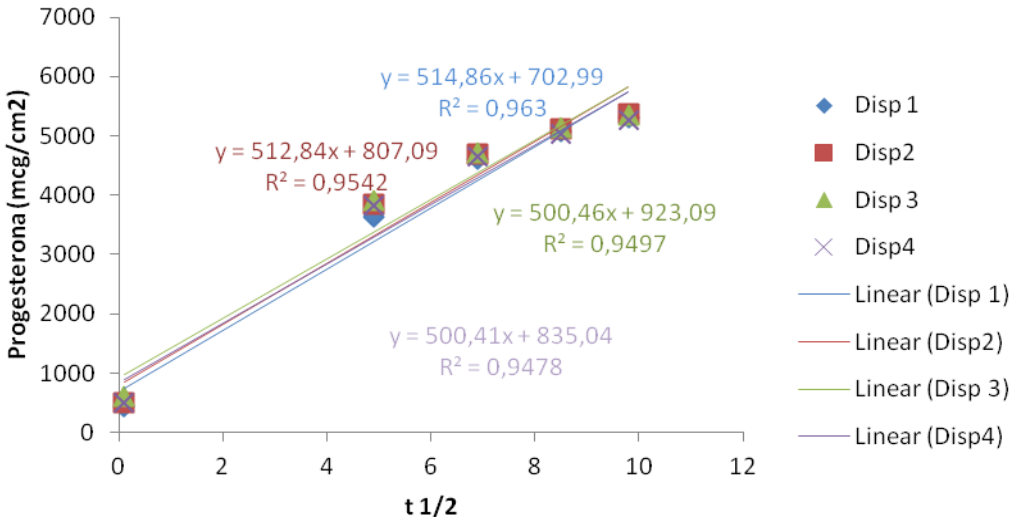


Gráfico 9 - P_4 acumulada pela liberação por cm2 de dispositivos com formulações diferentes, em função da raiz quadrada do tempo. **DISP1** formulação PHB:PCL:IRGANOXB215:P_4 na proporção de 45,65:45,65:0,70:8,00 respectivamente◆;**DISP2** PHB:PCL:IRGANOXB215:TINOVIN:P_4 na proporção de 45,50:45,50:0,70:0,30:8,00 respectivamente ■ ; DISP3 PHB:PCL:IRGANOXB215:P_4 na proporção de 40,65:50,65:0,70:8,00 respectivamente ▲ ; DISP 4 PHB:PCL:IRGANOXB215:TINOVIN:P_4 na proporção de 40,50:50,50:0,70:0,30:8,00 respectivamente X

Os coeficientes angulares foram: 514,86 µg/cm^2/t$^{1/2}$ para Disp 1, 512,84 µg/cm^2/t$^{1/2}$ para Disp2, 500,46 µg/cm^2/t$^{1/2}$ para Disp3 e 500,41 µg/cm^2/t$^{1/2}$ para Disp4.

Não houve diferença estatística na liberação de P_4, segundo dispositivo (*P*= 0,9407).

Pimentel (2006) realizou um trabalho onde comparou dispositivos de PHB+PCL com 8 ou 10% de P_4 com o dispositivo DIB®, e encontrou um coeficiente angular de 566 µg/cm^2/t$^{1/2}$ para dispositivos com 8% de P_4 . O autor concluiu que estes dispositivos liberam P_4 por cm^2 em função da raiz quadrada do tempo, corroborando os dados do presente estudo, onde os dispositivos empregados, seguiram o modelo matemático da equação Higuchi ($Q_t=K_H\sqrt{t}$), ou seja, a quantidade de P_4 liberada por cm^2 se deu em função da raiz quadrada do tempo (Gráfico 9).

Bunt et al. (1997) estudaram a liberação *in vitro* de dispositivos CIDR®, em condições muito semelhantes às do presente estudo e obtiveram coeficiente angular médio de 1.228±52 µg/cm^2/t$^{1/2}$, velocidade esta, maior que as velocidades de liberação observadas neste estudo. Estes autores também observaram que a velocidade de liberação aumentou em função da raiz quadrada do dobro da

quantidade inicial de P_4, contida no dispositivo, evidenciando a modulação da quantidade de droga na liberação.

Rathbone et al. (2002a) compararam os coeficientes angulares de dispositivos confeccionados em PCL e 10% de P_4,com o do CIDR e verificaram que eles foram semelhantes e se mantiveram ao redor de 1.300 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$.

Burggraff et al. (1997) compararam CIDRS com formulações diferentes em testes *in vitro* e *in vivo* e concluíram que o teste *in vitro* é mais eficiente para identificar pequenas diferenças entre os dispositivos testados, visto que no ensaio *in vivo*, realizado por estes pesquisadores, não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Neste estudo foram utilizados biopolímeros como plataforma de liberação sustentada de P_4 e o mecanismo pelo qual a P_4 se move no polímero ou silicone parece ser devido às diferenças no gradiente de concentração. Entretanto, a liberação de esteróide em biopolímeros não pode ser considerada de maneira simplista, pois se trata de moléculas com estruturas químicas complexas.

Além da difusão entre os sólidos do dispositivo, que talvez possa ser desconsiderada, existe a difusão dos mesmos no meio usado no ensaio *in vitro* (álcool 60% / água 40%) ou na corrente sanguínea do animal, no qual o dispositivo foi inserido. Assumindo a hipótese mais simples, em que o único sólido que se difunde no meio é a progesterona, pode-se considerar que a primeira lei de difusão de Fick (BIRD et al., 2004) seja válida.

Essa lei é válida para qualquer mistura binária sólida, líquida ou gasosa, desde que o soluto (progesterona) mova-se bem devagar e sua concentração seja muito pequena, de modo que, durante o processo de difusão possa ser considerado não nulo.

Rathbone et al. (2002a) utilizaram cortes seqüenciais, com 100µm de espessura , do dispositivo CIDR® submetidos ao teste de liberação *in vitro,* por diferentes períodos de tempo. Dosaram a concentração de P_4 nestes cortes e verificaram uma zona de depleção de droga, que aumentou à medida que a liberação ocorreu. A formação desta zona de depleção é sugestiva da liberação em função da raiz quadrada do tempo, como pode ser confirmada pela equação de

regressão obtida. Esta forma de liberação pode ser denominada de mecanismo de ordem zero.

A velocidade de liberação parece ser inerente ao material empregado na confecção das matrizes, mas a manipulação de uma série de fatores pode auxiliar no controle da liberação, ajustando-a as várias necessidades.

Burggraaf et al. (1997) compararam CIDRS produzidos com diversos lotes de silicone, contendo ou não 10% de carbonato de cálcio e progesterona micronizada ou não, e encontraram os seguintes resultados: o CIDR® contendo P_4 não micronizada liberou mais lentamente que o CIDR® com P_4 micronizada, com coeficientes angulares de 1078 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$ e 1088 $\mu g/cm^2/t^{1/2}$, respectivamente.

No presente estudo, a liberação de P_4 nos seguintes dispositivos, os aditivos não afetaram a liberação.

Entretanto, a adição de um aditivo inerte (carbonato de cálcio) no silicone diminuiu a taxa de liberação de P_4 no CIDR®. Outros autores já haviam observado uma diminuição na taxa de liberação de esteróides, misturados em uma matriz de silicone, quando aditivos inertes foram adicionados. Concluiu-se que esta adição aumenta a distância que a molécula de esteróide tem que percorrer até a superfície do silicone, diminuindo com isto a velocidade de liberação (PFISTER et al., 1987).

Contudo, a interferência na liberação da droga deve depender da quantidade e composição do aditivo.

10.5 CONCLUSÃO

- Dispositivos à base de polímeros biodegradáveis (PHB+PCL) em diferentes formulações com 2 tipos de estabilizantes (IRGANOXB215,TINOVIN) podem liberar P_4 de forma sustentada no sistema *in vitro* por 4 dias. Esta liberação se dá em função da raiz quadrada do tempo.

- A liberação de P_4 em sistema *in vitro* não diferiu entre os dispositivos.

- Adição de Estabilizantes não interferiu na liberação de P_4.

11 Conclusões Gerais

11 CONCLUSÕES GERAIS

- Dispositivos vaginais confeccionados com PHB+PCL podem liberar P_4 de forma sustentada por 8 dias, quando colocados na cavidade vaginal;

- Em sistemas *in vivo* foram liberados 31% da P_4 inicial do dispositivo ao longo de 7 dias;

- A liberação de P_4 *in vivo* tem aparência linear, sugerindo que a progesterona, liberada *in vivo,* pode ocorrer pelo mecanismo de ordem zero;

- Dispositivo manteve o teor de P_4 acima de 1ng/mL pelos 8 dias de duração do tratamento;

- Em sistema *in vitro* liberaram-se 75% da P_4 inicial ao longo dos 4 dias;

- A liberação de P_4 *in vitro* pode ser enquadrada no modelo matemático da equação de Higuchi ($Q_t=K_H\sqrt{t}$), onde a quantidade de P_4 liberada por cm^2 se deu em função da raiz quadrada do tempo;

- O coeficiente de difusão da P_4 na blenda PHB+PCL foi de 2,09 $x10^{-8}$ (cm^2/s), nas presentes condições experimentais;

- Os dispositivos confeccionados a partir da blenda PHB+PCL+P_4 independente da partida não contém diferença na porcentagem de P_4 e esta P_4 está distribuída uniformemente;

- Dispositivos à base de polímeros biodegradáveis (PHB+PCL) em diferentes formulações com 2 tipos de estabilizantes (IRGANOXB215®,TINOVIN®) liberam P_4 em função da raiz quadrada do tempo;

- Adição de Estabilizantes não interferiu na liberação de $P_{4;}$

- Alteração na proporção de PHB:PCL, não interferiram na liberação *in vitro*, pelo menos nas proporções testadas.

Referências

REFERÊNCIAS

ABR. Plástico biodegradável. Online. Disponível em: <http://www.radiobras.com.br/ct/1999/materia_220199_3.htm http://www.resbrasil.com.br/mostra_noticia.php?id_noticia=124>. Acesso em: 21 jun. 2005.

ADEYEMO, O.; HEATH, E. Plasma of progesterona concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 14, n. 6, p. 411-420, 1980.

ALMEIDA, A. B.; BERTAN, C. M.; ROSSA, L. A. F.; GASPAR, P. S.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H. Avaliação da reutilização de implantes auriculares contendo norgestomet associados ao valerato ou ao benzoato de stradiol em vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 456-465, 2006.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polydroxyialcanoates. **American Science for Microbiology**, v. 54, p. 450-472, 1990.

ANDERSON, L. H.; MC DOWELL, C. M.; DAY, M. L. Progestins-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 5, p.1025-1031, 1996.

APEX. Agência de promoção de exportações e investimentos. “Exportação de carne 2006”, **Informativo APEX**, 2006. Disponível em: <http://www.apexbrasil.com.br/noticia_detalhe.aspx?dnot=377> . Acesso em: 04 set. 2006.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. “Resultado da Comercialização de Sêmen 2004”, **Informativo ASBIA**, 2004. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/noticia.asp?id=54>. Acesso em: 02 abr. 2006.

ARIFIN, D. Y.; LEE, L. Y.; WANG, CHI-HWA. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1274–1325, 2006.

BARREIROS, T. R. R. Comparação entre ECG e desmame temporário na inseminação artificial em tempo fixo com uso de CIDR em vacas Nelore lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 03, p. 418-420, 2003.

BARTOLOMEU, C. C. Inseminação artificial em tempo fixo de vacas leiteiras mestiças Holando-Zebu no pós-parto com emprego de CIDR reutilizado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 426-427, 2003.

BARUSELLI, P. S.; ET, E. L. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu cow treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, n. 01, p. 214-218, 2003.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reprocution Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen ear implant. **Animal of Reproduction Science**, v. 59, p. 141–157, 2000.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The controlo of folicular wave development self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; TRIBULO, R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo em bovinos para carne: algunas experiências realizadas en Argentina. Primeira Parte. **Taurus**, v. 14, p. 10-21, 2002.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. **Animal of Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

BUNT, C. R.; RATHBONE, M. J.; BURGGRAAF, S.; OGLE, C. R. Development of a QC release assessment method for physically large veterinary product containing a hihly water insoluble drug and the effect of formulation variables upon release. **Proceed International Symposium Controlled Release Socitey**, v. 24, p. 145-146, 1997.

BURGGRAAF, S.; RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; PICKERING, K. L. Effect of silicone shore hardness, inert fillers and progesterone available one particle size upon the release of progesterone from a controlled release intravaginal drug delivery system. **Proceed International Symposium Controlled Release Bioactives Materials**, v. 24, p. 147–148, 1997.

CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J. E.; ENTWISTLE, K. W.; FITZPATRICK, L. A. Synchronization of estrus ans ovulation and associated endocrine changes in Bos indicus cows. **Theriogenology**, v. 47, p. 801–814, 1997.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**. v. 8, n. 4, p. 305-313, 1996.

CHIELLINI, E.; SOLARO, R. "Environmentally Degradable Polymers and Plastics. An Overview". in: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ENVIRONMENTALLY DEGRADABLE AND RECYCLABE POLYMERS IN LATIN AMERICA, 1998, Campinas. **Anais…** Campinas – SP, 1998. p. 15-20.

CHRISTIAN, R. E.; CASIDA, L. E. Effect of progesterone in altering the oestrus cycle of the cow. **Journal of Animal Science**, v. 7, p. 540, 1998.

CHRISTIAN, R. E.; CASIDA, L. E. Effect of progesterone in altering the oestrus cycle of the cow. **Journal of Animal Science**, v. 7, p. 540, 1948.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p.123–133, 2001.

COSTA, A. N. L.; ARAUJO, A. L.; MOURA, A. A. A. N.; CAMPOS, C. N.; MONTEZUMA JUNIOR, P. A. Sincronização do estro em novilhas girolandas: comparação entre protocolos CIDR-B e OVSYNCH. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 01, p.137-141, 2008.

CROWE, M. A.; GOULDING, D.; BAGUISI, A.; BOLAND, M. P.; RPCHE, J. F. Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckler cows using a GNRH anologue. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 551-555, 1993.

DERVAL, S. R.; FILHO, R. P.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da biodegradação de poli-β-(hidroxibutirato), Poli-β-(hidroxibutirato-co-valerato) e Poli-∈-(caprolactona) em solo compostado. **Polímeros**: Ciência e Tecnologia, v. 12, n. 4, p. 311-317, 2002.

EHRING, R. J. **Plastic recycling – products and processes**. Munich, Viena: Hanser Publisher, Verlag, 1992.

ERB, R. E.; GARVERICK, H. A.; RANDEL, R. D.; BROWN, B. L.; CALLAHAN, C. J. Profiles of reproductive hormones associated with fertile and nonfertile inseminations of dairy cows. **Theriogenology**, v. 5, n. 5, p. 227-242, 1976.

FRANCHETTI, A. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P. E.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Effects of norgestomet on follicular development in postpartum beef cows. **Journal Animal Science**, v. 64, p. 104-112, 1987.

GOMES, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de Plásticos Biodegradáveis por Bactérias, **Revista Brasileira Engenharia Quimica**, v. 17, p. 24-29, 1997.

GONÇALVES, P. B. D. Anestro pós parto em vacas de corte. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo: Faculdade de medicina Veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 105-116.

GRASSI, M.; GRASSI, G. Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems. **Current Drug Delivery**, v. 97, p. 97-116, 2005.

HALL, J. B.; STAIGMILLER, R. B.; SHORT, R. E.; BELLOW, R. E.; MACNEIL, M. D.; BELLOWS, S.E. Effect of age ant pattern of gain on induction of puberty with a progestin in beef heifers. **Journal Animal Science**, v. 75, p. 1606-1611, 1997.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-876, 1961.

HOLLENSTEIN, K.; JANETT, F.; BLEUL, U.; HASSIG, M.; KAHN, W.; THUN, R. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress**.** **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 292-302, 2005.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-876, 1961.

HUANG, J. C.; SHETTY, A. S. E.; WANG, M. S. Biodegradable plastics: a review. **Advanced Polymer Technology**, v. 10, p. 23-30, 1990.

JUNI, K.; NAKANO, M. Poly(hydroxyl acids) in drug delivery. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 3, p. 209-232, 1987.

KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. **Advance Drug Delivery Rewiews**, v. 48, p. 159-172, 2001.

KAWAGUCHI, T.; TSUGANE, A.; HIGASHIDE, K.; ENDOH, H.; HASEGAWA, T.; KANNO, H.; SEKI, T.; JUNI, K.; FUKUSHIMA S.; NAKANO, M. Control of drug release with a combination of prodrug and polymer matrix-antitumor activity and release profiles of 2.3-diacyl-5-fluoro-2-deoxyuridine from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres. **Faculty of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 508-512, 1992.

KUBOTA, M.; NAKANO, M.; JUNI, K. Mechanism of enhancement of the release rate of aclarubicin from poly(3-hydroxybutyrate)microspheres by fatty acid esters. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.36, p.333-337, 1988.

LANGER, R. S.; PEPPAS, N. A. Present and future applications of biomaterial in controlled drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 2, p. 201-214, 1981.

LUCY, M. C.; BILLINGS, H. J.; BUTLER, W. R.; EHNIS, L. R.; FIELDS, M. J.; KESLER, D. J.; KINDER, J. E.; MATTOS, R. C.; SHORT, R. E.; THATCHER, W. W.; WETTEMANN, R. P.; YELICH, J. V.; HAFS, H. D. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF2α for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in post-partum beef cows, and peripubertal beef heifers and dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v.79, p. 982–995, 2001.

LUO, S.; NETRAVALI, A.N. A study of physical and mechanical properties of poly-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate during composting. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, p. 59-66, 2003.

MADUREIRA, E. H. Controle farmacológico do ciclo estral com o emprego de progesterona e progestágenos em bovinos. In: MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. São Paulo: FUNVET, 2000. p. 89-98.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. P.; ALMEIDA, A. B.; ROSSA, L. A. F. Sincronização com progestágenos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS, 1., Londrina. 2004. p. 117-128.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V. IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Palestras. 2005.

MACMILLAN, K. L.; TAUFA, V. K.; BARNES, D. R.; DAY, A. M. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. **Animal of Reproduction Science**, v. 26, p. 25-40, 1991.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing devices for cattle (CIDR-B) for oestrous synchonization, increasing pregnancy rates and the treatment of pos-partum anoestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1, p. 1-25, 1993.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of estrus cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 307-320, 1996.

MALCOLM, K.; WOOLFSON, D.; RUSSELL, J.; TALLON, P.; MCAULEY, L.; CRAIG, D. Influence of silicone elastomer solubility and diffusivity on the in vitro release of drugs from intravaginal rings. **Journal Controlled Release**, v. 90, p. 217-225, 2003.

MARIANO, R. N.; TURINO, L. N.; CABRERA, M. I.; SCÁNDOLO, D. E.; MACIEL, M. G.; GRAU, R. J. A. A simple pharmacokinetic model linking plasma progesterone concentrations with the hormone released from bovine intravaginal inserts. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 250-256, 2010.

MIHM, M.; BAGUISI, A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers**.** **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 123–130, 1994.

MIHM, M. Delayed resumption of ciclicity in postpartum dairy and beef cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v. 34, p. 277-284, 1999.

MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T.; CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanism in the bovine corpus lutum. **Theriogenology**, v. 45, p. 1327-1349, 1996.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; GEARY, T. W. Ability of intravaginal progesterone inserts and melengestrol acetate to induce estrous cycles in postpartum beef cows. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 695-704, 2004.

PFISTER, W. R.; SHEERAN, M. A.; WATTERS, P. A. Proceed. **International Symposium Control Release Bioactives. Mater**, v. 14, p. 223-224, 1987.

PIMENTEL, J. R. V. **Emprego de matriz polimérica biodegradável em dispositivos vaginais para liberação sustentada de progesterona em fêmeas bovinas**: testes in vitro e in vivo. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PITT, C. G.; MARKS, T. A.; SCHINDLER, A. In. R. BAKER, R. (ed.) **Controller release of bioactive materials**. New York: Academic Press, 1980. p. 9.

PITT, C. G.; CHASALDO, F. J.; HIBIONADA, J. M.; KLIMAS, D. M.; MARKS, T. A.; SCHINDLER, A. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ϵ-caprolactone) *in vivo.* **Applied Polymer Science,** v. 28, n. 11, p. 3779, 1981.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e o potencial produtivo brasileiro**. São Paulo: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2006. p. 4.

RABELLO, M. **Aditivação de polímeros**. 1. ed. São Paulo: Artiliber, 2000.

RABIEE, A. R.; MACMILLAN, K. L.; SCHWARZENBERGER, F. The effect of level of feed intake on progesterone clearance rate by measuring feaca progesterone metabolites in grazing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 205-214, 2001.

RAGHAVAN, D. Characterization of Biodegradable Plastics Polymer-Plastics Technology and Engineering. **Polymer Plastic Technology Engineering**, v. 34, n. 1, p. 41-63, 1995.

RATHBONE , M. J.; MACMILLAN, K. L.; BUNT, C. R.; BURGGRAAF, S.; BURKE, C. Conceptual and commercially available intravaginal veterinary drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 363-392, 1997.

RATHBONE , M. J.; MACMILLAN, K. L.; JOCHLE W.; BOLAND, M.; INSKEEP, K. Controlled release products for the control of the estrous cycle in cattle, sheep, goats, deer, pigs and horses. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 15, p. 285-380, 1998a.

RATHBONE , M. J.; MACMILLAN, K. L.; INSKEEP, K.; SHANE, B.; BUNT, C. R. Fertility regulation in cattle. **Journal of Controlled Release**, v. 54, p.117-148, 1998b.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 277–320, 2001.

RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; OGLE, C. R.; BURGGRAAF, S.; MACMILLAN, K. L.; PICKERING, K. Reengineering of a commercially available bovine intravaginal insert (CIDR insert) containing progesterone. **Journal of Controlled Release**, v. 85, p. 105-115, 2002a.

RATHBONE, M. J.; BUNT, C. R.; OGLE, C. R.; BURGGRAAF, S.; MACMILLAN, K. L.; PICKERING, K. Development of an injection molded poly(ε-caprolactone) intravaginal insert for delivery of progesterone to cattle. **Journal of Controlled Release**, v. 85, p. 61-71, 2002b.

REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p. 39–47, 1996.

ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Effect exogenous progesterone on time occurrence of the lh surge in heifers. **Journal Animal Science**, v. 52, p. 580-586, 1981.

ROSA, D. S.; FRANCO, B. L. M. Análise do desenvolvimento de dióxido de carbono de polímeros biodegradáveis quando submetidos a lodo ativado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 5., 1999, Águas de Lindóia. 1999. p. 1241.

ROSA, D. S.; CHUI, Q. S. H.; FILHO, R. P.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da Biodegradação de Poli-b-(Hidroxibutirato), Poli-b-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli-e-(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros: Ciências e Tecnologia**, v. 12, n. 4, p. 311-317, 2002.

RHODES, F.M.; BURKE, C.R.; CLARK, B. A.; DAY, M. L.; MACMILLAN, K. L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestours cycles. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 139-150, 2002.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 153-159, 2007.

SIEPMAN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139–157, 2001.

SOUZA, C. A. Z.; AMARAL, F. A.; NEVES, S.; FOSECA, C. P. Aplicação de Poli-b -(hidroxibutirato) e Poli-b-(hidroxibutirato-co-valerato) como eletrólitos sólidos Poliméricos biodegradáveis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2000.

SANGSRITAVONG, S. D.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; WINTBANK, M. C. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 B in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

STANCZYK, F. Z. All progestins are not created equal. **Steroids**, v. 68, p. 879-890, 2003.

STEVENS, M. P. **Polymer chemistry an introduction**. New York: Oxford University Press, 1999.

VALENTIM, R. **Concentrações plasmáticas de progesterona e eficiência reprodutiva de diferentes dispositivos de liberação lenta de progesterona usados em inseminação artificial em tempo fixo**. 2004. 88 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E.; MELVIN, E. J.; FINDER, J. E. Development of persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of estradiol proceding ovulation dos not alter the pregnancy rates after embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p.1413-1421, 1997.

WETTEMANN, R. P.; HAFS, H. D.; EDGERTON, L. A.; SWANSON, L. V. Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. **Journal Animal Science**, v. 34, p. 1020-1024, 1972.

WINKLER, V. W.; BRORODKIN, S.; WEBEL, S. K.; MANNEBACH, J. T. In vitro and in vivo considerations of a novel matrix-controlled bovine progesterone-releasing intravaginal device. **Journal of Pharmacy Science**, v. 66, p. 816-818, 1977.

WINZENBURG, G.; SCHMIDT, C.; FUCHS, S.; KISSEL, T. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p.1453-1466, 2004.

YAVAS, Y.; JONSON, W. H.; WALTON, J. S. Modification of follicular dynamics by exogenous FSH and progesterone, and the induction of ovulation using hCG in postpartum beef cows. **Theriogenoloy**, v. 52, p. 949-963, 1999.

XIONG, Y. C.; YAO, Y. C.; ZHAN, X.Y.; CHEN, G. Q. Application if polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors. **Journal of Biomaterials Science**, v. 21, p. 127-140, 2010.

ZIMBELMAN, R. G.; SMITH, L. W. Control fo ovulation in cattle with melengestrol acetate. 1. Effects on dosage and route of administration. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 11, p. 185-189,1966.