

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO**  
**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**



**MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM DIDANOSINA E SUA FORMULAÇÃO**  
**EM GRÂNULOS MUCOADESIVOS**

Eng. Classius Ferreira da Silva

**Autor**

Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana

**Orientadora**

Dra. Fernanda Martins

**Co-Orientadora**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Engenharia Química

Campinas – São Paulo

Abril de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Si38m Silva, Classius Ferreira da  
Microparticulas de quitosana com didanosina e sua  
formulação em grânulos mucoadesivos / Classius  
Ferreira da Silva.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana,  
Fernanda Martins

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Agentes antivirais. 2. Microencapsulação. 3.  
AIDS (Doença). 4. Tecnologia de liberação controlada.  
I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Martins,  
Fernanda. III. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Didanosine-load chitosan microspheres and their formulation in  
mucoadhesive granules

Palavras-chave em Inglês: Didanosine, Chitosan, Microspheres, AIDS, Granulation,  
Drug delivery

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Marco Vinícius Chaud, Maria Marluce dos Santos Vilela, Marisa  
Masumi Beppu e Cláudio Airoidi

Data da defesa: 26/04/2006

Tese de Doutorado defendida por Classius Ferreira da Silva e aprovada em 26 de Abril de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana - Orientadora



---

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud (titular)



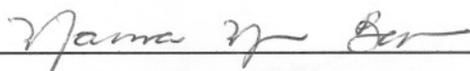
---

Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela (titular)



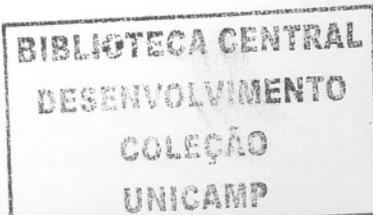
---

Prof. Dr. Cláudio Airoidi (titular)



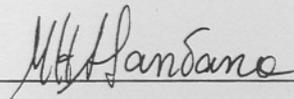
---

Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu (titular)



200616317

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Classius Ferreira da Silva e aprovada pela comissão julgadora em 26 de Abril de 2006.



---

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Ao meu companheiro José Araújo Lima Neto

Ao meu companheiro José Araújo Lima Neto.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Dra. Maria Helena Andrade Santana pela orientação, amizade e paciência nestes anos de trabalho.

A Dra. Fernanda Martins pela co-orientação e amizade que foram indispensáveis na execução deste trabalho.

Aos membros da banca pela participação. Tenho certeza de que a opinião de todos é muito construtiva em nosso trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (LDPB) que estão presentes: Aline Pires, Amós, Fernando, Giuliana, Luciana Lima, Lucimara, Reinaldo. E também aos ausentes, mas que sempre vou sentir saudades: Ana Paula, Elaine Cabral, Christiane Saraiva, Christine Lamenha, Raquel Melo.

Ao técnico do LDPB, Gilson Barbosa Maia Jr., pelo apoio, paciência e amizade nestes anos de convivência.

À Kelly Palma, técnica do Laboratório de Uso Comum da FEQ-Unicamp, pela atenção e execução das análises de MEV, MO e MasterSizer.

Ao Professor Dr. Marco Vinícius Chaud pela oportunidade de realização dos testes do intestino invertido nos Laboratórios da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Metodista de Piracicaba (Unimep).

Ao Professor Dr. Antônio Meireles e ao acadêmico Elias do DEA-FEA-Unicamp pela disponibilidade e atenção no uso do liofilizador.

Ao Professor Dr. Sinézio do DTP-FEQ-Unicamp e seu orientado Vítor pela disponibilidade e atenção no uso do goniômetro.

Às alunas do professor Chaud que contribuíram prontamente na realização dos testes do intestino invertido: Beatriz Zanchetta, Patrícia Severino, Priscila, Pollyanna. Serei sempre grato a todas, sem vocês estes ensaios não teriam sido realizados.

Aos amigos de todos os momentos, que tornaram a vida na Unicamp mais agradável: Arlete (minha afilhada), Márcia Simões, Rodrigo Vieira, Kitty, Érika Tomie, Tina (DTA-FEA), Luciana Aquino, Adriana Pequetita, Ângela Costela.

Aos amigos de todos os momentos, que tornaram a vida em Campinas mais agradável: Alice Braghetto, André Lauritto, Denise Bagnarelli, D. Neuza Braghetto.

Aos amigos da Unioeste que mesmo distante sempre foram presentes na minha vida: Débora e Sandra.

Ao Ambulatório Municipal de DST/AIDS (AMDA) da Prefeitura de Campinas pela amostra de comprimidos tamponados de didanosina.

À Dra. Marta Wilk Donida pelas sugestões e dicas na realização do processo de revestimento.

À Patrícia Zancanella da UFPR que passou pelo LDPB e deixou muitas saudades.

À professora Nádia Regina (DEQ-UEM), amiga de todas as horas e incentivadora do meu trabalho.

Ao José Araújo Lima Neto, pelo companherismo, dedicação, paciência e todos os melhores momentos que passei nos últimos anos.

À minha irmã pela amizade que consolidamos neste período de convivência em Campinas.

À minha família que mesmo de longe me apoiou sempre com amor e carinho.

À Labogen S/A Biotecnologia e Química Fina pelo apoio neste projeto.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná que me concedeu a licença para a realização do doutorado.

Ao Poder Superior que guia nossas vidas.

"Não se pode ser infeliz, não se pode morrer em vida, não se pode desistir de amar, de criar. Não se pode: é pecado, é proibido (...) Não é possível adiar a vida"

(Caio Fernando Abreu, escritor, falecido em decorrência da AIDS em 1996)

## RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um processo escalonável de produção de grânulos gastrorresistentes compostos de microesferas de quitosana contendo didanosina (ddl) incorporada. O processo global foi composto de três etapas, cujas condições operacionais foram otimizadas buscando-se preservar a forma ativa do fármaco, sensível ao pH ácido, e obter um produto de liberação modificada, mucoadesivo e gastrorresistente. A primeira etapa foi a incorporação da ddl, feita através da técnica da gelificação ionotrópica, utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente de reticulação e hidróxido de magnésio ( $Mg(OH)_2$ ) para assegurar a estabilidade do fármaco. As condições operacionais foram otimizadas pelo método do planejamento estatístico e análise de superfícies de resposta para as variáveis estatisticamente importantes: concentrações iniciais de quitosana, TPP e ddl. O máximo carregamento de ddl nas microesferas, 1433 mg de ddl/g de quitosana, foi obtido com 2,00 % de quitosana e 10,00 % de TPP. As microesferas obtidas apresentaram diâmetro médio de 11,42  $\mu m$ , e a ddl incorporada foi liberada gradualmente em 2 h em suco entérico simulado. Na segunda etapa foram produzidos os grânulos contendo as microesferas, para os quais foram testados como excipientes: a própria quitosana, amido pré-gelificado e carboximetilcelulose. Os grânulos foram preparados por extrusão seguida de esferonização, e os mais promissores foram caracterizados quanto à mucoadesividade *in vitro* através da isoterma de adsorção da mucina e quanto à permeação *ex vivo* através do modelo de permeação pelo segmento intestinal invertido. Os resultados mostraram que os grânulos contendo 4,8 % de quitosana apresentaram maior afinidade pela mucina além de promover o aumento de 18 % na permeação da ddl pelo segmento duodenal comparado ao fármaco livre comercial. Os grânulos contendo as microesferas liberaram a ddl em 2 h, mais lentamente que os grânulos compostos pela mistura física de ddl e excipientes (10 min). Finalmente foi feito o revestimento entérico dos grânulos pela técnica da película, utilizando Eudragit® L30-D55 como polímero gastrorresistente. Por limitações de processo, o revestimento não produziu retenção total da ddl no meio ácido (77 %), porém em meio básico, os grânulos contendo as microesferas apresentaram liberação da ddl mais lenta que o medicamento gastrorresistente comercial. Esses resultados mostram a factibilidade da produção de grânulos de quitosana contendo microesferas incorporando fármaco sensível ao pH, em processo passível de escalonamento. Além disso, apresentam a ddl como um novo medicamento de liberação modificada para administração oral, com benefícios potenciais para a terapia da AIDS e conforto do paciente.

## ABSTRACT

In this work a scalable process was developed for the production of gastroresistant granules containing chitosan microspheres, loaded with the drug didanosine (ddl). The global process included three stages, and the operational conditions were optimized in order to maintain the active form of the drug didanosine, which is sensitive to acidic pH conditions, and to obtain a final product with modified release, mucoadhesive and gastroresistant properties. The first stage included the encapsulation of ddl with the use of the ionotropic gelation technique with sodium tripoliphosphate (TPP) as the crosslinking agent and magnesium hydroxide ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) to ensure the stability of ddl. The optimization was performed using Response Surface Methodology (RSM) with the important statistical variables: chitosan, TPP and ddl concentrations. The maximum ddl loading in microspheres of 1433 mg of ddl/g of chitosan, was obtained with 2.00% (w/v) chitosan and 10.00% TPP. The microspheres were observed to have an average diameter of 11.42  $\mu\text{m}$ , and ddl was gradually released during a 2 h period in a simulated enteric fluid. In the second stage, the granules with microspheres were produced with different excipients: chitosan, pre-gelified starch and carboxymethylcellulose. The granules were prepared by extrusion-spheronization and the most promising ones were characterized according to the *in vitro* granule mucoadhesiveness, determined through the adsorption isotherm of mucin, and the *ex vivo* granule absorption, determined using the everted gut sac technique. The results showed that the granules with 4.8 % (w/w) chitosan presented greater affinity for the mucin as well as promoting an increase of 18 % in the ddl absorption through the duodenal segment compared with commercial free drug. The granules containing the chitosan microspheres released ddl in a 2 h period, a longer release period compared to the granules composed of the mixture of the drug and excipients, where the drug was released in approximately 10 minutes. Finally the granules were coated by the film technique, using Eudragit<sup>®</sup> L30-D55 as the gastroresistant polymer. Due to the process limitations, the polymer coating did not retain the total amount of the drug in the simulated gastric fluid (77 %). However, in the simulated enteric fluid, the granules containing chitosan microspheres showed a slower release of ddl compared to the commercial gastroresistant granules. These results demonstrate that it is possible to produce granules with microspheres that encapsulate a drug sensitive to acidic pH conditions, in a process that is easily scaled up. The process also shows a new formulation of the drug ddl, with modified release kinetics for oral administration, with potential benefits for AIDS therapy, as well as providing more comfort to the patient.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xix
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	7
3.1. O VÍRUS HIV E SUA AÇÃO SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	7
3.2. FÁRMACOS ANTI-RETROVIRAIS.....	8
3.2.1. Inibidores Análogos de Nucleosídeos.....	10
3.2.2. Inibidores Não-Análogos Nucleosídeos.....	10
3.2.3. Inibidores de Protease.....	10
3.3. SISTEMAS DE MICRO E NANOENCAPSULAÇÃO.....	11
3.3.1. Principais Matrizes de Micro e Nanoencapsulação.....	14
3.3.2. Formas de Liberação do Fármaco.....	15
3.4. QUITINA E QUITOSANA.....	17
3.4.1. Propriedades da Quitina e da Quitosana.....	18
3.4.2. Técnicas de Micro e Nanoencapsulação Utilizando Quitosana.....	21
3.4.2.1. Gelificação Ionotrópica.....	21
3.4.2.2. Técnica da Coacervação/Precipitação.....	21
3.4.2.3. Técnica de Secagem por Atomização (Spray-Drying).....	22
3.4.2.4. Técnica da Emulsão.....	22
3.4.3. Fármacos Micro ou Nanoencapsulados em Partículas de Quitosana..	22
3.4.4. Reticulação de Partículas de Quitosana.....	23
3.5. MICRO E NANOENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-HIV.....	25
3.5.1. Didanosina (2',3'-Dideoxinosina).....	26

3.5.1.1. Absorção e Metabolismo .....	27
3.5.1.2. Farmacocinética .....	28
3.5.1.3. Quantificação da Didanosina .....	29
<b>INCORPORAÇÃO DA DIDANOSINA .....</b>	<b>31</b>
4.0. INTRODUÇÃO .....	31
4.1. ESTABILIDADE DA DIDANOSINA E INCORPORAÇÃO .....	32
4.1.1. Material .....	32
4.1.2. Equipamentos .....	32
4.1.3. Métodos .....	33
4.1.3.1. Análise da Didanosina .....	33
4.1.3.2. Preparação das Soluções de Quitosana .....	33
4.1.3.3. Produção das Partículas de Quitosana .....	34
4.1.3.4. Caracterização das Partículas .....	35
4.1.3.5. Estabilidade da Didanosina .....	36
4.1.3.6. Incorporação da Didanosina .....	36
4.1.3.6.1. Incorporação Durante a Formação das Partículas .....	36
4.1.3.6.2. Incorporação por Hidratação das Partículas Secas Pré- Formadas .....	37
4.1.4. Resultados e Discussão .....	38
4.1.4.1. Produção de Partículas de Quitosana .....	38
4.1.4.2. Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanhos .....	38
4.1.4.3. Morfologia das Partículas .....	48
4.1.5. Estabilidade da Didanosina em Solução .....	50
4.1.6. Incorporação da Didanosina em Partículas de Quitosana .....	51
4.1.6.1. Incorporação Durante a Formação das Partículas .....	51
4.1.6.2. Incorporação por Hidratação das Partículas Secas Pré-Formadas. .....	55
4.2. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS .....	57
4.2.1. Preparação das Microesferas .....	57
4.2.2. Eficiência de Incorporação .....	62
4.2.3. Carregamento de Didanosina .....	70
4.2.4. Liberação da Didanosina em Suco Entérico Simulado .....	78

4.2.4.1. Métodos .....	78
4.2.4.1.1. Obtenção do Suco Entérico Simulado sem Pancreatina.....	78
4.2.4.1.2. Liberação da Didanosina em Suco Entérico Simulado .....	78
4.2.4.2. Resultados e Discussão .....	79
4.2.5. Diâmetro Médio das Partículas .....	89
4.2.6. Grau de Intumescimento .....	95
4.2.6.1. Método.....	95
4.2.6.2. Resultados e Discussão .....	95
4.2.7. Incorporação da Didanosina nas Condições Otimizadas .....	103
<b>GRANULAÇÃO .....</b>	<b>105</b>
5.0. INTRODUÇÃO.....	105
5.1. GRANULAÇÃO.....	106
5.1.1. Conceito e Métodos .....	106
5.1.2. Excipientes.....	110
5.2. MATERIAL.....	111
5.3. MÉTODOS.....	112
5.3.1. Preparação dos Grânulos .....	112
5.3.2. Caracterização dos Grânulos .....	113
5.3.2.1. Parâmetros Geométricos.....	113
5.3.2.2. Liberação da Didanosina .....	115
5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	115
5.4.1. Efeito dos Excipientes na Produção dos Grânulos.....	115
5.4.2. Efeito dos Excipientes nos Parâmetros Geométricos.....	115
5.4.3. Liberação da Didanosina em Suco Entérico Simulado.....	118
5.4.4. Representação da Liberação da Didanosina Através de Modelo Difusivo .....	120
5.4.5. Análise da Superfície dos Grânulos .....	127
<b>MUCOADESÃO .....</b>	<b>134</b>
6.0. INTRODUÇÃO.....	134
6.1. BIOADESÃO E MUCOADESÃO .....	134
6.1.1. Mecanismos da Bioadesão .....	135
6.1.2. Mucoadesão e Biodisponibilidade .....	137

6.1.3. Métodos para Determinação da Mucoadesão .....	137
6.2. MATERIAL .....	139
6.3. MÉTODOS .....	139
6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	140
PERMEAÇÃO INTESTINAL .....	145
7.0. INTRODUÇÃO .....	145
7.1. TÉCNICA DO INTESTINO INVERTIDO .....	145
7.1.1. Ensaio com Sistemas de Liberação Modificada .....	146
7.2. MATERIAL .....	147
7.3. MÉTODOS .....	147
7.3.1. Preparação dos Segmentos Intestinais .....	147
7.3.2. Preparação do Meio de Incubação .....	149
7.3.3. Análise Estatística .....	149
7.3.4. Preparação das Formas Farmacêuticas .....	149
7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	150
7.4.1. Análise da Didanosina no Meio Interno do Saco Intestinal .....	150
7.4.2. Análise da Didanosina no Meio Externo do Saco Intestinal .....	153
REVESTIMENTO DOS GRÂNULOS .....	156
8.0. INTRODUÇÃO .....	156
8.1. PROCESSOS DE REVESTIMENTO .....	157
8.1.1. Polímeros de Revestimento .....	158
8.1.2. Ângulo de Contato e Revestimento .....	159
8.2. MATERIAL .....	160
8.3. MÉTODOS .....	160
8.3.1. Revestimento dos Grânulos .....	160
8.3.2. Determinação do Trabalho de Adesão .....	162
8.3.3. Liberação da Didanosina .....	163
8.3.4. Análises da Morfologia e Superfície dos Grânulos Revestidos .....	164
8.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	164
CONCLUSÕES .....	171
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	178
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	179

ANEXO 1 .....	196
ANEXO 2 .....	205

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do HIV segundo Charles Dauguet (MONTAGNIER, 1995).....	7
Figura 2. Ciclo de replicação do HIV e locais de ação de fármacos anti-HIV (NETO <i>et al.</i> , 1996). .....	9
Figura 3. Comparação entre os níveis plasmáticos de fármaco em relação ao tempo, quando administrados nas formas livre (liberação não controlada) ou de liberação controlada (adaptação de KUMAR, 2000 <sup>A</sup> ).....	12
Figura 4. Representação de nano e micropartículas: (a) esferas, (b) cápsulas. ...	14
Figura 5. Formas de liberação de fármacos (adaptação de DUMITRIU & DUMITRIU, 1993). .....	16
Figura 6. Estrutura da quitina, quitosana e celulose (adaptação do site <a href="http://user.chol.com/~chitin/cellulose.gif">http://user.chol.com/~chitin/cellulose.gif</a> , acessado em 10/02/2006).....	18
Figura 7. Reticulação da quitosana com o tripolifosfato de sódio.....	25
Figura 8. Estrutura química da didanosina.....	27
Figura 9. Influência do hidróxido de sódio (NaOH) no diâmetro médio e distribuição de tamanhos das partículas: (a) diâmetro médio; (b) distribuição de tamanhos para 0,10 % (m/v) de NaOH; (c) distribuição de tamanhos para 1,00 % (m/v) de NaOH. ....	40
Figura 10. Influência do tripolifosfato de sódio (TPP) no diâmetro médio das partículas: (a) diâmetro médio; (b) distribuição de tamanhos para 0,10 % (m/v) de TPP; (c) distribuição de tamanhos para 1,00 % (m/v) de TPP.....	41
Figura 11. Variação do índice de polidispersidade em função da massa de tripolifosfato de sódio (TPP). .....	43
Figura 12. Variação do pH durante a formação das partículas: (a) tripolifosfato de sódio, (b) hidróxido de sódio. ....	45
Figura 13. Influência da velocidade de agitação mecânica no diâmetro médio das partículas.....	46
Figura 14. Comparação entre os diâmetros médios das partículas utilizando diferentes razões mássicas de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP) correspondente à região 3 de precipitação. ....	47

Figura 15. Comparação entre os diâmetros médios das partículas para duas formas de adição de uma mesma quantidade de tripolifosfato de sódio (TPP). .....	48
Figura 16. Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura: (a) (aumentada 100 vezes) (b) (aumentada 3.640 vezes). partículas de quitosana obtidas com 1,00 % (m/v) de TPP.....	49
Figura 17. Influência do solvente na degradação da didanosina em função do tempo. ....	50
Figura 18. Cromatograma tridimensional da didanosina e hipoxantina em solução de ácido acético ( $0,875 \text{ mol dm}^{-3}$ ) após 90 min.....	51
Figura 19. Eficiência de incorporação da didanosina durante a formação de micropartículas de quitosana em função da sua forma de adição. ....	55
Figura 20. Gráfico de Pareto para a eficiência de incorporação, com 95 % de intervalo de confiança, obtido para o planejamento fatorial. ....	66
Figura 21. Valores preditos <i>versus</i> valores observados experimentalmente para a eficiência de incorporação.....	67
Figura 22. Superfície de resposta para a eficiência de incorporação em função das concentrações de quitosana e didanosina (ddl).....	68
Figura 23. Superfície de resposta para a eficiência de incorporação em função das concentrações de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP). ....	69
Figura 24. Superfície de resposta para a eficiência de incorporação em função das concentrações de tripolifosfato de sódio (TPP) e didanosina (ddl). ....	69
Figura 25. Gráfico de Pareto para o carregamento, com 95 % de intervalo de confiança, obtido para o planejamento fatorial.....	73
Figura 26. Valores preditos <i>versus</i> valores observados experimentalmente para o carregamento. ....	74
Figura 27. Superfície de resposta do carregamento em função das concentrações de quitosana e didanosina (ddl). ....	75
Figura 28. Superfície de resposta do carregamento em função das concentrações de quitosana e tripolisfosfato de sódio (TPP).....	76
Figura 29. Superfície de resposta do carregamento em função das concentrações de didanosina (ddl) e tripolisfosfato de sódio (TPP).....	77

Figura 30. Gráfico de Pareto para o coeficiente de permeabilidade, com 95 % de intervalo de confiança, obtido para o planejamento fatorial. ....	82
Figura 31. Valores previstos pelo modelo <i>versus</i> valores observados experimentalmente para o coeficiente de permeabilidade. ....	84
Figura 32. Superfície de resposta do coeficiente de permeabilidade em função das concentrações de quitosana e didanosina (ddl). ....	85
Figura 33. Superfície de resposta do coeficiente de permeabilidade em função das concentrações de quitosana e tripolisfosfato de sódio (TPP). ....	87
Figura 34. Superfície de resposta do coeficiente de permeabilidade em função das concentrações de tripolisfosfato de sódio (TPP) e didanosina (ddl). ....	87
Figura 35. Liberação da didanosina incorporada em partículas de quitosana: experimento 5 (25,00 mg de didanosina/cm <sup>3</sup> - 2,00 % (m/v) de quitosana - 10,00 % de tripolisfosfato de sódio) e experimento 7 (25,00 mg de didanosina/cm <sup>3</sup> - 4,00 % (m/v) de quitosana - 10,00 % de tripolisfosfato de sódio). ....	88
Figura 36. Histograma da distribuição de diâmetros das partículas obtido a partir da imagem de microscopia ótica, correspondente ao experimento 5 (25,00 mg de didanosina/cm <sup>3</sup> / 2,00 % (m/v) de quitosana / 10,00 % de tripolisfosfato de sódio). ....	90
Figura 37. Micrografia das partículas obtidas através de microscopia ótica (aumentada 100 vezes): (a) experimento 5: 25,00 mg de didanosina/cm <sup>3</sup> - 2,00 % (m/v) de quitosana - 10,00 % de tripolisfosfato de sódio; (b) experimento 7: 25,00 mg de didanosina/cm <sup>3</sup> - 4,00 % (m/v) de quitosana - 10,00 % de tripolisfosfato de sódio. ....	91
Figura 38. Variação do diâmetro das partículas em função da concentração de tripolisfosfato de sódio (TPP) para diferentes concentrações de quitosana e didanosina. ....	92
Figura 39. Variação do diâmetro das partículas em função da concentração de quitosana para diferentes concentrações de tripolisfosfato de sódio (TPP) e didanosina (ddl). ....	93
Figura 40. Variação do diâmetro das partículas em função da concentração de didanosina para as diferentes concentrações de quitosana e tripolisfosfato de sódio (TPP). ....	94

Figura 41. Gráfico de Pareto, com intervalo de confiança de 95 %, para o modelo quadrático do grau de intumescimento obtido do planejamento composto central. ....	98
Figura 42. Valores previstos pelo modelo <i>versus</i> valores observados experimentalmente para o grau de intumescimento. ....	99
Figura 43. Superfície de resposta para o grau de intumescimento em função das concentrações da quitosana e didanosina (ddl). ....	100
Figura 44. Superfície de resposta para o grau de intumescimento em função das concentrações de quitosana e tripolisfosfato de sódio (TPP). ....	101
Figura 45. Superfície de resposta para o grau de intumescimento em função das concentrações de tripolisfosfato de sódio (TPP) e didanosina (ddl). ....	102
Figura 46. Representação esquemática de extrusoras alimentadas por rosca sem fim e pela gravidade (adaptação de SUMMERS & AULTON, 2001). ....	108
Figura 47. Representação esquemática de uma extrusora alimentada por pistão (adaptação de VERVAET <i>et al.</i> , 1995). ....	108
Figura 48. Configuração clássica de um esferonizador mostrando as características de movimento e formação das partículas durante a operação (adaptação de SUMMERS & AULTON, 2001). ....	109
Figura 49. Representação das transições de forma das partículas durante a esferonização: partículas cilíndricas (a), cilíndricas com extremidades arredondadas (b), halteres (c), elipsóides (d) e esferas (e) (adaptação de SUMMERS & AULTON, 2001). ....	110
Figura 50. Figura estrutura química da carboximetilcelulose. ....	112
Figura 51. Variações dos parâmetros geométricos em função da concentração dos excipientes quitosana e amido comercial. (a) e (b) Alongamento-AL; (c) e (d) Esferocidade-Esf; (e) e (f) Diâmetro de Feret-DF. ....	117
Figura 52. Perfil de liberação de didanosina contida nos grânulos sem excipientes. ....	118
Figura 53. Perfis de liberação de didanosina contida nos grânulos para diferentes concentrações de excipientes: (a) 2,4 % (m/m); (b) 4,8 % (m/m) e (c) 9,1 % (m/m). ....	119
Figura 54. Perfil de liberação da didanosina contida em grânulos cilíndricos da mistura física. ....	120

Figura 55. Perfis de liberação da didanosina obtidos através de ajuste de modelo difusivo aos dados experimentais para grânulos contendo 2,4 % (m/m) de excipiente: (a) carboximetilcelulose; (b) amido pré-gelificado e (c) quitosana. .....	121
Figura 56. Perfis de liberação da didanosina obtidos através de ajuste de modelo difusivo aos dados experimentais para grânulos contendo 4,8 % (m/m) de excipiente: (a) carboximetilcelulose; (b) amido pré-gelificado e (c) quitosana. .....	122
Figura 57. Perfis de liberação da didanosina obtidos através de ajuste de modelo difusivo aos dados experimentais para grânulos contendo 9,1 % (m/m) de excipiente: (a) carboximetilcelulose; (b) amido pré-gelificado e (c) quitosana. .....	123
Figura 58. Perfis de liberação da didanosina contida nos grânulos esféricos sem qualquer excipiente e o modelo difusivo ajustado aos dados experimentais. .....	124
Figura 59. Perfil de liberação da didanosina obtidos através de ajuste de modelo difusivo aos dados experimentais para grânulos cilíndricos da mistura física. .....	124
Figura 60. Variação da constante $k$ do modelo difusivo em função da concentração de excipientes nos grânulos.....	125
Figura 61. Micrografia dos grânulos cilíndricos contendo 4,8 % de carboximetilcelulose.....	127
Figura 62. Micrografia de um grânulo esférico contendo 4,8 % de amido pré-gelificado.....	128
Figura 63. Micrografia de um grânulo esférico contendo 4,8 % de quitosana.....	128
Figura 64. Micrografia de um grânulo esférico sem excipiente.....	129
Figura 65. Micrografia da estrutura interna do grânulo de Videx <sup>®</sup> EC (aumentada 2.000 vezes).....	130
Figura 66. Micrografia da estrutura interna do grânulo não recoberto (aumentada 2.000 vezes).....	130
Figura 67. Micrografia da superfície dos grânulos contendo microesferas de quitosana, didanosina e 4,8 % de amido pré-gelificado antes da liberação da ddl em suco entérico simulado com pancreatina.....	131

Figura 68. Micrografia da superfície dos grânulos contendo microesferas de quitosana, didanosina e 4,8 % de amido pré-gelificado após a liberação da ddi em suco entérico simulado com pancreatina. ....	132
Figura 69. Micrografia da superfície dos grânulos contendo microesferas de quitosana, didanosina e 4,8 % quitosana antes da liberação da ddi em suco entérico simulado com pancreatina.....	132
Figura 70. Micrografia da superfície dos grânulos contendo microesferas de quitosana, didanosina e 4,8 % de quitosana após a liberação da ddi em suco entérico simulado com pancreatina.....	133
Figura 71. Teorias da mucoadesão (círculos brancos) e propriedades materiais do mucoadesivos (círculos hachurados) as áreas sobrepostas entre os círculos das propriedades dos materiais e as teorias da mucoadesão indicam como e qual a extensão elas estão relacionadas (adaptação de DODOU <i>et al.</i> , 2005). ....	136
Figura 72. Isotermas de adsorção da mucina em: (a) grânulos esféricos com amido pré-gelificado, (b) grânulos esféricos com quitosana, (c) grânulos esféricos sem excipientes, (d) grânulos cilíndricos com CMC, (e) microesferas de quitosana liofilizadas. ....	141
Figura 73. Estrutura química do ácido siálico.....	144
Figura 74. Montagem experimental usada nos ensaios com intestino invertido incubado em tampão TC199 oxigenado, cada saco é removido no tempo pré-determinado e o fármaco é analisado no espaço serosal e no meio externo. ....	148
Figura 75. Perfis de permeação da didanosina através da membrana duodenal: comparação entre as formas farmacêuticas (diferença significativa em relação ao comprimido triturado de didanosina: * → $p < 0,05$ ; ** → $p < 0,10$ ; *** → $p < 0,01$ ). ....	152
Figura 76. Perfis de permeação da didanosina através da membrana do jejuno: comparação entre as formas farmacêuticas (diferença significativa em relação ao comprimido triturado de didanosina: * → $p < 0,05$ ). ....	152

Figura 77. Perfis de permeação da didanosina através da membrana do íleo: comparação entre as formas farmacêuticas (não há diferenças significativas entre as curvas). .....	153
Figura 78. Perfis de liberação da didanosina no meio TC199 (com glicose) contendo a porção do duodeno: comparação das formas farmacêuticas (diferenças significativas em relação ao comprimido triturado de didanosina: * → p < 0,05; ** → p < 0,01; *** → p < 0,10). .....	154
Figura 79. Perfis de liberação da didanosina no meio TC199 (com glicose) contendo a porção do jejuno: comparação das formas farmacêuticas (diferença significativa em relação ao comprimido triturado de didanosina: * → p < 0,05; ** → p < 0,01). .....	155
Figura 80. Perfis de liberação da didanosina no meio TC199 (com glicose) contendo a porção do íleo: comparação das formas farmacêuticas (diferença significativa em relação ao comprimido triturado de didanosina: * → p < 0,05; ** → p < 0,01). .....	155
Figura 81. Estrutura molecular do monômero do Eudragit® L30-D55. ....	158
Figura 82. Ângulo de contato do sistema sólido-líquido-gás (adaptação de DONIDA, 2004) .....	159
Figura 83. Sistema artesanal para o revestimento dos grânulos. ....	161
Figura 84. Perfis de liberação da didanosina em suco gástrico simulado e suco entérico simulado. ....	165
Figura 85. Formação das estruturas pontiagudas sobre a superfície dos grânulos. ....	166
Figura 86. Micrografias dos grânulos recobertos: (a) 50 % de crescimento (aumentada 120 vezes); (b) 50 % de crescimento (aumentada 110 vezes). ....	166
Figura 87. Micrografias dos grânulos recobertos: (a) 125 % de crescimento (aumentada 100 vezes); (b) 125 % de crescimento (aumentada 120 vezes). ....	167
Figura 88. Micrografias dos grânulos de Videx® EC: (a) aumentada 50 vezes; (b) superfície aumentada 2.000 vezes. ....	167
Figura 89. Micrografia da superfície dos grânulos recobertos: (a) 50 % de crescimento; (b) 125 % de crescimento (aumentadas 2.000 vezes). .....	168

Figura 90. Micrografia da fratura de um grânulo com 125 % de revestimento (aumentada 200 vezes).....	169
Figura 91. Liberação da didanosina em suco entérico simulado (pH = 7,40).....	170

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário global da epidemia da AIDS no mundo em novembro de 2005 de acordo com a Organização Mundial da Saúde. ....	1
Tabela 2. Vantagens e desvantagens da liberação controlada de fármacos (adaptação de DUMITRIU & DUMITRIU, 1993).....	13
Tabela 3. Principais materiais utilizados em matrizes de encapsulação (adaptação de SHAHIDI & HAN, 1993).....	15
Tabela 4. Propriedades da quitosana utilizada em alguns trabalhos da literatura e seus respectivos fabricantes. ....	20
Tabela 5. Alguns fármacos micro ou nanoencapsulados em partículas de quitosana.....	23
Tabela 6. Agentes de reticulação de quitosana e seus respectivos métodos de preparação de partículas.....	24
Tabela 7. Trabalhos encontrados na literatura sobre micro ou nanoencapsulação de fármacos anti-HIV.....	26
Tabela 8. Dados de exatidão para determinação da didanosina (cada valor representa a média de seis replicatas) (adaptação de SÁNCHEZ-LAFUENTE <i>et al.</i> , 2002). ....	30
Tabela 9. Precisão intra e inter-dia para a determinação da didanosina (adaptação de SÁNCHEZ-LAFUENTE <i>et al.</i> , 2002). ....	30
Tabela 10. Experimentos realizados para verificar o efeito do excesso de tripolisfosfato de sódio (TPP) no diâmetro das partículas. ....	35
Tabela 11. Soluções utilizadas no estudo da estabilidade da didanosina.....	36
Tabela 12. Condições experimentais dos experimentos de incorporação. ....	37
Tabela 13. Eficiência de incorporação e massa incorporada para diferentes concentrações de quitosana e didanosina (ddl).....	52
Tabela 14. Porcentagem mássica final de hipoxantina, quantidade de quitosana para incorporar 200 mg de didanosina (ddl) e relação mássica entre didanosina e quitosana. ....	54
Tabela 15. Eficiência de incorporação da didanosina (ddl) em micropartículas de quitosana pré-formadas. ....	56

Tabela 16. Relação das concentrações de quitosana e ácido acético. ....	58
Tabela 17. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial.....	60
Tabela 18. Experimentos propostos pelo planejamento fatorial.....	60
Tabela 19. Eficiência de incorporação para os experimentos do planejamento fatorial. ....	62
Tabela 20. Eficiência de encapsulação de diversos bioativos em microesferas preparadas pelo método de gelificação ionotrópica com TPP. ....	63
Tabela 21. Análise de variância e teste F para eficiência de incorporação, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada = $r^2 = 95,69$ %).....	64
Tabela 22. Estimativa dos efeitos para a eficiência de incorporação, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada = $r^2 = 95,69$ %). ....	65
Tabela 23. Carregamento de didanosina (ddl) nas partículas de quitosana para os experimentos do planejamento de experimento.....	70
Tabela 24. Análise de variância e teste F para o carregamento, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada = $r^2 = 98,42$ %).....	71
Tabela 25. Estimativa dos efeitos para o modelo do carregamento de didanosina, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada = $r^2 = 98,42$ %). ....	72
Tabela 26. Valores do coeficiente de permeabilidade, $P$ , para os experimentos do planejamento fatorial usado para a incorporação da didanosina em micropartículas e quitosana. ....	80
Tabela 27. Análise de variância e teste F para o coeficiente de permeabilidade, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada = $r^2 = 88,75$ %). ....	81
Tabela 28. Estimativa dos efeitos para a permeabilidade, com intervalo de confiança de 95 %, obtidos pelo planejamento de experimentos (variância explicada = $r^2 = 88,75$ %).....	82
Tabela 29. Diâmetro médio das partículas obtido a partir das imagens de microscopia ótica. ....	89

Tabela 30. Resultados do grau de intumescimento das partículas para o planejamento de experimentos. ....	96
Tabela 31. Análise de variância e teste F para o grau de intumescimento, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada = $r^2 = 86,75$ %). ....	97
Tabela 32. Estimativa dos efeitos para o grau de intumescimento como resposta para um modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada = $r^2 = 86,75$ %). ....	98
Tabela 33. Efeitos da variação da concentração de tripolisfosfato de sódio (TPP) na eficiência de incorporação, carregamento de didanosina (ddl) e grau de intumescimento (Concentração de didanosina igual a $39,00 \text{ mg cm}^{-3}$ ). ....	103
Tabela 34. Valores de $k$ (razão entre o coeficiente de difusão e o quadrado do raio das partículas, $D/R^2$ ) ajustado pelo modelo para as diferentes concentrações de tripolisfosfato de sódio (Concentração de didanosina igual a $39,00 \text{ mg cm}^{-3}$ ). ....	104
Tabela 35. Parâmetros geométricos de grânulos compostos de microesferas de quitosana e os excipientes amido e quitosana. Os grânulos sem excipientes e do Videx <sup>®</sup> EC foram caracterizados como controles. ....	116
Tabela 36. Valores da constante $k$ ( $\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) obtidos em várias concentrações de excipientes. ....	126
Tabela 37. Parâmetros do modelo de Langmuir e coeficientes estatísticos para a adsorção da mucina em microesferas e grânulos compostos de microesferas de quitosana. ....	143
Tabela 38. Composição da suspensão de revestimento (DONIDA, 2000). ....	162

## LISTA DE ABREVIações

3TC	Lamivudina
A	Área Superficial das Partículas
AL	Alongamento
Ar	Área da Partícula na Fotografia Digital
AUC <sub>∞</sub>	Área sob a curva das concentrações plasmáticas de 0 a infinito
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AZT	Zidovudina
C*	Concentração de Solute em Equilíbrio na Fase Líquida no Equilíbrio (mg de mucina/cm <sup>3</sup> de solução)
C <sub>MAX</sub>	Concentração Plasmática Máxima
C <sub>EXCIPIENTE</sub>	Concentração de Excipiente
CMC	Carboximetilcelulose
ddC	Zalcitabina
d4T	Estavudina
ddl	Didanosina ou Concentração de Didanosina
DF	Diâmetro de Feret
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EC	<i>Enteric-Coated</i> ou Revestimento Entérico
Esf	Esfericidade
F <sub>CALC</sub>	valor de <b>F</b> calculado
F <sub>TAB</sub>	valor de <b>F</b> tabelado
F <sub>p-1,n-p</sub>	valor de <b>F</b> para graus de liberdade da regressão (p-1) e dos resíduos (n-p)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> ou Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose

J	Fluxo
k	Constante do Modelo de Difusão
$K_D$	Constante de Langmuir (mg de Mucina/cm <sup>3</sup> de Solução)
$M_{inicial}$	Massa Inicial de Didanosina
$M_{final}$	Massa de Didanosina no Sobrenadante
$M(T)$	Massa de Fármaco Liberada em um Determinado Tempo T
$M_{\infty}$	Massa Total Liberada.
$M_w$	Massa Molar do Polímero.
$M_{EXCIPIENTE}$	Massa de Excipiente Adicionada,
$M_{ÁGUA}$	Massa de Água Absorvida Pelas Partículas Secas
$M_{FILME}$	Massa do Filme Formado Sobre os Grânulos
$M_{Grânulos\ Inicial}$	Massa Inicial das Partículas.
$M_{PARTÍCULAS}$	Massa de Partículas Secas.
$M_{PARTÍCULAS\ SECAS}$	Massa das Microesferas Secas.
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Média Quadrática
n-p	Grau de Liberdade dos Resíduos
OMS	Organização Mundial da Saúde
QUIT	Concentração de Quitosana
P	Coeficiente de Permeabilidade das Microestruturas
PEG	Polietilenoglicol
pKa	Potencial de Ionização
Pm	Perímetro da Partícula na Fotografia Digital
PVA	Álcool Polivinílico
p-1	Grau de Liberdade da Regressão
pH	Potencial Hidrogeniônico
q*	Concentração de Solute em Equilíbrio na Fase Sólida (mg de Mucina/mg de Partículas)
$q_{MAX}$	Quantidade Máxima de Solute Adsorvido pelas Partículas (mg de Mucina/mg de Partículas)
R	Raio das Partículas
RES	Sistema Reticuloendotelial
RNA	Ácido Ribonucléico

rpm	Rotações por Minuto
SES	Suco Entérico Simulado
SGS	Suco Gástrico Simulado
SS	Soma Quadrática
$t_{1/2}$	Tempo de Meia-Vida do Fármaco
$t_{max}$	Tempo Correspondente à Concentração Plasmática Máxima
TPP	Tripolifosfato de Sódio ou Concentração de Tripolifosfato de Sódio
USFDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultra-Violeta
V	Volume das Partículas
$W_{AD}$	Trabalho de Adesão

#### Letras Gregas

$\Delta C$	Diferença de Concentração entre as Soluções Interna e Externa
$\eta$	Viscosidade Intrínseca
$\theta$	Ângulo de Contato
$\sigma$	Tensão Superficial

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida ou AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) é uma doença crônica causada pelo vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) e caracterizada pela perda ou diminuição acentuada da capacidade do sistema imunológico de defender o organismo. De acordo com o Relatório “*Aids Epidemic Update*” (novembro de 2005) da Organização Mundial da Saúde (OMS), existem cerca de 40,3 milhões de pessoas vivendo com o HIV no mundo, sendo que 4,9 milhões foram infectadas no ano de 2005 e 3,1 milhões de pessoas morreram em decorrência da AIDS neste mesmo ano. Na América Latina existem aproximadamente 1,8 milhões de pessoas infectadas pelo HIV e o Brasil ocupa o primeiro lugar com cerca de 660.000 infectados. A Tabela 1 mostra um sumário global da epidemia.

**TABELA 1.** Sumário global da epidemia da AIDS no mundo em novembro de 2005 de acordo com a Organização Mundial da Saúde.

Número de pessoas vivendo com HIV	Total	40,3 milhões	36,7-45,3 milhões
	Adultos	38,0 milhões	34,5-42,6 milhões
	Crianças (até 15 anos)	2,3 milhões	2,1-2,8 milhões
Novos casos de infecção com HIV em 2005	Total	4,9 milhões	4,3-6,6 milhões
	Adultos	4,2 milhões	3,6-5,8 milhões
	Crianças (até 15 anos)	700.000	630.000-820.000
Mortes ocorridas em 2005 devido à AIDS	Total	3,1 milhões	2,8-3,6 milhões
	Adultos	2,6 milhões	2,3-2,9 milhões
	Crianças (até 15 anos)	570.000	510.000-670.000

O crescimento da epidemia tem merecido atenção da comunidade internacional no sentido de melhorar as condições de vida dos pacientes infectados pelo HIV. No Brasil, o Ministério da Saúde tem atuado como referência internacional no tratamento dos pacientes. Estima-se que 170.000 brasileiros estão recebendo gratuitamente os fármacos anti-retrovirais através do sistema público de saúde. No entanto, o Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS despende grande parte do seu orçamento na importação de vários anti-retrovirais.

A didanosina (ddl) é um importante anti-retroviral usado no tratamento da AIDS e atualmente é produzida pela indústria brasileira. Na sua forma convencional é administrada como comprimidos mastigáveis tamponados para prevenir a desativação quando exposta ao pH ácido do estômago. O uso do tampão provoca alguns efeitos colaterais, como diarreia, além de aumentar expressivamente o tamanho do comprimido. Para contornar estas desvantagens, a indústria farmacêutica americana lançou em 2001 a ddl formulada em grânulos gastrorresistentes (Videx<sup>®</sup> EC). Devido ao custo elevado, o Ministério da Saúde tem disponibilizado de forma racional esta nova formulação, priorizando a importação de outros anti-retrovirais não produzidos no Brasil. Apenas pacientes com maior tempo de tratamento, que já apresentaram algumas falhas terapêuticas e tomam diariamente vários anti-retrovirais (4 ou 5 diferentes), têm acesso ao Videx<sup>®</sup> EC, visando a melhor adesão ao tratamento. Neste sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologia nacional para a produção de grânulos gastrorresistentes de ddl com custo acessível ao governo brasileiro.

A adesão do paciente soropositivo à terapia anti-retroviral é uma constante preocupação dos médicos infectologistas, uma vez que alguns pacientes oferecem resistência psicológica ao tratamento. Esta aversão ao tratamento pode desencadear reações adversas que se somam aos efeitos colaterais de alguns destes fármacos levando-o à interrupção do tratamento. Atualmente, a terapia da AIDS é realizada através da utilização de dois até cinco fármacos anti-retrovirais, dependendo do estado clínico do paciente. Embora a combinação possibilite um sinergismo entre os fármacos, potencializando a ação individual de cada um, essa terapia obriga o paciente à ingestão diária de grande número de comprimidos. Tal

fato dificulta a adesão do paciente à terapia comprometendo o tratamento da doença (DELFRAISSY, 2002).

A microencapsulação de fármacos é uma técnica que vem sendo aplicada desde a década de 80 para proteger compostos sensíveis quando expostos a ambientes agressivos, reduzir os seus efeitos colaterais através da liberação controlada, promover o direcionamento específico do fármaco para determinados órgãos, produzir maior eficiência de ação *in vivo*, reduzindo assim o número de doses.

Estas características representam vantagens em relação à administração do fármaco livre, e se tornam extremamente importantes para o tratamento de pacientes com HIV. As reduções do número de doses diárias e dos efeitos colaterais beneficiam a adesão dos pacientes à terapia, proporcionando-lhes também uma melhor qualidade de vida.

A quitosana é um polímero natural biocompatível, que possui propriedades mucoadesivas e capacidade de formar microesferas encapsulando fármacos e produzindo sua proteção e liberação gradual. Ela é obtida a partir da desacetilação da quitina presente em exoesqueletos de crustáceos e insetos, que é considerada o segundo biopolímero mais abundante na Terra. A indústria de processamento de crustáceos produz anualmente toneladas de resíduos sólidos de degradação lenta que são constituídos basicamente de quitina. A produção de quitosana a partir de quitina de crustáceos é uma forma relativamente fácil de aproveitamento destes resíduos e agregação de valor. Um quilograma de quitosana pode custar de 5 dólares (a quitosana mais bruta) a 200 dólares (a quitosana purificada de grau farmacêutico).

Nesse trabalho, foram projetados grânulos gastrorresistentes compostos de microesferas de quitosana incorporando o fármaco anti-retroviral ddl. Essa nova formulação visa contornar o problema de tamanho do comprimido mastigável convencional (aproximadamente 850 mg e 1,3 mm de diâmetro) reduzir a frequência de doses através da maior eficiência de ação produzida pela mucoadesividade da quitosana e liberação controlada da ddl contida nas microesferas. O processo de produção foi estudado em cada uma das etapas, adequando e/ou otimizando condições operacionais de modo a preservar a forma ativa do fármaco, encapsular a dose diária de ddl em microesferas maximizando a

relação mássica fármaco/quitosana, promover a liberação modificada da ddl e obter grânulos mucoadesivos e gastrorresistentes. Esses grânulos poderão representar uma alternativa promissora mais eficaz, não somente em relação à formulação da ddl distribuída atualmente pelo Ministério da Saúde (comprimidos que contêm o fármaco livre em meio tamponado), mas também em relação ao Videx<sup>®</sup> EC, medicamento mais moderno e importado, composto de grânulos gastrorresistentes de ddl.

Os capítulos subseqüentes foram organizados de modo a descreverem os vários aspectos dos estudos realizados para cada uma das etapas do processo.

## CAPÍTULO 2

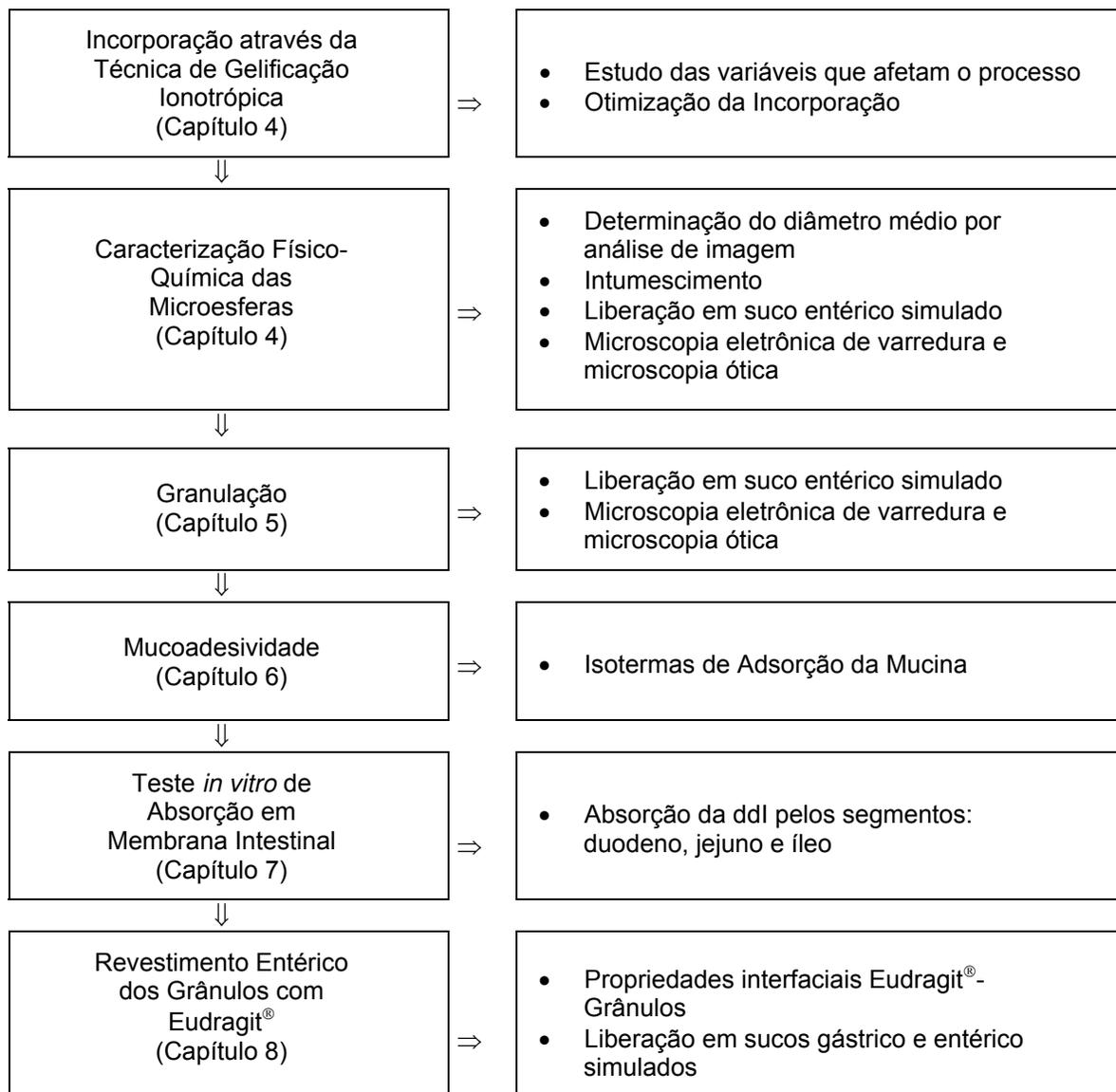
### OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um processo escalonável de produção de grânulos gastrorresistentes de liberação modificada, compostos de microesferas de quitosana incorporando o fármaco didanosina (ddl), para aplicação como um novo medicamento no tratamento da AIDS.

Para atingir esse objetivo, a pesquisa foi desenvolvida em três etapas: a primeira consistiu na incorporação da ddl em microesferas de quitosana pela técnica de gelificação ionotrópica. A incorporação de um fármaco sensível em pH ácido, como é o caso da ddl, representou um dos principais problemas no desenvolvimento deste trabalho, uma vez que a solubilização da quitosana é realizada em meio ácido. O planejamento estatístico de experimentos e análise de superfícies de resposta permitiram a identificação das variáveis significativas do processo, e otimização dos seus níveis em relação à eficiência de incorporação, grau de intumescimento, permeabilidade da ddl e carregamento da partícula (razão mássica ddl/quitosana). A segunda etapa constituiu a inovação tecnológica desenvolvida neste trabalho com a produção de grânulos contendo as microesferas de quitosana preparadas na primeira etapa. Esses grânulos foram produzidos por extrusão-esferonização, tendo sido testados alguns excipientes em várias concentrações. Os grânulos obtidos foram caracterizados com relação à liberação em suco entérico simulado e parâmetros geométricos por análise de imagem digital. Alguns grânulos foram selecionados para o estudo da sua mucoadesividade *in vitro* através da determinação de isotermas de adsorção da mucina. Os grânulos mais mucoadesivos foram submetidos à permeação da ddl pelo segmento intestinal através da técnica do intestino invertido e comparados à formulação comercial de distribuição gratuita usada como controle. Finalmente, os grânulos que apresentaram melhor permeação intestinal foram revestidos com o

polímero gastrorresistente Eudragit® L30-D55, e caracterizados quanto à liberação da ddl nos sucos gástrico e entérico simulados.

O diagrama abaixo resume a abordagem do trabalho, os parâmetros estudados e as propriedades do produto caracterizadas em cada etapa, localizando o capítulo no qual são descritos.

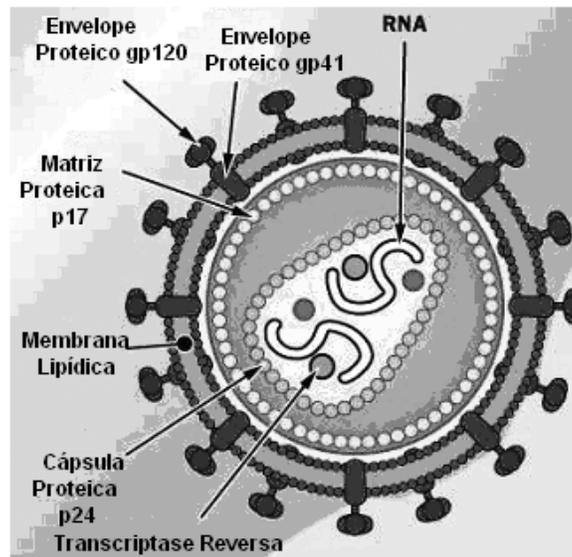


## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

#### 3.1. O VÍRUS HIV E SUA AÇÃO SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO

Os vírus não são exatamente seres vivos porque só existem no interior das células de que são parasitos. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV ou *Human Immunodeficiency Virus*) apresenta a forma de pequenas esferas que possuem cerca de 80 saliências arredondadas em forma de patera. Cada patera possui várias moléculas grandes como a gp120 que tem uma altíssima afinidade pelos receptores específicos dos linfócitos T CD4. Depois que o vírus se prende à célula, as moléculas de gp120 associadas às proteínas transmembranares menores chamadas gp41, permitem a fusão da capa do vírus com a membrana da célula, e assim a internalização dos constituintes internos do vírus. A Figura 1 mostra a estrutura do HIV segundo Charles Dauguet.



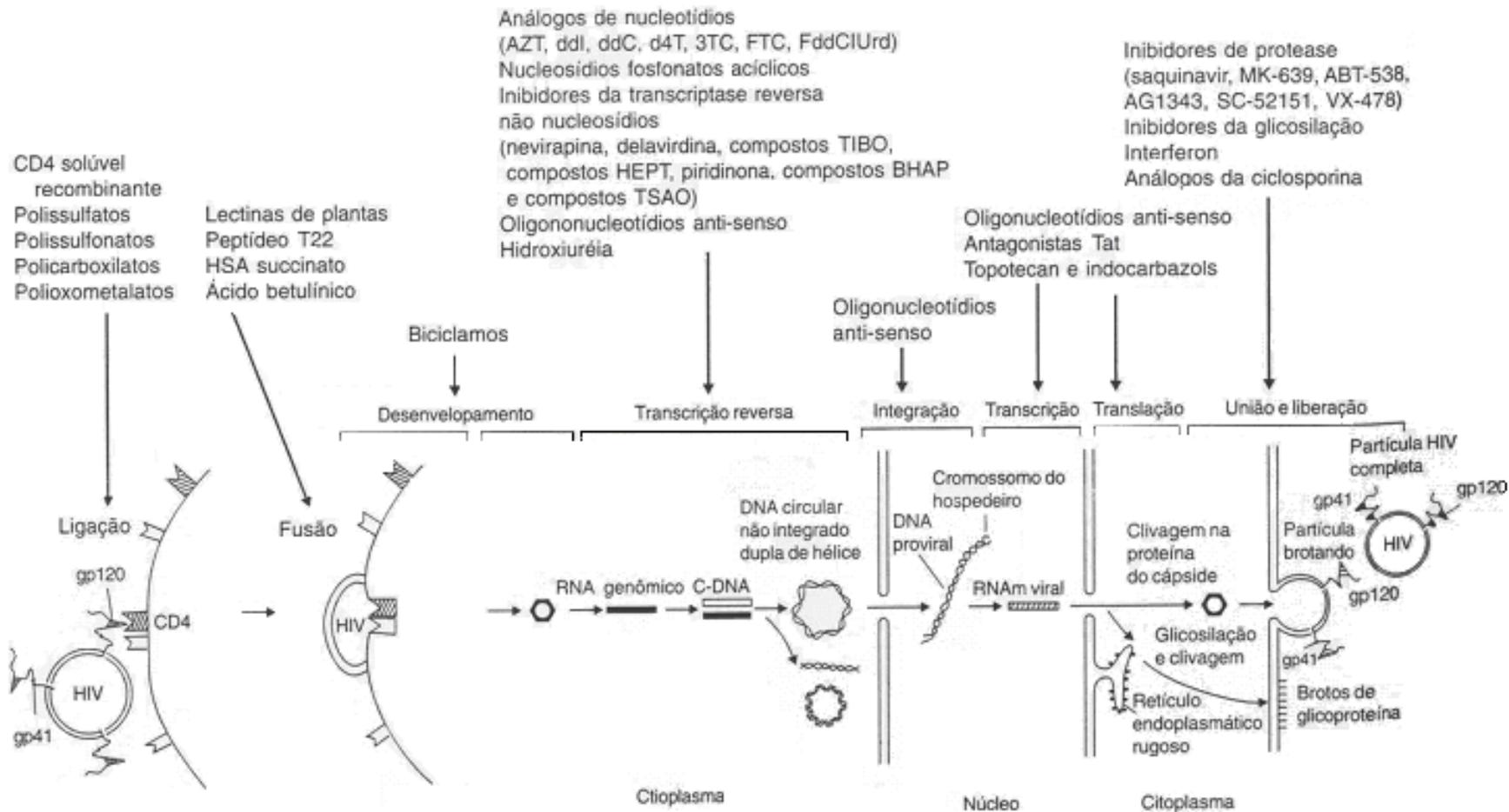
**FIGURA 1.** Estrutura do HIV segundo Charles Dauguet (MONTAGNIER, 1995)

De acordo com MONTAGNIER (1995), o ciclo de vida do vírus, ou seja, a sua replicação, se efetua em três etapas:

- 1) As moléculas gp120/gp110 da capa do vírus reconhecem as moléculas CD4, receptoras, da superfície da célula a infectar, as membranas se fundem e o vírus penetra na célula.
- 2) O vírus libera sua molécula de RNA no interior da célula e sua enzima transcriptase reversa se encarrega de transformar este RNA em DNA viral que é transportado para o núcleo da célula hospedeira. No núcleo, a enzima integrase se encarrega da integração do DNA viral no DNA celular dos cromossomos. Se o linfócito estiver numa fase de ativação favorável, o vírus não leva mais de algumas horas para fazer tudo isto. Na maioria dos casos, para se integrar no material genético de uma célula, os retrovírus necessitam que a célula esteja ativada e se multiplicando intensamente. No caso do HIV é apenas suficiente que o DNA esteja se preparando para a replicação. Se o linfócito retornar à sua fase de repouso, o ciclo pode ser interrompido e o vírus permanece em estado dormente até uma próxima ativação da célula.
- 3) O DNA do vírus integrado na célula é transcrito em RNA mensageiros, portadores passivos da informação genética, que migram para o citoplasma, onde se encarregam da síntese de proteínas virais, que se agrupam para formar novas cópias do vírus e deslocam-se para a superfície celular e liberam no meio dezenas de novas partículas, prontas para infectar novas células.

### **3.2. FÁRMACOS ANTI-RETROVIRAIS**

Segundo PEÇANHA *et al.* (2002), os fármacos anti-HIV disponíveis no mercado mundial apresentam como alvo uma das etapas de replicação do vírus, impedindo a continuidade do seu ciclo (Figura 2). Apesar de não destruírem o vírus HIV, estes fármacos possibilitam redução imensa na quantidade de suas cópias, produzindo assim redução nos danos que o HIV provocam no sistema imunológico. Como consequência, produzem melhoria no quadro clínico, mesmo em casos avançados da doença. O uso destes fármacos também possibilita boa qualidade de vida aos pacientes infectados pelo HIV, tornando-os menos susceptíveis às doenças oportunistas.



**FIGURA 2.** Ciclo de replicação do HIV e locais de ação de fármacos anti-HIV (NETO *et al.*, 1996).

Atualmente os fármacos mais usados atuam na inibição das enzimas virais transcriptase reversa e protease.

Os inibidores de transcriptase reversa foram os primeiros fármacos utilizados na terapia da AIDS e são muito utilizados até o momento. São capazes de diminuir a carga viral ("concentração" do vírus no sangue), melhorar sintomas clínicos, retardar a progressão e prolongar a sobrevivência de pacientes infectados pelo HIV. Esta classe de fármacos é dividida em dois grupos: os análogos de nucleosídeos e os não-análogos nucleosídeos (STOLK & LÜERS, 2004).

### **3.2.1. Inibidores Análogos de Nucleosídeos**

De acordo com PEÇANHA *et al.* (2002), durante a síntese do DNA viral pela enzima transcriptase reversa, os inibidores análogos nucleosídeos atuam colocando-se como "falsos nucleosídeos" na formação da molécula de DNA viral, impedindo que um novo nucleosídeo se ligue, interrompendo assim o processo. Portanto, eles são considerados inibidores competitivos. Porém, a transcriptase reversa possui grande capacidade de mutação e com o passar do tempo pode ocorrer alteração de sua estrutura nos sítios de ligação dos análogos nucleotídeos, sobrevivendo então a resistência ao fármaco que deixa de atuar como inibidor da enzima. Destacam-se nesta classe a zidovudina (AZT) e a didanosina (ddI) além de outros como zalcitabina (ddC), estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e abacavir (ABC).

### **3.2.2. Inibidores Não-Análogos Nucleosídeos**

Atuam como inibidores não competitivos de transcriptase reversa, bloqueando a reação química de duplicação da molécula de RNA viral sem interferir na ligação dos nucleosídeos. Destacam-se nesta classe a nevirapina, a delavirdina e o efavirenz (STOLK & LÜERS, 2004).

### **3.2.3. Inibidores de Protease**

Atuam na inibição da protease viral e proteases celulares, enzima responsável por clivar a poliproteína codificada, formada no ribossomo da célula

hospedeira. Destacam-se nesta classe o saquinavir, indinavir, ritonavir, amprenavir, lopinavir e nelfinavir (PEÇANHA *et al.*, 2002).

### **3.3. SISTEMAS DE MICRO E NANOENCAPSULAÇÃO**

A micro ou nanoencapsulação de fármacos pode atender a vários objetivos, tais como: proteção, direcionamento específico e liberação controlada.

A proteção do fármaco tem como finalidade manter sua estabilidade quando exposto aos excipientes da formulação e aos fluidos corpóreos. Com a micro ou nanoencapsulação é possível manter a integridade de alguns fármacos em condições muito severas como a do suco gástrico. O direcionamento específico do fármaco para alguns órgãos se deve à afinidade diferenciada do sistema encapsulante por alguns tecidos. Essa estratégia é muito importante em casos como o câncer, no qual o alvo específico é o tumor, ou no caso do vírus HIV que normalmente se aloja em células do sistema reticuloendotelial (RES). A liberação controlada do fármaco possibilita o prolongamento da sua ação e a redução do número de doses. É de grande interesse em casos de patologias crônicas, como a AIDS, na qual os pacientes devem tomar várias doses diárias de anti-retrovirais durante toda a sua vida.

A Figura 3 apresenta uma comparação genérica entre os níveis plasmáticos de fármacos administrados na forma livre e através de mecanismos de liberação controlada, quando as funções renais e hepáticas estão em perfeitas condições. No primeiro caso, a remoção rápida do fármaco da corrente sanguínea exige a administração mais freqüente de doses maiores que podem ultrapassar o nível tóxico do fármaco. Com a liberação controlada, a dose terapêutica é mantida por longo intervalo de tempo. Para fármacos cuja ação está relacionada com sua concentração no sangue, as flutuações decorrentes da sua administração na forma livre freqüentemente provocam efeitos colaterais (KUMAR, 2000<sup>A</sup>).

Recentemente, os pesquisadores da área procuraram padronizar a terminologia usada para caracterizar a liberação mais lenta de fármacos em relação à sua forma livre. Assim, recomenda-se que o termo liberação controlada seja usado quando se conhece o controle da liberação do fármaco *in vivo*, ou seja,

o seu perfil de liberação ao longo do tempo. Quando os resultados restringem-se apenas a experimentos *in vitro*, deve-se usar o termo liberação modificada.



**FIGURA 3.** Comparação entre os níveis plasmáticos de fármaco em relação ao tempo, quando administrados nas formas livre (liberação não controlada) ou de liberação controlada (adaptação de KUMAR, 2000<sup>A</sup>).

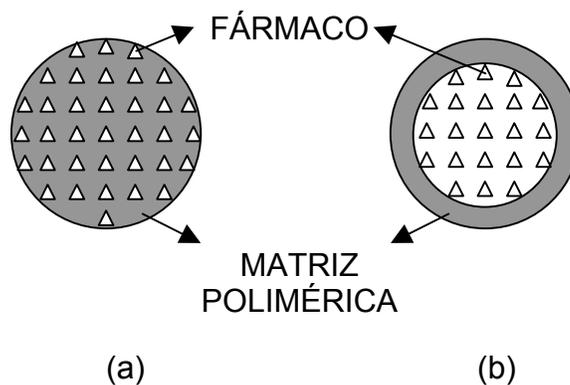
Dentre os sistemas de micro e nanoencapsulação mais utilizados encontram-se os lipossomas e as partículas poliméricas (micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas). A Tabela 2 mostra algumas vantagens e desvantagens da liberação controlada de fármacos.

Os lipossomas ou vesículas lipídicas são estruturas aproximadamente esféricas, compostas de fosfolípidos agregados na forma de bicamadas concêntricas. Essa agregação resulta do caráter anfifílico das moléculas de fosfolípidos, as quais possuem uma porção hidrofóbica (cauda) e outra hidrofílica (cabeça). Ao se agregarem, tais moléculas se organizam de maneira que as porções hidrofóbicas se mantêm no interior da bicamada e as porções hidrofílicas se organizam na superfície interna e externa do lipossoma. A maioria dos trabalhos, da literatura relacionados à encapsulação de fármacos anti-HIV, utilizaram lipossomas como sistema de nanoencapsulação.

**TABELA 2.** Vantagens e desvantagens da liberação controlada de fármacos (adaptação de DUMITRIU & DUMITRIU, 1993).

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Fácil manipulação do fármaco através do seu direcionamento para os órgãos alvos na quantidade certa e no tempo certo;</li><li>• Potencialidade de encapsulação de um ou vários tipo de fármacos;</li><li>• Muitos pontos de interações com a parede celular de bactérias, assim como interações com vírus;</li><li>• Menor toxicidade, embora a toxicidade pode ser acentuada dependendo do polímero e do fármaco;</li><li>• Alteração ou modificação da atividade do fármaco pela alteração na solubilidade e na taxa de difusão;</li><li>• Redução dos efeitos colaterais como irritação, náuseas e vômitos que são comuns em grandes doses de fármacos;</li><li>• Continuidade do tratamento durante a fase noturna;</li><li>• Preservação de fármacos que são rapidamente destruídos pelo corpo, isto é particularmente importante na liberação de macromoléculas tais como proteínas que são agora produzidas por engenharia genética;</li><li>• Aumento do conforto do paciente;</li><li>• Prolongamento de atividade;</li><li>• Liberação localizada do fármaco para uma região localizada do corpo diminuindo o nível sistêmico do fármaco;</li><li>• Melhor adesão do paciente ao tratamento.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Custos de processamento e preparação dos sistemas de liberação controlada podem ser substancialmente maiores do que os custos das formulações padrões;</li><li>• Risco de toxicidade se o suporte é degradado, que é acompanhado pela liberação de grandes quantidades de princípio ativo;</li><li>• Uso de aditivos de polímeros como estabilizantes e antioxidantes;</li><li>• Risco de acumulação se a taxa de liberação do fármaco é lenta;</li><li>• Baixa eficiência e falta de reprodutibilidade, como consequência do processo individual de desorção e metabolismo;</li><li>• Efeitos da matriz polimérica no meio em que se encontra;</li><li>• Adaptação reduzida de fármacos mais fracas que requerem quantidades plasmáticas muito maiores.</li></ul>

As nano e microesferas são definidas como partículas com tamanho variando de 50 nm a 2 mm, contendo um fármaco disperso em sua matriz polimérica. Podem ser classificadas em nano e microcápsulas, quando apresentam um núcleo, onde o fármaco é disperso, o qual é recoberto pela matriz polimérica (Figura 4). A distinção que se faz entre nanocápsula/nanoesfera e microcápsula/microesfera varia de autor para autor. Nanocápsulas e nanoesferas apresentam dimensões da ordem de nanômetros (nm) e microcápsulas e microesferas da ordem de micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). Essas partículas podem se acumular nas células do sistema do reticuloendotelial (RES), seu alvo natural, como também podem ter a superfície modificada de modo a capacitá-las a atingir outras partes do corpo (LÖBENBERG & KREUTER, 1996).



**FIGURA 4.** Representação de nano e micropartículas: (a) esferas, (b) cápsulas.

### **3.3.1. Principais Matrizes de Micro e Nanoencapsulação**

De acordo com SHAHIDI & HAN (1993), uma matriz de encapsulação ideal deve apresentar as seguintes propriedades:

- a) Boas propriedades reológicas em altas concentrações e fácil manipulação durante o processo de encapsulação;
- b) Habilidade de dispersar ou emulsificar o material ativo e estabilizar a emulsão produzida;
- c) Ausência de reatividade química com o material a ser encapsulado durante o processamento e por um período longo de estocagem;
- d) Habilidade de manter e preservar íntegro o material dentro da estrutura durante o processamento ou na estocagem;

- e) Completa remoção do solvente ou outro material que for usado no processo de encapsulação, seja por secagem ou outro processo de remoção do solvente;
- f) Habilidade de promover a máxima proteção do material ativo contra as condições ambientais (por exemplo: luz, calor, umidade);
- g) Capacidade de economizar o bioativo e ser de baixo custo.

Não há material que possua todas estas características mencionadas, mas o uso de associações possibilita melhores propriedades. Os materiais mais utilizados na encapsulação são listados na Tabela 3.

**TABELA 3.** Principais materiais utilizados em matrizes de encapsulação (adaptação de SHAHIDI & HAN, 1993).

Polissacarídeos	Amido, Amido Modificado, Dextrana, Ciclodextrinas, Ácido Hialurônico, Quitosana
Gomas	Goma Acácia, Ágar, Alginato de Cálcio, Carragenas
Proteínas	Glúten, Caseína, Gelatina, Albumina, Hemoglobina, Peptídeos
Lipídeos	Cera, Parafina, Cera de Abelha, Ácido Tristéárico, Diglicerídeos, Triglicerídeos, Óleos
Celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose, Etilcelulose, Nitrocelulose, Acetilcelulose

### 3.3.2. Formas de Liberação do Fármaco

De acordo com DUMITRIU & DUMITRIU (1993), a liberação do fármaco pode ocorrer de diversas formas, como representado na Figura 5. SHAHIDI & HAN (1993) apresentam os seguintes mecanismos de liberação:

- a) Fratura:** a estrutura de recobrimento pode ser fraturada ou quebrada por forças externas como pressão, cisalhamento e ultra-sônica, ou por forças internas como expansão e permeação seletiva.
- b) Difusão:** processo de permeação que ocorre devido a um gradiente de concentração ou forças atrativas inter-cadeias (Figura 5 (b)). Permeabilidade é definida como o transporte de um penetrante através dos poros de uma matriz.

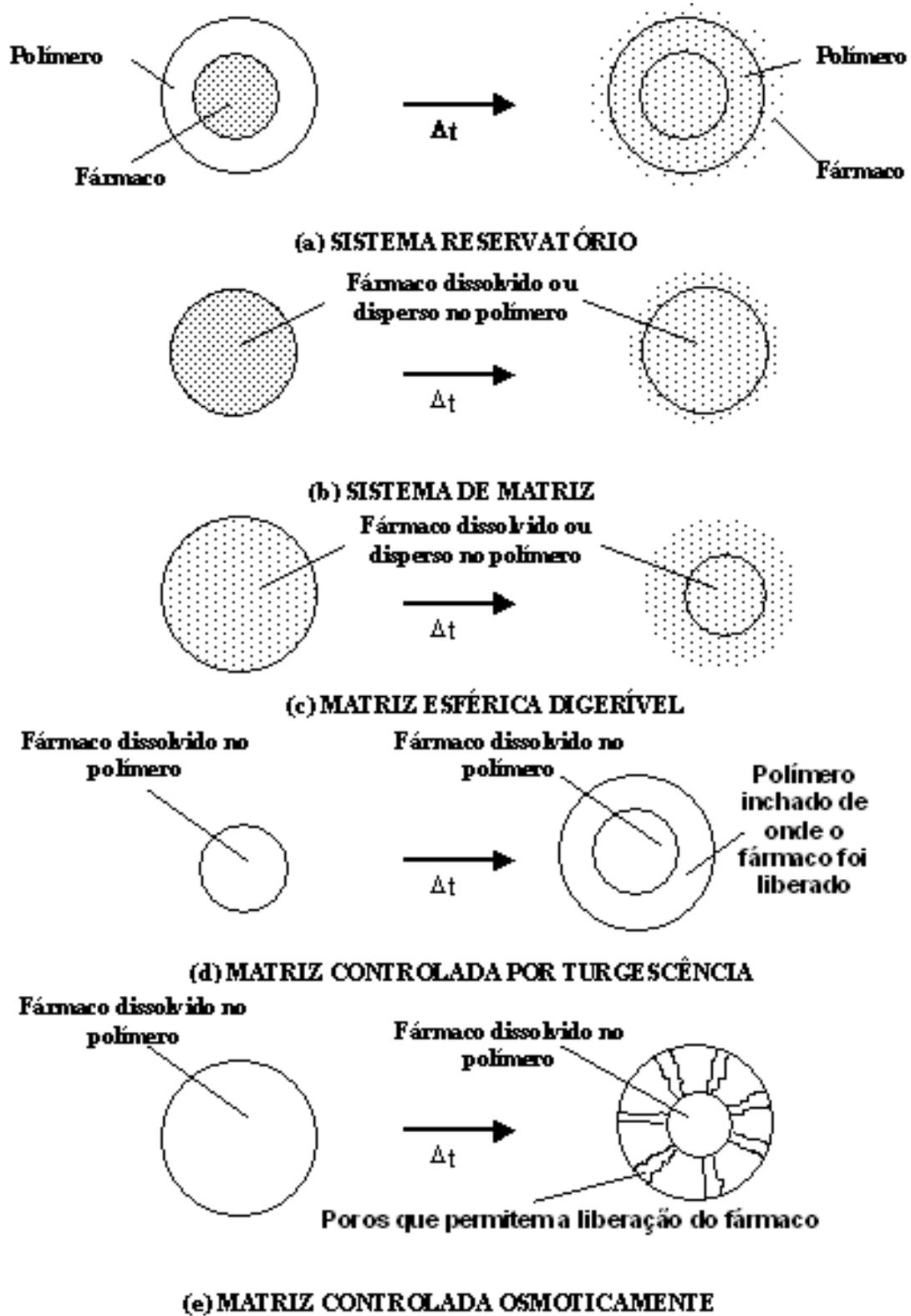


FIGURA 5. Formas de liberação de fármacos (adaptação de DUMITRIU & DUMITRIU, 1993).

**c) Dissolução:** a integridade do material de recobrimento pode ser destruída por dissolução em solvente apropriado ou por meio térmico (Figura 5 (c)).

**d) Biodegradação:** quando a liberação ocorre devido à susceptibilidade do recobrimento aos mecanismos degradativos. Por exemplo, o recobrimento de lipídeos pode ser degradado pela ação de enzimas lipases (Figura 5 (c)).

Em sistemas reservatórios, ou do tipo cápsulas, pode haver a saída do bioativo do seu interior por difusão através da matriz polimérica (Figura 5 (a)). A formação de canais, tanto em nano/microesferas como em nano/microcápsulas, também favorece a saída do material encapsulado (Figura 5 (a) e (e)). Alguns sistemas de liberação requerem o intumescimento da matriz polimérica para que haja a liberação do bioativo (Figura 5 (c)).

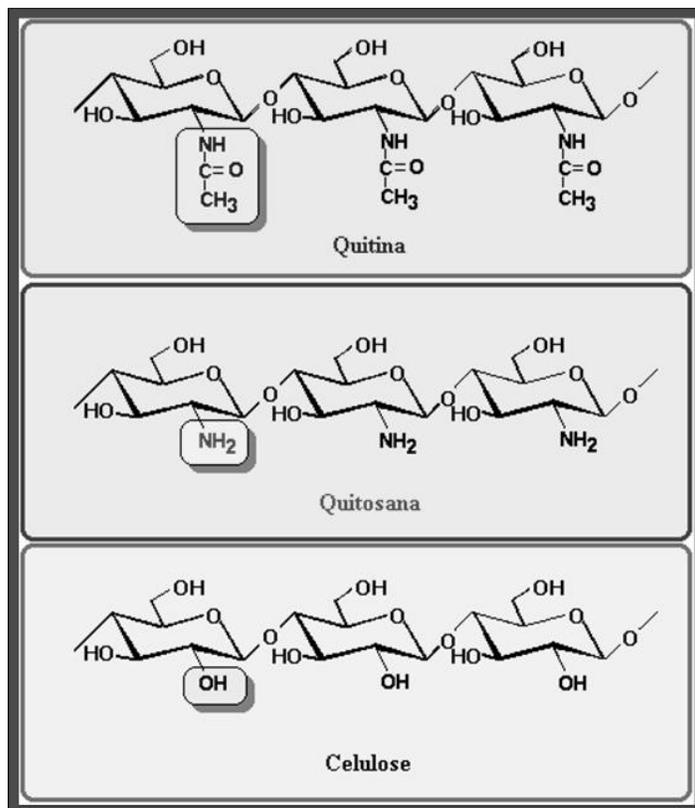
### 3.4. QUITINA E QUITOSANA

O nome quitina é derivado da palavra grega “*chiton*” que significa armadura e foi usada pela primeira vez em 1811 por Braconnot. A quitina é o principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados e parede celular de fungos. Representa cerca de 20 a 50 % do peso seco dos resíduos de processamento de camarões e siris. É o segundo biopolímero mais abundante na Terra após a celulose. A sua produção biológica é cerca de 150.000 toneladas, sendo que os Estados Unidos e o Japão são os maiores produtores (HON, 1996).

A biodegradação da quitina é muito lenta nos resíduos de carcaças de crustáceos da indústria de processamento de frutos do mar, portanto é possível agregar valor a estes resíduos para obtenção de quitina, quitosana e seus derivados para diferentes campos de aplicações (SHAHIDI *et al.*, 1999). A Figura 6 mostra a estrutura da quitina, quitosana e celulose.

A quitina é um glicano com ligações  $\beta$  (1→4), composto de 2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucose (N-acetilglucosamina), um dos mais abundantes polissacarídeos chamado de poli  $\beta$  (1→4)-2-acetamido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucose. Quitosana é o nome usado para a forma de quitina desacetilada, a qual é composta primariamente de glucosamina e 2-amido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucose, conhecida como (1→4)-2-amido-2-deoxi- $\beta$ -D-glucose (SHAHIDI *et al.*, 1999). Segundo KAS (1997), sua fórmula química é  $(C_6H_{11}O_4N)_n$ .

A quitosana possui três tipos de grupos funcionais reativos, um grupo amino, um hidroxil primário e um hidroxil secundário nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente. A modificação destes grupos possibilita a obtenção de diferentes materiais úteis em vários campos de aplicações (SHAHIDI *et al.*, 1999).



**FIGURA 6.** Estrutura da quitina, quitosana e celulose (adaptação do site <http://user.chol.com/~chitin/cellulose.gif>, acessado em 10/02/2006).

### 3.4.1. Propriedades da Quitina e da Quitosana

A massa molar é talvez a mais importante propriedade destes biopolímeros, devido à sua relação com as propriedades desejadas. A massa molar média da quitina varia de  $1,03 \times 10^6$  a  $2,5 \times 10^6$  Da, porém a quitosana obtida após a desacetilação, apresenta massa molar média de  $1,0 \times 10^5$  a  $5,0 \times 10^5$  Da (HON, 1996).

A quitosana, o produto da desacetilação da quitina, é solúvel em ácidos diluídos como ácido acético, ácido fórmico, etc. Já a quitina é altamente

hidrofóbica e insolúvel em água e a maioria dos solventes orgânicos (KUMAR, 2000<sup>B</sup>).

Após a completa remoção de contaminantes tóxicos e materiais como proteínas, metais pesados e pirogênicos, a quitosana e a quitina de alta qualidade são consideradas biocompatíveis e seguras para uso. Muitos testes revelaram que ambas são seguras no que diz respeito à mutagenicidade, toxicidade (aguda, sub-aguda e crônica), pirogenia, hemólise e sensibilização (HON, 1996).

Devido à carga positiva do C-2 do monômero glucosamina em pH menor que 6, a quitosana é mais solúvel e tem maior atividade antimicrobial que a quitina. O mecanismo exato desta ação antimicrobial da quitina, quitosana e seus derivados é ainda desconhecido, porém diversos mecanismos são propostos. Acredita-se que a interação entre a carga positiva da quitosana e a carga negativa da membrana celular dos microrganismos provoca o desprendimento de proteínas e outros constituintes intracelulares.

A quitosana também é um agente quelante que se liga seletivamente a traços de metais e inibe a produção de toxinas e o crescimento microbiano. A quitosana que penetra no núcleo dos microrganismos se liga ao DNA e inibe a síntese de RNA e proteínas (SHAHIDI *et al.*, 1999).

NISHIMURA *et al.* (1998) pesquisaram a adição de grupos sulfatados em quitosana. Os resultados mostraram que estes novos compostos promovem a inibição da replicação *in vitro* do HIV e a diminuição da sua atividade anticoagulante. Estes resultados também sugeriram que existe uma interação específica entre os grupos sulfatos com a glicoproteína 120 (gp 120) do vírus HIV.

A quitosana possui efeito de fibra dietética como ingrediente funcional uma vez que ela não é absorvida pelo intestino, sendo que em 1983 ela foi aprovada pela USFDA (*United States Food and Drug Administration*) como aditivo alimentar. A grande vantagem do uso da quitosana como aditivo alimentar é seu efeito hipocolesterolêmico (SHAHIDI *et al.*, 1999). Além disto, ela é não-tóxica e facilmente bioabsorvível, apresenta propriedades antiácidas e antiúlcera que previnem irritações no estômago. Todas estas propriedades da quitosana fazem deste polímero natural um candidato para formulações de fármacos de liberação controlada (KUMAR, 2000<sup>A</sup>).

A Tabela 4 mostra valores de massa molar e grau de desacetilação de algumas quitosanas utilizadas em trabalhos de microencapsulação de fármacos e seus respectivos fabricantes. É importante mencionar que são poucos os trabalhos publicados que apresentam estes dados. Alguns trabalhos também apresentam dados de viscosidade da quitosana em solução de ácido acético, no entanto a comparação entre eles é inviável uma vez que a viscosidade é obtida por técnicas diferentes e em concentrações diferentes de quitosana.

**TABELA 4.** Propriedades da quitosana utilizada em alguns trabalhos da literatura e seus respectivos fabricantes.

Fabricante	Massa Molar (kDa)	Grau de Desacetilação (%)	Referência
Katokichi Co. Ltd (Japão)	NF	100	SHIKATA <i>et al.</i> (2002)
Natural Biopolymer (EUA)	102	80	CUI & MUMPER (2001)
Primex (Noruega)	NF	93	LUBBEN <i>et al.</i> (2001)
Pronova Biopolymer (Noruega)	> 50	87	VILA <i>et al.</i> (2002)
Fluka BioChimika (Suíça)	70, 750 e 2.000	87	BERTHOLD <i>et al.</i> (1996)
Pronova Biopolymer (Noruega)	> 100	NF*	JANES <i>et al.</i> (2001) <sup>A</sup>
Tianbao Chitosan Co. Ltd (China)	460	86	SHU & ZHU (2000)
Sigma(EUA)	1.000	85	CHANDY <i>et al.</i> (2000)
Sigma (EUA)	390	NF*	LEONG <i>et al.</i> (1998)

NF: Não fornecido pelos autores.

Com relação à massa molar, observa-se pela Tabela 4, que os valores variam de 50 a 2.000 kDa, sendo que apenas o trabalho de BERTHOLD *et al.* (1996) fez um estudo do efeito da massa molar da quitosana na preparação de microesferas de quitosana por precipitação. Eles verificaram que a quantidade de sulfato de sódio necessária para a preparação das microesferas de quitosana depende da massa molar da quitosana. Já o grau de desacetilação encontra-se em valores próximos de 90 %, com exceção do trabalho de SHIKATA *et al.* (2002) que utilizou quitosana totalmente desacetilada, o que é questionável sob o ponto de vista teórico e prático.

A quitosana é facilmente hidrolisada pela enzima lisozima que está presente em muitos fluídos corpóreos, como sangue, saliva e fluido presente nas

cartilagens. Esta despolimerização da quitosana promovida pela lisozima possibilita que a quitosana seja utilizada nos sistemas de liberação controlada de fármacos (HON, 1996).

### **3.4.2. Técnicas de Micro e Nanoencapsulação Utilizando Quitosana**

As principais técnicas empregadas para encapsulação, utilizando quitosana, incluem gelificação ionotrópica, secagem por atomização (*spray-drying*), emulsão, coacervação. É possível a combinação destas técnicas para a obtenção de partículas com propriedades e desempenho específicos.

A aplicação da quitosana na encapsulação de fármacos para sistemas de liberação prolongada é relativamente recente, data da década de noventa, e constitui um campo de pesquisa novo e promissor. As técnicas mais utilizadas para obtenção das partículas são a gelificação ionotrópica com tripolifosfato de sódio (TPP) e a coacervação/precipitação com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

#### **3.4.2.1. Gelificação Ionotrópica**

A gelificação ionotrópica consiste na reticulação iônica da quitosana com contra-íons multivalentes. As partículas resultantes da gelificação ionotrópica possuem tamanhos da ordem de nanômetros (CAMPOS *et al.*, 2001) ou de milímetros (ARAL & AKBUĞA, 1998). São formadas pela adição de uma solução à outra sob agitação magnética ou mecânica (SHU & ZHU, 2000). O fármaco ou bioativo pode ser adicionado à solução de quitosana (JANES *et al.*, 2001<sup>A</sup> e SHU & ZHU, 2000), ou à solução de TPP (VILA *et al.*, 2002).

#### **3.4.2.2. Técnica da Coacervação/Precipitação**

De acordo com PENICHE *et al.* (2003), a técnica da coacervação envolve a separação de uma solução polimérica diluída em duas fases coexistindo: uma fase rica em polímero e uma muito diluída, quase livre do polímero. A coacervação pode ser classificada em simples ou complexa. Na coacervação simples, o colóide hidrofílico é subtraído do solvente pela adição de uma substância hidrofílica concorrente, tal como um sal ou álcool ("*salting out*"). A coacervação complexa é produzida pela mistura de dois polieletrólitos de cargas opostas. O polieletrólito

complexo (também chamado de coacervato complexo) se separa numa fase rica em polímero que coexiste com uma fase muito diluída. Há a formação de um filme insolúvel ou barreira que cobre a micropartícula. As partículas podem ser formadas tanto pelo gotejamento da solução de quitosana à solução do outro polímero (como por exemplo: carboximetilcelulose, carregena, condroitina) ou o procedimento contrário.

#### **3.4.2.3. Técnica de Secagem por Atomização (Spray-Drying)**

O processo de microencapsulação por atomização tem sido empregado desde 1927. Consiste essencialmente das seguintes etapas: o fármaco a ser encapsulado é disperso em uma solução, preferencialmente aquosa, do carreador, neste caso a quitosana. Esta dispersão é atomizada, na forma de pequenas gotas, dentro de uma câmara de secagem aquecida. A água é evaporada rapidamente, formando um pó seco, no qual o diâmetro das partículas varia normalmente, de 10 a 40  $\mu\text{m}$  (PENICHE *et al.*, 2003).

#### **3.4.2.4. Técnica da Emulsão**

Na técnica da emulsão, as partículas são formadas pela dispersão da solução aquosa de quitosana em óleo contendo um tensoativo, formando uma emulsão água-em-óleo (A/O). As gotas de quitosana suspensas na fase oleosa podem ser enrijecidas pela adição de um ânion polivalente como o TPP, como agente de reticulação. Após o enrijecimento, as partículas são separadas, lavadas com solvente e secas. O fármaco a ser incorporado usualmente é adicionado na solução de quitosana antes da obtenção da emulsão.

O tamanho e a morfologia das partículas depende de múltiplos fatores, tais como: temperatura, velocidade de agitação, concentração da quitosana, concentração do surfactante, viscosidade das fases, configuração do reator e do agitador, entre outros.

#### **3.4.3. Fármacos Micro ou Nanoencapsulados em Partículas de Quitosana**

A micro ou nanoencapsulação de fármacos em partículas de quitosana tem sido muito estudada nos últimos anos principalmente devido à sua

biocompatibilidade. Observa-se pela Tabela 5 que a aplicação da quitosana em sistemas de liberação controlada é muito vasta, envolvendo vários fármacos com propriedades físico-químicas diferentes.

**TABELA 5.** Alguns fármacos micro ou nanoencapsulados em partículas de quitosana.

Finalidade Terapêutica	Fármaco	Referência
Terapia do Câncer	Gadólíneo	TOKUMITSU <i>et al.</i> (2000)
	Doxorrubicina	MITRA <i>et al.</i> (2001) JANES <i>et al.</i> (2001) <sup>A</sup>
	5-Fluoruracil	CHANDY <i>et al.</i> (2000)
	Metotrexato Adriamicina	SINGH & UDUPA (1998) NISHIMURA <i>et al.</i> (1986)
Vacinas	Ovoalbumina	LUBBEN <i>et al.</i> (2001)
	Plasmídeo de DNA	CUI & MUMPER (2001)
	Proteína do Toxóide Tetânico	VILA <i>et al.</i> (2002)
Antibiótico	Bupravaquona	JACOBS <i>et al.</i> (2001)
Diabete	Insulina	MOSES <i>et al.</i> (2000), RAMADAS <i>et al.</i> (2000), AIEDEH <i>et al.</i> (1997)
Epilepsia	Fenobarbitona	AL-HELW <i>et al.</i> (1998)
Anti-hipertensivo	Cloreto de Propanolol	LIM & WAN (1998)
Antiinflamatórios	Diclofenaco Sódico	KUMBAR <i>et al.</i> (2002), GONÇALVES & LARANJEIRA (2000)
	Fosfato de Prednisolona Sódico	BERTHOLD <i>et al.</i> (1996)
	Ibuprofeno	QIU <i>et al.</i> (2001)
Fármacos Oftalmológicos	Ciclosporina A	CAMPOS <i>et al.</i> (2001)
	Indometacina	CALVO <i>et al.</i> (1997) <sup>B</sup>
Osteoporose	Calcitonina Salmão	AYDIN & AKBUGA (1996)

#### 3.4.4. Reticulação de Partículas de Quitosana

A reticulação das partículas de quitosana visa principalmente reduzir a sua solubilidade no meio ao qual estão expostas, é feita através de um composto (agente de reticulação ou de ligação cruzada, *crosslinking*), que interage com a quitosana, reduzindo os poros da sua matriz. Em conseqüência, as partículas tornam-se mais rígidas, com menor capacidade de intumescimento, e prolongam o tempo de liberação do fármaco encapsulado. O agente de reticulação pode ser adicionado às partículas já formadas ou durante a sua formação.

A Tabela 6 ilustra a reticulação da quitosana com diferentes agentes. O glutaraldeído é o agente de reticulação mais conhecido e utilizado, no entanto tem sido substituído devido à sua toxicidade na forma livre (MORRIS *et al.*, 1996).

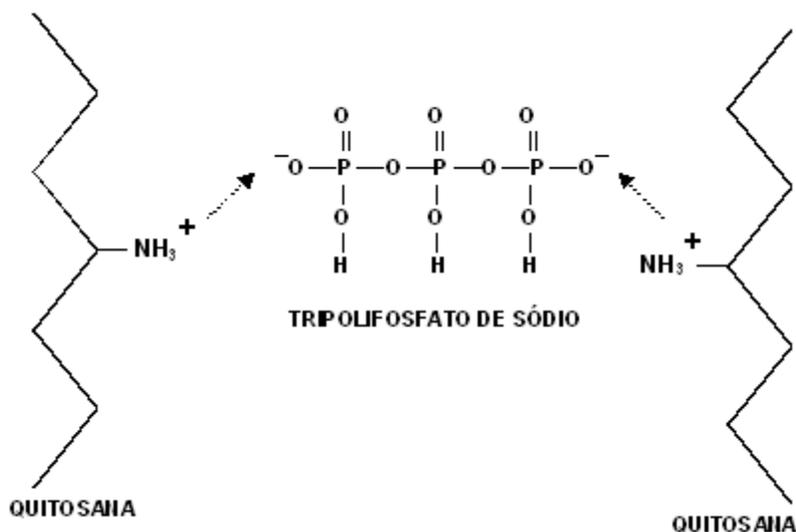
**TABELA 6.** Agentes de reticulação de quitosana e seus respectivos métodos de preparação de partículas.

Agente de Reticulação	Método de Preparação	Tipo de Partícula	Referência
Glutaraldeído	Microemulsão	Nanoesfera	MITRA <i>et al.</i> (2001)
	<i>Spray Drying</i>	Microesfera	HE <i>et al.</i> (1999) <sup>A, B</sup>
	Coacervação-Precipitação	Microesfera	AGGARWAL <i>et al.</i> (2001)
	Emulsão	Microesfera	AL-HELW <i>et al.</i> (1998)
			GENTA <i>et al.</i> (1998)
			SINGH & UDUPA (1998)
			KUMBAR <i>et al.</i> (2002)
	Gelificação Ionotrópica	Microesfera	KIMURA <i>et al.</i> (1998)
			POZZA <i>et al.</i> (1998)
Alginato de Sódio	Gelificação Ionotrópica	<i>Bead</i>	SHU & ZHU (2000)
Palmitato de Ascorbil	Emulsão A/O	Microcápsula	AIEDEH <i>et al.</i> (1997)
Ácido Sulfúrico	Emulsão A/O	Microesfera	KUMBAR <i>et al.</i> (2002)
Temperatura	Emulsão A/O	Microesfera	KUMBAR <i>et al.</i> (2002)
Epicloridrina	Coacervação	Microesferas	GONÇALVES & LARANJEIRA (2000)
Gliceraldeído	<i>Spray-Drying</i>	Microesferas	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2004)
Genipina	Gelificação Ionotrópica	<i>Bead</i>	MI <i>et al.</i> (2002)
			MI <i>et al.</i> (2003)

Os agentes de reticulação interagem com a quitosana de duas maneiras: eletrostaticamente ou covalentemente. A primeira se refere à interação que ocorre entre cargas eletrostáticas opostas, ou seja, as cargas positivas da quitosana interagem com as cargas negativas do agente de reticulação, promovendo a sua reticulação iônica. Neste caso se enquadram os seguintes agentes: TPP, alginato, palmitato de ascorbil, sulfato de sódio. A segunda se refere à formação de ligações covalentes entre um grupo funcional do agente reticulante e o grupo amina da cadeia da quitosana. Epicloridrina, temperatura, ácido sulfúrico, glutaraldeído, gliceraldeído e genipina formam estas ligações covalentes com a quitosana. Estes dois últimos agentes têm merecido maior atenção porque não apresentam toxicidade como o glutaraldeído e epicloridrina. De acordo com SUNG

*et al.* (1998) e SUNG *et al.* (1999), a genipina é cerca de 5.000 a 10.000 vezes menos citotóxica que o glutaraldeído.

Segundo VANDELLI *et al.* (1995), o gliceraldeído é um agente de reticulação biocompatível que não apresenta problemas de toxicidade, pois é metabolizado pelo organismo humano. O TPP é atóxico, e promove a reticulação iônica da quitosana (Figura 7) em condições relativamente fáceis e com baixo custo de processo. Ao contrário da maioria dos agentes reticulantes, ele não apresenta graves restrições no manuseio e armazenamento.



**FIGURA 7.** Reticulação da quitosana com o tripolifosfato de sódio.

### **3.5. MICRO E NANOENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-HIV**

A encapsulação de fármacos anti-HIV é uma linha de pesquisa bastante promissora, uma vez que a liberação controlada pode promover a redução das doses diárias dos fármacos e dos seus efeitos colaterais, possibilitando melhor qualidade de vida aos pacientes infectados pelo HIV. Diversos trabalhos são apresentados na literatura abordando a encapsulação destes fármacos em vários sistemas, como mostrado na Tabela 7. Observa-se que a zidovudina (AZT) é o anti-HIV mais estudado e os lipossomas representam o sistema de encapsulação mais utilizados.

**TABELA 7.** Trabalhos encontrados na literatura sobre micro ou nanoencapsulação de fármacos anti-HIV.

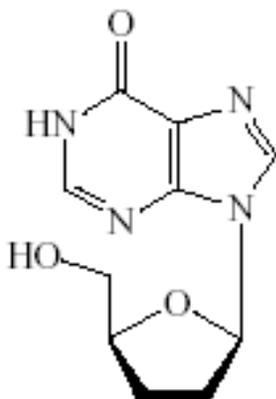
Fármaco anti-HIV	Sistema de Micro ou Nanoencapsulação	Referência
Zidovudina	Niossomas	GOPINATH <i>et al.</i> (2001)
	Lipossomas	PHILLIPS (1992)
		PHILLIPS <i>et al.</i> (1991)
		PHILLIPS & TSOUKAS (1992)
	Nanopartículas	LÖBENBERG <i>et al.</i> (1998)
		LÖBENBERG <i>et al.</i> (1997)
LÖBENBERG & KREUTER (1996)		
Imunolipossomas	SELVAM <i>et al.</i> (1996)	
Microcápsulas	MANDAL & TENJARLA (1996)	
Indinavir	Imunolipossomas	GAGNÉ <i>et al.</i> (2002)
	Lipossomas	DÉSORMEAUX <i>et al.</i> (2005)
Didanosina	Lipossomas	DIPALI <i>et al.</i> (1997)
		DESORMEAUX <i>et al.</i> (1994)
		HARVIE <i>et al.</i> (1995)
Saquinavir	HP- $\beta$ -CD* e	BOUDAD <i>et al.</i> (2001)
	HP- $\beta$ -CD/nanosferas	
	Nanopartículas	BENDER <i>et al.</i> (1996)
2', 3'-Dideoxicitidina	Lipossomas	OUSSOREN <i>et al.</i> (1999)
	Nanopartículas	BENDER <i>et al.</i> (1996)
Estavudina	Lipossomas	KATRAGADDA <i>et al.</i> (1999)
	Nanopartículas	KUO (2005)
Dideoxicitidina-5'-trifosfato	Lipossomas	OUSSOREN <i>et al.</i> (1999)

\* HP- $\beta$ -CD: Hidroxipropil - $\beta$ - ciclodextrina.

### 3.5.1. Didanosina (2',3'-Dideoxinosina)

A didanosina, um análogo da adenosina, é um inibidor da enzima transcriptase reversa do vírus HIV. Como os outros análogos nucleosídeos, a ddl não é ativa como administrada, pois requer a aminação e fosforilação pelas quinases e nucleotidasas da célula para a formação do metabólito ativo denominado 2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato (ddATP). O ddATP compete com o nucleosídeo natural deoxiadenosina trifosfato (dATP) pelo sítio ativo da enzima transcriptase reversa. O ddAPT ao se ligar na cadeia do DNA viral promove um bloqueio da replicação viral (PERRY & BALFOUR, 1996).

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2003), a ddl é um pó cristalino branco, ligeiramente solúvel em água, insolúvel em acetona, clorofórmio, etanol e éter etílico. Sua fórmula química é  $C_{10}H_{12}N_4O_3$  e sua estrutura química é mostrada na Figura 8.



**FIGURA 8.** Estrutura química da didanosina.

A ddl é apresentada na forma de comprimidos, os quais contêm antiácidos na sua formulação, para evitar a sua degradação no pH ácido do estômago. A degradação da ddl é resultante da hidrólise, formando a hipoxantina. A presença destes antiácidos faz com que os comprimidos sejam muito grandes. É ainda recomendável que sejam ingeridos dois comprimidos por vez, para maior eficácia do efeito tamponante, e distante das refeições para melhor absorção do fármaco.

#### **3.5.1.1. Absorção e Metabolismo**

KAUL *et al.* (1993) estudaram o metabolismo da ddl em cães e verificaram que o principal metabólito encontrado, tanto no plasma como na urina, foi a alantoína. Foram também encontrados outros metabólitos como o ácido úrico, xantina e hipoxantina. Segundo os autores, cerca de 55 % da ddl absorvida é metabolizada na primeira passagem pelo fígado.

De acordo com SHELTON *et al.* (1997), pacientes com hipoacidez gástrica ( $\text{pH} < 3$ ) e pacientes com  $\text{pH}$  gástrico maior que 3 não apresentaram diferenças significativas com relação à farmacocinética da ddl.

GAREY *et al.* (1998) recomendam que a ddl seja administrada com o estômago vazio porque os alimentos reduzem sua absorção. DAMLE *et al.* (2002)<sup>A</sup> também verificaram que a absorção da ddl é reduzida em cerca de 25 % quando a formulação de grânulos gastrorresistentes (*enteric-coated*) é administrada com alimentos. Segundo SINKO *et al.* (1995), estudos de absorção da ddl *in vitro* e *in situ* sugerem que a difusão paracelular com transporte paracelular é o principal responsável pela sua absorção no intestino.

BRAMER *et al.* (1993) verificaram que a absorção da ddl no reto é cerca de 39 vezes maior do que a sua absorção no cólon, sugerindo a administração retal como uma rota alternativa em relação à administração oral.

### **3.5.1.2. Farmacocinética**

De acordo com POLLARD (2000), a meia-vida plasmática da ddl é de 1,88 h e a meia-vida intracelular situa-se entre 24 e 40 h, permitindo a posologia de duas doses ao dia. O efeito colateral mais preocupante, embora incomum (ocorre em cerca de 3 % do pacientes) é a pancreatite, que pode ser fatal. Por esta razão deve-se monitorar os níveis de amilase durante o tratamento. Outros efeitos colaterais incluem neuropatia periférica e diarreia, sendo que esta última está relacionada à ingestão do tamponante associado no comprimido, sendo, portanto, mais freqüente quando empregadas doses maiores (NETO *et al.*, 1996).

KUNCHES *et al.* (2001) compararam a administração do Videx<sup>®</sup> (nome comercial do comprimido tamponado de ddl) com o Videx<sup>®</sup> Enteric-Coated ou Videx<sup>®</sup> EC (cápsulas contendo grânulos gastrorresistentes de ddl), ambos fabricados pela Bristol-Myers Squibb (Princeton - Estados Unidos da América). Segundo eles, o Videx<sup>®</sup> EC promoveu maior conforto aos pacientes, por reduzir os efeitos colaterais como náuseas, cólicas intestinais e diarreia, aumentando assim a sua tolerabilidade e a adesão ao tratamento.

DAMLE *et al.* (2002)<sup>B</sup> estudaram a farmacocinética de comprimidos tamponados de ddl e grânulos gastrorresistentes (*enteric-coated*) em pessoas

infectadas pelo HIV. Eles verificaram que não ocorreram diferenças significativas entre parâmetros farmacocinéticos como  $AUC_{\infty}$ ,  $C_{MAX}$  e  $t_{1/2}$ , mas o  $t_{MAX}$  aumentou. Os autores concluíram que as formulações são equivalentes na extensão da absorção, mas diferem na taxa de absorção da ddl. DAMLE *et al.* (2002)<sup>C</sup> verificaram resultados semelhantes para indivíduos não infectados.

### **3.5.1.3. Quantificação da Didanosina**

A determinação da ddl por cromatografia líquida é utilizada na maioria dos trabalhos envolvendo a sua encapsulação. SÁNCHEZ-LAFUENTE *et al.* (2002) compararam o método espectrofotométrico com o método cromatográfico (HPLC). As Tabelas 8 e 9 mostram que a exatidão apresenta valores muito próximos em ambos os métodos, no entanto os coeficientes de variação, inter e intra-dia, foram menores para o método espectrofotométrico.

**TABELA 8.** Dados de exatidão para determinação da didanosina (cada valor representa a média de seis replicatas) (adaptação de SÁNCHEZ-LAFUENTE *et al.*, 2002).

Método Cromatográfico (HPLC)			Método Espectrofotométrico UV		
Concentração Real ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	Concentração Observada ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) (média $\pm$ desvio padrão)	Exatidão	Concentração Real ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ )	Concentração Observada ( $\mu\text{g cm}^{-3}$ ) (média $\pm$ desvio padrão)	Exatidão
40,00	41,45 $\pm$ 1,73	3,63	20,00	20,15 $\pm$ 0,04	0,77
20,00	18,94 $\pm$ 0,15	-5,28	10,00	9,57 $\pm$ 0,02	-4,28
10,00	10,36 $\pm$ 0,21	3,63	5,00	5,15 $\pm$ 0,03	3,10
5,00	5,11 $\pm$ 0,18	2,24	2,50	2,54 $\pm$ 0,01	1,72
2,50	2,66 $\pm$ 0,09	6,26	1,25	1,28 $\pm$ 0,01	2,09
1,25	1,26 $\pm$ 0,05	0,45	0,63	0,64 $\pm$ 0,01	2,62
0,63	0,63 $\pm$ 0,03	0,19	0,31	0,33 $\pm$ 0,01	6,51
			0,15	0,16 $\pm$ 0,01	7,08

30

**TABELA 9.** Precisão intra e inter-dia para a determinação da didanosina (adaptação de SÁNCHEZ-LAFUENTE *et al.*, 2002).

Nível		Média	Desvio padrão	Graus de Liberdade	Coeficiente de Variação (%)
Método Cromatográfico (HPLC)					
5 $\mu\text{g cm}^{-3}$	Intra-dia	87.968,15	3,02 E-3	20	3,43
	Inter-dia	85.695,65	3,24 E-3	20	3,78
Método Espectrofotométrico UV					
5 $\mu\text{g cm}^{-3}$	Intra-dia	0,346	0,004	20	1,10
	Inter-dia	0,347	0,004	20	1,20

## CAPÍTULO 4

### INCORPORAÇÃO DA DIDANOSINA

#### 4.0. INTRODUÇÃO

Este capítulo é composto de duas grandes partes: (4.1) Estudo da estabilidade da didanosina (ddl) e obtenção das partículas pela técnica da gelificação ionotrópica; (4.2) Otimização das condições de incorporação da ddl. A incorporação refere-se à dispersão do composto ativo em toda a matriz polimérica das microesferas (interior e superfície) e a encapsulação ao seu confinamento somente no interior da estrutura.

O estudo da estabilidade da ddl é importante uma vez que esse fármaco sofre hidrólise em meio ácido, havendo a formação da hipoxantina que não apresenta atividade contra o HIV. A incorporação e/ou encapsulação em partículas de quitosana é realizada a partir de soluções de quitosana que normalmente se encontram em pH's ácidos. Portanto, é necessário garantir a estabilidade da ddl no meio ácido de produção das partículas.

Nesta primeira parte, também são apresentados estudos da obtenção de partículas pela técnica de gelificação ionotrópica que foram úteis no estabelecimento das variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental posteriormente apresentado.

Na segunda parte é apresentado um estudo de otimização da produção das micropartículas de quitosana utilizando a técnica de planejamento fatorial. As variáveis estudadas foram: concentrações de quitosana, de ddl e de tripolifosfato de sódio (TPP). As respostas estudadas no planejamento foram eficiência de incorporação, carregamento de ddl, grau de intumescimento, diâmetro médio das partículas e permeabilidade. O planejamento de experimentos realizado visou principalmente a obtenção de micropartículas de quitosana com elevado carregamento de ddl e baixa permeabilidade.

Os métodos utilizados para o estudo da estabilidade da ddl e sua incorporação em micropartículas de quitosana, assim como sua otimização, além dos resultados obtidos e discussão dos aspectos estudados, são apresentados nos itens subseqüentes deste capítulo.

#### **4.1. ESTABILIDADE DA DIDANOSINA E INCORPORAÇÃO**

##### **4.1.1. Material**

Para a produção das partículas utilizou-se a quitosana da Polymar (Fortaleza, Ceará), com grau de desacetilação, determinado por titulação potenciométrica, igual a  $81,61 \pm 1,05\%$  e massa molar igual a 105 kDa, determinada por viscosimetria de acordo com a equação de Mark-Houwink descrita por POGODINA *et al.* (1986).

Os agentes gelificantes: tripolifostato de sódio (TPP) e hidróxido de sódio (NaOH) foram da Synth.

O ácido acético glacial, utilizado para a solubilização da quitosana e para o tampão acetato de sódio, foi da Glacial.

Para a obtenção dos tampões utilizou-se acetato de sódio da Synth e acetato de amônio da Merck, respectivamente, para os tampões acetato de sódio ( $0,875 \text{ mol dm}^{-3}$ ; pH = 5,6) e acetato de amônio ( $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$ ; pH = 6,7).

A ddl, de massa molar 236,23 g/mol e sem cargas eletrostáticas, foi cedida pela empresa Labogen S/A Química Fina e Biotecnologia (Indaiatuba - SP) com pureza cromatográfica igual a 99,58% de acordo com laudo técnico do produto fornecido pela empresa.

Água destilada e purificada em sistema Milli-Q foi usada em todas as preparações.

##### **4.1.2. Equipamentos**

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento dos experimentos foram:

- Espectrômetro de espalhamento de luz por incidência de raio laser, marca Malvern, Mastersizer S, modelo S – MAM 5005 (equipamento utilizado para

determinação de diâmetro médio e distribuição de partículas maiores que 1  $\mu\text{m}$ ).

- Espectrômetro de espalhamento de luz por incidência de raio laser, marca Malvern, Autosizer, modelo 4700 (equipamento utilizado para determinação de diâmetro médio e distribuição de tamanhos de partículas menores que 1  $\mu\text{m}$ ).
- Sistema de água Ultrapura, marca Milli-Q Millipore;
- Banho sonicador, marca Branson, modelo 2200;
- Sistema HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), marca Varian, Detector de UV modelo 9050, Bomba modelo 9012, com injetor manual e lâmpada UV, acoplado a um computador (*Workstation*). A coluna utilizada foi uma Lichrospher 100 RP – 18 (5  $\mu\text{m}$ ) 125 x 4 mm a 30,0°C, da Merck.
- Liofilizador, marca FTS Systems, modelo EZ DRY;
- Microscópio Eletrônico de Varredura, marca LEICA, modelo LEO440i;
- Agitador mecânico digital, marca Tecnal, modelo TE 039/1;
- Centrífuga, marca Metroterm, modelo MTD III Plus;
- Incubadora (*shaker*), marca New Brunswick Scientific Co. INC., modelo G24 Environmental Incubator Shaker;

### **4.1.3. Métodos**

#### **4.1.3.1. Análise da Didanosina**

A ddl foi quantificada por cromatografia líquida (HPLC). Para a análise utilizou-se coluna Lichrospher 100 RP – 18 (5  $\mu\text{m}$ ). A fase móvel foi constituída de solução de acetato de amônio 0,015 mol  $\text{dm}^{-3}$  e acetonitrila. A eluição do fármaco foi realizada através de um gradiente de acetato de amônio 0,015 mol  $\text{dm}^{-3}$ . O comprimento de onda do detector ultravioleta foi definido em 248 nm.

#### **4.1.3.2. Preparação das Soluções de Quitosana**

Inicialmente a quitosana foi suspensa em metade da água Milli-Q necessária e em seguida adicionou-se o ácido acético glacial. A mistura foi feita com agitação magnética por 24 h a temperatura ambiente (25°C) e completou-se o volume com o restante da água. Agitou-se por mais 24 h em temperatura

ambiente e estocou-se em refrigerador (5°C) para prevenir a proliferação de microrganismos. Durante o longo processo de agitação, o recipiente foi devidamente coberto com filme plástico para evitar a evaporação do solvente.

#### ***4.1.3.3. Produção das Partículas de Quitosana***

A técnica de gelificação ionotrópica consiste basicamente na adição de solução de agente gelificante à solução de quitosana 0,25 % (m/v) sob agitação mecânica. A reticulação das partículas ocorre com a gelificação ionotrópica através de um dos agentes gelificantes: TPP e NaOH.

#### **Influência da Concentração e Tipo de Agente Reticulante**

Inicialmente foi estudada a influência do TPP e NaOH no diâmetro médio e distribuição das partículas de quitosana formadas. Ambos os agentes reticulantes foram usados em 2 concentrações: 0,10 e 1,00 % (m/v). A concentração da solução de quitosana foi 0,25 % (m/v), e a adição dos agentes gelificantes foi gradativa, sob agitação mecânica utilizando rotor do tipo pá dentada (1.500 rpm).

Após cada adição de agente gelificante, eram retiradas alíquotas do meio para análise do diâmetro das partículas formadas. Em seguida, as alíquotas eram retornadas ao meio reacional, para manter a quantidade inicial de quitosana, e prosseguia-se com nova adição do agente reticulante. Ao final do experimento, as partículas obtidas com 1,00 % (m/v) de TPP foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas para a análise da morfologia.

#### **Influência da Velocidade de Agitação**

A influência da velocidade de agitação foi feita com as partículas contendo 1,00 % (m/v) de TPP. Foi usado um agitador mecânico com rotor do tipo pá dentada, e velocidades de agitação 500, 1.500 e 2.500 rpm. Da mesma maneira descrita anteriormente, a evolução do diâmetro das partículas foi acompanhada através de análise de alíquotas retiradas do meio.

#### **Influência do Excesso de TPP**

Nestes experimentos foram utilizadas quantidades maiores de TPP em relação à quantidade máxima utilizada nos experimentos descritos acima. Os experimentos foram programados de acordo com a Tabela 10. Para estes

experimentos foi efetuada a adição gota-à-gota da solução de TPP (tempo de adição ~ 1 min), com exceção do experimento 6 na qual a adição foi realizada lentamente durante 20 min com auxílio de bomba peristáltica.

**TABELA 10.** Experimentos realizados para verificar o efeito do excesso de tripolisfosfato de sódio (TPP) no diâmetro das partículas.

Experimento	Razão mássica (g de quitosana/g de TPP)
1	1,67
2	1,25
3	1,00
4	0,83
5	0,71
6	1,25

#### ***4.1.3.4. Caracterização das Partículas***

##### **Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanhos**

O diâmetro médio e distribuição de tamanhos das partículas foram determinados por espalhamento de luz utilizando laser de alta potência. As partículas com diâmetro até 1  $\mu\text{m}$  foram analisadas em equipamento Malvern Autosizer 4700. As partículas maiores que 1  $\mu\text{m}$  foram analisadas em equipamento Malvern Mastersizer (Modelo E) do Laboratório de Uso Comum da Faculdade de Engenharia Química (LUC-FEQ).

##### **Morfologia**

As partículas foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas por 48 h. Após a liofilização, as partículas foram metalizadas com ouro e analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

#### 4.1.3.5. Estabilidade da Didanosina

Tendo em vista a instabilidade da ddl em meios ácidos, foram realizados testes de estabilidade com o tempo nas soluções de ddl preparadas em ácido acético e em tampão acetato de sódio, em duas concentrações, e expostas a níveis diferentes de pH, conforme apresentado na Tabela 11. Nos experimentos preparou-se uma solução contendo 0,16 mg de ddl  $\text{cm}^{-3}$  de solução com volume de 50  $\text{cm}^3$ . Após a adição da ddl, a solução foi sonicada por 1 min para auxiliar a solubilização. As amostras foram retiradas em intervalos de tempos pré-definidos e injetadas no cromatógrafo para análise da concentração de ddl.

**TABELA 11.** Soluções utilizadas no estudo da estabilidade da didanosina.

Solução	Concentração ( $\text{mol dm}^{-3}$ )	pH
Ácido Acético	0,875	2,61
Tampão Acetato de Sódio	0,875	5,63
Tampão Acetato de Sódio	2,000	5,61
Tampão Acetato de Amônio	0,015	6,69

#### 4.1.3.6. Incorporação da Didanosina

A incorporação da ddl foi feita utilizando duas técnicas diferentes: durante a formação das partículas e por hidratação das partículas pré-formadas. Em ambos os casos a eficiência de incorporação foi calculada pela equação (1).

$$\text{Eficiência de Incorporação (\%)} = \frac{(M_{\text{INICIAL}} - M_{\text{FINAL}})}{M_{\text{INICIAL}}} \times 100 \quad (1)$$

onde  $M_{\text{INICIAL}}$  é a massa inicial de ddl e  $M_{\text{FINAL}}$  é a massa de ddl no sobrenadante.

##### 4.1.3.6.1. Incorporação Durante a Formação das Partículas

Nesta técnica de incorporação utilizou-se o processo de formação de partículas descrito no item 4.1.3.3 com a adição prévia do fármaco à solução de tampão e TPP.

A adição da solução de agente gelificante à solução de quitosana foi realizada em 1 min sob agitação mecânica (1.500 rpm) sendo que após a adição, a suspensão foi agitada por mais 1,5 min. As partículas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi devidamente diluído em tampão acetato de amônio  $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$  para a análise cromatográfica. Nestes experimentos utilizou-se a razão de 1 g de quitosana / 2 g de TPP. A Tabela 12 mostra as condições dos experimentos:

**TABELA 12.** Condições experimentais dos experimentos de incorporação.

Experimento	Concentração de Quitosana (%)	Quantidade de ddl (mg)	Tampão da Solução de ddl e TPP
1	0,25	50	Acetato de Sódio
2	0,25	100	Acetato de Sódio
3	0,50	50	Acetato de Sódio
4	0,50	100	Acetato de Sódio
5	0,50	100	Acetato de Amônio

Outro experimento, o número 6, foi feito nas mesmas condições que o experimento 4, diferindo somente na forma de adição da solução ddl/TPP. Inicialmente foi adicionado 1/5 da quantidade de TPP, em seguida fez-se a adição da ddl e finalmente, o restante (4/5) do TPP. A intercalação da adição da ddl e agente reticulante visou obter-se maior eficiência de incorporação e aumento do carregamento do fármaco nas micropartículas.

Após a preparação, as partículas foram centrifugadas e ressuspensas em solução tampão. A ddl do sobrenadante foi analisada por cromatografia líquida.

#### **4.1.3.6.2. Incorporação por Hidratação das Partículas Secas Pré-Formadas**

Foi realizada previamente a síntese de partículas isentas de ddl, utilizando o procedimento descrito anteriormente e soluções de quitosana 0,50 % (m/v) e TPP 1,00% (m/v) na razão de 1 mg de quitosana/2 mg de TPP. Após a

centrifugação da suspensão, as partículas foram congeladas em *freezer* durante uma noite e liofilizadas durante 48 h.

A incorporação da ddl consistiu em incubar as partículas secas com uma solução de ddl em tampão acetato de amônio ( $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$ ). A suspensão foi agitada a 200 rpm em agitador recíproco com temperatura controlada em  $27^\circ\text{C}$ . Ao final de intervalos de tempos definidos (1, 2 e 12 h), o material foi centrifugado por 20 min a 3.000 rpm. O sobrenadante foi diluído e analisado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 248 nm. Para a análise espectrofotométrica foi construída uma curva de calibração da ddl com concentrações variando de 2,50 a  $25,00 \mu\text{g cm}^{-3}$ .

#### **4.1.4. Resultados e Discussão**

##### **4.1.4.1. Produção de Partículas de Quitosana**

A produção de partículas de quitosana por gelificação ionotrópica foi estudada acompanhando-se a evolução do tamanho das partículas com a adição do agente gelificante, visando identificar as regiões de produção predominante de nano e micropartículas, em função da concentração e tipo do agente de gelificação. As partículas obtidas foram adicionalmente caracterizadas com relação à morfologia e características de superfície.

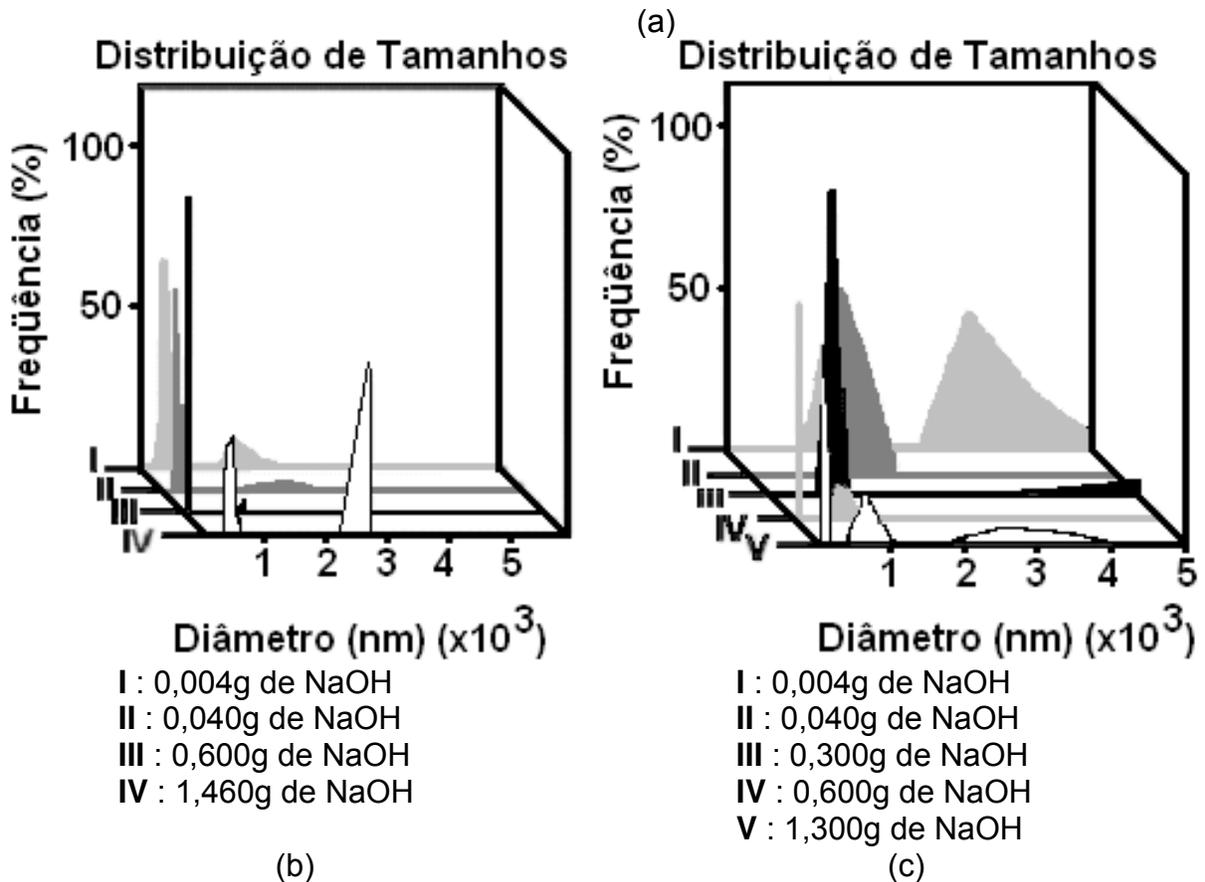
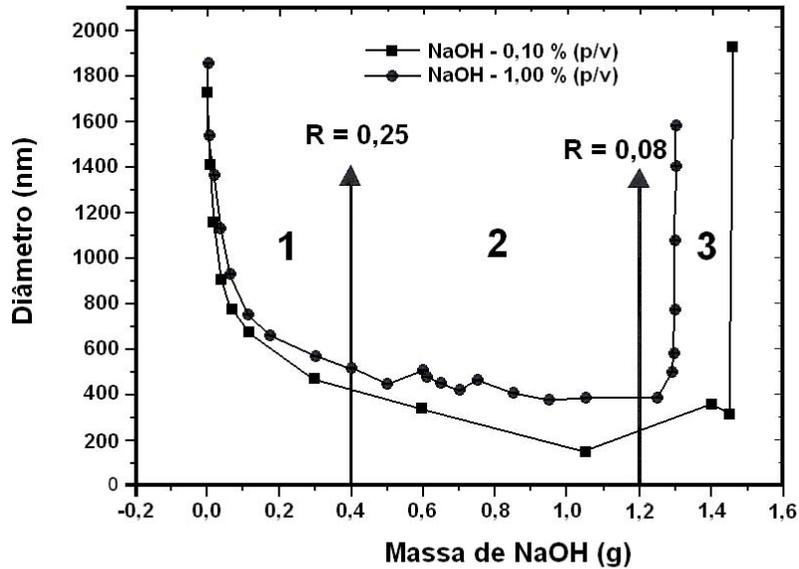
##### **4.1.4.2. Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanhos**

As Figuras 9 e 10 mostram a variação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos das partículas com a adição dos agentes gelificantes NaOH e TPP. Para ambos os agentes, observa-se pelas Figuras 9 (a) e 10 (a) que os perfis apresentam três regiões distintas: (1) inicialmente a redução gradativa de tamanhos que evidencia a formação das partículas pela interação do polímero com o agente de gelificação, seguida de uma região (2) onde o diâmetro médio é aproximadamente constante, após a qual (3) ocorre um aumento brusco para um nível constante, independente da adição de maior quantidade de agente de gelificação. Nessa última etapa observa-se experimentalmente a precipitação das partículas.

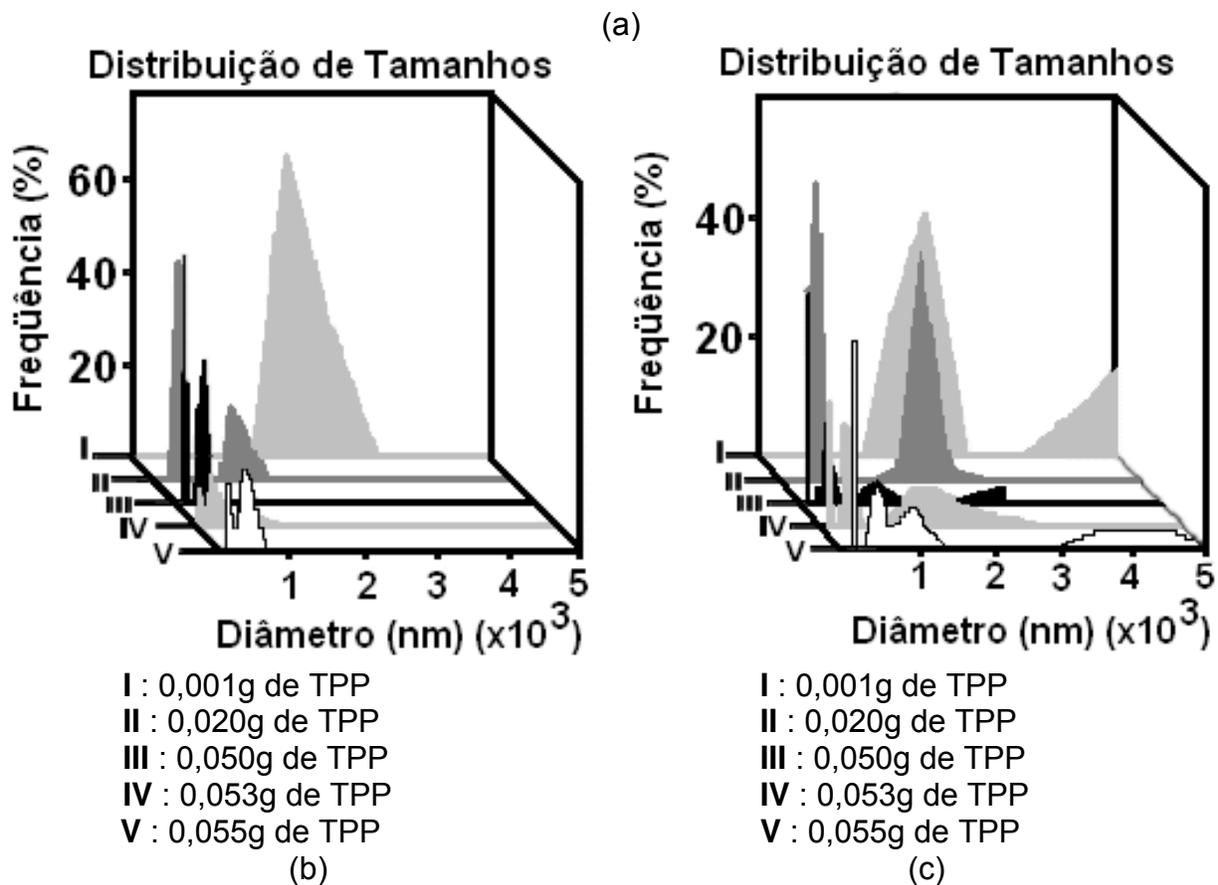
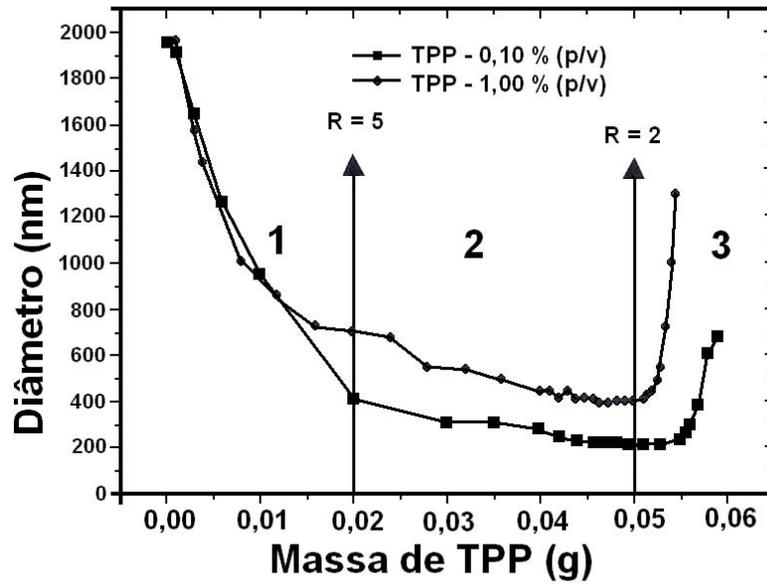
CALVO *et al.* (1997)<sup>A</sup> verificaram resultados semelhantes na preparação de partículas pela mesma técnica. Eles testaram diversas concentrações de quitosana e TPP e determinaram diagramas que estabelecem regiões distintas de formação de partículas: região de solução, região de nanopartículas e região de agregados, semelhantes, respectivamente às regiões 1, 2 e 3 deste trabalho.

A partir dos perfis das Figuras 9 (a) e 10 (a), pode-se determinar razões mássicas entre o polímero e o agente gelificante (g de quitosana/g de agente gelificante) para as quais a formação das partículas é iniciada e a neutralização total das cargas onde ocorre a sua precipitação. Nas condições dos ensaios, estas razões foram: 0,25 e 0,08 para o NaOH e 5,00 e 2,00 para o TPP.

Observa-se nas Figuras 9 (a) e 10 (a) que o diâmetro médio das partículas na região (2) foi menor que 600 nm quando a concentração do agente de gelificação foi igual a 1,00 % (m/v), e menor que 400 nm para a menor concentração da solução gelificante (0,10 % (m/v)). Os pontos das Figuras 9 (a) e 10 (a) representam diâmetros médios, e as distribuições de tamanhos de alguns destes pontos são apresentadas nas Figuras 9 (b-c) e 10 (b-c). A distribuição de tamanhos das partículas mostrada nas Figuras 9 (b) e (c) evidencia a agregação e formação de nanopartículas na região (2) e de micropartículas (região 3), e a polidispersidade da população.



**FIGURA 9.** Influência do hidróxido de sódio (NaOH) no diâmetro médio e distribuição de tamanhos das partículas: (a) diâmetro médio; (b) distribuição de tamanhos para 0,10 % (m/v) de NaOH; (c) distribuição de tamanhos para 1,00 % (m/v) de NaOH.



**FIGURA 10.** Influência do tripolifosfato de sódio (TPP) no diâmetro médio das partículas: (a) diâmetro médio; (b) distribuição de tamanhos para 0,10 % (m/v) de TPP; (c) distribuição de tamanhos para 1,00 % (m/v) de TPP.

É possível verificar, nas Figuras 9 (b-c) e 10 (b-c), que as partículas são polidispersas, ou seja, apresentam mais de uma população. Se assumirmos uma simples população que segue uma distribuição Gaussiana, então o índice de polidispersidade (*PdI*), calculado pela equação (2), está relacionado com o desvio padrão ( $\sigma$ ) de uma distribuição Gaussiana hipotética e o tamanho principal médio ( $Z_D$ ).

$$PdI = \left( \frac{\sigma}{Z_D} \right)^2 \quad (2)$$

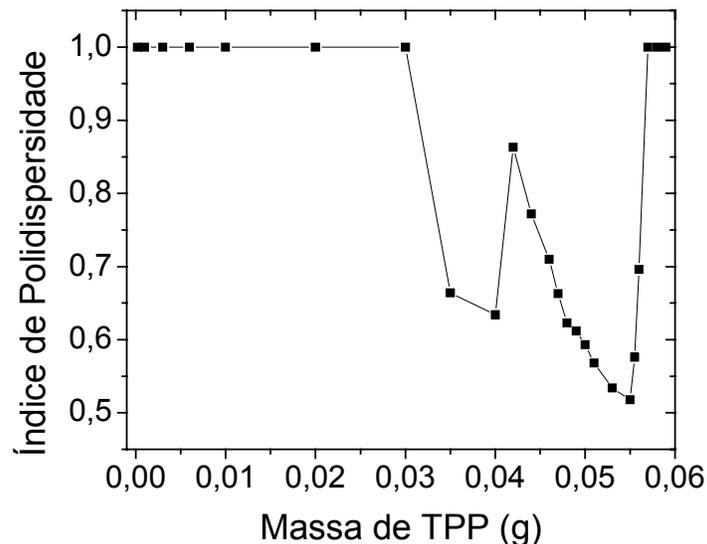
De acordo com manual do equipamento de análise do tamanho de partículas (Malvern), amostras com índice de polidispersidade menores que 0,04 podem ser consideradas monodispersas. A Figura 11, para 0,10 % (m/v) de TPP, apresenta valores bem maiores do que 0,04 confirmando a distribuição multi-modal (ou multi-picos) observados nas Figuras 9 (b-c) e 10 (b-c). Também é possível verificar as três regiões distintas de formação de partículas na Figura 11. Comportamento semelhante foi encontrado para o NaOH.

As três regiões de formação de partículas podem ser relacionadas às estruturas predominantes encontradas no meio reacional. Na região 1 ocorrem principalmente cadeias distendidas de quitosana (estrutura 1), neste caso a quantidade de TPP presente no meio reacional é muito pequena, conseqüentemente as cadeias poliméricas encontram-se principalmente distendidas. Na região 2 a maior predominância é de nanopartículas (estrutura 2), ou seja, a quantidade de TPP é suficiente para promover o enovelamento das cadeias de quitosana e conseqüente formação das nanopartículas. Finalmente, na região 3, a quantidade de TPP é maior do que a quantidade estequiométrica para neutralização das cargas da cadeia de quitosana, assim o excesso de cargas negativas, decorrentes do TPP, promove a precipitação das nanopartículas formando micropartículas (estrutura 3).

Na região (1) o índice de polidispersidade é igual a 1, o que indica a presença de várias populações, principalmente estrutura 1 e algumas populações de estrutura 2. Na região (2), apesar da distribuição multi-modal persistir, há uma

redução no índice de polidispersidade, o que evidencia a predominância de nanopartículas (estrutura 2). No início da região (2), coexistem nanopartículas (estrutura 2) e cadeias distendidas de quitosana (estrutura 1), a medida em que a quantidade de TPP se aproxima da região (3), as populações de estrutura 1 tendem a desaparecer e surgem as primeiras populações de micropartículas (estrutura 3). Na região 3, as nanopartículas (estrutura 2) tendem a precipitar para a formação de micropartículas (estrutura 3).

À medida que o agente gelificante é adicionado, estas populações vão desaparecendo dando origem a novas populações menores. Um gráfico típico do índice de polidispersidade é apresentado na Figura 11 para a solução com menor concentração de TPP (0,10% (m/v)).



**FIGURA 11.** Variação do índice de polidispersidade em função da massa de tripolifosfato de sódio (TPP).

O uso de hidróxido de sódio, como agente gelificante gerou partículas bastante polidispersas (Figuras 9 (b) e (c)). Com o aumento da quantidade de hidróxido de sódio, as partículas distribuíram-se em duas ou três populações. Mesmo na iminência da precipitação, as partículas ainda estavam polidispersas.

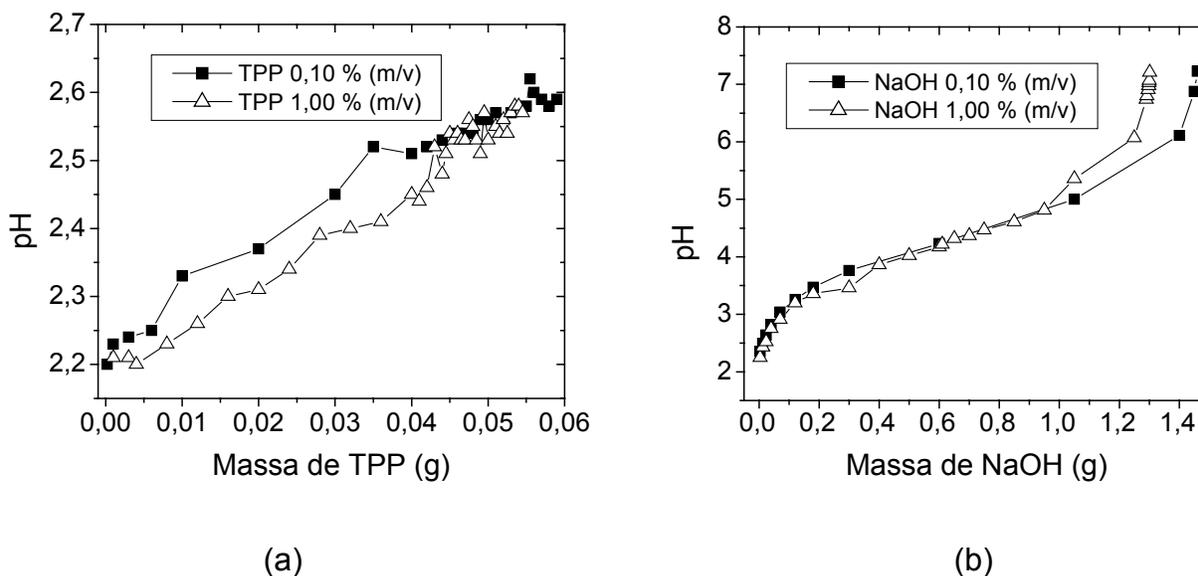
Observa-se, nas Figuras 10 (b) e (c), a presença de duas populações de partículas para menores quantidades de TPP. No entanto, à medida que a

quantidade de TPP aumenta, há redução da população maior até que a mesma desapareça e as partículas concentram-se na menor população. Na iminência da precipitação das partículas há apenas esta população. Este comportamento deve-se à forte interação entre o TPP com as cadeias da quitosana, de modo que o cisalhamento não é suficiente para o rompimento das partículas. Além disso, as interações iônicas nesta etapa evitam a presença de cadeias poliméricas não gelificadas ou livres. O enovelamento das cadeias poliméricas decorrentes das interações eletrostáticas possibilita a encapsulação de bioativos na matriz formada. A possibilidade de interação entre o TPP e a quitosana pode resultar da carga negativa do fosfato trivalente, três unidades glucosamina das quitosana.

Ainda nas Figuras 9 e 10 (a, b ou c), os gráficos de distribuição de tamanhos mostram através da redução do tamanho das partículas, a contração do polímero e interação com o agente de gelificação. Antes da adição do agente de gelificação, o tamanho da partícula era de 2.000 nm, que corresponde à cadeia de polímero distendida. Com a adição do agente de gelificação observa-se redução no diâmetro médio das partículas, decorrente da contração das cadeias poliméricas devido às interações agente-polímero. No caso da gelificação com NaOH a melhor distribuição de tamanhos foi obtida com 1,00 % de concentração, enquanto que com o TPP a distribuição foi mais estreita para a concentração de 0,10 % (m/v).

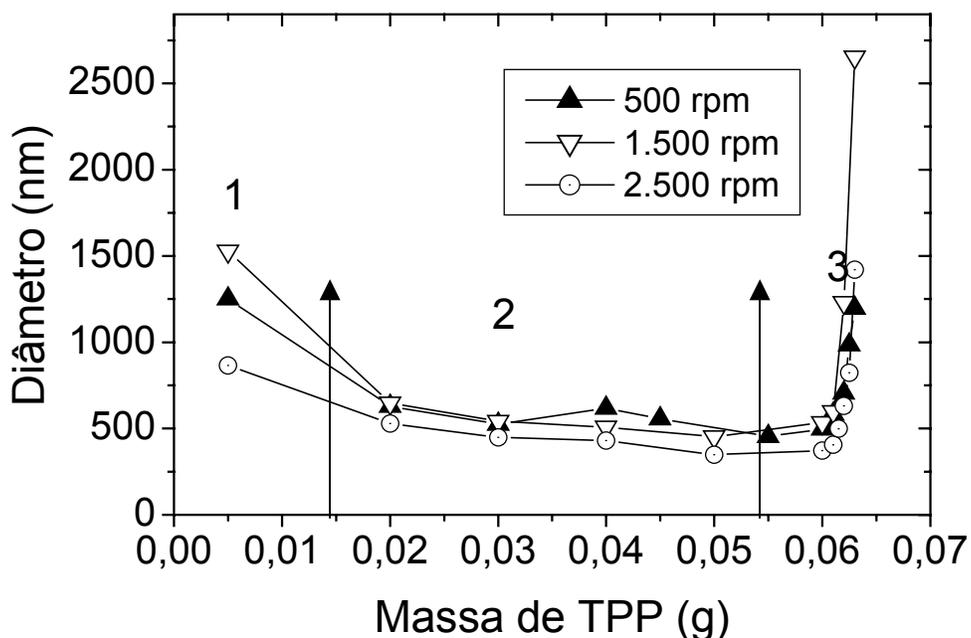
A Figura 12 relaciona os valores de pH observados para cada ponto das Figuras 9 (a) e 10 (a). A complexação do polímero com o agente de gelificação por interação eletrostática, com conseqüente neutralização das cargas e redução da solubilidade da quitosana, é a força motriz para a formação das partículas, e no caso do NaOH tem-se também a redução da solubilidade do polímero pelo aumento do pH da solução, como pode ser visto na Figura 12. Para o TPP a variação do pH foi menor que uma unidade. Observa-se, para as duas concentrações, que para o TPP há uma pequena diferença entre os valores de pH (Figura 12 (a)), ao contrário dos valores para o NaOH (Figura 12 (b)) que estão praticamente sobrepostos. O NaOH além de ser uma molécula bem menor que o TPP, suas interações com as cargas da quitosana não são tão intensas como as do TPP, desta forma a homogeneidade do meio é mais favorecida pelo cisalhamento da agitação, independentemente da concentração de NaOH.

A concentração maior do TPP, aliada à sua interação mais intensa com a quitosana, dificulta a homogeneização do meio reacional e o aumento do pH da solução de quitosana, ao contrário da menor concentração de TPP, cuja homogeneização é mais fácil.



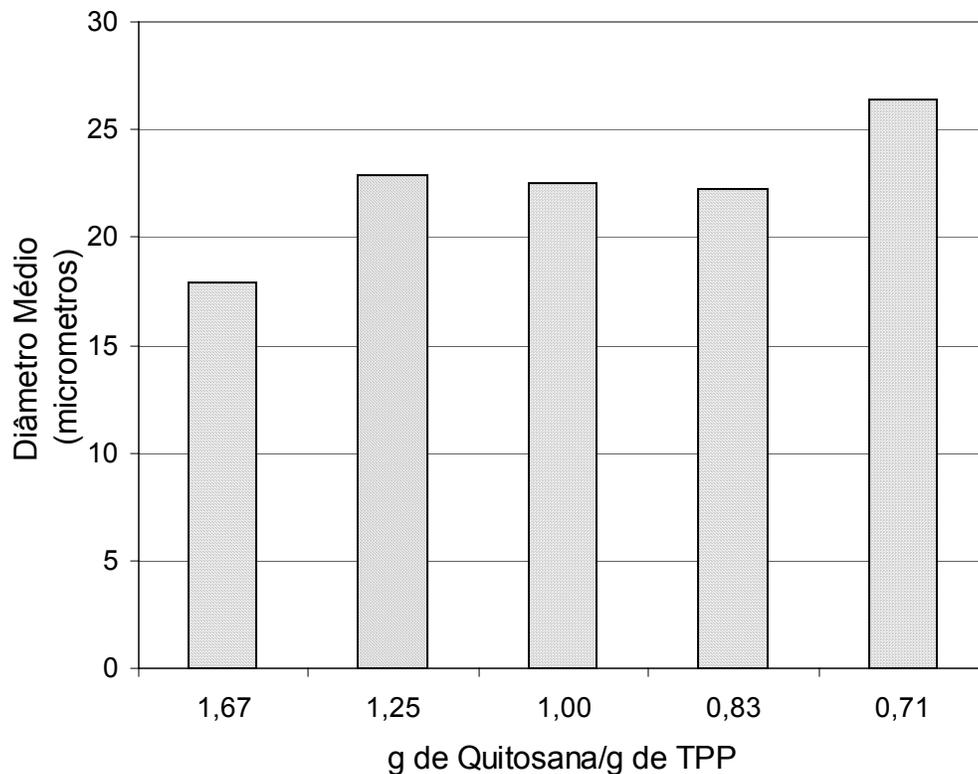
**FIGURA 12.** Variação do pH durante a formação das partículas: (a) tripolifosfato de sódio, (b) hidróxido de sódio.

Os resultados do efeito da velocidade da agitação mecânica no diâmetro médio das partículas são mostrados na Figura 13. Apesar das diferenças não serem muito expressivas, observa-se que quanto maior a velocidade de agitação, menor o diâmetro médio atingido no patamar da região 2, isto porque o cisalhamento é mais intenso. Na região 1, logo após o início da adição da primeira alíquota de TPP, é possível observar que a velocidade de agitação tem efeito maior no diâmetro médio das partículas. A Figura 13 também mostra que a quantidade de TPP em que ocorre a precipitação das partículas é independente da velocidade de agitação, ou seja, existe uma razão mássica definida entre a quitosana e o TPP.



**FIGURA 13.** Influência da velocidade de agitação mecânica no diâmetro médio das partículas.

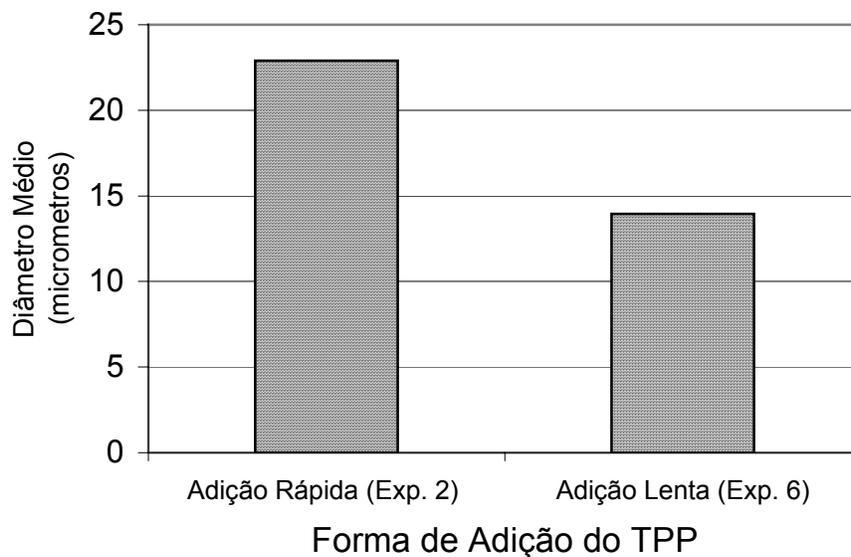
Foi selecionada a solução de TPP com concentração igual a 1,00 % (m/v) para estudar o efeito da quantidade de TPP após a precipitação das partículas, ou seja, na região 3 quando a razão mássica é menor que 2 g de quitosana/g de TPP. A Figura 14 mostra os valores do diâmetro médio de micropartículas obtidas com quantidades excessivas de TPP. Observa-se que as micropartículas apresentaram diâmetro aproximado de 22  $\mu\text{m}$ , com exceção dos experimentos para razão de 1,67 e 0,71 g de quitosana/g de TPP, que apresentaram, o menor (17,92  $\mu\text{m}$ ) e maior (26,36  $\mu\text{m}$ ) diâmetro médio, respectivamente.



**FIGURA 14.** Comparação entre os diâmetros médios das partículas utilizando diferentes razões mássicas de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP) correspondente à região 3 de precipitação.

A Figura 15 mostra o efeito do tempo de adição do TPP no tamanho das partículas. Em ambos os experimentos, foram utilizadas as mesmas quantidades de TPP. Observa-se que ao fazer a adição lenta do TPP há uma redução no diâmetro médio das partículas. Nessas condições, o meio reacional dispõe de tempo maior para o arranjo ordenado das cadeias poliméricas na formação das partículas, e este arranjo, em tese mais ordenado, possibilita a obtenção de partículas menores. A adição lenta do TPP favorece sua difusão no interior das cadeias de quitosana, favorecendo maiores interações entre as cargas negativas do TPP e as cargas positivas da quitosana tornando as partículas menores. Por outro lado, a adição rápida do TPP dificulta sua difusão, conseqüentemente a neutralização das cargas positivas da quitosana é dificultada. Além disto, a adição rápida também pode promover a reticulação da superfície da partícula que dificulta

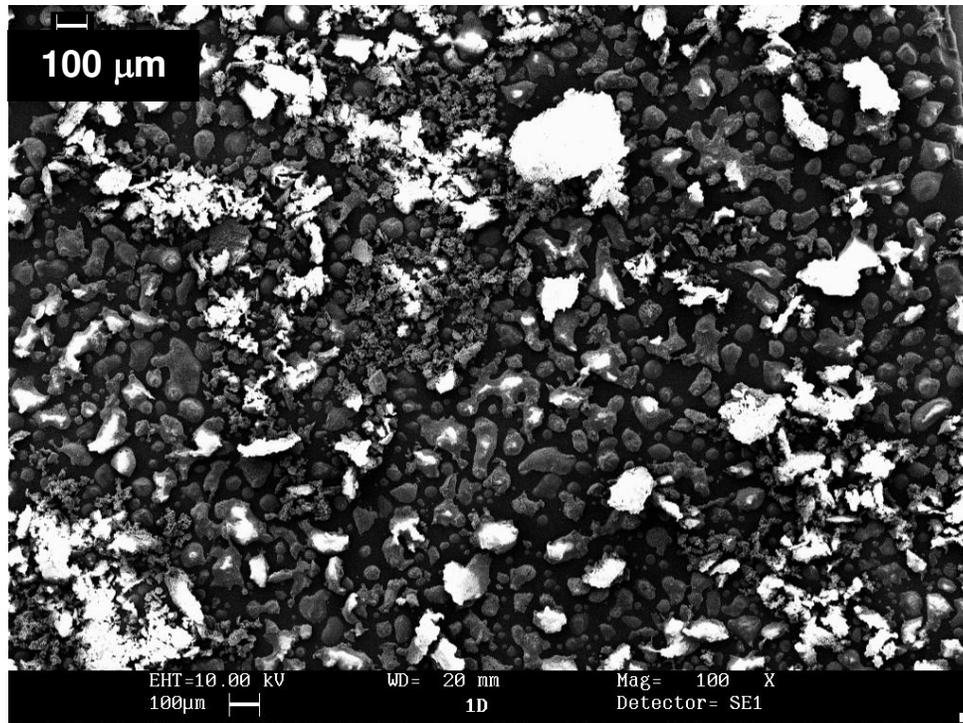
a interiorização do TPP, conseqüentemente, com o interior menos reticulado, as cadeias de quitosana permanecem mais estendidas e as partículas obtidas são maiores.



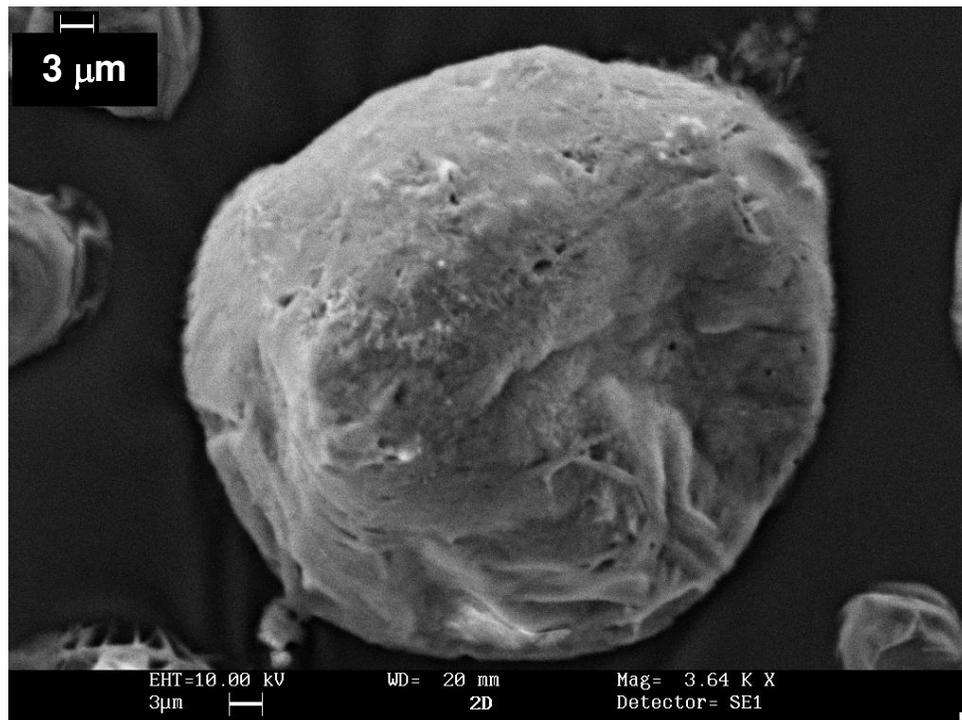
**FIGURA 15.** Comparação entre os diâmetros médios das partículas para duas formas de adição de uma mesma quantidade de tripolifosfato de sódio (TPP).

#### **4.1.4.3. Morfologia das Partículas**

A Figura 16 (a e b) mostra as micrografias da amostra de micropartículas secas obtidas para 1,00 % (m/v) de TPP. Observa-se pela Figura 16 (a) que a população é predominantemente de partículas esféricas. A presença de estruturas amorfas com brilho intenso (de coloração branca), deve-se provavelmente aos efeitos de artefatos na preparação das amostras. A fotografia da superfície de uma partícula esférica é mostrada na Figura 16 (b). É possível verificar que a partícula apresenta superfície rugosa com presença de alguns poros.



(a)

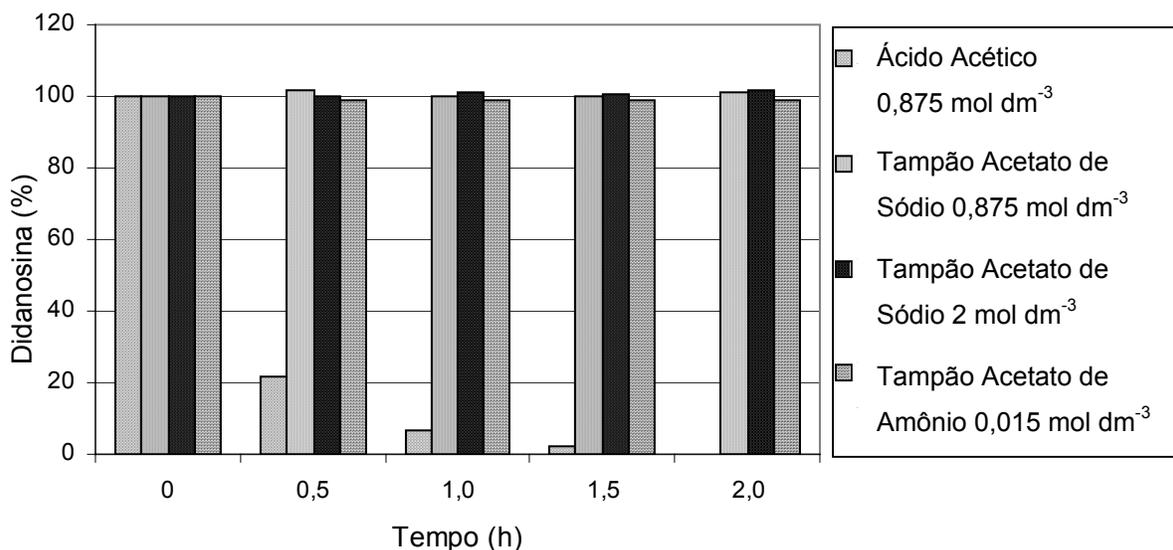


(b)

**FIGURA 16.** Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura: (a) (aumentada 100 vezes) (b) (aumentada 3.640 vezes). partículas de quitosana obtidas com 1,00 % (m/v) de TPP.

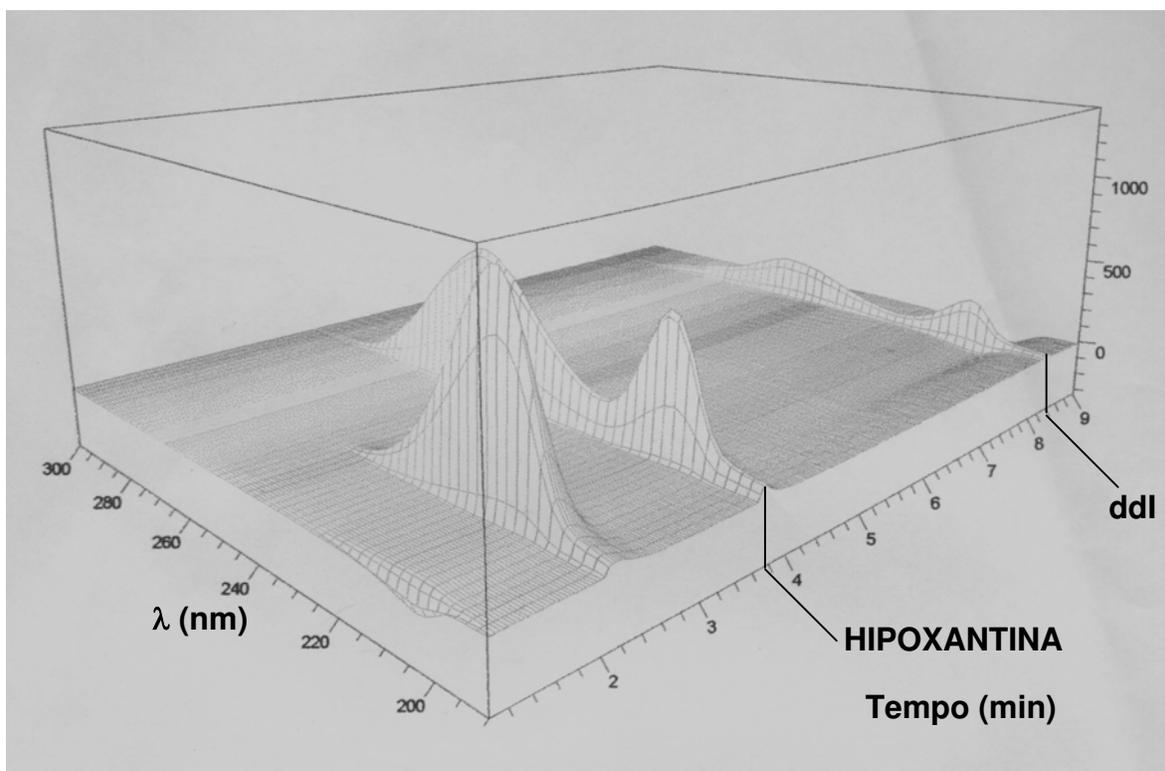
#### 4.1.5. Estabilidade da Didanosina em Solução

Para todas as soluções tampões estudadas observou-se que a ddl manteve-se estável no tempo estudado de 2 h, indiferentemente da concentração do tampão acetato de sódio (0,875 e 2 mol dm<sup>-3</sup>) e do tipo de tampão, acetato de sódio ou amônio. Para estes ensaios não houve variação maior que 1 % da massa inicial da ddl utilizada no teste, com exceção da solução de ácido acético (0,875 mol dm<sup>-3</sup>, ou seja, com a mesma concentração de ácido acético contido na solução de quitosana). Para esta solução, 97,83 % da ddl foi degradada em 1,5 h. A Figura 17 mostra esta degradação através da porcentagem mássica da ddl em relação à massa total inicial.



**FIGURA 17.** Influência do solvente na degradação da didanosina em função do tempo.

O cromatograma tridimensional da Figura 18 mostra os picos da ddl (8,3 min) e da hipoxantina (3,7 min), o produto da degradação. Observa-se que todos estes compostos apresentam absorbância máxima no comprimento de onda de 248 nm. Este fato dificulta a análise da ddl por técnicas espectrofotométricas, a menos que seja garantida sua estabilidade meio.



**FIGURA 18.** Cromatograma tridimensional da didanosina e hipoxantina em solução de ácido acético ( $0,875 \text{ mol dm}^{-3}$ ) após 90 min.

#### **4.1.6. Incorporação da Didanosina em Partículas de Quitosana**

##### **4.1.6.1. Incorporação Durante a Formação das Partículas**

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para a incorporação do fármaco durante a formação das partículas. A eficiência de incorporação variou de 7 a 10 %, observando-se que o aumento da concentração do fármaco promoveu aumento da eficiência de incorporação para ambas as concentrações de quitosana (ensaios 1 e 4). A baixa eficiência de incorporação deve-se a menor porosidade da matriz polimérica preparada com excesso de TPP (0,5 g de Quitosana/g de TPP, correspondente à região 3) relativo à concentração de precipitação das micropartículas. Essas condições, apesar de garantirem a separação total da quitosana no sobrenadante e possibilitarem a análise precisa da ddl no sobrenadante, conduziram a matrizes com elevada resistência difusional interna, mesmo para moléculas de baixa massa molar como a ddl

(236,23 g mol<sup>-1</sup>). Isto também pode ser comprovado com o aumento da incorporação quando se aumenta a quantidade de quitosana na solução para uma mesma quantidade de ddl. A partir desses resultados, infere-se que a difusão intrapartícula é, portanto, a etapa controladora do processo de incorporação.

A Tabela 13 mostra que na presença de tampão acetato de amônio as eficiências de incorporação foram menores do que com tampão acetato de sódio. Um fato que deve ser considerado neste caso é que o tampão acetato de amônio (0,015 mol dm<sup>-3</sup>) é muito mais diluído que o tampão acetato de sódio (0,875 mol dm<sup>-3</sup>), o que diminuí a força iônica do meio.

A repetição dos ensaios 4 e 6 da Tabela 13 mostra a variação em termos de eficiência de incorporação é relativamente pequena, cerca de 1 % de variação entre as repetições. No entanto, quando se compara, por exemplo, as massas incorporadas nas repetições do ensaio 4 foram 10,06 e 8,91 mg, o que mostra que a variação entre os valores é quase 10%. Mas é importante levar em consideração que a magnitude dos valores de massa incorporada destes ensaios é aceitável, uma vez que as comparações devem ser feitas em relação à massa inicial de ddl ou mesmo pelos valores da eficiência de incorporação.

**TABELA 13.** Eficiência de incorporação e massa incorporada para diferentes concentrações de quitosana e didanosina (ddl).

Ensaio	Concentração de Quitosana (%)	Massa de ddl (mg)	Massa Incorporada (mg)	Eficiência de incorporação (%)
1	0,25	50	3,52	7,16
2	0,25	100	8,25	8,25
3	0,50	50	4,38	8,91
4	0,50	100	10,06	10,07
			8,91**	8,98**
5	0,50	100	7,53	8,04
6*	0,50	100	8,86	8,92
			7,79**	7,85**

OBS: No ensaio 5 utilizou-se tampão acetato de amônio, nos demais ensaios foi utilizado tampão acetato de sódio; \*Adição intercalada de TPP (1/5), didanosina e TPP (4/5); \*\* Repetições do ensaio.

Os experimentos da Tabela 13 utilizaram 0,5 g de quitosana/g de TPP, ou seja, quantidade maior de TPP se comparado os trabalhos de VILA *et al.* (2002) e JANES *et al.* (2001)<sup>A</sup> que utilizaram a mesma técnica. VILA *et al.* (2002) encapsularam insulina e toxóide tetânico e obtiveram eficiência de encapsulação de 94,7 e 55,1 %, respectivamente, utilizando 6 g de quitosana/ g de TPP. Por outro lado, JANES *et al.* (2001)<sup>A</sup> obtiveram valores de 9 a 22 % para a encapsulação da doxorrubicina utilizando 3 g de quitosana/g de TPP. Estes trabalhos indicam que o aumento na quantidade de TPP, reduz a eficiência de encapsulação.

Também se observa, a partir da Tabela 14 que este ensaio apresentou a maior porcentagem mássica de composto degradado (hipoxantina) no sobrenadante. Esta degradação é provavelmente maior porque a solução de quitosana 0,50 % (m/v) apresenta pH igual a 3,01, mas quando se faz a adição da solução contendo o agente gelificante e a ddl em solução tampão acetato de amônio ( $0,015 \text{ mol dm}^{-3}$  e pH = 6,69), o pH aumenta para 3,30. No caso do tampão acetato de sódio (ensaios 1 a 4), o pH aumentou de 3,01 para 4,70 e a degradação da ddl foi menor.

A didanosina em estudo apresenta biodisponibilidade oral de cerca 42 %. Esta biodisponibilidade é baixa porque ocorre a sua degradação no suco gástrico antes mesmo de chegar ao intestino, além da absorção relativamente moderada. A biodisponibilidade seria ainda menor se não fosse a presença de tampões no excipiente do comprimido. A dosagem diária da ddl, nesta condição tamponada, é de 200 mg duas vezes ao dia, desta forma aproximadamente 84 mg de ddl é absorvida pelo intestino. Se considerarmos que a quantidade de 200 mg de ddl deve ser incorporada, deveremos ter comprimidos ainda grandes, já que as quantidades de quitosana mostradas na Tabela 14 são relativamente altas, isto sem contar com a massa de TPP que é incorporada à partícula de quitosana.

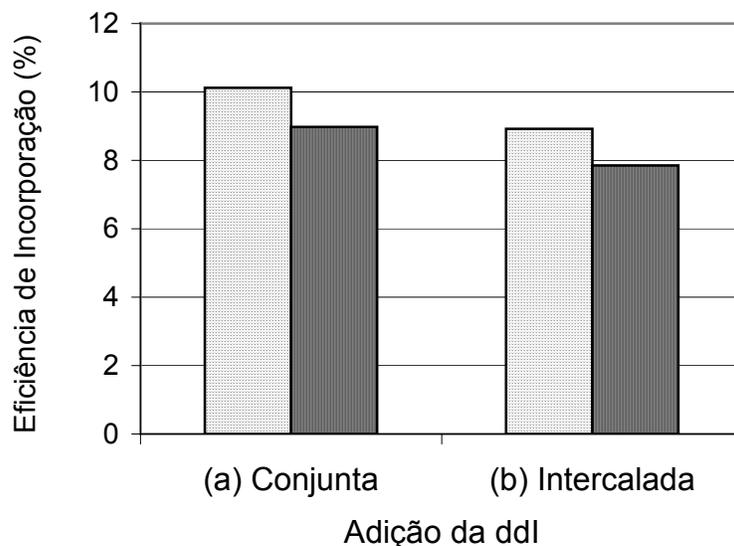
A Tabela 14 mostra ainda que os ensaios 2 e 3 apresentaram, a melhor e a pior relação de massa de ddl por massa de quitosana respectivamente, o que conseqüentemente influi nas quantidades de quitosana necessária para incorporar 200 mg de ddl.

**TABELA 14.** Porcentagem mássica final de hipoxantina, quantidade de quitosana para incorporar 200 mg de didanosina (ddl) e relação mássica entre didanosina e quitosana.

Ensaio	Porcentagem mássica final de hipoxantina	mg de ddl incorporada/mg de quitosana	Quantidade de quitosana (em grama) necessária para incorporar 200 mg de ddl
1	0,16	0,070	2,857
2	0,05	0,164	1,219
3	0,10	0,035	5,714
4	0,08	0,082	2,439
	0,13	0,089	2,247
5	0,29	0,075	2,666
6*	0,12	0,089	2,247
	0,14	0,078	2,564

\*Adição intercalada de TPP (1/5), didanosina e TPP (4/5)

A Figura 19 mostra que a adição conjunta favorece a incorporação da ddl e também que os ensaios 4 (adição conjunta) e 6 (adição intercalada) apresentam boa repetibilidade. O ensaio 6, semelhante ao ensaio 4, foi realizado com a finalidade de verificar o efeito da adição separada de ddl e TPP. Inicialmente 1/5 da quantidade de TPP é adicionada, há a formação de nanoesferas (região 2), em seguida a ddl é adicionada e finalmente ocorre a precipitação com a adição do TPP restante (4/5). De acordo com o teste-t, com 95 % de confiança, não há diferenças significativas entre as eficiências de incorporação dos ensaios 6 e 4. Desta forma, para maior simplicidade do processo, a adição conjunta de TPP e ddl foi escolhida para as etapas posteriores do trabalho.



**FIGURA 19.** Eficiência de incorporação da didanosina durante a formação de micropartículas de quitosana em função da sua forma de adição.

#### **4.1.6.2. Incorporação por Hidratação das Partículas Secas Pré-Formadas.**

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos para a incorporação da ddl através da hidratação das partículas secas pré-formadas. Nos ensaios foi utilizado 0,2 g de micropartículas secas em 40 cm<sup>3</sup> de meio. A massa das micropartículas foi calculada tomando como base a concentração obtida após a liofilização, 0,005 g de micropartículas/cm<sup>3</sup>. Observa-se que a eficiência de incorporação é muito baixa se comparada com os valores obtidos quando a ddl é incorporada durante a formação de partículas.

A incorporação por impregnação apresentou valores mais baixos de eficiência se comparados com aqueles obtidos para a incorporação durante a formação das partículas. Essas diferenças devem-se provavelmente à presença de poros pequenos, formados durante a reticulação com excesso de TPP, limitando assim a difusão da ddl para o interior da partícula e, portanto, a sua incorporação. Nesse caso, as limitações difusivas são muito mais intensas que para a incorporação durante a formação das partículas.

Também é possível observar que o tempo necessário para atingir o equilíbrio na impregnação é bem próximo de 1 h, já que em 12 h não houve alteração significativa na eficiência de incorporação.

**TABELA 15.** Eficiência de incorporação da didanosina (ddl) em micropartículas de quitosana pré-formadas.

Massa de ddl (mg)	Tempo de Impregnação das Micropartículas com a ddl (h)	Eficiência de incorporação (%)
50	1	1,37
	12	1,97
100	1	2,23
	12	2,45

A incorporação de bioativos em micropartículas de quitosana previamente formadas também foi estudada por diversos autores. BERTHOLD *et al.* (1996) encapsularam fosfato de prednisolona sódico através da adsorção do anti-inflamatório em microesferas de quitosana previamente preparadas pela técnica de precipitação com sulfato de sódio. Através da variação da razão fármaco/microesferas, os autores obtiveram valores de eficiência de incorporação que variaram de 23 a 80 %.

Diclofenaco de sódio foi incorporado por KUMBAR *et al.* (2002) através da sua adsorção em microesferas de quitosana preparadas pela técnica da emulsão. As partículas previamente formadas foram incubadas em solução de diclofenaco de sódio e os resultados mostraram que a eficiência de incorporação variou de 15 a 30 % dependendo do agente de reticulação e da sua concentração.

LUBBEN *et al.* (2001) também estudaram a incorporação da ovoalbumina como um composto modelo de vacinas lábeis no meio gástrico, obtendo eficiência de incorporação da ordem de 40 %.

A comparação desses resultados da literatura com os obtidos neste trabalho mostra a importância do contato entre polímero e material a ser incorporado, promovido pelo método de incorporação, e do agente reticulante e intensidade de reticulação, responsáveis pela formação dos poros nas micropartículas.

## **4.2. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS**

### **4.2.1. Preparação das Microesferas**

A técnica de planejamento fatorial foi utilizada para maximizar a eficiência de incorporação da ddl. As variáveis estudadas foram: concentração de TPP (% de TPP em relação à massa de quitosana), concentrações de quitosana e ddl.

O planejamento fatorial tipo estrela é indicado quando as equações das superfícies de resposta apresentam comportamento não linear, ou seja, quadrático. Em um primeiro momento foi realizado um planejamento simples (oito ensaios e mais três repetições no ponto central), que possibilita apenas o ajuste de modelos lineares, mas estes não apresentaram bons ajustes. Além disto, o programa STATISTICA, através do módulo de planejamento experimental, possibilitou a checagem da curvatura das superfícies de resposta do planejamento fatorial simples, ou seja, a verificação do seu comportamento não linear. Tal checagem confirmou a curvatura das superfícies e o planejamento fatorial foi refeito com o tipo estrela, composto de oito ensaios mais três repetições no ponto central e seis pontos axiais.

As soluções tampões utilizadas nas etapas anteriores não possibilitaram aumento suficiente do pH para valores seguros no que diz respeito à estabilidade da ddl, apesar de que em nenhum dos experimentos a sua degradação foi significativa como mostrado na Tabela 14. Inicialmente, uma das estratégias para o aumento do pH foi o uso de soluções mais concentradas de tampão, no entanto o aumento não foi suficiente para atingir valores de pH maiores que 7,00. No planejamento de experimentos optou-se pelo uso do hidróxido de magnésio como tamponante do meio reacional de formação das partículas, pois este é normalmente utilizado como tampão para a ddl nos comprimidos comerciais. Além disto, o hidróxido de magnésio garante de forma mais eficiente a elevação do pH durante a preparação das partículas. Foram realizados estudos preliminares para determinar a menor quantidade de hidróxido de magnésio, necessária para elevar o pH durante a formação das partículas e garantir um meio básico capaz de manter a ddl estável no meio. A quantidade utilizada de hidróxido de magnésio foi de 30 % em relação à massa de quitosana do experimento.

A quantidade necessária de ácido acético para solubilizar toda a quitosana foi determinada para cada concentração de quitosana utilizada no planejamento de experimentos. Esta quantidade foi baseada em testes onde soluções de mesmas concentrações de quitosana foram solubilizadas com quantidades diferentes de ácido acético. Após a visualização a olho nu e no microscópio ótico foi possível estabelecer qual a quantidade mínima de ácido acético necessária para solubilização total da quitosana. Minimizando-se a quantidade de ácido acético, obtém-se soluções de quitosana com valores de pH mais elevados, o que é desejável para preservar a estabilidade da ddl. Nas etapas anteriores deste trabalho, as soluções de quitosana foram obtidas com excesso de ácido acético e conseqüentemente, os valores de pH foram mais baixos. A Tabela 16 mostra as concentrações de ácido acético utilizadas para a solubilização de diferentes concentrações de quitosana. Nesses ensaios o pH inicial da solução de quitosana foi ajustado em 4,80.

**TABELA 16.** Relação das concentrações de quitosana e ácido acético.

Concentração de Quitosana (%) (m/v)	Concentração de Ácido Acético (%) (v/v)
1,33	0,46
2,00	0,75
3,00	1,00
4,00	1,25
4,67	1,87

Esses experimentos de incorporação foram todos realizados tomando como base 60 cm<sup>3</sup> de solução A (Quitosana) e 60 cm<sup>3</sup> de solução B (TPP, Mg(OH)<sub>2</sub> e ddl). A adição lenta (tempo de adição ~ 1 min), da solução B à solução A, foi realizada sob agitação mecânica a 4.500 rpm. A velocidade de agitação, três vezes maior do que a utilizada nos experimentos do item 4.1.3.6.1, foi estabelecida para garantir a homogeneidade do meio, devido ao aumento da concentração de quitosana nas soluções. O tempo de agitação de 90 min, muito maior do que o tempo dos experimentos do item 4.1.3.6.1 (tempo de agitação = 1,5 min), também foi estabelecido para garantir a homogeneidade e equilíbrio no meio reacional.

Devido ao  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , em menos de 5 min o pH do meio reacional atingiu valores maiores que 7,00. Após 90 min, a suspensão de partículas foi centrifugada e a ddl foi quantificada no sobrenadante através do método espectrofotométrico. As partículas foram congeladas através de uma única imersão em nitrogênio líquido e liofilizadas durante 48 h para realização posterior dos testes de liberação e intumescimento. Antes da liofilização as partículas foram observadas no microscópio ótico para determinação da distribuição de diâmetros.

As Tabelas 17 e 18 mostram os níveis das variáveis e o planejamento fatorial proposto.

A escolha dos níveis da concentração de quitosana baseou-se nos resultados obtidos anteriormente. Nas etapas anteriores utilizaram-se soluções de quitosana com concentrações relativamente baixas, 0,25 e 0,50 % que forneceram eficiências de incorporação também baixas (7 a 10 %). Observou-se que o aumento da concentração promoveu aumento da eficiência, e desta forma optou-se por utilizar soluções ainda mais concentradas visando o aumento da eficiência de incorporação.

A razão mássica entre quitosana e o agente reticulante utilizada anteriormente foi de 0,5 g de quitosana/g de TPP, ou seja, na região 3 (de precipitação das micropartículas - Figura 10 (a)). Também visando aumento na eficiência de incorporação, optou-se por trabalhar com quantidades menores de TPP uma vez que muitos trabalhos relatam que o aumento da quantidade de agente reticulante promove redução na eficiência de incorporação. Escolheu-se 20,00 % de TPP (quantidade relativa à massa de quitosana) como nível (+1), que corresponde a razão mássica igual a 5 g de quitosana/g de agente reticulante, ou seja, o início da região 2, que é a região de nanopartícula na Figura 10 (a).

Raciocínio análogo foi utilizado para a concentração de ddl. Escolheu-se  $25 \text{ mg cm}^{-3}$  como nível (+1) pois este valor é muito próximo da solubilidade da ddl ( $27,3 \text{ mg cm}^{-3}$  segundo a bula do Videx<sup>®</sup> EC).

**TABELA 17.** Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial.

Variável	Níveis				
	-1,67	-1	0	+1	+1,67
(1) Concentração de ddl ( $\text{mg cm}^{-3}$ )	8,29	12,50	18,75	25,00	29,20
(2) Concentração de Quitosana (%)	1,33	2,00	3,00	4,00	4,67
(3) Concentração de TPP (%)*	6,63	10,00	15,00	20,00	23,36

\* porcentagem de TPP em relação à massa de quitosana.

**TABELA 18.** Experimentos propostos pelo planejamento fatorial.

Experimento	Concentração de TPP (%)	Concentração de Quitosana (%)	Concentração de ddl ( $\text{mg cm}^{-3}$ )
1	10,00	2,00	12,50
2	20,00	2,00	12,50
3	10,00	4,00	12,50
4	20,00	4,00	12,50
5	10,00	2,00	25,00
6	20,00	2,00	25,00
7	10,00	4,00	25,00
8	20,00	4,00	25,00
9 (ponto central)	15,00	3,00	18,75
10 (ponto central)	15,00	3,00	18,75
11 (ponto central)	15,00	3,00	18,75
12 (ponto axial)	15,00	3,00	8,29
13 (ponto axial)	15,00	3,00	29,20
14 (ponto axial)	15,00	1,33	18,75
15 (ponto axial)	15,00	4,67	18,75
16 (ponto axial)	6,63	3,00	18,75
17 (ponto axial)	23,36	3,00	18,75

Os efeitos de cada variável e suas interações foram calculados pelo programa STASTISTICA, versão 5.0. Foi realizada a análise de regressão, ou ajuste por mínimos quadrados, do modelo quadrático aos resultados obtidos a partir do planejamento experimental. A partir destes cálculos foram obtidos os coeficientes dos polinômios ajustados.

Os parâmetros destes modelos foram calculados de forma a minimizar os resíduos, que são diferenças entre valores observados experimentalmente e os valores estimados pelo modelo. Para que uma regressão seja estatisticamente significativa, ou seja, também útil para fins preditivos, o valor da razão Média Quadrática da Regressão/Média Quadrática dos Resíduos deve ser no mínimo de 4 a 5 vezes o valor tabelado de  $F_{p-1, n-p}$  onde  $p-1$  é o grau de liberdade da regressão e  $n-p$  é o grau de liberdade dos resíduos. Com base nos graus de liberdade das regressões e dos resíduos obtém-se o valor tabelado de  $F$ .

As respostas estudadas neste planejamento de experimentos foram: eficiência de incorporação, carregamento, grau de intumescimento, diâmetro médio das partículas e permeabilidade. A análise das respostas e a discussão dos resultados são apresentadas separadamente nos itens subseqüentes.

### 4.2.2. Eficiência de Incorporação

A Tabela 19 mostra os valores da eficiência de incorporação obtidos para cada um dos experimentos propostos. Os valores da eficiência de incorporação encontrados na literatura, utilizando o mesmo método da gelificação ionotrópica, apresentam uma faixa ampla de valores, semelhantes aos apresentados na Tabela 19. Os resultados obtidos para eficiência de incorporação neste trabalho variaram de 21,46 a 39,86 %, que são considerados relativamente baixos, mas para outros métodos de encapsulação em partículas de quitosana é comum obter valores até menores do que estes, por exemplo, KUMBAR *et al.* (2002) encapsularam diclofenaco de sódio em microesferas de quitosana pelo método da emulsão e obtiveram valores de 15 a 30 %.

**TABELA 19.** Eficiência de incorporação para os experimentos do planejamento fatorial.

Experimento	Concentração de TPP (%)	Concentração de Quitosana (%)	Concentração de ddl (mg cm <sup>-3</sup> )	Eficiência de incorporação (%)
1	10,00	2,00	12,50	22,32
2	20,00	2,00	12,50	24,74
3	10,00	4,00	12,50	36,16
4	20,00	4,00	12,50	36,28
5	10,00	2,00	25,00	25,54
6	20,00	2,00	25,00	26,37
7	10,00	4,00	25,00	37,10
8	20,00	4,00	25,00	39,86
9	15,00	3,00	18,75	27,86
10	15,00	3,00	18,75	28,92
11	15,00	3,00	18,75	27,71
12	15,00	3,00	8,29	28,05
13	15,00	3,00	29,20	30,83
14	15,00	1,33	18,75	21,46
15	15,00	4,67	18,75	36,46
16	6,63	3,00	18,75	30,27
17	23,36	3,00	18,75	30,84

SINGH & UDUPA (1998) também verificaram valores de eficiência de incorporação da mesma ordem dos valores deste trabalho (11 a 28 %), no entanto eles encapsularam metotrexato em microesferas de quitosana pelo método da emulsão/evaporação.

A Tabela 20 compara a eficiência de encapsulação de fármacos durante a formação das partículas de quitosana pelo método da gelificação ionotrópica e reticulação com TPP. Observa-se que a eficiência de encapsulação depende não só do fármaco mas também da sua solução de adição. A maioria dos trabalhos realizou a adição do bioativo à solução de quitosana, sendo que apenas VILA *et al.* (2002) realizaram a adição do bioativo à solução de TPP como neste trabalho.

**TABELA 20.** Eficiência de encapsulação de diversos bioativos em microesferas preparadas pelo método de gelificação ionotrópica com TPP.

Bioativo Encapsulado	Eficiência de encapsulação (%)	Referência
Insulina*	94,7	VILA <i>et al.</i> (2002)
Toxóide Tetânico*	55,1	VILA <i>et al.</i> (2002)
Ciclosporina**	73,4	CAMPOS <i>et al.</i> (2001)
Isotiocianato de Fluoresceína Dextrana**	71,5	SHU & ZHU (2000)
Doxorrubicina**	19,3 - 22,5	JANES <i>et al.</i> (2001) <sup>A</sup>
Albumina Bovina**	80	CALVO <i>et al.</i> (1997) <sup>A</sup>
Oligonucleotídeo (17 mer)**	78 - 93	Calvo <i>et al.</i> (1998) citado por JANES <i>et al.</i> (2001) <sup>B</sup>

NOTA:\* → o bioativo foi adicionado à solução de TPP antes da formação das partículas;  
 \*\* → o bioativo foi adicionado à solução de quitosana antes da formação das partículas.

Especificamente para os dados obtidos (Tabela 19), os graus de liberdade da regressão, dos resíduos, da falta de ajuste e do erro puro foram, respectivamente, 9, 7, 5 e 2. Desta forma, os valores de  $F_{9,7}$  e  $F_{5,2}$ , com 95 % de confiança, respectivamente para a regressão (modelo) e para falta de ajuste, são iguais a 3,68 e 19,30 segundo BRUNS *et al.* (1995). A Tabela 21 mostra a análise de variância do modelo e o teste **F**. Observa-se que a análise da variância do

modelo apresenta uma relação  $F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$  maior do que 4, ao nível de significância de 95 %.

**TABELA 21.** Análise de variância e teste F para eficiência de incorporação, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada =  $r^2 = 95,69$  %).

	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MS)	F	$F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$
Modelo	462,37	9	51,37	17,28	4,70
Erro Total	20,81	7	2,97		
Falta de Ajuste	19,94	5	3,99	9,17	0,47
Erro Puro	0,87	2	0,44		
Total	483,18				

$F_{\text{TAB}}(0,95; 9, 7) = 3,68$ ;  $F_{\text{TAB}}(0,95; 5,2) = 19,30$ .

Segundo BRUNS *et al.* (1995), quanto menor o valor da razão  $F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$  para a falta de ajuste, melhor é o ajuste do modelo. A Tabela 21 mostra que esta razão para a falta de ajuste é menor do que 1, portanto a falta de ajuste do modelo não é significativa. Isto também é evidenciado pelo valor de  $p$ , maior que 0,05, para a falta de ajuste (dado não apresentado).

A proporção de variância devido ao modelo de regressão (soma quadrática da regressão do modelo,  $SS_{\text{MODELO}}$ ) é dada pela diferença entre a variância total da variável dependente (soma quadrática total,  $SS_{\text{TOTAL}}$ ) e proporção de variância devido aos resíduos (soma quadrática do erro total,  $SS_{\text{ERRO TOTAL}}$ ), ou seja,  $SS_{\text{MODELO}} = SS_{\text{TOTAL}} - SS_{\text{ERRO TOTAL}}$ . A partir destes conceitos podemos calcular a razão entre  $SS_{\text{MODELO}}/SS_{\text{TOTAL}}$  que explica a proporção de variância dada à variável dependente pelo modelo, ou seja, a variância explicada, que é equivalente ao  $r^2$  ( $0 \leq r^2 \leq 1$ , o coeficiente de determinação). Esta medida avalia quão bem o modelo ajusta aos dados.

Considerando um intervalo de confiança de 95 %, observa-se pela Tabela 22 que o efeito principal (intercepto) representa o efeito mais significativo

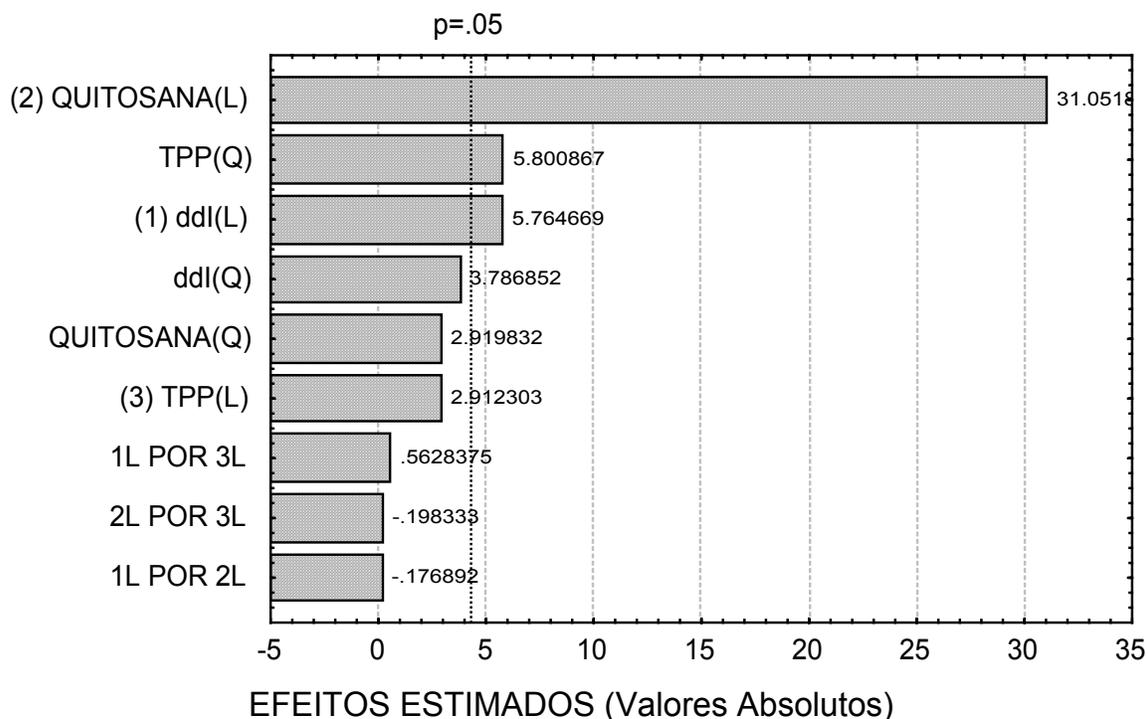
sobre a eficiência de incorporação, seguido pelos efeitos da concentração de quitosana (linear), concentração de TPP (quadrático) e concentração de ddl (linear). Os demais efeitos não apresentaram significância estatística porque seus valores de  $p$  foram maiores que 0,05. Isto também é confirmado no gráfico de Pareto na Figura 20.

Observa-se também pela Tabela 22, que os efeitos de todas as variáveis são positivos, com exceção dos efeitos das interações entre quitosana e ddl e entre quitosana e TPP, que são negativos. Efeito positivo significa que a mudança dos níveis destas variáveis, de (-1) para (+1), representa o aumento da resposta. Por exemplo, de acordo com a Tabela 22, o efeito da concentração de quitosana é 11,11 %, o que significa que o aumento da concentração de quitosana, de 2,00 % (nível = -1) para 4,00 % (nível = +1), promove o aumento de 11,11% na eficiência de incorporação da ddl. Para as demais variáveis o efeito é bem menor, da ordem de 2%.

**TABELA 22.** Estimativa dos efeitos para a eficiência de incorporação, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada =  $r^2 = 95,69$  %).

	Efeito	Erro Puro	$p$
<b>Principal</b>	<b>28,07</b>	<b>0,38</b>	<b>0,0002</b>
<b>(1) ddl (L)</b>	<b>2,06</b>	<b>0,36</b>	<b>0,0288</b>
(1) ddl (Q)	1,50	0,40	0,0632
<b>(2) Quitosana (L)</b>	<b>11,11</b>	<b>0,36</b>	<b>0,0010</b>
(2) Quitosana (Q)	1,15	0,40	0,1000
(3) TPP (L)	1,04	0,36	0,1005
<b>(3) TPP (Q)</b>	<b>2,29</b>	<b>0,40</b>	<b>0,0285</b>
(1) e (2)	-0,08	0,47	0,8759
(1) e (3)	0,26	0,47	0,6302
(2) e (3)	-0,09	0,47	0,8611

OBS: Os efeitos mais significativos ( $p < 0,05$ ) estão destacados em **negrito**.



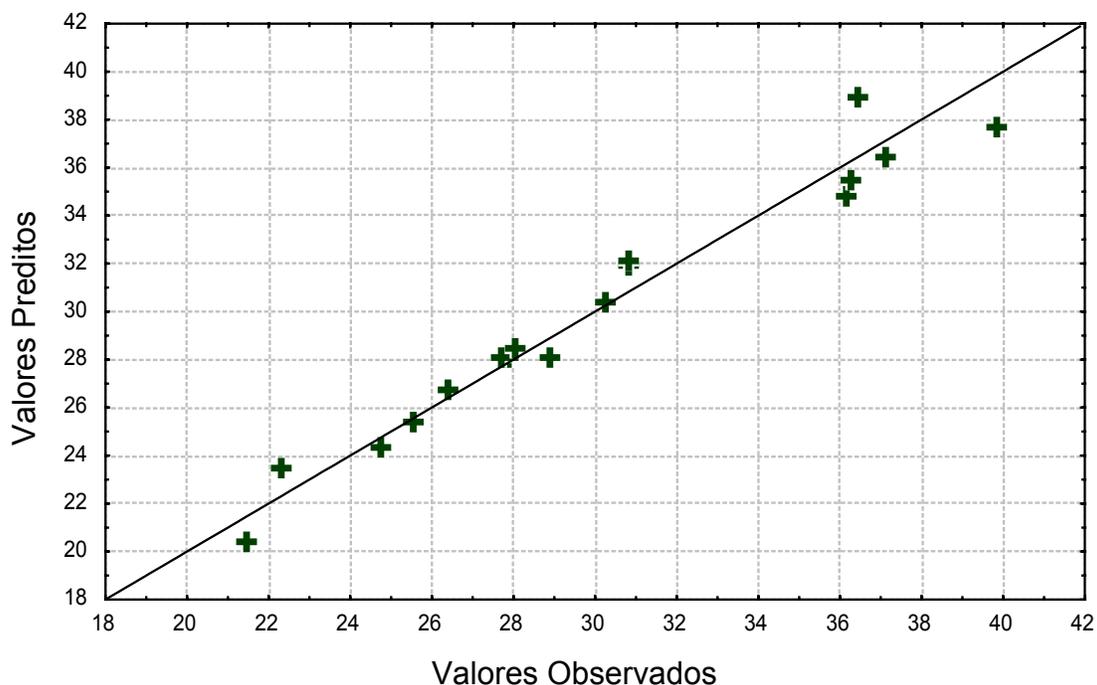
**FIGURA 20.** Gráfico de Pareto para a eficiência de incorporação, com 95 % de intervalo de confiança, obtido para o planejamento fatorial.

A partir do teste **F** e da ótima variância explicada ( $r^2$ ) foi possível gerar um modelo matemático que descreve a eficiência de incorporação. Este modelo é apresentado na equação (3).

$$\begin{aligned} \text{Eficiência} = & 28,07 + 1,03 \times \text{ddl} + 0,75 \times \text{ddl}^2 + 5,55 \times \text{QUIT} + 0,58 \times \text{QUIT}^2 + 0,52 \times \text{TPP} \\ & + 1,15 \times \text{TPP}^2 - 0,04 \times \text{ddl} \times \text{QUIT} + 0,13 \times \text{ddl} \times \text{TPP} - 0,05 \times \text{QUIT} \times \text{TPP} \end{aligned} \quad (3)$$

onde ddl, QUIT e TPP correspondem às variáveis codificadas, respectivamente, concentrações de ddl, de quitosana e de TPP.

A Figura 21 mostra os valores preditos pelo modelo *versus* os valores observados experimentalmente. É possível verificar que o modelo apresenta uma pequena dispersão dos valores preditos em torno da reta, o que é considerado muito bom para o ajuste de um modelo.



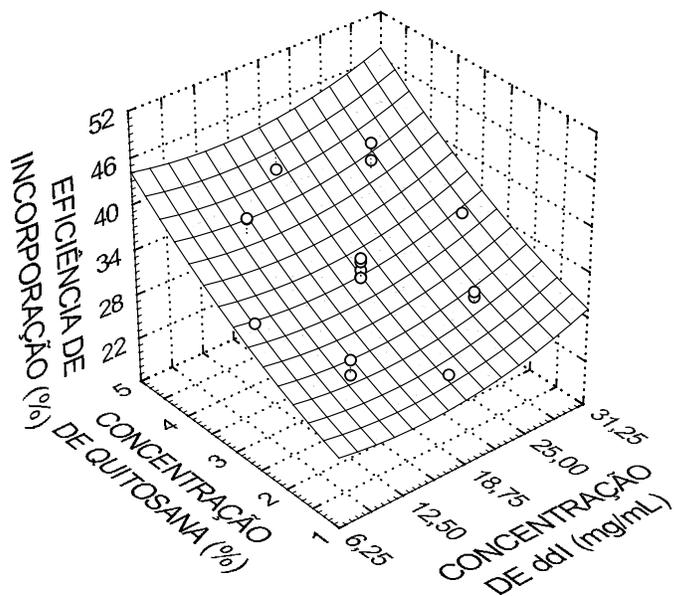
**FIGURA 21.** Valores preditos *versus* valores observados experimentalmente para a eficiência de incorporação.

A superfície de resposta da Figura 22 mostra que a eficiência de incorporação aumenta significativamente com o aumento da concentração de quitosana, independente da concentração de ddl. Este resultado também foi verificado pelos valores dos efeitos apresentados na Tabela 22, cujo o efeito da quitosana sobre a eficiência de incorporação é cerca de cinco vezes maior do que o efeito da ddl. GIUNCHEDI *et al.* (2002), HE *et al.* (1999)<sup>A</sup> e HE *et al.* (1999)<sup>B</sup> observaram resultados semelhantes utilizando a técnica de *spray-drying*. Por outro lado, para uma determinada concentração de quitosana, a variação da concentração de ddl não altera significativamente os valores da eficiência de incorporação.

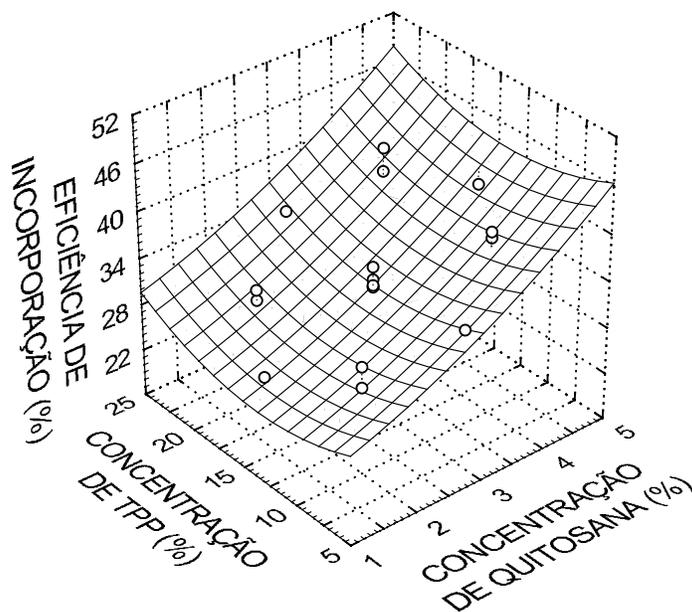
Resultados similares podem ser observados para a concentração de TPP na Figura 23, onde sua variação também pouco afeta a eficiência de incorporação. GENTA *et al.* (1998) também verificaram que o aumento da concentração de glutaraldeído não alterou significativamente a eficiência de incorporação de teofilina em microesferas de quitosana. Estes autores adicionaram o agente reticulante e o fármaco durante a formação das partículas, assim como foi

realizado neste trabalho. KUMBAR *et al.* (2002), ao contrário, incorporaram o bioativo às partículas previamente preparadas e reticuladas. Eles observaram que o aumento da concentração de agente reticulante (glutaraldeído ou ácido sulfúrico) promoveu a redução na eficiência de incorporação.

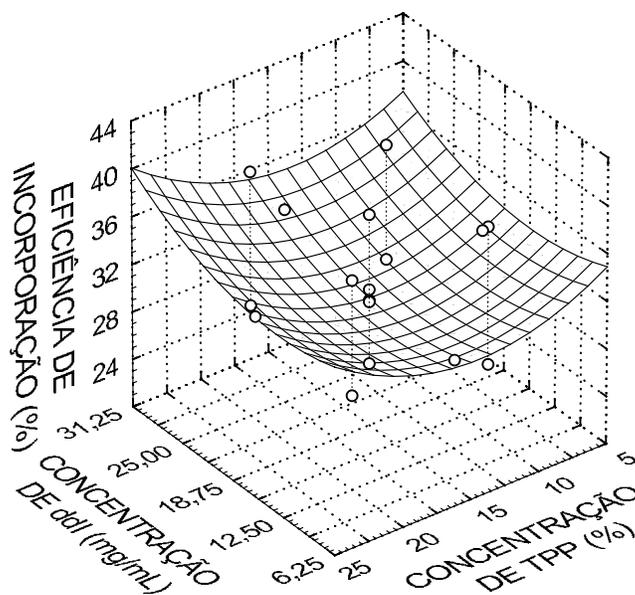
A Figura 24 mostra que existe um mínimo para a eficiência de incorporação, na região próxima do ponto central. À medida que aumenta a concentração de TPP, para um valor fixo de concentração de ddl, há inicialmente uma pequena redução da eficiência de incorporação, seguida por um mínimo e finalmente o aumento da eficiência. Enquanto que um o aumento da concentração de ddl, para uma dada concentração de TPP, promove pequeno aumento na eficiência de incorporação. Resultados contrários foram obtidos por WIN *et al.* (2003) que utilizaram a mesma técnica e observaram que o aumento da concentração de fármaco promove uma breve redução na eficiência de incorporação.



**FIGURA 22.** Superfície de resposta para a eficiência de incorporação em função das concentrações de quitosana e didanosina (ddl).



**FIGURA 23.** Superfície de resposta para a eficiência de incorporação em função das concentrações de quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP).



**FIGURA 24.** Superfície de resposta para a eficiência de incorporação em função das concentrações de tripolifosfato de sódio (TPP) e didanosina (ddl).

### 4.2.3. Carregamento de Didanosina

O carregamento de ddl foi calculado pela equação (4):

$$\text{Carregamento de ddl} = \frac{\text{Massa de ddl Incorporada}}{\text{Massa de Quitosana}} \quad (4)$$

O pH final de todos os experimentos foi maior do que 8,00, portanto pode-se afirmar que toda a quitosana encontra-se presente nas partículas formadas uma vez que o pKa da unidade glucosamina da quitosana é igual a 6,50 (KRAJEWSKA, 2005). Desta forma, os carregamentos foram calculados para cada experimento e são apresentados na Tabela 23. Os valores obtidos para o carregamento são da mesma ordem dos valores de VILA *et al.* (2002) para a encapsulação da insulina e toxóide tetânico utilizando a mesma técnica.

**TABELA 23.** Carregamento de didanosina (ddl) nas partículas de quitosana para os experimentos do planejamento de experimento.

Experimento	Concentração de TPP (%)	Concentração de Quit (%)	Concentração de ddl (mg cm <sup>-3</sup> )	Carregamento (mg de ddl/g de Quit)
1	10,00	2,00	12,50	281
2	20,00	2,00	12,50	312
3	10,00	4,00	12,50	209
4	20,00	4,00	12,50	209
5	10,00	2,00	25,00	643
6	20,00	2,00	25,00	664
7	10,00	4,00	25,00	428
8	20,00	4,00	25,00	460
9	15,00	3,00	18,75	351
10	15,00	3,00	18,75	365
11	15,00	3,00	18,75	349
12	15,00	3,00	8,29	187
13	15,00	3,00	29,20	572
14	15,00	1,33	18,75	509
15	15,00	4,67	18,75	316
16	6,63	3,00	18,75	382
17	23,36	3,00	18,75	389

A Tabela 24 mostra o teste **F** e a análise de variância para o modelo do carregamento. Observa-se que a análise da variância apresenta uma relação  $F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$  maior do que 4, ao nível de significância de 95 %. O valor de  $F_{\text{CALC}}$  é cerca de treze vezes maior que o  $F_{\text{TAB}}$ , ao nível de significância de 95 %, mostrando que o modelo para o carregamento também apresenta significância estatística, além do excelente valor da variância explicada.

**TABELA 24.** Análise de variância e teste **F** para o carregamento, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada =  $r^2 = 98,42\%$ ).

	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MS)	F	$F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$
Modelo	324110,63	9	36012,29	48,38	13,15
Erro Total	5210,80	7	744,40		
Falta de Ajuste	5072,56	5	1014,51	14,68	0,76
Erro Puro	138,24	2	69,12		
Total	329321,43				

$F_{\text{TAB}}(0,95; 9, 7) = 3,68$ ;  $F_{\text{TAB}}(0,95; 5,2) = 19,30$ .

A razão  $F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$  para a falta de ajuste é menor do que 1, portanto não há evidência de falta de ajuste do modelo. Isto também foi verificado para o valor de  $p$  menor que 0,05 para a falta de ajuste (dado não apresentado).

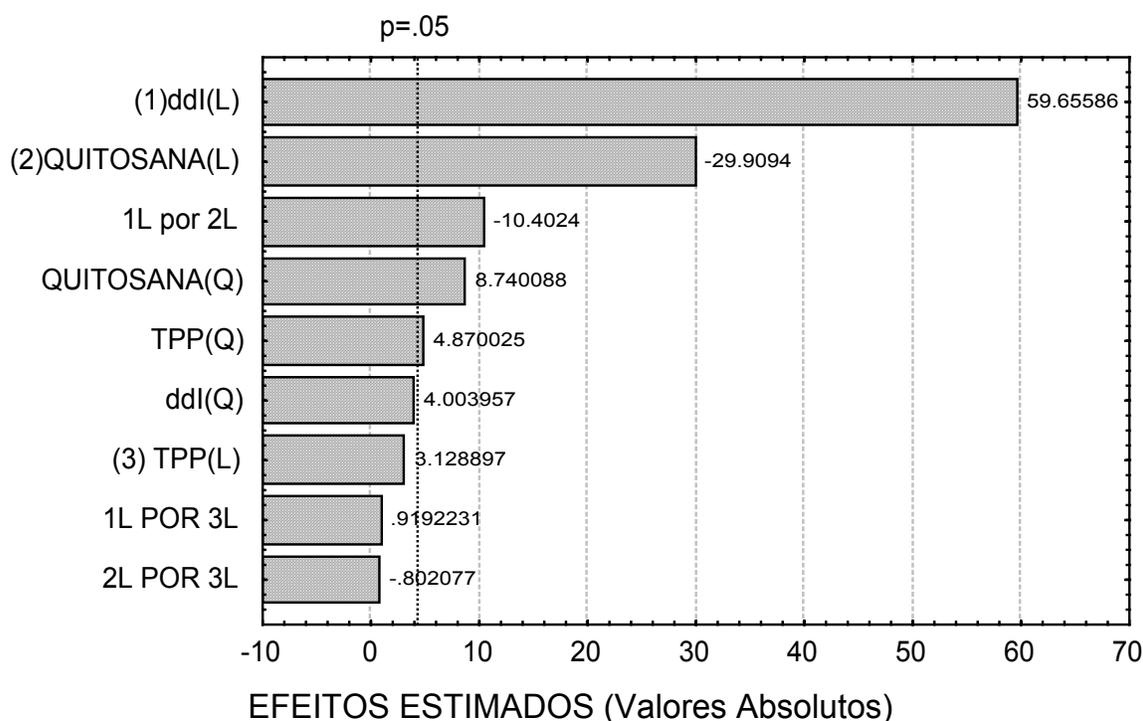
Considerando um intervalo de confiança de 95 %, a Tabela 25 mostra que o efeito principal (intercepto) representa o efeito mais significativo sobre o carregamento das partículas. Seguido pelos efeitos da concentração de ddl (linear), da concentração de quitosana (linear), das interações entre a concentrações de quitosana e ddl, e finalmente a concentração da quitosana (quadrático). Estes efeitos são melhores observados no gráfico de Pareto da Figura 25. É esperado que estas variáveis, concentrações de quitosana e ddl, sejam as mais importantes sobre o carregamento porque este é calculado a partir

da massa de quitosana e massa de ddl incorporada. O aumento da concentração de ddl, de 12,50 para 25,00 mg cm<sup>-3</sup>, promove o aumento do carregamento na ordem de 269 mg de ddl/mg de quitosana, ou seja, um efeito positivo. Por outro lado, o aumento da concentração de quitosana, de 2,00 % para 4,00%, promove a redução do carregamento na ordem de 135 mg de ddl/mg de quitosana, ou seja, um efeito negativo.

**TABELA 25.** Estimativa dos efeitos para o modelo do carregamento de didanosina, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada =  $r^2 = 98,42$  %).

	Efeito	Erro Puro	$p$
<b>Principal</b>	<b>354,55</b>	<b>15,71</b>	<b>0,0002</b>
<b>(1) ddl (L)</b>	<b>268,98</b>	<b>14,80</b>	<b>0,0003</b>
(1) ddl (Q)	19,96	16,36	0,0571
<b>(2) Quitosana (L)</b>	<b>-134,86</b>	<b>14,80</b>	<b>0,0011</b>
<b>(2) Quitosana (Q)</b>	<b>43,57</b>	<b>16,36</b>	<b>0,0128</b>
(3) TPP (L)	14,11	14,80	0,0888
<b>(3) TPP (Q)</b>	<b>24,28</b>	<b>16,36</b>	<b>0,0397</b>
<b>(1) e (2)</b>	<b>-61,15</b>	<b>19,29</b>	<b>0,0091</b>
(1) e (3)	5,40	19,29	0,4550
(2) e (3)	-4,72	19,29	0,5067

OBS: Os efeitos mais significativos ( $p < 0,05$ ) estão destacados em **negrito**.



**FIGURA 25.** Gráfico de Pareto para o carregamento, com 95 % de intervalo de confiança, obtido para o planejamento fatorial.

Baseado nos resultados do teste **F** e no elevado valor da variância, foi possível determinar um modelo matemático para o carregamento. Este modelo é descrito pela equação (5):

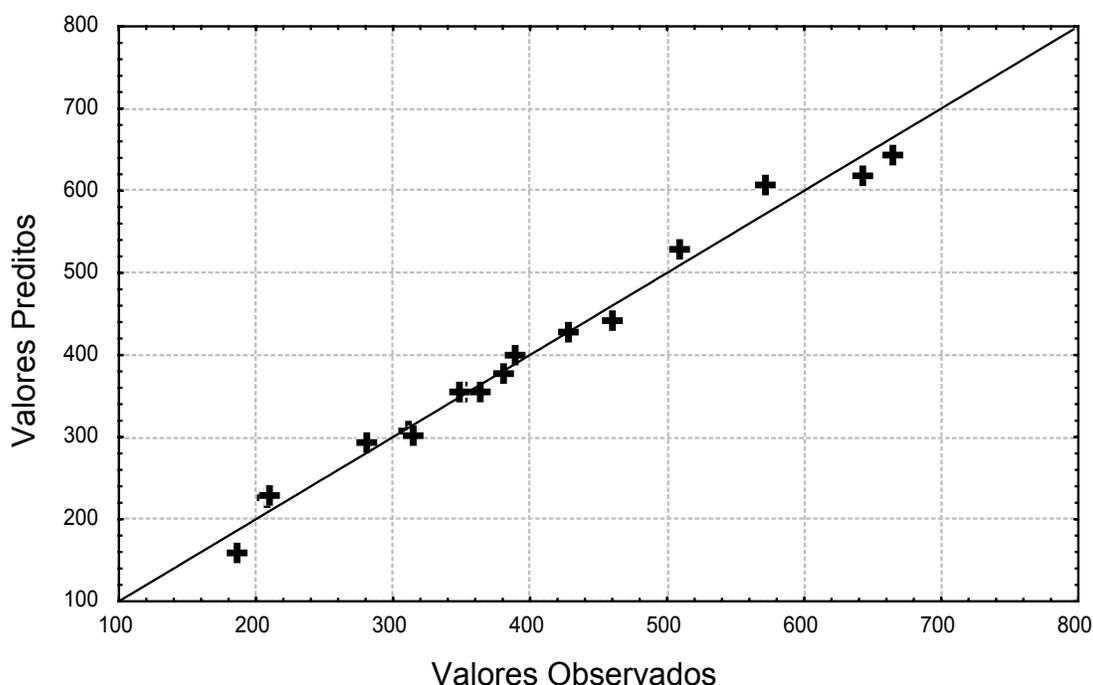
$$\begin{aligned}
 \text{Carregamento} = & 354,55 + 134,49 \times \text{ddl} + 9,98 \times \text{ddl}^2 - 67,43 \times \text{QUIT} + \\
 & 21,78 \times \text{QUIT}^2 + 7,05 \times \text{TPP} + 12,14 \times \text{TPP}^2 - 30,58 \times \text{ddl} \times \text{QUIT} \\
 & + 2,70 \times \text{ddl} \times \text{TPP} - 2,36 \times \text{QUIT} \times \text{TPP}
 \end{aligned} \quad (5)$$

onde ddl, QUIT e TPP correspondem às variáveis codificadas, respectivamente, concentrações de ddl, de quitosana e de TPP.

AGGARWAL *et al.* (2001) também utilizaram a técnica de planejamento de experimentos para estudar a encapsulação de indometacina em microesferas de quitosana obtidas pela técnica de coacervação. Inicialmente eles realizaram um estudo de seleção de variáveis através do método de Plackett-Burman. Nesta etapa eles estudaram as seguintes variáveis: velocidade de agitação, concentração de quitosana, concentração do agente precipitante (sulfito de sódio),

concentração de agente reticulante (glutaraldeído), razão indometacina/quitosana. Eles selecionaram como variáveis a razão fármaco/polímero e a concentração de agente reticulante para a realização de outro planejamento fatorial completo, ou seja, as variáveis escolhidas foram semelhantes às variáveis deste trabalho. A partir do planejamento fatorial, eles também determinaram uma equação quadrática para descrever o carregamento.

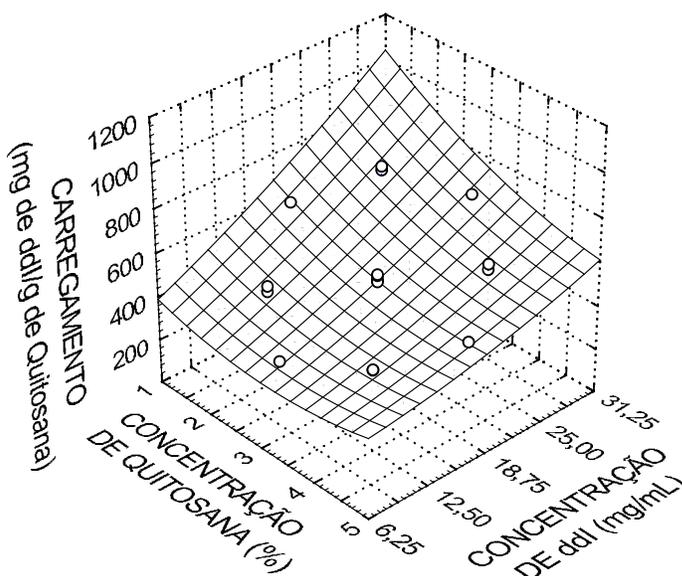
O gráfico dos valores preditos pelo modelo *versus* valores observados experimentalmente (Figura 26) mostra que há uma diferença pouco significativa entre estes valores, uma vez que há pouca dispersão dos pontos em torno da reta.



**FIGURA 26.** Valores preditos *versus* valores observados experimentalmente para o carregamento.

Uma vez que as concentrações de quitosana e ddl representam as variáveis significativas, foi obtida a superfície de resposta para o modelo proposto anteriormente em função destas variáveis (Figura 27). Verificou-se que os maiores valores do carregamento são obtidos para a menor concentração de quitosana, além disto, o aumento na concentração de ddl promove o aumento no

carregamento das partículas. Desta forma, um máximo é verificado para menor concentração de quitosana e maior concentração de ddl.



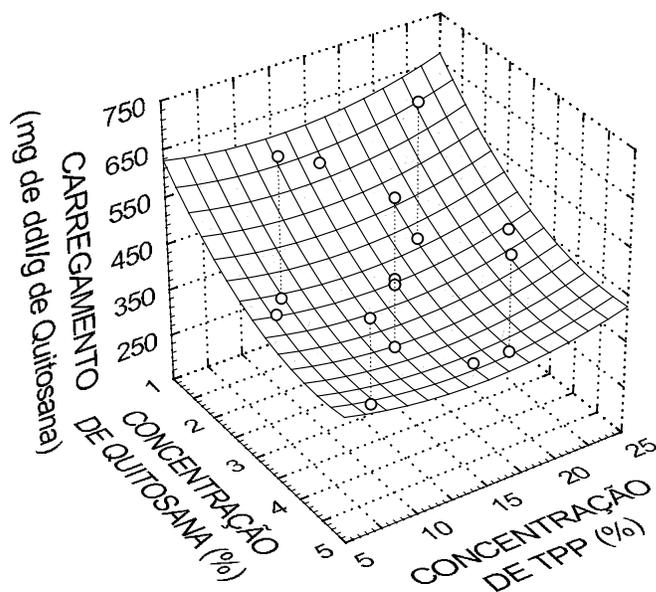
**FIGURA 27.** Superfície de resposta do carregamento em função das concentrações de quitosana e didanosina (ddl).

Resultados diferentes destes foram obtidos por LUBBEN *et al.* (2001). Eles estudaram a encapsulação de albumina bovina em microesferas de quitosana preparadas pelo método da coacervação com sulfato de sódio. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de albumina, não alterou significativamente o seu carregamento, no entanto, os autores trabalharam com baixas concentrações de albumina que variaram de 0,50 para 2,00 % (m/v).

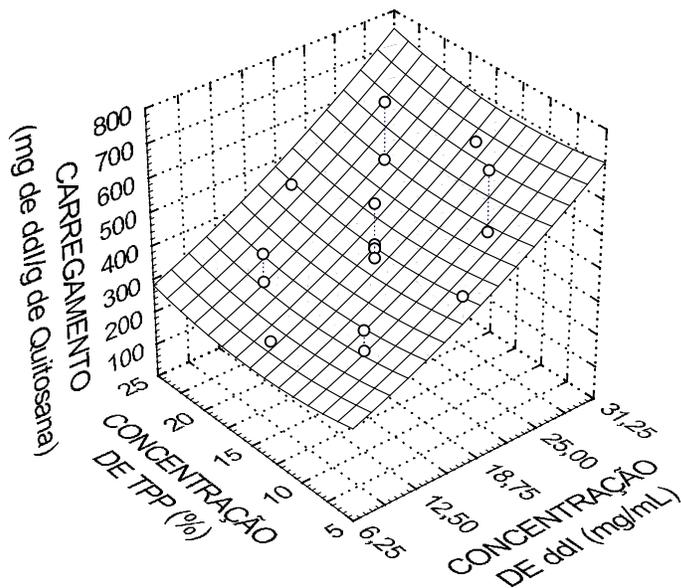
A superfície de resposta do carregamento em função das concentrações de quitosana e TPP (Figura 28) mostra que a redução na concentração de quitosana promove o aumento do carregamento, ao passo que a variação da concentração de TPP não o altera significativamente. O mesmo comportamento é verificado na

Figura 29, com relação ao TPP, no entanto, o aumento da concentração de ddl também aumenta o carregamento.

AGGARWAL *et al.* (2001) estudaram a variação na concentração de agente reticulante (glutaraldeído) e observaram, ao contrário deste trabalho, que o aumento da concentração de glutaraldeído promove a redução no carregamento de ddl. Entretanto é importante considerar que a reticulação com glutaraldeído é um processo mais drástico onde ocorrem ligações covalentes e no caso de reticulação com TPP é um processo iônico de interação de cargas opostas, ou seja, um processo mais brando.



**FIGURA 28.** Superfície de resposta do carregamento em função das concentrações de quitosana e tripolisfosfato de sódio (TPP).



**FIGURA 29.** Superfície de resposta do carregamento em função das concentrações de didanosina (ddl) e tripolisfosfato de sódio (TPP).

#### **4.2.4. Liberação da Didanosina em Suco Entérico Simulado**

##### **4.2.4.1. Métodos**

###### **4.2.4.1.1. Obtenção do Suco Entérico Simulado sem Pancreatina**

O suco entérico simulado (SES) foi preparado de acordo com a metodologia da Farmacopéia Americana (USP XXIII). Inicialmente 0,80 g de fosfato monobásico de potássio foi adicionado à cerca de 0,50 dm<sup>3</sup> de água destilada, em seguida o pH foi ajustado em 7,40 utilizando uma solução de hidróxido de sódio 0,10 mol dm<sup>-3</sup>. Finalmente, completou-se para 1,00 dm<sup>3</sup> o volume da solução com água destilada.

###### **4.2.4.1.2. Liberação da Didanosina em Suco Entérico Simulado**

Para estes experimentos foram utilizados 10 cm<sup>3</sup> de SES e 60 mg de partículas secas (liofilizadas) contendo a ddl. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos foram coletadas alíquotas do meio de liberação e adicionado o mesmo volume de SES para reposição do meio. Os experimentos foram realizados em agitador recíproco à 37°C e 150 rpm. A ddl foi quantificada por espectrofotometria em 248 nm.

A partir do modelo de difusão, baseado na lei de Fick, de solutos no interior de esferas sólidas e dos dados experimentais foi ajustado o parâmetro  $k$  pelo método de máxima verossimilhança, descrito por DRAPER & SMITH (1981), e utilizando o programa desenvolvido pelos pesquisadores Leonardo Machado e José Roberto Nunhez (LCPD/FEQ/UNICAMP). Este método leva em conta as incertezas de todas as medidas experimentais no ajuste.

O modelo é uma função representada por uma série, onde o parâmetro  $k$  pertence a todos os termos da série, que varia de um ao infinito. Desta forma, foram utilizados 1.000 termos da série. Este valor foi muito maior que o necessário, uma vez que após algum tempo ocorria a convergência da série, com apenas o primeiro termo para representar a função. O único problema é quando  $t$  tende a zero e a série apresenta problemas de oscilação. No entanto, no limite quando  $t$  tende a zero, a série é representada pela equação:

$$\frac{M(t)}{M_{\infty}} = 3 \left( \frac{2(kt)^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}}} - kt \right) \quad (6)$$

onde  $k$  é a razão entre o coeficiente de difusão do fármaco na estrutura e o quadrado do raio das partículas,  $M(t)$  é a massa de fármaco liberada em um determinado tempo  $t$  e  $M_{\infty}$  é a massa total liberada.

O coeficiente de permeabilidade das microestruturas,  $P$ , é definido pela razão entre o fluxo  $J$  e a diferença de concentração entre as soluções interna e externa,  $\Delta C$ :

$$P = \frac{J}{\Delta C} \quad (7)$$

Em termos de constante  $k$ , usada no modelo (equação 6), a permeabilidade pode ser expressa através do comprimento característico de uma esfera, ou seja, a razão  $V/A$ :

$$P = \frac{(k \cdot V)}{A} \quad (8)$$

onde  $V$  e  $A$  são o volume e a área superficial das partículas, respectivamente. Nos cálculos, considerou-se o raio médio das micropartículas. Considerando as equações de volume e área superficial de uma esfera, é possível reescrever a equação 8:

$$P = \frac{(k \cdot R)}{3} \quad (9)$$

onde  $k$  é a constante do modelo (equação 6) e  $R$  é o raio da partícula.

#### **4.2.4.2. Resultados e Discussão**

A Tabela 26 apresenta os valores do coeficiente de permeabilidade das micropartículas.

**TABELA 26.** Valores do coeficiente de permeabilidade,  $P$ , para os experimentos do planejamento fatorial usado para a incorporação da didanosina em micropartículas e quitosana.

Experimento	Concentração de TPP (%)	Concentração de Quitosana (%)	Concentração de ddl ( $\text{mg cm}^{-3}$ )	$P$ (cm/s) $\times 10^7$
1	10,00	2,00	12,50	0,02221
2	20,00	2,00	12,50	0,01063
3	10,00	4,00	12,50	0,01942
4	20,00	4,00	12,50	0,01072
5	10,00	2,00	25,00	0,00211
6	20,00	2,00	25,00	0,00471
7	10,00	4,00	25,00	0,01722
8	20,00	4,00	25,00	0,00639
9	15,00	3,00	18,75	0,01702
10	15,00	3,00	18,75	0,01974
11	15,00	3,00	18,75	0,01565
12	15,00	3,00	8,29	0,02162
13	15,00	3,00	29,20	0,00396
14	15,00	1,33	18,75	0,00500
15	15,00	4,67	18,75	0,00436
16	6,63	3,00	18,75	0,01505
17	23,36	3,00	18,75	0,00990

A Tabela 27 mostra a análise de variância do modelo e o teste  $F$ . Observa-se que  $F_{\text{CALC}}$  para falta de ajuste é menor que  $F_{\text{TAB}}$ , portanto não há evidência de falta de ajuste do modelo. Isto também é evidenciado pelo valor de  $p$  (maior que 0,05) para a falta de ajuste (dado não apresentado) da Tabela 26. No entanto, também é necessário observar que o valor da relação  $F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$  para o modelo é

menor do que o sugerido para um bom ajuste, isto também é confirmado pela variância explicada, da ordem de 88 %, mas relativamente razoável já que a própria permeabilidade é obtida de um ajuste.

**TABELA 27.** Análise de variância e teste **F** para o coeficiente de permeabilidade, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada =  $r^2 = 88,75$  %).

	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MS)	F	$F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$
Modelo	0,000694	9	0,000077	6,10	1,66
Erro Total	0,000088	7	0,000013		
Falta de Ajuste	0,000080	5	0,000016	3,67	0,19
Erro Puro	0,000009	2	0,000004		
Total	0,000782	16			

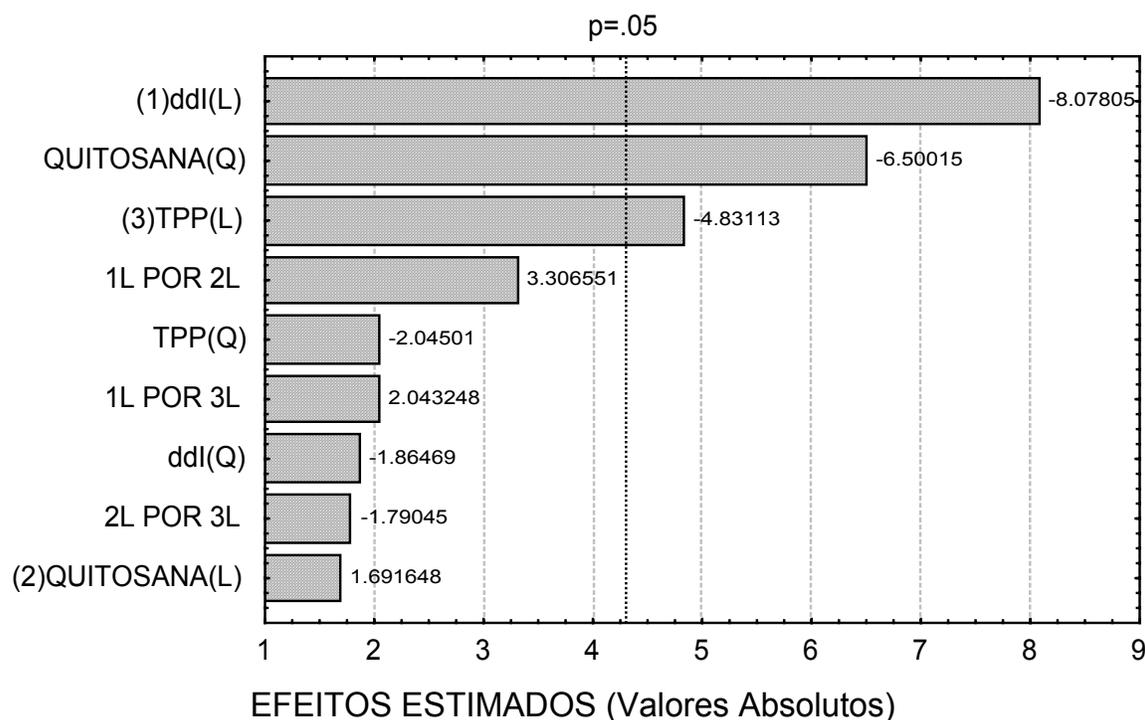
$F_{\text{TAB}}(0,95; 9, 7) = 3,68$ ;  $F_{\text{TAB}}(0,95; 5,2) = 19,30$ .

Considerando um intervalo de confiança de 95 %, observa-se pela Tabela 28 que o efeito principal (intercepto) representa o efeito mais significativo sobre o coeficiente de difusão do fármaco. Seguido pelos efeitos da concentração de ddl (linear), da concentração de quitosana (quadrático) e da concentração de TPP (linear). Isto também é confirmado no gráfico de Pareto da Figura 30.

**TABELA 28.** Estimativa dos efeitos para a permeabilidade, com intervalo de confiança de 95 %, obtidos pelo planejamento de experimentos (variância explicada =  $r^2 = 88,75\%$ ).

	Efeito	Erro Puro	$p$
<b>Principal</b>	<b>0,017305</b>	<b>0,001200</b>	<b>0,0048</b>
<b>(1) ddl (L)</b>	<b>-0,009131</b>	<b>0,001130</b>	<b>0,0150</b>
(1) ddl (Q)	-0,002330	0,001250	0,2032
(2) Quitosana (L)	0,001912	0,001130	0,2328
<b>(2) Quitosana (Q)</b>	<b>-0,008123</b>	<b>0,001250</b>	<b>0,0229</b>
<b>(3) TPP (L)</b>	<b>-0,005461</b>	<b>0,001130</b>	<b>0,0403</b>
(3) TPP (Q)	-0,002556	0,001250	0,1775
(1) e (2)	0,004873	0,001474	0,0806
(1) e (3)	0,003011	0,001474	0,1777
(2) e (3)	-0,002639	0,001474	0,2153

OBS: Os efeitos mais significativos ( $p < 0,05$ ) estão destacados em **negrito**.



**FIGURA 30.** Gráfico de Pareto para o coeficiente de permeabilidade, com 95 % de intervalo de confiança, obtido para o planejamento fatorial.

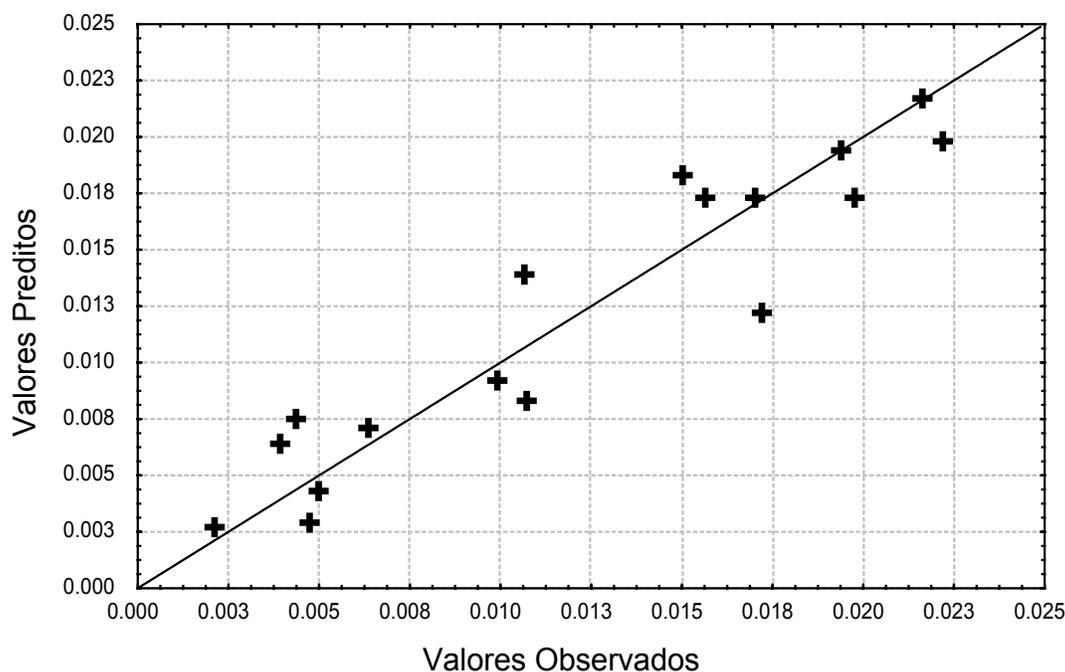
Observa-se pelo gráfico de Pareto, que todas as variáveis apresentam efeito negativo sobre a permeabilidade, o que significa que o aumento de nível de quaisquer uma destas variáveis promove uma redução na permeabilidade. O aumento da quantidade de TPP implica em um aumento na intensidade das reticulações, conseqüentemente o fármaco enfrenta maiores barreiras difusionais na liberação, ou seja, a sua permeabilidade diminui. Sob o ponto de vista da concentração de quitosana, o seu aumento possibilita o aumento da quantidade de cadeias poliméricas no meio, desta forma, as cadeias se encontram mais próximas uma das outras o que favorece o processo de reticulação e incorporação da ddl, levando a menor permeabilidade da ddl. Por outro lado, o aumento da concentração de ddl favorece o aumento da sua quantidade nas partículas, através do preenchimento de poros e recobrimento da superfície, o que dificulta a difusão das moléculas mais interiorizadas para o meio, reduzindo assim a permeabilidade.

Também foi obtido o modelo que descreve o coeficiente de permeabilidade em função das variáveis estudadas no planejamento. Apesar do modelo apresentar variância explicada de 88,75 %, é necessário ressaltar que é um valor relativamente bom, especificamente para o coeficiente de permeabilidade, uma vez que seu valor é obtido do ajuste de um modelo (obtenção da constante  $k$ ) e também da medida do diâmetro médio das partículas (obtido por microscopia ótica). No caso da microscopia ótica, a ampla distribuição dos diâmetros das partículas contribui para um erro no valor do coeficiente de permeabilidade. Assim, é de se esperar que o erro propagado nestes processos acarrete uma menor variância explicada do modelo. De qualquer forma, é possível afirmar que o ajuste do modelo é razoável, sendo possível a proposição do modelo abaixo e a análise das superfícies de resposta.

$$\begin{aligned} \text{Coeficiente de Permeabilidade} = & 0,017305 - 0,004566 \times \text{ddl} - 0,001165 \times \text{ddl}^2 \\ & + 0,000956 \times \text{QUIT} - 0,004062 \times \text{QUIT}^2 - 0,002731 \times \text{TPP} - 0,001278 \times \text{TPP}^2 \\ & + 0,002437 \times \text{ddl} \times \text{QUIT} + 0,001506 \times \text{ddl} \times \text{TPP} - 0,001320 \times \text{QUIT} \times \text{TPP} \quad (10) \end{aligned}$$

onde ddl, QUIT e TPP correspondem às variáveis codificadas, respectivamente, concentrações de ddl, de quitosana e de TPP.

O gráfico dos valores preditos *versus* valores observados é representado na Figura 31. Observa-se que os valores estão um pouco mais dispersos em torno da reta se comparado com os mesmos gráficos obtidos para a eficiência de incorporação e o carregamento. Apesar disto, o modelo é razoável em se tratando de um coeficiente de permeabilidade também estimado e a variância explicada do modelo é 88,75 %.



**FIGURA 31.** Valores previstos pelo modelo *versus* valores observados experimentalmente para o coeficiente de permeabilidade.

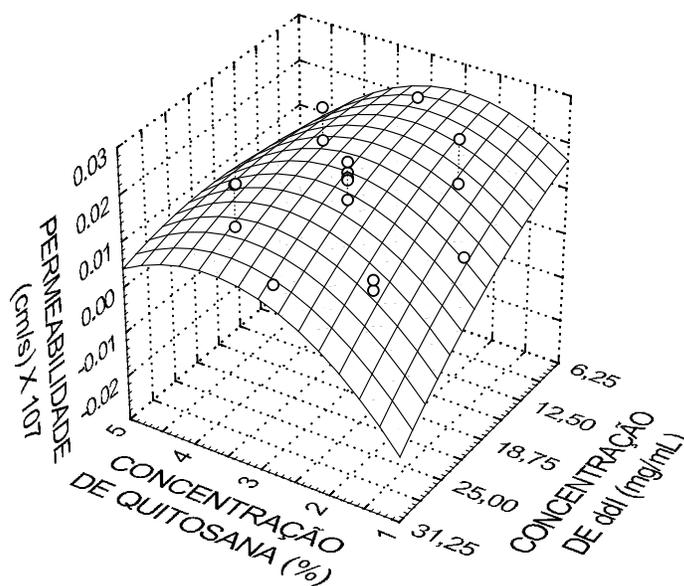
KO *et al.* (2003) utilizaram um planejamento de experimentos para o estudo da encapsulação de felodipina em micropartículas de quitosana pela técnica de emulsão seguida da reticulação com TPP. Eles estudaram três variáveis: concentração de quitosana, pH da solução de TPP e tempo de reticulação. A partir da análise dos dados, eles obtiveram um modelo quadrático que descreve a porcentagem de felodipina liberada em 24 h. Os autores, assim como os resultados obtidos neste trabalho, também observaram que a concentração de quitosana é uma variável significativa.

As Figuras 32 a 34 representam as superfícies de respostas para o coeficiente de permeabilidade. Nos casos de liberação controlada é interessante que o coeficiente de permeabilidade seja minimizado, o que ocorre na região onde

se tem menor concentração de quitosana e maior concentração de ddl (Figura 32). Para uma quantidade fixa de ddl, verifica-se que o coeficiente de permeabilidade apresenta um comportamento praticamente parabólico no qual ele atinge um máximo. Por outro lado, o aumento na concentração de ddl promove a redução do coeficiente de permeabilidade, esta redução é mais significativa nas concentrações mais baixas de quitosana. A redução do coeficiente de permeabilidade, que significa a liberação mais lenta do fármaco, mostra que o seu excesso nas partículas dificulta sua própria liberação, através do preenchimento dos poros e interstícios das partículas.

Isto também é confirmado pela comparação entre a Figura 32 e a superfície de resposta análoga para o carregamento (Figura 27) mostra que nas regiões de maior carregamento, o valor do coeficiente de permeabilidade é mínimo.

AYDIN & AKBUĞA (1996) encapsularam calcitonina em partículas de quitosana preparadas por gelificação com TPP. Eles verificaram resultados semelhantes com relação à liberação do fármaco, segundo eles o aumento da concentração da calcitonina promoveu a redução no coeficiente de difusão do fármaco, conseqüentemente na permeabilidade do fármaco.

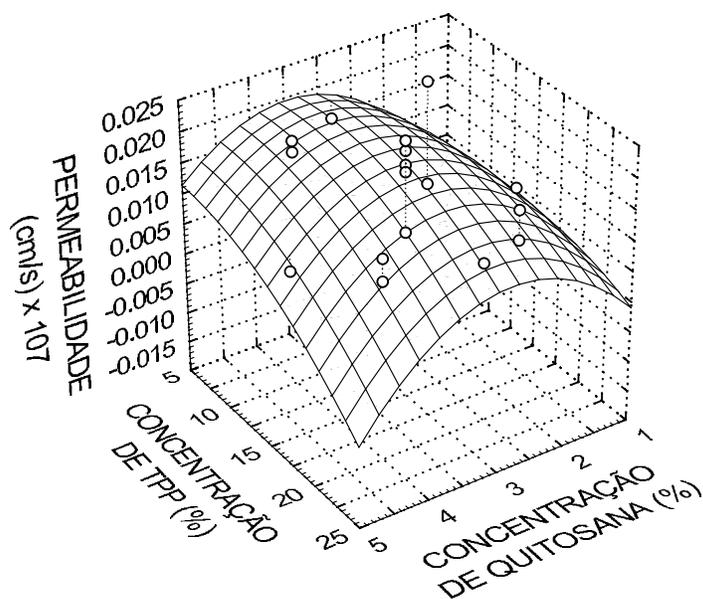


**FIGURA 32.** Superfície de resposta do coeficiente de permeabilidade em função das concentrações de quitosana e didanosina (ddl).

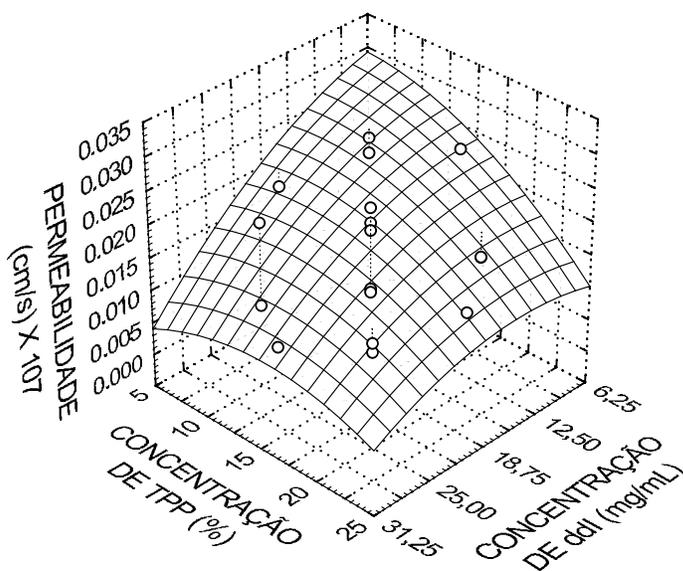
A superfície de resposta do coeficiente de permeabilidade em função das concentrações de TPP e quitosana é apresentada na Figura 33. Também se verifica um comportamento parabólico do coeficiente de permeabilidade, quando se varia a concentração de quitosana para uma mesma quantidade de TPP, sendo que os valores máximos do coeficiente de permeabilidade foram obtidos para a menor concentração de TPP. Este fato era esperado uma vez que quantidades menores de TPP promovem menor grau de reticulação da quitosana que conseqüentemente promoverá a liberação mais rapidamente (maior permeabilidade). Por outro lado, maior quantidade de TPP promove reticulações mais intensas que dificultam a liberação do fármaco. GENTA *et al.* (1998) e SINGH & UDUPA (1998) verificaram o mesmo efeito para microesferas reticuladas com glutaraldeído e GANZA-GONZÁLEZ *et al.* (1999) para microesferas reticuladas com formaldeído.

SINGH & UDUPA (1998) também verificaram que o aumento da concentração de quitosana promove liberação mais lenta do fármaco, no entanto eles trabalharam com soluções de quitosana que variaram de 1 a 6 %.

A Figura 34 confirma o que foi dito anteriormente, o aumento na concentração do TPP promove a redução no coeficiente de permeabilidade, no entanto este efeito é maior para as maiores concentrações de ddl. E o aumento na concentração de ddl também promove a redução no coeficiente de permeabilidade, independente da concentração de TPP.

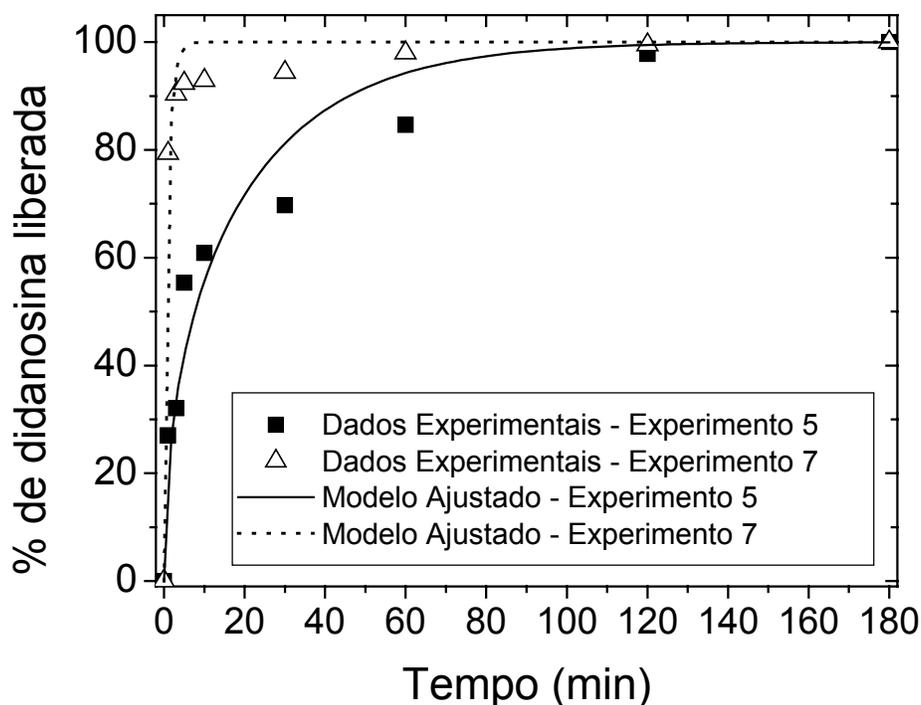


**FIGURA 33.** Superfície de resposta do coeficiente de permeabilidade em função das concentrações de quitosana e tripolisfosfato de sódio (TPP).



**FIGURA 34.** Superfície de resposta do coeficiente de permeabilidade em função das concentrações de tripolisfosfato de sódio (TPP) e didanosina (ddl).

A Figura 35 mostra os perfis de liberação das partículas dos experimentos 5 e 7. Estes dois experimentos foram realizados com 10,00 % de TPP e 25,00 mg de ddl/cm<sup>3</sup>, porém diferentes concentrações de quitosana (2,00 e 4,00 %). Os demais perfis de liberação estão apresentados no Anexo 1. Será visto posteriormente que as partículas obtidas com maior concentração de polímeros apresentaram menores diâmetros que as partículas obtidas com menor concentração de polímeros. Soluções mais concentradas promovem a formação de maior quantidade de partículas e conseqüentemente maior choque entre elas no processo de agitação, reduzindo seus diâmetros. Os resultados obtidos por microscopia ótica para os diâmetros das partículas confirmam esta hipótese, como será visto posteriormente.



**FIGURA 35.** Liberação da didanosina incorporada em partículas de quitosana: experimento 5 (25,00 mg de didanosina/cm<sup>3</sup> - 2,00 % (m/v) de quitosana - 10,00 % de tripolifosfato de sódio) e experimento 7 (25,00 mg de didanosina/cm<sup>3</sup> - 4,00 % (m/v) de quitosana - 10,00 % de tripolifosfato de sódio).

#### 4.2.5. Diâmetro Médio das Partículas

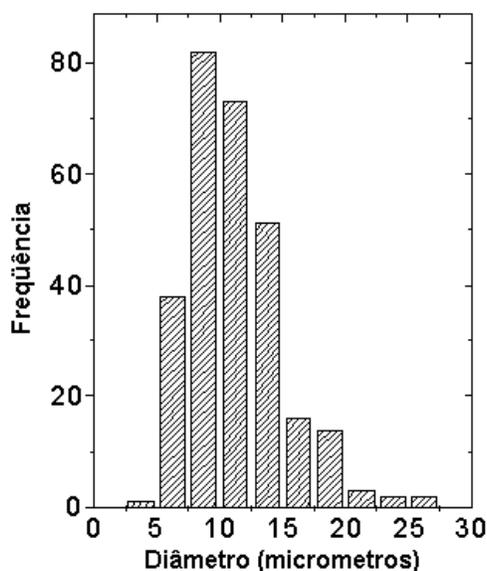
Imediatamente após cada experimento de incorporação, as partículas foram analisadas por microscopia ótica. As imagens obtidas foram tratadas com o programa *UTHSCSA Image Tool 3.0* (*The University of Texas Health Science Center in San Antonio*, <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.htm>, acessado em 23/11/2005). A partir deste programa foram determinados o diâmetro médio das partículas e o histograma de distribuição de diâmetro para cada experimento. O diâmetro médio foi obtido em três micrografias diferentes, sendo que foram medidos de 400 a 500 partículas. Os resultados são apresentados na Tabela 29. Os valores são muito próximos dos obtidos por LUBBEN *et al.* (2001) para microesferas de quitosana preparadas por coacervação com sulfato de sódio.

**TABELA 29.** Diâmetro médio das partículas obtido a partir das imagens de microscopia ótica.

Experimento	Concentração de TPP (%)	Concentração de Quitosana (%)	Concentração de ddl ( $\text{mg cm}^{-3}$ )	Diâmetro Médio ( $\mu\text{m}$ )
1	10,00	2,00	12,50	9,28 $\pm$ 2,76
2	20,00	2,00	12,50	7,20 $\pm$ 1,57
3	10,00	4,00	12,50	7,53 $\pm$ 1,83
4	20,00	4,00	12,50	5,92 $\pm$ 1,68
5	10,00	2,00	25,00	11,42 $\pm$ 4,35
6	20,00	2,00	25,00	6,88 $\pm$ 1,62
7	10,00	4,00	25,00	6,20 $\pm$ 1,62
8	20,00	4,00	25,00	5,75 $\pm$ 1,34
9	15,00	3,00	18,75	8,55 $\pm$ 2,02
10	15,00	3,00	18,75	8,83 $\pm$ 1,85
11	15,00	3,00	18,75	8,69 $\pm$ 1,79
12	15,00	3,00	8,29	9,34 $\pm$ 2,96
13	15,00	3,00	29,20	8,55 $\pm$ 1,50
14	15,00	1,33	18,75	8,85 $\pm$ 2,66
15	15,00	4,67	18,75	8,19 $\pm$ 2,57
16	6,63	3,00	18,75	9,45 $\pm$ 3,75
17	23,36	3,00	18,75	8,16 $\pm$ 2,45

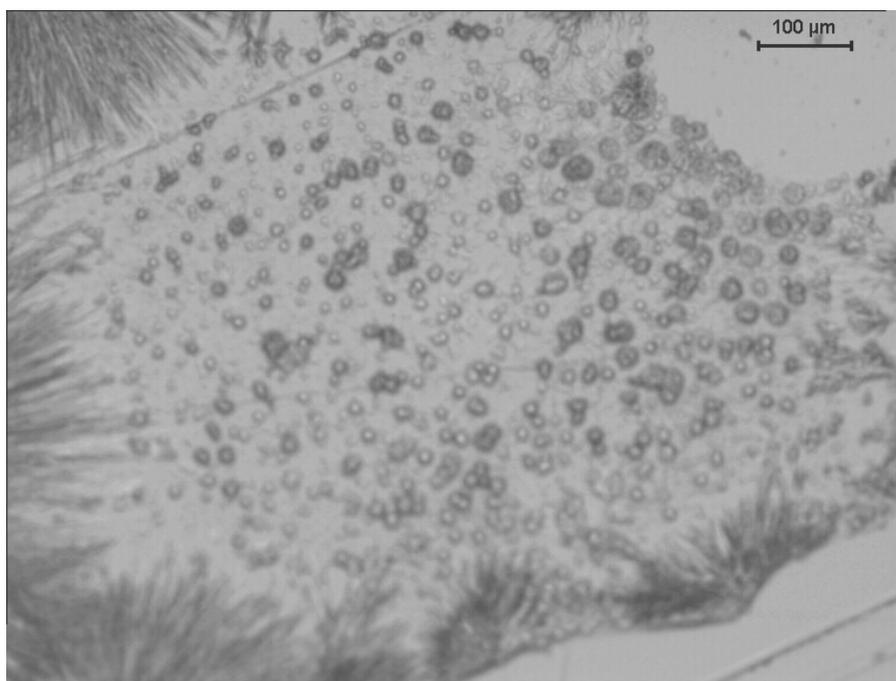
Observa-se pela Tabela 29 que a maioria dos diâmetros foram menores que  $10\ \mu\text{m}$  o que é um resultado desejável, pois segundo LUBBEN *et al.* (2001), micropartículas menores que  $10\ \mu\text{m}$  são absorvidas pelas células M (células de defesa capazes de fagocitar partículas e com isto transportá-las até as placas de Peyer).

Um histograma típico da distribuição de diâmetros das partículas é apresentado na Figura 36, para as partículas obtidas no experimento 5. Os demais histogramas foram muito semelhantes a este. Observa-se que a distribuição apresenta o comportamento muito próximo de uma distribuição normal, com diâmetro médio  $11,42 \pm 4,35\ \mu\text{m}$ .

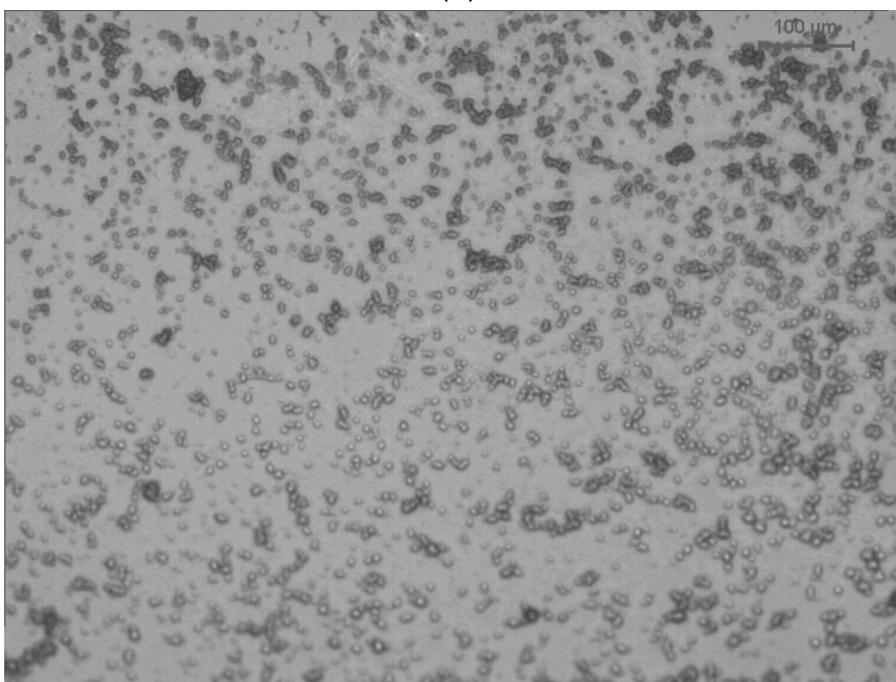


**FIGURA 36.** Histograma da distribuição de diâmetros das partículas obtido a partir da imagem de microscopia ótica, correspondente ao experimento 5 (25,00 mg de didanosina/cm<sup>3</sup> / 2,00 % (m/v) de quitosana / 10,00 % de tripolifosfato de sódio).

A Figura 37 apresenta as micrografias dos experimentos 5 e 7. Ambos experimentos foram realizados com 10,00 % de TPP e 25,00 mg de ddl/cm<sup>3</sup>, observa-se que as partículas do experimento 5 são maiores do que as partículas do experimento 7. Como já foi mencionado anteriormente, o aumento na concentração do polímero promove redução do diâmetro das partículas. As demais micrografias foram muito semelhantes.



(a)

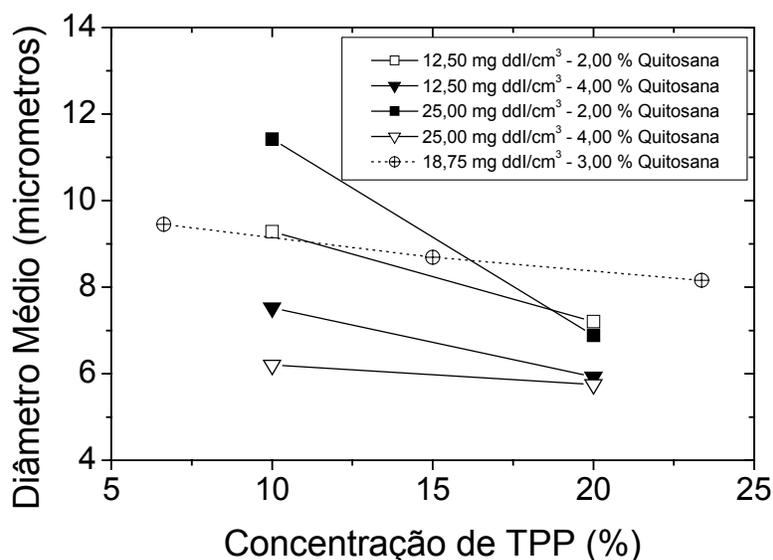


(b)

**FIGURA 37.** Micrografia das partículas obtidas através de microscopia ótica (aumentada 100 vezes): (a) experimento 5: 25,00 mg de didanosina/cm<sup>3</sup> - 2,00 % (m/v) de quitosana - 10,00 % de tripolifosfato de sódio; (b) experimento 7: 25,00 mg de didanosina/cm<sup>3</sup> - 4,00 % (m/v) de quitosana - 10,00 % de tripolifosfato de sódio.

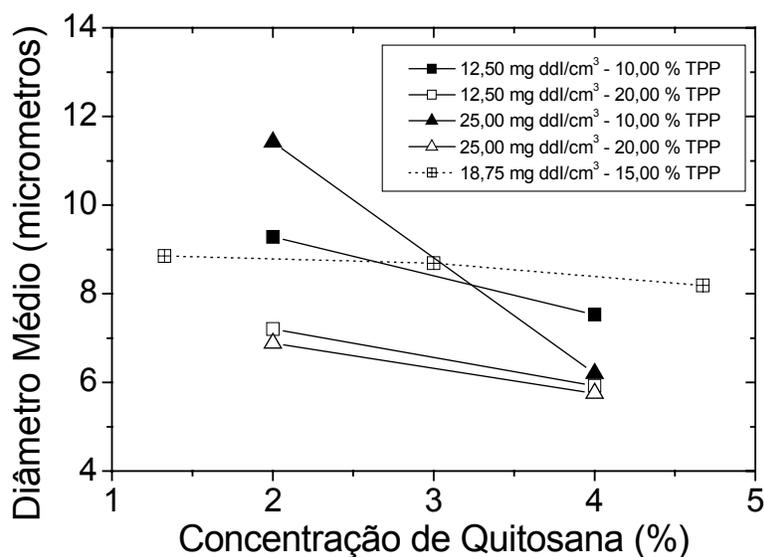
Além das microesferas, observa-se na Figura 37 (a) a presença de estruturas cristalinas do tipo agulha. Tais estruturas cristalinas ocorrem devido à própria ddl não encapsulada.

Especificamente para o diâmetro obtido por microscopia ótica, a análise estatística do planejamento experimental com o programa *STATISTICA* mostrou que a falta de ajuste é significativa, não sendo possível apresentar a análise estatística e as superfícies de resposta. As Figuras 38 a 40 mostram a variação do diâmetro médio das partículas, respectivamente, com as concentrações de TPP, quitosana e ddl. Verifica-se pela Figura 38, que o aumento na concentração de TPP promove a redução do diâmetro médio das partículas, esta redução é mais acentuada para as partículas obtidas com 2,00 % de quitosana e mais sutil quando se utiliza 4,00 % de quitosana. GENTA *et al.* (1998) também verificaram que o aumento da concentração do glutaraldeído promoveu a redução no diâmetro das microesferas. Apesar de terem utilizado o método de emulsão/evaporação para obtenção das microesferas, eles obtiveram diâmetros das microesferas de 9 a 30  $\mu\text{m}$ , ou seja, da mesma ordem de grandeza dos resultados deste trabalho.



**FIGURA 38.** Variação do diâmetro das partículas em função da concentração de tripolisfosfato de sódio (TPP) para diferentes concentrações de quitosana e didanosina.

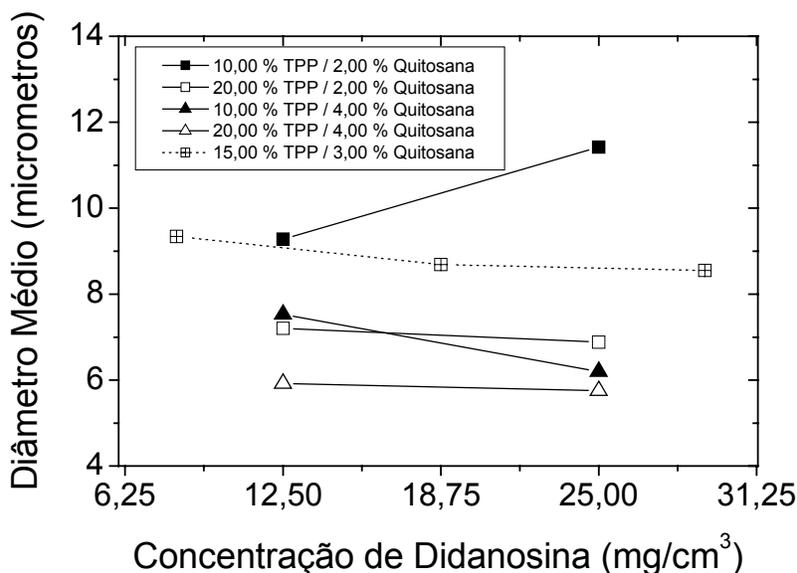
A Figura 39 mostra que o aumento da concentração de quitosana promove a redução do diâmetro médio das partículas. Quanto maior a concentração de quitosana, maior a densidade de partículas no meio, conseqüentemente o choque entre elas é mais freqüente o que promove a redução do diâmetro médio. Resultados semelhantes foram observados por CAMPOS *et al.* (2001), que encapsularam ciclosporina A em micropartículas de quitosana preparadas pela técnica de gelificação ionotrópica com TPP. Ao contrário destes resultados, HE *et al.* (1999)<sup>A</sup> utilizaram a técnica de secagem por atomização e observaram efeitos contrários, ou seja, o aumento da concentração de quitosana promoveu a redução do diâmetro das partículas.



**FIGURA 39.** Variação do diâmetro das partículas em função da concentração de quitosana para diferentes concentrações de tripolisfosfato de sódio (TPP) e didanosina (ddl).

A variação do diâmetro médio das partículas em função da concentração de ddl é apresentada na Figura 40. A quantidade de ddl utilizada na incorporação praticamente não altera o diâmetro das partículas, com exceção das partículas obtidas com 2,00 % de quitosana e 10,00 % de TPP. Em concentrações elevadas

de quitosana (4,00 %), a quantidade de ddl não afeta o diâmetro das partículas, ou seja, o diâmetro é governado pela concentração de quitosana. Por outro lado, em concentração menor de quitosana (2,00 %) e se a concentração de TPP é baixa (10,00 %), então o efeito da ddl sobre o diâmetro é significativo. Com 2,00 % de quitosana e 10,00 % de TPP, as reticulações não são tão intensas do que com 2,00 % de quitosana e 20,00 % de TPP, desta forma o diâmetro da partícula se torna mais susceptível à ddl.



**FIGURA 40.** Variação do diâmetro das partículas em função da concentração de didanosina para as diferentes concentrações de quitosana e tripolisfosfato de sódio (TPP).

#### **4.2.6. Grau de Intumescimento**

A capacidade de absorver água pelas partículas, ou grau de intumescimento, é definida pela razão entre a massa de água absorvida pelas partículas e a massa de partículas secas. É dada pela equação (11).

$$\text{Grau de Intumescimento} = \left( \frac{M_{\text{ÁGUA}}}{M_{\text{PARTÍCULAS}}} \right) \times 100 \quad (11)$$

onde  $M_{\text{ÁGUA}}$  é a massa de água absorvida pelas partículas secas e  $M_{\text{PARTÍCULAS}}$  é a massa de partículas secas. O grau de intumescimento é dado em porcentagem.

##### **4.2.6.1. Método**

O experimento consistiu em pesar cerca de 100 mg de partículas secas e em seguida água destilada foi adicionada gota-à-gota até a completa absorção da água e saturação das partículas. As partículas molhadas eram pesadas para a quantificação da água absorvida e o grau de intumescimento calculado de acordo com a equação (11). Para garantir repetibilidade dos resultados, os experimentos foram realizados em triplicata em um mesmo dia, para a determinação da média e desvio padrão.

##### **4.2.6.2. Resultados e Discussão**

A análise estatística, dos resultados do grau de intumescimento (Tabela 30), utilizando o programa STATISTICA 5.0 mostrou que há uma falta de ajuste significativa do modelo quadrático que descreve o grau de intumescimento em função das variáveis estudadas.

**TABELA 30.** Resultados do grau de intumescimento das partículas para o planejamento de experimentos.

Experimento	Concentração TPP (%)	Concentração de Quitosana (%)	Concentração de ddl ( $\text{mg cm}^{-3}$ )	Grau de Intumescimento (%)
1	10,00	2,00	12,50	269
2	20,00	2,00	12,50	200
3	10,00	4,00	12,50	509
4	20,00	4,00	12,50	445
5	10,00	2,00	25,00	460
6	20,00	2,00	25,00	372
7	10,00	4,00	25,00	564
8	20,00	4,00	25,00	542
9	15,00	3,00	18,75	483
10	15,00	3,00	18,75	496
11	15,00	3,00	18,75	506
12	15,00	3,00	8,29	592
13	15,00	3,00	29,20	472
14	15,00	1,33	18,75	318
15	15,00	4,67	18,75	565
16	6,63	3,00	18,75	470
17	23,36	3,00	18,75	528

A Tabela 31 mostra a análise de variância e o teste **F** para o intumescimento. O teste **F** para o modelo apresenta relação  $F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$  menor do que 4, com nível de significância de 95 %, e por outro lado, esta relação para a falta de ajuste é maior que 1, mostrando que o modelo apresenta uma falta de ajuste significativa.

**TABELA 31.** Análise de variância e teste **F** para o grau de intumescimento, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada =  $r^2 = 86,75$  %).

	Soma Quadrática (SS)	Graus de Liberdade	Média Quadrática (MS)	F	$F_{\text{CALC}}/F_{\text{TAB}}$
Modelo	165450,52	9	18383,39	5,09	1,38
Erro Total	25281,07	7	3611,58		
Falta de Ajuste	25017,92	5	5003,58	38,03	1,97
Erro Puro	263,15	2	131,57		
Total	190731,59	16			

$F_{\text{TAB}}(0,95; 9, 7) = 3,68$ ;  $F_{\text{TAB}}(0,95; 5,2) = 19,30$ .

Esta falta de ajuste também é evidenciada pelo valor de  $p$  para a falta de ajuste que é menor que 0,05 (dado não apresentado), assim como pela variância explicada igual a 86,75 %.

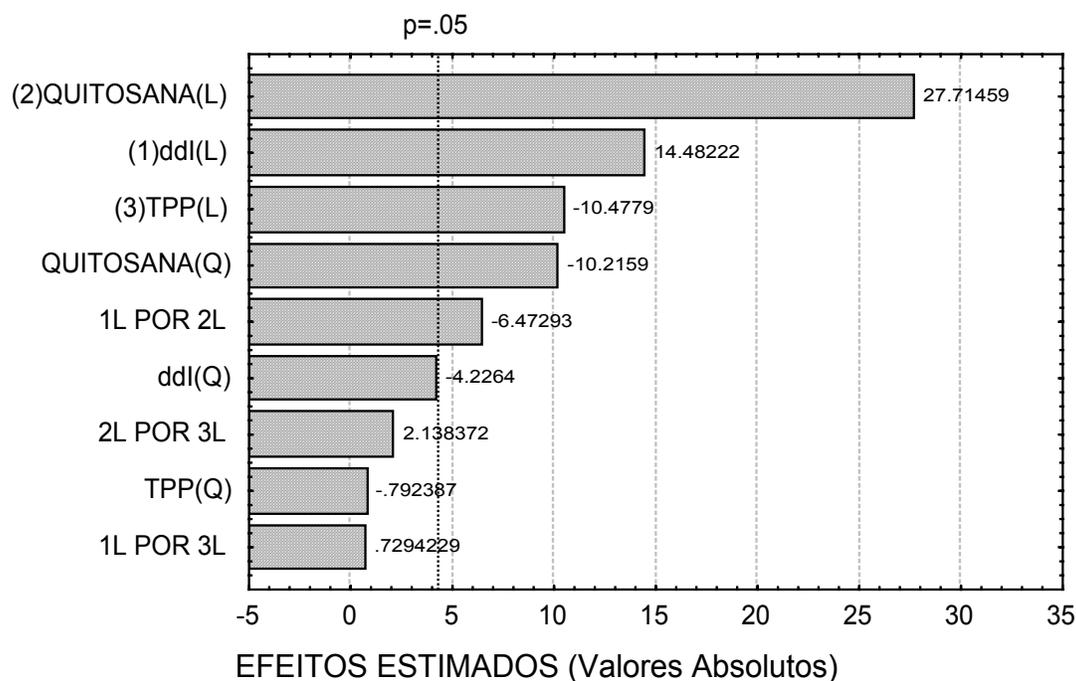
É importante ressaltar que o método de determinação do grau de intumescimento é um método visual no qual o analista determina até quando a água deve ser adicionada às partículas. No entanto, todas as análises foram realizadas em um mesmo dia, e com um treinamento prévio para se estabelecer padrões de saturação da água. No caso das partículas do planejamento de experimentos, observa-se que existe uma boa diferença entre os resultados para cada experimento. Desta forma, apesar das limitações da técnica, decorrentes dos seus erros, a dificuldade de ajuste de um modelo aos dados experimentais é esperada, então se considerou razoável a obtenção do modelo e superfícies de respostas.

Considerando um intervalo de confiança de 95 %, observa-se pela Tabela 32 que o efeito mais significativo sobre o grau de intumescimento, de acordo com o valor de  $p$ , é o efeito principal (intercepto). Seguido pelos efeitos da concentração de quitosana (linear), da concentração de ddl (linear), da concentração de TPP (linear), da concentração de quitosana (quadrático) e a interação entre a concentração de quitosana e concentração de ddl. Isto também é confirmado no gráfico de Pareto da Figura 41.

**TABELA 32.** Estimativa dos efeitos para o grau de intumescimento como resposta para um modelo quadrático, com intervalo de confiança de 95 %, obtida para o planejamento de experimentos (variância explicada =  $r^2 = 86,75 \%$ ).

	Efeito	Erro Puro	$p$
<b>Principal</b>	<b>500,29</b>	<b>6,60</b>	<b>0,0002</b>
<b>(1) ddl (L)</b>	<b>90,09</b>	<b>6,22</b>	<b>0,0047</b>
(1) ddl (Q)	-29,07	6,88	0,0517
<b>(2) Quitosana (L)</b>	<b>172,41</b>	<b>6,22</b>	<b>0,0013</b>
<b>(2) Quitosana (Q)</b>	<b>-70,26</b>	<b>6,88</b>	<b>0,0094</b>
<b>(3) TPP (L)</b>	<b>-65,18</b>	<b>6,22</b>	<b>0,0090</b>
(3) TPP (Q)	-5,45	6,88	0,5112
<b>(1) e (2)</b>	<b>-52,50</b>	<b>8,11</b>	<b>0,0230</b>
(1) e (3)	5,92	8,11	0,5416
(2) e (3)	17,34	8,11	0,1659

OBS: Os efeitos mais significativos ( $p < 0,05$ ) estão destacados em **negrito**.



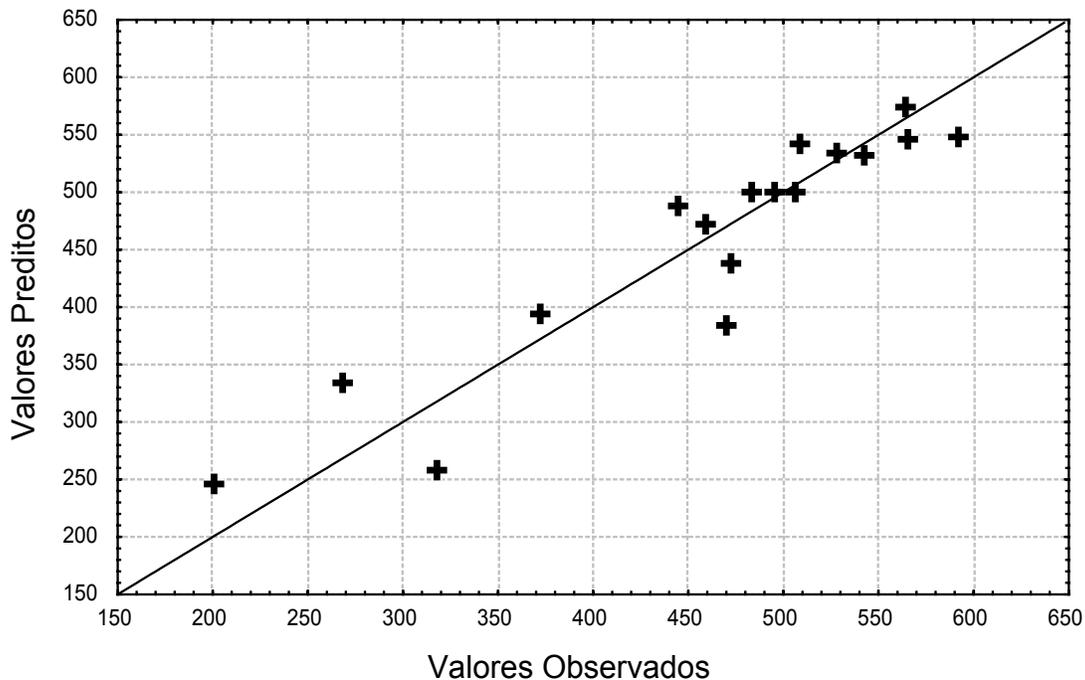
**FIGURA 41.** Gráfico de Pareto, com intervalo de confiança de 95 %, para o modelo quadrático do grau de intumescimento obtido do planejamento composto central.

A partir dos coeficientes da regressão foi obtido um modelo que descreve o grau de intumescimento das partículas:

$$\begin{aligned} \text{Grau de Intumescimento} = & 500,29 + 45,05 \times \text{ddl} - 14,53 \times \text{ddl}^2 + 86,20 \times \text{QUIT} - \\ & 35,13 \times \text{QUIT}^2 - 32,59 \times \text{TPP} - 2,72 \times \text{TPP}^2 - 26,25 \times \text{ddl} \times \text{QUIT} + 2,96 \times \text{ddl} \times \text{TPP} \\ & + 8,67 \times \text{QUIT} \times \text{TPP} \end{aligned} \quad (12)$$

onde ddl, QUIT e TPP correspondem às variáveis codificadas, respectivamente, concentrações de ddl, de quitosana e de TPP.

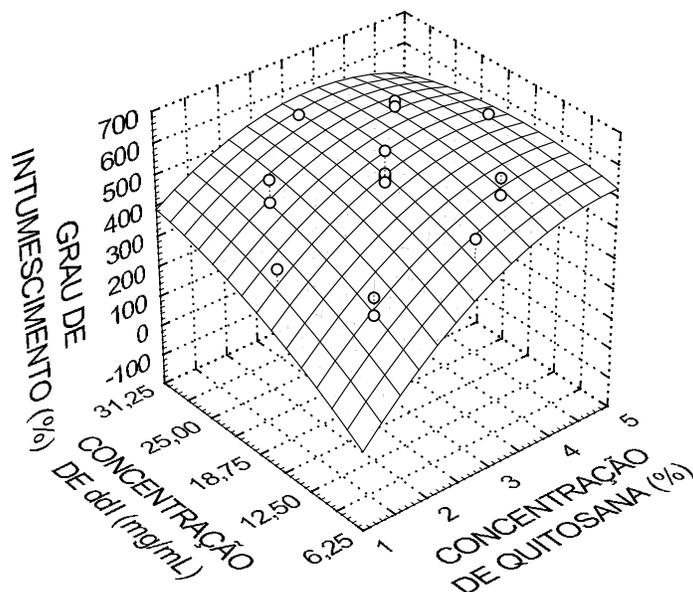
O gráfico dos valores preditos *versus* valores observados experimentalmente é representado na Figura 42. Observa-se que os valores estão um pouco dispersos em torno da reta, como também foi verificado para o coeficiente de permeabilidade.



**FIGURA 42.** Valores previstos pelo modelo *versus* valores observados experimentalmente para o grau de intumescimento.

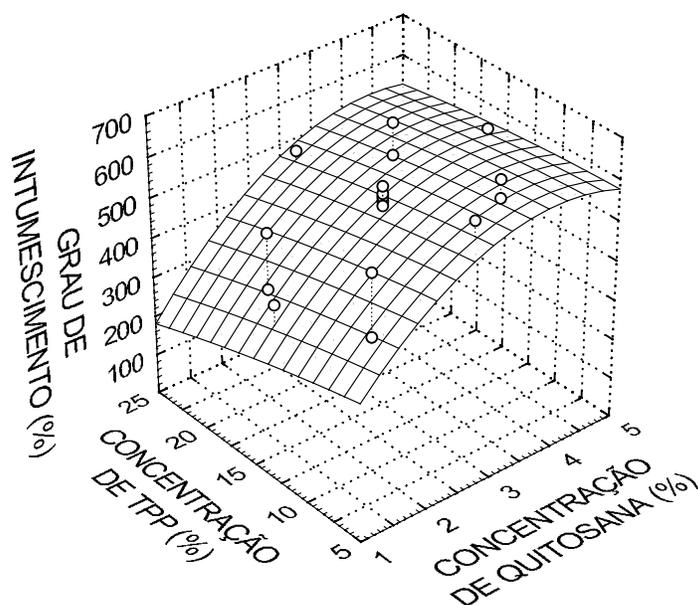
As Figuras 43 a 45 representam as superfícies de respostas para o grau de intumescimento. A superfície de resposta da Figura 43 apresenta ao fundo uma

região de máximo para os maiores valores de concentração de quitosana e de ddl. Verifica-se também que para uma mesma concentração de quitosana, o aumento na quantidade de ddl promove um aumento no grau de intumescimento. Este aumento é muito maior para as concentrações mais baixa de quitosana. Por outro lado para uma mesma concentração de ddl, o aumento da concentração de quitosana promove aumento no grau de intumescimento.



**FIGURA 43.** Superfície de resposta para o grau de intumescimento em função das concentrações da quitosana e didanosina (ddl).

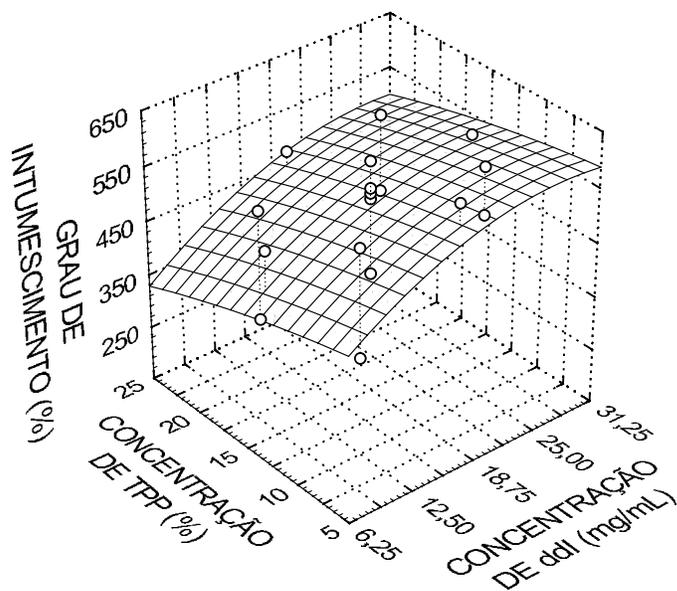
Também é possível verificar pela Figura 44 que existe uma região de máximo para a superfície de resposta do grau de intumescimento em função das concentrações de quitosana e TPP. Esta região de máximo ocorre para as concentrações mais altas de quitosana e menores concentrações de TPP. O aumento na quantidade de TPP promove a redução do grau de intumescimento, esta redução é maior para as menores concentrações de quitosana.



**FIGURA 44.** Superfície de resposta para o grau de intumescimento em função das concentrações de quitosana e tripolisfosfato de sódio (TPP).

O intumescimento também depende do grau de reticulação das partículas, quanto mais reticulada estiver a partícula, menor a sua capacidade de absorver água. Desta forma, a Figura 44 mostra que o aumento da concentração de quitosana promove o aumento no intumescimento, ou seja, o intumescimento é proporcional à quantidade de polímero das partículas, o que já é esperado porque a quitosana é um polímero hidrofílico.

A Figura 45 confirma o que foi observado anteriormente, na qual o aumento da concentração de ddl promove o aumento no intumescimento das partículas, isto porque a ddl é hidrofílica e colabora para a absorção de água pelas partículas. Também é observada uma região de máximo do intumescimento para as maiores quantidades de ddl e menores concentrações de TPP isto porque quantidades menores de TPP promovem reticulações menos intensas favorecendo o intumescimento das partículas.



**FIGURA 45.** Superfície de resposta para o grau de intumescimento em função das concentrações de tripolisfosfato de sódio (TPP) e didanosina (ddi).

#### 4.2.7. Incorporação da Didanosina nas Condições Otimizadas

Para a continuidade do trabalho, selecionou-se as condições do experimento 5 uma vez que este apresentou bom carregamento ( $\approx 643$  mg de ddl/g de quitosana) e baixa permeabilidade se comparado com os demais experimentos.

Como foi observado que a concentração de ddl é um fator importante no carregamento do fármaco, foram realizados novos experimentos com maior concentração de ddl. De acordo com as informações da bula do Videx<sup>®</sup> EC, a solubilidade da ddl em água à 25° C é de  $27,3 \text{ mg cm}^{-3}$ , no entanto optou-se em realizar experimentos em concentração supersaturada igual a  $39 \text{ mg cm}^{-3}$ . Além disto foi verificado o efeito de três diferentes concentrações de TPP. A Tabela 33 mostra os experimentos propostos e os resultados para a eficiência de incorporação, carregamento e grau de intumescimento. Observa-se que a eficiência, o carregamento e o grau de intumescimento são reduzidos com o aumento da concentração de TPP.

**TABELA 33.** Efeitos da variação da concentração de tripolisfosfato de sódio (TPP) na eficiência de incorporação, carregamento de didanosina (ddl) e grau de intumescimento (Concentração de didanosina igual a  $39,00 \text{ mg cm}^{-3}$ ).

Concentração de TPP (%)	Eficiência de incorporação (%)	Carregamento (mg de ddl/g de quitosana)	Grau de Intumescimento (%)
10,00	36,47	1433	$465 \pm 15$
20,00	31,89	1253	$481 \pm 10$
50,00	23,99	943	$438 \pm 13$

Na escolha da melhor condição de preparação das partículas, é também desejável que a difusividade seja minimizada, o que implica em menores taxas de difusão do fármaco do interior da partícula para o meio externo. Na Tabela 34 são apresentados os valores de  $k$ , que relaciona a difusividade ( $D$ ) do fármaco e quadrado do raio ( $R$ ) das partículas, para as mesmas condições experimentais da Tabela 33. Observa-se que os valores de  $k$  decrescem com a concentração de

TPP. Considerando que as partículas possuem raios semelhantes, selecionou-se a quantidade de TPP igual a 10,00 % como melhor condição. Além de produzir a menor difusividade, essa condição ainda possibilita economia na quantidade de TPP no processo. Portanto, pode-se concluir que as melhores condições de preparação das partículas contendo o fármaco foram obtidas para 10,00 % de TPP, 2,00 % de quitosana e 39,00 mg de ddl/cm<sup>3</sup>.

**TABELA 34.** Valores de  $k$  (razão entre o coeficiente de difusão e o quadrado do raio das partículas,  $D/R^2$ ) ajustado pelo modelo para as diferentes concentrações de tripolifosfato de sódio (Concentração de didanosina igual a 39,00 mg cm<sup>-3</sup>).

Concentração de tripolifosfato de sódio (%)	$k (D/R^2) (h^{-1})$
10,00	$2,72 \times 10^{-3}$
20,00	$8,96 \times 10^{-3}$
50,00	$7,04 \times 10^{-3}$

## CAPÍTULO 5

### GRANULAÇÃO

#### **5.0. INTRODUÇÃO**

Nesse trabalho, foi estudada a granulação do produto resultante da preparação das microesferas de quitosana com incorporação simultânea da didanosina (ddl). Esse material é composto de quitosana na forma de microesferas e da ddl nas formas livre e incorporada. O objetivo da preparação de grânulos com esse material foi principalmente prolongar e controlar melhor a liberação da ddl em relação aos grânulos convencionais produzidos por mistura física dos seus constituintes, além de facilitar a sua administração pela via oral. Tanto quanto é do nosso conhecimento, não existem na literatura estudos sobre a granulação de materiais contendo microesferas.

O estudo de granulação aqui realizado, teve abordagem puramente tecnológica e exploratória, pois visou a obtenção de grânulos com propriedades geométricas semelhantes ao produto comercialmente disponível (Videx<sup>®</sup> EC) e a comparação da sua capacidade de liberação da ddl. Nesse estudo avaliaram-se os efeitos de três excipientes na capacidade de obtenção de grânulos pelo método úmido de extrusão-esferonização, nas suas propriedades geométricas e finalmente na capacidade de liberação da ddl. Os excipientes usados foram a carboximetilcelulose (CMC), o amido pré-gelificado e a própria quitosana usada na preparação das microesferas. A análise destes resultados representará uma avaliação do desempenho da nova formulação agora sob a forma granular, e apontará direções para se atingir o objetivo inicialmente proposto.

Nesse capítulo, apresenta-se de forma sucintas definições, aplicações, métodos e excipientes descritos na literatura para a operação de granulação, os resultados obtidos e discussão dos aspectos estudados.

## **5.1. GRANULAÇÃO**

### **5.1.1. Conceito e Métodos**

A granulação é uma operação unitária que possui diversas aplicações industriais em processos que utilizam partículas sólidas.

KLEINEBUDDE (2001) define granulação como o aumento de tamanho de partículas, que por várias razões é freqüentemente necessário na produção de formas sólidas. SUMMERS & AULTON (2001) definem granulação como o processo na qual partículas primárias em pó são aderidas entre si para formar partículas maiores, entidades multiparticuladas, denominadas de grânulos.

De acordo com a utilização de uma fase líquida, os métodos de granulação descritos na literatura são classificados em úmidos e secos (VERVAET *et al.*, 1995).

Um dos métodos úmidos mais usados na preparação de partículas esféricas é a extrusão-esferonização. Esse método foi desenvolvido em 1964, e vem sendo aplicado freqüentemente em processos catalíticos industriais (HOLT, 2004 e ISMAGILOV *et al.*, 1999), em meio ambiente (KASAI *et al.*, 2000) e na indústria de fertilizantes e rações para peixes (VERVAET *et al.*, 1995). As aplicações na área farmacêutica foram descritas pela primeira vez em 1970 (SONAGLIO *et al.*, 1995).

Atualmente, as aplicações do método da extrusão-esferonização na indústria farmacêutica também incluem a produção de sistemas de liberação controlada (NEAU *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002; BREITKREUTZ *et al.*, 2003; TOMER *et al.*, 2002). GANDHI *et al.* (1999) destaca as seguintes vantagens do uso de grânulos esféricos para sistemas de liberação controlada: a) São facilmente dispersos no trato gastrointestinal e isto invariavelmente maximiza a absorção do fármaco, reduzindo o pico plasmático e minimizando os efeitos colaterais sem reduções apreciáveis de sua biodisponibilidade; b) Evitam alta concentração local do agente bioativo, as quais podem ser irritantes ou anestésicas; c) Produzem melhor fluxo das partículas, faixa estreita de distribuição de tamanhos, dosagens menos friáveis e empacotamento mais uniforme; d) Possuem pequena razão entre área superficial e volume, sendo ideais para

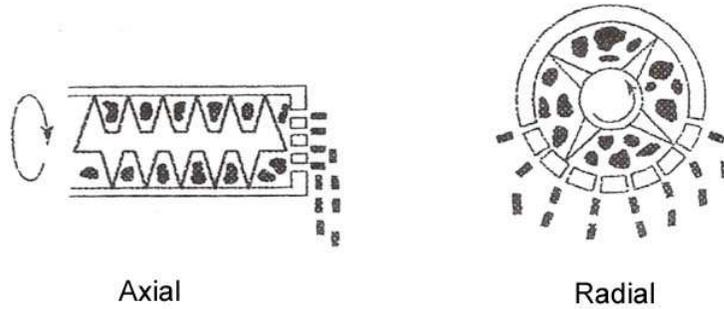
aplicação de filmes de recobrimento. Podem também se tornar atrativos devido às cores e formas que lhes podem ser dadas na fabricação; e) Possuem flexibilidade para modificações posteriores, tais como compressão para formar comprimidos ou sofrerem recobrimento.

Segundo SUMMERS & AULTON (2001), a grande vantagem do método da extrusão-esferonização sobre os outros métodos de produção de partículas esféricas, é a sua habilidade de incorporar grandes quantidades de ingredientes ativos sem produzir partículas excessivamente grandes, minimizando a quantidade de excipientes.

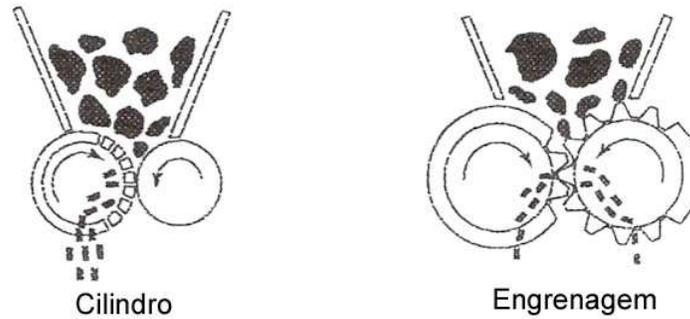
O método da extrusão-esferonização é composto de várias etapas, dentre as quais as principais, citadas por SUMMERS & AULTON (2001), são: 1. Mistura dos ingredientes secos para obtenção de uma dispersão homogênea de pós; 2. Umidificação dos pós para produção de uma massa molhada suficientemente plástica para sofrer extrusão; 3. Extrusão para obtenção de bastões cilíndricos de diâmetro uniforme que são quebrados devido ao seu próprio peso. Esses bastões devem ter plasticidade suficiente para sofrerem deformação sem aderirem uns aos outros na etapa posterior de esferonização. 4. Esferonização para a quebra dos bastões e formação das partículas esféricas; 5. Secagem para atingir a umidade final desejada; 6. Peneiramento (opcional) para obtenção partículas com faixa estreita de distribuição de tamanhos. Segundo SONAGLIO *et al.* (1995), é importante que os parâmetros tecnológicos de cada etapa sejam estudados, uma vez que não são independentes.

Em termos de equipamentos, diferentes configurações de extrusoras foram desenvolvidas para as várias aplicações. SUMMERS & AULTON (2001) classificaram as extrusoras em 3 categorias de acordo com o mecanismo de alimentação: (i) alimentadas por rosca sem fim; (ii) alimentadas pela gravidade e (iii) alimentadas por pistões. As duas primeiras categorias são utilizadas no desenvolvimento e produção, e a última é utilizada para o desenvolvimento experimental. As Figuras 46 e 47 mostram esquemas, respectivamente, das duas primeiras categorias e da terceira categoria de extrusoras.

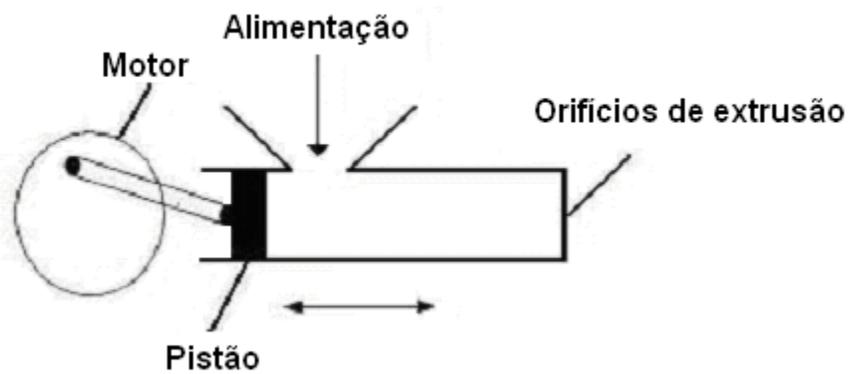
Extrusoras alimentadas por rosca sem fim



Extrusoras alimentadas pela gravidade



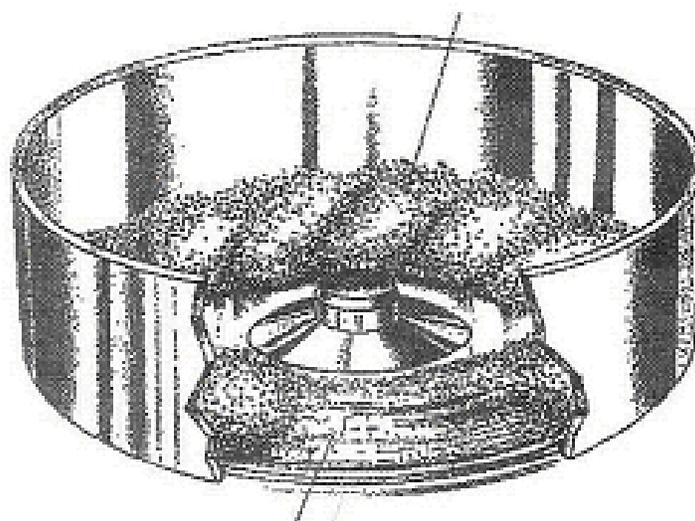
**FIGURA 46.** Representação esquemática de extrusoras alimentadas por rosca sem fim e pela gravidade (adaptação de SUMMERS & AULTON, 2001).



**FIGURA 47.** Representação esquemática de uma extrusora alimentada por pistão (adaptação de VERVAET *et al.*, 1995).

Para esferonização, os equipamentos devem ter a capacidade de dar forma redonda aos bastões produzidos pela extrusão. A configuração clássica consiste de um recipiente com paredes laterais fixas contendo um disco ou prato rotatório no fundo, conforme mostrado na Figura 48. A formação das esferas depende da força gerada pelas colisões partícula-partícula e partícula-parede do equipamento. O disco do fundo possui ranhuras que aumentam o atrito com a superfície e favorecem as colisões.

Produto úmido esferonizado durante a rotação



Disco Friccional Rotatório

**FIGURA 48.** Configuração clássica de um esferonizador mostrando as características de movimento e formação das partículas durante a operação (adaptação de SUMMERS & AULTON, 2001).

A transição de formas dos bastões para esferas durante o tempo de esferonização ocorre em vários estágios apresentados na Figura 49. Inicialmente os cilindros extrudados sofrem deformação arredondando as suas extremidades. Em seguida adquirem a forma de halteres, com fragilização da região central e quebra em partículas de forma elipsoidal, as quais adquirem a forma esférica final através do desgaste da sua superfície.



**FIGURA 49.** Representação das transições de forma das partículas durante a esferonização: partículas cilíndricas (a), cilíndricas com extremidades arredondadas (b), halteres (c), elipsóides (d) e esferas (e) (adaptação de SUMMERS & AULTON, 2001).

### 5.1.2. Excipientes

Anteriormente, excipiente era conceituado como simples adjuvante, nada mais que uma substância química e farmacologicamente inerte. Mas atualmente, o excipiente não é considerado apenas uma substância inerte, mas um componente essencial e funcional nas formas farmacêuticas modernas (FERREIRA, 2004; PIFFERI *et al.*, 1999).

Os excipientes podem ser classificados como diluentes: aqueles que fornecem peso, consistência e volumes adequados à forma farmacêutica; e adjuvantes: aqueles que auxiliam o fármaco a cumprir o seu papel. Alguns excipientes influenciam na estabilidade do fármaco tais como antioxidantes, quelantes, conservantes, tampões, modificadores de pH; e outros influenciam na absorção do fármaco tais como desintegrantes, plastificantes, modificadores de liberação, promotores de penetração, molhantes, formadores de filmes, agentes bioadesivos (FERREIRA, 2004).

O sucesso da granulação é muito influenciado pelos excipientes adicionados durante o processo. Tais excipientes além de contribuir no processo de granulação, também atribuem propriedades aos grânulos.

De acordo com WALDRON (2001) a celulose microcristalina é um dos excipientes mais utilizados nos processos de extrusão-esferonização. Sua estrutura é essencialmente fibrosa e altamente porosa, sendo capaz de absorver grande quantidade de água. No entanto, sob pressão, parte desta umidade pode ser liberada e a massa úmida atinge plasticidade suficiente para a extrusão.

Segundo WALDRON (2001), alguns agentes ligantes, tal como a hidroxipropilmetilcelulose, podem ser adicionados à formulação para auxiliar o processo de extrusão.

SAWAYANAGI *et al.* (1982) verificaram que a quitosana, se adicionada a comprimidos, apresenta propriedades desintegrantes até mesmo melhores do que a celulose microcristalina e o amido de milho.

UPADRASHTA *et al.* (1992) estudaram o uso da quitosana como agente ligante em comprimidos. Eles observaram que a quitosana apresenta eficiência superior a alguns excipientes como a metilcelulose e a carboximetilcelulose, no entanto, inferior ao hidroxipropilmetilcelulose.

Os amidos quando submetidos a tratamentos químicos e/ou mecânico com água, seguido pela secagem, obtêm-se os amidos pré-gelatinizados que apresentam desempenhos melhores com relação às propriedades aglutinantes e desintegrantes (PIFFERI *et al.*, 1999).

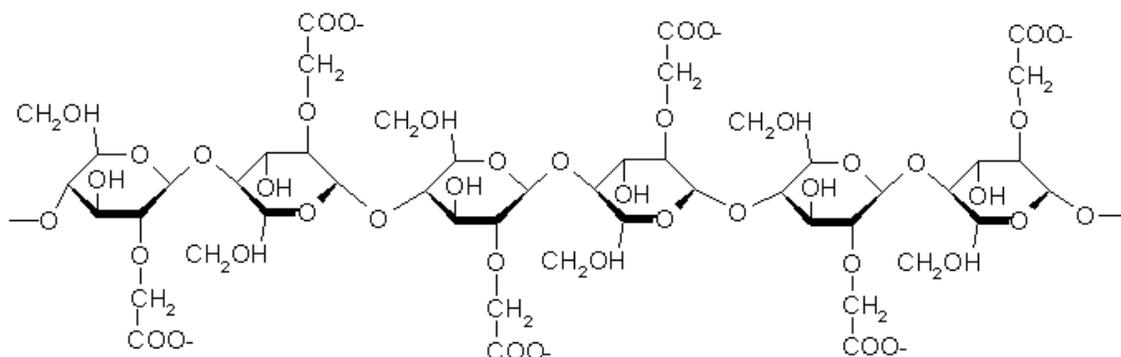
## **5.2. MATERIAL**

Os grânulos foram preparados utilizando as microesferas previamente preparadas e um dos seguintes excipientes: quitosana, carboximetilcelulose (CMC) ou amido pré-gelificado comercial.

A quitosana foi da marca Polymar (Fortaleza-Brasil), a mesma utilizada na preparação das microesferas. A CMC (Cekol 30.000) e o amido pré-gelificado comercial (STARTAB PG) foram cedidos, respectivamente, pela Noviant (Suécia) e Chemyunion Química Ltda (Brasil).

A massa molar da CMC, determinada por viscosimetria, foi  $7,23 \times 10^6$  Da. Para esta determinação utilizou-se a equação de Mark-Houwink com os parâmetros de Brown & Henley (1964), citado por EREMEEVA & BYKOVA (1998). A estrutura química da CMC é apresentada na Figura 50. Quando na forma

sódica, os cátions  $\text{Na}^+$  neutralizam as cargas negativas do grupo carboxílico da estrutura.



**FIGURA 50.** Figura estrutura química da carboximetilcelulose.

### 5.3. MÉTODOS

#### 5.3.1. Preparação dos Grânulos

Os grânulos foram preparados pelo método úmido de extrusão-esferonização, com modificações introduzidas neste trabalho, para a utilização de microesferas na sua composição.

As microesferas preparadas de acordo com a metodologia apresentada no Capítulo 4 foram centrifugadas e, após a remoção do sobrenadante, foram secas em estufa a aproximadamente  $40^{\circ}\text{C}$  até a umidade residual de 75%. Às microesferas úmidas, fez-se a adição de um dos excipientes e com o auxílio de uma espátula misturou-se até obter uma massa homogênea. Essa massa foi submetida à extrusão manual através de uma seringa metálica com 12 furos de 1 mm de diâmetro. Os bastões extrudados foram coletados em um esferonizador artesanal, construído de recipiente redondo, cujo fundo era formado por pirâmides truncadas espaçadas uniformemente. A esferonização era feita em um agitador recíproco a 550 rpm por 30 min. Para finalizar, o material era colocado em outro recipiente de fundo liso e agitado por mais 1 h a 550 rpm. Os grânulos esféricos formados foram secos em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) por 48 h e estocados em recipiente fechado à temperatura ambiente.

Os excipientes CMC, amido pré-gelificado comercial e quitosana foram testados em três concentrações: 2,4; 4,8 e 9,1 %. Essas concentrações foram calculadas pela equação (13).

$$C_{EXCIPIENTE} = \left( \frac{M_{EXCIPIENTE}}{M_{EXCIPIENTE} + M_{MICROESFERAS SECAS}} \right) \times 100 \quad (13)$$

onde  $M_{EXCIPIENTE}$  é a massa de excipiente adicionada e  $M_{MICROESFERAS SECAS}$  é a massa das microesferas secas.

Grânulos também foram obtidos da mistura física dos constituintes das microesferas e contendo 4,8 % de quitosana como excipiente, para serem usados como controle. Em um recipiente, os pós de quitosana, hidróxido de magnésio e TPP foram misturado exatamente na mesma quantidade utilizada para a preparação das microesferas. Em seguida, adicionou-se a ddl em quantidade igual à incorporada na preparação das microesferas, quantidade esta baseada na eficiência de incorporação dos ensaios anteriores. De forma análoga à preparação dos grânulos, adicionou-se ainda 4,8 % de quitosana como excipiente. Estes pós foram homogeneizados em um recipiente fechado sob agitação recíproca por 30 min a 500 rpm. Finalmente, adicionou-se água destilada até a obtenção de uma massa úmida passível de extrusão. Não foi possível realizar a esferonização devido à plasticidade inadequada da massa úmida apesar de terem sido testadas diferentes quantidades de água, desta forma os grânulos apresentaram forma cilíndrica como os grânulos com CMC.

### **5.3.2. Caracterização dos Grânulos**

Os grânulos obtidos foram caracterizados através de parâmetros geométricos e da liberação da ddl incorporada.

#### **5.3.2.1. Parâmetros Geométricos**

Os parâmetros geométricos foram determinados através da análise de fotografias digitais dos grânulos espalhados sobre uma superfície negra, obtidas com uma câmera digital SONY (modelo FD Mavica MVC-FD75). As fotografias

foram processadas pelo programa *UTHSCSA Image Tool 3.0*. Para cada excipiente foram analisados 500 grânulos em várias fotografias. Os parâmetros geométricos determinados foram:

**Área (*Ar*):** corresponde à área ocupada pelo grânulo na fotografia.

**Perímetro (*Pm*):** comprimento da projeção do limite exterior do grânulo.

**Comprimento do maior eixo:** comprimento da maior linha traçada na maior distância.

**Comprimento do menor eixo:** comprimento da menor linha traçada na menor distância.

**Alongamento (*AL*):** relação entre o comprimento do maior eixo e o comprimento do menor eixo.

**Esfericidade (*Esf*):** medida dependente da rugosidade da superfície externa do grânulo (perímetro). Representa um número entre 0 e 1 e, quanto maior o valor, maior é o grau de esfericidade. É calculada pela equação (14).

$$Esf = \frac{4 \times \pi \times Ar}{Pm^2} \quad (14)$$

onde *Ar* e *Pm* são respectivamente, área e perímetro da partícula na fotografia digital.

Partículas muito próximas de um círculo perfeito apresentam valores de esfericidade e alongamento muito próximos de 1.

**Diâmetro de Feret (*DF*):** é o diâmetro de um círculo com a mesma área do objeto. É calculado pela equação (15).

$$DF = \sqrt{\frac{4 \times Ar}{\pi}} \quad (15)$$

onde *Ar* é a área da partícula na fotografia.

### **5.3.2.2. Liberação da Didanosina**

A liberação da ddl foi feita em suco entérico simulado (SES). Este foi preparado previamente com solução de tampão fosfato contendo 1,00 % de pancreatina de acordo com a metodologia da USP XXIII. O pH final foi ajustado em 7,40 com hidróxido de sódio ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Nesses ensaios foram utilizados 60 mg de grânulos e  $30 \text{ cm}^3$  de SES. Esta quantidade de grânulos apresentava de 23 a 30 mg de ddl, dependendo da quantidade de excipiente. Após a adição do SES aos grânulos, o sistema foi submetido à agitação recíproca (150 rpm e  $37^\circ\text{C}$ ) e, em tempos pré-determinados, eram retiradas alíquotas (20 - 30  $\mu\text{L}$ ) para a quantificação da ddl conforme descrito na seção 4.1.3.6.2. O SES fresco era repostado ao meio, em quantidade igual à da alíquota retirada, para manter o volume constante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## **5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.4.1. Efeito dos Excipientes na Produção dos Grânulos**

Dentre os excipientes usados, somente a CMC não possibilitou a esferonização dos grânulos extrudados. Provavelmente as interações entre as cargas negativas da CMC e as cargas positivas da quitosana produziram bastões resistentes à quebra durante a esferonização. Devido à essa limitação, quando a CMC foi usada como excipiente se procedeu apenas até a etapa de extrusão, obtendo-se grânulos cilíndricos com cerca de 3 mm de comprimento. Os outros dois excipientes testados, quitosana e amido não apresentaram esse problema durante a esferonização, possibilitando a obtenção de grânulos esféricos.

### **5.4.2. Efeito dos Excipientes nos Parâmetros Geométricos**

Algumas fotografias dos grânulos obtidos, usadas para a determinação dos parâmetros geométricos através do programa computacional *UTSHCSA Image Tool 3.0*, são apresentadas no Anexo 2. A Tabela 35 e a Figura 51 mostram os parâmetros geométricos determinados para os grânulos aqui preparados, em

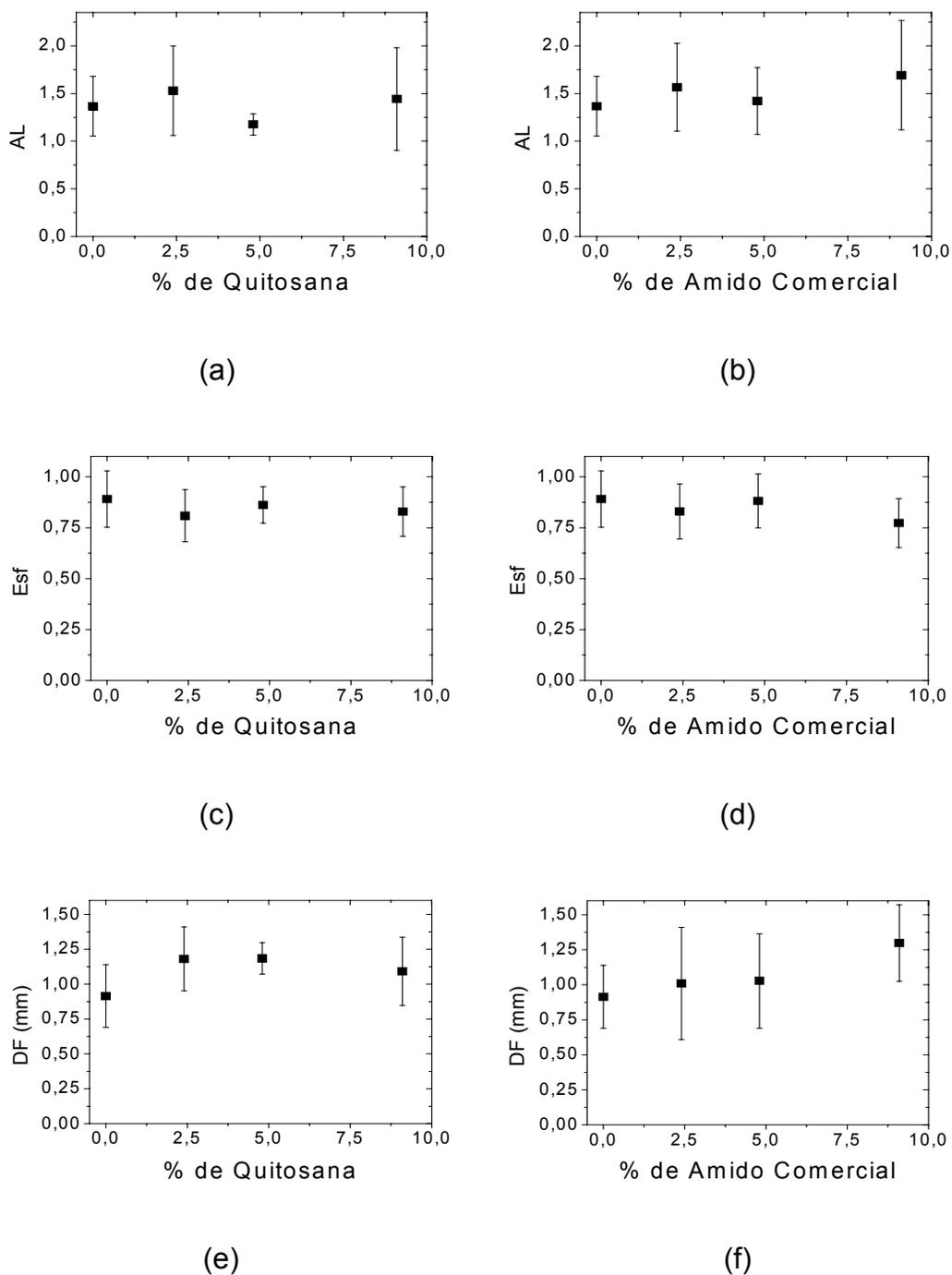
função da concentração dos excipientes usados, em comparação com os grânulos preparados sem excipiente e com o produto comercial (Videx<sup>®</sup> EC).

Para os grânulos com excipiente, observa-se que com relação ao alongamento, a diferença entre os valores médios é inferior a 10%, independente do excipiente ou concentração, com exceção dos grânulos nos quais se utilizou quitosana como excipiente a 4,8%. Os valores de esfericidade também foram semelhantes e maiores que 0,80, o que é considerado satisfatório para grânulos esferonizados, com exceção dos grânulos de amido comercial a 9,1%. Os diâmetros de Feret foram muito próximos de 1 mm, que é um valor adequado para encher cápsulas duras de gelatina, uma das formas pretendidas para a veiculação desses grânulos. Na ausência de excipiente, os grânulos apresentaram diâmetro de 0,91 mm, sugerindo que a adição do excipiente aumenta o seu diâmetro médio em cerca de 10 %. Esses resultados também foram muito semelhantes aos obtidos para o grânulo de Videx<sup>®</sup> EC, no entanto, cabe ressaltar que esses apresentam forma cilíndrica com altura aparentemente igual ao diâmetro (1 mm).

Para os grânulos contendo CMC, os parâmetros geométricos não foram calculados, por apresentaram-se na forma cilíndrica, com altura muito maior do que o diâmetro.

**TABELA 35.** Parâmetros geométricos de grânulos compostos de microesferas de quitosana e os excipientes amido e quitosana. Os grânulos sem excipientes e do Videx<sup>®</sup> EC foram caracterizados como controles.

	Alongamento	Esfericidade	Diâmetro de Feret (mm)
2,4 % Amido	1,55 ± 0,46	0,83 ± 0,13	1,01 ± 0,40
4,8 % Amido	1,42 ± 0,35	0,88 ± 0,13	1,03 ± 0,34
9,1 % Amido	1,69 ± 0,57	0,77 ± 0,12	1,30 ± 0,27
2,4 % Quitosana	1,53 ± 0,47	0,81 ± 0,12	1,18 ± 0,23
4,8 % Quitosana	1,18 ± 0,11	0,86 ± 0,09	1,18 ± 0,11
9,1 % Quitosana	1,43 ± 0,39	0,83 ± 0,12	1,09 ± 0,24
Sem Excipientes	1,36 ± 0,30	0,89 ± 0,14	0,91 ± 0,22
Videx <sup>®</sup> EC	1,43 ± 0,31	0,86 ± 0,10	1,52 ± 0,28

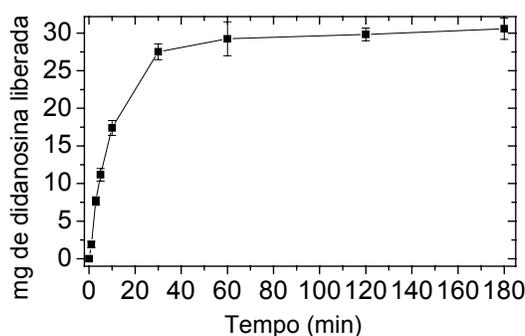


**FIGURA 51.** Variações dos parâmetros geométricos em função da concentração dos excipientes quitosana e amido comercial. (a) e (b) Alongamento-AL; (c) e (d) Esfericidade-Esf; (e) e (f) Diâmetro de Feret-DF.

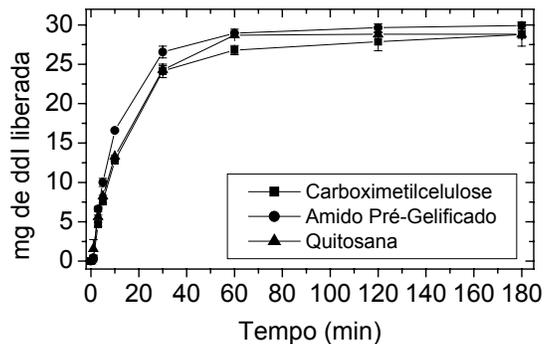
### 5.4.3. Liberação da Didanosina em Suco Entérico Simulado

Em função da quantidade de excipiente adicionada e da umidade, os grânulos preparados apresentaram de 37 a 50 % (m/m) de ddl. A Figura 52 mostra o perfil de liberação da ddl para os grânulos sem excipientes e a Figura 53 para os grânulos com várias concentrações dos excipientes. A comparação entre as Figuras 52 e 53 mostra pouca diferença entre os perfis de liberação dos grânulos com e sem excipientes.

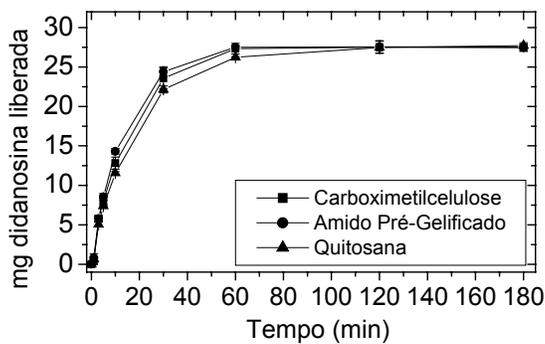
Em todos os casos, a forma hiperbólica dos perfis indica que a liberação da ddl dos grânulos ocorreu por difusão, em um intervalo de tempo de 60 min. Comparando-se os perfis, observa-se que quanto menor a quantidade de excipiente, maior a quantidade de ddl liberada. Por outro lado, a comparação entre os excipientes, para uma mesma concentração, mostrou que os perfis foram muito semelhantes para 2,4 e 4,8 % de excipiente. Diferenças na região do patamar foram observadas apenas para a concentração de 9,1 % dos excipientes (Figura 53 (c)). Essas diferenças foram da ordem de 10% para os excipientes quitosana e amido, e de 20% para a CMC. Estes resultados indicam que a CMC dificulta a liberação da ddl devido às interações entre as suas cargas negativas e as cargas positivas da quitosana.



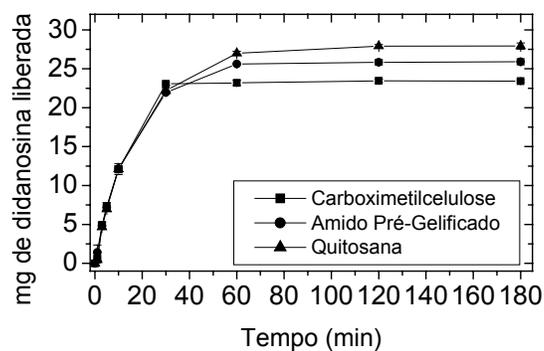
**FIGURA 52.** Perfil de liberação de didanosina contida nos grânulos sem excipientes.



(a)



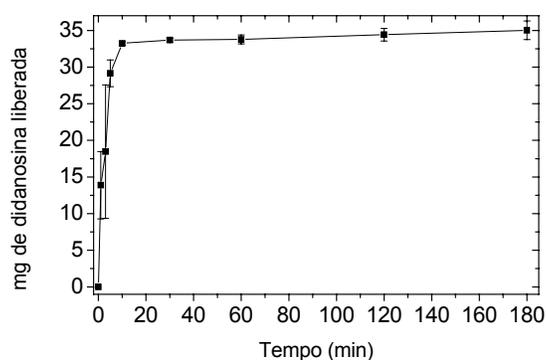
(b)



(c)

**FIGURA 53.** Perfis de liberação de didanosina contida nos grânulos para diferentes concentrações de excipientes: (a) 2,4 % (m/m); (b) 4,8 % (m/m) e (c) 9,1 % (m/m).

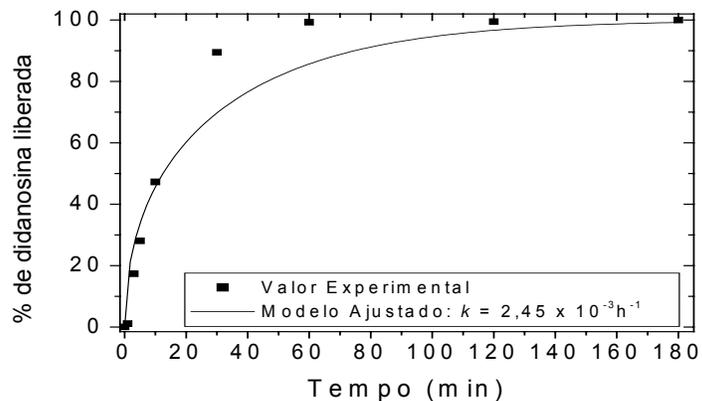
O perfil de liberação da ddl dos grânulos da mistura física dos compostos (sem a formação das microesferas) é apresentado na Figura 54. Observa-se nesse caso que a liberação ocorreu muito rapidamente (em 10 min praticamente toda ddl foi liberada) ao passo que para os grânulos contendo as microesferas de quitosana (Figura 53 (c)), a liberação completa ocorreu em um período maior que 100 min. Esses resultados mostram que as microesferas não só promovem a esferonização dos bastões obtidos por extrusão, quanto prolongam a liberação da ddl.



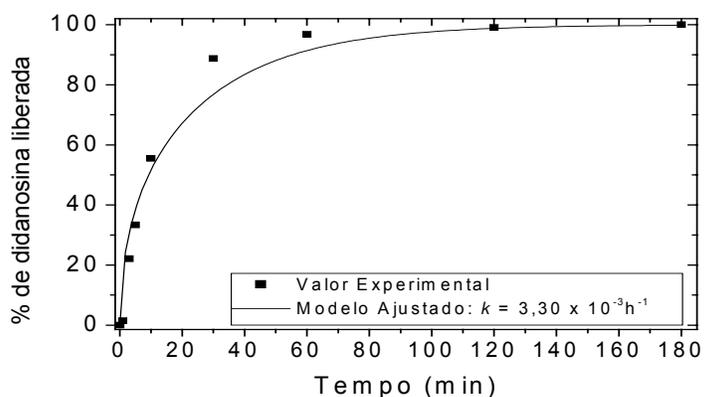
**FIGURA 54.** Perfil de liberação da didanosina contida em grânulos cilíndricos da mistura física.

#### ***5.4.4. Representação da Liberação da Didanosina Através de Modelo Difusivo***

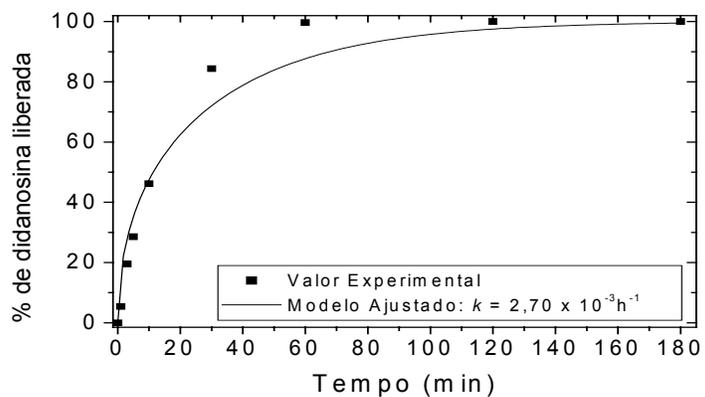
As Figuras 55 a 59 apresentam as curvas obtidas através do ajuste do modelo difusivo aos dados experimentais obtidos da liberação da ddl dos grânulos contendo ou não excipientes. Apesar do modelo ter sido desenvolvido para difusão em esferas, para efeito de comparação com os demais grânulos, também foi realizado o ajuste aos dados experimentais dos grânulos cilíndricos com CMC. Como já era esperado, o modelo difusivo representou melhor a liberação da ddl dos grânulos esféricos contendo quitosana ou amido como excipientes, e também para aqueles produzidos sem excipiente.



(a)

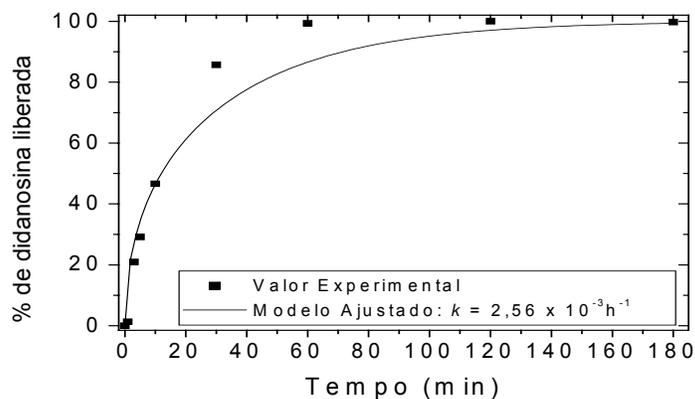


(b)

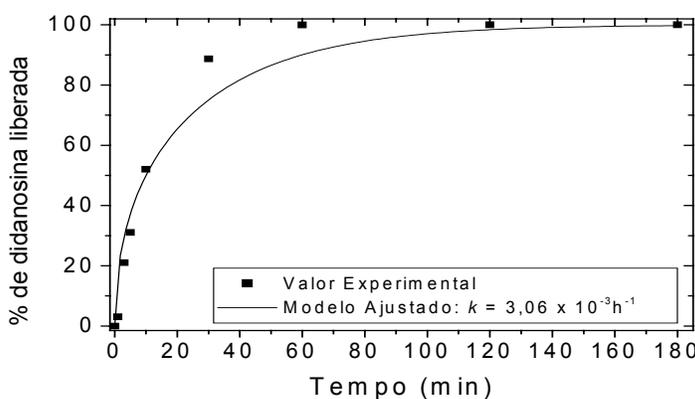


(c)

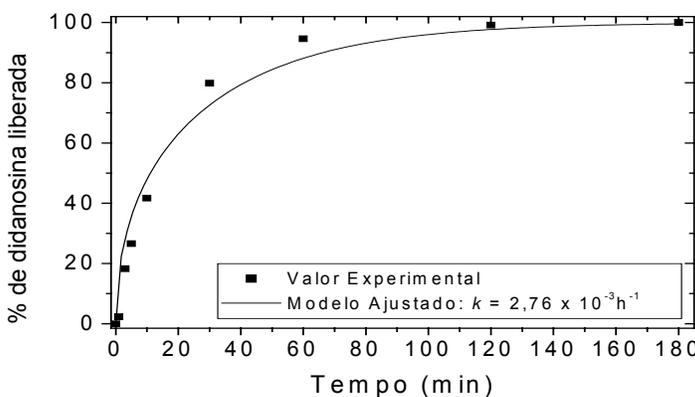
**FIGURA 55.** Perfis de liberação da didanosina obtidos através de ajuste de modelo difusivo aos dados experimentais para grânulos contendo 2,4 % (m/m) de excipiente: (a) carboximetilcelulose; (b) amido pré-gelificado e (c) quitosana.



(a)

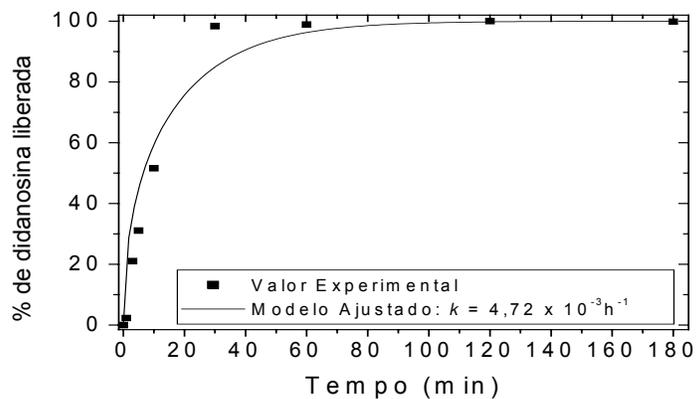


(b)

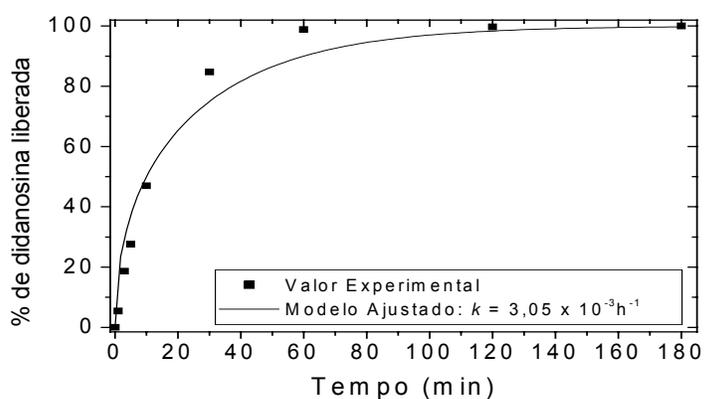


(c)

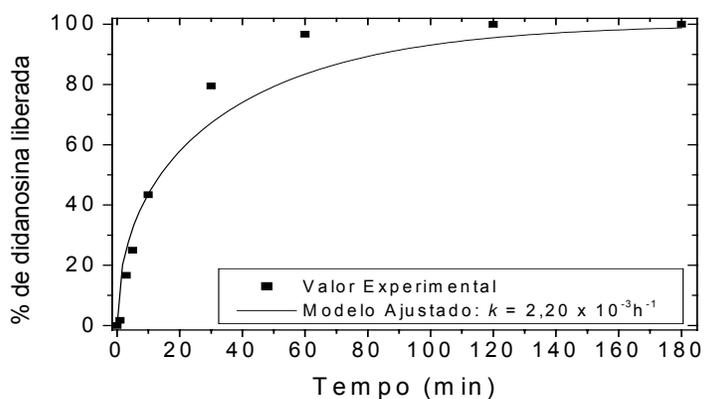
**FIGURA 56.** Perfis de liberação da didanosina obtidos através de ajuste de modelo difusivo aos dados experimentais para grânulos contendo 4,8 % (m/m) de excipiente: (a) carboximetilcelulose; (b) amido pré-gelificado e (c) quitosana.



(a)

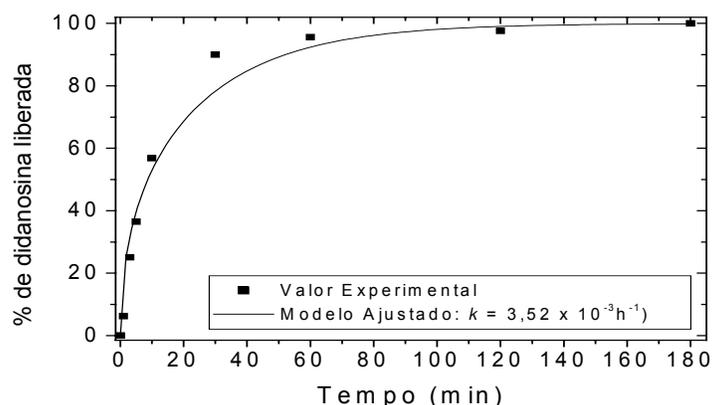


(b)



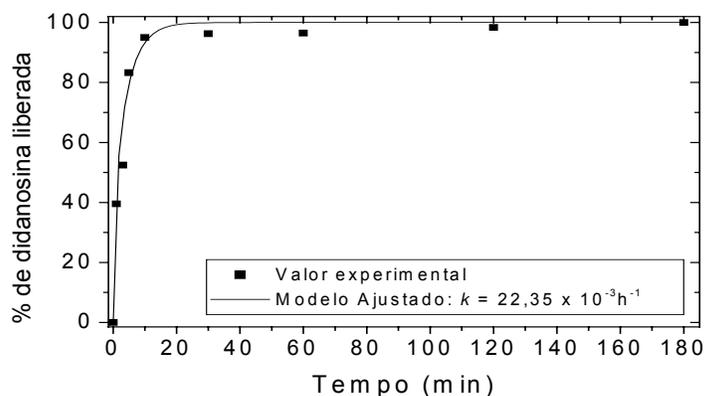
(c)

**FIGURA 57.** Perfis de liberação da didanosina obtidos através de ajuste de modelo difusivo aos dados experimentais para grânulos contendo 9,1 % (m/m) de excipiente: (a) carboximetilcelulose; (b) amido pré-gelificado e (c) quitosana.



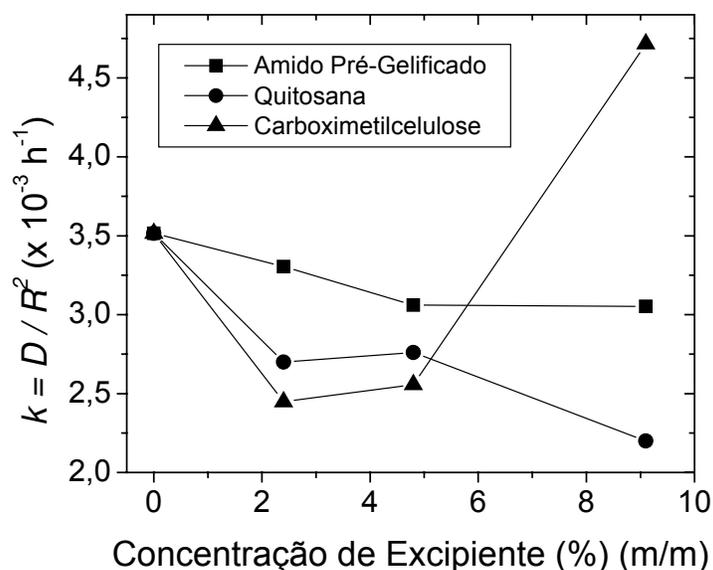
**FIGURA 58.** Perfis de liberação da didanosina contida nos grânulos esféricos sem qualquer excipiente e o modelo difusivo ajustado aos dados experimentais.

Comparando-se com a mistura física, apesar da geometria cilíndrica dos grânulos, o modelo difusivo para esferas também representou adequadamente os dados experimentais como pode ser visto na Figura 59.



**FIGURA 59.** Perfil de liberação da didanosina obtidos através de ajuste de modelo difusivo aos dados experimentais para grânulos cilíndricos da mistura física.

O comportamento da constante  $k$  ( $= D/R^2$ ) da equação (5), determinada a partir do modelo, em função do excipiente e da sua concentração é apresentado na Figura 60. Em todos os casos os valores de  $k$  foram da mesma ordem de grandeza. Os maiores valores foram obtidos para os grânulos com amido pré-gelificado comercial, com exceção dos grânulos contendo 9,1 % de CMC. O amido é normalmente utilizado em formulações farmacêuticas como agente desintegrante, promovendo assim maior taxa de liberação da ddl, o que explica os resultados obtidos.



**FIGURA 60.** Variação da constante  $k$  do modelo difusivo em função da concentração de excipientes nos grânulos.

A Tabela 36 mostra os valores da constante  $k$  obtidos com as várias concentrações de excipientes, em comparação com os valores determinados para os grânulos preparados sem excipiente, e a partir da mistura física dos componentes (sem microesferas).

**TABELA 36.** Valores da constante  $k$  ( $\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) obtidos em várias concentrações de excipientes.

Excipiente	Concentração do Excipiente % (m/m)	$k$ ( $\times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ )
Carboximetilcelulose	2,4	2,45
	4,8	2,56
	9,1	4,72
Amido	2,4	3,30
	4,8	3,06
	9,1	3,05
Quitosana	2,4	2,70
	4,8	2,76
	9,1	2,20
Mistura Física	4,8	22,35
Sem Excipiente	-	3,52

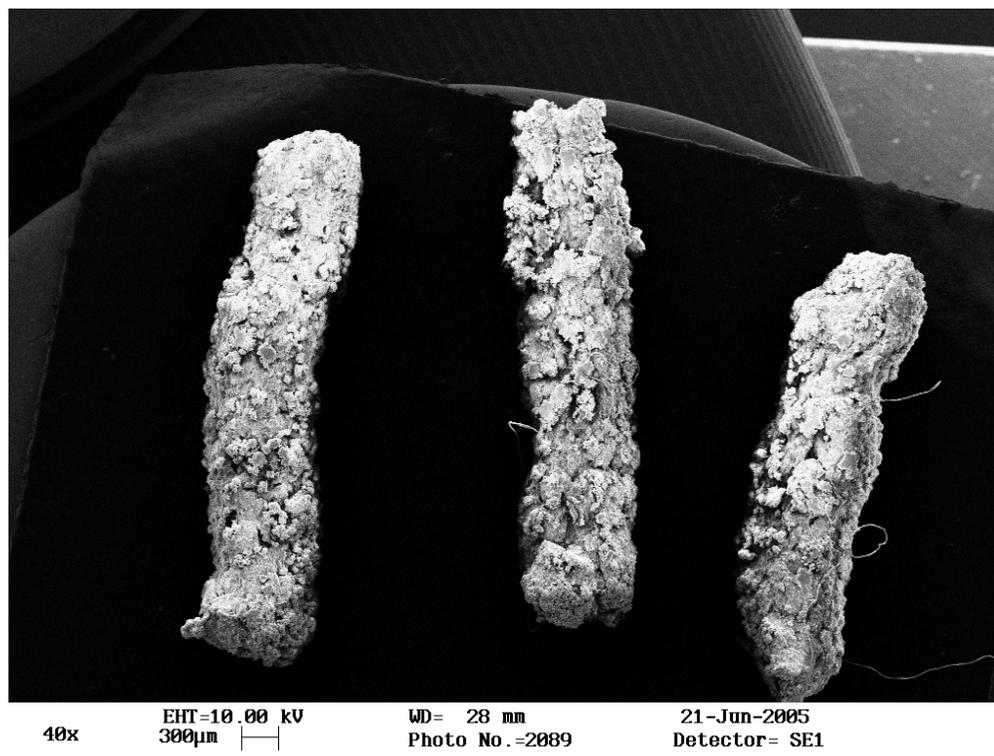
Observa-se na Tabela 36, que os valores de  $k$  variaram, para o amido pré-gelificado comercial, de  $3,05 \times 10^{-3}$  a  $3,30 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , e para a quitosana, de  $2,20 \times 10^{-3}$  a  $2,76 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Para a CMC a variação foi quase o dobro, de  $2,45 \times 10^{-3}$  (2,4 % de CMC) a  $4,72 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  (9,1 % de CMC).

O valor da constante  $k$ , obtida para a liberação da ddl dos grânulos preparados sem excipiente, foi aproximadamente igual ao obtido para os grânulos com os excipientes quitosana e amido. Esse resultado mostra que nesses casos o excipiente não tem influência na liberação da ddl, a qual é controlada pelas microesferas presentes nos grânulos. A constante  $k$  determinada para a mistura física foi  $22,35 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , quase 10 vezes maior que o valor obtido para os grânulos de microesferas contendo 4,8 % de quitosana como excipiente ( $k = 2,76 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

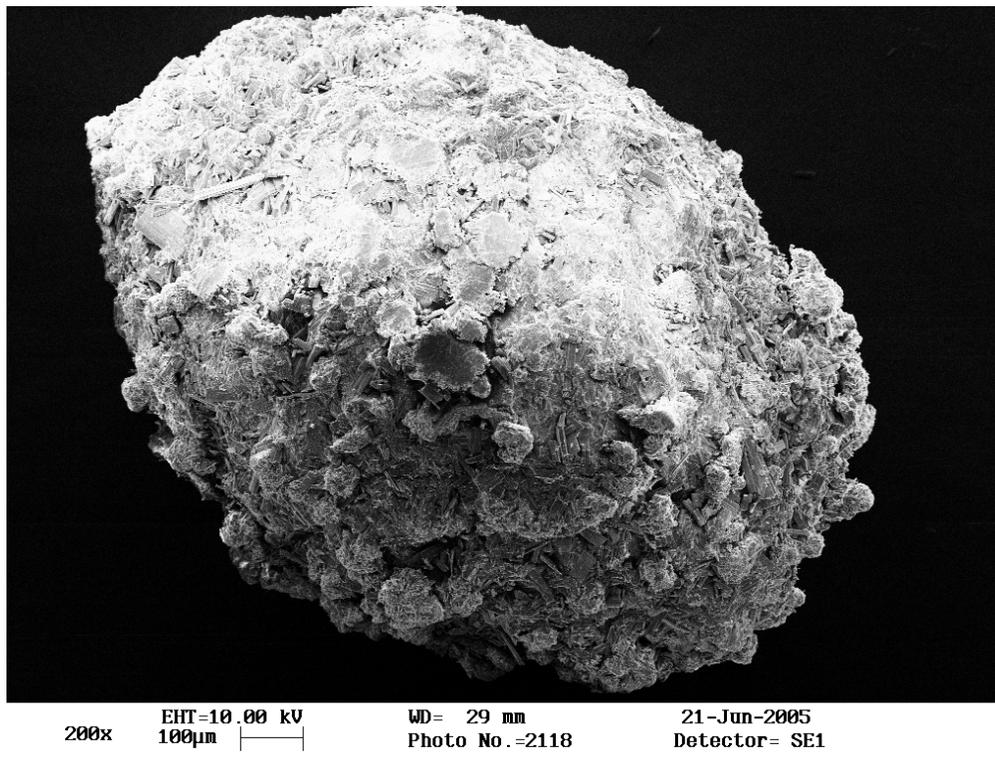
### 5.4.5. Análise da Superfície dos Grânulos

Os grânulos contendo o valor intermediário da concentração (4,8 %) dos excipientes CMC, quitosana, e amido e os grânulos sem excipiente foram escolhidos para análise da sua superfície através de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

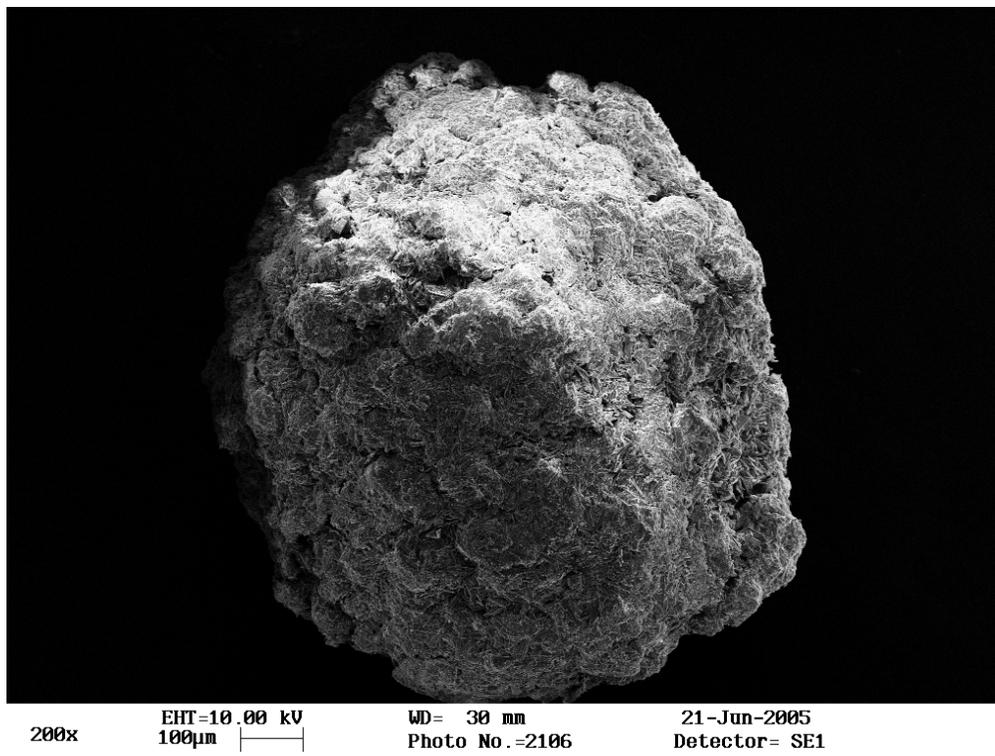
As Figuras 61 a 64 mostram as superfícies dos grânulos contendo ou não excipiente. Observa-se, principalmente nas Figuras 61 e 62, sobre as superfícies, a presença de estruturas esféricas de tamanhos maiores (100  $\mu\text{m}$ ) que os das microesferas previamente preparadas. Um aumento maior na micrografia dos grânulos de amido (Figura 67), permite detectar a presença de grande número de cristais de ddl na superfície desses grânulos, que provavelmente posicionados sobre as microesferas produziram o aumento de tamanho observado nas Figuras 61 a 64.



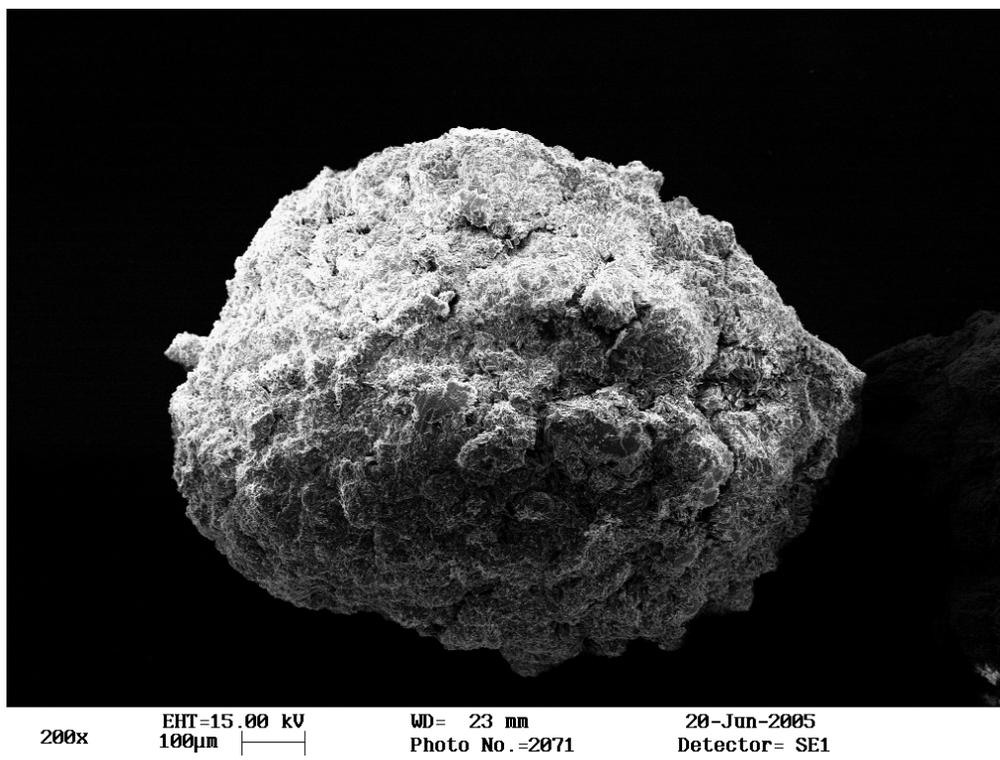
**FIGURA 61.** Micrografia dos grânulos cilíndricos contendo 4,8 % de carboximetilcelulose.



**FIGURA 62.** Micrografia de um grânulo esférico contendo 4,8 % de amido pré-gelificado.

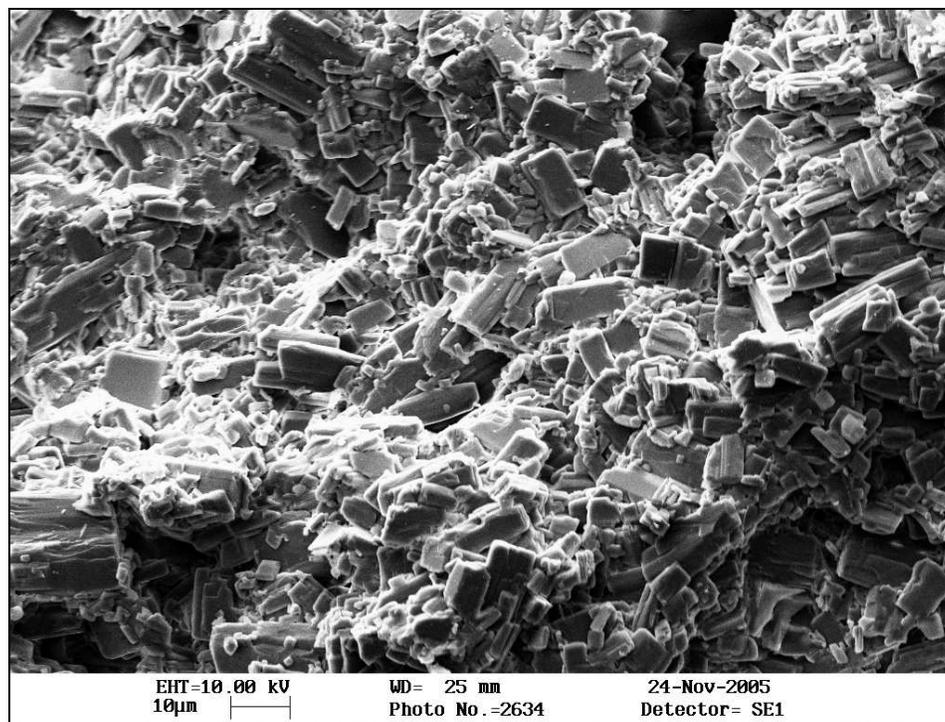


**FIGURA 63.** Micrografia de um grânulo esférico contendo 4,8 % de quitosana.

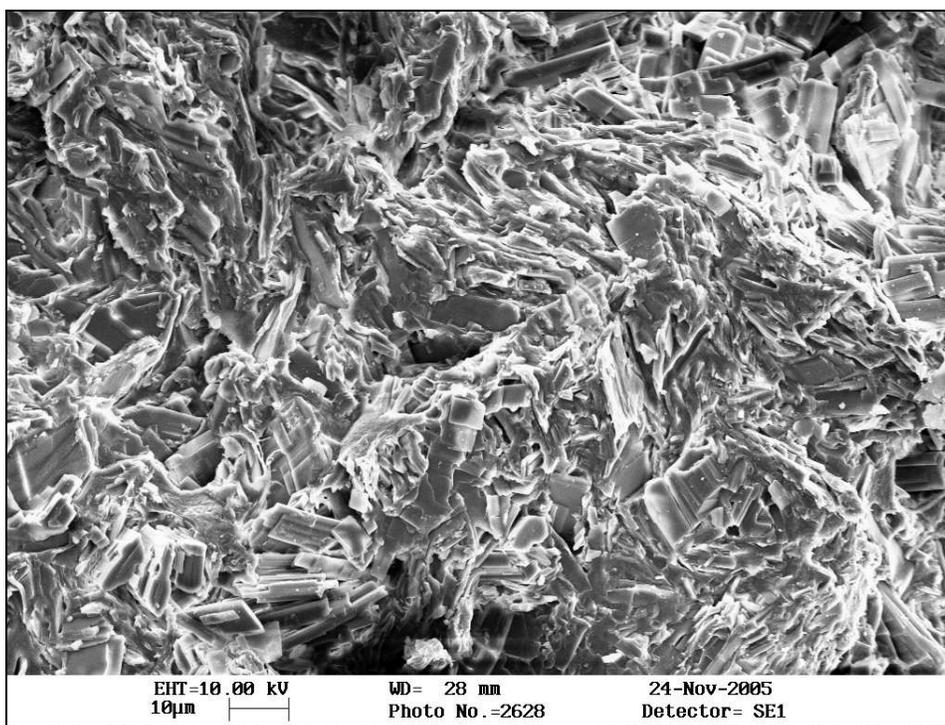


**FIGURA 64.** Micrografia de um grânulo esférico sem excipiente.

As Figuras 65 e 66, com aumento de 2.000 vezes, mostram a existência de muitos cristais de ddl, tanto no grânulo de Videx<sup>®</sup> EC como no grânulo não recoberto. Os cristais têm diâmetros da ordem de 10 µm, tão grandes quanto as microesferas de quitosana. No processo de secagem, que antecede a extrusão-esferonização, as microesferas tendem a se encolherem e se agregarem, o que dificulta a visualização das mesmas. É provável que no processo de liberação da ddl, quando os grânulos absorverem água, as microesferas retomem a forma original.

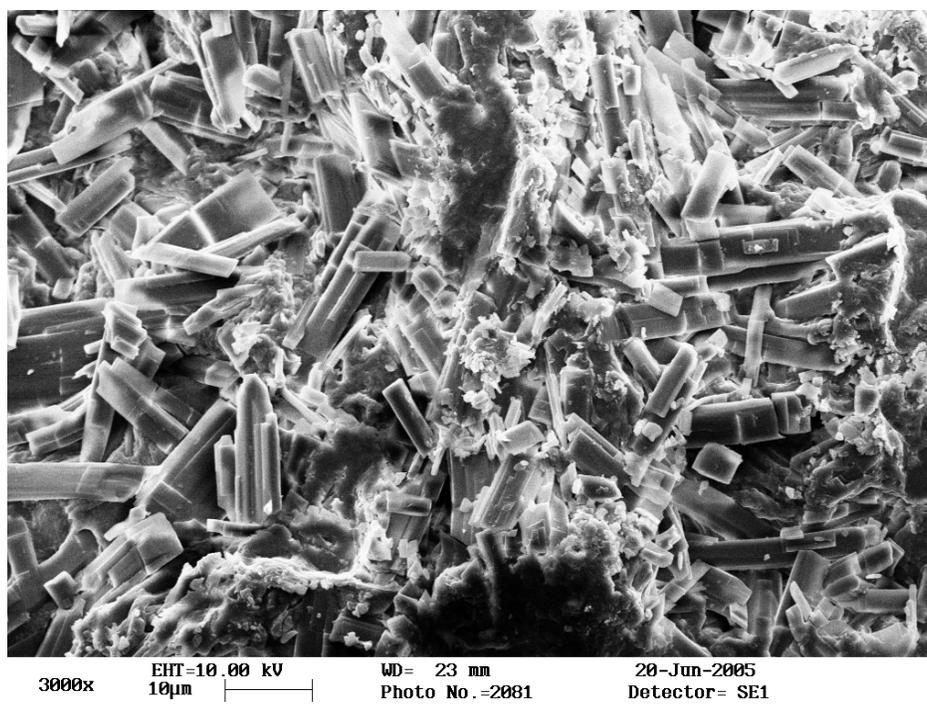


**FIGURA 65.** Micrografia da estrutura interna do grânulo de Videx® EC (aumentada 2.000 vezes).

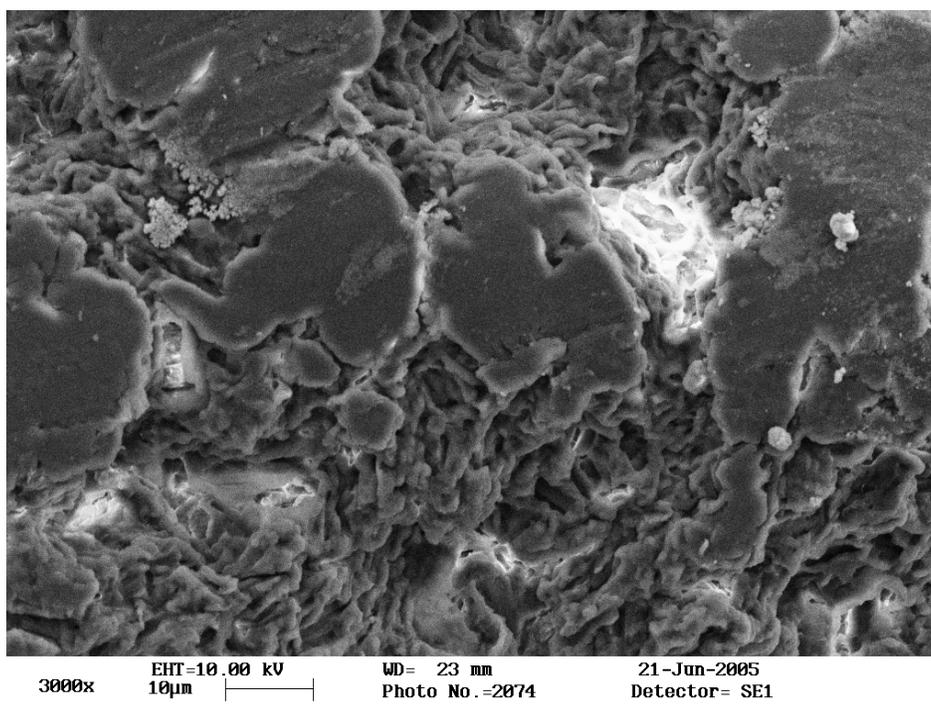


**FIGURA 66.** Micrografia da estrutura interna do grânulo não recoberto (aumentada 2.000 vezes).

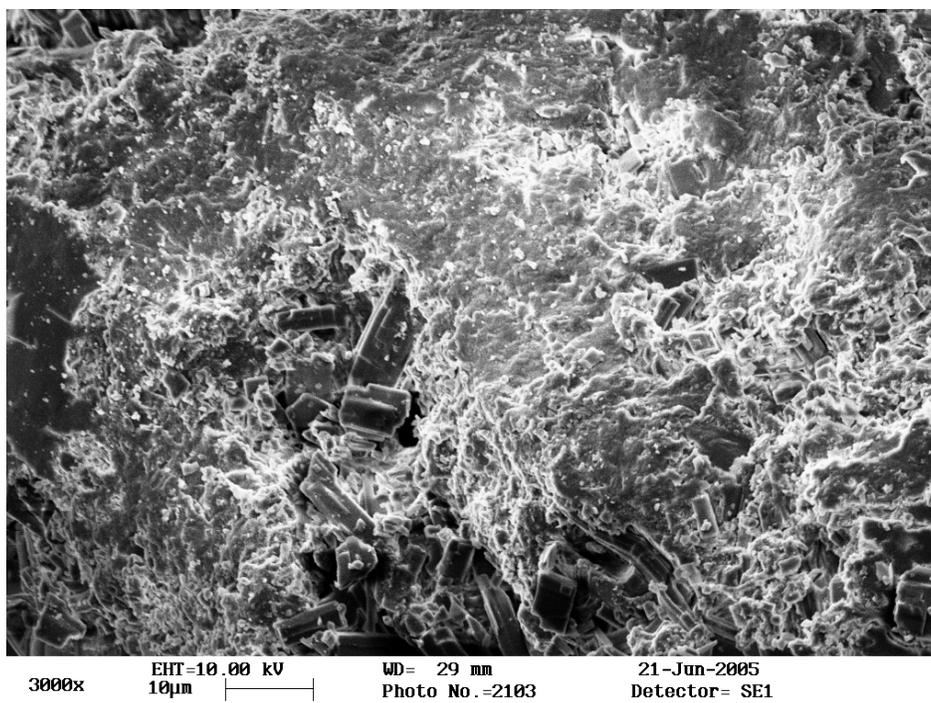
As Figuras 67 a 70 mostram comparativamente as superfícies dos grânulos antes e depois da liberação da ddl em SES. A Figura 67, antes da liberação, mostra a presença de grande quantidade de cristais de ddl não encapsulada sobre a superfície dos grânulos contendo amido pré-gelificado, que nessa ampliação dificulta a visualização das microesferas. Com a quitosana como excipiente, a superfície dos grânulos apresenta-se mais homogênea, com quantidade menor de cristais expostos, sugerindo que o excipiente reveste a superfície dos grânulos (Figura 69). Após a liberação em SES, em ambos os casos os cristais de ddl não mais foram observados, dando lugar a cavidades sobre a superfície dos grânulos, as quais foram mais freqüentes na superfície dos grânulos contendo amido pré-gelificado (Figura 68), em relação aqueles que continham quitosana como excipiente (Figura 70).



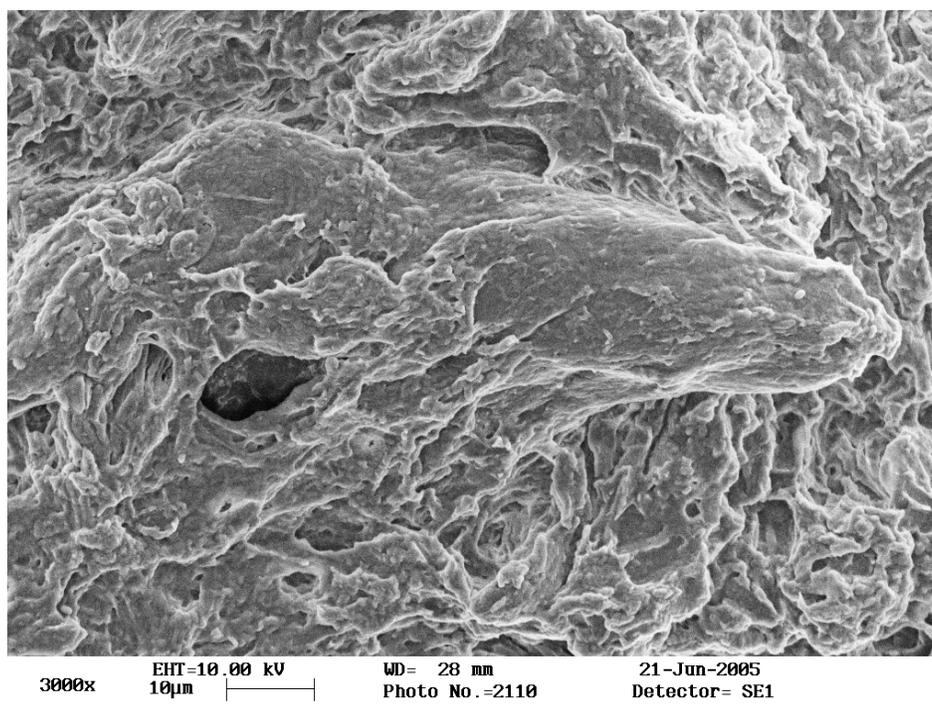
**FIGURA 67.** Micrografia da superfície dos grânulos contendo microesferas de quitosana, didanosina e 4,8 % de amido pré-gelificado antes da liberação da ddl em suco entérico simulado com pancreatina.



**FIGURA 68.** Micrografia da superfície dos grânulos contendo microesferas de quitosana, didanosina e 4,8 % de amido pré-gelificado após a liberação da ddi em suco entérico simulado com pancreatina.



**FIGURA 69.** Micrografia da superfície dos grânulos contendo microesferas de quitosana, didanosina e 4,8 % quitosana antes da liberação da ddi em suco entérico simulado com pancreatina.



**FIGURA 70.** Micrografia da superfície dos grânulos contendo microesferas de quitosana, didanosina e 4,8 % de quitosana após a liberação da ddl em suco entérico simulado com pancreatina.

## CAPÍTULO 6

### MUCOADESÃO

#### 6.0. INTRODUÇÃO

A caracterização da mucoadesão *in vitro* das partículas preparados neste trabalho, teve o objetivo de avaliá-los quanto à potencialidade de retenção na mucosa intestinal, como uma medida indireta da absorção e biodisponibilidade da didanosina (ddl) nessas formulações.

A mucoadesão foi avaliada através de isotermas de adsorção da mucina. Foram avaliados os efeitos da granulação e dos excipientes usados na preparação dos grânulos: quitosana, carboximetilcelulose (CMC) e amido pré-gelificado comercial. As microesferas liofilizadas e os grânulos sem excipientes foram usados como controles.

Nesse capítulo, apresentam-se os conceitos de bioadesão e mucoadesão, os seus efeitos na biodisponibilidade de fármacos, os principais mecanismos e métodos descritos na literatura para a caracterização da mucoadesão, os resultados obtidos e discussão.

#### 6.1. BIOADESÃO E MUCOADESÃO

Bioadesão é a aderência de moléculas em superfícies biológicas. Em formulações farmacêuticas, a propriedade de bioadesão é usada para aumentar o tempo de residência de princípios ativos nas superfícies através das quais os fármacos são absorvidos, elevando assim a sua biodisponibilidade. As mucosas, constituem a maioria das superfícies biológicas de interesse para administração de fármacos. Essas superfícies são cobertas por uma camada de muco, um gel complexo excretado pelas células calciformes da superfície epitelial, que apresenta grande quantidade da glicoproteína mucina. Assim, define-se

mucoadesão como um caso particular da bioadesão, na qual as moléculas são aderidas à camada de muco (WOODLEY, 2001).

De acordo com (WOODLEY, 2001), a adição de moléculas mucoadesivas às formulações representa uma estratégia de direcionamento do fármaco para mucosas, e o aumento do tempo de residência combinado com a liberação controlada, que pode levar a redução na frequência de administração.

### **6.1.1. Mecanismos da Bioadesão**

DODOU *et al.* (2005) descrevem as principais teorias que explicam o mecanismo pelo qual as moléculas se aderem à camada de muco. Essas teorias, são baseadas nas teorias clássicas de adesão de polímeros a metais, e são conhecidas como: *teoria eletrônica, de adsorção, intumescimento e difusão*.

-*Teoria eletrônica*: considera que a transferência de elétrons do muco para a molécula mucoadesiva ocorre devido às diferenças nas suas estruturas eletrônicas. Essa transferência leva à formação de uma dupla camada de cargas elétricas na interface, devido às forças de atração.

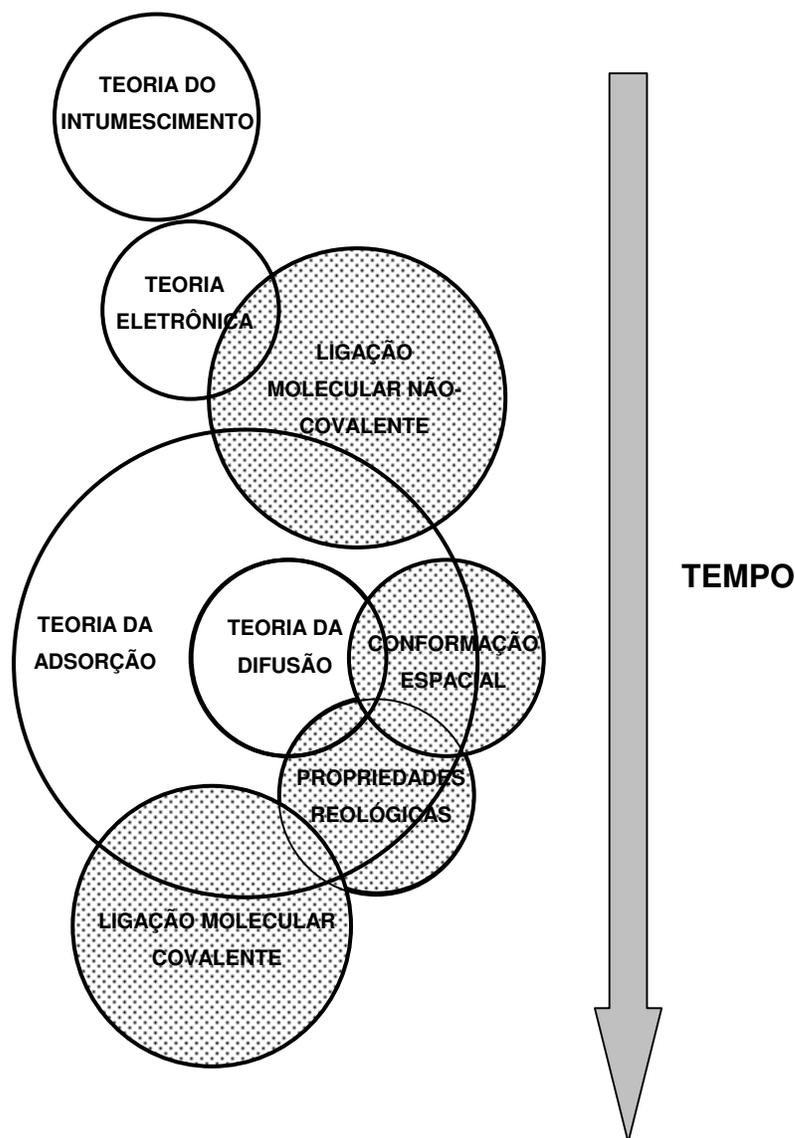
-*Teoria da adsorção*: refere-se à atração entre o muco e a molécula mucoadesiva atingida através de ligações moleculares tais como ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. Essas forças atrativas são consideravelmente maiores que as descritas pela teoria eletrônica.

-*Teoria do Intumescimento*: correlaciona as tensões superficiais do muco e da molécula mucoadesiva com a sua habilidade de intumescer e se espalhar sobre a camada de muco. Indica que a energia interfacial desempenha papel importante na mucoadesão. O espalhamento da molécula sobre o muco é um pré-requisito para a validade de todas outras teorias.

-*Teoria da Difusão*: refere-se à interpenetração em profundidade e entrelaçamento físico das cadeias poliméricas da molécula mucoadesiva e muco. Esses processos dependem de propriedades da molécula mucoadesiva como massa molar, grau de reticulação, comprimento da cadeia polimérica, flexibilidade e conformação espacial.

Nenhuma dessas teorias isoladas dá uma descrição completa do mecanismo de mucoadesão. Na verdade, o fenômeno total de mucoadesão é o

resultado da combinação de todas essas teorias, e o processo de mucoadesão é uma seqüência de etapas em que cada uma está associada a um mecanismo diferente, como esquematizado na Figura 71.



**FIGURA 71.** Teorias da mucoadesão (círculos brancos) e propriedades materiais do mucoadesivos (círculos hachurados) as áreas sobrepostas entre os círculos das propriedades dos materiais e as teorias da mucoadesão indicam como e qual a extensão elas estão relacionadas (adaptação de DODOU *et al.*, 2005).

### **6.1.2. Mucoadesão e Biodisponibilidade**

Além de caracterizar a mucoadesão, CHICKERING III *et al.* (1997) estudaram a habilidade dos polímeros alginato ou poli-(fumárico-co-sebácico anídrico) de aumentar a biodisponibilidade de um fármaco modelo (dicumarol) em ratos. As microesferas de poli-(fumárico-co-sebácico anídrico) promoveram o aumento significativo na área sob a curva concentração plasmática *versus* tempo se comparada com o controle. Os resultados foram justificados pela maior mucoadesão dessas microesferas ao tecido epitelial. Segundo os autores, o contato íntimo com o tecido epitelial reduz as perdas do fármaco, resultando em aumento da sua absorção.

DODANE *et al.* (1999) estudaram as alterações promovidas pela quitosana nas barreiras epiteliais utilizando medidas da permeabilidade do manitol, um marcador paracelular, através de células Caco-2 (originária de um carcinoma colorretal humano). Eles concluíram que a quitosana aumenta a permeabilidade da célula devido ao caminho intracelular e paracelular. Segundo os autores, a quitosana promove efeitos leves e reversíveis na morfologia epitelial que a torna um componente promotor de absorção de fármacos em mucosas.

### **6.1.3. Métodos para Determinação da Mucoadesão**

A literatura mostra grande diversidade de métodos para determinação da mucoadesão. Esses métodos podem ser realizados nas diferentes formas: *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, e alguns deles são somente qualitativos. Segundo PARK *et al.* (1987), uma vez que o método é estabelecido, a melhor maneira de caracterizar as propriedades de vários polímeros é ter uma medida comparativa do seu desempenho adesivo. Para um dado método, a medida da adesão é muito sensível às condições experimentais.

GÅSERØD *et al.* (1998) construíram um sistema para determinar a mucoadesão de microcápsulas de alginato recobertas ou não com quitosana. Nesse sistema, uma determinada quantidade de partículas era colocada na parte superior de uma superfície inclinada recoberta por um tecido de estômago de porco que era constantemente molhado por saliva artificial na parte mais alta. No decorrer do tempo as partículas percorriam a superfície inclinada e caíam sobre

um recipiente. A porcentagem de adesão foi definida como a razão entre a quantidade de partículas que não se deslocavam e a quantidade inicial de partículas. Os autores observaram que a porcentagem de adesão das partículas recobertas com quitosana foi duas vezes e meio maior do que as partículas não recobertas.

A mucoadesão de microesferas de alginato ou poli-(fumárico-co-sebácico anídrico) marcadas com bário foi estudado por CHICKERING III *et al.* (1997). Após a ingestão das partículas por ratos, o trato gastrintestinal era radiografado em intervalos pré-determinados para determinar a localização das microesferas. As fezes dos animais também foram analisadas durante três dias em intervalos de tempo pré-determinados. Eles verificaram que após 34 h, 90 % das microesferas de poli-(fumárico-co-sebácico anídrico) haviam sido excretadas, por outro lado, para as microesferas de alginato este tempo foi de 20 h.

EL-HAMEED & KELLAWAY (1997) estudaram a mucoadesão de microesferas poliméricas utilizando o método do tensiômetro. Círculos de 9 mm de membranas de nitrato de celulose foram recobertos com um filme de gel de carbopol. As microesferas foram retidas neste filmes e posteriormente secas em estufa. A mucoadesão foi determinada através da força necessária para o desprendimento do disco contendo as esferas, em contato com uma camada de solução de mucina. Os autores compararam microesferas de diferentes polímeros e verificaram que as partículas de quitosana apresentaram mucoadesão duas vezes maior do que as partículas de álcool polivinílico (PVA).

TIROSH *et al.* (1997) utilizaram o método do tensiômetro para estudar a adesão da mucina em comprimidos recobertos com Eudragit® RL 100. Eles observaram que o aumento da concentração do Eudragit® RL 100 promove a redução na mucoadesão.

O método do tensiômetro foi utilizado por BERNKOP-SCHNÜRCH *et al.* (1998) estudar a mucoadesão da mucina em filmes de quitosana e de Carbopol 934P. Os resultados mostraram que a mucoadesão dos polímeros é da mesma ordem.

GENTA *et al.* (1998) utilizaram a microscopia eletrônica de transmissão para verificar qualitativamente a mucoadesão de microesferas de quitosana. A

mucina foi previamente solubilizada em cloreto de guanidina e colocada em contato com as microesferas. Em seguida foram feitas imagens onde foi possível observar a interação entre a mucina e as microesferas. Os autores verificaram que as microesferas de quitosana não reticuladas apresentaram grande afinidade pela mucina se comparadas com as microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído que não apresentaram esta propriedade.

HE *et al.* (1998) determinaram isotermas de adsorção de mucina em microesferas de quitosana. A concentração de mucina foi medida através do método colorimétrico PAS que utiliza o ácido periódico e a base de Schiff. Eles observaram que o ajuste ao modelo de Langmuir foi melhor do que ao modelo de Freundlich. A avaliação da mucoadesividade através de isotermas de adsorção possui as seguintes vantagens: (i) mimetiza o processo *in vivo*; (ii) possibilita a obtenção de dados quantitativos e (iii) simplicidade e reprodutibilidade.

## **6.2. MATERIAL**

Microesferas liofilizadas de quitosana, grânulos sem excipientes ou contendo 4,8 % dos excipientes: carboximetilcelulose (CMC), amido pré-gelificado e quitosana, todos anteriormente preparados e caracterizados neste trabalho, foram usados como adsorventes. Como adsorbato foi usada a mucina de porcos do tipo III (1 % de ácido siálico) da marca Sigma. Ácido periódico e pararosanilina (fucsina) ambos da marca VETEC foram usados para a quantificação da mucina.

## **6.3. MÉTODOS**

Os dados experimentais de adsorção da mucina nas microesferas ou grânulos, foram obtidos de acordo com procedimento utilizado por HE *et al.* (1998). Colocou-se 20 mg de partículas em contato com 5 cm<sup>3</sup> de solução de mucina em diferentes concentrações. Após 3,5 h de contato sob agitação recíproca (150 rpm e 37°C), dosou-se a quantidade de mucina no sobrenadante dessa suspensão. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração de solução de mucina. A quantidade de mucina adsorvida foi determinada pela diferença entre a sua quantidade inicial e aquela contida no sobrenadante após o contato com as partículas.

A mucina foi dosada pelo método espectrofotométrico PAS (Periodic Acid/Schiff ou Ácido Periódico/Schiff) descrito por MANTLE & ALLEN (1978). O método baseia-se na medida de polissacarídeos que são oxidados pelo periodato. Consiste na oxidação dos grupos 1-2 glicol, produzindo aldeídos, os quais reagem com a fucsina descolorada, chamada de reagente de Schiff, dando um composto de coloração rosa vivo que é medido em 555 nm.

As isotermas de adsorção da mucina foram obtidas plotando-se as concentrações de mucina em equilíbrio nas fases líquida e sólida (adsorvida na partícula). Os dados experimentais foram ajustados ao modelo de Langmuir (equação 16) pelo módulo de estimativa não linear do programa STATISTICA que utiliza o método de quasi-Newton.

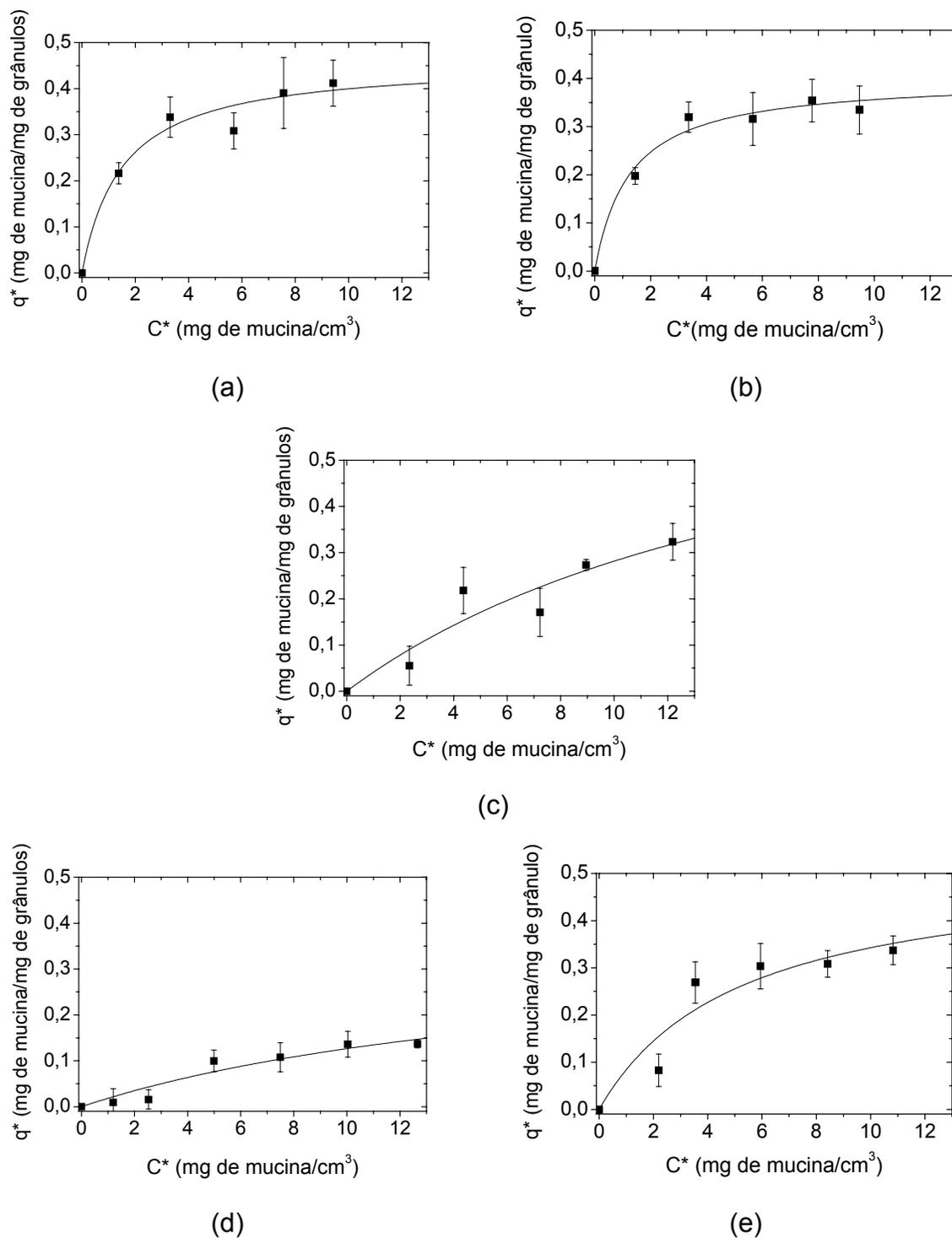
$$q^* = \frac{q_{MAX} \cdot C^*}{K_D + C^*} \quad (16)$$

onde,  $q^*$  é a concentração de soluto em equilíbrio na fase sólida (neste caso, mg de mucina/mg de partículas),  $q_{MAX}$  é a quantidade máxima de soluto adsorvido pelas partículas (mg de mucina/mg de partículas),  $C^*$  é a concentração de soluto em equilíbrio na fase líquida (mg de mucina/cm<sup>3</sup> de solução) e  $K_D$  é a constante de Langmuir ou constante de afinidade (mg de mucina/cm<sup>3</sup> de solução).

Para utilização desta técnica, supõe-se que não ocorrem reações químicas entre os componentes da mucina e as partículas testadas.

#### **6.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Figura 72 mostra as isotermas de adsorção obtidas. Observa-se que o modelo de Langmuir representou bem os dados experimentais, com coeficientes de regressão variando entre 0,94 e 0,99. HE *et al.* (1998) também verificaram bom ajuste do modelo de Langmuir para microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e preparadas pela técnica de atomização (*Spray Drying*).



**FIGURA 72.** Isotermas de adsorção da mucina em: (a) grânulos esféricos com amido pré-gelificado, (b) grânulos esféricos com quitosana, (c) grânulos esféricos sem excipientes, (d) grânulos cilíndricos com CMC, (e) microesferas de quitosana liofilizadas.

A comparação dos perfis das isotermas da Figura 72 e os valores dos coeficientes do modelo de Langmuir da Tabela 37 possibilita a compreensão do fenômeno de adsorção. O perfil das isotermas dos grânulos, com quitosana e com amido pré-gelificado, é muito semelhante à forma da isoterma das microesferas liofilizadas. Por outro lado, a forma das isotermas dos grânulos sem excipientes e com CMC é mais distinta apesar do bom ajuste ao modelo de Langmuir. O processo de extrusão-esferonização das microesferas sem excipientes altera a afinidade das microesferas com relação à mucina, principalmente pela interiorização das microesferas no grânulo, que reduz a afinidade do grânulo. Isto porque muitas microesferas presentes no interior do grânulo são sítios potenciais de adsorção da mucina. Fisicamente alguns destes sítios poderiam ser inatingíveis pela a mucina, o que acarretaria grandes diferenças nos valores obtidos para o  $q_{MAX}$ , mas isto não foi verificado, de acordo com a Tabela 37.

A difusão da mucina para o interior destes grânulos depende da diferença entre a concentração de mucina no interior do grânulo e no exterior (na solução). Desta forma, é necessário um gradiente maior de concentração, ou seja, a concentração da solução de mucina deve ser muito maior para atingir o interior dos grânulos, o que significa maior valor de  $K_D$  ou redução da afinidade. Por outro lado, a esferonização das microesferas com excipientes como a quitosana e o amido promove um aumento significativo da afinidade da mucina pelos grânulos. Tais grânulos apresentam afinidade superior até mesmo à afinidade das microesferas pela mucina. O aumento da afinidade se deve ao excipiente adicionado. A interpenetração da mucina com as cadeias poliméricas do amido ou da quitosana favorecem o processo de adsorção. Assim, a adição de excipientes compensa a perda de afinidade decorrente do processo de esferonização sem excipiente.

Os parâmetros ajustados através do modelo de Langmuir, apresentados na Tabela 37, mostram que a capacidade máxima de adsorção,  $q_{MAX}$ , é da mesma ordem de grandeza para os vários grânulos (de 0,37 a 0,80 mg de mucina/mg de partículas) e para as microesferas liofilizadas (0,52 mg de mucina/mg de partículas). Apesar disso, observa-se que os grânulos sem excipientes apresentam  $q_{MAX}$  superior. Conforme as Tabelas 29 e 35, o diâmetro médio dos grânulos é aproximadamente 1,10 mm (= 1100  $\mu$ m) e das microesferas é 8,13  $\mu$ m,

ou seja, cerca 135 vezes menor do que o diâmetro dos grânulos. Admitindo que não há quebra ou deformação das microesferas durante a granulação, a razão entre o volume de um grânulo e o volume de uma microesfera fornece a quantidade aproximada de microesferas em um grânulo, ou seja, aproximadamente 2.445.965 microesferas/grânulo. Entretanto, trata-se de uma aproximação, porque não se considera o volume de vazio entre as microesferas, o que reduziria este valor. Por outro lado, a área superficial de um grânulo é igual a  $3.801.327,1 \mu\text{m}^2$ , e a área superficial de uma microesfera é igual a  $207,6 \mu\text{m}^2$ . Como em um grânulo há aproximadamente 2.445.965 microesferas, a área superficial de um grânulo contendo microesferas é igual a  $507.782.334 \mu\text{m}^2$ , ou seja, muito maior do que a área superficial de um grânulo sem microesferas. Essas considerações podem explicar o valor mais elevado do  $q_{MAX}$  dos grânulos sem excipientes, comparado ao das microesferas. No caso dos grânulos com excipientes, a redução nos valores de  $q_{MAX}$  pode ser devida ao alisamento da superfície causada pela deposição do excipiente.

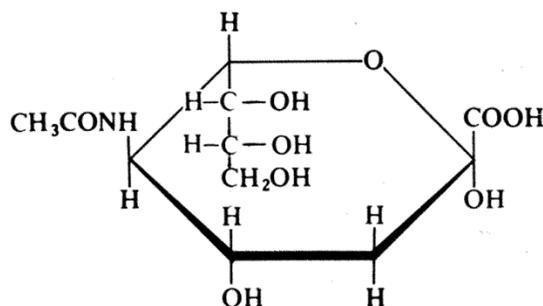
**TABELA 37.** Parâmetros do modelo de Langmuir e coeficientes estatísticos para a adsorção da mucina em microesferas e grânulos compostos de microesferas de quitosana.

Partículas	Parâmetros		
	$q_{MAX}^{(A)}$	$K_D^{(A)}$	r
Microesferas liofilizadas	0,52	5,18	0,9499
Grânulos sem excipiente	0,80	18,42	0,9435
Grânulos com excipiente:			
Quitosana	0,40	1,24	0,9910
Carboximetilcelulose	0,37	19,23	0,9627
Amido Pré-Gelificado	0,46	1,51	0,9835

OBS:(A)  $q_{MAX}$  em mg de mucina/mg de partículas,  $K_D$  em mg de mucina/cm<sup>3</sup> de solução.

O coeficiente  $K_D$ , que expressa a afinidade do adsorvente pela mucina, apresentou variações expressivas entre as partículas. Quanto maior o coeficiente  $K_D$ , menor a afinidade da mucina pelo adsorvente. Um dos principais fatores que

contribuem para a afinidade é a interação eletrostática entre as cargas positivas dos grupos amina protonados da quitosana, com as cargas negativas do ácido siálico presente na mucina. A estrutura química do ácido siálico, apresentada na Figura 73, mostra a presença de vários grupos químicos que podem apresentar cargas negativas.



**FIGURA 73.** Estrutura química do ácido siálico.

Observa-se na Tabela 37, que o valor de  $K_D$  varia de 5,18, para as microesferas, para 18,42 mg de mucina/cm<sup>3</sup>, para os grânulos sem excipientes, Esse resultado indica que os processos de granulação e esferonização reduzem a carga positiva na superfície dos grânulos, e conseqüentemente as interações moleculares entre a mucina e a quitosana. A adição dos excipientes quitosana ou amido pré-gelificado, promove o aumento significativo na afinidade refletindo-se na redução do coeficiente  $K_D$ .

A adição do excipiente CMC às microesferas promoveu redução da afinidade da mucina pelo adsorvente, correspondendo ao aumento de quase quatro vezes no coeficiente  $K_D$ . Este comportamento pode ser explicado pela repulsão eletrostática, porque o ácido siálico e a CMC apresentam cargas negativas.

A partir destes resultados, as duas situações extremas, grânulos com quitosana e os grânulos sem excipientes, foram escolhidas para a avaliação da permeação intestinal, cujos resultados estão descritos no Capítulo 7.

# CAPÍTULO 7

## PERMEAÇÃO INTESTINAL

### 7.0. INTRODUÇÃO

A biodisponibilidade representa a quantidade e a velocidade com que um composto ativo absorvido de uma forma farmacêutica atinge a circulação sangüínea. Para atingir a circulação sangüínea é necessário que as moléculas atravessem uma ou várias membranas biológicas. A quantidade de fármaco que atinge a circulação sangüínea pela via oral, é afetada por várias propriedades físico-químicas do fármaco, tais como massa molar, pKa, solubilidade, lipofilicidade, além da formulação, forma farmacêutica, pH gastrintestinal, trânsito gastrintestinal, interações com muco e alimentos, etc. De acordo com BARTHE *et al.* (1999), durante o desenvolvimento de um fármaco para administração oral é importante a otimização da sua biodisponibilidade.

A caracterização e estudos do mecanismo de permeação intestinal podem ser feitos *in vivo* ou através de diversas técnicas *in vitro*. Muitas dessas técnicas são também utilizadas pela indústria farmacêutica no estudo de novos fármacos. Dentre as técnicas *in vitro*, destacam-se: (i) técnica das câmaras com medida do fluxo transepitelial; (ii) técnica do cultivo de células, por exemplo, do tipo Caco-2, em monocamadas (DODANE *et al.*, 1999); e (iii) técnica do intestino invertido.

### 7.1. TÉCNICA DO INTESTINO INVERTIDO

Segundo ACRA & GHISHAN (1991), a técnica do intestino invertido foi primeiramente utilizada por Wilson e Wiseman em 1954. Consiste na inversão de segmentos intestinais utilizando uma haste de polietileno, enchimento com uma solução tampão oxigenada, amarração das extremidades e colocação em meio tamponado bem oxigenado e agitado contendo o soluto em estudo. A permeação

do soluto é detectada através da variação da sua concentração no meio externo e/ou no meio interno ao longo do tempo.

Em relação às outras técnicas *in vitro*, a técnica do intestino invertido apresenta algumas vantagens como simplicidade, rapidez, boa reprodutibilidade e baixo custo. As suas principais desvantagens são a heterogeneidade celular e o fato de que as membranas luminal e basolateral são estudadas em conjunto. As medidas podem ser afetadas pelo fluxo contrário da substância em estudo ou em função dos caminhos paracelulares. Em se tratando de técnica *in vitro*, deve-se também considerar que o modelo animal não reflete os resultados de permeação real obtidos com humanos, e parâmetros fisiológicos tais como tempo de trânsito ou presença de alimentos, as influências da irrigação e do sistema nervoso não são consideradas. O papel destes parâmetros na permeação pode ser estudado *in situ* com modelos *in vivo*.

Neste trabalho a permeação intestinal da didanosina (ddl) foi caracterizada através da técnica do intestino invertido, comparando-se a cinética e a eficiência de permeação dos grânulos desenvolvidos neste trabalho (contendo microesferas com 4,8 % de quitosana como excipiente ou somente os grânulos contendo microesferas sem excipiente adicional), tendo como controle a forma farmacêutica comercial (comprimidos tamponados de ddl).

### **7.1.1. Ensaio com Sistemas de Liberação Modificada**

Nos últimos dez anos, a técnica do intestino invertido também vem sendo usada para avaliar a permeação de fármacos incorporados em sistemas de liberação modificada. As citações abaixo ilustram resultados obtidos com esses sistemas.

CARRENO-GÓMEZ *et al.* (1999) utilizaram a técnica do intestino invertido e verificaram que lectinas ligadas a nanopartículas promoveram aumento na sua permeação devido à biodesividade das lectinas.

Um dos problemas comuns na permeação de fármacos pelas células cancerosas é o mecanismo de resistência multidrogas. O PSC833 é um dos moduladores utilizados para superar este problema de permeação do fármaco. LO *et al.* (2001) estudaram a técnica do intestino invertido para verificar o efeito de

lipossomas contendo PSC833 na permeação da epirrubicina. Eles verificaram que a permeação da epirrubicina é aumentada pela presença de PSC833, e é ainda maior quando o PSC833 encontra-se encapsulado em lipossomas.

LO (2000) também encapsulou a epirrubicina em lipossomas e verificou, pela técnica do intestino invertido, que é possível aumentar sua permeação através do uso de lipossomas sem a utilização de moduladores como PSC833. Em ambos os trabalhos (LO, 2000 e LO *et al.*, 2001), eles verificaram que a permeação pelo jejuno é maior do que pelo íleo.

## **7.2. MATERIAL**

Nos ensaios, foram estudadas três formas farmacêuticas: didanosina em comprimido mastigável tamponado contendo 100 mg de ddl/comprimido (marca Farmanguinhos), grânulos esféricos contendo microesferas de quitosana, sem qualquer excipiente e grânulos esféricos contendo microesferas de quitosana e 4,8 % de quitosana como excipiente.

Os intestinos foram retirados de ratos machos adultos da raça *Wistar*, pesando entre 250 e 300 g. O tampão TC199 foi usado como meio de incubação.

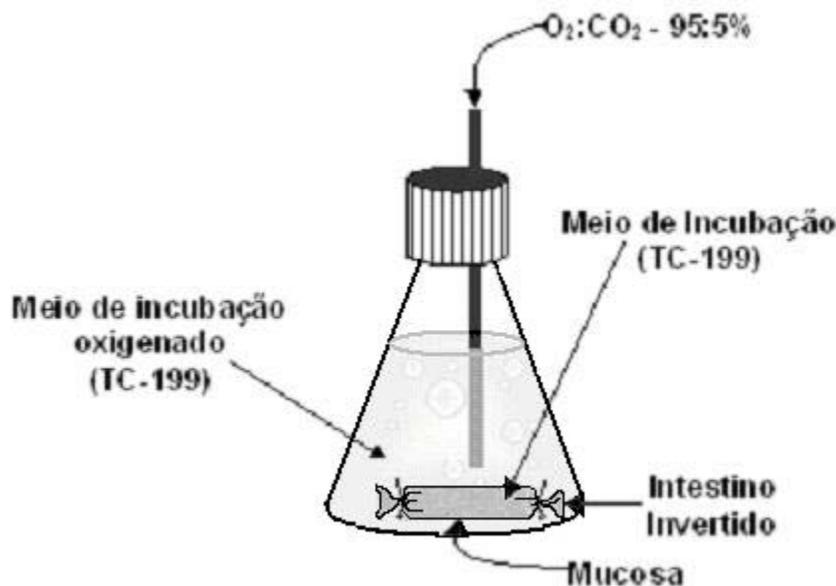
## **7.3. MÉTODOS**

### **7.3.1. Preparação dos Segmentos Intestinais**

Os ratos foram anestesiados com éter etílico e o intestino delgado imediatamente dissecado, lavado com solução tampão TC199 mantida à 10°C. O intestino delgado foi gentilmente invertido com auxílio de uma haste flexível (~ 2,5 mm de diâmetro) com sua extremidade protegida por um tecido fino de seda. Em seguida, o intestino delgado foi dividido em 3 segmentos de 8 cm. O primeiro segmento foi medido a partir do piloro (duodeno proximal), o segundo segmento foi medido a partir do ângulo duodeno-jejunal (jejuno proximal) e o terceiro segmento foi medido acima do ceco (íleo distal). Cada segmento teve uma das extremidades fechadas com fio de sutura e foram imediatamente preenchidos com tampão TC199 sem glicose. A outra extremidade do segmento intestinal foi fechada da mesma maneira, de forma que o saco intestinal ficasse com 6 cm de

comprimento. Cada segmento intestinal foi separadamente incubado em um sistema contendo tampão TC199 com glicose e a ddl ( $0,0875 \text{ mg cm}^{-3}$ ) nas diferentes formas de apresentação. O meio foi mantido à  $37^\circ\text{C}$  sob oxigenação ( $\text{O}_2 : \text{CO}_2 - 95 : 5$ ) e agitação suave. Após os intervalos de tempo pré-determinados, os segmentos intestinais eram removidos do meio de incubação, cuidadosamente lavados e o conteúdo filtrado. As quantidades de ddl não permeada (fora do saco intestinal) e permeada (no interior do saco intestinal) foram determinadas por espectrofotometria de UV ( $\lambda = 248 \text{ nm}$ ). Os intervalos de tempo estudados foram 5, 10, 20, 40, 80, e 120 min. Para cada tempo foram utilizados três animais ( $n = 3$ ). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão. O controle foi feito com os três segmentos intestinais, sendo  $n = 3$ , utilizando somente as soluções tamponantes anteriormente descritas. Amostras analisadas no intervalo de tempo de 120 min não apresentaram interferências nas leituras do meio de incubação no comprimento de onda utilizado para a determinação da ddl ( $\lambda = 248 \text{ nm}$ ).

A Figura 74 ilustra a montagem experimental usada nesses ensaios.



**FIGURA 74.** Montagem experimental usada nos ensaios com intestino invertido incubado em tampão TC199 oxigenado, cada saco é removido no tempo pré-determinado e o fármaco é analisado no espaço serosal e no meio externo.

### **7.3.2. Preparação do Meio de Incubação**

O tampão TC199, usado como meio de incubação, foi preparado pelo seguinte procedimento: para um 1 dm<sup>3</sup> de água deionizada, adicionou-se nesta seqüência: 8,470 g de cloreto de sódio, 0,340 g cloreto de potássio, 0,126 g de cloreto de cálcio, 0,595 g de fosfato de sódio dibásico e 1,801 g de glicose.

### **7.3.3. Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada através do teste Tukey (AYRES & AYRES JUNIOR, 2003).

### **7.3.4. Preparação das Formas Farmacêuticas**

As formas farmacêuticas caracterizadas foram preparadas da seguinte maneira para utilização nos ensaios de permeação pela técnica do intestino invertido:

- Didanosina em comprimido mastigável tamponado: a massa de cada comprimido é cerca de 850 mg, sendo 100 mg de ddl e 750 mg de excipientes, principalmente tampão. Os comprimidos foram triturados em gral para a utilização no teste.
- Grânulos esféricos contendo microesferas de quitosana: após a preparação das microesferas de quitosana contendo a ddl, as mesmas foram secas, extrudadas e esferonizadas.
- Grânulos esféricos contendo microesferas de quitosana e 4,8 % de quitosana como excipiente: às microesferas de quitosana contendo ddl, previamente secas em estufa, adicionou-se 4,8 % de quitosana (em relação à massa seca de partículas), procedendo-se em seguida com a extrusão e esferonização.

A escolha da concentração de ddl adicionada ao meio de incubação foi baseada nas seguintes informações:

- a dose do fármaco Videx<sup>®</sup> EC (*enteric-coated*) é de 400 mg/dia, que para um indivíduo de 75 kg correspondem a 5,33 mg kg<sup>-1</sup> de massa corporal.
- a bula do medicamento comercial relata que para uma dose de 7,00 mg de ddl/kg de massa corporal, a permeação é de 33 % em humanos adultos.

Optou-se por esta dosagem que para um rato de aproximadamente 250 g corresponde a 1,75 mg de ddl. Considerando que os grânulos possuem cerca de 50 % de ddl em massa, foram usados 3,5 mg de grânulos para cada ensaio.

## **7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.4.1. Análise da Didanosina no Meio Interno do Saco Intestinal**

As Figuras 75 a 77 mostram os perfis de permeação da ddl pelos segmentos intestinais. Apesar do pequeno número de animais ( $n = 3$ ) utilizados nos experimentos, observa-se que os desvios são relativamente pequenos em se tratando de estudos dessa natureza. As absorções da ddl pelo duodeno em 120 min foram cerca de 34, 20 e 16 %, respectivamente, para os grânulos contendo 4,8 % de quitosana, grânulos sem excipiente e comprimido triturado comercial (ddl livre) (Figura 75). Esses resultados mostram que o processo de granulação promove aumento na permeação, provavelmente devido à mucoadesividade das partículas. Além disso, após a adição dos grânulos ao tampão TC199 com o saco intestinal, foi possível visualizar a adesão do próprio grânulo ao saco intestinal. Esses dados experimentais são da mesma ordem de grandeza do valor informado na bula do medicamento comercial para a permeação da ddl em humanos, que é 33 % da quantidade administrada.

Analisando a forma dos perfis da Figura 75, observa-se que a permeação da ddl comercial livre no decorrer do tempo atinge um patamar no qual a porcentagem de permeação se torna praticamente constante. Por outro lado, os perfis correspondentes aos grânulos com 4,8 % de quitosana não atingem um patamar, mas sim, apresentam claramente tendência de aumento na permeação mesmo após 120 min. É provável que a permeação da ddl seja ainda maior após 120 min, no entanto, estudos com durações maiores que 120 min não garantem a viabilidade das células intestinais utilizando esta técnica.

A análise estatística dos dados experimentais da Figura 75, mostra que até 40 min não há diferenças significativas entre as curvas, no entanto, para 80 e 120 min, os grânulos contendo 4,8 % de quitosana apresentaram diferenças significativas em relação ao medicamento comercial. Por outro lado, grânulos sem

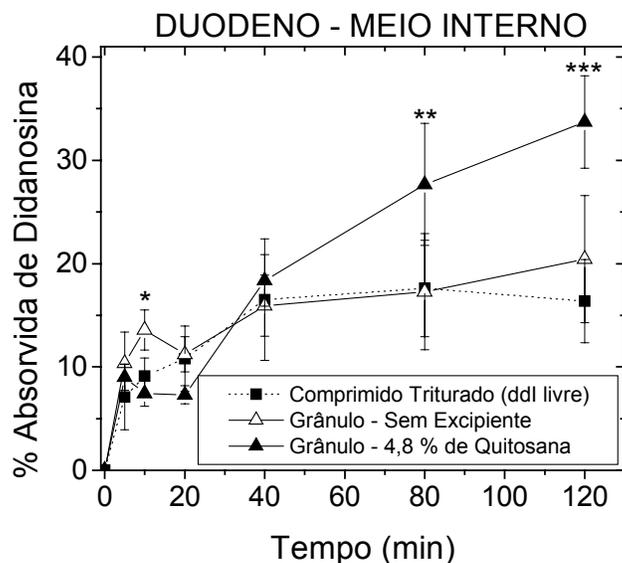
excipiente não apresentaram diferenças significativas em relação ao medicamento comercial.

Uma das prováveis hipóteses para explicar o aumento na permeação da ddl no segmento duodenal é a presença de quitosana como excipiente nos grânulos, além da quitosana das microesferas. De acordo com GUO *et al.* (2004), a quitosana aumenta a permeação da ddl porque atua na abertura das junções estreitas entre as células. Essa hipótese também foi confirmada por KOTZÉ *et al.* (1998) através da comparação do efeito da permeabilidade de diferentes sais de quitosana e cloreto de N-trimetil-quitosana em células epiteliais (Caco-2).

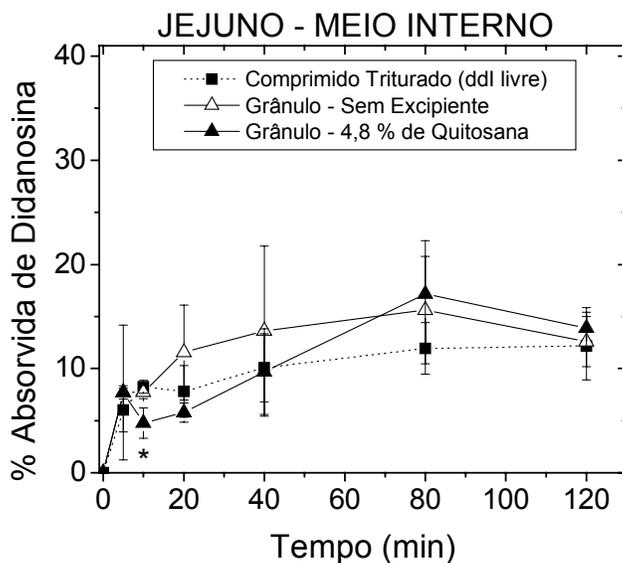
As Figuras 76 e 77 mostram que não há diferença estatística significativa, de acordo com o teste Tukey, na permeação da ddl pelo jejuno e íleo. As curvas de permeação estão praticamente sobrepostas para cada forma de apresentação da ddl. A comparação entre as Figuras 75, 76 e 77 mostra que a permeação através da membrana duodenal é superior a permeação através das membranas do jejuno e do íleo. Esse fato pode estar relacionado ao maior número de vilosidades e microvilosidades presentes no duodeno.

Resultados semelhantes foram observados por SINKO *et al.* (1994). Eles utilizaram a técnica de perfusão intestinal em ratos e também verificaram que a permeação da ddl reduz a cada porção subsequente do intestino. Posteriormente, SINKO *et al.* (1997) observaram o mesmo comportamento na permeação da ddl injetada diretamente nas porções intestinais de cães.

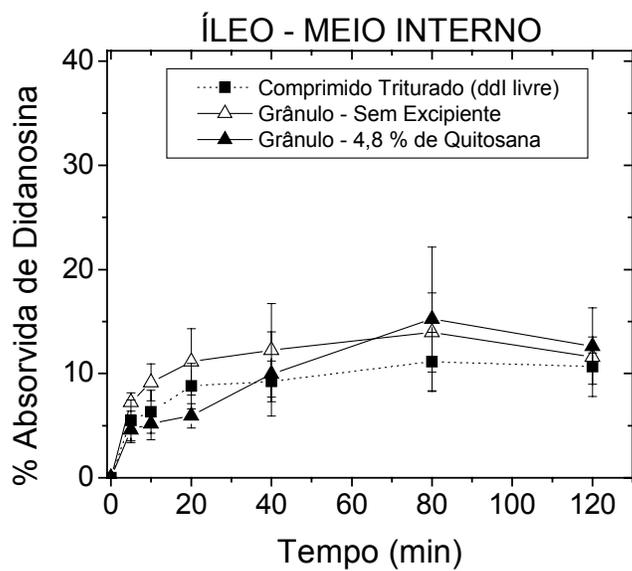
WINTERGERST *et al.* (1999) verificaram que permeação da ddl, quando administrada via retal, é cerca de 5 % do valor absorvido pela administração oral, evidenciando a redução da permeação do fármaco no transcorrer do trato gastrointestinal.



**FIGURA 75.** Perfis de permeação da didanosina através da membrana duodenal: comparação entre as formas farmacêuticas (diferença significativa em relação ao comprimido triturado de didanosina: \*  $\rightarrow p < 0,05$ ; \*\*  $\rightarrow p < 0,10$ ; \*\*\*  $\rightarrow p < 0,01$ ).



**FIGURA 76.** Perfis de permeação da didanosina através da membrana do jejuno: comparação entre as formas farmacêuticas (diferença significativa em relação ao comprimido triturado de didanosina: \*  $\rightarrow p < 0,05$ ).



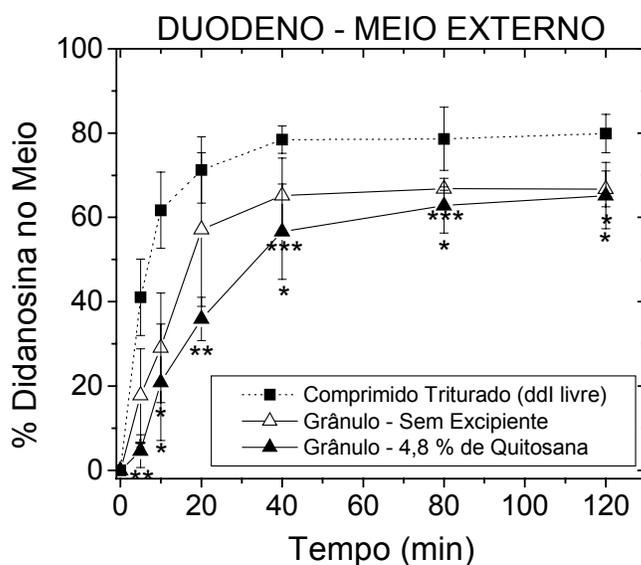
**FIGURA 77.** Perfis de permeação da didanosina através da membrana do íleo: comparação entre as formas farmacêuticas (não há diferenças significativas entre as curvas).

#### **7.4.2. Análise da Didanosina no Meio Externo do Saco Intestinal**

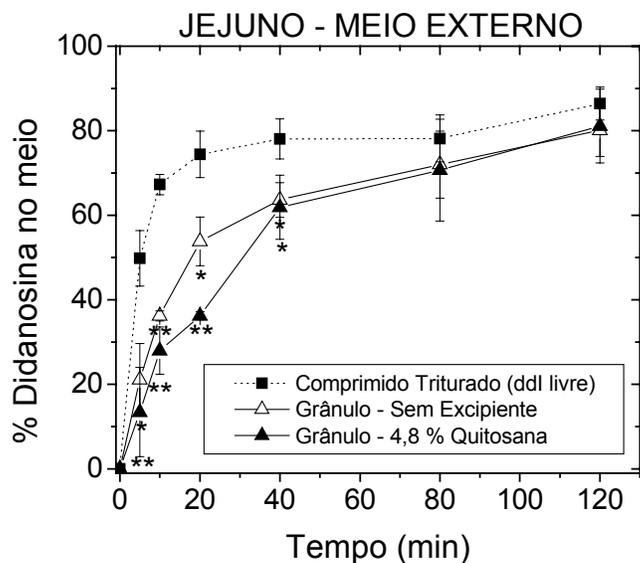
As Figuras 78 a 80 mostram os perfis de liberação da ddl no meio externo de incubação, para cada forma de apresentação, ou seja, corresponde à ddl que não permeou pela membrana. Na Figura 78, observa-se que para o duodeno, a quantidade de ddl no meio externo é menor para os grânulos contendo 4,8 % de quitosana se comparada ao medicamento comercial. Esses resultados obtidos confirmam os anteriores, os quais mostraram que a incorporação promove liberação mais lenta da ddl, sobretudo para os grânulos contendo 4,8 % de quitosana.

Por outro lado, no jejuno e no íleo a porcentagem da ddl disponível no meio externo é maior comparada aos dados obtidos com o duodeno, comprovando também os resultados anteriores com o meio interno, que mostram menor permeação para a ddl nos segmentos do jejuno e íleo. O teste Tukey para o jejuno e íleo (Figuras 79 e 80) mostra que há diferença significativa entre as curvas nos

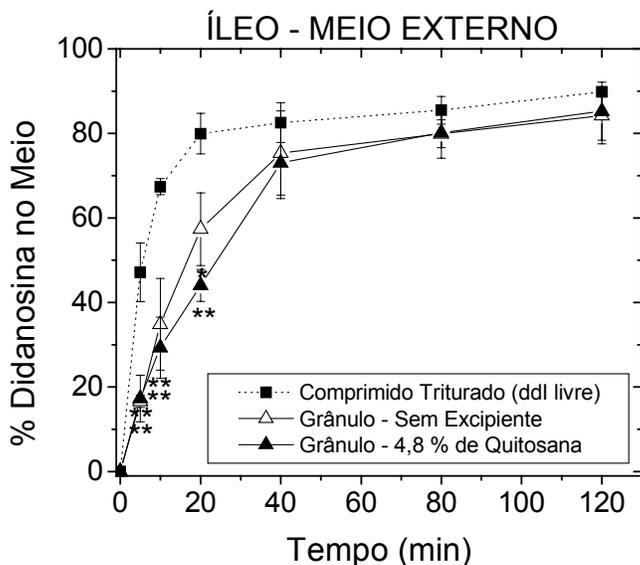
pontos iniciais, até 40 min. Desse tempo em diante, não há diferenças significativas e as curvas se sobrepõem, indicando que as intensidades de permeação por estes segmentos são praticamente iguais para as formas farmacêuticas estudadas. As diferenças iniciais observadas devem-se possivelmente à maior velocidade de solubilização inicial no meio externo do medicamento comercial, cujos comprimidos foram triturados para esses ensaios, em relação aos grânulos.



**FIGURA 78.** Perfis de liberação da didanosina no meio TC199 (com glicose) contendo a porção do duodeno: comparação das formas farmacêuticas (diferenças significativas em relação ao comprimido triturado de didanosina: \*  $\rightarrow p < 0,05$ ; \*\*  $\rightarrow p < 0,01$ ; \*\*\*  $\rightarrow p < 0,10$ ).



**FIGURA 79.** Perfis de liberação da didanosina no meio TC199 (com glicose) contendo a porção do jejuno: comparação das formas farmacêuticas (diferença significativa em relação ao comprimido triturado de didanosina: \* →  $p < 0,05$ ; \*\* →  $p < 0,01$ ).



**FIGURA 80.** Perfis de liberação da didanosina no meio TC199 (com glicose) contendo a porção do íleo: comparação das formas farmacêuticas (diferença significativa em relação ao comprimido triturado de didanosina: \* →  $p < 0,05$ ; \*\* →  $p < 0,01$ ).

## CAPÍTULO 8

### REVESTIMENTO DOS GRÂNULOS

#### 8.0. INTRODUÇÃO

Revestimento é definido como a aplicação de um material, geralmente selante, sobre a superfície de uma partícula com a finalidade de modificação de suas características (TARANTO, 1996). Vários setores industriais como o farmacêutico, alimentício e agrícola utilizam o revestimento no processamento de produtos como: comprimidos, cosméticos, essências, enzimas, proteínas, vegetais, sementes, fertilizantes, doces e confeitos, catalisadores, etc.

De acordo com SILVA (2003), o revestimento tem vários objetivos: (i) ativar catalisadores; (ii) modificar, sustentar ou retardar a liberação do princípio ativo de um medicamento; (iii) colorir comprimidos e alimentos (fatores estéticos); (iv) proteger sólidos contra higroscopicidade e produtos tóxicos; (v) melhorar as propriedades de manuseio.

Neste trabalho, o revestimento foi feito com o polímero Eudragit<sup>®</sup> nos grânulos compostos de microesferas e quitosana como excipiente, os quais apresentaram maiores mucoadesividade e permeação intestinal, respectivamente, nos testes *in vitro* e *ex vivo*. Esse revestimento teve como objetivo bloquear a liberação da ddl em pH ácido, evitando a sua degradação, e permitir a sua liberação somente em meio neutro ou básico. Em aplicações farmacêuticas, o revestimento que atende a essas condições é denominado de revestimento entérico, e é usado na administração oral para proteção de fármacos sensíveis ao pH ácido durante a passagem pelo estômago, permitindo a sua liberação apenas no intestino onde o pH é próximo do neutro.

Os ensaios realizados visaram finalizar a tecnologia de produção de grânulos de ddl contendo microesferas para liberação modificada para administração oral, desenvolvida neste trabalho, e também avaliar o recobrimento

feito em montagem laboratorial simples contendo bico atomizador e corrente de ar quente.

Os grânulos revestidos com diferentes quantidades de Eudragit<sup>®</sup> foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para verificação a morfologia e a superfície após o revestimento, e quanto à liberação da ddl em suco gástrico simulado (SGS) e em suco entérico simulado (SES). Para comparação, essas caracterizações foram também feitas para o produto comercial VIDEX<sup>®</sup> EC.

### **8.1. PROCESSOS DE REVESTIMENTO**

Em geral, o revestimento é realizado em um leito de partículas que se movimentam por uma corrente de gás ascendente e sobre as quais é aspergida uma solução ou suspensão de revestimento. Na medida em que as gotículas se depositam sobre as partículas, ocorre um processo simultâneo de umedecimento e secagem até formar uma camada com características específicas. Os processos de revestimento envolvem três etapas: fluidização, atomização e secagem. É necessária a otimização destas etapas para se obter um produto com a qualidade desejada, ou seja, quantidade mínima de partículas aglomeradas e liberação das moléculas ativas em tempo e meio adequados (MAA *et al.*, 1996).

Segundo FREIRE & OLIVERIA (1992), o revestimento pode ser de três tipos: (1) revestimento com suspensões aquosas à base de água; (2) revestimento por cristalização de materiais fundidos e (3) revestimento por película.

O revestimento com suspensões aquosas à base de água baseia-se na utilização de água e açúcar. Apresenta bom selamento, acabamento e alisamento, mas promove o aumento excessivo da partícula.

No revestimento por cristalização de materiais fundidos, ao contrário de se fornecer calor para a secagem, é retirado o calor para a solidificação do material fundido sobre a partícula.

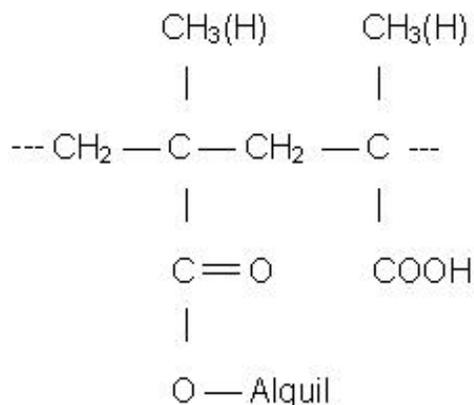
O revestimento por película apresenta vantagens como pequena variação de peso (2 a 8 %) das partículas, tempo curto de processamento, boa eficiência e bom rendimento de processo, flexibilidade das formulações e boa resistência da cobertura.

No entanto, algumas vezes utilizam-se solventes orgânicos que apresentam desvantagens como perigo de combustão, perigo de intoxicação do operador, perigo de contaminação ambiental, custos mais elevados de equipamentos e processos (DONIDA, 2000).

### 8.1.1. Polímeros de Revestimento

Vários polímeros com propriedades funcionais têm sido usados para revestimento de grânulos, comprimidos e partículas. O Acetofalato de Celulose (CAP), o Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e o Eudragit® são os polímeros mais usados.

O Eudragit® é um polímero acrílico muito utilizado no revestimento de formas farmacêuticas sólidas. Existem diversos tipos de Eudragit® para diferentes formulações e aplicações. O uso de suspensões poliméricas aquosas tem merecido destaque atualmente por motivos de segurança e custo. O Eudragit® L30-D55 é um polímero solúvel em água que contém um copolímero aniônico baseado em ácido metacrílico e etil acrilato, que é descrito como “copolímero de ácido metacrílico tipo C”. A razão entre os grupos carboxila livres e ésteres é aproximadamente 1:1 e a sua massa molar média é 250.000 kDa. A Figura 81 mostra a estrutura molecular do monômero do EUDRAGIT® L30-D55.



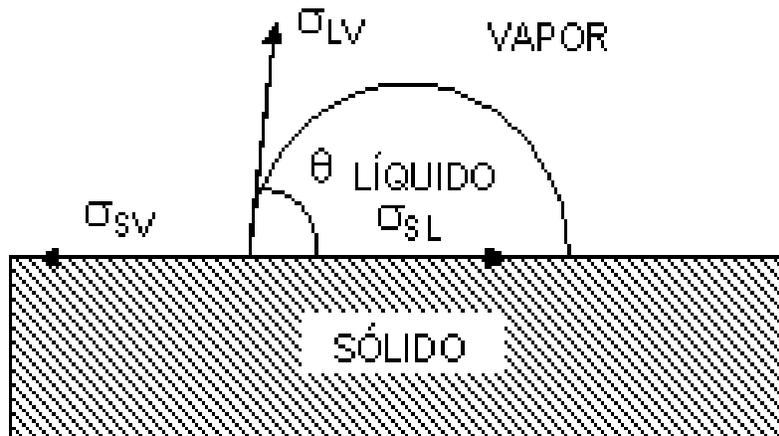
**FIGURA 81.** Estrutura molecular do monômero do Eudragit® L30-D55.

O Eudragit® L30-D55 é insolúvel em baixos valores de pH, mas sua solubilização ocorre em meio ligeiramente ácido a neutro (pH > 5,50) através da

formação de sais com álcalis. Filmes de  $1 \text{ mg cm}^{-2}$  servem como revestimento selante e de proteção, sendo que a gastrorresistência aumenta com a espessura do filme.

### 8.1.2. Ângulo de Contato e Revestimento

Segundo ADAMSON (1990), a energia de molhamento de um sólido por um líquido depende do ângulo de contato entre as três fases presentes: sólido-líquido-gás. O ângulo de contato ( $\theta$ ) é definido como ângulo formado entre a tangente da interface gás-líquido ( $\sigma_{LV}$ ) a partir do ponto trifásico e a tangente da interface sólido-líquido ( $\sigma_{SL}$ ) a partir do mesmo ponto, como representado na Figura 82.



**FIGURA 82.** Ângulo de contato do sistema sólido-líquido-gás (adaptação de DONIDA, 2004)

A receptividade da superfície sólida pelo líquido é dada pelo ângulo de contato. Quando o ângulo de contato é menor que  $90^\circ$ , o sólido é molhado pelo líquido. Se maior que  $90^\circ$ , o sólido não é molhado pelo líquido. Em condições limites, quando  $\theta = 0$  e  $\theta = 180^\circ$  ocorrem, respectivamente, molhamento completo (espalhamento espontâneo) e o não molhamento completo (aglutinação espontânea das gotas).

O ângulo de contato depende de propriedades físicas do sistema trifásico, como a tensão superficial ( $\sigma$ ) que é definida como a força necessária para

estender a superfície por unidade de distância, ou ainda, a energia necessária para criar uma unidade de área superficial para uma dada interface. A energia de adesão, que é quantificado pelo trabalho de adesão ( $W_{AD}$ ), foi definida por NEUMANN & GOOD (1979) como:

$$W_{AD} = \sigma_{LV} (1 + \cos \theta) \quad (17)$$

onde  $\sigma_{LV}$  é a tensão superficial entre as fases líquida e gasosa e  $\theta$  é o ângulo de contato. Altos valores de  $W_{AD}$  indicam um bom molhamento para cada conjunto sólido-líquido (ADAMSON, 1990).

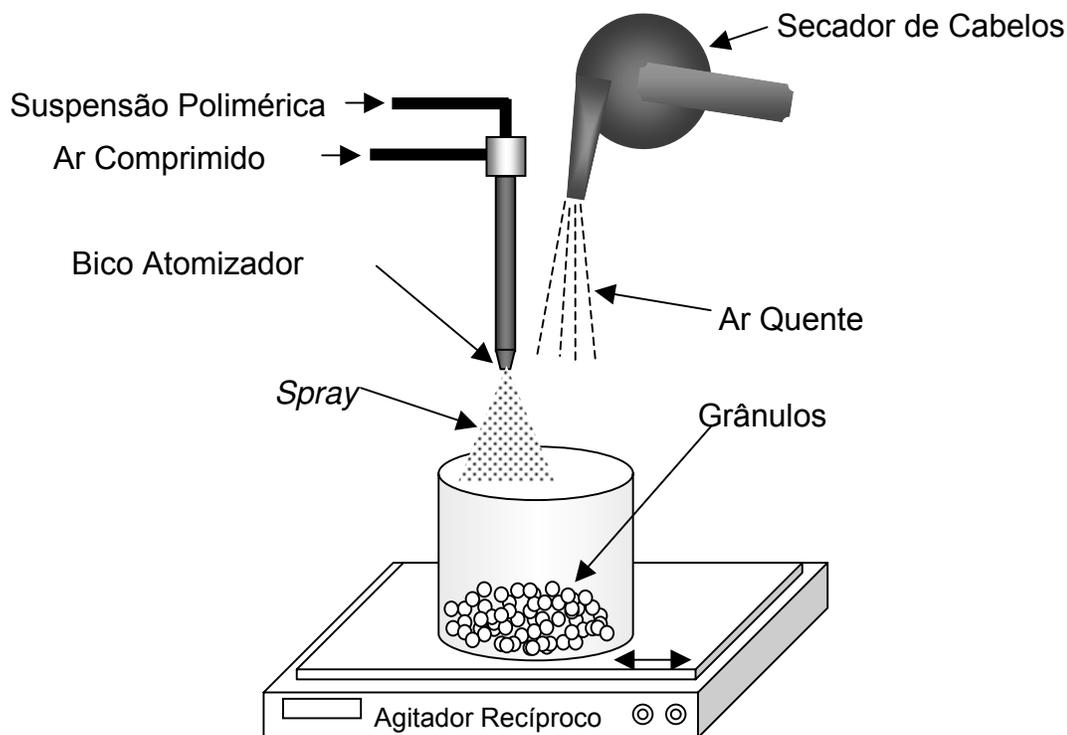
## **8.2. MATERIAL**

A suspensão de revestimento foi composta dos seguintes reagentes: Eudragit® L30-D55 (Hons Has - Alemanha), citrato de trietila (marca Numaquímica S.A. - Rio de Janeiro), polietilenoglicol 6.000 (PEG 6.000, marca Oxiteno), estearato de magnésio (marca Mallinckrodt INC. – Estados Unidos), dióxido de titânio e talco (ambos da marca Synth). Essa suspensão foi usada para o revestimento dos grânulos contendo microesferas de quitosana e quitosana como excipiente.

## **8.3. MÉTODOS**

### **8.3.1. Revestimento dos Grânulos**

O revestimento foi realizado através de um sistema montado em nosso laboratório. O sistema consistiu de um agitador recíproco no qual foi colocado um recipiente contendo os grânulos (Figura 83). Sobre o recipiente foi direcionado o ar quente proveniente de um secador de cabelos distante 30 cm do fundo do recipiente. A temperatura média do ar quente foi de 50°C. O bico atomizador, do tipo duplo fluido, foi colocado também sobre o recipiente a cerca de 15 cm do fundo.



**FIGURA 83.** Sistema artesanal para o revestimento dos grânulos.

Inicialmente as partículas foram agitadas a 280 rpm e aquecidas com o ar quente por 30 min para remoção do excesso de água e pré-aquecimento das partículas. Após este período, sob agitação constante das partículas (280 rpm), a suspensão de revestimento foi bombeada com uma bomba peristáltica, com vazão de  $0,10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , através do bico atomizador. O ar comprimido utilizado pelo bico atomizador foi fornecido por um compressor sob a vazão de  $20 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ . O crescimento dos grânulos ( $\delta$ ), definido como a razão entre a massa do filme formado durante o revestimento e a massa original dos grânulos, foi medido pela pesagem dos mesmos durante algumas interrupções da atomização da suspensão e secagem por cerca 15 min. Foi calculado pela equação (18):

$$\delta = \left( \frac{M_{\text{FILME}}}{M_{\text{GRÂNULOS INICIAL}}} \right) \times 100 \quad (18)$$

onde  $M_{FILME}$  e  $M_{GRÂNULOS\ INICIAL}$  são, respectivamente, massa do filme formado sobre os grânulos e massa inicial dos grânulos.

A suspensão de revestimento foi preparada de acordo com a metodologia proposta por DONIDA (2000) para o revestimento polimérico de partículas esféricas de uréia. No entanto, excluiu-se o corante da formulação porque o mesmo interferia na leitura da absorbância da ddi. A formulação é apresentada na Tabela 38.

**TABELA 38.** Composição da suspensão de revestimento (DONIDA, 2000).

Reagentes	Massa (%)	Função
Eudragit® L30-D55	16,70	Polímero de Revestimento
PEG 6.000	0,75	Plastificante
Talco	2,75	Agente de Separação e Alisamento
Estearato de magnésio	1,00	Agente de Separação e Alisamento
Dióxido de titânio	1,40	Opacificante
Citrato de trietila	0,50	Plastificante
Água	76,90	Solvente

A Tabela 38 mostra que cada um dos componentes apresenta uma função específica na formulação. O PEG 6.000 e o citrato de trietila têm a finalidade de dar flexibilidade à película final para suportar melhor os esforços. O talco e o estearato de magnésio reduzem a aglutinação das películas ao secarem e produzem uma película com superfície lisa. O dióxido de titânio tem a função de dar uma coloração uniforme ao revestimento. A água, o solvente, deve garantir uma deposição controlada do polímero na superfície do grânulo, obtendo-se uma membrana uniforme e aderente.

### **8.3.2. Determinação do Trabalho de Adesão**

As medidas do ângulo de contato foram realizadas pelo método ótico, utilizando um goniômetro manual da Tantec - Contact Angle Meter (Estados Unidos). O método consiste na deposição de uma gota da suspensão sobre uma superfície plana na qual se deseja determinar o ângulo de contato. Um feixe de luz

incide nessa gota, projetando-a sobre um anteparo graduado. O ângulo de contato apresentado foi resultante da média dos valores de 50 medidas em diferentes gotas para garantir resultados confiáveis.

Para a obtenção da superfície plana, sobre a qual a gota era depositada, alguns grânulos foram prensados em uma prensa térmica sob pressão de 4.500 psia e 120 s em temperatura ambiente (25°C).

A tensão superficial da suspensão de Eudragit<sup>®</sup> L30-D55 foi medida por um tensiômetro da marca KSV Instrument (Finlândia), modelo Sigma 701. Foram realizadas 10 medidas consecutivas.

### **8.3.3. Liberação da Didanosina**

Os ensaios de liberação foram realizados em dois meios: suco gástrico simulado (SGS) (sem pepsina, pH = 1,00) e em seguida em suco entérico simulado (SES) (com pancreatina, pH = 7,40). Ambos os meios foram preparados de acordo com a USP XXIII.

Uma determinada quantidade de grânulos recobertos foi adicionada inicialmente ao SGS e mantida sob agitação (150 rpm) e 37°C. Alíquotas foram retiradas do meio em 60 e 120 min para a quantificação da ddl liberada. Imediatamente após a retirada da alíquota de 120 min, as partículas foram removidas do SGS e adicionadas ao SES. Em intervalos de tempo pré-definidos, alíquotas foram retiradas do SES para quantificação da ddl. Os experimentos foram realizados em triplicata.

As quantidades de grânulos utilizadas em cada ensaio variaram para cada porcentagem de crescimento dos grânulos, procurando manter a mesma quantidade de ddl nos ensaios.

Para efeito de comparação, também foram realizados ensaios de liberação das partículas apenas em SES sem a realização da liberação prévia em SGS. Além dos grânulos recobertos e não-recobertos, foram feitas as liberações das microesferas liofilizadas e dos grânulos de Videx<sup>®</sup> EC (grânulos gastrorresistentes de ddl disponíveis comercialmente). Os ensaios foram realizados de forma semelhante aos ensaios de liberação descritos anteriormente.

### **8.3.4. Análises da Morfologia e Superfície dos Grânulos Revestidos**

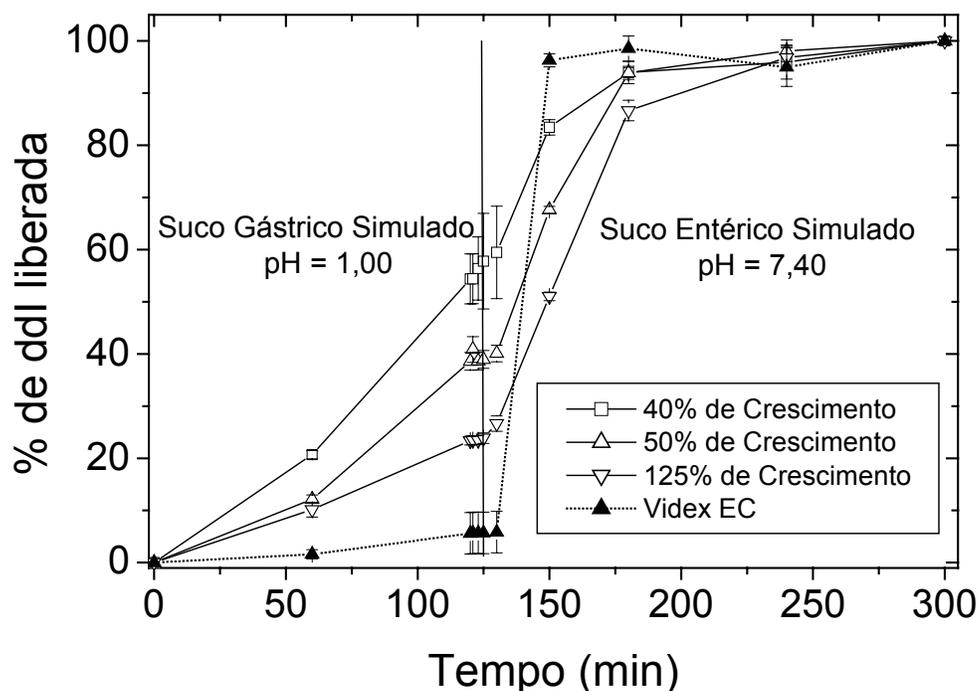
A morfologia, superfície externa e estrutura interna dos grânulos recobertos foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (marca LEICA, modelo LEO440i). Foram utilizados grânulos recobertos neste trabalho e grânulos de Videx<sup>®</sup> EC. A estrutura interna dos grânulos também foi observada, para tanto, alguns grânulos foram colocados sobre uma folha de papel, algumas gotas de cola de secagem rápida (Super Bonder - LOCTITE<sup>®</sup>) foram adicionadas sobre os mesmos. Após a secagem, este aglomerado foi mergulhado em nitrogênio líquido e fraturado.

## **8.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os valores médios do ângulo de contato da suspensão e da tensão superficial foram, respectivamente,  $50,18^\circ \pm 1,99^\circ$  e  $39,28 \pm 0,049 \text{ mN m}^{-1}$ . De acordo com a equação (17), o trabalho de adesão calculado,  $W_{AD}$ , é igual a  $64,43 \text{ mN m}^{-1}$ . Este valor corresponde a 82 % do trabalho de adesão máximo ( $W_{AD}^{MAX} = 78,56 \text{ mN m}^{-1}$ ) que ocorre quando  $\theta = 0^\circ$ , ou seja, há o molhamento completo ou espalhamento espontâneo. DONIDA (2004) estudou o revestimento de partículas de diferentes materiais com suspensão de hidroxietilcelulose. Os resultados mostraram que o revestimento das partículas ocorreu quando o  $W_{AD}$  é superior a 63 % do  $W_{AD}^{MAX}$  e a secagem da suspensão ocorreu quando o  $W_{AD}$  é inferior a 59 % do  $W_{AD}^{MAX}$ . Desta forma, é provável que a suspensão de Eudragit<sup>®</sup> L30-D55 promova o revestimento dos grânulos, mas é desejável um estudo mais detalhado das interações da superfície com a suspensão de revestimento para otimizá-lo, além de considerar a dinâmica do processo no equipamento usado.

Observa-se pela Figura 84, que o revestimento dos grânulos com Eudragit<sup>®</sup> L30-D55 não foi suficiente para evitar a total liberação da ddl apesar do elevado crescimento das partículas recobertas. Após 2 h de liberação em SGS, o medicamento comercial, Videx<sup>®</sup> EC, liberou cerca de 5 % da ddl, por outro lado, nas mesmas condições, as formulações desenvolvidas neste trabalho liberaram 54, 38 e 23 % para os grânulos recobertos com crescimento de 40, 50 e 125 %, respectivamente. Embora a liberação tenha sido dependente do revestimento,

comparando-se os resultados dos grânulos com crescimentos de 125 % e 40 %, observa-se que apesar do crescimento ter sido cerca de 3 vezes maior, o revestimento não foi efetivo para evitar a liberação da ddl.

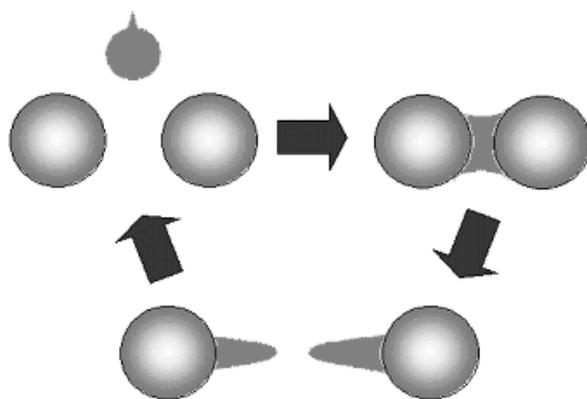


**FIGURA 84.** Perfis de liberação da didanosina em suco gástrico simulado e suco entérico simulado.

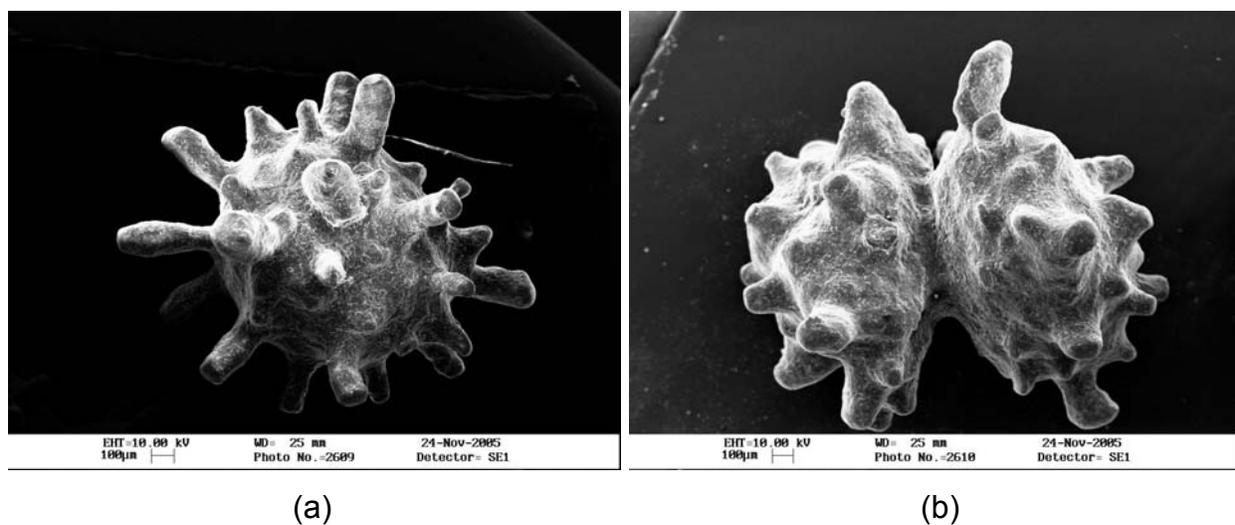
As micrografias obtidas por MEV mostram que o crescimento da partícula não ocorreu forma regular. Durante o revestimento houve a formação de estruturas pontiagudas sobre a superfície, prejudicando a formação de película.

A formação das estruturas pontiagudas foi decorrente da dinâmica do processo realizado na montagem experimental. A Figura 85 esquematiza a formação das estruturas pontiagudas na superfície dos grânulos, como observada nos ensaios experimentais. Uma gotícula era compartilhada por dois grânulos ao cair sobre eles sob agitação. Em seguida eles se separavam e simultaneamente ocorria a secagem da gota e formação da estrutura pontiaguda.

As micrografias obtidas por MEV são mostradas nas Figuras 86 e 87. As Figuras 86 (a) e 87 (a) mostram os grânulos separadamente e as Figuras 86 (b) e 87 (b) mostram dois grânulos aglomerados, unidos pelo revestimento. O processo de crescimento dos grânulos, a partir da suspensão de Eudragit® L30-D55, se deu principalmente nas extremidades das estruturas pontiagudas, tornando o revestimento inadequado para a proteção da ddl no meio gástrico. A dimensão das estruturas pontiagudas com 125 % de crescimento foi muito maior do que a dimensão para 50 % de crescimento.



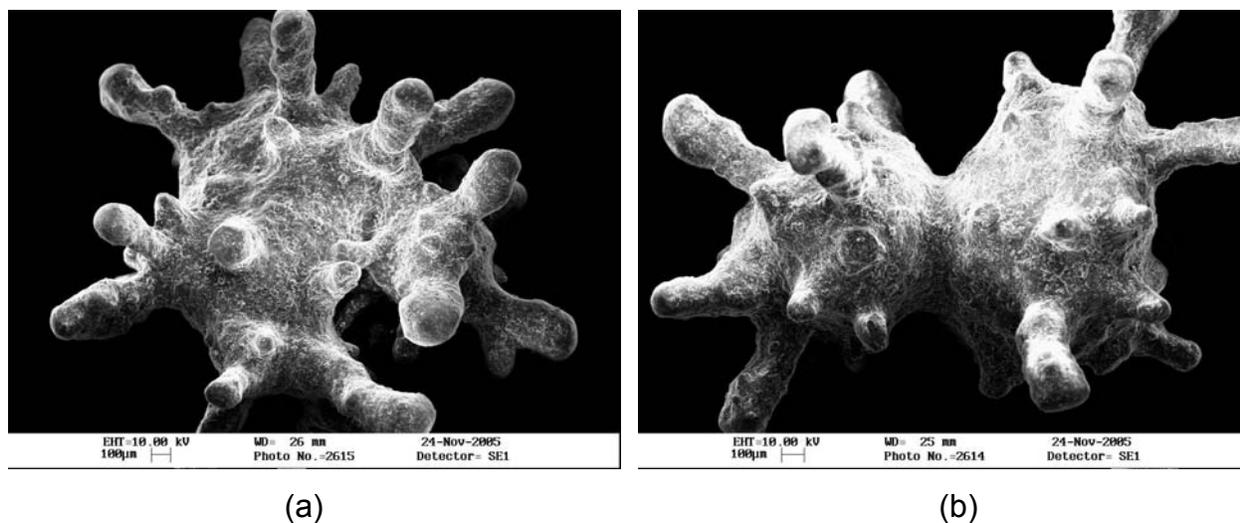
**FIGURA 85.** Formação das estruturas pontiagudas sobre a superfície dos grânulos.



(a)

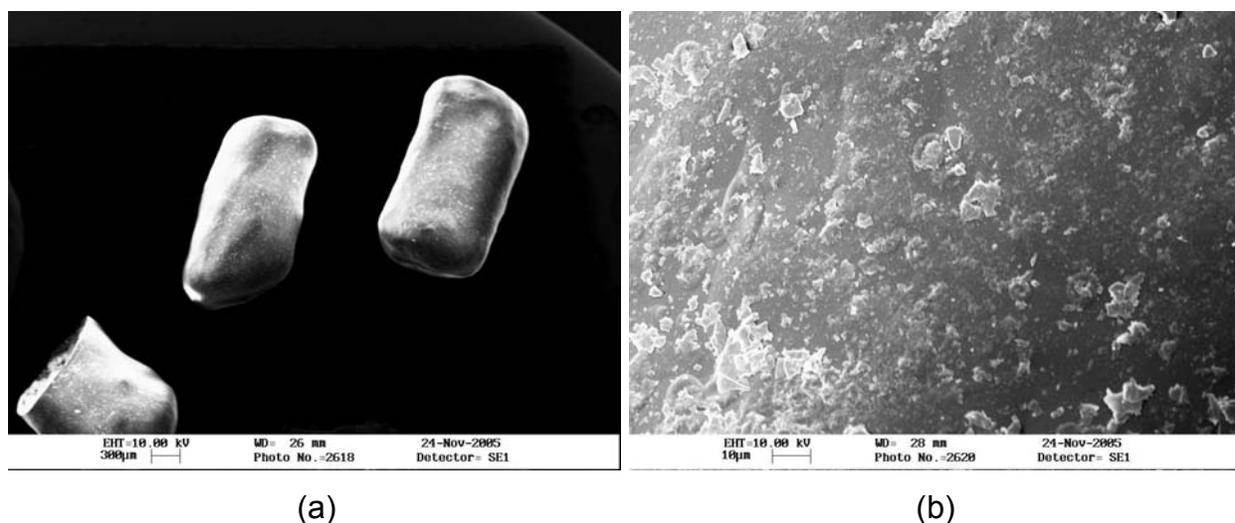
(b)

**FIGURA 86.** Micrografias dos grânulos recobertos: (a) 50 % de crescimento (aumentada 120 vezes); (b) 50 % de crescimento (aumentada 110 vezes).



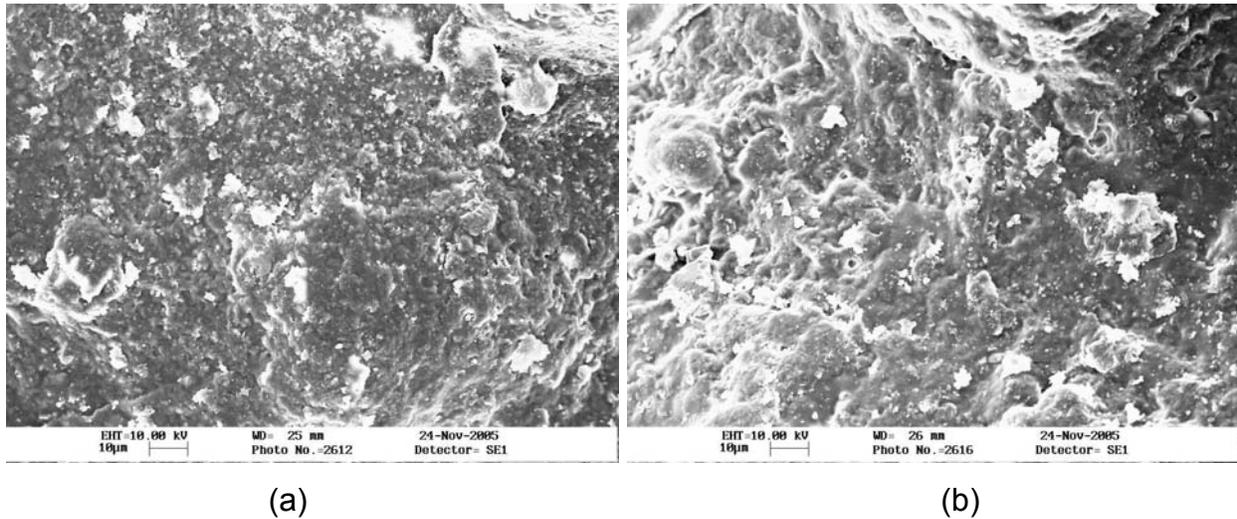
**FIGURA 87.** Micrografias dos grânulos recobertos: (a) 125 % de crescimento (aumentada 100 vezes); (b) 125 % de crescimento (aumentada 120 vezes).

Os grânulos de Videx<sup>®</sup> EC e a sua superfície são apresentados nas Figuras 88 (a) e (b), respectivamente. Observa-se que os grânulos apresentam forma cilíndrica e superfície homogênea.



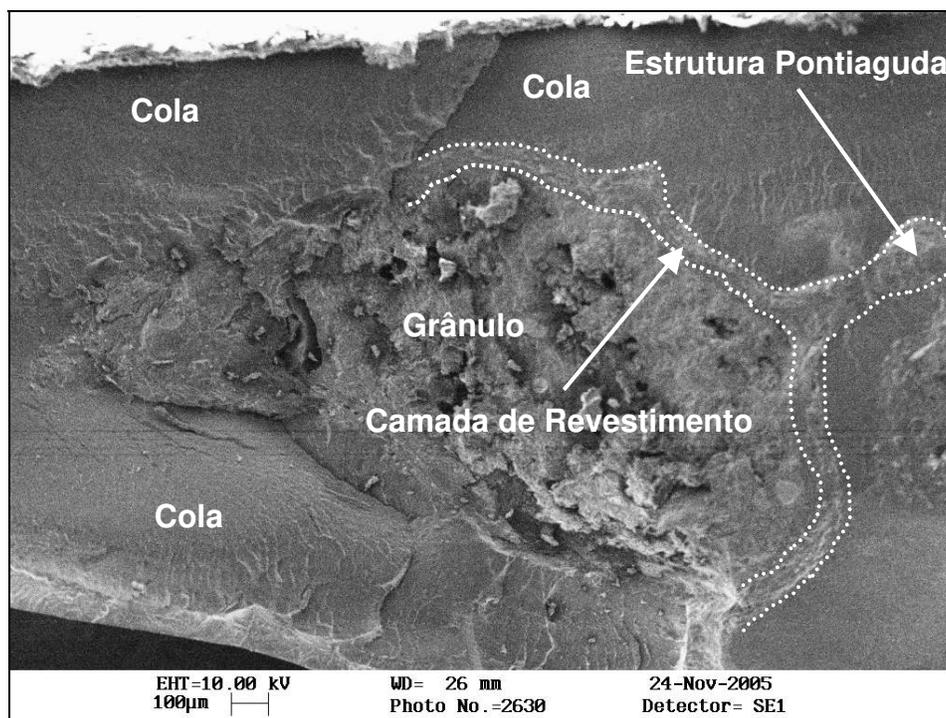
**FIGURA 88.** Micrografias dos grânulos de Videx<sup>®</sup> EC: (a) aumentada 50 vezes; (b) superfície aumentada 2.000 vezes.

A Figura 89 mostra comparativamente as superfícies planas dos grânulos revestidos neste trabalho. Observa-se que as superfícies são semelhantes à superfície do Videx<sup>®</sup> EC (Figura 88), principalmente para 50% de crescimento.



**FIGURA 89.** Micrografia da superfície dos grânulos recobertos: (a) 50 % de crescimento; (b) 125 % de crescimento (aumentadas 2.000 vezes).

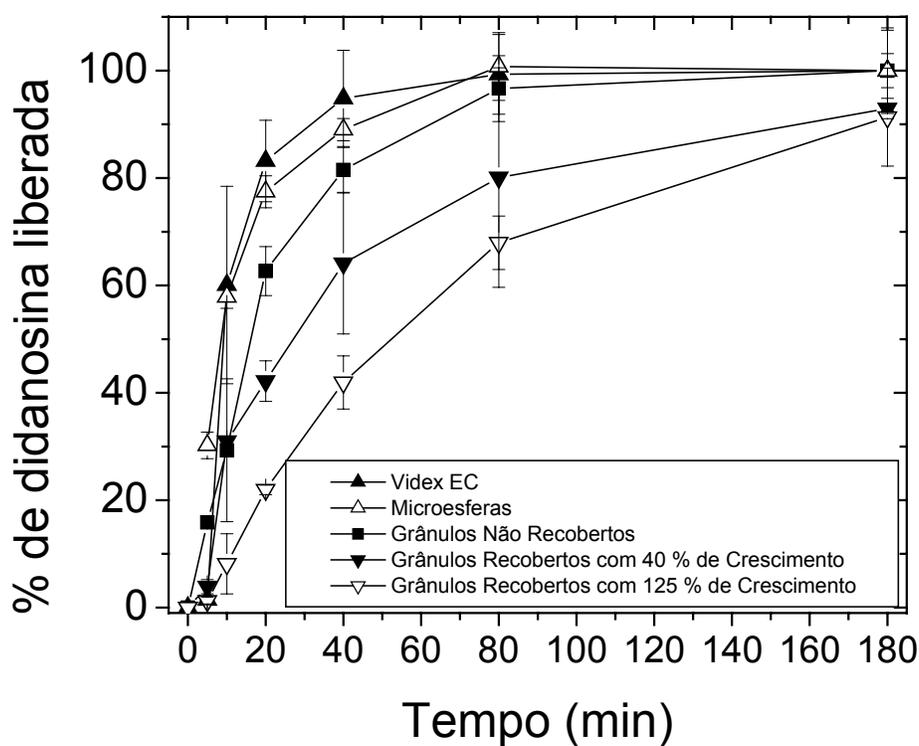
A micrografia do grânulo fraturado (Figura 90) mostra a estrutura interna dos grânulos. É possível observar as 3 regiões: ao centro (o grânulo), a camada de revestimento e a cola de secagem rápida (externamente).



**FIGURA 90.** Micrografia da fratura de um grânulo com 125 % de revestimento (aumentada 200 vezes).

A Figura 91 mostra os perfis de liberação da ddl das várias partículas, obtidos somente em SES, sem a liberação prévia em SGS, em comparação com o Videx<sup>®</sup> EC, as microesferas livres liofilizadas e contidas nos grânulos. Observa-se que o Videx<sup>®</sup> EC e as microesferas liofilizadas apresentaram perfis de liberação muito semelhantes, no entanto, deve-se ressaltar que os grânulos do Videx<sup>®</sup> EC são capazes de proteger a ddl no meio gástrico e as microesferas sozinhas não apresentam tal propriedade. Os grânulos contendo microesferas apresentam perfil de liberação um pouco mais lento, o que é esperado, tanto pela interiorização dessas microesferas nos grânulos, quanto pelas diferenças em tamanho, geometria, área superficial e excipiente de granulação. Após o revestimento dos grânulos com Eudragit<sup>®</sup> L30-D55 (40 e 125 % de crescimento dos grânulos), a liberação se torna mais lenta e somente em 180 min é que 90 % da ddl foi liberada. Os grânulos recobertos com 125 % de crescimento apresentaram liberação ainda mais lenta, porém nesse caso o revestimento não é recomendável pois não atende à formação de película ou à proteção gástrica, como anteriormente apresentado.

Esses resultados evidenciam a importância do recobrimento na liberação modificada da ddl dos grânulos contendo microesferas no SES, e ressaltam mais uma vez a característica inovadora desses grânulos, que é a liberação modificada da ddl no meio entérico. Essa característica distingue os grânulos preparados neste trabalho daqueles do medicamento comercial Videx<sup>®</sup> EC, os quais, se adequadamente recobertos, são potencialmente muito mais promissores para aplicação na terapia da AIDS, uma vez que a liberação modificada promove maior eficiência na ação terapêutica da ddl.



**FIGURA 91.** Liberação da didanosina em suco entérico simulado (pH = 7,40).

## CAPÍTULO 9

### CONCLUSÕES

De modo geral, conclui-se que o processo de incorporação da didanosina (ddI) em micropartículas de quitosana é factível, preserva estrutura química do fármaco e produz um carregamento de fármaco compatível com as doses administradas. Uma das principais dificuldades nos processos de incorporação/encapsulação com quitosana se deve à sua solubilização realizada em meios ácidos. Neste sentido, o presente trabalho contribuiu para o desenvolvimento de um processo de incorporação de moléculas sensíveis ao pH que via de regra não poderiam ser encapsuladas/incorporadas em partículas de quitosana pela técnica de gelificação ionotrópica ou outras técnicas de preparação de partículas de quitosana. O processo de preparação de microesferas poderá ser utilizado na incorporação/encapsulação de outras moléculas sensíveis ou não ao pH, destacando assim sua flexibilidade. Além disto, sob o ponto de vista tecnológico, o trabalho contribui de forma inovadora para a preparação de grânulos contendo microesferas. Processos de produção de grânulos homogêneos, sem nano ou micropartículas, através de extrusão-esferonização têm sido muito estudados, porém não há referências sobre processos de produção de grânulos heterogêneos, grânulos contendo nano ou micropartículas. Outros biopolímeros poderiam ser utilizados na preparação das microesferas ou nanoesferas por diferentes técnicas, o que torna o processo de granulação também flexível. A granulação preservou a integridade das microesferas, e prolongou o tempo de liberação do fármaco. Os grânulos obtidos apresentaram mucoadesividade e absorção intestinal *in vitro* superiores à formulação comercial e ao fármaco livre. Atualmente grânulos funcionais com propriedades mucoadesivas representam uma importante estratégia para fármacos de cujo alvo são as mucosas intestinais. O revestimento dos grânulos apesar de ao ter sido

capaz de bloquear a liberação total do fármaco, poderá ser otimizado em equipamentos e soluções de revestimentos mais adequados.

Os grânulos funcionais desenvolvidos neste trabalho, quando perfeitamente revestidos com polímero gastrorresistente, representarão uma nova alternativa aos paciente com melhor adesão ao tratamento em relação aos comprimidos mastigáveis de didanosina.

As conclusões parciais para as etapas do processo são aqui ordenadas segundo os aspectos estudados:

### **Processo de Formação das Partículas:**

- Pode-se concluir que o processo de formação das partículas por gelificação ionotrópica apresenta três etapas distintas independentes do agente de gelificação. Na etapa 1, ou região 1, corresponde às interações iniciais da cadeia de quitosana com o agente gelificante e a quantidade de cargas positivas da quitosana é muito maior do que as cargas negativas do agente gelificação. Na etapa 2, ou região 2, ocorre a formação de nanoesferas de quitosana, a quantidade de cargas negativas do agente gelificante possibilita o enovelamento das cadeias de quitosana e a formação das nanopartículas. Finalmente, na etapa 3, ou região 3, a quantidade de cargas negativas de agente gelificante é superior às cargas positivas da quitosana e ocorre a precipitação das microesferas devido à coagulação das nanoesferas.
- O mecanismo envolvido na formação de partículas usando o tripolifosfato de sódio (TPP) é decorrente apenas de interações eletrostáticas, por outro lado, para o hidróxido de sódio (NaOH) além deste mecanismo ainda ocorre a insolubilização do polímero;
- Razões mássicas definidas entre as quantidades de agente gelificante e de quitosana delimitam as três etapas de formação de partículas. Estas razões mássicas são úteis no projeto de partículas de quitosana utilizando a técnica de gelificação ionotrópica;

- A gelificação com TPP apresentou melhores resultados no que diz respeito ao índice de polidispersidade das populações. Isto porque as interações eletrostáticas entre o TPP e a quitosana são mais intensas do que as interações entre o NaOH e a quitosana.

### **Estabilidade do Fármaco:**

- A estabilidade da ddl na preparação das partículas foi garantida através do ajuste da quantidade de ácido acético utilizado na solubilização da quitosana e da adição do hidróxido de magnésio à solução de TPP e ddl;
- Apesar do pH ácido da solução de quitosana (pH ~ 4,8), as condições de preparação das microesferas não produziram degradação da ddl. Isto porque após a adição da solução de TPP, ddl e  $Mg(OH)_2$  à solução de quitosana, o pH do meio reacional atingiu valores maiores do que 7,00 em menos de 5 min.

### **Otimização da Incorporação:**

- O planejamento fatorial simples, utilizado inicialmente, não apresentou bom ajuste de modelos lineares às superfícies de resposta. O comportamento não linear levou a utilização de um planejamento fatorial do tipo estrela.
- A técnica do planejamento fatorial possibilitou a obtenção de superfícies de respostas e modelos matemáticos que descrevem respostas como eficiência de incorporação, carregamento, grau de intumescimento, permeabilidade da ddl;
- Todas variáveis estudadas no planejamento fatorial apresentaram efeito significativo sobre as respostas estudadas. O efeito da concentração de TPP foi o terceiro mais importante em todas as respostas, e os efeitos das concentrações de quitosana e de ddl alternaram como primeiro e segundo efeito mais importante dependendo da resposta estudada.

- Dentre as respostas estudadas, apenas o diâmetro médio das partículas não possibilitou o ajuste de superfícies de resposta de acordo com a análise de variância;
- O fato da concentração de TPP apresentar menor efeito pode estar ligado a sua concentração relativamente baixa em relação às concentrações de quitosana e de ddl. Além do fato da concentração de TPP estar atrelada à concentração de quitosana e ainda porque os níveis de TPP se encontram principalmente na região 1 de formação de partículas (apenas o nível maior se encontra no limite entre as regiões 1 e 2). É provável que a escolha de níveis de concentração de TPP que pertençam às três regiões de formação de partículas promova maior efeito desta variável no planejamento de experimentos;
- A escolha das condições ótimas de encapsulação foi realizada com base nos seguintes parâmetros: boa eficiência de incorporação, alto carregamento de fármaco, baixa permeabilidade, alto grau de intumescimento. Estas condições foram obtidas para 2,00 % (m/v) de quitosana, 10,00 % de TPP e 25 mg de ddl/cm<sup>3</sup>.
- O aumento da concentração de ddl, para concentrações supersaturadas, possibilitou a obtenção de microesferas com desempenho ainda melhor.

### **Granulação:**

- Foi possível obter grânulos esféricos a partir de montagens simples de laboratório sem a utilização de uma extrusora e um esferonizador comercial;
- Grânulos contendo as microesferas foram obtidos com sucesso após a secagem branda das microesferas e adição de excipientes;
- A carboximetilcelulose (CMC), nas concentrações utilizadas, não possibilitou a esferonização devido à plasticidade da massa úmida. Este fato pode estar associado às interações eletrostáticas entre as cargas positivas da quitosana e as cargas negativas da CMC que tornam a massa mais coesa;

- O aumento da quantidade de amido pré-gelificado dificultou a esferonização porque confere plasticidade à massa úmida de forma análoga à CMC. Este fato pode estar associado à propriedade aglutinante do amido, que também torna a massa mais coesa;
- A constante  $k$  ( $D/R^2$ ) variou muito pouco com a adição dos excipientes e com a concentração dos mesmos, mostrando que a presença de microesferas é fator determinante do perfil de liberação muito mais do que os excipientes;
- Parâmetros geométricos, tais como alongamento, diâmetro de Feret e esfericidade, apresentaram valores satisfatórios para o preenchimento de cápsulas gelatinosas. Tais valores foram muito semelhantes ao do medicamento comercial, os grânulos gastrorresistente de didanosina (Videx<sup>®</sup>EC).

### **Mucoadesividade:**

- A determinação da isoterma de adsorção da mucina possibilitou a quantificação *in vitro* da mucoadesividade das partículas, embora a técnica não represente um sistema real, a comparação dos resultados possibilita a inferência da mucoadesividade das partículas *in vivo*;
- O modelo de Langmuir apresentou bom ajuste às isotermas de adsorção da mucina;
- A capacidade máxima de adsorção de mucina, dada pelo parâmetro  $q_{MAX}$ , não apresentou grandes variações após o processo de granulação das microesferas. Por outro, o processo de granulação das microesferas sem excipiente promoveu redução da afinidade pela mucina, dada pelo parâmetro  $K_D$ . Esta redução da afinidade foi compensada pela granulação das microesferas utilizando excipientes como quitosana e amido pré-gelificado;
- No caso da adição de quitosana como excipiente, o aumento da afinidade dos grânulos está relacionado às interações eletrostáticas entre a quitosana e a mucina, além da sua boa dispersão nos grânulos. No caso do amido

pré-gelificado, o aumento da afinidade está relacionado ao maior entrelaçamento das cadeias de amido nas cadeias de mucina;

- A adição de CMC, como excipiente aos grânulos, reduziu a afinidade pela mucina devido à repulsão das cargas negativas da CMC e da mucina.

### **Permeação Intestinal *ex vivo*:**

- O segmento duodenal apresentou maior absorção da ddl em relação aos outros segmentos (jejuno e íleo). A absorção deste segmento é maior porque a quantidade de microvilosidades é maior, conseqüentemente a área para absorção e mucoadesão também é maior;
- O grânulo contendo 4,8 % de quitosana apresentou maior absorção pelo segmento duodenal. Segundo alguns autores (GUO *et al.*, 2004; KOTZÉ *et al.*, 1998 e DODANE *et al.*, 1999), tal fato pode ser atribuído à presença da quitosana que favorece a absorção de fármacos através da abertura das junções estreitas da membrana intestinal;
- A quitosana adicionada na preparação dos grânulos favorece o processo de absorção da ddl pelo duodeno;
- Os perfis de absorção nos segmentos do jejuno e íleo não apresentaram diferenças significativas;

### **Revestimento dos Grânulos com Eudragit® L30-D55:**

- O equipamento utilizado no revestimento não apresentou resultados eficientes para proteção da partícula no meio ácido, devido à formação de estruturas pontiagudas na superfície dos grânulos. Na formação destas estruturas, o polímero Eudragit é depositado preferencialmente sobre as estruturas pontiagudas em detrimento das outras regiões sem tais estruturas, levando a formação de grânulos recobertos com elevado crescimento em Eudragit mas ineficiente quando a proteção em meio ácido.

- Em suco entérico simulado, os grânulos recobertos apresentaram perfil de liberação da ddl mais lento do que os grânulos de Videx<sup>®</sup>EC, o que representa grande vantagem em relação a este medicamento comercial.

## CAPÍTULO 10

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aumentar a escala de produção de microesferas de quitosana para verificar a manutenção das suas propriedades;
- Estudar o processo de granulação das microesferas em equipamento comercial tendo em vista o aumento de escala e a reprodutibilidade;
- Realizar testes de mucoadesão *in vivo* para verificar se o método *in vitro*, utilizado neste trabalho, representa satisfatoriamente um modelo animal;
- Utilizando um planejamento de experimentos, otimizar a formulação de revestimento dos grânulos com variáveis como concentração de polímero de revestimento, tipo de polímero de revestimento, concentração de agente plastificante, tipo de agente plastificante. E tendo o ângulo de contato e a tensão superficial como respostas do planejamento;
- A partir da solução de revestimento otimizada, realizar o revestimento dos grânulos em equipamento comercial de leite fluidizado;
- Utilizar o processo aqui desenvolvido para outros fármacos, sensíveis ou não ao pH, de interesse comercial;

## CAPÍTULO 11

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACRA, S. A., GHISHAN, F. K. Methods of investigating intestinal transport. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v.15, n.3, Supplement, p.93S-98S, 1991.
- ADAMSON, A.W. Physical Chemistry of Surfaces, 5<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons, 1990.
- AGGARWAL, A., KAUR, S., TIWARY, A. K., GUPTA, S. Chitosan microspheres prepared by an aqueous process: release of indomethacin. *Journal of Microencapsulation*, v.18, n.6, p.819-823, 2001.
- AIEDEH, K., GIANASI, E., ORIENTI, I., ZECCHI, V. Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin. *Journal of Microencapsulation*, v.14, n.5, p.567-576, 1997.
- AL-HELW, A. A., AL-ANGARY, A. A., MAHROUS G. M., AL-DARDARI, M. M. Preparation and evaluation of sustained release cross-linked chitosan microspheres containing phenobarbitone. *Journal of Microencapsulation*, v.15, n.3, p.373-382, 1998.
- ARAL, C., AKBUĞA, J. Alternative approach to the preparation of chitosan beads. *International Journal of Pharmaceutics*, v.168, p.9-15, 1998.
- AYDIN, Z., AKBUĞA, J. Chitosan beads for delivery of salmon calcitonin: preparation and release characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, v.131, p.101-103, 1996.
- AYRES, M., AYRES JUNIOR, M. *BioEstat - Aplicações Estatísticas na Área das Ciências Bio-médicas*, Belém: Editora da Universidade Federal do Pará, 2003, 302p.

- BARTHE, L., WOODLEY, J., HOUIN, G. Gastrintestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v.13, p.154-168, 1999.
- BENDER, A. R., von BRIESEN, H., KREUTER, J., DUNCAN, I. B., RUBSAMENWAIGMANN, H. Efficiency of nanoparticles as a carrier system for antiviral agents in human immunodeficiency virus-infected human monocytes/macrophages *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.40, n.6, p.1467-1471, 1996.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A., HUMENBERGER, C., VALENTA, C. Basic Studies on bioadhesive delivery systems for peptide and protein drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.165, p.217-225, 1998.
- BERTHOLD, A., CREMER, K., KREUTER, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *Journal of Controlled Release*, v.39, p.17-25, 1996.
- BOUDAD, H., LEGRAND, P., LEBAS, G., CHERON, M., DUCHENE, D., PONCHEL, G. Combined hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. *International Journal of Pharmaceutics*, v.218, n.1-2, p.113-124, 2001.
- BRAMER, S. L., WIENTJES, M. G., AU, J. L. S. Absorption of 2'-3'-dideoxyinosine from lower gastrintestinal tract in rats and kinetic evidence of different absorption rates in colon and rectum. *Pharmaceutical Research*, v.10, n.5, p.763-770, 1993.
- BREITKREUTZ, J., BORNHÖFT, M., WÖLL, F., KLEINEBUDDE, P. Pediatric drug formulations of sodium benzoate: I. Coated granules with a hydrophilic binder. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.56, p.247-253, 2003.
- BRUNS, R. E., BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. 1ª Edição, Campinas: Editora da Unicamp, 1995, 300p.

- CALVO P., REMUNAN-LOPEZ, C., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, v.63, n.1, p.125-129, 1997<sup>A</sup>.
- CALVO, P., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.153, p.41-50, 1997<sup>B</sup>.
- CAMPOS, A. M., SÁNCHEZ A., ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, v.224, p.159-168, 2001.
- CARRENO-GÓMEZ, B. WOODLEY, J. F., FLORENCE, A. T. Studies on the uptake of tomato lectin nanoparticles in everted gut sacs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.183, p.7-11, 1999.
- CHANDY, T., DAS, G. S., RAO, G. H. R. 5-Fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours. *Journal of Microencapsulation*, v.17, n.5, p.625-638, 2000.
- CHICKERING III, D. E., JACOB, J. S., DESAI, T. A., HARRISON, M., HARRIS, W. P., MORRELL, C. N., CHATURVEDI, P., MATHIOWITZ, E. Bioadhesive Microspheres: III. An *in vivo* transit and bioavailability study of drug-loaded alginate and poly-(fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres. *Journal of Controlled Release*, v.48, p.35-46, 1997.
- CUI, Z., MUMPER, R. J. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *Journal of Controlled Release*, v.75, p.409-419, 2001.
- DAMLE, B. D., YAN, J.H., BEHR, D., O'MARA, E., NICHOLA, P., KAUL, S., KNUPP, C. Effect of food on the oral bioavailability of didanosine from encapsulated enteric-coated beads. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, p.419-427, 2002<sup>A</sup>.
- DAMLE, B. D., KAUL, S., BEHR, D., KNUPP, C. Bioequivalence of two formulations of didanosine, encapsulated enteric-coated beads and buffered

- tablet, in healthy volunteers and HIV-infected subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, p.791-797, 2002<sup>B</sup>.
- DAMLE, B. D., ULLAH, I., DOLL, W., WILEY, G., KNUPP, C. Pharmacokinetics and gamma scintigraphy evaluation of two coated formulations of didanosine in healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.54, p.255-261, 2002<sup>C</sup>.
- DELFRASSY, J. F. *Prise en charge des personnes infectées par le VIH - Rapport 2002 - Ministère de la Santé, de la Famille et des Personnes Handicapées*. Paris: Médecine-Sciences Flammarion, 2002, 384p.
- DESORMEAUX, A., BERGERON, M. G. Lymphoid tissue targeting of anti-HIV drugs using liposomes. *Methods in Enzymology*, v.391, Parte E, p.330-351, 2005.
- DESORMEAUX, A., HARVIE, P., PERRON, S., MAKABIPANZU, B., BEAUCHAMP, D., TREMBLAY, M., POULIN, L., BERGERON, M. G. Antiviral Efficacy, Intracellular Uptake and Pharmacokinetics of Free and Liposome-Encapsulated 2',3'-Dideoxyinosine. *AIDS*, v.8, n.11, p.1545-1553, 1994.
- DIPALI, S. R., LIN, Y. J., RAVIS, W. R., BETAGERI, G. V. Pharmacokinetics and tissue distribution of long circulating liposomal formulation of 2',3'-dideoxyinosine. *International Journal of Pharmaceutics*, v.152, n.1, p.89-97, 1997.
- DODANE, V., KHAN, M. A., MERWIN, J. R. Effects of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*, v.182, p.21-32, 1999.
- DODOU, D., BREEDVELD, P., WIERINGA, P. A. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.60, p.1-16, 2005.
- DONIDA, M. W. *Revestimento Polimérico de Uréia em Leito de Jorro Bidimensional*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000. 102 p. Dissertação (Mestrado).

- DONIDA, M. W. *Análise das Influências das Características do Sólido e da Suspensão no Processo de Recobrimento em Leito de Jorro*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 157 p. Tese (Doutorado).
- DRAPER, N. R., SMITH, H. *Applied Regression Analysis*, Second Edition, John Wiley & Sons, 1981.
- DUMITRIU, S., DUMITRIU, M. Polymeric Drug Carriers. In DUMITRIU, S. - *Polymeric Biomaterials*. New York: Marcel Dekker, INC., 1993, p.447-452.
- EL-HAMEED, M. D. A., KELLAWAY, I. W. Preparation and *in vitro* characterisation of mucoadhesive polymeric microspheres as intra-nasal delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.44, p.53-60, 1997.
- EREMEEVA, T. E., BYKOVA, T. O. SEC of mono-carboxymethyl cellulose (CMC) in a wide range of pH; Mark-Houwink constants. *Carbohydrate Polymers*, v.36, p.319-326, 1998.
- FERREIRA, A. O. *Guia Prático de Farmácia Magistral*. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2a. Edição, 2004.
- FREIRE, J. T., OLIVEIRA, W. P. *Tópicos Especiais em Secagem*. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1992. Cap. VII: Aspectos Tecnológicos de Processos de Recobrimento de Partículas, v.1, p.255-293.
- GAGNÉ, J. F., DESORMEAUX, A., PERRON, S., TREMBLAY, M. J., BERGERON, M. G. Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, v.1558, n.2, p.198-210, 2002.
- GANDHI, R., KAUL, C. L., PANCHAGNULA, R. Extrusion and spheronization in the development of oral controlled-release dosage forms. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v.2, n.4, p.160-170, 1999.
- GANZA-GONZÁLEZ, A., ANGUIANO-IGEA, S., OTERO-ESPINAR, F. J., MÉNDEZ, J. B. Chitosan and chondroitin microspheres for oral-

- administration controlled release of metoclopramide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.48, p.149-155, 1999.
- GAREY, K. W., RODVOLD, K. A., RODVOLD, A. Antiretroviral agents and food interactions. *Infections in Medicine*, v.15, n.12, p.836-841, 1998.
- GÅSERØD, O., JOLLIFFE, I. G., HAMPSON, F. C., DETTMAR, P. W., SKJÅK-BRÆK, G. The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, v.175, p.237-246, 1998.
- GENTA, I., COSTANTINI, M., ASTI, A., CONTI, B., MONTANARI, L. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v.36, p.81-88, 1998.
- GIUNCHEDI, P., JULIANO, C., GAVINI, E., COSSU, M., SORRENTI, M. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.53, p.233-239, 2002.
- GONÇALVES, V. L., LARANJEIRA, M. C. M. Sistema de liberação controlada de diclofenaco de sódio a partir de microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído. In 23<sup>a</sup> REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 2000, Poços de Caldas. Anais de Trabalhos Apresentados. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2000.
- GOPINATH, D., RAVI, D., KARWA, R., RAO, B. R., SHASHANK, A., RAMBHAU, D. Pharmacokinetics of zidovudine following intravenous bolus administration of a novel niosome preparation devoid of cholesterol. *Arzneimittel-Forschung-Drug Research*, v.51, n.11, p.924-930, 2001.
- GUO, J., PING, Q., JIANG, G., DONG, J., QI, S., FENG, L., LI, C. Transport of leuprolide across rat intestine, rabbit intestine and Caco-2 cell monolayer. *International Journal of Pharmaceutics*, v.278, p.415-422, 2004.
- HARVIE, P., DESORMEAUX, A., GAGNE, N., TREMBLAY, M., POULIN, L., BEAUCHAMP, D., BERGERON, M.G. Lymphoid-Tissues Targeting of

- Liposome-Encapsulated 2',3'-Dideoxyinosine. *AIDS*, v.9, n.7, p.701-707, 1995.
- HE, P., DAVIS, S. S., ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v.187, p.53-65, 1999<sup>A</sup>.
- HE, P., DAVIS, S. S., ILLUM, L. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. *Journal of Microencapsulation*, v.16, n.3, p.343-355, 1999<sup>B</sup>.
- HE, P., DAVIS, S. S., ILLUM, L. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v.166, p.75-68, 1998.
- HOLT, E. M. The properties and forming of catalysts and absorbents by granulation. *Powder Technology*, v.140, p.194-202, 2004.
- HON, D. N. S. Chitin and Chitosan: Medical Applications. In: DUMITRIU, S. – Polysaccharides in Medicinal Application, New York: Marcel Dekker Inc., 1996, p.631-649.
- ISMAGILOV, Z. R., SHKRABINA, KORYABKINA, N. A. New technology for production of spherical alumina supports for fluidized bed combustion. *Catalysis Today*, v.47, p.51-71, 1999.
- JACOBS, C., KAYSER, O., MÜLLER, R. H. Production and characterization of mucoadhesive nanosuspensions for the formulation of bupravaquone. *International Journal of Pharmaceutics*, v.214, n.1-2, p.3-7, 2001.
- JANES, K. A., FRESNEAU, M. P., MARAZUELA, A., FABRA, A., ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, v.73, p.255-267, 2001<sup>A</sup>.
- JANES, K. A., CALVO, P., ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.47, p.83-97, 2001<sup>B</sup>.
- KAS, H. S. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *Journal of Microencapsulation*, v.14, n.6, p.689-711, 1997.

- KASAI, E., HARJANTO, S., TERUI, T., NAKAMURA, T., WASEDA, Y. Thermal remediation of PCDD/Fs contaminated soil by zone combustion process. *Chemosphere*, v.41, p.857-864, 2000.
- KATRAGADDA, A. K., SINGH, M., BETAGERI, G. V. Encapsulation, stability, and *in vitro* release characteristics of liposomal formulations of stavudine (D4T). *Drug Delivery*, v.6, n.1, p.31-37, 1999.
- KAUL, S., SHYU, W. C., SHUKLA, U. A., DANDEKAR, K. A., BARBHAIYA, R. H. Absorption, disposition and metabolism of [C-14] didanosine in the beagle dog. *Drug Metabolism and Disposition*, v.21, n.3, p.447-453, 1993.
- KIMURA, I. Y., POZZA, F., FÉLIX, E. G., STOLBERG, J., FÁVERE, V. T. Adsorção do Corante Remazol Brilliant Orange 3R (Reativo laranja 16) por Microesferas de Quitosana Reticuladas. In 2º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, 1998, Florianópolis. Anais de Trabalhos Apresentados. Florianópolis: Universidade Estadual de Santa Catarina, 2000, p.423-431.
- KLEINEBUDDE, P. Theme Issue "Granulation". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.52, p.267, 2001.
- KO, J. A., PARK, H. J., PARK, Y. S., HWANG, S. J., PARK, J. B. Chitosan microparticles preparation for controlled drug release by response surface methodology. *Journal of Microencapsulation*, v.20, n.6, p.791-797, 2003.
- KOTZÉ, A. F., LUEßEN, H. L., LEEUW, B. J., BOER, A. B. G., VERHOEF, J. C., JUNGINGER, H. E. Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (caco-2). *Journal of Controlled Release*, v.51, p.35-46, 1998.
- KRAJEWSKA, B. Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Separation and Purification Technology*, v.41, p.305-312, 2005.
- KUMAR, M. N. V. R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutics Science*, v.3, n.2, p.234-258, 2000<sup>A</sup>.

- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v.46, p.1-27, 2000<sup>B</sup>.
- KUMBAR, S. G, KULKARNI, A. R., AMINABHAVI, T. M. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. *Journal of Microencapsulation*, v.19, n.2, p.173-180, 2002.
- KUNCHES, L. M., REINHALTER, N. E., MARQUIS, A., COAKLEY, E., COHEN, C., MORRIS, A. B., MAZZULLO, J. M. Tolerability of enteric-coated didanosine capsules compared with didanosine tablets in adults with HIV infections. *Journal of Acquired Immuno Deficiency Syndromes*, v.28, n.2, p.150-153, 2001.
- KUO, Y. C. Loading efficiency of stavudine on polybutylcyanoacrylate and methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate copolymer nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.290, n.1-2, p.161-172, 2005.
- LEONG, K. W., MAO, H.-Q., TRUONG-LE, V. L., WALSH, S. M., AUGUST, J. T. DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *Journal of Controlled Release*, v.53, p.183-193, 1998.
- LIM, L. Y., WAN, L. S. C. Effect of magnesium stearate on chitosan microspheres prepared by emulsification-coacervation technique. *Journal of Microencapsulation*, v.15, n.3, p.319-333, 1998.
- LO, Y. Phospholipids as multidrug resistance modulators of the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 layers and everted gut sacs of rats. *Biochemical Pharmacology*, v.60, p.1381-1390, 2000.
- LO, Y., LIU, F., CHERNG, J. Effect of PSC833 liposomes and intralipid on the transport of epirubicin in Caco-2 cells and rat intestines. *Journal of Controlled Release*, v.76, p.1-10, 2001.
- LÖBENBERG, R., KREUTER, J. Macrophage Targeting of Azidothymidine: A Promising Strategy for AIDS Therapy. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.12, n.18, p.1709-1715, 1996.

- LÖBENBERG, R., ARAUJO, L., KREUTER, J. Body distribution of azidothymidine bound to nanoparticles after oral administration. *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics*, v.44, n.2, p.127-132, 1997.
- LÖBENBERG, R., ARAUJO, L., VON BRIESEN, H., RODGERS, E., KREUTER, J. Body distribution of azidothymidine bound to hexyl-cyanoacrylate nanoparticles after i.v. injection to rats. *Journal of Controlled Release*, v.50, n.1-3, p.21-30, 1998.
- LUBBEN, I. M. V. D., VERHOEF, J. C., AELST, A. C. V., BORCHARD, G., JUNGINGER, H. E. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary *in vivo* uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials*, v.22, p.687-694, 2001.
- MAA, Y. F., NGUYEN, P., HSU, C. C. Spray-coating of rhDNase on lactose: effect of system design, operational parameters and protein formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, v.144, p.47-59, 1996.
- MANDAL, T. K., TENJARLA, S. Preparation of biodegradable microcapsules of zidovudine using solvent evaporation: Effect of the modification of aqueous phase. *International Journal of Pharmaceutics*, v.137, p.187-197, 1996.
- MANTLE, M., ALLEN, A. A Colorimetric Assay for Glycoproteins Based on the Periodic Acid/Schiff Stain. *Biochemical Society Transactions*, v.6, p.607-609, 1978.
- MI, F. L., SUNG, H. W., SHYU, S. S. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymers*, v.48, p.61-72, 2002.
- MI, F. L., SUNG, H. W., SHYU, S. S., SU, C. C., PENG, C. K. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer*, v.44, p.6521-6530, 2003.
- MITRA, S., GAUR, U., GHOSH, P. C., MAITRA, A. N. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *Journal of Controlled Release*, v.74, p.317-323, 2001.

- MONTAGNIER, L. *AIDS: Seus Mecanismos e Tratamentos*, Traduzido por Maria Luiza X. de A. Borges. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed., 1995.
- MORRIS, J. B., ROBINSON, D. E., VOLLMUTH, T. A., BROWN, R. P., DOMEYER, B. E. A parallelogram approach for safety evaluation of ingested acetaldehyde. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.24, n.3, p.251-263, 1996.
- MOSES, L. R., DILEEP, K. J., SHARMA, C. P. Beta cyclodextrin-insulin-encapsulated Chitosan/Alginate Matrix: Oral Delivery System. *Journal of Applied Polymer Science*, v.75, p.1089-1096, 2000.
- NEAU, S. H., CHOW, M. Y., HILEMAN, G. A., DURRANI, M. J., GHEYAS, F., EVANS, B. A. Formulations and process considerations for beads containing Carbopol® 974P, NF resin made by extrusion-spheronization. *International Journal of Pharmaceutics*, v.199, p.129-140, 2000.
- NETO, V. A., MEDEIROS, E. A. S., KALLÁS, E. G., LEVI, G. C., BALDY, J. L. S., MEDEIROS, R. S. S. *AIDS Na Prática Médica*. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, 1996.
- NEUMANN, A. W., GOOD, R. J. *Surface and Colloid Science*, v.II, 1979.
- NISHIMURA, K., NISHIMURA, S., SEO, H., NISHI, N., TOKURA, S., AZUMA, I. Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.20, p.1359-1372, 1986.
- NISHIMURA, S. I., KAI, H., SHINADA, K., YOSHIDA, T., TOKURA, S., KURITA, K., NAKASHIMA, H., YAMAMOTO, N., URYU, T. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV activity of novel chitin sulfates. *Carbohydrate Research*, v.306, p.427-433, 1998.
- OLIVEIRA, B. F., SANTANA, M. H. A., RÉ, M. I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. In DRYING 2004, São Paulo, 2004. *Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS*

- 2004). Campinas: Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, 2004, v.B, p.1166-1173.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2005), *Aids Epidemic Update*, Genebra: UNAIDS, 2005.
- OUSSOREN, C., MAGNANI, M., FRATERNALE, A., CASABIANCA, A., CHIARANTINI, L., INGEBRIGSTEN, R., UNDERBERG, W.J.M., STORM, G. Liposomes as carriers of the antiretroviral agent dideoxycytidine-5'-triphosphate. *International Journal of Pharmaceutics*, v.180, n.2. p.261-270, 1999.
- PARK, K., COOPER, S. L., ROBINSON, J. R. Bioadhesives Hydrogels. In PEPPAS, N.A. - *Hydrogels in Medicine and Pharmacy - Properties and Applications*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1987, v.III, Cap. 8, p.151-175.
- PEÇANHA, E. P., ANTUNES, O. A. C., TANURI, A. Estratégias para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*, v.25, n.6B, p.1108-1116, 2002.
- PENICHE, C., ARGÜELLES-MONAL, W., PENICHE, H., ACOSTA, N. Chitosan: An attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, v.3, n.10, p.511-520, 2003.
- PERRY, C. M., BALFOUR, J. A. Didanosine. An uptake on its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV disease. *Drugs*, v.52, p.928-962, 1996.
- PHILLIPS, N. C. Liposomal Carriers for the Treatment of Acquired Immune-Deficiency Syndromes. *Bulletin de L'Institut Pasteur*, v.90, n.4, p.205-230, 1992.
- PHILLIPS, N. C., SKAMENE, E., TSOUKAS, C. Liposomal Encapsulation of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (AZT) Results in Decreased Bone-Marrow Toxicity and Enhanced Activity Against Murine Aids-Induced Immunosuppression. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, v.4, n.10, p.959-966, 1991.
- PHILLIPS, N. C., TSOUKAS, C. Liposomal Encapsulation of Azidothymidine: Results in Decreased Hematopoietic Toxicity and Enhanced Activity Against

- Murine Acquired-Immunodeficiency-Syndrome. *Blood*, v.79, n.5, p.1137-1143, 1992.
- PIFFERI, G., SANTORO, P., PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. *Il Farmaco*, v.54, p.1-14, 1999.
- POGODINA, N. V., PAVLOV, G. M., BUSHIN, S. V., MELNIKOV, A. B., LYSENKO, Y. B., MARSHEVA, V. N., MARCHENKO, G. N., TSVETKOV, V. N. Hydrodynamic properties of chitine nitrate molecules from the data of diffusion-sedimentation analysis and viscometry. *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya A*, v.28, n.4, p.688-694, 1986.
- POLLARD, R. B. Didanosine once daily: potential for expanded use. *AIDS*, v.14, n.16, p.2421-2428, 2000.
- POZZA, F., KIMURA, I. Y., PEDROSA, R., LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T. (1998) Cibacron Blue F3G-A Imobilizado em Microesferas de Quitosana como Adsorvente de Proteínas. In 2º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, 1998, Florianópolis. Anais de Trabalhos Apresentados. Florianópolis: Universidade Estadual de Santa Catarina, 2000, p.449-455.
- QIU, X., LEPORATTI, S., DONATH E., MÖHWALD H. Studies on the drug release properties of polysaccharide multilayers encapsulated ibuprofen microparticles. *Langmuir*, v.17, p.5375-5380, 2001.
- RAMADAS, M., PAUL, W., DILEEP, K. J., ANITHA, Y., SHARMA, C. P. Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats. *Journal of Microencapsulation*, v.17, n.4, p.405-411, 2000.
- SANTOS, H., VEIGA, F., PINA, M., PODCZECK, F., SOUSA, J. Physical properties of chitosan pellets produced by extrusion-spheronization: influence of formulation variables. *International Journal of Pharmaceutics*, v.246, p.153-169, 2002.
- SÁNCHEZ-LAFUENTE, C., RABASCO, A. M., ÁLVAREZ-FUENTE4S, J., FERNÁNDEZ-ARÉVALO, M. Eudragit® RS-PM and Ethocel® 100 Premium: influence over the behavior of didanosine inert matrix system. *Il Farmaco*, v.57, p.649-656, 2002.

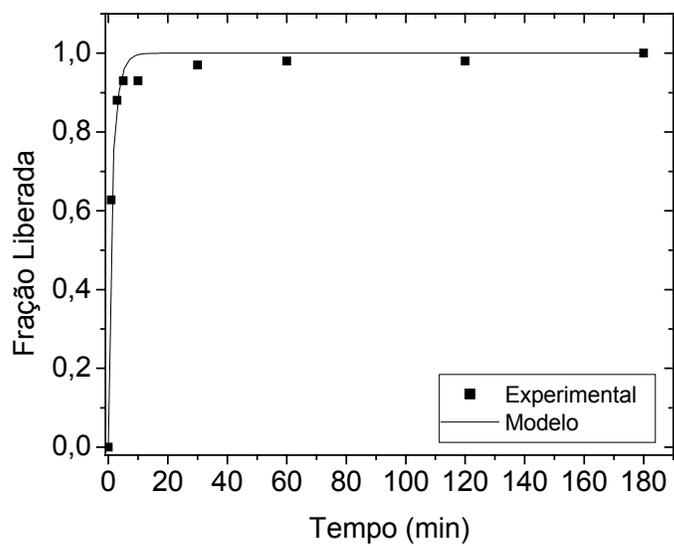
- SAWAYANAGI, Y., NAMBU, N., NAGAI, T. Directly compressed tablets containing chitin or chitosan in addition to lactose or potato starch. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.30, p.2935-2940, 1982.
- SELVAM, M. P., BUCK, S. M., BLAY, R. A., MAYNER, R. E., MIED, P. A., EPSTEIN, J. S. Inhibition of HIV replication by immunoliposomal antisense oligonucleotide. *Antiviral Research*, v.33, n.1, p.11-20, 1996.
- SHAHIDI, F., HAN, X. Q. Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.33, n.6, p.501-547, 1993.
- SHAHIDI, F., ARACHCHI, J.K.V., JEON, Y.J. Food Application of Chitin and Chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, v.10, p.37-51, 1999.
- SHIKATA, F., TOKUMITSU, H., ICHIKAWA, H., FUKUMORI, Y. *In vitro* cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.53, p.57-63, 2002.
- SHELTON, M. J., ADAMS, J. M., HEWITT, R. G., STEINWANDEL, C., DEREMER, M., COUSINS, S., MORSE, G. D. Effects of spontaneous gastric hypoacidity on the pharmacokinetics of zidovudine and didanosine. *Pharmacotherapy*, v.17, n.3, p.438-444, 1997.
- SHU, X. Z., ZHU, K. J. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.201, p.51-58, 2000.
- SILVA, O. S. *Desenvolvimento do Processo de Revestimento e Secagem de Microgrânulos em Leito Fluidizado*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003, 140p. Tese (Doutorado).
- SINGH, U. V., UDUPA, N. Methotrexate loaded chitosan and chitin microspheres- *in vitro* characterization and pharmacokinetics in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Journal of Microencapsulation*, v.15, n.5, p.581-594, 1998.

- SINKO, P. J., PATEL, N. R., HU, P. D. Site-specific oral absorption of didanosine - in situ characterization and correlation with extent of absorption *in vivo*. *International Journal of Pharmaceutics*, v.109, n.2, p.125-133, 1994.
- SINKO, P. J., HU, P., WACLAWSKI, A. P., PATEL, N. R. Oral absorption of anti-AIDS nucleoside analogs. 1. Intestinal transport of didanosine in rat and rabbit preparations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.84, n.8, p.859-965, 1995.
- SINKO, P. J., SUTYAK, J. P., LEESMAN, G. D., HU, P. D., MAKHEY, V. D., YU, H. S., SMITH, C. L. Oral absorption of anti-AIDS nucleoside analogues. 3. Regional absorption and *in vivo* permeability of 2',3'-dideoxyinosine in an intestinal-vascular access port (IVAP) dog model. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v.18, n.8, p.697-710, 1997.
- SONAGLIO, D., BATAILLE, B., ORTIGOSA, C., JACOB, M. Factorial design in the feasibility of producing Microcel MC 1001 pellets by extrusion/spheronization. *International Journal of Pharmaceutics*, v.115, p.53-60, 1995.
- STOLK, L. M. L., LÜERS, J. F. J. Increasing number of anti-HIV drugs but no definite cure – Review of anti-HIV drugs. *Pharmacy World & Science*, v.26, n.3, p.133-136, 2004.
- SUMMERS, M., AULTON, M. Granulation. In AULTON, M. - *Pharmaceutics: The Science of Dosage from Design*. Grã-Bretanha: Churchill Livingstone, Cap.25, 2001, p.364-378.
- SUNG, H. W., HUANG, R. N., HUANG, L. L. H., TSAI, C. C., CHIU, C. T. Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomedical Material Research*, v.42, p.560-573, 1998.
- SUNG, H. W., HUANG, L. L. H., TSAI, C. C. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition*, v.10, p.63-74, 1999.
- TARANTO, O. P. *Monitoramento de Regimes e Revestimento de Partículas em Leito de Jorro Bidimensionais*. Campinas: Faculdade de Engenharia

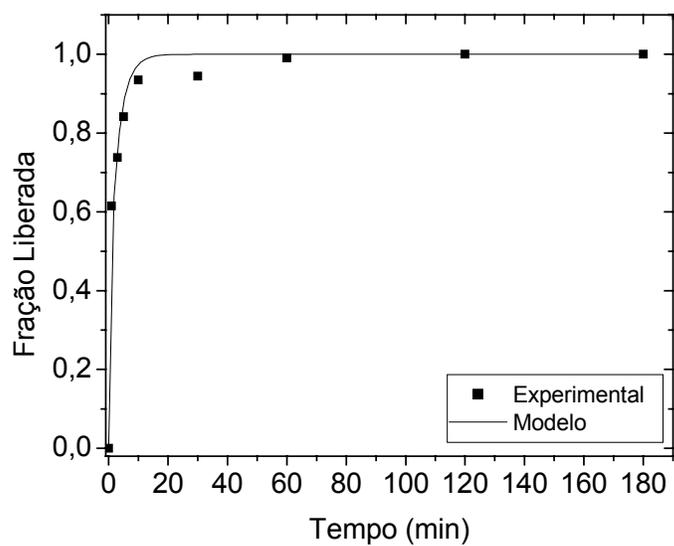
- Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996, 141p. Tese (Doutorado).
- TIROSH, B., BALUOM, M., NASSAR, T., FRIEDMAN, M., RUBINSTEIN, A. The Effect of Eudragit RL-100 on the Mechanical and Mucoadhesion Properties of Polycarbophil dosage forms. *Journal of Controlled Release*, v.45, p.57-64, 1997.
- TOKUMITSU, H., HIRATSUKA, J., SAKURAI, Y., KOBAYASHI, T., ICHIKAWA, H., FUKUMORI, Y. Gadolinium neutron-capture therapy using novel gadopentetic acid-chitosan complex nanoparticles: *in vivo* growth suppression of experimental melanoma solid tumor. *Cancer Letters*, v.150, p.177-182, 2000.
- TOMER, G., PODCZECK, F., NEWTON, J. M. The influence of model drugs on the preparation of pellets by extrusion/spheronization: II spheronization parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, v.231, p.107-119, 2002.
- UPADRASHTA, S. M., KATIKANENI, P. R., NUESSELE, N. O. Chitosan as a tablet binder. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.18, p.1701-1708, 1992.
- VANDELLI, M. A., PIFFERI, G., SEGHIZZI, R., CAMERONI, R. Swelling behaviour of gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde. The effect of the preparative factor. *Pharmacy and Pharmacology Letters*, v.5, p.116-119, 1995.
- VERVAET, C., BAERT, L., REMON, J. P. Extrusion-spheronisation - A literature review. *International Journal of Pharmaceutics*, v.116, p.131-146, 1995.
- VILA, A., SÁNCHEZ, A., TOBÍO, M., CALVO, P., ALONSO, M. J. Design of biodegradable for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, v.78, p.15-24, 2002.
- WALDRON, M. A practical guide to the extrusion and spheronization of pharmaceuticals using NICA™ System. GEA Process Technology Division, 26p., 2001.

- WIN, P. P., SHIN-YA, Y., HONG, K. J., KAJIUCHI, T. Formulation and characterization of pH sensitive drug carrier based on phosphorylated chitosan (PCS). *Carbohydrate Polymers*, v.53, p.305-310, 2003.
- WINTERGERST, U., ROLINSKI, B., SOLDER, B., BOGNER, J. R., WOLF, E., JAGER, H., ROSCHER A. A., BELOHRADSKY, B. H. Lack of absorption of didanosine after rectal administration in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.3, p.699-701, 1999.
- WOODLEY, J. Bioadhesion: New Possibilities for Drug Administration? *Clinical Pharmacokinetics*, v.40, n.2, p.77-84, 2001.

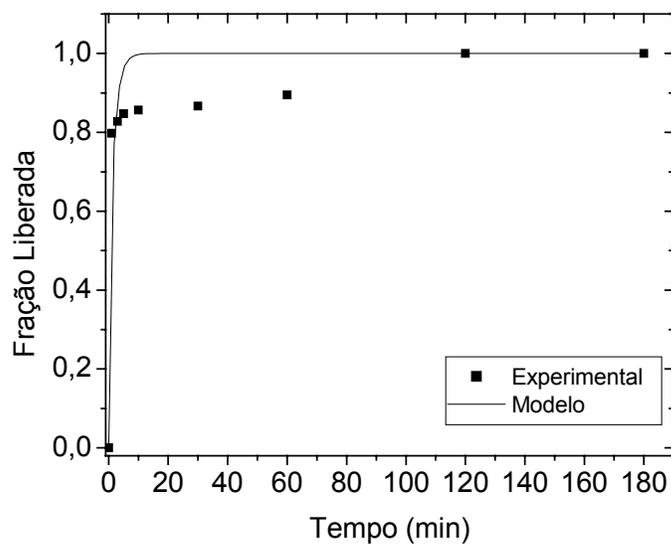
## **ANEXO 1**



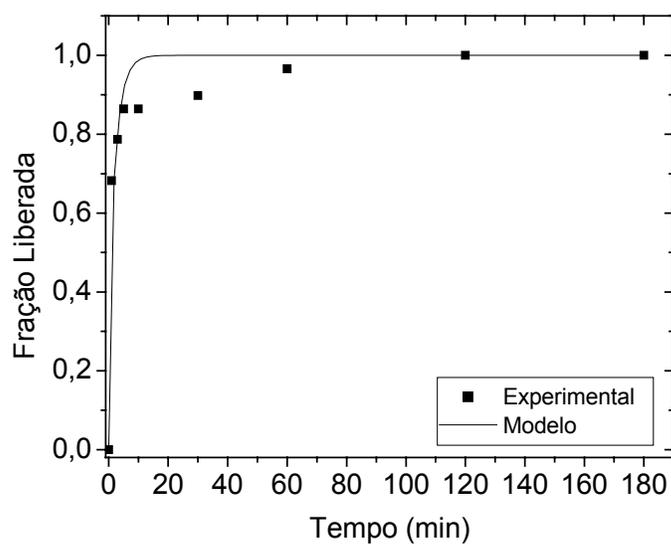
Experimento 1:  $P = 5,17 \text{ min}^{-1}$  (10,00 % de TPP, 2,00 % de Quitosana, 12,50 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



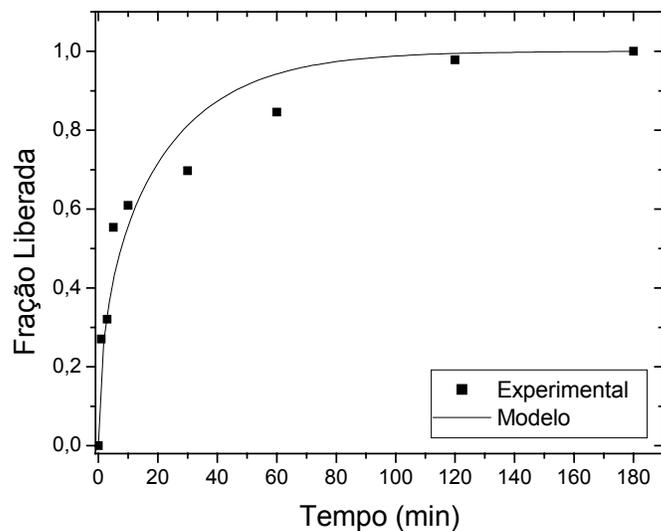
Experimento 2:  $P = 3,19 \text{ min}^{-1}$  (20,00 % de TPP, 2,00 % de Quitosana, 12,50 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



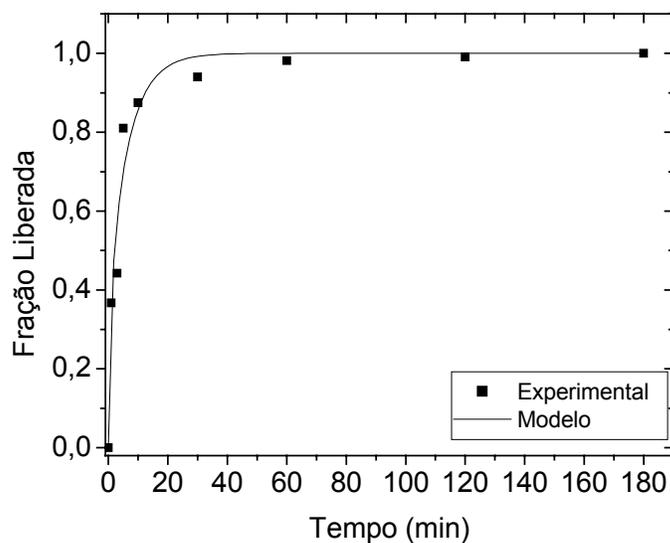
Experimento 3:  $P = 5,57 \text{ min}^{-1}$  (10,00 % de TPP, 4,00 % de Quitosana, 12,50 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



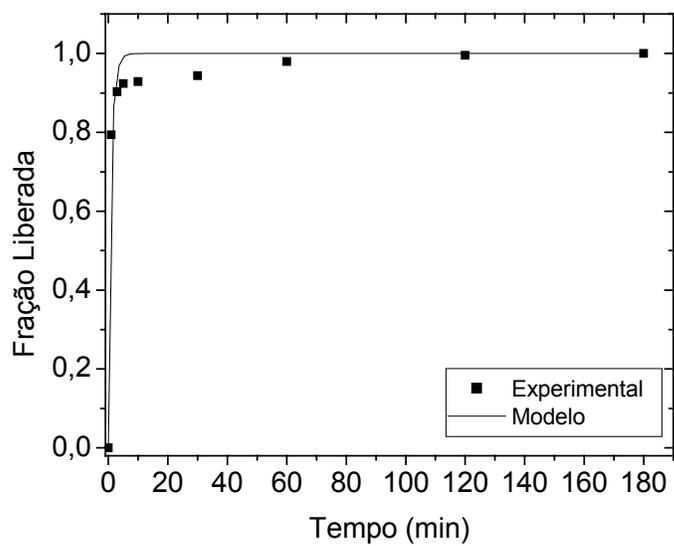
Experimento 4:  $P = 3,91 \text{ min}^{-1}$  (20,00 % de TPP, 4,00 % de Quitosana, 12,50 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



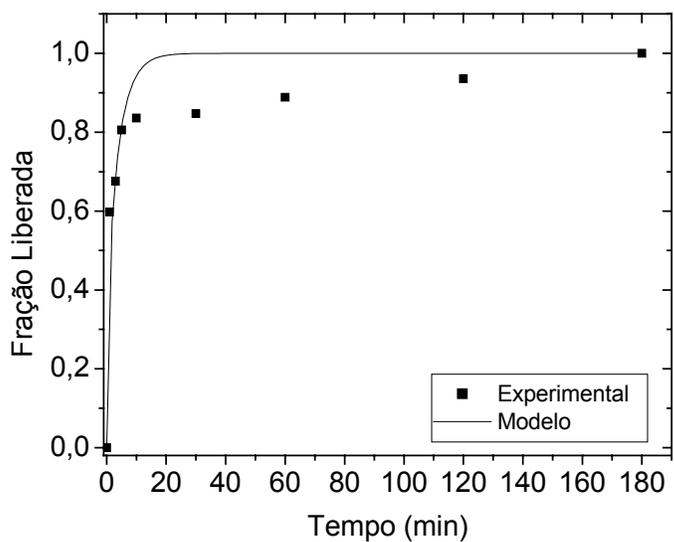
Experimento 5:  $P = 0,40 \text{ min}^{-1}$  (10,00 % de TPP, 2,00 % de Quitosana, 25,00 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



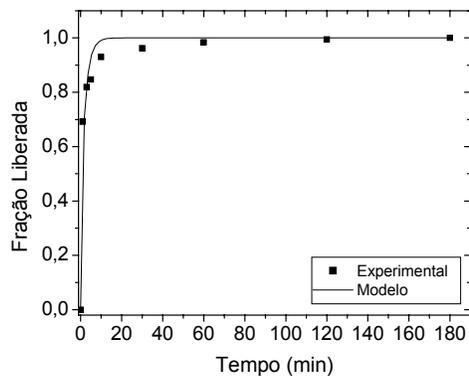
Experimento 6:  $P = 1,48 \text{ min}^{-1}$  (20,00 % de TPP, 2,00 % de Quitosana, 25,00 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



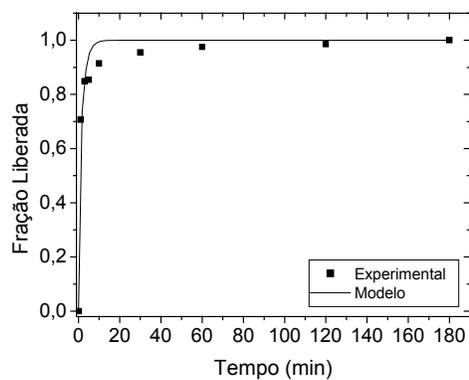
Experimento 7:  $P = 6 \text{ min}^{-1}$  (10,00 % de TPP, 4,00 % de Quitosana, 25,00 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



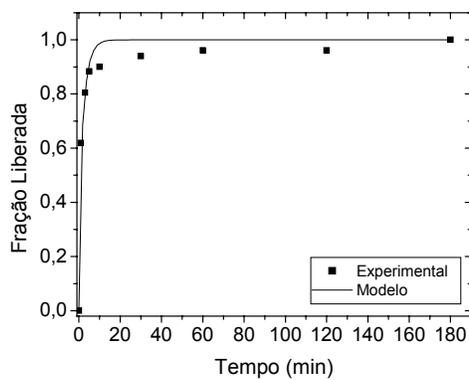
Experimento 8:  $P = 2,40 \text{ min}^{-1}$  (20,00 % de TPP, 4,00 % de Quitosana, 25,00 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



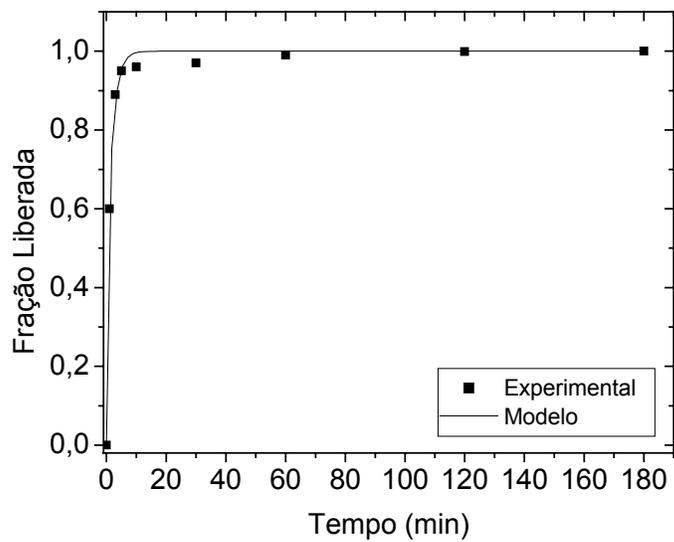
Experimento 9:  $P = 4,30 \text{ min}^{-1}$  (15,00 % de TPP, 3,00 % de Quitosana, 18,75 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



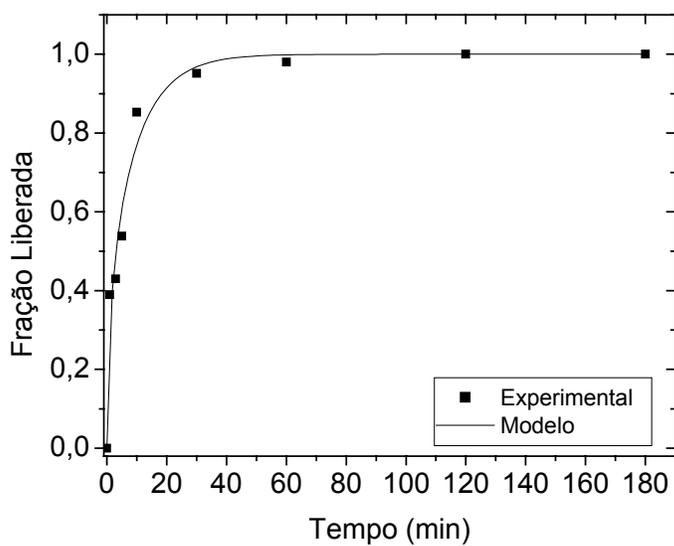
Experimento 10:  $P = 4,83 \text{ min}^{-1}$  (15,00 % de TPP, 3,00 % de Quitosana, 18,75 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



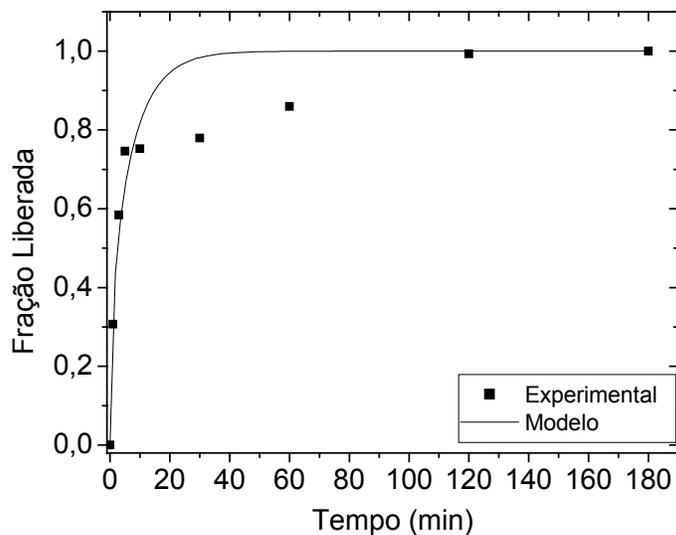
Experimento 11:  $P = 3,89 \text{ min}^{-1}$  (15,00 % de TPP, 3,00 % de Quitosana, 18,75 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



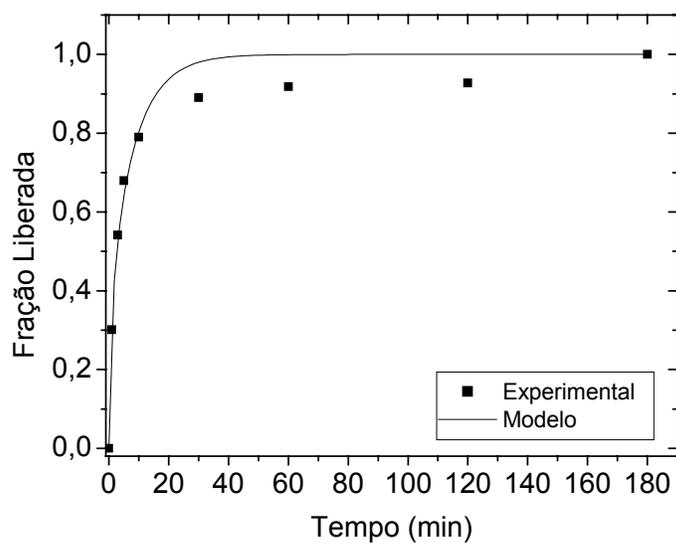
Experimento 12:  $P = 5,00 \text{ min}^{-1}$  (15,00 % de TPP, 3,00 % de Quitosana, 8,29 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



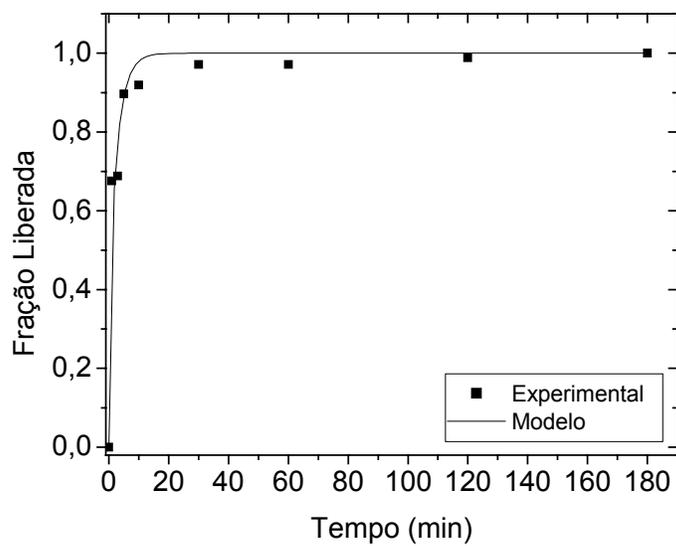
Experimento 13:  $P = 1,00 \text{ min}^{-1}$  (15,00 % de TPP, 3,00 % de Quitosana, 29,20 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



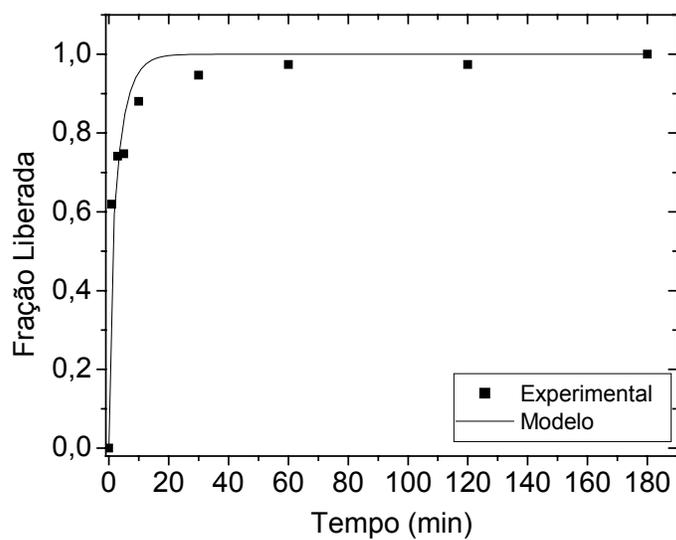
Experimento 14:  $P = 1,22 \text{ min}^{-1}$  (15,00 % de TPP, 1,33% de Quitosana, 18,75 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)



Experimento 15:  $P = 1,15 \text{ min}^{-1}$  (15,00 % de TPP, 4,67% de Quitosana, 18,75 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)

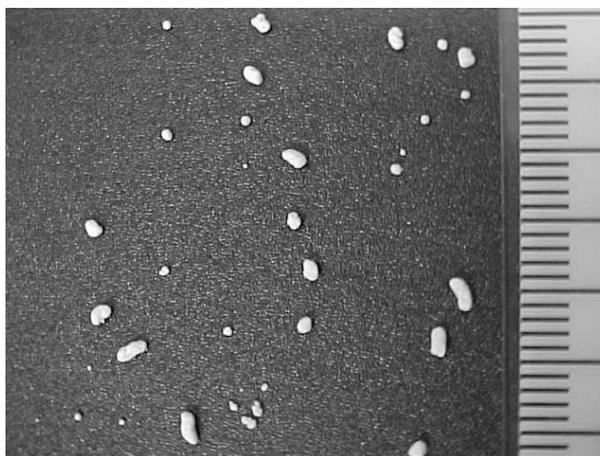


Experimento 16:  $P = 3,44 \text{ min}^{-1}$  (6,63 % de TPP, 3,00 % de Quitosana, 18,75 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)

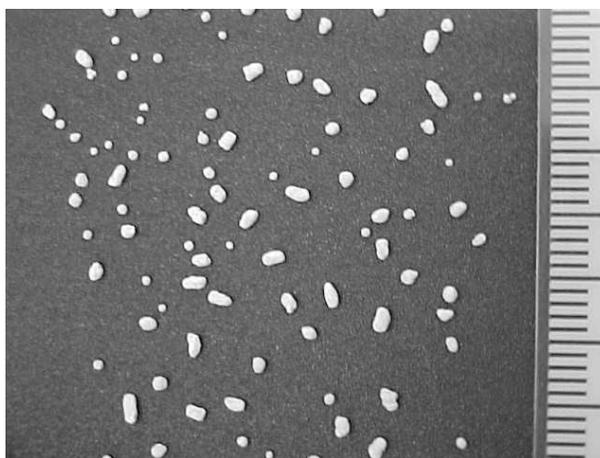


Experimento 17:  $P = 2,62 \text{ min}^{-1}$  (23,36 m% de TPP, 3,00 % de Quitosana, 18,75 mg de ddl/cm<sup>3</sup>)

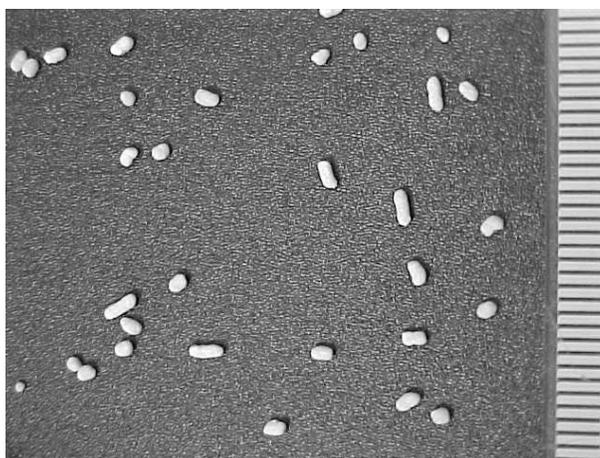
## **ANEXO 2**



(a)



(b)

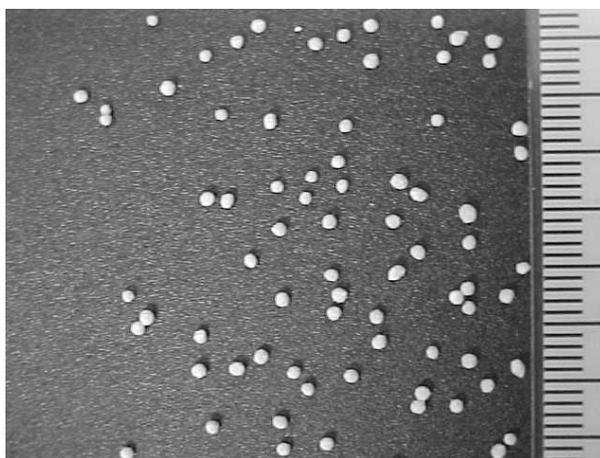


(c)

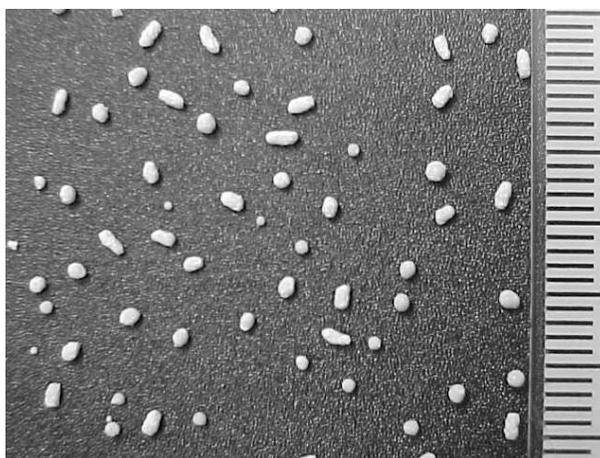
**FIGURA 1.** Fotografias digitais dos grânulos contendo amido pré-gelificado comercial como excipiente: (a) 2,4 %, (b) 4,8 % e (c) 9,1 % de amido.



(a)

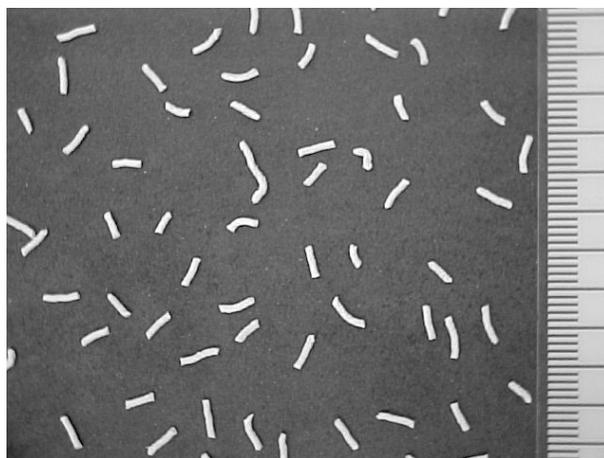


(b)

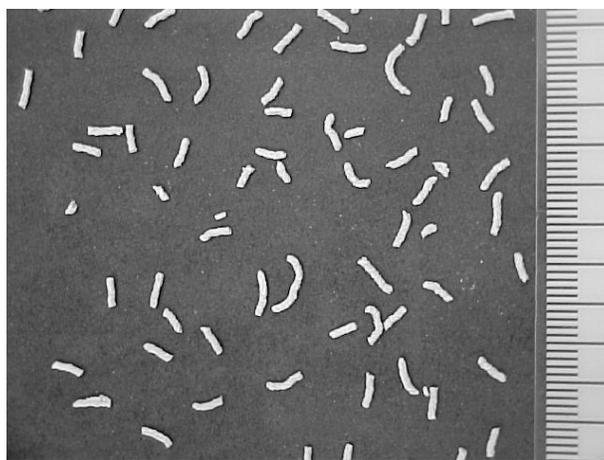


(c)

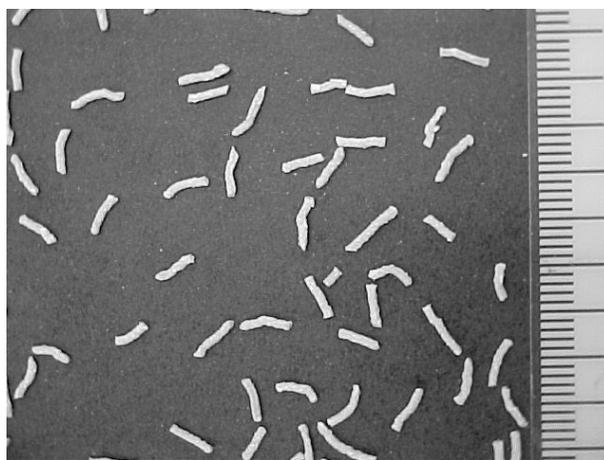
**FIGURA 2.** Fotografias digitais dos grânulos contendo quitosana como excipiente: (a) 2,4 %, (b) 4,8 % e (c) 9,1 % de quitosana.



(a)

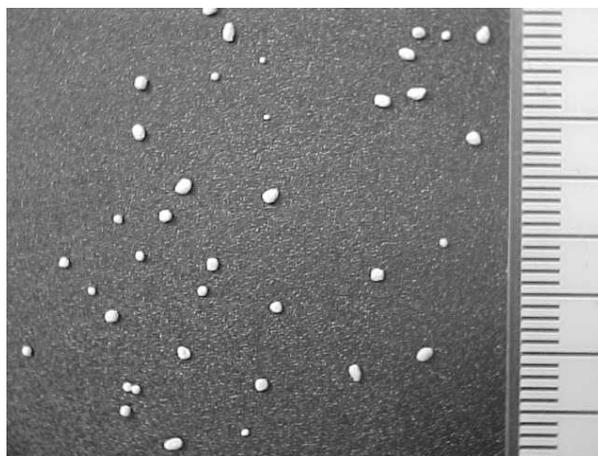


(b)

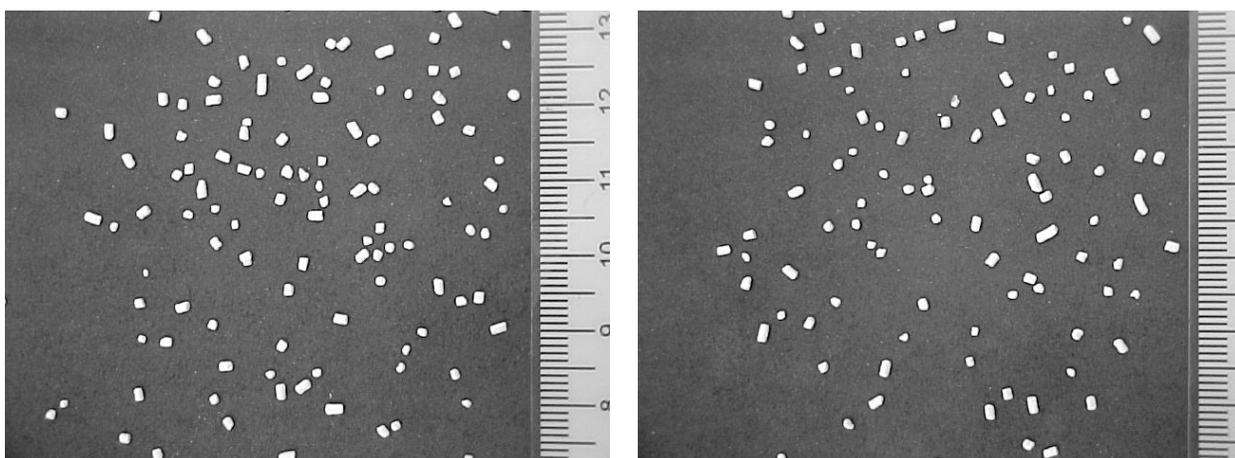


(c)

**FIGURA 3.** Fotografias digitais dos grânulos contendo carboximetilcelulose como excipiente: (a) 2,4 %, (b) 4,8 % e (c) 9,1 % de carboximetilcelulose.



**FIGURA 4.** Fotografias digitais dos grânulos sem excipientes.



**FIGURA 5.** Fotografias digitais dos grânulos de VIDEX EC®.