UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

# "INFLUÊNCIA DO POLI(ETILENO GLICOL) (PEG) NO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DA OXITETRACICLINA NO SISTEMA ALGINATO/QUITOSANA: MODELAMENTO "*IN VITRO*" DA LIBERAÇÃO ORAL"

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Maria Clara Pinto Cruz

Prof. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei
ORIENTADORA

Prof. Dr. Sergio Persio Ravagnani
CO-ORIENTADOR

Campinas – São Paulo
dezembro, 2004.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA
T/UNICAMP
C889i
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 62707
PROC. 16-86-05
C ☐ D ☒
PREÇO 11,00
DATA 11-03-05
Nº CPD ____
Bibid 343173

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

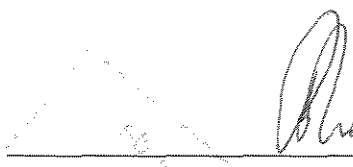
C889i

Cruz, Maria Clara Pinto
Influência do poli(etileno glicol) (PEG) no processo de microencapsulação da oxitetraciclina no sistema alginato/quitosana: modelamento "*in vitro*" da liberação oral / Maria Clara Pinto Cruz.--Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadores: Lucia Helena Innocentini Mei; Sergio Pérsio Ravagnani
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

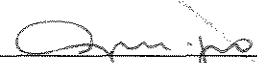
1. Alginatos. 2. Quitosana. 3. Tetraciclina. 4. Microencapsulação. 5. Difusão. I. Mei, Lucia Helena Innocentini. II. Ravagnani, Sergio Pérsio. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Tese de Doutorado defendida e aprovada em 14 de dezembro de 2004 pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:

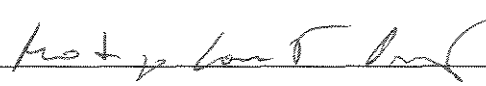


Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei –
Orientadora

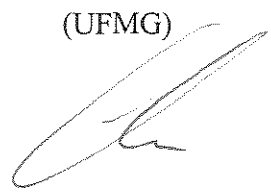
Profa. Dra. Flávia Martellini
(IPEN – São Paulo)



Prof. Dr.Antônio Aprígio da Silva Curvelo
(USP – São Carlos)



Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice
(UFMG)



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
(FEQ – UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

Orientador (a)

PROFª DRª LÚCIA HELENA INNOCENTINI MEI
DTP/FEQ/UNICAMP
Matrícula 15.468-7

Ofereço essa tese ao Deus da minha vida, Senhor e Salvador meu, que nos diz que "... aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam" (Isaias 40:31 NVI). Ele é o motivo do meu existir, toda honra e glória desta darei a Ele.

## Agradecimentos

Nunca pensei em ser doutora, gostava de cuidar de meus irmãos e de ajudar as pessoas. Deus, porém, tinha outros planos, assim, encontrei pessoas no doutorado que tornaram significativos esses quatro anos pelos relacionamentos desenvolvidos. Então, você pode imaginar a minha gratidão!! Começo com à Prof. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei, Lucia Mei, como gosta que a tratemos, eu gostei de trabalhar com você mais do que meras palavras possam expressar. Admiro muito o seu jeito humano de tratar todos os seus orientados e agradeço os conhecimentos transmitidos.

Prof. Dr. Sergio Persio Ravagnani, foram muito proveitosas nossas conversas, a que mais me marcou foi a de ser mais firme com os meus futuros alunos.

O que seria de mim sem minhas duas mães?? D. Rita e Tia Zenilde!! Vocês são as reais vencedoras!!

Meus irmãos de sangue vocês são dez também, pois, sofreram com a minha ausência.

Tiveram papel preponderante no doutorado, os irmãos da Igreja Holiness de Campinas e Presbiteriana Chácara Primavera, pelo apóio, incentivo e amizade.

Ao professor Dr. Dorgival Caetano, pela compreensão, presteza e atenção, no percurso do doutorado.

Não posso esquecer a D. Namico e Sr. Ishida... sou grata a Deus por também me acolherem. Que Deus os abençoe sempre.

Tem a Beraca também, calma!! Não é palavrão, significa bênção em hebraico, república cristã a qual morei, pelos momentos de companheirismo que tive nas pessoas da Aída, Miriam Costa, Miriam Marcatto, Juliana, Carol, Natália, Mariana, Kézia, Débora, Everly, Marcos, Silvana, Regiane, Kelly, Lucimar, Ana Maria e Francheska. Seremos sempre beraquetes e beraquito!!!

A república cristã Caverna de Adulão... a república irmã da Beraca, meus irmãos cavernosos!!! Valeu Juliano!!!!

Tem o Daniel e toda a sua família!!! Marina, Bia e Sr. João... o ministério do Daniel era levar as beraquetes para o culto!! Valeu Dani!!!

Ao Pastor Ronaldo Holdorf e sua esposa Nelma Lange Holdorf, meus pais espirituais desde Aracaju quanto tinha 14 anos. Deus nos fez reencontrar em Campinas e sou grata por seus pés... eles são formosos!!!

Ao Prof. Dr. Sérgio Campana, do Instituto de Química da USP de São Carlos e a sua aluna Márcia pelas valiosas conversas sobre quitosana.

Ao Prof. Dr. Lisandro, do Instituto de Física da UNICAMP e sr. Alfredo pelo modo atencioso com que sempre me atenderam para as análises de raio X.

Ao Fábio América e Angela Costella, amigos que o vento não leva... conviver com vocês na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp sempre será inesquecível para mim.

Aos amigos do Instituto de Química, Flávia e Maria Del Pilar, pela amizade que permaneceu.

O meu grupo de pesquisa, Cris, Gustavo, Rodrigo, Chico, Newton, André, Gabi, Pilar, Jesus... pelos bons momentos compartilhados.

Assessorei dois alunos de Iniciação Científica, o Ennio Balbi Flores e o Cleber Ronqui... foi um período de aprendizado mútuo... mas o anseio do meu coração é que tenham aprendido a serem competentes sem perderem a humildade.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Polímeros (DTP), responsável pela Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Materiais, (ACCTM), pela colaboração e amizade, em especial a Prof. Dra. Leila Peres e o Prof. Dr. José Sinézio.

Aos colegas do DTP, Stela, Harold, Alexandre, Noeli, Elvio, Zaida, Iliana, Marcos, Andréia... assim, como os de outros departamentos, como a Adriana, Erica, João Vicente.

Ao Disney, técnico do Departamento de Tecnologia de Polímeros (DTP), pelo apoio mútuo que nós tivemos um pelo outro, Maria Tereza, secretária do DTP, quase toda manhã ia tomar café dos professores que ela fazia e aproveitava para conversar... Rodolfo, técnico do DTP, nossas conversas sobre diversos assuntos foram marcantes para mim, Adriano, valeu as caronas e a amizade mesmo com nossas diferenças de pensamentos.

Aos professores da Universidade Federal de Sergipe, especialmente os do curso de graduação de Química Industrial.

A todos os funcionários da Unicamp, desde os mais simples, como os da limpeza... eles sempre ouviam o meu "bom dia"... chegava por volta das 7 h e eles já estavam lá... gostava de vê-los. Quero em especial agradecer a Kelly, técnica do Laboratório de Uso Comum da FEQ, que além de todo o acompanhamento científico nas análises de microscopia eletrônica de varredura, foi uma boa companhia quando nada parecia dar certo com os resultados.

À FAPESP pelo apoio financeiro aos projetos do grupo e à bolsa de doutorado.

Todas estas pessoas citadas colaboraram com o andamento da Tese muito mais pelo relacionamento desenvolvido, pelo "caminhar junto". O apoio emocional necessário para dar um passo de cada vez em direção a sua conclusão. Compartilho minha alegria com eles.

# LISTA DE ABREVIATURAS

**Alg**: alginato de sódio

**aq**: aquoso

**D**: coeficiente de difusão

**G**: ácido gulurônico

**GA**: glutaraldeído

**M**: ácido manurônico

**Qui**: quitosana

**OTC**: oxitetraciclina

**PEG**: Poli(etileno glicol)

**PEO**: Poli(óxido de etileno)

**TEC**: trietilcitrato

# SUMÁRIO

RESUMO ..... xxi
ABSTRACT ..... xxiii
I. INTRODUÇÃO ..... 1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 3
2.1. HIDROGÉIS COMO BIOMATERIAIS ..... 3
2.2. POLÍMEROS BIOCOMPATÍVEIS E BIODEGRADÁVEIS ..... 4
2.2.1. *Biopolímeros: alginato e quitosana* ..... 6
2.3 POLIETILENO GLICOL (PEG): ESTRUTURA E PROPRIEDADES ..... 9
2.4 EUDRAGIT®: POLÍMEROS ACRÍLICOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA ..... 11
2.5 O ANTIBIÓTICO OXITETRACICLINA (OTC) ..... 14
2.6 OS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA ..... 15
2.6.1 Dispositivos ..... 15
2.6.2 *Vantagens e limitações* ..... 21
2.7 PRINCIPAIS PARÂMETROS AVALIADOS ..... 23
2.7.1 *Estrutura do polímero* ..... 23
2.7.2 *Intumescimento do hidrogel* ..... 24
2.7.3 *Difusão do fármaco no polímero* ..... 24
2.8 LIBERAÇÃO DE MEDICAMENTOS EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS ..... 24
2.8.1 *Processo de microencapsulação* ..... 25
2.8.1.1 *Utilizando alginato* ..... 26
2.8.1.2 *Utilizando alginato/PEG e alginato/quitosana* ..... 28

2.8.1.3 *Utilizando alginato/quitosana/PEG*..... 31
2.9 MODELAGEM MATEMÁTICA PARA A DIFUSÃO DE OTC ..... 32
III. PARTE EXPERIMENTAL ..... 40
3.1. MATERIAIS USADOS ..... 40
3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS ..... 40
3.2.1 *Determinação da massa molar* ..... 40
*3.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho* (FT-IR) ..... 41
*3.2.3 Espectroscopia* de Ressonância Nuclear Magnética de Próton *(RMN $^{1}H$)* ..... 42
3.2.4 *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)* e Análise Termogravimétrica (TGA) ..... 42
3.2.5 *Espalhamento de Raio X de Alto Ângulo (WAXS)* ..... 43
3.3 PREPARACÃO DAS MICROPARTÍCULAS ..... 43
3.4 INTUMESCIMENTO DAS MICROPARTÍCULAS ..... 45
3.5 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS ..... 45
3.6 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE OTC ..... 45
3.7 MODELAGEM MATEMÁTICA ..... 46
3.8 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA DE OTC ..... 46
3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) ..... 46
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 47
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERAIS ..... 47
4.1.1 *Análise das massas molares médias* ..... 47
4.1.2 *Análise da microestrutura dos biopolímeros por Espectroscopia na Região do Infravermelho* (FT-IR) ..... 51

4.1.3 *Análise da microestrutura dos biopolímeros por Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética de Prótons (RMN $^{1}H$)* ..... 55
4.1.4 *Análise calorimétrica dos biomateriais por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e perda de massa por termogravimétria (TGA)* ..... 61
4.1.5 *Análise da microestrutura dos biopolímeros por Espalhamento de Raio X de Alto Ângulo (WAXS)* ..... 65
4.2 LIBERAÇÃO DE OTC EM pH 1,2 E 7,4 ..... 71
4.3 ANÁLISE MORFOLOGICA DAS MICROPARTÍCULAS ..... 104
V. CONCLUSÕES ..... 132
VI SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ..... 134
VII. REFERÊNCIAS ..... 135



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

# RESUMO

Neste trabalho as análises de difusão de oxitetracilina (OTC) como espécie ativa, foram realizadas a 37 ± 0,5 °C; em soluções tampão pH=7,4 e 1,2, condições estas similar ao trato gastro-intestinal, com microesferas de alginato de cálcio; microcápsulas de alginato de cálcio coacervado com quitosana (baixa, média e alta viscosidade); microcápsulas de alginato de cálcio coacervada com a quitosana baixa viscosidade, e revestidas com o polietileno glicol – PEG (2000, 4600 e 10000); microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com o PEG e, finalmente, microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com EUDRAGIT®. Na primeira parte do trabalho, priorizou-se o estudo da estrutura, sequência e composição das unidades repetitivas dos biopolímeros alginato e quitosana, as quais certamente exercem profunda influência na liberação controlada do fármaco. Na segunda parte, o coeficiente de difusão (*D*) de OTC foi calculado através de equações estabelecidas por Crank, para difusão em esferas, que seguem a segunda lei de Fick. Considerou-se a difusão do interior para o exterior das micropartículas, utilizando o método dos mínimos quadrados e método iterativo de Newton Raphson para ajuste dos dados. Foi verificado que o modelo matemático para a difusão de OTC tem uma representatividade muito boa em meio básico, mesmo com o efeito de disparo de OTC em forma de cristais alojados na superfície das micropartículas, conforme observado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). No entanto, em meio ácido, o ajuste não foi o esperado, pois fatores como a alta solubilidade do fármaco no meio; além da presença de fissuras nas microesferas, devido aos cristais na superfície, contribuíram para que o perfil desviasse do obtido em outros meios, resultando em um comportamento não-Fickiano. Finalmente, observou-se a possibilidade de modulação da velocidade de liberação nos diversos tipos de microesferas.

Palavras chaves: alginato, quitosana, poli(etileno glicol), oxitetraciclina, microesferas

# ABSTRACT

Diffusion studies of oxytetracycline (OTC) entrapped in microbeads of calcium alginate, calcium alginate coacerved with chitosan (high, medium and low viscosity) and calcium alginate coacerved with chitosan low viscosity, covered with Poly(ethylene glycol) - PEG (2 000, 4 600 and 10 000) and alginate covered with EUDRAGIT®, were carried out at 37 ± 0.5 °C, in buffer solutions at pH 7.4 and pH 1.2, similar to the conditions of the gastric-intestinal system. The diffusion coefficient, or diffusivity (D), of OTC was calculated by equations provided by Crank for diffusion, which follows Fick's second law, considering the diffusion from the inner parts to the surface of the microbeads. The least square and the Newton Raphson methods were used to obtain the diffusion coefficients. The microbeads swelling in pH 7.4 and OTC diffusion is classically Fickian, suggesting that the OTC transport, in this case, is controlled by the exchange rates of free water and relaxation of calcium-alginate chains. In case of acid media, it was observed that the phenomenon did not follow Fick's law, due probably to the high solubility of the OTC in this environment and the presence of cracks formed during the drying process of the microbeads. It was possible to model the release rate of OTC in several types of microbeads.

Key Words: alginate, chitosan, poly(ethylene glycol), oxytetracycline, microbeads

# INFLUÊNCIA DO POLIETILENO GLICOL (PEG) NO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DA OXITETRACICLINA NO SISTEMA ALGINATO/QUITOSANA: MODELAMENTO "*IN VITRO*" DA LIBERAÇÃO ORAL

## I. INTRODUÇÃO

Muitos tipos de materiais naturais e sintéticos têm sido investigados e utilizados na área médica, a fim de se obter um material que possa apresentar uma boa resistência mecânica, quando necessária, e que seja biocompatível com o organismo humano. Desta forma, ele pode substituir órgãos, ossos, veias, artérias, tecidos moles como cartilagens, dispositivos para o sistema de liberação controlada, entre outros. Nestas condições eles se denominam biomateriais [1- 6].

Durante a década de 80, a tecnologia de sistemas de liberação controlada começou a se expandir, e tem sido foco de pesquisas em decorrência de sua amplitude de aplicação. Esta tecnologia, quando aplicada à liberação de fármacos no organismo por um determinado tempo, consiste, basicamente, na liberação do princípio ativo contido em um suporte polimérico, sob condições farmaceuticamente ideais. Assim, a liberação ocorre somente, quando e onde ela é necessária, e na concentração apropriada para o efeito terapêutico desejado [7-10].

Desta forma, esta é uma tecnologia promissora que pretende substituir algumas das técnicas convencionais de administração de medicamentos hoje aplicadas (comprimidos, injetáveis, pulverizações), pois muitos métodos utilizados requerem freqüência e repetição nas doses [11]. Assim, a opção por esta técnica tem levado a medicamentos que melhoram a saúde humana, trazendo vantagens para pacientes idosos e doentes crônicos, principalmente pessoas que devem tomar muitos remédios por dia e são portadores de outras doenças associadas. Atualmente existem no Brasil cerca de 30 produtos comercializados sob a forma de liberação controlada.

Existe uma tendência atual em se adotar a administração de medicamentos segundo as técnicas de Liberação Controlada (Drug Delivery System), tanto por via oral (microesfera resistente ao ambiente estomacal); por inalação; pela pele (tal como os adesivos de nicotina) ou, ainda, por injeções sem agulha utilizando tecnologia semelhante às impressoras jato-de-tinta [11].

O que conduz as pesquisas na área é a obtenção de sistemas de liberação controlada cada vez mais seguros e confiáveis, a fim de se manter a concentração apropriada do medicamento no organismo de um paciente, dentro de uma faixa determinada de concentração e por um determinado tempo, sem risco de toxicidade [12]. Desta forma, os testes *"in vitru"* devem ser reprodutíveis e permitir medidas com elevada precisão para posterior correlação *"in vivo"*, assegurando, assim, um avanço no conhecimento em biomateriais e, principalmente, o progresso do objetivo alvo das pesquisas – o ser humano.

Esta pesquisa tem como **objetivo** estudar a cinética de liberação controlada de OTC em microesferas de alginato de cálcio; alginato de cálcio incorporado com o PEG, com ou sem reticulação com o glutaraldeído; alginato de cálcio coacervado com a quitosana; alginato de cálcio coacervado com a quitosana e revestido com o PEG utilizando o glutaraldeído; e alginato de cálcio revestido com o EUDRAGIT®, elucidando o modelo matemático que descreve o comportamento difusional de OTC, e correlacionando os valores do coeficiente de difusão global com a morfologia das microesferas.

# II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 HIDROGÉIS COMO BIOMATERIAIS

Os hidrogéis compreendem um grupo de materiais poliméricos reticulados por ligações iônicas, ou covalentes, que intumescem a um considerável grau em meio aquoso. Normalmente o termo hidrogel é utilizado para designar um polímero, sintético ou biopolímero, e macio, com consistência elastômérica e que intumesce em água sem se dissolver [13, 14]. Assim, quando as moléculas de água migram para os volumes livres existentes entre as cadeias do polímero reticulado, elas induzem o sistema ao intumescimento , caracterizado por um volume de equilíbrio. Por isso, e aliado a outros fatores, os hidrogéis tem atraído considerável interesse como biomateriais.

O princípio químico marcante da maioria dos hidrogéis utilizados como biomateriais é seu caráter hidrofílico, atribuído à presença em sua estrutura de grupos que induzem sua intumescência em água, tais como –OH, -COOH, -$CONH_2$, -$SO_3H$, dentre outros. Desta forma, podem reter uma significante fração de água em seu interior, provocado por interações fortes entre estes grupos funcionais no polímero e as moléculas de água; tais como pontes de hidrogênio, que são na grande maioria responsáveis pelo intumescimento dos hidrogéis [13].

Tendo em vista que antes do intumescimento as cadeias estão em posição de equilíbrio, é natural que elas ofereçam uma certa resistência às mudanças impostas. Desse modo, o intumescimento pode ser descrito por um estiramento das cadeias, onde a pressão osmótica no sistema, que provoca penetração da água na massa do polímero, será contrabalanceada pela pressão contrária das cadeias poliméricas que tentam resistir à expansão; neste ponto, o intumescimento é alcançado [15].

Além disto, a insolubilidade e estabilidade destes materiais são devidas à presença de uma rede tridimensional gerada por ligações cruzadas, também

responsáveis por suas propriedades no estado intumescido. No caso de sistema de liberação controlada, o transporte de medicamento dentro do meio polimérico, e sua migração para o meio aquoso, implica normalmente em um processo de absorção de água e outro simultâneo de dessorção do medicamento, por mecanismo de difusão controlada pelo intumescimento do polímero, que pode estar reticulado ou não [16].

Qualquer polímero solúvel em água que adquira insolubilidade por ligações cruzadas, ou incorporação de um copolímero em bloco, onde um dos componentes possa apresentar uma unidade hidrofóbica, poderá ser usado como um hidrogel para a difusão controlada. Provavelmente, o mais conhecido e mais largamente usado é o colágeno reticulado, utilizado em indústria farmacêutica, e como base de filmes fotográficos. No entanto, as pesquisas na área foram se desenvolvendo em direção à utilização de polímeros sintéticos, devido a fácil preparação e baixo custo destes, como os metacrilatos de hidroxietila; acrilamidas e seus N-açucares derivados substituídos; N-vinilpirolidona e poli(óxido de etileno) [17].

Normalmente, as características de liberação de medicamentos são pouco influenciadas pela natureza química do polímero, a não ser que exista alguma afinidade entre a matriz e o fármaco; portanto, a grande influencia reside em controlar os seus parâmetros físicos. Por exemplo, conteúdo de água, grau de ligações cruzadas, cristalinidade e morfologia (presença de duas ou mais fases) [17].

## 2.2 POLÍMEROS BIOCOMPATÍVEIS E BIODEGRADÁVEIS

A biocompatibilidade dos hidrogéis é devida à alta quantidade de água, que eles são capazes de absorver, e às propriedades de sua superfície, simulando um tecido natural. Quando se descreve as interações entre a superfície do biomaterial e o organismo humano, está-se tentando definir o termo biocompatibilidade [18,19]. Este termo é freqüentemente usado como sinônimo de não-toxicidade e

basicamente está dividido em dois grupos; compatibilidade mecânica (ou "bulk") e compatibilidade interfacial (ou biológica) [20].

A rejeição é a resposta natural de um sistema biológico, diante da presença de um corpo estranho. Ela pode ocorrer por uma série de reações celulares, que dependem das propriedades microscópicas e macroscópicas do corpo estranho (tamanho, formato, natureza da superfície, etc). No caso de um biomaterial polimérico, tanto a superfície quanto toda a massa podem ser alteradas, como um resultado de hidrólise e/ou deteriorização proveniente de uma reação imunológica ou enzimática [20-22].

É importante, em alguns casos, que os biomateriais se apresentem biodegradáveis, bioabsorvíveis ou bioerosíveis; sendo esses termos freqüentemente interrelacionados entre si. O termo bioabsorvível tem sido associado à suturas cirúrgicas provenientes de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, que gradualmente se dissolvem no organismo. Os polímeros bioerosíveis tem sido relacionados à materiais que se deterioram por baixa dissolução, devido à hidrólise de grupos laterais ou ionização; enquanto a cadeia principal do polímero permanece sem se degradar. Freqüentemente a erosão ocorre como um fenômeno de superfície. No entanto, o termo biodegradável é o mais geral, sendo aplicado para muitos materiais diferentes como surfactantes, inseticidas e componentes sintéticos em geral [17,21].

Normalmente a biodegradação ocorre por uma reação de hidrólise devido ao ambiente do organismo humano ser um meio preferencialmente aquoso. Em alguns casos, enzimas aceleram consideravelmente a reação de degradação e, provavelmente a mais importante consideração com implantes biodegradáveis é que os produtos da degradação sejam atóxicos e efetivamente eliminados pelo organismo, não requerendo cirurgia para remoção [17].

### 2.2.1 BIOPOLÍMEROS: ALGINATO E QUITOSANA

A quitosana e alginato são polímeros de ocorrência natural, com ausência de toxicidadade e de fácil degradação hidrolítica e enzimática, gerando produtos atóxicos. O primeiro deles pode ser obtido a partir da hidrólise alcalina de parte dos grupos acetamida da quitina, um biopolímero de ocorrrência em cascas de crustáceos como caranguejos e lagostas. Uma maneira simples de distinguir quitina e quitosana é através da solubilidade, pois quitosana é solúvel em solução de ácido diluído, mas a quitina é insolúvel. Por sua vez, os alginatos são produzidos a partir da polimerização da algina, um polissacarídeo obtido a partir de algas marinhas marrons, especialmente a espécie *Macrocystis Pyrifera*, encontrada ao longo da costa da América do Norte e do Sul, Nova Zelândia, Austrália e África. Eles fazem parte da família dos polissacarídeos, conhecidos pela sua alta viscosidade e capacidade de gelificação. O uso destes materiais como aditivos em processos industriais de papel; plantas; alimentos, e para indústria farmacêutica é, hoje em dia, muito amplo [23-25].

Na Figura 2.1 estão apresentadas as estruturas do alginato. Conforme se observa, o alginato é um copolímero linear de ácido β-D-manurônico (M) e ácido α-L-gulurônico (G), ligações 1,4 α- e 1,4 β - glicosídicas, com proporções variáveis e arranjos seqüenciais de M e G ao longo da cadeia (MM, GG ou MG).

A conformação de D-manuronato está no $^4C_1$, enquanto L-guloronato está na conformação $^1C_4$ , independentemente de sua unidade ao redor. A composição molecular específica de uma amostra de alginato depende da alga de onde o mesmo é extraído, podendo ocorrer variações nas porcentagens de ácido manurônico (M) e gulurônico (G ) [26].

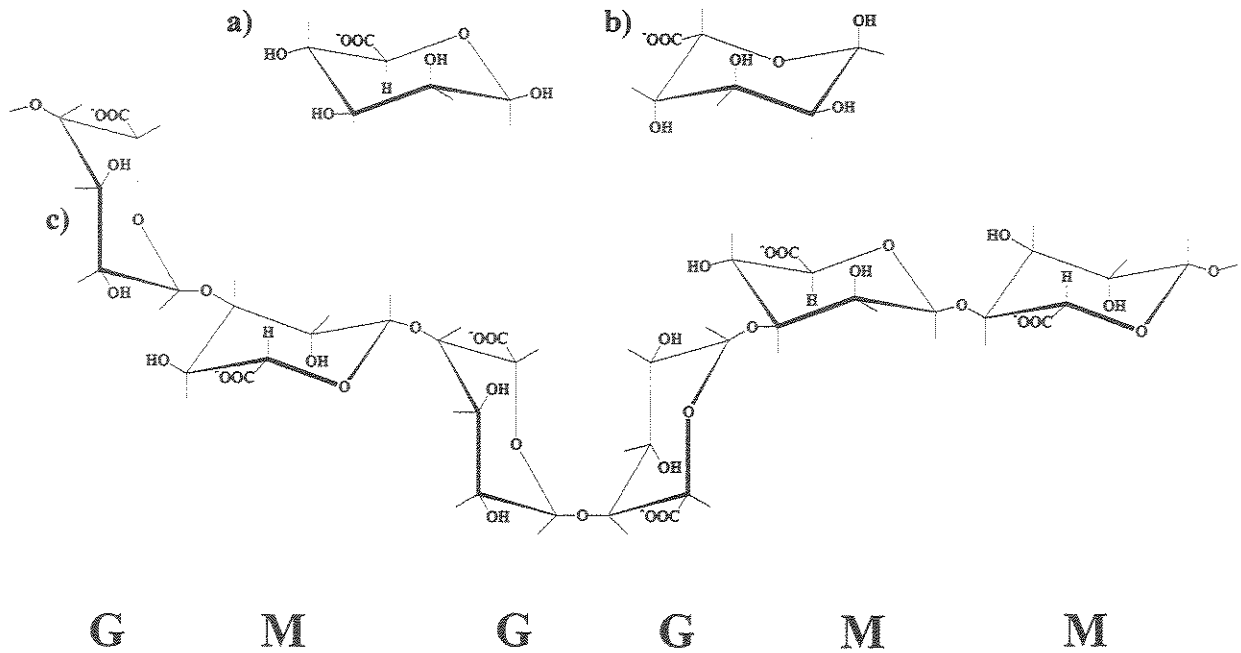



**Figura 2.1** Estruturas do alginato: a) β-D-manurônico (M), b) α-L-gulurônico (G) e c) estrutura em bloco das unidades constituídas do alginato

Além disso, existem diferenças estruturais entre os tipos de bloco. Os blocos M estão na forma de uma fita flexível, enquanto os blocos G formam cadeias rígidas e, por fim, os blocos MG apresentam rigidez intermediária e são solúveis a pH mais baixo que os outros tipos de blocos.

Dois blocos G podem ser ligados por cátions divalentes ($Ca^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Sr^{2+}$, etc..), conduzindo a formação de gel. A gelificação do alginato é baseada, portanto, em sua afinidade por certos íons e a habilidade de ligar-se a estes íons seletivamente e cooperativamente. O íon ligante é seletivo ao conteúdo guluronato e, se o contéudo for alto, apresenta maior resistência mecânica devido ao comprimento dos blocos G [27- 29].

Diferente do alginato de sódio, que é muito solúvel em água, o alginato de cálcio é insolúvel. O processo de troca iônica no alginato de sódio é de fundamental importância para a aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica pois, a

interação entre cátions divalentes e os blocos G das suas moléculas forma uma estrutura de rede na forma de gel. A determinação do conteúdo de sódio e cálcio em alginato é de fundamental importância para quantificar o processo de troca de íon [30].

Semelhantemente ao alginato, a quitosana também é um copolímero linear. Contém unidades acetiladas (2-acetoamido-2-deoxi-D-glicopiranose) e desacetiladas (2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose) unidas por ligações glicosídicas β(1→4), com predominância das unidades desacetiladas (ver Figura 2.2). No entanto, é um polieletrólito de carga positiva quando dissolvido em meio aquoso moderadamente ácido como, por exemplo em soluções diluídas de ácido acético e ácido clorídrico, porém são insolúveis em meios neutros e alcalinos [31].

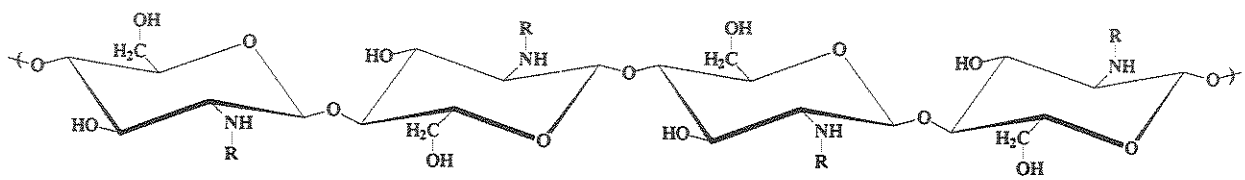


**Figura 2.2** Estrutura primária de quitosana, na qual R corresponde ao grupo acetil ou átomo de hidrogênio.

A quitosana pode sofrer diversas modificações químicas, tanto nos grupos amino como nos grupos hidroxila, quando utilizados os reagentes apropriados, podendo resultar, por exemplo, em derivados O- ou N-carboximetilados, derivados entrecruzados, etc. [32]

As suas propriedades em solução devem ser provavelmente governadas pelo grau de N-acetilação; pela distribuição dos grupos acetil; pelo pH e pela força iônica. Por exemplo, a quitosana se dissolve em pH ácido, onde os grupos $NH_2$ da cadeia polimérica são protonados, tornando-se um polieletrólito. A mútua repulsão entre as cadeias determina a dissolução do polímero. A seguinte reação de equilíbrio descreve o estado de ionização segundo a equação química 2.1 [33]:

$$Quit\text{-}NH_2 + H_3O^+_{(aq.)} \rightarrow Quit\text{-}NH_3^+_{(aq.)} + H_2O \quad (2.1)$$

Ácido acético é comumente usado para solubilizar quitosana na concentração de 0,1 M ou 1%, podendo também a mesma ser solubilizada na presença de um ácido forte, como o HCl [33].

As matrizes de quitosana apresentam habilidade em formarem gel a baixo pH, onde possuem atividades antiulcera e antiácido; porém, a pH 6.8 tendem a se desintegrar. Estas características capacitam as matrizes de quitosana a serem um biomaterial com potencialidade elevada em liberação, controlada em ambientes gastro-intestinais [25,34-36].

Portanto, os hidrogéis de quitosana apresentam várias aplicações, particularmente no campo de farmácia ou biomateriais, pelas propriedades anteriormente citadas. Os géis de quitosana podem, ainda, ser reticulados quimicamente utilizando-se diferentes técnicas de reticulação. A influência de diferentes parâmetros, como: o tipo e a concentração do agente reticulante; o co-solvente; a concentração e a massa molar da quitosana; o grau de desacetilação, o pH e a temperatura, no processo de geleificação, tem sido extensivamente estudada sob várias condições [34-39].

## 2.3 POLIETILENO GLICOL (PEG): ESTRUTURA E PROPRIEDADES

O polietileno glicol (PEG) $HO\text{-}(CH_2CH_2\text{-}O)_n\text{-}H$ é um poliéter produzido pela polimerização do óxido de etileno e que apresenta baixa massa molar; enquanto que, os de elevadas massas molares são conhecidos como Poli(óxido de etileno) (PEO). Ambos diferem em suas propriedades, de forma que se justifica a separação em duas categorias. Os polímeros de baixas massas molares são fluidos viscosos ou sólidos cerosos; enquanto os de elevada massa molar são termoplásticos

cristalinos moldáveis. Os polímeros, segundo POWELL [40], com n superior a 2.200 ($M_n \cong 100.000$ g/mol) são denominados PEO.

As diferenças nas propriedades são devidas, principalmente, a importância significativa das hidroxilas terminais no PEG, e ao tamanho da cadeia polimérica no PEO.O PEG apresenta-se como um polímero solúvel em água e solventes orgânicos; possui capacidade lubrificante; baixa toxidez; estabilidade; pequena volatilidade; podendo complexar com metais; ser facilmente modificado quimicamente, e apresentar compatibilidade biológica. A mais interessante entre todas as propriedades do PEG é certamente a sua elevada solubilidade em água e muitas das suas aplicações estão associadas com esta propriedade [40].

Tanto o PEG quanto o PEO apresentam-se à temperatura ambiente completamente solúveis em água, em todas as proporções, porque possuem dois sítios diferentes de hidratação: as hidroxilas terminais e os oxigênios dos meros. Normalmente, a dissolução do PEG em água é acompanhada de liberação de energia. As soluções aquosas do polímero de elevada massa molar possuem um caráter elástico em concentrações menores que 1%; tais soluções são classificadas como pseudoplásticas. Para concentrações do polímero em torno de 20% as soluções formam géis reversíveis. Soluções ainda mais concentradas do polímero formam materiais plásticos, onde a água atua como plastificante [40].

Apesar de serem substâncias estáveis, apresentam-se higroscópicos, num grau comparável ao do glicerol. A higroscopicidade aumenta com a diminuição da massa molar do polímero, e isto se deve principalmente ao aumento relativo do número de hidroxilas terminais. Devido a isto, tem ocorrido uma expansão em seu uso em aplicações químicas, biomédicas e industriais, principalmente aliado ao seu baixo custo. Sabe-se que adesão de células do sangue em biomateriais é um fenômeno de superfície, sendo controlado pelas proteínas adsorvidas que podem gerar uma incompatibilidade interfacial. O PEG pode impedir essa adesão devido à sua habilidade não adesiva; entretanto, sozinho não possui as propriedades estruturais necessárias para a construção de artérias, catéteres e circuitos

extracorpóreos. Por isso, tem sido incorporado sobre a superfície dos biomateriais por enxertia; por simples tratamento da superfície, baseado em adsorção primária ou dessorção secundária; incorporação por ligações cruzadas ou copolimerização em bloco. Isto justifica o seu uso em baixa concentração para revestir microcápsulas, pois melhora a sua biocompatibilidade e estabilidade. Este tipo de revestimento tem melhorado a biocompatibilidade em termos de deposição celular [41-44].

## 2.4 EUDRAGIT®: POLÍMEROS ACRÍLICOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA [45]

A linha de polímeros EUDRAGIT® utilizada para dosagem dérmica e oral de princípios ativos compreende dois graus básicos:

- *Polimetilacrilato solúvel em fluído gástrico, por formação de sal.* Estes níveis graduados de EUDRAGIT® apresentam grupos ácidos ou básicos. Eles permitem liberação pH dependente do ativo. Podendo, ainda, atuam em liberação para formulações gastro-resistentes, com liberação do princípio dirigida para a região intestinal.

- *Polimetilacrilato insolúvel em fluído digestivo.* Estes EUDRAGIT® permitem liberação dependente do tempo, com desenvolvimento de formulações de liberação sustentada. Eles são insolúveis em água, e formam filmes que intumescem baseados em ésteres metacrílicos ou em uma pequena porção de cloreto de trimetilaminoetil metacrilato. As formulações com estes polímeros EUDRAGIT® liberam o fármaco, independente do pH. Alguns grupos de amônia quaternária estão contidos no copolímero, diminuindo a permeabilidade do revestimento e oferecendo propriedades de liberação mais sustentada.

Na Figura 2.3 estão apresentados diferentes polimetacrilatos de uso farmacêuticos, sob o ponto de vista químico, em termos de estrutura; e na Tabela 2.1 estão resumidos as aplicações para os EUDRAGIT® L, S e RS.

Copolímero de ácido metacrílico

**EUDRAGIT® L 100 /S 100/ L 100-55**

**EUDRAGIT® L 30 D – 55**

R = COOH

GASTRORESISTENTE

ENTÉRICO

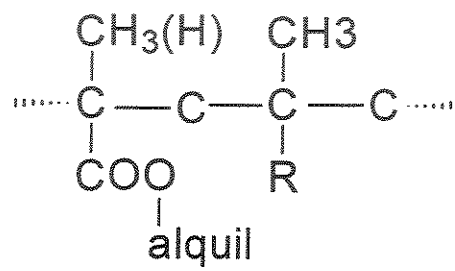
Copolímero aminoalquil metacrilato

**EUDRAGIT® E 100**

**EUDRAGIT® E PO**

R = $-CO-O-CH_2-CH_2N(CH_3)_2$

GASTROSOLÚVEL




Copolímero de ester metacrílico

**EUDRAGIT® NE 30 D**

**PLASTOID B**

R = $CO-OCH_3$ ou $CO-OC_4H_9$

Insolúvel, permeável

pH independente

copolímeros de aminoalquil metacrilato

**EUDRAGIT® RL 100 / RL 30 D / PL PO**

**EUDRAGIT® RS 100 / RS 30 D / RS PO**

**EUDRAGIT® RD 100**

R = $CO-OCH_2-CH_2N^+(CH_3)_3Cl^-$

Insolúvel, permeável

ou pH independente

**Figura 2.3** Polimetacrilatos farmacêuticos

## Tabela 2.1 – Aplicações farmacêuticas dos EUDRAGIT® L, S e RS

| Tipo | Aplicações | Propriedades de dissolução | Funcionalidade | Grau | Disponibilidade | Conteúdo polimérico |
|---|---|---|---|---|---|---|
| EUDRAGIT® L | Liberação do fármaco no duodeno | Solúvel em fluido intestinal acima de pH 5.5 | Polímero aniônico baseado em ácido metacrílico e metacrilatos com COOH | EUDRAGIT® L 100- 55 | Pó | Revestimento entérico efetivo e estável |
| | | | | EUDRAGIT® L 30 D – 55 | Dispersão Aquosa | |
| | Liberação do fármaco no jejuno | Solúvel em fluido intestinal acima de pH 6 | Polímeros aniônicos baseados em ácido metacrílicos e metacrilatos COOH | EUDRAGIT® L 12,5 | Solução orgânica em álcool isopropílico | Granulações de fármaco em forma de pó<br><br>Liberação específica do fármaco no intestino por combinação com EUDRAGIT ®® tipo S |
| | | | | EUDRAGIT® L 100 | Pó | |
| EUDRAGIT® S | Liberação do fármaco no ileo | Solúvel em fluido intestinal acima de pH 7 | Polímeros aniônicos baseados em ácido metacrílicos e metacrilatos COOH | EUDRAGIT® S 12,5 | Solução orgânica em álcool isopropílico | Granulações de fármaco em forma de pó<br><br>Liberação específica do fármaco no intestino por combinação com EUDRAGIT ®® tipo L |
| | | | | EUDRAGIT® S 100 | Pó | |
| EUDRAGIT® RS | Formulações de liberação sustentada | Insolúvel<br><br>Baixa permeabilidade | Copolímeros catiônicos de acrilato e metacrilato com grupos de amônio quaternário | EUDRAGIT® RS 12,5 | Solução orgânica em álcool isopropílico | Aplicável para revestimento de partícula e estrutura de matriz |
| | | | | EUDRAGIT® RS 100 | Grânulos | |
| | | | | EUDRAGIT® RS PO | Pó | |
| | | | | EUDRAGIT® RS 30 D | Dispersão aquosa | |

Para formação de filme gastroresistente sobre as microesferas são empregados polímeros gastroresistêntes que apresentam grupos funcionais com natureza aniônica, que em pH ácido do estômago os torna insolúveis (ex: acetoftalato de celulose, copolímero do ácido metacrílico/metacrilato de metila). Com a mudança do pH para valores superiores a 5,5, estes grupos ficam ionizados e tornam-se solúveis no meio, promovendo a liberação dos fármacos [46]. Assim agem alguns EUDRAGIT® contidos na Tabela 2.1.

## 2.5. O ANTIBIÓTICO OXITETRACICLINA

Os antibióticos são agentes antimicrobianos empregados no tratamento de infecções. Normalmente, a escolha de um antibiótico específico, no tratamento de uma infecção qualquer, dependerá do micro-organismo causador da infecção e sua sensibilidade; como também da gravidade da enfermidade; da ação tóxica do mesmo; dos antecedentes de alergia do paciente e do custo. Podem ser administrados por via oral (cápsulas), tópica (colírio, gotas, etc...) e injetável (intramuscular, intravenosa). Após administrados, podem atuar por ação bactericida, matando os microorganismos existentes ou interferindo com a habilidade do microorganismo em produzir certas proteínas vitais, assim inibindo a multiplicação dos mesmos [47].

Uma das famílias de antibióticos comuns é a das tetraciclinas, em que a oxitetraciclina faz parte, e cuja ação é bacteriostática, com amplo espectro de atividade. Por isso, podem ser prescritos nas infecções por bactérias relativamente raras com Rickettsias, Clamidias, Brucelosis, dentre outras, e no trato de infecções respiratórias e urinárias. No entanto, podem produzir moléstias no estômago; outras infecções; manchas nos dentes e crescimento anormal de fetos em mulheres gestantes [47].

Além disto, as tetraciclinas formam um grupo de antibióticos que apresenta em sua estrutura básica quatro anéis carbocíclicos comuns, diferindo um do outro quimicamente somente por variação nos substituintes. Na Figura 2.4 estão apresentados os nomes genéricos e químicos dos mesmos, assim como suas respectivas estruturas. Como podemos observar, a estrutura básica apresenta dois grupos cromóforos, anel A e anéis BCD que absorvem no ultravioleta, separados por uma hidroxila na posição doze. A modificação

destes grupos cromóforos por ruptura de um dos anéis; aromatização do anel C ou A; extensão do cromóforo ou bloqueio de um cromóforo, destrói a atividade das tetraciclinas [48,49].

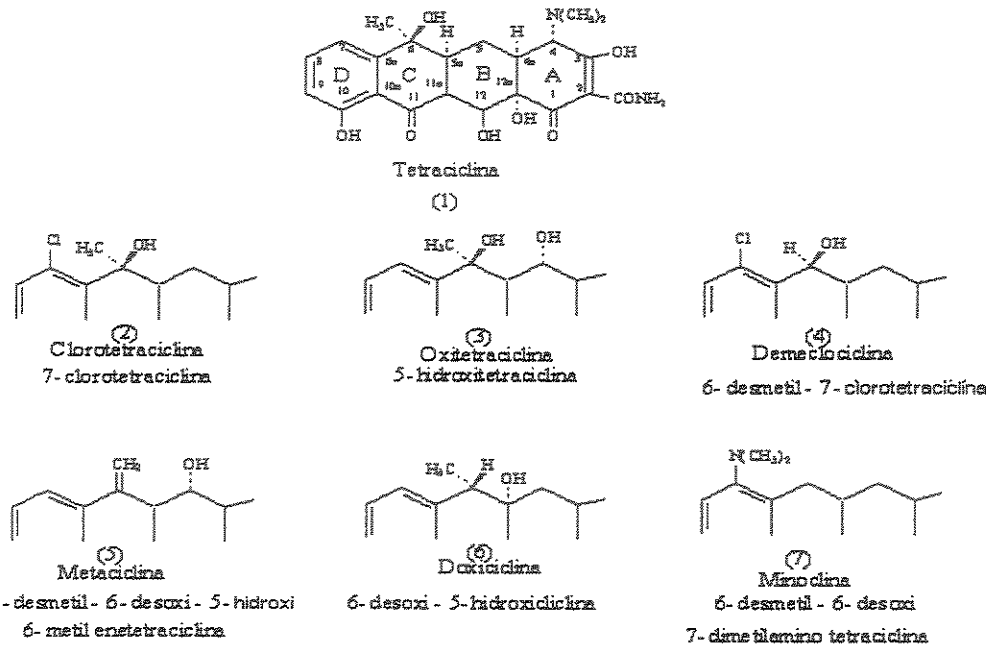



**Figura 2.4** Principais derivados das tetraciclinas [48, 49].

É conhecido também que existe alta incidência de efeito de ordem gastrointestinal associado com o uso da oxitetraciclina oral, incluindo náuseas e dispepsia, particularmente quando tomado com o estomago vazio. Por estas razões, as tetraciclinas tem sido administradas tradicionalmente para um conjunto de animais e aves domésticos em alimentos, na água de beber ou por injeção intramuscular, duas ou três vezes ao dia. No entanto, este modo de administração é freqüentemente não econômico.

## 2.6 OS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA *[12]*

### *2.6.1 Dispositivos [12]*

Vários polímeros já foram testados em sistemas de liberação controlada. Muitos, em função de suas propriedades físicas, tais como: Poli(uretanos) por sua elasticidade; poli(siloxanos) ou silicones, por serem bons isolantes; poli(metil metacrilato), por sua força física e poli(vinil álcool), por sua hidrofobicidade e força. Estes polímeros podem liberar o fármaco por:

- Difusão, em um suporte polimérico não degradável;
- liberação controlada, à medida que o sistema polimérico degrada;

- liberação controlada por osmose;
- liberação por troca iônica
- liberação pró-droga.

A descrição esquemática destes dispositivos está apresentada na Figura 2.5 e os mecanismos que podem acioná-los encontram-se na Tabela 2.2. Qualquer um destes sistemas terapêuticos pode ter mais de um mecanismo influenciando; no entanto, para cada sistema existe um predominante e, normalmente, os polímeros determinam o controle da difusão.

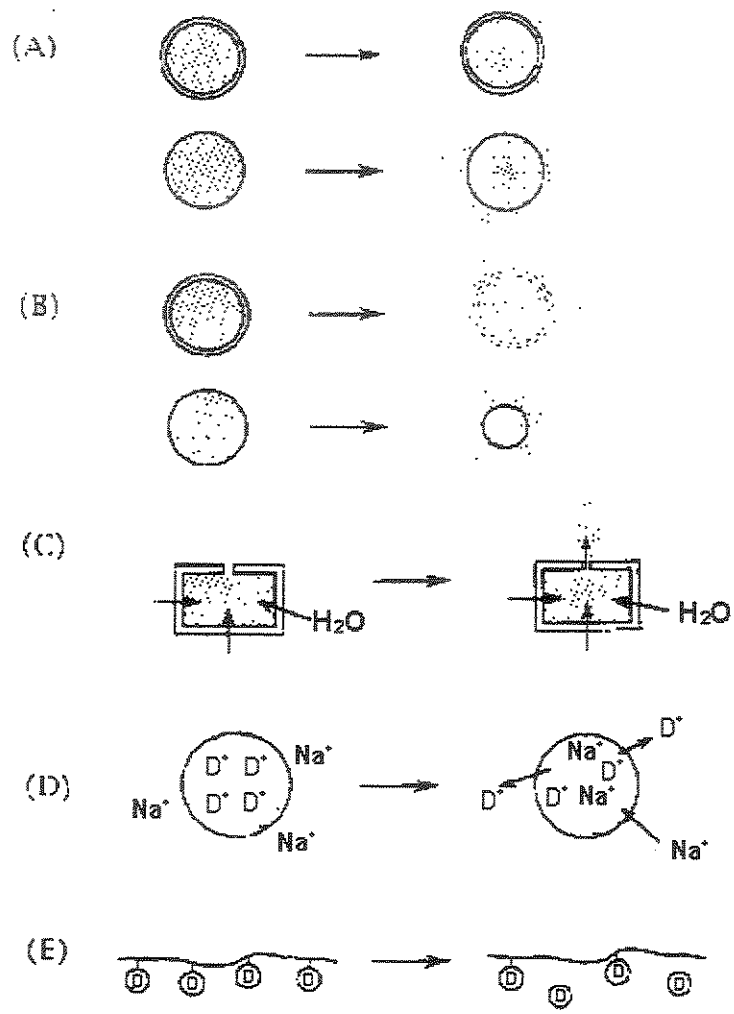



**Figura 2.5** Descrição esquemática dos mecanismos de liberação controlada: A) suporte polimérico não degradável; B) sistema polimérico degradável; C) sistema controlado por osmose; D) liberação por troca iônica E) liberação pró-droga. [12].

**Tabela 2.2** Mecanismos que acionam a liberação do fármaco [11]

| Mecanismos que acionam a liberação do fármaco no organismo: | | |
|---|---|---|
| **Estímulo** | **Polímero** | **Mecanismo** |
| pH | hidrogel ácido ou básico | Mudança do pH - entumecimento - liberação do fármaco |
| Força Iônica | hidrogel iônico | Mudança na força iônica— alteração na carga efetiva do hidrogel— mudança na conformação - liberação do fármaco |
| Espécies químicas | Hidrogel contendo grupos aceptores de elétrons | Formação de complexo de transferência de carga - mudança na conformação - liberação do fármaco |
| Enzima-substrato | Hidrogel contendo enzimas imobilizadas | Substrato presente - conversão enzimática - produto muda a conformação do hidrogel - liberação do fármaco |
| Magnético | Partículas magnéticas dispersas nas microesferas | Campo magnético aplicado - mudança nos poros da microesfera - liberação do fármaco |
| Térmico | Hidrogel termosensível, como poli(N-isopro-pilacrilamida) | Mudança na temperatura - mudanças na interações intermoleculares polímero-água - liberação do fármaco |
| Elétrico | Polieletrólito | Campo elétrico aplicado - carregamento da membrana - eletroforese da droga carregada - mudança na conformação do polímero - liberação do fármaco |
| Ultrasom | poli(etileno-vinil álcool) | Irradiação de ultrasom - aumento da temperatura -liberação do fármaco |

### *a. Difusão do fármaco em um suporte polimérico não degradável*

Nos sistemas monolíticos, o suporte polimérico é geralmente não-biodegradável, onde o fármaco é liberado por migração nos poros que vão se formando na matriz, à medida que o mesmo intumesce. O sistema consiste na incorporação do fármaco no interior da massa de um polímero hidrofílico, que pode ser intumescido quando entra em contato com água ou fluido biológico semelhante.

A difusão nos sistemas de cápsulas (reservatório) é controlada pela membrana que envolve o fármaco; nos casos de membranas não porosas, a difusão ocorre desde que ocorra desejável solubilidade do fármaco. A encapsulação por membrana microporosa, em que os poros variam na faixa de alguns centésimos de milímetros a dez angstrons, inicialmente são preenchidas e permeadas com fluido gastro-intestinal e com subseqüente formação de um gel.

Normalmente, na liberação controlada por difusão, o principal mecanismo refere-se à permeação do fármaco pelos poros e também à

diferença de concentração entre a matriz polimérica e o meio; que controlará a difusão no sistema em função do tempo, conforme se observa na Figura 2.6.

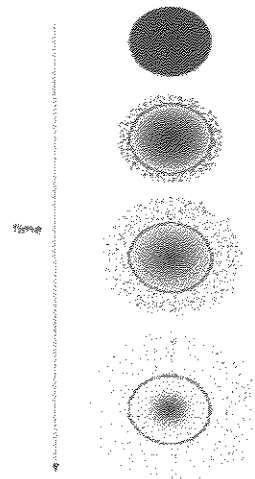


**Figura 2.6** Ilustração da liberação controlada do fármaco sem a degradação polimérica [11].

Quando o polímero intumesce, sua $T_g$ diminui para um valor abaixo da temperatura do meio e, assim, passa para o estado elastômérico, permitindo que o fármaco contido nele se difunda através da matriz. Com este tipo de sistema é possível, ao menos teoricamente, chegar a uma velocidade constante de liberação do fármaco.

A Tabela 2.3 mostra os fatores que influenciam o intumescimento dos hidrogéis, os quais podem ser divididos em dois grupos: os que são favoráveis à entrada de água na estrutura polimérica, e aqueles que resistem ou inibem o fluxo de água.

**Tabela 2.3** Fatores que influenciam o intumescimento de hidrogéis [50]

| FATORES FAVORÁVEIS AO INTUMESCIMENTO | FATORES QUE INIBEM O INTUMESCIMENTO |
|---|---|
| Potencial osmótico | - |
| Interações fortes com a água | Interações fracas com água |
| Volume livre alto | Volume livre baixo |
| Flexibilidade alta da cadeia | Flexibilidade baixa da cadeia |
| Densidade de reticulação baixa | Densidade de reticulação alta |

***b. Liberação controlada do fármaco a medida que o sistema polimérico degrada***

Quando o fármaco é liberado, à medida que o polímero degrada (dissolve), estamos nos referindo a liberação com dissolução polimérica. O termo "dissolução" designa desprendimento físico das cadeias poliméricas na presença de excesso de água, sem envolvimento de alguma mudança química, em pequenos fragmentos, por processo químico ou biológico, e subsequente liberação no meio.

Os sistemas de liberação de polímeros biodegradáveis podem ser considerados como um caso especial de sistemas de dissolução controlada. Os polímeros biodegradáveis comumente usados são; poli(ácido lático); poli(ácido glicolico), derivados da dextrana, poli(amino ácidos) e seus copolímeros, dentre outros.

No primeiro estágio do processo de dissolução, o polímero começa a intumescer como resultado da penetração das moléculas de água. Durante intumescimento, a porção mais superficial da matriz polimérica forma uma barreira, que retarda o ingresso das moléculas de água, agindo como uma camada que controla a liberação do agente bioativo. A difusão deste através desta barreira contribui para a velocidade e a cinética de dissolução da matriz polimérica.

Em sistemas monolíticos, a matriz que se dissolve geralmente é preparada por compressão do polímero, ou por evaporação do solvente seguida de secagem de uma solução polimérica, contendo uma quantidade de droga dissolvida ou dispersa.

Nos sistemas de reservatório, a solubilidade da membrana polimérica e a liberação do medicamento dependem da espessura da membrana; do tipo de polímero usado, e pode ocorrer em um sistema alternado de camadas de fármaco e polímero.

***c. Liberação controlada por osmose.***

Os sistemas de osmose, para a liberação controlada, são constituídos por um centro de reservatório do medicamento, rodeado por uma membrana polimérica semi-permeável. Assim, a presença da molécula do fármaco no reservatório cria um gradiente de pressão osmótica, provocando difusão gradual de água em direção ao dispositivo, forçando a molécula do agente bioativo a sair por um orifício feito no sistema. A força mecânica da membrana

semi-permeável deve ser forte o bastante para resistir a tensão formada no interior do dispositivo durante o tempo de vida operacional do sistema. A velocidade de liberação do agente bioativo, no sistema de liberação osmótica, é diretamente relacionado à velocidade de difusão externa da água, que pode ser controlado pelo tipo, espessura e área da membrana polimérica semi-permeável.

***d. Liberação controlada por troca iônica e liberação pró-droga.***

Os sistemas pró-drogas são os sistemas nos quais os grupos funcionais do polímero são ligados covalentemente às moléculas do fármaco e gradualmente liberadas por ruptura hidrolítica ou enzimática; com isso, não são fisiologicamente ativos e sua atividade é adquirida por essa ligação lábil que pode ser removida "in situ", por enzimas hidrolíticas. Se ocorrer ruptura por hidrólise química, a liberação do fármaco dependerá da natureza da ligação covalente e do pH do ambiente. No organismo isto ocorre muito devagar. Se a molécula do medicamento é liberada por hidrólise enzimática, a liberação é dependente da concentração da enzima. Assim, o sistema de liberação exata depende das condições "in vivo" e não do sistema de liberação em si mesmo.

O sistema de troca iônica é usado na liberação controlada de agentes bioativos iônicos (ou ionizáveis). Polieletrólitos são reticulados para formar resinas de troca iônica insolúveis em água. Desta forma, forma sal durante a absorção e liberação, por mudança apropriada de íons nas redondezas. Medicamentos catiônicos formam complexos com mudança aniônica na resina de troca iônica, como grupos carboxílicos e sulfônicos de poli(ácido sulfônico estireno) e poli(ácido acrílico), respectivamente. Íons de hidrogênio e/ou outros cátions, como íons sódio ou potássio, agem na liberação de fármacos por ação do complexo resina-medicamento. Para a liberação do agente bioativo aniônico, pode-se utilizar resina de troca iônica-catiônica que contém grupos básicos, como amino ou grupos amônio quaternários de poli(metacrilato de dimetil etilamina).

Para ser um suporte de fármaco, o polímero necessita possuir certas características; como: continuar solúvel em água após carregamento do fármaco; apresentar uma massa molar elevada o bastante para permitir filtração glomerular, mas baixa o bastante para atingir todo tipo de célula; as ligações suporte-fármaco devem ser estáveis no fluido do organismo, sendo

posteriormente degradável por enzimas presentes no lisossoma. É preferível que o polímero seja degradável por enzimas, para ser eliminado pelo organismo após liberação do fármaco. O suporte polimérico deve ser não-tóxico, não imunogênico e biocompatível.

Os sistemas de liberação controlada por dissolução e pró-drogas são conhecidos como sistemas controlados quimicamente. O controle da liberação ocorrerá no primeiro sistema por degradação, enquanto no segundo por hidrólise.

### 2.6.2 *Vantagens e limitações [50]*

Como vantagens dos sistemas de liberação controlada temos:

- níveis do fármaco no plasma são continuadamente mantidos em uma faixa terapêutica desejável;

- os efeitos laterais nocivos, a partir da administração convencional, podem ser reduzidos ou eliminados pela administração local;

- os fármacos que tem um tempo de vida curto "in vivo" podem ser protegidos da degradação;

- a administração contínua de pequenas quantidades de fármacos, pela liberação controlada, poderia eliminar o desconforto no paciente em comparação à administração parenteral de várias doses grandes do agente bioativo.

Desta maneira, para se obter uma taxa de liberação constante sobre um período prolongado, esta atividade deve ser mantida em um valor constante. Logicamente, é importante assegurar a integridade da membrana devido a possibilidade de haver uma liberação do fármaco rápida, por causa de imperfeições na estrutura da mesma. Devido a isto, o sistema de liberação controlado pode possuir as seguintes limitações:

- o alto custo de uma determinada formulação polímero-fármaco, devido ao preço do polímero ou do seu procedimento de obtenção;

- a toxicidade ou ausência de biocompatibilidade do material polimérico usado;

- a necessidade que existe, em alguns casos, de intervenção cirúrgica para implantar o polímero em um local apropriado;

- os problemas derivados pela presença do implante;

- formação de produtos secundários nocivos, procedentes do polímero, se este for degradável;

- o impacto da degradação do polímero no meio;

- o uso de aditivos no polímero, como plastificantes, estabilizantes, antioxidantes, cargas; que poderão provocar fortes reações no organismo

- o custo, o tempo e a probabilidade de sucesso.

Para que o projeto de liberação controlada não seja inviável, devemos selecionar a matriz polimérica, a partir de alguns critérios, tais como:

- massa molar, transição vítrea e funcionalidade química apropriados do polímero, que permitem a propriedade de difusão e liberação do agente ativo;

- os grupos funcionais do polímero não devem reagir quimicamente com o agente ativo;

- o polímero e os produtos da sua degradação não devem ser tóxicos para o meio e, no caso de aplicações médicas, não devem ser tóxicos para o paciente. Os polímeros devem estar livres de aditivos, impurezas, estabilizantes, resíduos de catalizadores ou emulsificantes, e não devem induzir fenômenos cancerígenos ou nocivos em geral;

- o polímero não deve degradar-se durante a estocagem, nem durante o seu período de uso. A degradação térmica é de menor importância devido às pequenas flutuações de temperatura no organismo;

- o polímero deve ser facilmente manufaturado no produto desejado e deve permitir a incorporação de grandes quantidades de agentes ativos, sem a deteriorização de suas propriedades mecânicas. Os parâmetros das

propriedades físicas e mecânicas do polímero mais importante são a geometria do dispositivo; propriedades elásticas; grau de intumescimento; resistência à tração; resistência à compressão; baixa cargas estáticas e oscilatórias; resistência ao desgaste e a fadiga;

- o custo do polímero não pode ser excessivo, pois desse modo o projeto não será competitivo.

Uma vez que as aplicações, a matriz polimérica e o agente bioativo foram completamente investigados e aceitos, devemos selecionar a tecnologia de liberação controlada que melhor se adequar à aplicação, as quais já foram mencionadas aqui.

## 2.7. PRINCIPAIS PARÂMETROS AVALIADOS [51]

Dentre os mais importantes parâmetros nos sistemas de liberação, destacam-se a facilidade de permeabilidade de fármacos solúveis em água, nos sistemas em matriz ou reservatório; suas propriedades físicas; e a durabilidade no estado vítreo, quando seco e elástico, ao absorverem certa quantidade de água. Estes são parâmetros fundamentais para a sua aplicação prática e podem ser otimizados com o conhecimento da ciência dos polímeros.

Por exemplo, em casos de polímeros com ligações cruzadas, quanto maior o grau de reticulação, maior será à força de resistência que as cadeias deverão ter para resistir à expansão; assim, sistemas altamente reticulados tendem a possuir baixos graus de intumescimento. Em casos de cadeias poliméricas rígidas, muito ou pouco flexíveis, o intumescimento será inibido devido ao aumento da resistência à deformação; e se o volume livre do polímero for suficientemente baixo, a água será incapaz de penetrar na matriz polimérica para iniciar o processo de intumescimento.

### 2.7.1 *Estrutura do polímero*

O volume livre representa os vazios nos quais as moléculas em difusão podem saltar; então, em termos gerais, o coeficiente de difusão aumenta em ordem crescente do estado cristalino para o estado vítreo e, por fim, para o estado elástico. Este fato está associado à densidade de um polímero ou ao empacotamento de suas cadeias, ou de algum material polimérico em particular, que geralmente tende a diminuir nesta ordem.

No estado vítreo, os polímeros são duros, rígidos e freqüentemente quebradiços, com baixo grau de movimentação molecular; logo, a velocidade de difusão do agente bioativo provavelmente será muito baixa. No entanto, sob aquecimento, a uma velocidade definida, pode ocorrer mudança do estado vítreo para o estado elástico. Neste estado, se o polímero não se contrair por alguma interação molecular, ou ligação, ele será um material mais fluido, de maior viscosidade e, assim, pode ocorrer separação de fase; formação de cristalitos e ligações cruzadas (se $T_c > T_g$). Como os polímeros nunca são totalmente cristalinos, acima de sua transição vítrea terão uma fase elástica junto com várias porções de domínios cristalinos.

### 2.7.2. *Intumescimento de polímeros reticulados*

A capacidade de um polímero intumescer em um solvente é governada por uma análise teórica complexa. Um solvente que intumesce o polímero pode ser utilizado no caso de hidrogéis para moderar ou controlar a difusão de fármacos diretamente no polímero, seguindo a teoria da energia livre da mistura do solvente com o polímero e a densidade de ligações cruzadas. Neste caso, o grau de intumescimento aumenta por redução da densidade de ligações cruzadas. O coeficiente de difusão também aumenta com o aumento do intumescimento podendo ser usado como um controle da velocidade de liberação na incorporação de fármacos solúveis.

### *2.7.3 Difusão* do medicamento

O tamanho da molécula do fármaco a ser difundida através da massa do polímero, assim como suas propriedades físico-químicas, são extremamente importantes na liberação. A permeação na membrana não depende somente de seu coeficiente de difusão, mas também da solubilidade no polímero e seu coeficiente de distribuição entre o polímero e o meio externo.

## 2.8 LIBERAÇÃO DE MEDICAMENTOS EM CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS

Muitos farmacos, como os antibióticos, podem ser encapsulados em microesferas de alginato [52-54], microesferas de quitosana [55-61], microesferas de alginato coacervada com quitosana [62-80] e microesferas de alginato coacervada com a quitosana e revestidas com o PEG [81,82]. Com as

microesferas poliméricas surge uma alternativa de administrar medicamentos simples. Uma grande vantagem deste sistema inclui o fato de poderem ser administrados por diferentes rotas. A rota mais conveniente e mais comumente empregada é a ingestão oral. Este tipo de administração está sujeito à freqüentes mudanças de pH. Durante seu caminho, o medicamento passa da parte gástrica, fortemente ácida; para intestinal, alcalina.

### 2.8.1 *Processos de microencapsulação*

A microencapsulação compreende o revestimento de pequenas partículas sólidas, gotículas líquidas, ou bolhas de gás. Muitos termos são usados para descrever o conteúdo de uma micropartícula, tais como; agente ativo; material de centro; material de recheio; fase interna; núcleo e carga. Do mesmo modo, o material usado para formar a partícula é chamado de suporte; revestimento; membrana; casca ou parede [83].

O que distingue uma micropartícula da outra, a princípio, é o seu tamanho. Entre as de 1 e 1000 μm de diâmetro, denomina-se micropartículas; as de diâmetros maiores que 1000 μm e menores que 1 μm são denominadas macropartículas e nanopartículas, respectivamente. Desta forma, as partículas podem ser divididas em cápsulas e esferas na escala macro, micro e nano [84].

A obtenção de microesferas, como no exemplo da Figura 2.7, ocorre devido ao fato do polímero gelificar por gelificação iônica, gelificação térmica ou por combinação destes dois mecanismos [85]. Podemos obter as microesferas por diferentes métodos que podem ser divididos em físicos, como a técnica do spray drying; spray chilling; spray cooling; leito fluidizado; extrusão; co-cristalização e liofilização; métodos químicos, através de inclusão molecular ou polimerização interfacial; e os métodos físico-químicos, incluindo coacervação; separação por fase orgânica e formação de lipossomos [83,84].

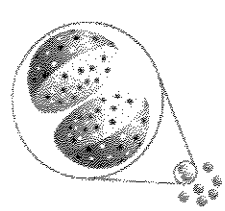


**Figura 2.7** Microesfera de poli(lactato-co-glicolato) [11]

As microcapsulas podem apresentar uma larga variedade de geometria e estrutura, segundo mostra a Figura 2.8.

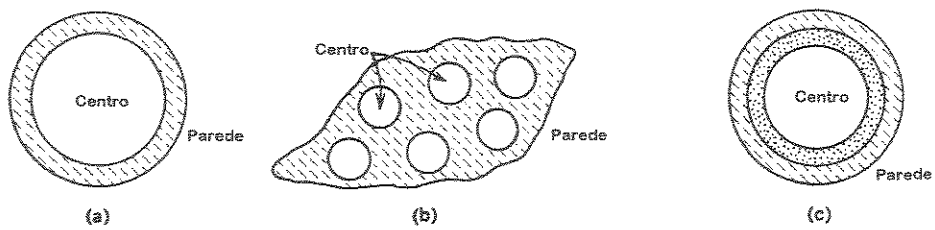



**Figura 2.8** Estrutura de microcápsulas: a) cápsula mononuclear, b) agregados e c) estrutura dupla parede [84].

Quando um agregado ativo é encapsulado por diferentes materiais, a cápsula é caracterizada por tamanho de partícula e distribuição de tamanho; pela geometria da partícula; pelo conteúdo ativo e distribuição; pelo mecanismo de liberação; pela estabilidade de estocagem e por outros parâmetros.

O custo de manufatura está baseado no material de revestimento; solvente; equipamento e trabalho. O preço do material de revestimento varia grandemente e, como regra, o material aceitável é o mais barato. Revestimentos que podem ser aplicados sem envolver solvente ou água são preferidos. As normas de segurança e ambientais aumentam o custo do processo, quando se utilizam solventes orgânicos voláteis. Os processos que requerem equipamentos simples e mínimo trabalho são preferíveis.

### *2.8.1.1 Utilizando alginato*

Os géis de alginato induzido por cátions divalentes, constitui uma técnica de encapsulação simples por gelificação iônica, que ocorre por uma transição sol-gel, com formações de junções intercadeias numa estrutura em rede.

Existe uma direta relação entre resistência mecânica de um gel de alginato e a porosidade da rede que forma o gel. Quando géis são produzidos a partir de alginatos com elevados conteúdos de ácido gulurônico, altos módulos são obtidos, comparados aos géis formados com menor conteúdo G. Isto normalmente produz alta velocidade de difusão. A explicação proposta para este comportamento é que géis com alto conteúdo G e seus pequenos

segmentos elásticos, tornam os poros mais consistentes, menos flexíveis. Assim, o alginato de cálcio apresenta uma estrutura de rede estatística quando comparada à estrutura mais dinâmica de rede de géis que são formados com baixo conteúdo G. Isto se deve aos segmentos elásticos relativamente longos na cadeia, conforme se observa na Figura 2.9 [24].

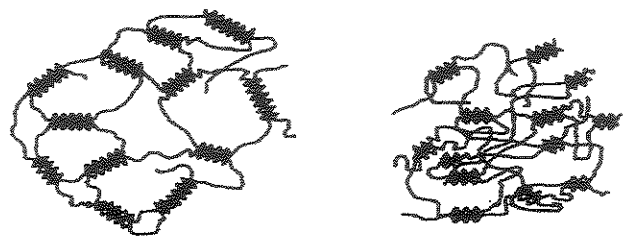


**Figura 2.9** Modelo proposto para estrutura de rede em géis feitos de alginato com blocos de ácido gulurônico de diferentes comprimentos [24].

GRANT et. al. (1973) [86] propôs o mecanismo de formação do gel de alginato que pode ser explicado pelo modelo "caixa de ovos" para as interações de segmentos G com íons cálcio. As regiões de blocos G são alinhadas lado a lado, resultando na formação de uma cavidade, onde os íons cálcio fazem uma junção entre as cadeias, semelhante ao ovo numa caixa de ovos [87], formando uma rede tridimensional. A força do gel está diretamente relacionada com a quantidade de zonas de junção e a natureza das associações envolvidas nestas zonas.

Desta forma, as propriedades físicas dos géis de alginato, como força e porosidade, dependem da razão entre os monômeros; composição de uronato; razão M/G, e também da distribuição seqüencial no copolímero. A formação destes géis depende principalmente das junções formadas auto-cooperativamente entre regiões enriquecidas por sequências GG [24].

THU et. al. [54] observaram que a estrutura de gel de alginato não é somente influenciada pela concentração e estrutura química, mas também pela cinética de formação de gel. Essa cinética pode proporcionar um gel no formato esférico, sistema em reservatório, sem homogeneidade; ou seja, com alta concentração próxima à superfície e diferentes graus de anisotropia (heterogeneidade).

As esferas em gel de alginato de cálcio são desestabilizadas quando quelados com fosfato, lactato ou citrato ou cátions não gelificantes como sódio

e magnésio. Estes íons trocam com os íons cálcio ligando-se não cooperativamente, conduzindo ao intumescimento do gel. Para geis de alginato com alto conteúdo de ácido guluronico, eles iniciam o intumescimento quando a razão de íons sódio para cálcio é maior que 40 vezes.

### *2.8.1.2 Utilizando alginato/PEG e alginato/quitosana*

Tanto o alginato, quanto a quitosana, são polissacarídeos de estrutura química diferentes, tendo um ou mais propriedades físicas de uso comercial; viscosidade e geleificação são dois exemplos.

O alginato é um poliânion e a quitosana é um policátion; quando dissolvidos em meio apropriado, ocorre a interação eletrostática dos grupos carboxílicos do alginato com os grupos amina da quitosana e o resultante entrelaçamento dos polímeros, podendo formar uma membrana que envolve o fármaco; ou seja, encapsular por coacervação. Este é um tipo de complexo formado por dois polímeros de cargas opostas.

Na Figura 2.10 está apresentada a interação iônica entre alginato e quitosana em diferentes pH.

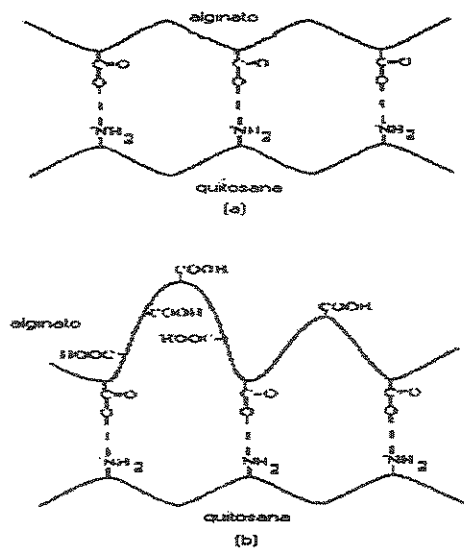



**Figura 2.10** Representação esquemática das interações iônicas entre alginato e quitosana: (a) pH 5.4; (b) pH 2.0 [88].

É claro que a interação entre os íons é favorecida a pH 5.4. Neste pH os grupos carboxílicos sofrem ionização e todos se ligam ao grupo amina formando uma estrutura regular e conseqüentemente, uma melhor coacervação.

A membrana formada diminui a perda do material a ser encapsulado, aumentando o tempo de liberação do fármaco. Ela pode ser forte o bastante para resistir a uma pressão de intumescimento osmótico, que surge dentro da microcápsula. Uma membrana alginato-policátion também reduzirá e controlará a permeabilidade servindo como uma barreira.

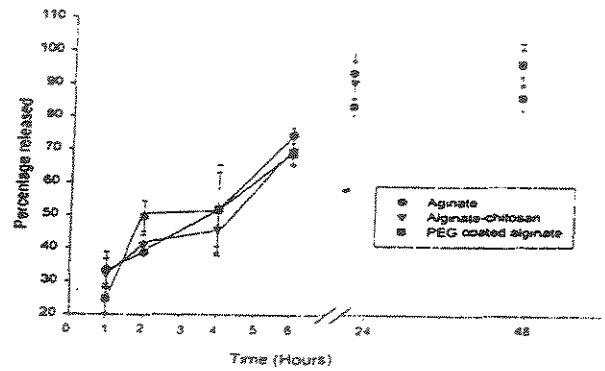
Para a preparação destas microcápsulas, o procedimento e materiais aplicados são vastos. Por exemplo, iremos abordar duas maneiras de prepará-las. A primeira é um procedimento de um único estágio, onde a membrana complexa coacerva, formando uma interface entre as soluções de alginato e quitosana. Isto é feito simplesmente gotejando uma solução de alginato em uma solução aquosa de quitosana, gera uma membrana com um centro alginato líquido. Este centro é facilmente geleificado por adição de cloreto de cálcio na solução de quitosana, ou por tratamento das microesferas de centro líquido com $CaCl_2$ (aq), após a membrana ter sido formada. O processo oposto pode ser feito, dependendo da interação do agente bioativo com a membrana, gotejando quitosana em alginato para produzir microcápsulas com um centro quitosana. E finalmente, o procedimento em dois passos, o qual compreende a formação de esferas de alginato de cálcio gotejando uma solução de alginato em um banho geleificante contendo íons cálcio, $CaCl_2$ (aq). Em seguida as esferas são transferidas para uma solução contendo um policátion, a quitosana, para formar uma membrana sobre a superfície das microesferas.

Os géis podem ser feitos com a concentração de alginato distribuído uniformemente ou com um gradiente na concentração de alginato através da secção cruzada da esfera no gel, chamada microesferas homogêneas e não homogêneas, respectivamente. O grau de homogeneidade pode facilmente ser controlado, ajustando a concentração e razão de geleificação para cátions não gelificantes na solução gelificante. É possível produzir um gel não homogênio com uma concentração do polímero na superfície 10 vezes maior que a concentração do polímero no centro.

CHANDY et.al. (1998) prepararam microesferas de alginato de cálcio; microcápsulas de alginato/quitosana e microesferas de alginato de cálcio, incorporada com PEG, em um único estágio, para liberarem hirudina. Uma parte destas microcápsulas sofreram um tratamento ácido com 0.1 M de HCl por 4 h. A Figura 2.11 mostra a liberação de hirudina em função do tempo, no tampão tris-HCl, pH 7,4, nestes dois sistemas. Observa-se na Figura 2.11 um

efeito de disparo (~ 2h), seguido por uma liberação constante de hirudina nas micropartículas sem tratamento ácido. A liberação de hirudina das micropartículas, após tratamento ácido, reduziu a liberação, com diminuição do efeito de disparo. No entanto, durante o tratamento das micropartículas em baixo pH, 35-40% da carga do fármaco foi liberada.

a)




b)

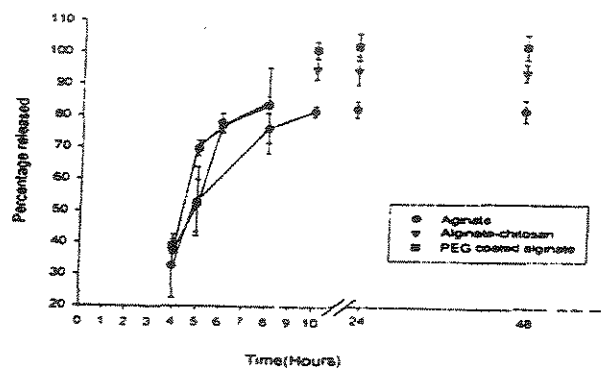



**Figura 2.11** Percentagem de liberação da hirudina em tampão tris-HCl, pH 7.4 sob vários sistema de liberação controlada: a) sem alterar condições das esferas e b) após tratamento ácido (0.1 M HCl, 4h) [81].

CHANDY et. al. (1998) continuaram seus estudos, desta vez liberando albumina humana em microesferas de alginato de cálcio e microesferas de alginato de cálcio incorporando PEG (0,05, 0,1, 0,2 e 0,3%). A Figura 2.12 mostra a percentagem de liberação de albumina de microesferas de géis de alginato, incorporadas com o PEG, como função do tempo, em tampão tris-HCl, pH 7,4.

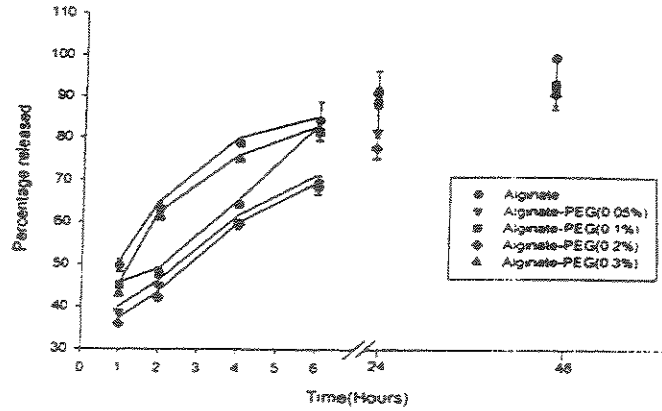



**Figura 2.12** Liberação do BSA em alginato enxertado com PEG [81].

A liberação inicial de albumina (BSA) foi substancialmente reduzida por incorporação de baixa concentração de PEG nas microesferas de alginato. A liberação inicial da mesma, em microesferas sem o PEG, foi de 49,7% em 1 h de liberação, e de 35 a 38% para microesferas de alginato de cálcio, modificadas com o PEG. Entretanto, as microesferas preparadas com alta concentração de PEG (0.3%) liberaram albumina em maior percentagem que microesferas preparadas com baixa concentração (0.05%). Por exemplo, em 4 h, as microesferas preparadas com 0.05 de PEG liberaram somente 59% de albumina encapsulada, enquanto que as preparadas com 0.3 % de PEG liberaram 75% de albumina. Desta forma, foi concluído que baixa concentração de PEG modifica o perfil de liberação de albumina em microesferas de alginato.

### *2.8.1.2 Utilizando alginato/quitosana/PEG*

CHANDY et. al. (1999), em um outro trabalho, estudaram as microesferas de alginato de cálcio coacervadas com quitosana, incorporando às mesmas o PEG. A utilização de PEG, em microcápsulas de alginato/quitosana, tem a função de tornar as microcápsulas menos adesivas em comparação a quitosana que é mucoadesiva. Para tal, encapsularam células vermelhas do sangue (Red Blood Cells – RBC) em microesferas de alginato de cálcio, microcápsulas de alginato/quitosana; microcápsulas de alginato/quitosana/PEG; microcápsulas alginato/quitosana/GA; microcápsulas alginato/quitosana/1-etil- 3- (3' – dimetil aminopropil) carboamida (EDC) e finalmente, microcápsulas alginato/quitosana/PEG/GA. A Figura 2.13 apresenta

a liberação de RBC em pH 7,4. A percentagem de hemoglobina liberada de RBC em microesferas de alginato foi alta, comparada com as velocidades de várias microcápsulas modificadas. Eles concluíram que a incorporação de baixas concentraçãoes de GA (0,05%), durante gelação, pode melhorar a bioestabilidade de células encapsuladas e a liberação pode ser substancialmente reduzida em microcápsulas de alginato/quitosana/PEG.

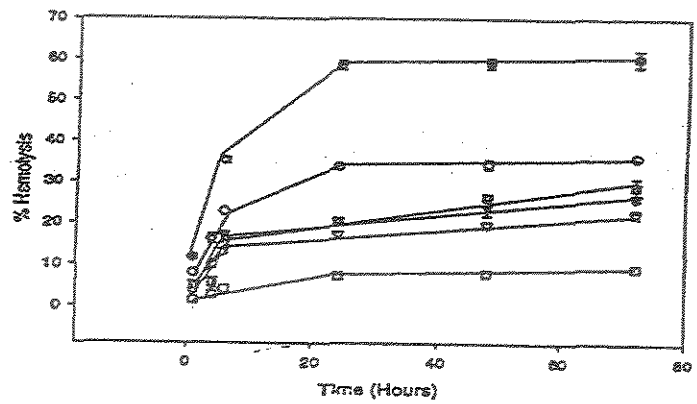



**Figura 2.13** O gráfico mostra a difusão de RBC através de várias microcápsulas de alginato: (•) alginato, (O) alginato/quitosana, (▽) alginato/quitosana/PEG, (▽) alginato/quitosana/GA, ( ) alginato/quitosana EDC e ( ) alginato/quitosana/PEG/GA.

## 2.9 MODELAGEM MATEMÁTICA PARA A DIFUSÃO DE OTC

Difusão em soluções poliméricas e géis tem sido estudada por várias técnicas como gravimetria; permeação por membrana; fluorescência e sondas radioativas. Estes estudos conduzem a um melhor entendimento sobre morfologia polimérica; fenômenos de transporte; fusão polimérica e liberação controlada de fármacos. Várias descrições teóricas dos processos de difusão foram propostas. Os modelos teóricos foram baseados em conceitos físicos diferentes como efeito de obstrução; efeito do volume livre e interações hidrodinâmicas [89].

O processo responsável pelo movimento da matéria, de uma parte a outra, o qual é principalmente devido a movimentos moleculares aleatórios é chamado de difusão. Em gases, os processos de difusão são rápidos (10

cm/min); porém são bem mais lentos em líquidos (0,05 cm/mim) e sólidos (0,00001 cm/mim). Difusão, em gases e líquidos, pode ser predita por teorias; no entanto, em sólidos é difícil estimar com modelos teóricos. Particularmente em polímeros, a difusão é complexa, podendo ter valores entre os líquidos e sólidos. Ela depende fortemente da concentração e grau de intumescimento do polímero [89].

O primeiro tratamento matemático da difusão foi estabelecido por Fick, onde a difusão é tratada como um processo molecular dinâmico, baseando-se na hipótese que a taxa de transferência da substância, difundida através da unidade de área de uma seção, é proporcional ao gradiente de concentração, normal a esta seção [90]. A primeira Lei de Fick é a lei fundamental da difusão, expressa pela equação 2.3:

$$J = -D.\nabla C^{*} \qquad (2.3)$$

onde,

**J** é o fluxo mássico [g/s.cm]

D é o coeficiente de difusão da espécie difusiva no sistema polimérico [$cm^2/s$]

$\nabla C$ é o gradiente de concentração da espécie difusiva no sistema polimérico (matriz, cilindro, esfera...) [$g/cm^3$]

A equação 2.3 é o ponto inicial de numerosos modelos de difusão em sistemas poliméricos [89]. Esta equação mostra que o fluxo mássico da especíe difusiva (**J**) é proporcional ao gradiente de concentração da mesma no sistema polimérico ($\nabla C$). Entretanto, a primeira lei de Fick só é válida em situações de estado estacionário, onde a concentração do difusante não varia com o tempo, o que experimentalmente não ocorre. Desta forma, partimos para a segunda lei de difusão de Fick, que descreve o estado não-estacionário, que reflete nossas condições experimentais, ou seja:

$$\frac{\partial C^{*}}{\partial t} = -\nabla J \qquad (2.4)$$

Substituindo a equação (2.3) na equação (2.4), temos,

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = -\nabla.(-D\nabla C^*) \tag{2.5}$$

Se o sistema for isotrópico (D≠f(espaço))

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = D\nabla^2 C^* \tag{2.6}$$

O coeficiente de difusão (*D*) de OTC, espécie a ser difundida, pode ser determinado a partir da eq. (2.6) para a difusão em uma micropartícula esferica. Neste caso, a equação (2.6) pode ser expressa em coordenadas esféricas tal que:

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = D\left(\frac{1}{r^2}\frac{\partial}{\partial r}\left(r^2\frac{\partial C^*}{\partial r}\right)+\frac{1}{r^2\,\mathrm{sen}\,\theta}\frac{\partial}{\partial \theta}\left(\mathrm{sen}\,\theta\frac{\partial C^*}{\partial \theta}\right)+\frac{1}{r^2\,\mathrm{sen}^2\,\theta}\frac{\partial^2 C^*}{\partial \phi^2}\right) \tag{2.7}$$

podendo ser representada genericamente pela Figura 2.14:

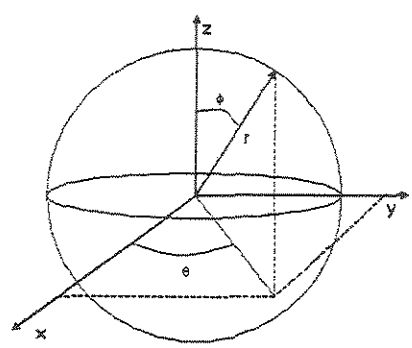



**Figura 2.14** Sistema de coordenadas esféricas

Sob circunstâncias onde a difusão depende apenas da direção r, a eq. (2.7) simplifica-se a:

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = D\left(\frac{1}{r^2}\frac{\partial}{\partial r}\left(r^2\frac{\partial C^*}{\partial r}\right)\right) \tag{2.8}$$

ou

$$\frac{\partial C^*}{\partial t} = D\left(\frac{\partial^2 C^*}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial C^*}{\partial r}\right) \qquad (2.8')$$

Quando as micropartículas estão carregadas com OTC e são colocadas na solução de liberação líquida livre de OTC, sob agitação, para facilitar a transferência de massa de OTC entre a micropartícula e a solução, será determinada por difusão, sendo dada pela equação 2.8. Desta foram as condições de contorno são:

Condição inicial: t=0 e 0<r<a, $C^* = C_0$, e

Condições de contorno: t>0, r=0, $\frac{\partial C^*}{\partial r} = 0$ (simetria)

t>0, r=a, $C^* = C_L$

sendo a o raio da micropartícula e C* a concentração de OTC na micropartícula.

Assim, a transferência de massa da espécie difusiva é dada pela resolução da Equação 2.8, usando o método de transformada de Laplace [89]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(1+\alpha)e^{-Dq_n^2 t/a^2}}{9 + 9\alpha + q_n^2\alpha^2} \qquad (2.9)$$

onde

*t* é o tempo

$\alpha$ é definido $(V/N)/(4\pi a^3/3)$

*V* é o volume da solução excluindo o espaço

*N* é o número das esferas

$q_n$ são termos de raiz positiva diferente de zero dado por $\tan q_n = \frac{3q_n}{3+\alpha q_n^2}$

Uma vez que o estudo de liberação de OTC foi feito através da determinação da sua concentração na solução de liberação e através de um balanço de massa no sistema, podemos afirmar que a quantidade de massa liberada pela micropartícula é igual a massa de OTC na solução. Tem-se, então, a equação 2.10, cuja Figura 2.15 esquematiza o sistema de liberação de OTC.

$$\frac{C_t - C_0}{C_{LE} - C_0} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(1+\alpha)e^{-Dq_n^2 t/a^2}}{9 + 9\alpha + q_n^2\alpha^2} \qquad (2.10)$$

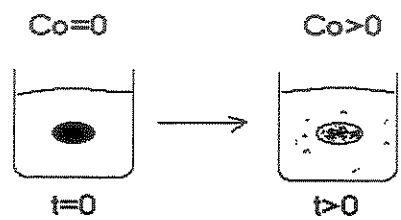



**Figura 2.15** Esquema ilustrando a transferência de massa de uma espécie difusiva da micropartícula para a solução.

No sistema, a concentração inicial de OTC na solução, $C_0$, é zero, e $C_L$ é a concentração da espécie difusiva na solução, o qual é assumida ser uniforme e $C_{LE}$ é a concentração do substrato no equilíbrio na solução. Assim, a concentração da espécie difusiva na solução é dada pela equação 2.11 [91]:

$$\frac{C_L}{C_{LE}} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(1+\alpha)e^{-Dq_n^2 t/a^2}}{9 + 9\alpha + q_n^2\alpha^2} \qquad (2.11)$$

É importante salientar a existência de limitações para a aplicação deste modelo; foram tomados cuidados em seu uso bem como na interpretação dos resultados. É praticamente impossível se estimar e predizer o coeficiente de difusão de um difusante para sistemas específicos com mais de uma fase. Por

exemplo, temos um sistema de microcápsula em que o centro é formado por uma rede de alginato e na superfície existe uma camada de quitosana coacervada. Portanto, quando aplicamos o modelo matemático estamos obtendo o valor do coeficiente de difusão do fármaco, que move-se primeiramente dentro da esfera de alginato, atravessa a membrana interfásica e, por fim, a camada de quitosana precipitada. Neste caso, temos um coeficiente global, porém torna-se impossível determinar a difusão na camada de quitosana ou de alginato. As mesmas considerações foram feitas para as micropartícula de centro alginato coacervado com a quitosana e revestida com o PEG utilizando o glutaraldeído.

### *2.8.1 Método de determinação do coeficiente de difusão [92,93]*

O coeficiente global de difusão (*D*), de OTC liberada do interior das microcápsulas ao meio, pode ser determinado com o emprego de um programa computacional desenvolvido em linguagem FORTRAN. A equação 2.11, por sua vez, pode ser empregada para representar os diversos sistemas de micropartículas. Estes métodos são desenvolvidos a partir da solução numérica de sistemas de equações, os quais se dividem em dois grupos: métodos diretos e métodos iterativos.

Os métodos diretos são aqueles que conduzem à solução exata, após um número finito de passos. Os métodos iterativos se baseiam em iterações sucessivas as quais, a partir de uma aproximação inicial, fornecem novas aproximações usando valores calculados anteriormente. Este método será útil se a seqüência convergir para a solução do sistema. A escolha do método a ser usado depende de cada caso. Nos nossos estudos escolhemos o método iterativo dos mínimos quadrados.

Aplicando o método dos mínimos quadrados, pode-se calcular o coeficiente global de difusão *D*. O erro entre o valor experimental e o valor calculado deve ser o menor possível, logo de acordo com a seguinte função objetiva temos:

$$\phi = \sum_{n=1}^{Npo} \left( \left( \frac{C_L}{C_{LE}} \right)_{\exp} - \left( \frac{C_L}{C_{LE}} \right)_{cal} \right)^2 \qquad (2.12)$$

Este passo tem o objetivo de conhecer o valor do coeficiente global de difusão que minimiza a função $\phi$.

Partindo da equação 2.12 o método escolhido deve destinar-se a solução de uma equação não-linear com uma incógnita *D*. O método de Newton-Raphson apresenta bons resultados na determinação de zeros de equação algébrica não linear, como também alcança a convergência muito rapidamente. Ele é relativamente simples de aplicar, podendo ser um bom método iterativo utilizado para este tipo de equação. Este método combina duas idéias básicas muito comuns nas aproximações numéricas: linearização e iteração

Na linearização, substitui-se um problema complicado por uma aproximação linear que, por via de regra, é mais facilmente resolvida. Em geral, a aproximação linear é obtida tomando os primeiros termos do desenvolvimento de Taylor da função em questão, assim:

$$\frac{d\phi}{dD} = f \quad \text{(derivada primeira, resolução analítica, a qual deverá ser zero)} \quad (2.13)$$

$$\frac{df}{dD} = f' \quad \text{(derivada segunda, resolução analítica )} \quad (2.14)$$

Genericamente, o processo iterativo consiste em evoluir da aproximação $D^n$ (valor inicial) para a aproximação $D^{n+1}$.

O método se desenvolve da seguinte maneira:

$$D^{n+1} = D^n - \frac{f(D)}{f'(D)} \quad (2.15)$$

Prossegue-se repetindo os cálculos, até que a precisão desejada seja atingida. Pode-se usar como critério de parada a falta de progresso nos dados; isso ocorre quando a diferença de dois iterados torna-se muito pequena. Outro critério de parada pode ser a comparação do valor obtido com uma variável dada, por exemplo, o erro permitido.

Usualmente os dados são apresentados através de uma curva $C_L/C_{LE}$ versus t. Um dos critérios do "comportamento fickiano" assegura que esta

curva deverá ser exponencial. Além disso, com o valor de D obtido, com o auxílio da equação 2.15, pode-se gerar gráficos a partir da equação 2.11 para verificação da representatividade do modelo.

Com base nesta introdução, a pesquisa deste trabalho foi direcionada aos estudos de diferentes sistemas de biomateriais, utilizadas para liberação controlada e a modelagem matemática do fenômeno de difusão que ocorre nestes sistemas quando carregados com o fármaco.

# III. PARTE EXPERIMENTAL

## 3.1. MATERIAIS USADOS

Utilizou-se as notações indicadas na Tabela 3.1 para especificar as amostras. Foram utilizadas três amostras de quitosana, duas amostras de alginato e três amostras de polietileno glicol, onde a designação do PEG é feita indicando sua massa molar media (sem a unidade) após a sua abreviação.

**Tabela 3.1** - Notação adotada para designação dos biomateriais.

| AMOSTRA | ESTADO FÍSICO | PROCEDÊNCIA | DESIGNAÇÃO |
|---|---|---|---|
| **QUITOSANA** | sólidas | Aldrich | Qui-av<br>Qui-mv<br>Qui-bv |
| **ALGINATO** (*M. Pyrifera*) | sólidos | Sigma | Alg-mv<br>Alg-bv |
| **POLIETILENO GLICOL** | sólidos | Aldrich | PEG 2000<br>PEG 4600<br>PEG 10000 |
| **OXITETRACICLINA** | sólida | Sigma | OTC |

OBS: b (baixa), m (média), a (alta) e v (viscosidade).

Purificou-se a quitosana dissolvendo 1 g em 100 mL de ácido acético (2%) e mantida agitação constante por cerca de 18 horas. Após este período a solução obtida foi filtrada, em papel de filtro quantitativo faixa azul, a presença de impurezas foi observada no papel de filtro. Em seguida reprecipitou-se a mesma em solução de $NH_4OH$ concentrado. O precipitado foi filtrado, lavado com água deionizada até neutralidade e seco em liofilizador [94].

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS

### 3.2.1 *Determinação da Massa molar*

As massas molares médias das diferentes amostras de quitosana foram obtidas utilizando-se a Cromatografia por Permeação em Gel (GPC) em um cromatógrafo Waters 486, com injetor automático de amostras e detetor de

Índice de Refração. O software Millenium32® GPC foi utilizado como controlador do sistema cromatográfico. As colunas utilizadas foram do tipo Ultrahydrogel 1000 e Ultrahydrogel 500 (Waters), de poli-metilmetacrilato hidroxilado, com volumes de exclusão de $1x10^6$ e $8x10^4$, respectivamente, conectadas em série. Foram utilizados padrões de dextrana (Sigma) em concentração de 1 mg/ml, com massa molar 200000, 473000, 65282, 38800 e 9400 daltons. Um padrão de D-glucosamina HCl (Seikagaku, peso molecular 212 g/mol) foi utilizado. Os padrões foram preparados em fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, filtrados para frascos especiais por membranas (0,45 μm) Millipore e mantidos em geladeira até a injeção. A fase móvel utilizada para dissolução das amostras foi AcOH 0,33M/NaOH 0,1M pH 3,9 ± 0,2, fluxo de 0,8 ml/min e temperatura 40°C [95].

Além disto, foi considerada a massa molar do fabricante para as três amostras de polietileno glicol e as duas amostras de alginato.

### 3.2.2 *Espectroscopia na Região do Infravermelho* (FT – IR)

Os espectros na região do infravermelho de todas as amostras foram obtidos em espectrofotômetro FT - IR da Perkin Elmer modelo Spectrum 2000.

Foram feitos filmes de alginatos a partir da evaporação de sua solução aquosa em placa de petri, de poliestireno, e transferidos para estufa à temperatura de 50 °C, por tempo suficiente para formação do filme, em torno de oito horas. A espessura final foi na faixa de 20 a 50 μm. Foi utilizada uma faixa espectral de 400 – 4.000 $cm^{-1}$, resolução de ± 4 $cm^{-1}$ e uma média de 128 varreduras [96]. Foram feitos filmes em triplicata e vários testes para obtermos uma espessura que seguisse a lei de Beer.

As amostras de quitosanas foram previamente reduzidas a granulometria através da utilização de nitrogênio líquido. Foi produzido um pó para obtermos uma pastilha o mais transparente possível. Assim, 40 mg destes foram misturados com 120 mg de KBr e colocados em estufa por 12 h à 80 °C. Foram obtidos os espectros em triplicata, utilizando-se pastilha de KBr, seguindo o procedimento descrito em SABNIS and BLOCK (1997) [97]. Foram corridos os espectros a uma faixa de 400 – 4.000 $cm^{-1}$, resolução de ± 4 $cm^{-1}$ e uma média de 128 varreduras.

Os espectros do PEG também foram obtidos em forma de pastilha de KBr e foram corridos os espectros a uma faixa de 400 – 4.000 $cm^{-1}$, resolução de ± 4 $cm^{-1}$ e uma média de 128 varreduras.

### 3.2.3 *Espectroscopia* de Ressonância Nuclear Magnética de Próton *(RMN $^1H$)*

Foram obtidos espectros do RMN $^1H$ para as amostras de alginato e quitosana em um espectrofotômetro Bruker-AC 200 MHz, a temperatura de 80 °C.

As amostras de alginato (~5 mg) foram dissolvidas em $D_2O$ a pD neutro, com adição de EDTA (~1,5 mg) para impedir que traços de cátions divalentes interagissem com as glucuronas [98]. Foram feitos duzentos e cinqüenta e seis varreduras, operando no modo de Transformada de Fourier. O programa utilizado foi o INVREC.

As amostras de quitosana original (8-10 mg) foram dispersas em $D_2O$ sob agitação, por 24 horas, o que resultou para as amostras de alta e média viscosidade soluções límpidas, enquanto a solução de baixa viscosidade apresentou turbidez nítida. Ao solvente foi adicionado HCl, em quantidade suficiente ($D_2O$/HCl 100:1 v/v), para promover a solubilização da quitosana e no sentido de deslocar os sinais interferentes da região examinada para a determinação do grau de acetilação [94]. Uma alíquota de aproximadamente 5 ml da solução da quitosana foi transferida para um tubo apropriado (ø = 5 mm) e os espectros foram adquiridos utilizando o programa PRESAT, saturação do pico de água, com pulso de 90 °, com tempo de relaxação 7,0 μsec e 128 varreduras.

### *3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA)*

As análises termogravimétricas dos copolímeros alginato e quitosana purificada foram realizadas em um analisador termogravimétrico SDT 2960 da TA instruments, à uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, em fluxo de argônio, partindo da temperatura ambiente até a completa perda de água. Enquanto, para a OTC foi obtido o termograma completo.

As propriedades térmicas dos biopolímeros foram medidas usando-se a calorímetria diferencial exploratória TA 2920, com módulo DSC 2910 para

tratamento de dados. Usou-se como padrão o Índio ($T_m$= 156,60 °C). As amostras foram colocadas em um porta amostra padrã, de alumínio, e dois ciclos de aquecimentos foram feitos à uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min em fluxo de nitrogênio. As amostras de alginato foram resfriadas rapidamente de 25 °C à -50 °C, utilizando nitrogênio líquido. Em seguida deu-se início ao primeiro ciclo de aquecimento, até atingir 200 °C. Para fechar o primeiro ciclo, um resfriamento a uma taxa de 20 °C/min foi feito até atingir –50 °C. A partir desta temperatura, uma segunda varredura foi realizada até 200 °C. Para as amostras de quitosana, seguimos o mesmo padrão com a mesma faixa de temperatura.

### 3.2.5 Espalhamento de Raio X de Alto Ângulo (WAXS)

Os espectros de Espalhamento de Raio X de Alto Ângulo (WAXS) das amostras de quitosana, e das amostras dos PEG, foram registrados em um difratômetro, contendo um monocromador de níquel cujo propósito é filtrar os diversos feixes, isolando a linha de CuK$\alpha$, a 40 kV e 30 mA.

## 3.3. PREPARACÃO DAS MICROESFERAS

### 3.3.1 *Sistema de microesferas de alginato de cálcio*

Foi feita uma dispersão de 0,014 g/mL de OTC em uma solução de alginato de sódio de 1,75% (média e baixa viscosidade) e cloreto de sódio 0,9%. Esta solução foi gotejada em 80 mL de um banho gelificante, constituído de cloreto de cálcio 2,0%. As microesferas obtidas foram deixadas nesta solução por 30 minutos para endurecerem. Após endurecidas, foram lavadas com água deionizada e deixadas secar à temperatura ambiente, até que a massa não variasse. Desta forma, foram feitas as microesferas de alginato de cálcio de média e de baixa viscosidade, por gelificação com íons cálcio.

### *3.3.2 Sistema de microesferas de alginato(mv) -poli(etilenoglicol) – PEG, com e sem reticulação com o Glutaraldeído (GA)*

Foi preparada uma solução de OTC (0,014 g/mL) em alginato de sódio 1,75% contendo NaCl 0,9%. Esta solução foi gotejada em 100 mL de uma solução reticulante de PEG 0,5% e $CaCl_2$ 2% (ajustado o pH para 5), deixando as microesferas de alginato-PEG formadas repousarem por 30 min para gelificação.

Do mesmo modo, preparou-se uma solução de OTC (0,014 g/ml) em alginato de sódio 1,75% , contendo NaCl 0,9% e PEG 0,5%. Esta solução foi gotejada em 100 mL de uma solução reticulante de $CaCl_2$ 2% e GA 0,2%.

### *3.3.3 Sistema de microcápsulas de alginato-quitosana*

Uma solução de 0,3% de quitosana, em 0,02M HCl, foi preparada deixando-se por 24 h sobre agitação. Após esse tempo, foi preparado $CaCl_2$ 2,0% em 100 mL desta solução e o pH da solução resultante foi ajustado para 5,7, usando-se 0,1 M de NaOH. A seguir, a solução foi filtrada para se obter uma solução límpida. A esta solução foi gotejada uma solução de OTC (0,014 g/ml), dissolvida em alginato de sódio 1,75% e NaCl 0,9%. Desta forma, preparou-se microcápsulas de alginato/quitosana por coacervação complexa em um único estágio.

### *3.3.4 Sistema de microcápsulas de alginato-quitosana-PEG*

Uma solução de 0,3% de quitosana em HCl 0,02M foi preparada, deixando-se por 24 h sobre agitação. Após esse tempo, o pH da solução foi ajustado para 5,7, usando-se NaOH 0,1 M, e posteriormente, filtrou-se a solução para se obter uma solução límpida. Em 100 mL desta solução, foi preparada uma solução 2,0% de $CaCl_2$; 0,2% e 0,1% de PEG e 0,05% e 0,08% de glutaraldeído. A esta solução foi gotejada uma solução de OTC (0,014 g/ml), em alginato de sódio 1,75% e NaCl 0,9%, para a obtenção de microcápsulas de alginato/quitosana/PEG, em um único estágio.

### *3.3.5 Sistema de microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com EUDRAGIT® RS – 100, L – 100 e S - 100*

Foi preparada uma solução de OTC (0,014 g/mL), em alginato de sódio 1,75% contendo NaCl 0,9%. Esta solução foi gotejada em 100 mL de uma solução reticulante $CaCl_2$ 2%, deixando as microesferas de alginato formadas repousarem por 30 min para gelificação. Após endurecidas, foram lavadas com água deionizada e deixadas secar à temperatura ambiente, até que a massa não variasse. Enquanto isso, foram preparadas as soluções de revestimento para as microesferas secas, partindo-se dos EUDRAGIT®, onde os mesmos foram preparados a uma concentração de 5%, partindo de 100 ml de álcool isopropílico, qsp; além de, após dissolvidos, serem acrescentados

PEG 2000 2%; água deionizada 2% e, finalmente, trietilcitrato (TEC) 0,5%. Este último como agente reticulante. Após as soluções prontas, as microesferas foram imersas nas soluções individualmente e, à 37 $^0$C, a camada de revestimento foi reticulada. Este procedimento foi repetido três vezes.

## 3.4 INTUMESCIMENTO DAS MICROPARTÍCULAS

As micropartículas, após produzidas, eram lavadas com água deionizada, cujo o excesso de água era retirado com papel de filtro para determinação de sua massa inicial. As microesferas eram secas à temperatura ambiente, até que a massa não variasse; logo após, a massa seca era anotada e a água de hidratação determinada pela equação 3.1:

$$I_o = \left( \frac{m_o - m_t}{m_o} \right) X \quad 100 \qquad (3.1)$$

Onde: %I = porcentagem de intumescimento das micropartículas

$m_t$ = massa das micropartículas secas

$m_o$ = massa inicial das micropartículas expandidas

## 3.5 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS

Foi determinado o tamanho médio das micropartículas, após serem secas, utilizando-se um micrômetro para cada formulação, com 50 espécies medidas.

## 3.6 LIBERAÇÃO CONTROLADA DA OXITETRACICLINA

A concentração de OTC, liberada das micropartículas em solução de pH 1,2 e solução de pH 7,4, condições estas que simulam o ambiente gastro-intestinal, foi determinada por medida direta da absorbância nestas soluções, à ~268 nm, em um espectrofotômetro Varian 1G. Retiraram-se alíquotas em determinados intervalos, as quais foram posteriormente devolvidas ao meio de liberação. Foram utilizados cerca de 10-20 mg de micropartículas, sendo as mesmas colocadas em 200 mL do meio de dissolução, mantido em um banho maria com agitação orbital tipo Dubnoff, da marca Marconi, com velocidade de rotação de 100 rpm, à temperatura de 37 ± 0,5 $^0$C. Foi utilizada a curva de

calibração de oxitetraciclina, em pH 7,4 e pH 1,2, para se determinar à concentração liberada. Cada determinação foi executada em triplicata.

### 3.7 MODELAGEM MATEMÁTICA

Os dados de concentração de OTC no tempo t ($C_L$), antes de atingir o equilíbrio; e da concentração no equilíbrio ($C_{LE}$), foram obtidos medindo-se inicialmente a absorbância de OTC na solução em que as micropartículas foram imersas e, posteriormente, convertidos para concentração com o auxílio de uma curva de calibração. Inicialmente, a cada duas horas, alíquotas eram retiradas até completar 12 horas de ensaio. Testes mostraram que esse intervalo era suficiente para assegurar uma faixa próxima ao equilíbrio. Posteriormente, as alíquotas eram retiradas de 12 em 12 horas até atingir 48 ou 72 h. Com esses dados foram calculados os coeficientes de difusão.

### 3.8 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA DE OTC

A determinação da distribuição do tamanho de partículas cristalinas de OTC, em meio aquoso, foi feita por Espalhamento de Luz em mastersizer S, marca Malvern, modelo S-MAM 5005, com capacidade de determinação de tamanho de partícula de 0,05 a 3500 μm. Foi preparada uma dispersão de OTC 0.0105 %, em 600 ml de água, homogenizada e submetida a um feixe de raios laser. A medida do desvio da luz é inversamente proporcional ao diâmetro de partícula; com os ângulos dos desvios, defini-se a distribuição da população de partículas cristalinas.

### 3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para observação da morfologia da superfície, e da superfície de fratura das micropartículas, as amostras foram coladas em porta amostra com fita dupla face. Foram obtidas micrografias de fraturas das amostras, feitas com nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram revestidas com uma camada fina de ouro, em um metalizador ("sputtering"), e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol, com um voltagem do feixe de 10 Kv. Foram fotografadas as microesferas com várias ampliações, cuja escala está registrada nas micrografias.

# IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERAIS

### *4.1.1 Análise das massas molares médias*

As massas molares médias foram calculadas empregando-se o software Millenium 32, pela integração dos perfis cromatográficos obtidos na região de massas molares maiores (correspondentes à região entre $2x10^6$ e 2500). Para realizar estes cálculos, o software emprega a curva cumulativa (gráfico percentual que representa a relação entre as massas molares e a sua fração mássica). Uma vez construída a curva cumulativa, é possível calcular relativamente as massas molares características.

Observando os cromatogramas das Figuras 4.1 a 4.6, obtidas em duplicatas para mesma amostra, podemos notar dois picos acima da linha de base, correspondente o primeiro ao valor da massa molar média de cada biopolímero e o segundo, provavelmente, traços de impurezas oriundas do próprio processo de obtenção do polímero.

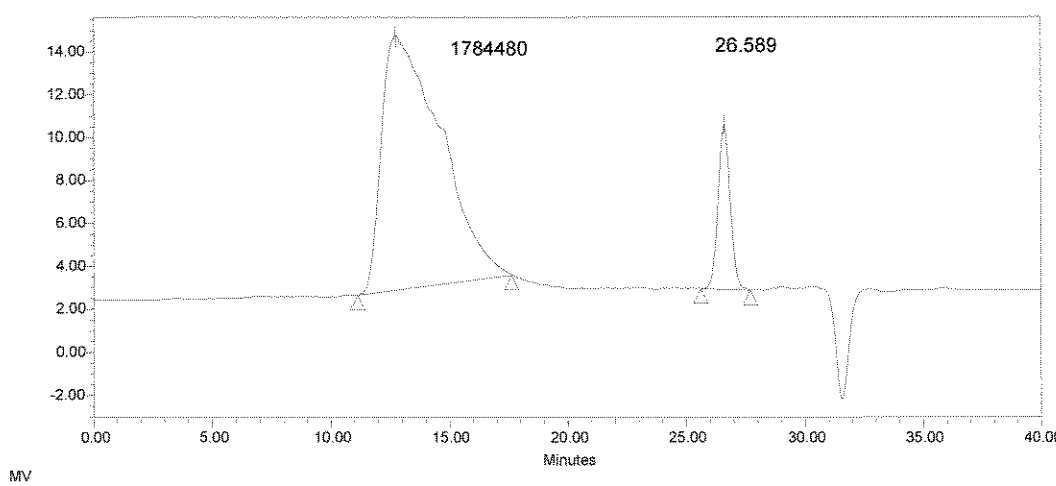



**Figura 4.1** Cromatograma de GPC em fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M, para amostra quitosana alta viscosidade.

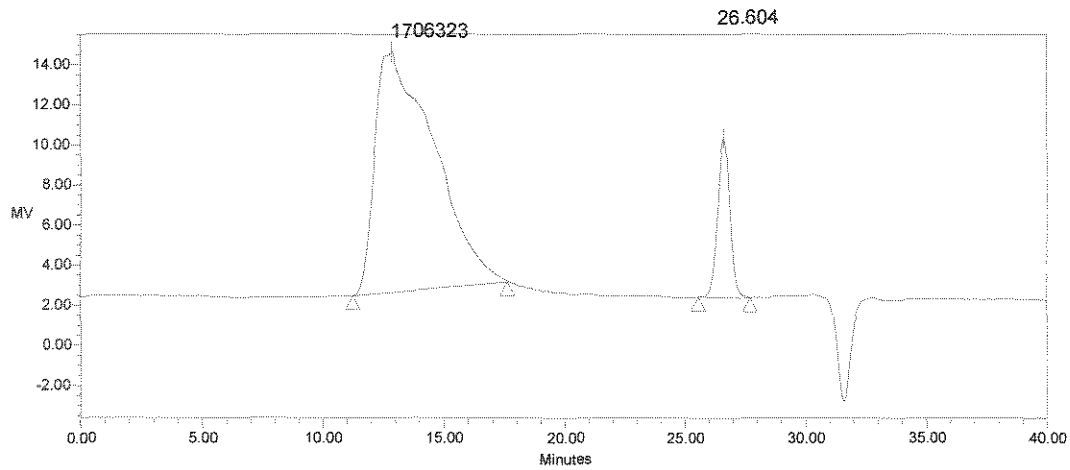



**Figura 4.2** Cromatograma de GPC em fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M para amostra quitosana alta viscosidade.

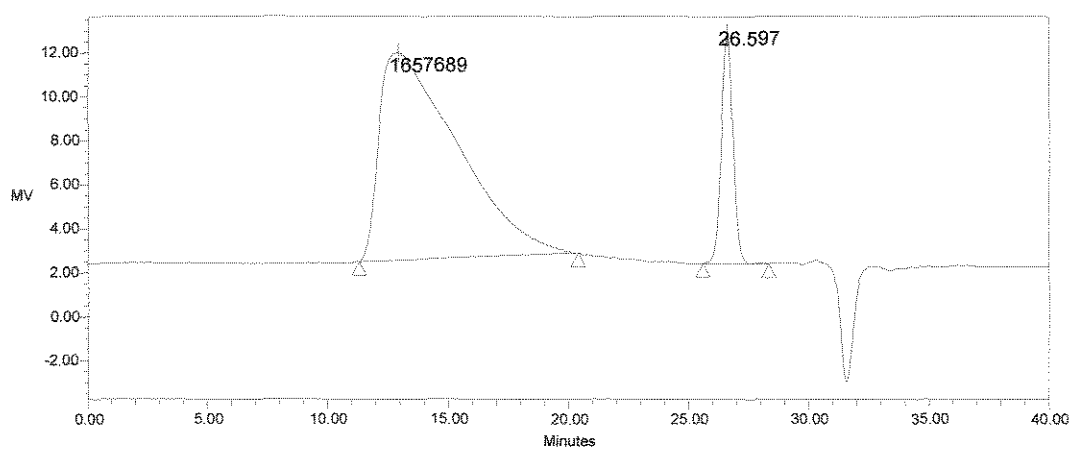



**Figura 4.3** Cromatograma de GPC em fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M para amostra quitosana média viscosidade.

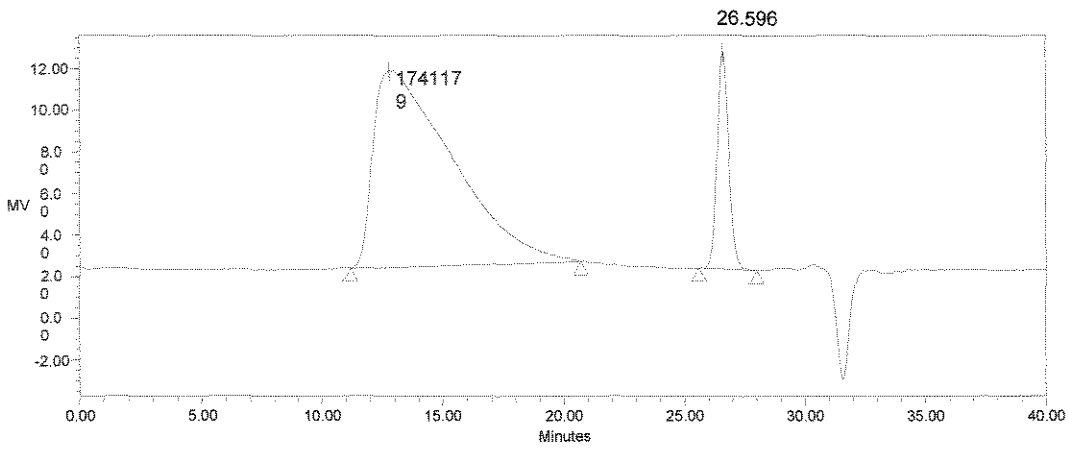



**Figura 4.4** Cromatograma de GPC em fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M para amostra quitosana média viscosidade.

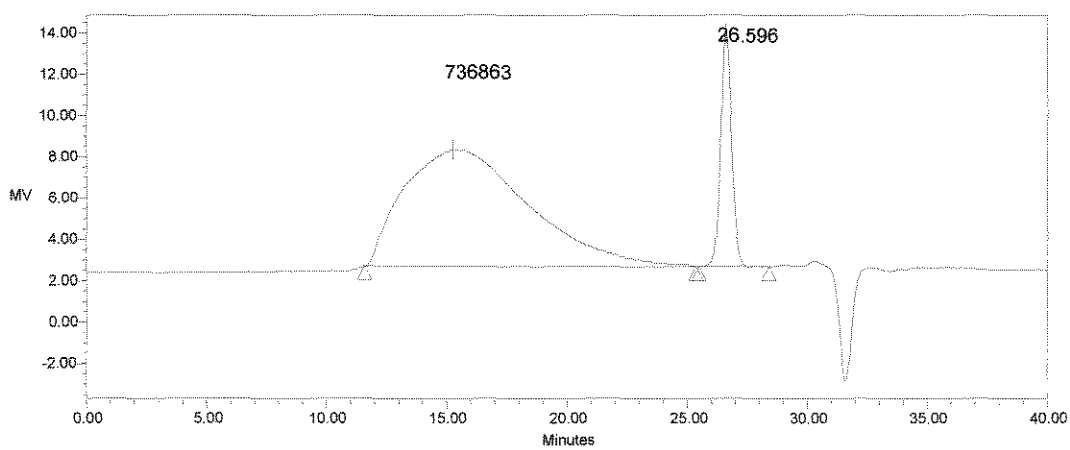



**Figura 4.5** Cromatograma de GPC em fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M para amostra quitosana baixa viscosidade.

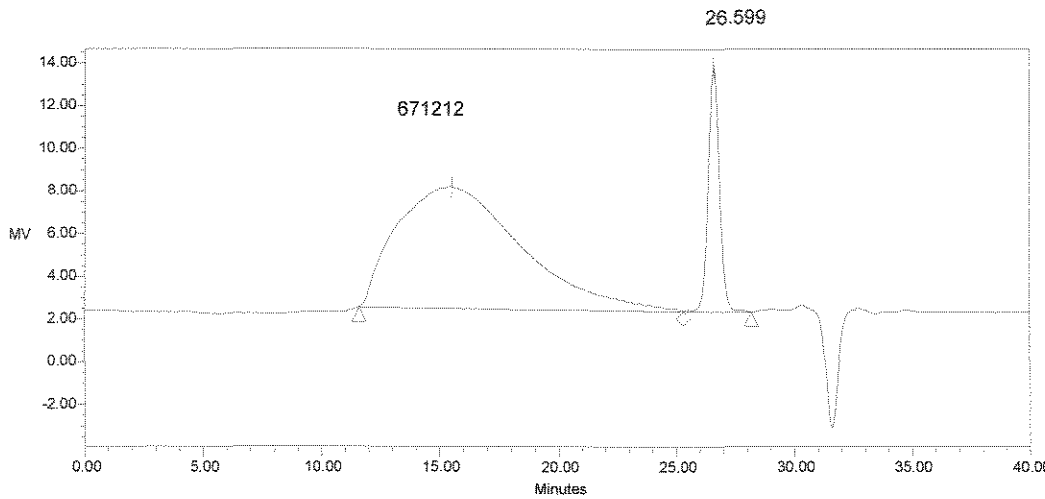



**Figura 4.6** Cromatograma de GPC em fase móvel AcOH 0,33M/NaOH 0,1M para amostra quitosana baixa viscosidade.

Na Tabela 4.1 estão apresentados os valores das massas molares médias e das polidispersividades das três amostras de quitosana. Os valores das polidispersividades indicam uma estreita faixa de distribuição de massa molar, com exceção da quitosana de baixa viscosidade que apresenta-se mais polidispersa e, portanto, menos uniforme. Os dados sugerem, ainda, que a diminuição da massa molar, de qui-av para qui-bv, seguido pelo aumento do índice de polidispersividade, sugerem que as amostras de qui-mv e qui-bv foram preparadas por despolimerização da amostra qui-av, provavelmente, pelo método de hidrólise ácido-base, que promove alguma desacetilação. Assim, quando a quitosana é despolimerizada por hidrólise ácida, uma ruptura aleatória das ligações glicosídicas ocorre ao longo das cadeias de quitosana, gerando uma larga distribuição nas cadeias e um aumento na polidispersividade do polímero.

**Tabela 4.1** Massas molares médias e polidispersividades das amostras de quitosanas obtidas à partir dos cromatogramas mostrados nas Figuras 4.1 a 4.6.

| **Amostras** | $\overline{M}_W$ **(g/mol)** $10^{-5}$ | $\overline{M}_n$ **(g/mol)** $10^{-5}$ | **Polidispersividade** $(\overline{M}_W / \overline{M}_n)$ |
|---|---|---|---|
| **Qui-av** | 12,43 | 10,80 | 1,15 |
| **Qui-mv** | 10,75 | 7,80 | 1,38 |
| **Qui-bv** | 6,70 | 1,74 | 3,90 |

### 4.1.2 *Análise da microestrutura dos biopolímeros por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)*

Na quitosana, derivado obtido por desacetilação parcial de quitina, predominam unidades estruturais desacetiladas que podem apresentar uma proporção e distribuição variáveis nas cadeias. Desta forma, é importante se determinar o grau médio de desacetilação, uma vez que quanto mais desacetilada a quitosana, maior a sua solubilidade. A espectroscopia na região do infravermelho pode ser utilizada para se determinar o grau médio de desacetilação de quitosana, através da banda referente à amida a 1655 $cm^{-1}$, como uma medida do conteúdo de grupo n-acetil. A banda referente à hidroxila em 3450 $cm^{-1}$, é considerada como um padrão interno para corrigir a espessura de filmes ou para diferença na concentração de quitosanas.

SABINS E BLOCK [97] desenvolveram um método para determinar o grau médio de desacetilação. Eles se baseiam na obtenção de curvas de calibração. Para tal, foram utilizadas quatro amostras de quitosanas, de diferentes graus médios de desacetilações, determinados por métodos analíticos. Em seguida, estabeleceu-se uma proporção na quantidade de amostra e de KBr a ser utilizada. Desta forma, a razão de absorbância ($A_{1655}/A_{3450}$) pôde ser obtida, utilizando as seguintes distâncias conforme Figura 4.7, onde a absorbância da banda referente à banda amida é dada pela equação 4.1:

$$\text{Log (DF/DE)} = (A)_{\text{amida}} \qquad (4.1)$$

e para a banda referente à hidroxila, segundo a equação 4.2:

$$\text{Log (AC/AB)} = (A)_{\text{hidroxila}} \qquad (4.2)$$

Assim, DF, DE, AC e AB são definidas na Figura 3.7 e foram usadas no presente trabalho com os graus médios de desacetilação das amostras determinados seguindo o mesmo procedimento experimental e utilizando a equação 4.3:

$$\%\overline{GD} = 97{,}67 - [\,26{,}486.(A_{1655}/A_{3450})] \qquad (4.3)$$

Os valores dos graus médios de desacetilação foram transformados para graus médios de acetilação para uma melhor comparação com outras técnicas. Onde a equação 3.4 foi utilizada:

$$\%\overline{GA} = 100 - \%\overline{GD} \qquad (4.4)$$

Assim, a quitosana, alta, média e baixa viscosidades apresentaram graus médios de acetilação de 20,62; 16,03 e 16,21%, respectivamente.

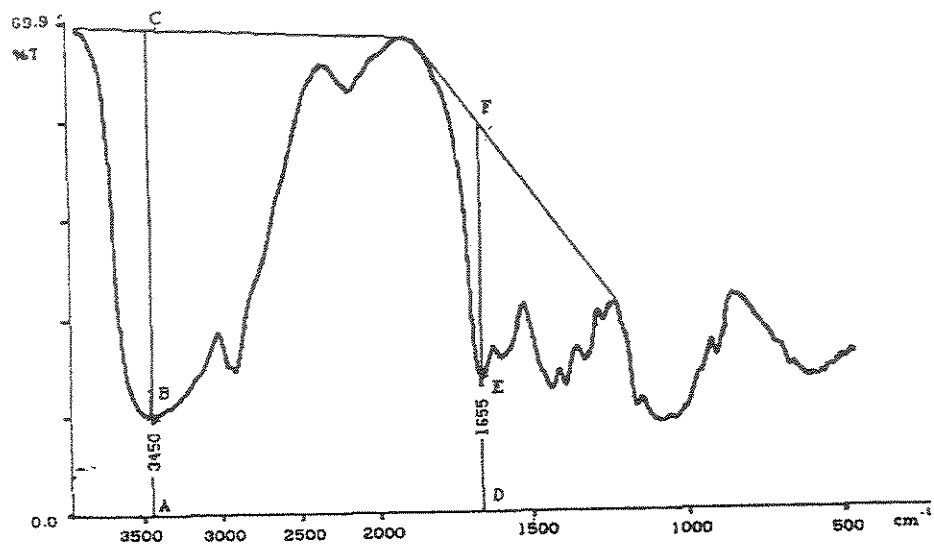



**Figura 4.7** Espectro de FT-IR típico de quitosana [97].

Além disto, o espectro de infravermelho de quitosanas mostram, de acordo com a Figura 4.7, bandas características de absorção 3000 – 4000 $cm^{-1}$ (OH, $NH_2$) e a presença de estiramento vibracional C-O de álcool primário em 1068 $cm^{-1}$ (1090 cm-1 grupo éter); aminas alifáticas em 1070 a 1100 $cm^{-1}$; aminas (N-H) em 1600 $cm^{-1}$, COOH (C=O) em 1700 $cm^{-1}$; amida em 1600-1670 $cm^{-1}$; vibração de deformação de intensidade média N-H de amina primária e de intensidade pequena C-H do grupo $CH_3$, referente ao grupo acetamida, em 1655 $cm^{-1}$ e 1380 $cm^{-1}$ (a quitosana não é completamente desacetilada); sobreposição de aminas, amidas e ânions carboxilatos (O-C-O) em 1400 $cm^{-1}$; grupo alquil (CH) em 1450 $cm^{-1}$; grupos ésteres em 1725-1750 $cm^{-1}$ e 1230 – 1277 $cm^{-1}$, estiramento C-H em 2900 $cm^{-1}$ e presença de hidroxilas (estiramento OH) na região de 3400 $cm^{-1}$ [37].

Os alginatos apresentam espectros na região do infravermelho conforme Figura 4.8 e na Tabela 4.2 estão apresentadas as suas bandas de absorção [96].

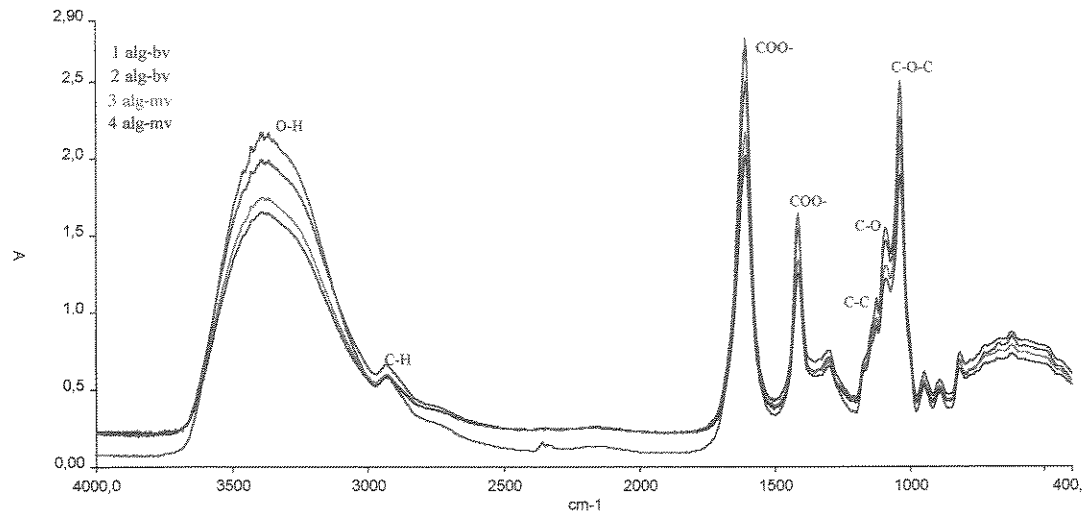



**Figura 4.8** Espectros na região do infravermelho de duas amostras de alginato baixa e média viscosidade.

**Tabela 4.2** - Atribuição das bandas de absorção do alginato de sódio [96].

| Freqüência ($cm^{-1}$) | Forma da Intensidade | Atribuição |
|---|---|---|
| 3360 – 3380 | Banda muito forte | O-H estiramento |
| 3250 | Ombro forte | O-H estiramento |
| 2930 – 2932 | Banda fraca | C-H estiramento |
| 2750 | Ombro fraco | C-H estiramento |
| 1608 – 1611 | Banda aguda muito forte | $COO^-$ estiramento |
| 1413 – 1414 | Banda aguda média | $COO^-$ estiramento |
| 1317 | Banda fraca | C-O estiramento |
| 1294 | Ombro fraco | C-O estiramento |
| 1176 | Ombro fraco | C-O estiramento<br>C-C estiramento<br>C-C-C bending |
| 1124 – 1126 | Banda aguda media | C-C estiramento<br>C-O estiramento |
| 1087 – 1088 | Banda aguda media | C-O estiramento<br>C-O-C estiramento |
| 1059 | Ombro médio | O-H bending |
| 1030 – 1035 | Banda aguda muito forte | ? |
| 997 | Ombro média | ? |
| 947 – 950 | Banda aguda fraca | C-O estiramento<br>C-C-H estiramento |
| 903 | Banda aguda fraca | ? |
| 892 | Ombro fraco | C-C estiramento<br>C-C-H bending<br>C-O bending |
| 818 | Banda fraca | ? |
| 781 | Banda fraca | C-O rotação interna<br>C-C-O bending<br>C-C-H bending |

Pode se observar diferenças claras nos espectros do infravermelho, com relação à diferença de massa molar, devido a banda de O-H ser intensa e significativamente diferenciada.

O PEG apresenta uma estrutura helicoidal, que contém sete átomos por unidade química ($CH_2CH_2O$), e uma sucessão de conformações estruturais trans (CCOC), trans (COCC) e gauche (OCCO) e portanto, a rotação interna de uma série de ligações -O- em CH2-CH2-O- que origina um modelo TGT que assegura os modos de vibrações deste polímero [99].

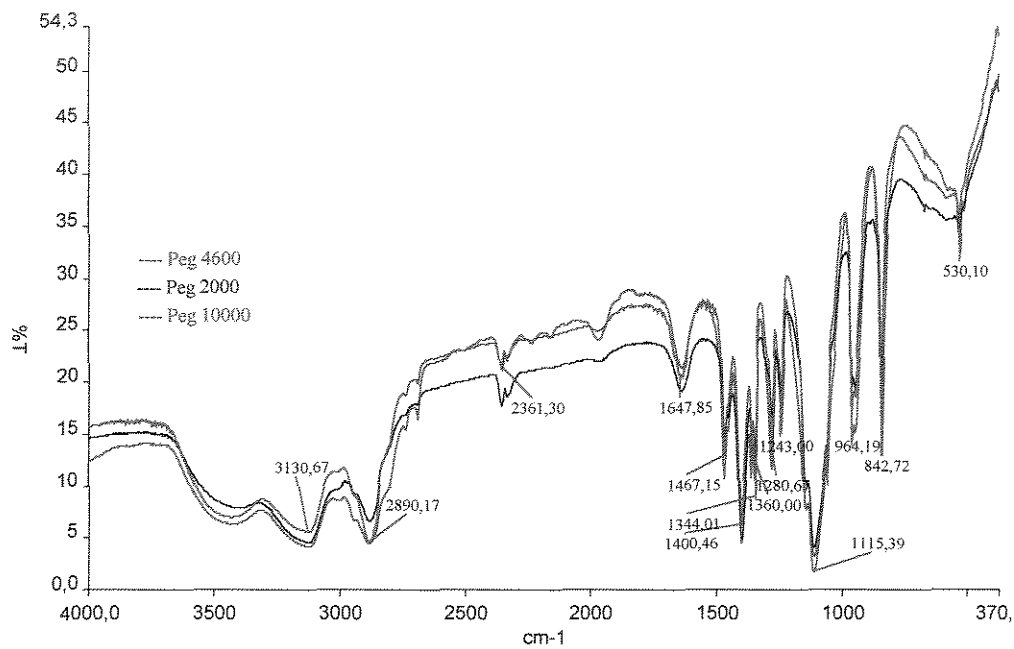



**Figura 4.9** Espectro na região do infravermelho de amostras de PEG com diferentes massas molares.

Nos seus espectros de infravermelho (Figura 4.9) as bandas na região de 1500-800 $cm^{-1}$ são devidas as vibrações de grupos das unidades repetitivas, e as bandas devida ao modo de estiramento C-H são expressas na região de 300-2800 $cm^{-1}$. Além disto, uma banda larga na região de 3000 – 3600 é devida a uma grande quantidade de grupos OH terminais [99].

### 4.1.3 *Análise da microestrutura dos biopolímeros por Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética de Prótons (RMN $^1H$)*

A técnica de RMN permite a determinação do conteúdo de pares (díades) e trincas (tríades) monoméricas adjacentes sendo a mais amplamente utilizada para a determinação da estereorregularidade de um polímero [100]. O grau de estereoregularidade de um polímero esta relacionado às unidades manoméricas que podem ser organizadas na cadeia de maneira aleatória (estatística); alternada; em blocos; ou, ainda, em estruturas ramificadas.

A ressonância magnética nuclear de prótons tem sido largamente utilizada para identificar e quantificar espécies monoméricas. Por exemplo, os graus de acetilação das amostras de quitosana foram determinados através da razão entre as áreas dos prótons metílicos do grupo acetamido ($A_{CH3}$; $\delta$= 2,00 ppm) e do próton ligado ao carbono 2 do anel glicosamina ($A_{H2}$; $\delta$=3,12 ppm), expressa pela equação 4.5 [94]:

$$GA = \frac{A_{CH3}}{3A_{H2}}.100 \qquad (4.5)$$

Além disso, os espectros de RMN de prótons podem apresentar alargamento e superposição de sinais e, apesar desta desvantagem, a RMN de prótons pode ser utilizada com sucesso para fornecer informações sobre a composição, taticidade e configuração de polímeros [100].

Na Figura 4.10 está apresentado um espectro RMN $^1H$ característico de quitosana, em $D_2O$/HCl, com as atribuições dos sinais observados. Nas Figuras 4.11 a 4.13 estão apresentados os espectros de RMN $H^1$ das amostras da quitosana.

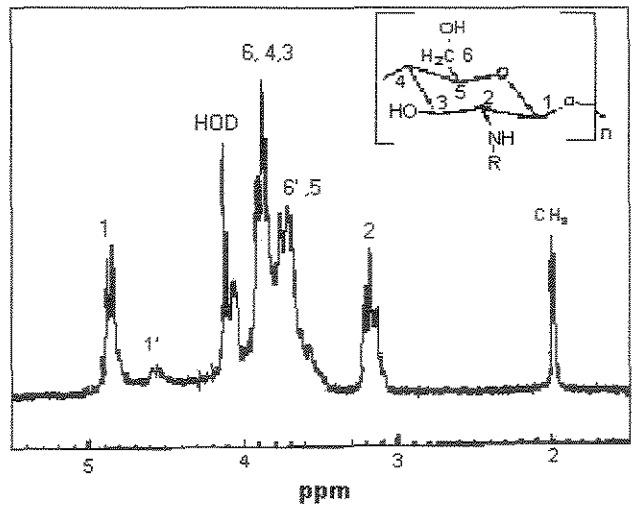



**Figura 4.10** Espectro de RMN $H^1$ típico de quitosana em $D_2O$/HCl, onde R=$COCH_3$ ou H [32].

O espectro de quitosana baixa viscosidade apresentou picos os quais indicam presença de impurezas conforme comparação com os espectros de alta e média viscosidade; porém, não interfere nos picos necessários a determinação do grau de acetilação. A quitosana alta, média e baixa viscosidades apresentaram graus de acetilação de 22,55; 14,58 e 16,11%, respectivamente.

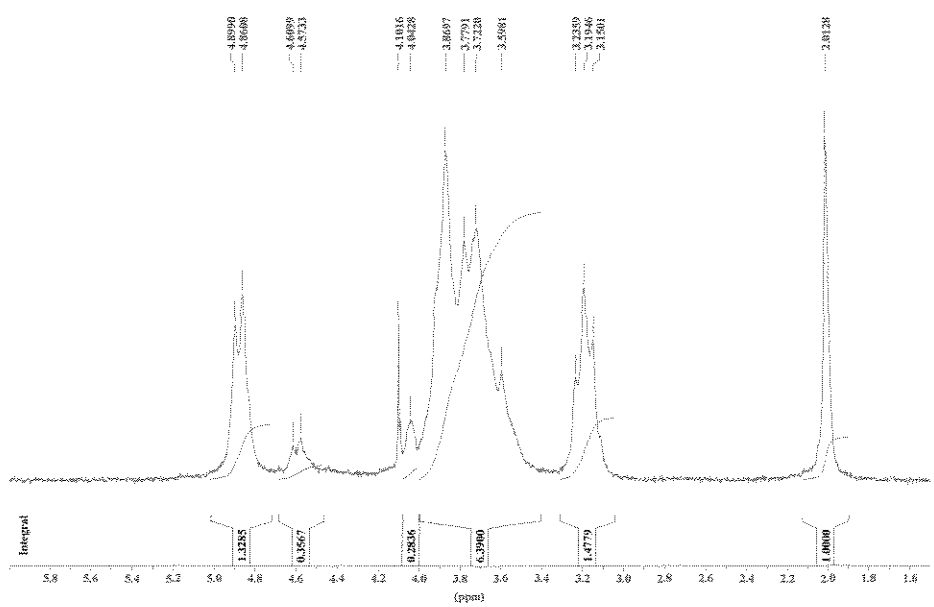



**Figura 4.11** Espectro de RMN $H^1$ da amostra de quitosana alta viscosidade em $D_2O$/HCl.

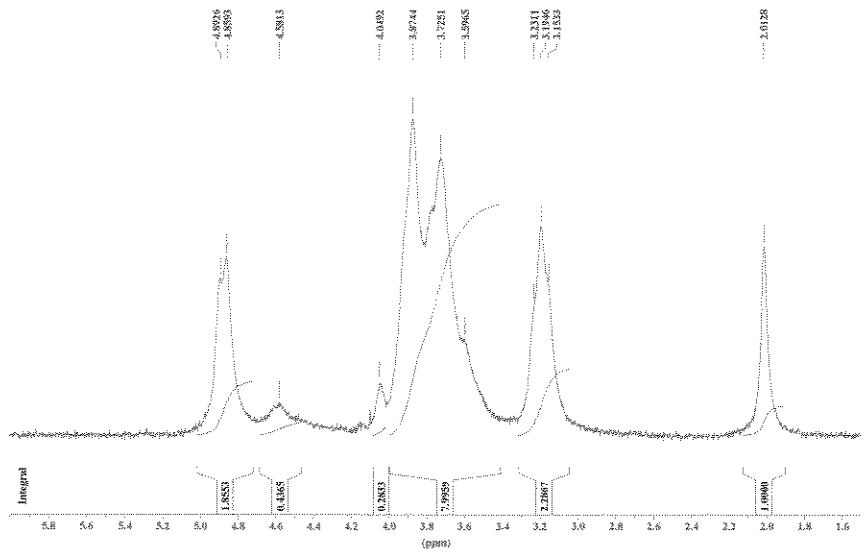



**Figura 4.12** Espectro de RMN $H^1$ da amostra de quitosana média viscosidade em $D_2O$/HCl.

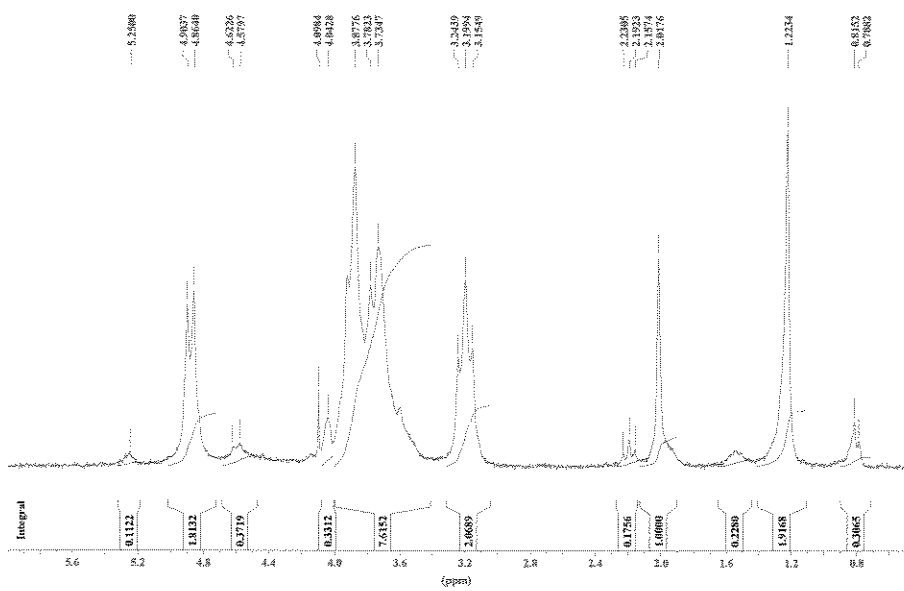



**Figura 4.13** Espectro de RMN $H^1$ da amostra de quitosana baixa viscosidade em $D_2O$/HCl.

O alginato de sódio é um copolímero em bloco e sua microestrutura além de depender da sequência dos comonômeros, depende também dos efeitos de estereo e regiossequências . Por isso, foi adicionado o EDTA a solução com o intuito de impedir que cátions divalentes interagissem com glucuronas, funcionando como quelante. Apresentamos os espectros nas Figuras 4.14 e 4.15, para o alginato de média e de baixa viscosidade, respectivamente.

Existem quatro possíveis dubletes ao longo das cadeias do alginato MM, MG, GM e GG. Assim, a partir do número e área relativa das linhas observadas nos espectros, pode-se avaliar quantitativamente a razão M/G através dos sinais associados a cada bloco [98, 103].

As áreas dos picos na região expandida do espectro referente a 5.05 ppm (G-1), 4,67 ppm (M-1 e GM-5) e 4,45 ppm (GG-5) contém informações sobre a razão M/G e frações de dubletes nas proximidades vizinhas ao longo das cadeias intactas. As proporções das regiões alternadas são proporcionais as áreas destes picos e a fração molar de G é proporcional a área de 5,05 ppm; desta forma, a composição e seqüência de distribuição pode ser obtida [98].

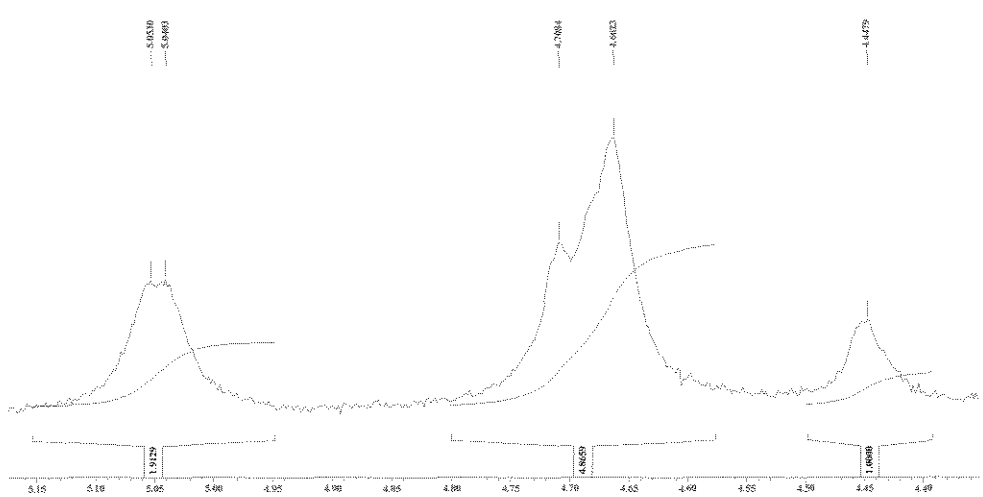


**Figura 4.14** Espectro de RMN $H^1$ do alginato média viscosidade. Espectro expandido na região de interesse.

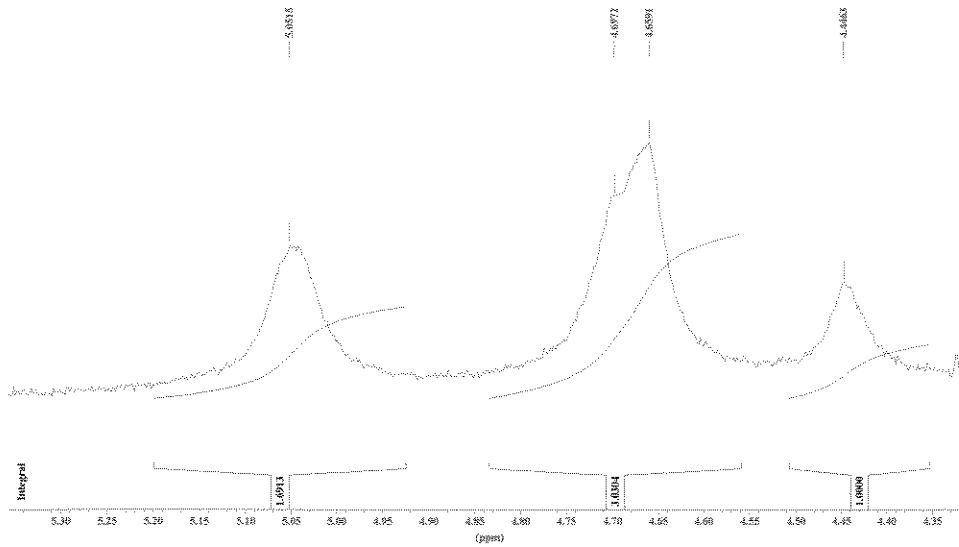



**Figura 4.15** Espectro de RMN $H^1$ do alginato de baixa viscosidade. Espectro expandido na região de interesse.

Os espectros de RMN $^1H$ apresentam pico dominante na região 4,67 ppm, isto significa uma alta fração molar de M e os resíduos G ocorrem em seqüências alternantes.

Quantitativamente, as frações molares de G e do doublete de freqüência $F_{GG}$ são relacionadas com a intensidade (I) das respectivas linhas pelas equações 4.6 e 4.7 [98]:

$$F_G = \frac{I_{5.05}}{I_{4.67} + I_{4.45}} \tag{4.6}$$

$$F_{GG} = \frac{I_{4.45}}{I_{4.67} + I_{4.45}} \tag{4.7}$$

A fração molar de M é então derivada das condições de normalização $F_G$ e $F_M = 1$. As equações 4.8 e 4.9 mostram as frações molares e as freqüência de dubletes são dados por:

$$F_{GG} + F_{GM} = F_G \quad (4.8)$$

$$F_{MM} + F_{MG} = F_M \quad (4.9)$$

Para longas cadeias (GP > 20), correções para resíduos nos finais de cadeias podem ser negligenciadas, então, $F_{MG} = F_{GM}$. Desta forma, valores numéricos para a razão M/G e as freqüências de dubletes foram calculados [98].

Os resultados obtidos para os alginatos de sódio são mostrados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3** Frações e composições dos blocos de alginato de sódio média e baixa viscosidade.

| **Composto** | **Frações e composição** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $F_M$ | $F_G$ | $F_{MM}$ | $F_{MG}$ | $F_{GM}$ | $F_{GG}$ |
| **Alg - bv** | 0,58 | 0,42 | 0,41 | 0,17 | 0,17 | 0,25 |
| **Alg - mv** | 0,67 | 0,33 | 0,51 | 0,16 | 0,16 | 0,17 |

### 4.1.4 Análise Calorimétrica dos Biopolímeros por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e de Perda de Massa por Termogravimetria (TGA)

Em temperaturas muito baixas os polímeros sólidos são rígidos, quebradiços, duros, vítreos e em temperaturas mais altas comportam-se como viscoelásticos ou borrachosos, sendo assim eles são sensíveis às mudanças de temperatura. A diferença entre o estado vítreo e o borrachoso, do ponto de vista molecular, está na mobilidade das cadeias poliméricas e esta transição é conhecida como transição vítrea ($T_g$).

Pela sua natureza cinética, $T_g$ depende da escala de tempo das perturbações aplicadas ao polímero. Por esta razão, a calorimetria exploratória diferencial pode ser utilizada desde que assegurado que todas as amostras tenham a mesma história térmica, sendo um mesmo procedimento adotado para todas as amostras.

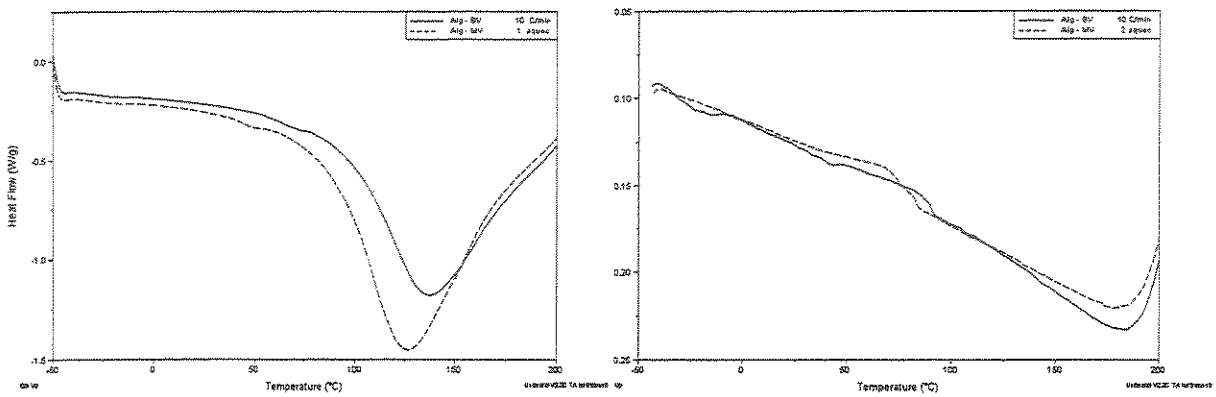
Foram feitas as análises de DSC de todas as amostras, sendo realizados um primeiro e segundo aquecimento. Nas curvas de DSC do alginato, segundo Figura 4.16, não foram observadas as transições vítreas. Observou-se no primeiro aquecimento um pico endotérmico característico, entre 90 e 150 °C, que pode ser devido a perda de água estrutural. Nesta mesma Figura, encontra-se nos itens c e d as correspondentes curvas de TGA, que permitem determinar o teor de umidade. Para o alginato baixa viscosidade encontrou-se um teor de 8.0%, enquanto para o de média viscosidade o valor foi de 6.6%, entre 90 e 150 °C como descrito.

No aquecimento destas amostras deveria ser possível observar a temperatura de transição vítrea na qual as amplitudes de vibração dos átomos provocaria a dilatação do sólido; levando ao aumento do volume livre. Provavelmente, a técnica não detecta a quantidade de calor de todas estas mudanças e o sinal característico não é observado nas curvas de DSC.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

a. b.




c. d.

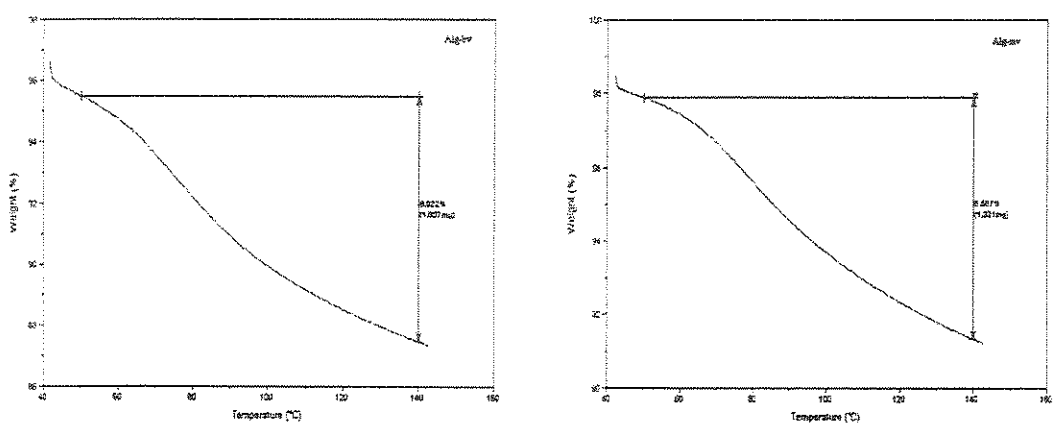
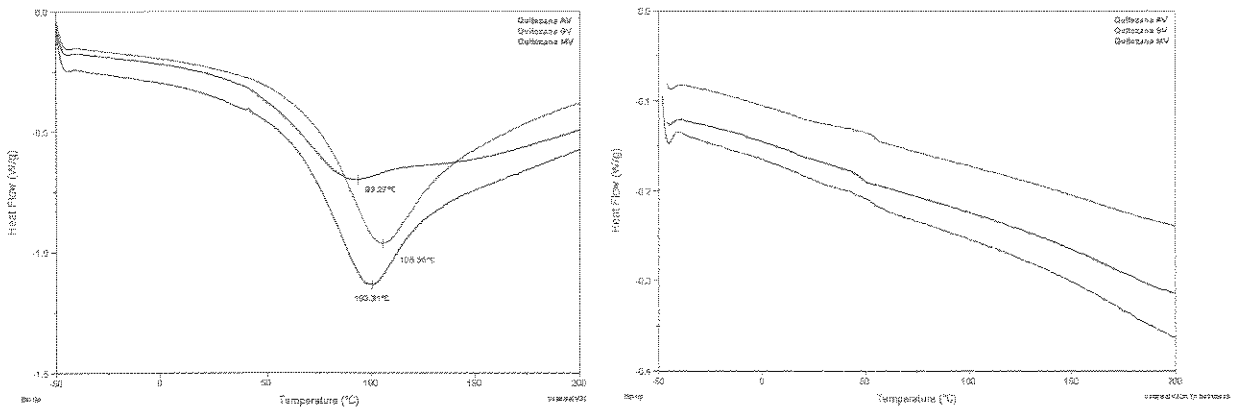



**Figura 4.16** Curvas de DSC para as amostras de alginato: a. primeiro e b. segundo aquecimentos a 10 °C/min e c e d curvas de TGA para o alg - bv e alg - mv.

As três amostras de quitosanas, segundo Figura 4.17, em seu primeiro aquecimento, também apresentaram um pico endotérmico característico entre 120 e 140 °C que pode ser devida a perda de água estrutural que desaparece no segundo aquecimento.

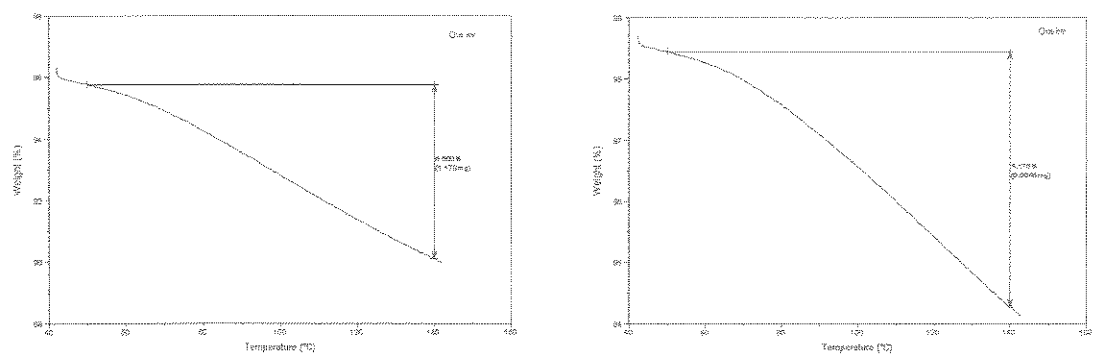
a.

b.




c.

d.




e.

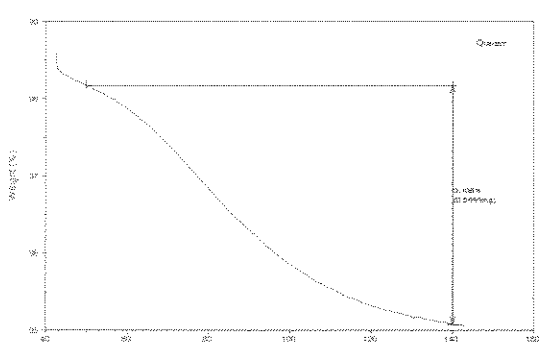
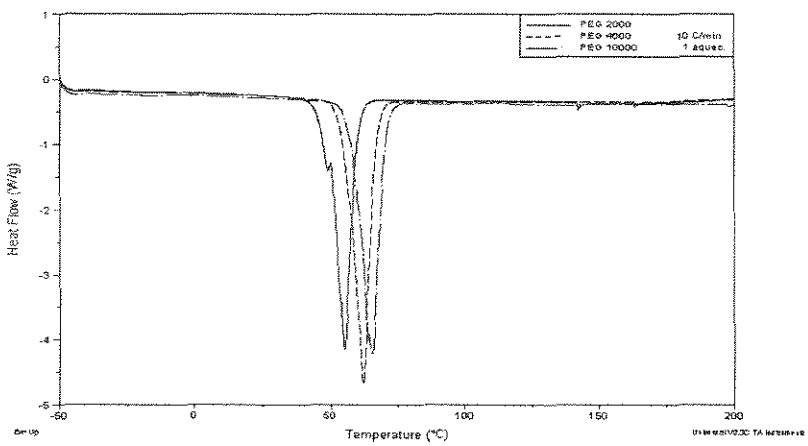



**Figura 4.17** Curvas de DSC E TGA para as amostras de quitosana purificadas. a. DSC 1° aquec., b. DSC 2° aquec. a 10 °C/min, c.TGA para qui-av, d. TGA para qui-bv e e. TGA para qui-mv.

As três amostras de polietileno glicol em seu primeiro aquecimento são cristalinas, segundo Figura 4.18. No segundo aquecimento um deslocamento na temperatura de fusão foi observado com novos valores para o PEG de massa molar 2000, 4600 e 10 000

a.




b.

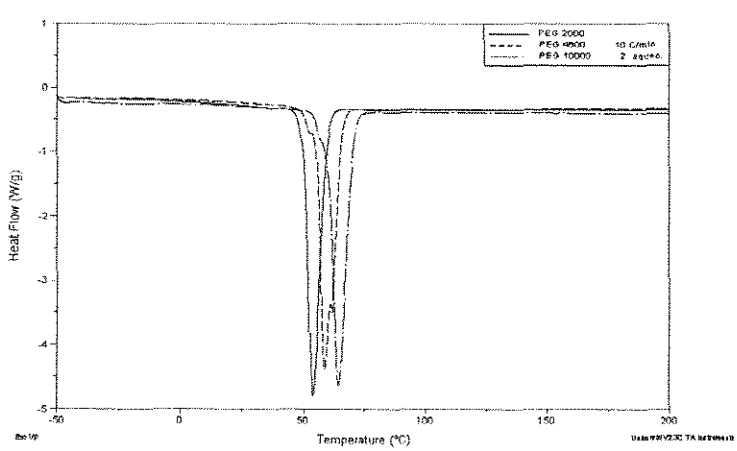



**Figura 4.18** Curvas de DSC para as amostras de PEG. a. primeiro e b. segundo aquecimentos a 10 °C/min.

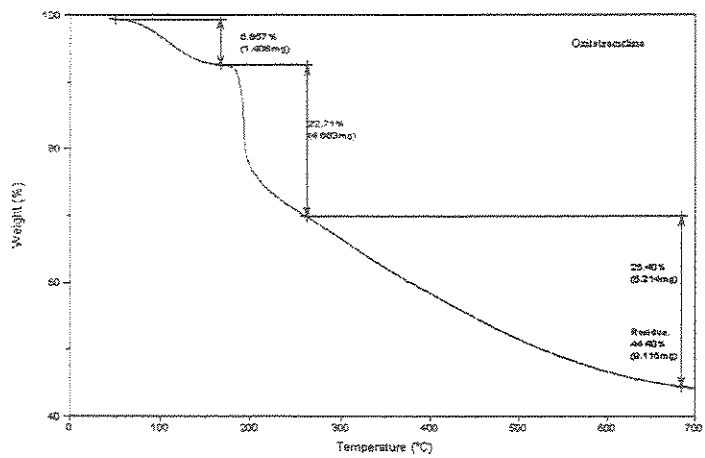



**Figura 4.19** Curvas de TGA para a amostra de oxitetraciclina a 10 °C/min.

Observamos três perdas de massa do fármaco. A primeira ocorre em uma faixa de temperatura entre 50 a 100 °C, com uma perda pequena de massa em termos de percentagem; o que nos leva a crer ser devido à perda de água da amostra. O segundo estágio ocorre entre 150 a 280 °C e mostra uma perda de massa maior. O último estágio ocorre a temperatura acima dos 280 °C e apresenta alta perda de massa em relação aos demais, sendo relacionada a degradação do fármaco.

### *4. 1.5 Analise da microestrutura dos biopolímeros por Espalhamento de Raio X* de Alto Ângulo (WAXS)

As cadeias macromoleculares de um polímero podem estar dispostas aleatoriamente ou com ordenação molecular. No primeiro caso, o polímero é dito amorfo e no segundo é considerado semicristalino. Há dois fatores principais para uma maior ou menor tendência ao ordenamento de cadeias: a configuração da cadeia polimérica e a intensidade das interações entre cadeias.

Em situações de alinhamento de cadeias, devido ao estiramento ou à ação de um campo; o polímero pode continuar a ser não cristalino e mostrar reflexões peculiares, em um difratograma de raios-X.

As principais técnicas utilizadas para a caracterização da organização molecular são: espalhamento e difração de raios-X; métodos térmicos; RMN de sólidos; espalhamento de nêutrons e espalhamento de luz em baixo ângulo [104].

O método de espalhamento de raios-X é uma das técnicas mais antigas e mais utilizadas para o estudo da estrutura dos polímeros. Um feixe de raios-X incidente em um material é parcialmente absorvido, parcialmente espalhado, e o restante é transmitido sem modificação. O espalhamento dos raios-X ocorre como um resultado da interação com os elétrons no material. Os raios-X espalhados de diferentes elétrons sofrem interferência entre si e podem até produzir um padrão de difração. A variação da intensidade espalhada e difratada com o ângulo de espalhamento dá informações sobre a distribuição de densidade eletrônica e, portanto, das posições atômicas dentro do material [105].

As técnicas de espalhamento de raios-X mais comuns são o espalhamento de raios-X a alto ângulo (WAXS = wide-angle X-ray scattering) e espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS = small-angle X-ray scattering). Em termos gerais, WAXS é utilizado para obter informações estruturais na escala de 1 nm ou menor e SAXS na escala de 1-1000 nm [104]. A relação de Bragg, escrita como $d = \lambda/2.\text{sen}\theta$, onde $\lambda$ é o comprimento de onda da radiação, e $\theta$ o ângulo de intensidade máxima de espalhamento, pode ser utilizada para se estimar a escala de tamanho responsável pelo máximo espalhado.

Os difratogramas de raios X para as amostras de quitosana comercial Aldrich e para as mesmas purificadas, encontram-se nas Figuras 4.20 a 4.22.

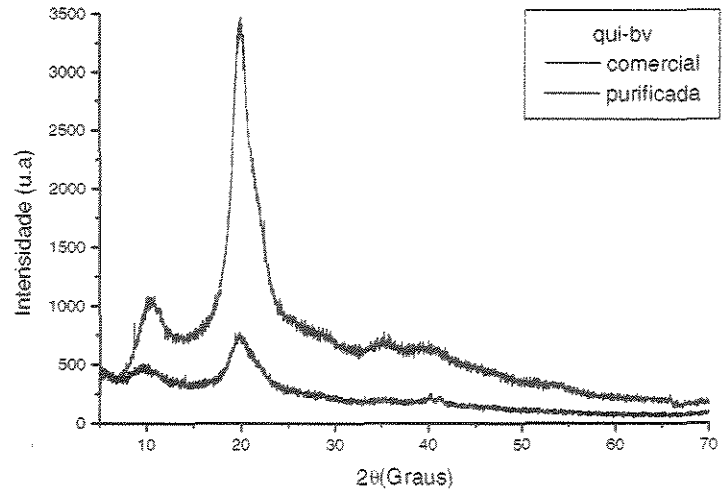



**Figura 4.20** Difratogramas de raios X (WAXS) para amostras de quitosana baixa viscosidade (qui-bv) original e purificada.

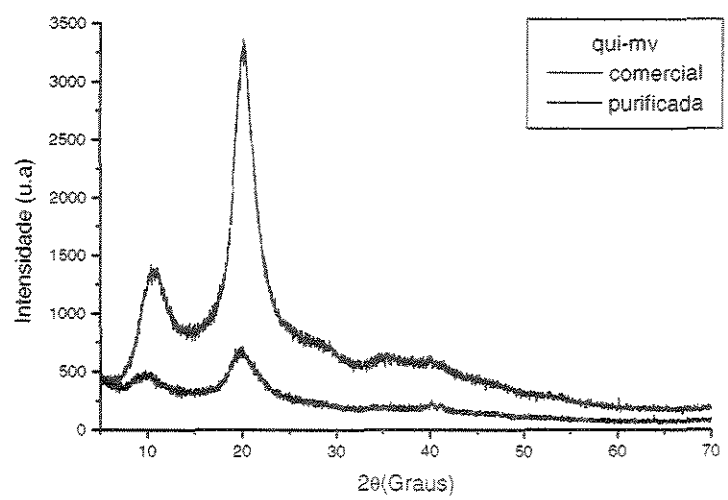



**Figura 4.21** Difratogramas de raios X (WAXS) para amostras de quitosana média viscosidade (qui-mv) original e purificada.

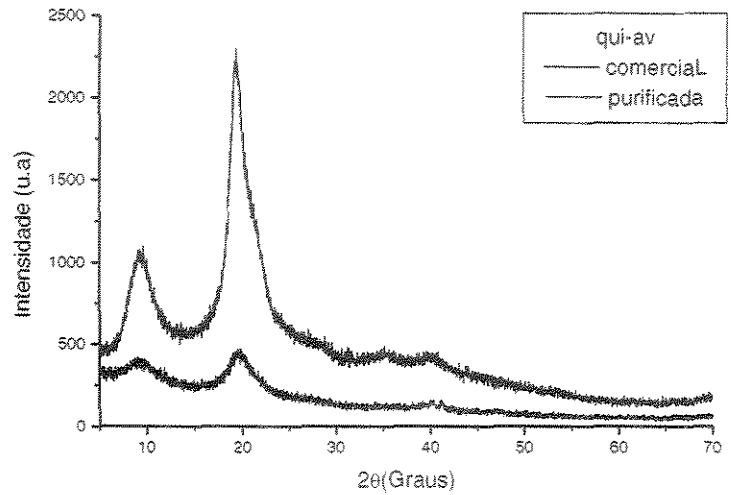



**Figura 4.22** Difratogramas de raios X (WAXS) para amostras de quitosana alta viscosidade (qui-av) original e purificada.

O padrão de espalhamento de um polímero amorfo consiste somente de halos alargados que, entretanto, podem oferecer informações úteis sobre o estado de empacotamento das moléculas no interior da matriz amorfa.

Percebemos que as quitosanas alta, média e baixa viscosidade são polímeros em que coexistem segmentos em regiões ordenadas (formando domínios cristalinos) por volta de 2θ igual a 21, com reflexão mais forte, e segmentos desordenados por volta de 2θ igual a 11.

Os índices de cristalinidade de quitosana podem ser determinados a partir de análises de difração de raios X, segundo a equação 4.10 [106]:

$$\%I_{CR} = (I_C - I_A)/I_C X100 \qquad (4.10)$$

onde:

$I_{CR}$ é o índice de cristalinidade,

$I_C$ intensidade difratada relativa à região cristalina (2θ≅20)

$I_A$ intensidade difratada relativa à região amorfa (2θ≅12).

A tabela 4.4 apresenta os valores encontrados no grau de cristalinidade das quitosanas calculados pela equação 4.10.

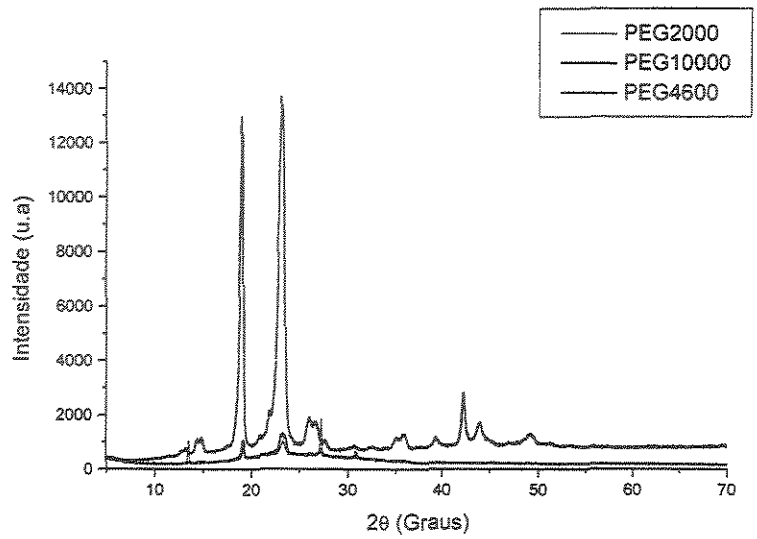
**Tabela 4.4** Representação dos Índices de Cristalinidade ($I_{CR}$) em percentagem para cada amostra de quitosana utilizada nesta pesquisa.

| Amostra | $\%I_{CR}$ | |
|---|---|---|
| | comercial | purificada |
| qui-av | 51,2 | 18,7 |
| qui-mv | 58,0 | 33,2 |
| qui-bv | 66,3 | 39,9 |

Notamos, ainda, que todas as amostras de quitosana purificadas apresentaram menor cristalinidade que as amostras comerciais. De fato, os difratogramas destas amostras mostram sinais menos intensos que os observados para a quitosana comercial. Assim, essas diferenças podem ser atribuídas à ocorrência de modificações no empacotamento das cadeias poliméricas devido ao processo de purificação da quitosana, diferentemente do observado para as amostras de quitosana de SIGNINI E CAMPANA [106]. Provavelmente, as interações por pontes de hidrogênio entre o grupo amino e o grupo hidroxil na quitosana tenham sido rompidas pela presença do solvente usado na purificação da quitosana, o que resultou em uma maior porcentagem de estrutura amorfa.

Os diversos PEG apresentam difratogramas de raio X conforme Figura 4.23. Nesta Figura podemos perceber claramente que os difratogramas das amostras PEG 2000 e 10000 são indistinguíveis entre si (ver Figura 4.23 a). Já a curva correspondente a amostra PEG 4600 apresenta maior resolução e é bastante distinguível das outras. Este último se destaca pelos picos de intensidade relativamente alta. No entanto, observando a Figura 4.23 b nota-se a região amorfa com picos referente à fase cristalina como diferencial entre as curvas.

a.




b.

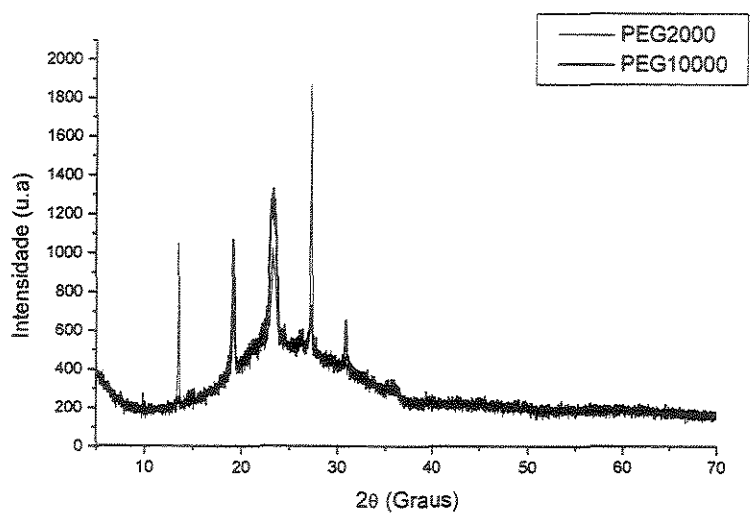



**Figura 4.23** Difratograma de raios X para os diversos tipos de PEG: a) sobreposições dos diversos PEG b) sobreposição dos PEG 10000 e 2000.

Apesar de não ser feita uma determinação quantitativa de graus de cristalinidade para o PEG, o exame qualitativo dos difratogramas apresentados permite concluir que as amostras são semi-cristalinas, como esperado para uma cadeia linear ordenada, sendo o PEG 4600 o mais cristalino.

## 4.2 LIBERAÇÃO DE OTC EM pH 1,2 E 7,4

A via de administração mais freqüente para os fármacos é a oral; embora alguns sejam destinados à dissolução na boca, a maior parte deles é deglutida. Destes, a maioria é administrada para que tenha efeitos sistêmicos que aparecem depois da absorção, a partir das várias superfícies ao longo do trato gastrointestinal [107].

Uma vez administrado, e iniciada sua absorção, o fármaco não permanece em um só local; ao contrário, ele é distribuído por todo o organismo, até a eliminação total (ver Figura 4.24). Por exemplo, depois da administração oral, e de sua entrada no trato gastrointestinal, uma parte é absorvida pelo sistema circulatório, a partir de onde será distribuído para os outros líquidos, tecidos e órgãos do corpo. A partir desses locais, pode retornar para o sistema circulatório e ser excretado através do rim, ou ser metabolizado pelo fígado e outros locais, sendo excretado como metabólitos [107].

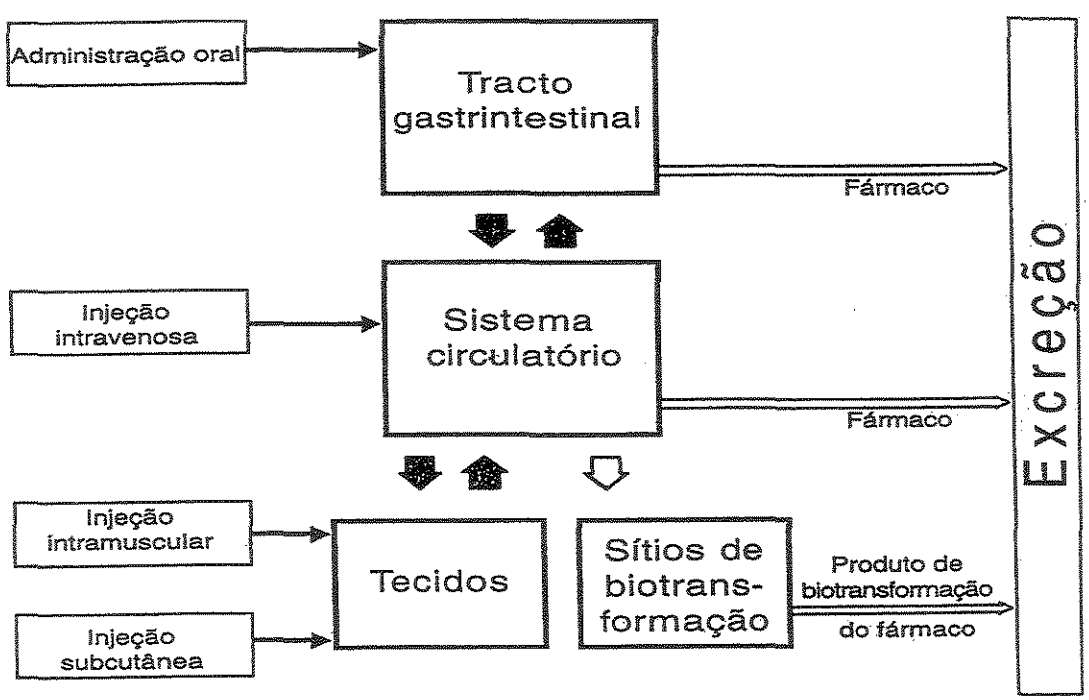



**Figura 4.24** Representação esquemática dos eventos de absorção, biotransformação e excreção dos fármacos depois de sua administração pelas diversas vias [107].

Em comparação com as vias alternativas, a via oral é considerada o meio mais natural, simples, conveniente e seguro de administração de fármacos. Entretanto, deve-se considerar as desvantagens dessa via; tais como: a resposta lenta (em comparação com a via parenteral); probabilidade de absorção irregular, dependendo de fatores como constituição física, quantidade ou tipo de alimento presente no trato gastrointestinal; e destruição de certos fármacos pela reação com os ácidos do estômago ou com as enzimas gastrointestinais [107].

Neste trabalho a OTC, antibiótico que apresenta um largo espectro de ação, apresenta a desvantagem de irritar o estômago. Assim, o nosso objetivo foi desenvolver um sistema de liberação que passasse intacto pelo estômago e tivesse maior absorção no sistema intestinal.

Os perfis de liberação de OTC em microesferas de alginato de cálcio, média e baixa viscosidades, em tampão 0,2 M tris-HCl (pH 7,4), estão apresentados na Figura 4.25.

Comparando-se os valores experimentais aos valores calculados, segundo a Figura 4.25, observamos uma representatividade muito boa dos resultados experimentais ao modelo matemático. Isto nos leva a crer que a OTC difunde livremente das microesferas de alginato de cálcio, para a solução tampão 7,4, seguindo o modelo de equação desenvolvida por CRANK [90]. Além disso, a liberação inicial de OTC apresenta claramente um efeito de disparo (burst) nos dois tipos de microesferas. Este efeito pode ter origem durante a secagem, quando a água difunde para fora das microesferas, a OTC pode ser carregada com ela estando dissolvida, podendo se depositar na superfície ou também por não estar completamente encapsulada.

O mecanismo de transporte do agente ativo através da microesfera pode ocorrer [108]: através de uma fase polimérica contínua [109]; através de canais interconectados; na forma de poros minúsculos ou pequenas rompimentos [110]; paralelamente, através da fase polimérica contínua, e através de canais interconectados [111]. Desta forma, a liberação controlada ocorre por permeação do fármaco pelos poros da matriz polimérica, sendo mantida pela diferença de concentração entre a matriz polimérica e o meio, que controlará a liberação no

sistema em função do tempo. Além disso, o intumescimento da matriz polimérica pode ou não ocorrer.

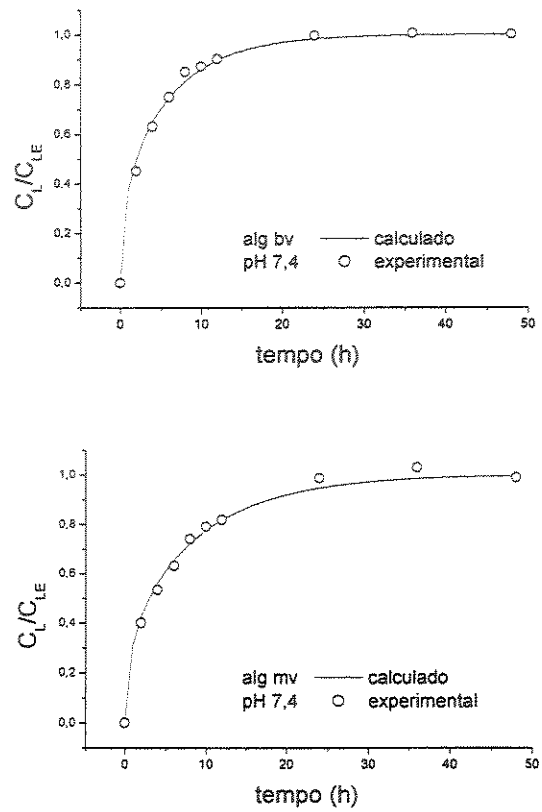



**Figura 4.25** Liberação controlada de OTC em microesferas de alginato de cálcio baixa viscosidade (alg-bv) e alginato de cálcio média viscosidade (alg-mv) em tampão 0,2 M tris-HCl (pH 7,4).

Na Tabela 4.4 apresentamos os valores de diâmetro médio; porcentagem de intumescimento e coeficiente de difusão de OTC, encapsulada em microesferas de alginato de cálcio, de baixa e de média viscosidade, cuja liberação foi seguida em pH 7,4 e 1,2, por 48 h de ensaio.

Os valores de diâmetro e a porcentagem de intumescimento indicam que massa molar elevada de alginato produz esferas maiores, com retenção maior de água, devido, talvez a um volume livre maior entre as cadeias, as quais podem se expandir e acomodar mais moléculas de água. Este resultado também foi obtido

por MATULOVIC et. al. [112] e SKJÅK-BRÆK et. al [113] os quais verificaram que o tamanho das microcroesferas depende primariamente da superfície de tensão (viscosidade) da solução de alginato de sódio e da distância entre o gotejamento e a solução, e não do diâmetro interno da agulha.

**Tabela 4.4** Valores médios de diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficiente de difusão em pH 7,4 e 1,2 para as microesferas de alginato de cálcio de baixa e de média viscosidade.

| Microesferas alginato | Diâmetro médio (μm) | Porcentagem de intumescimento | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 7,4) | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 1,2 ) |
|---|---|---|---|---|
| Alg-bv | 507 ± 80 | 90,5 ± 0,4 | (27,4 ± 5,0) | - |
| Alg-mv | 662 ± 81 | 91,8 ± 0,3 | (23,3 ± 7,8) | (183,0 ± 16,4) |

Os resultados mostram que não houve diferença significativa na liberação de OTC nos dois casos, conforme se nota na Tabela 4.4 em pH 7,4, ou seja, está dentro do erro experimental de medida, de acordo com os valores dos coeficientes globais de difusão (D) para a OTC nas microesferas de alginato de cálcio. Uma vez que a massa molar do alg-bv é relativamente menor que a do alg-mv, e isso não alterou a liberação da OTC, fica evidente que a massa molar do alginato não aparenta ser fator determinante na liberação do fármaco.

Um outro fator que pode estar associado à obtenção de valores de difusão tão próximos está relacionado à estrutura de rede tridimensional formada na gelificação, o que pode interferir na liberação do fármaco. A estrutura de rede tridimensional do alginato depende da razão M/G, frações G-G e frações M-M, além do comprimento das cadeias. O valor da fração M para o alg-bv foi de 0,58, enquanto que para o alg-mv foi de 0,67; a fração dos blocos M-M apresentou o valor de 0,41 para alg-bv e 0,51 para o alg-mv. As disposições dos blocos G-G ao longo das cadeias, e o tamanho das mesmas, são responsáveis pela estrutura final da rede tridimensional formada. Assim, nos dois tipos de alginato a fração de blocos M é maior que a dos blocos G, e mesmo tendo o alg-bv maior conteúdo de

blocos G, não foi observada diferença significativa na liberação de OTC nestas microesferas. Deste modo, a liberação de OTC nestes géis, provavelmente, também vai depender da irregularidade de blocos M e G, responsável por uma menor ou maior porosidade da rede polimérica.

Sabe-se que os principais fatores que influenciam o coeficiente de difusão no sistema polimérico são o tamanho e formato da molécula do agente ativo; a flexibilidade das cadeias poliméricas e a densidade de empacotamento, ou cristalinidade, das cadeias poliméricas. Isto reafirma o efeito de uma cadeia amorfa de alginato na conformação da rede, aliada a valores baixos de conteúdo G.

TOMIDA et al. [114] observaram que quando esferas de alginato de cálcio são obtidas pelo gotejamento da solução de alginato de sódio, contendo o material de recheio na solução de cloreto de cálcio, o modelo parece ser o de difusão controlada pela matriz do gel. Segundo MARTINSEN et. al [115], o coeficiente de difusão de albumina em 4% de géis de alginato de cálcio, provenientes de Laminaria digitada, Macrocytis pyrifera e L. Hyperbores cresceu com o decréscimo do conteúdo de ácido gulurônico (G). OSTEBERG e GRAFFUER [116] observaram que alginatos, contendo menores quantidades de conteúdo G na matriz, apresentaram mais baixa eficiência de encapsulação e também uma liberação do agente ativo mais rápida.

O efeito de disparo, dentre as liberações de OTC em pH 7,4, foi menor no alginato de sódio de média viscosidade, segundo Figura 4.24, apesar de apresentar uma fração menor de blocos G-G de 0,17. Por isso, foi escolhido o alginato de sódio média viscosidade para ser o material das microcápsulas, aliado ao efeito da viscosidade facilitar a síntese das mesmas.

Na Figura 4.26 tem-se o perfil da liberação de OTC em microesferas de alginato de cálcio média viscosidade, em meio ácido. Observa-se que a liberação é rápida, o que implica que o fármaco é liberado quase instantaneamente quando é colocado no meio. O seu coeficiente de difusão foi de (183,0 ± 16,4) $10^{-6}$ $cm^2/h$. Este resultado indica que a velocidade de liberação foi em torno de oito vezes maior neste meio, quando comparada ao tampão 7,4; e que o efeito de disparo (burst) foi em torno de duas vezes maior. A liberação mais rápida em fluído gástrico simulado é atribuída ao fato da OTC ser muito solúvel em meio ácido. A

solução ácida penetra na matriz das microesferas de alginato de cálcio dissolvendo rapidamente os cristais do fármaco, o que provoca rápida difusão do mesmo para fora das microesferas. A administração de antibiótico quase sempre irrita o estomago, motivo pelo qual a liberação em meio intestinal é o mais desejado. O ajuste do modelo matemático apresenta uma região de desvio, como se observa na Figura 4.26.

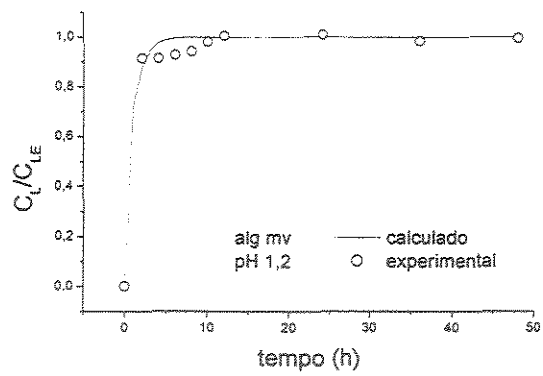



**Figura 4.26** Liberação controlada de OTC em microesferas de alginato de cálcio média viscosidade, em 0,1 M HCl pH 1,2.

O pH do meio externo exerce influência sobre o comportamento das microesferas de alginato de cálcio. Notou-se que elas são estáveis e não intumescem em pH ácido, como do estômago; mas intumescem em pH intestinal, alcalino. Por isso, as microesferas apresentam liberação controlada em pH 7,4; no entanto, a velocidade de difusão varia de amostra para amostra, resultando em desvio padrão elevado. Esse comportamento pode ser explicado estudando a morfologia das micropartículas.

Mesmo com este comportamento adverso, o mecanismo de transporte de OTC em pH 7,4 é algo extremamente interessante de se aprofundar. Quando as microesferas entram em contato com esse meio, sua $T_g$, nesse pH, diminui para um valor abaixo da temperatura de liberação. Com isso, a microesfera passa para um estado elastomérico, ou seja, sua estrutura torna-se mais flexível ocorrendo relaxações das cadeias de alginato. Como as microesferas de alginato são hidrofílicas devido aos grupos –OH e –COOH em sua cadeia, a água do meio se aloja nos volumes livres e se liga através de pontes de hidrogênio na cadeia do alginato. Desta forma, os grupos polares são hidratados, a rede intumesce, e os

grupos hidrofóbicos são expostos. Tais grupos também interagem com moléculas de água, levando a formação de água ligada hidrofobicamente ou "água de ligação secundária" (*secondary bound water*). A microesfera neste estágio torna-se, então, um hidrogel e aumenta seu diâmetro. Após os sítios hidrofóbicos e polares interagirem com moléculas de água ligadas, a rede absorve água adicional, devido a direção das forças osmóticas das cadeias, levando à "diluição infinita". O intumescimento adicional ocorre pela "água livre" (*free water* ou *bulk water*), que é absorvida quando grupos hidrofóbicos, polares e iônicos tornam-se saturados com água ligada. É assumido que esta água preenche os espaços entre as cadeias da rede e/ou o centro de macroporos ou vazios [13,117].

A importância pratica da presença de água nos hidrogéis, para a tecnologia de liberação controlada, é sua relação com o transporte. A água que é ligada ao polímero não será capaz de contribuir muito para a dissolução dos cristais de OTC. No entanto, água livre no gel promove um bom ambiente para dissolução e transporte do mesmo [13].

TANAKA et. al. [91] prepararam esferas de alginato de cálcio contendo diferentes solutos, com diversas massas molares. Os autores prepararam esferas (3,3 ± 0,2 mm) por gotejamento de uma solução de alginato (2% ou 4%) contendo o soluto, em uma solução de cloreto de cálcio preparada em tampão tris 1M (pH 7,0). As esferas foram gelificadas por 2 h na solução tampão. Em seguida montaram um reator específico, onde a velocidade de agitação foi de 625 rpm e a temperatura constante de 30 °C. A difusão, também calculada a partir da equação 1.7, porém com outra abordagem matemática, ocorreu em água como o meio de liberação. Eles observaram que os valores de D, para os solutos de massas molares baixas como glucose, L-triptofan e massa molar mais elevada, como α - lactoalbumina ($M_W < 2x10^4$) foram quase os mesmos. Estes resultados sugeriram que os solutos de diferentes tamanhos difundiram livremente nas esferas, no entanto, para solutos com massa molar elevada, como a albumina, a γ- globulina e a fibrinogênio ($M_W > 6,5 x10^4$), o comportamento de difusão foi diferente para cada um . A Tabela 4.5 apresenta alguns resultados dos coeficientes de difusão de alguns solutos.

**Tabela 4.5** Coeficientes de difusão de solutos em água e difundidos para dentro e para fora das esferas em gel a 30 °C [91].

| | Coeficiente de difusão ($x10^4$) ($cm^2$/min) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Para dentro das esferas | | para fora das esferas | |
| Solutos | em água | 2%Ca-alginato | 4% Ca-alginato | 2%Ca-alginato | 4% Ca-alginato |
| Glucose | 4,08 | 4,10 | - | 4,10 | - |
| L-triptofan | 4,02 | 4,00 | - | - | - |
| α-lactoalbumina | 0,61 | 0,61 | 0,61 | 0,61 | - |
| albumina | 0,42 | Não difundido | - | 0,21 | 0,054 |
| γ - globulina | 0,27 | - | - | 0,12 | 0,040 |
| Fibrinogen | 0,12 | - | - | 0,02 | - |

MARTINSEN et. al. [115] também determinaram o coeficiente de difusão da albumina (BSA), para fora das esferas, em géis de alginato de cálcio a 20 °C em pH 7. Os autores verificaram a difusividade da albumina em esferas de alginato do tipo *L. hyperborea*, *L. digitada* e *M. Pyrifera*. A difusão aumentou com o aumento do conteúdo e comprimento de blocos de ácido guluronico na molécula de alginato, e também aumentou com a diminuição da concentração do alginato. Além disso, a difusão dependeu fortemente do método de preparação dos géis de alginato, e foi mais rápida em esferas homogêneas; formadas na presença de íons sódio. Vale ressaltar que alginato do tipo *L. hyperborea* apresenta fração de blocos G de 0,68, enquanto *L. digitada* de 0,39 e por fim, *M. pyrifera de 0,40*. Os resultados dos autores encontram-se na Tabela 4.6.

**Tabela 4.6** Coeficiente de difusão de BSA em esfera em gel de *L. hyperborea*, *L. digitada* e *M. Pyrifera* [115].

| Alginato | Concentração de Na | $D_{homogeneas}$ x $10^6$ ($cm^2$/s) | $D_{não\text{-}homogeneas}$ x $10^6$ ($cm^2$/s) |
|---|---|---|---|
| *M. pyrifera* | 2,0 (4%) | 0,45 | - |
| *L. digitada* | 1,9 (4%) | 1,02 | 1,22 |
| | 2,5 | 0,82 | 0,50 |
| | 3,0 | | 0,34 |
| | 4,0 | 0,54 | 0,33 |
| *L. hyperborea* | 3,0 (4%) | 1,79 | - |

É difícil em certos casos, comparar coeficientes de difusão obtidos por diferentes trabalhos, por causa das variações consideráveis nas condições experimentais que certos autores tem usado. Nos nossos experimentos, seguimos as condições experimentais da maioria dos autores da área, ou seja, liberação a 37 °C e 100 rpm de rotação, situações que simulam as condições do corpo humano.

A adição de gotas de alginato em íons divalentes ($Ca^{2+}$) produz uma neutralização parcial dos grupos carboxilatos, presentes nas cadeias de alginato, formando microesferas gelatinosas insolúveis (mas permeáveis). A equação 4.1 exemplifica a gelificação do alginato de sódio [73]:

$$2n\text{Na(Alginato)(aq.)} + n\text{Ca}^{2+}\text{(aq.)} \rightarrow n\,\text{Ca(Alginate)}_2\text{(s)} + 2n\text{Na}^{+}\text{(aq.)} \quad (4.1)$$

A formação de uma microesfera de alginato de cálcio é o resultado da formação de reticulações entre unidades de duas diferentes cadeias de alginato com íons cálcio, onde preferencialmente o bloco G é envolvido. Há dois tipos de gelificação das microesferas; a gelificação externa, resultando em microesferas não homogêneas e a gelificação interna, produzindo microesferas homogêneas. Microesferas formadas utilizando o primeiro tipo de gelificação apresentam um alto gradiente polimérico, próximo a superfície da microesfera, o qual diminui em direção ao centro. O gradiente é formado durante gelificação, onde ocorre uma difusão do alginato em direção a uma zona de gelificação, localizada na região próxima à superfície. Isto promove uma camada externa não porosa. Microesferas formadas por gelificação interna apresentam um processo de gelificação rápida, mas não promovem a difusão do alginato, resultando em géis mais homogêneos. No entanto, apresentam maior porosidade que aquelas produzidas por gelificação externa [67].

Assim, a transição sol/gel pode originar vários graus de anisotropias (heterogeneidade) nas microesferas, por permitir que cátions reticulantes difundam dentro da solução de alginato de sódio. Vários fatores contribuem para isto; tais como, composição do alginato; massa molar e concentração do alginato

versus a concentração de íons gelificantes e não-gelificantes. Em microesferas no estado de gel, o gradiente de concentração de alginato pode facilmente ser visualizado por microscopia de transmissão. A não homogeneidade é essencialmente um resultado de um mecanismo de gelificação irreversível, caracterizado por fortes ligações de íons reticulantes, e é governada pela velocidade de difusão do íon gelificante e a molécula do alginato [54].

No nosso estudo preferimos trabalhar com micropartículas homogêneas, gelificação interna, em todos os sistemas abordados. Utilizamos para tal um íon não gelificante, o $Na^{+}_{(aq.)}$ proveniente do NaCl, que pode promover uma distribuição uniforme do alginato ao longo da microesfera impedindo que se forme a camada externa.

Continuamos nossos estudos desta vez preparando microesferas de alginato de cálcio na presença de PEG, utilizando em um dos sistemas o glutaraldeído como agente reticulante entre o alginato e o PEG. Notamos, segundo a Tabela 4.7 que os resultados de diâmetro médio das microesferas não apresentam aparente correlação com a influência das diferentes massas molares dos PEG, nem com a adição ou não de GA. O intumescimento, do mesmo modo, também não teve mudanças significativas.

**Tabela 4.7** Valores médios de diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficiente de difusão da OTC, para as microesferas de alginato de cálcio (mv)/PEG, sem e com o reticulante GA (0,2 %), em pH 7,4 e pH 1,2.

| Microesferas de Alginato/PEG | Diâmetro Médio (μm) | Porcentagem de intumescimento | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 7,4) | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 1,2 ) |
|---|---|---|---|---|
| PEG 2000 sem GA | 714 ± 79 | 92,2 ± 1,0 | (38,9 ± 6,4) | (208,5 ± 91,6 ) |
| PEG 4600 sem GA | 736 ± 89 | 92,0 ± 1,7 | (39,3 ± 7,4) | (396,6 ± 57,9 ) |
| PEG 10000 sem GA | 732 ± 72 | 92,1 ± 1,6 | (33,6 ± 3,4) | (356,2 ± 47,5) |
| PEG 2000 – GA | 733 ± 67 | 94,0 ± 1,3 | (28,4 ± 9,2) | (366,8 ± 17,7) |
| PEG 4600 – GA | 745 ± 76 | 93,8 ± 1,7 | (25,3 ± 10,0 ) | (292,7 ± 45,2) |
| PEG 10000 – GA | 724 ± 79 | 93,8 ± 1,9 | (37,4 ± 14,6) | (323,2 ± 34,5) |

O coeficiente de difusão, em pH 7,4, mostra uma leve tendência a diminuir para o sistema com GA em relação ao sistema sem GA, sugerindo que uma possível reticulação pode ter atrasado a liberação de OTC. No entanto, quando comparada as microesferas de alginato de cálcio os sistemas de um modo geral, em pH 7,4 e 1,2, aumentaram seu valores de coeficientes de difusão. Além disso, a velocidade de difusão varia de amostra para amostra, resultando em desvio padrão elevado, atribuído à falta de homogeneidade das microesferas. Essa falta de homogeneidade pode ser devido a um aumento da concentração iônica no meio, podendo gerar anisotropia no processo de gelificação. Esta hipótese pode ser confirmada com a análise morfológica das microesferas.

Uma vantagem destas microesferas é que a presença do PEG torna as mesmas menos adesivas, mais lisas e mais biocompatíveis, por sua menor aderência [81,82]. É interessante lembrar que o tempo de esvaziamento do estômago será dependente do tempo de residência das mesmas; por não serem muco-adesivas, elas diminuirão o tempo de trânsito no trato estomacal.

Os sistemas de microesferas, com ou sem a adição de GA, em pH 1,2, aumentaram seus coeficientes de difusão quando comparado a microesfera de alginato de cálcio, provavelmente, quando se usou PEG, por este ser hidrofílico, venha a atrair maior quantidade de água e isto facilite ainda mais o transporte de OTC, com leve tendência a um aumento sem a adição de GA.

Através do modelo matemático, que segue a equação da segunda Lei de Fick, foram construídos os gráficos comparativos da cinética de liberação de OTC em pH 7,4 e 1,2, sem e com o GA, segundo Figuras 4.27 a 4.30, respectivamente.

Observamos que a liberação em meio básico, que simula a condição intestinal, ocorre de um modo controlado, devido a sua intumescência, preservando, assim, os comentários anteriores sobre o transporte de OTC. Em meio ácido, que simula o sistema gástrico, observamos ainda uma aceleração devido a alta solubilidade do fármaco. Essa aceleração caracteriza um sistema convencional de administração de fármacos, onde a presença das microesferas não interfere praticamente em nada na redução da liberação do fármaco. O perfil cinético afasta-se do esperado por Fick.

Na Figura 4.27, observa-se a liberação controlada de OTC em pH 7,4. O modelo matemático descreve o comportamento difusional de OTC gerada pelo transporte de água.

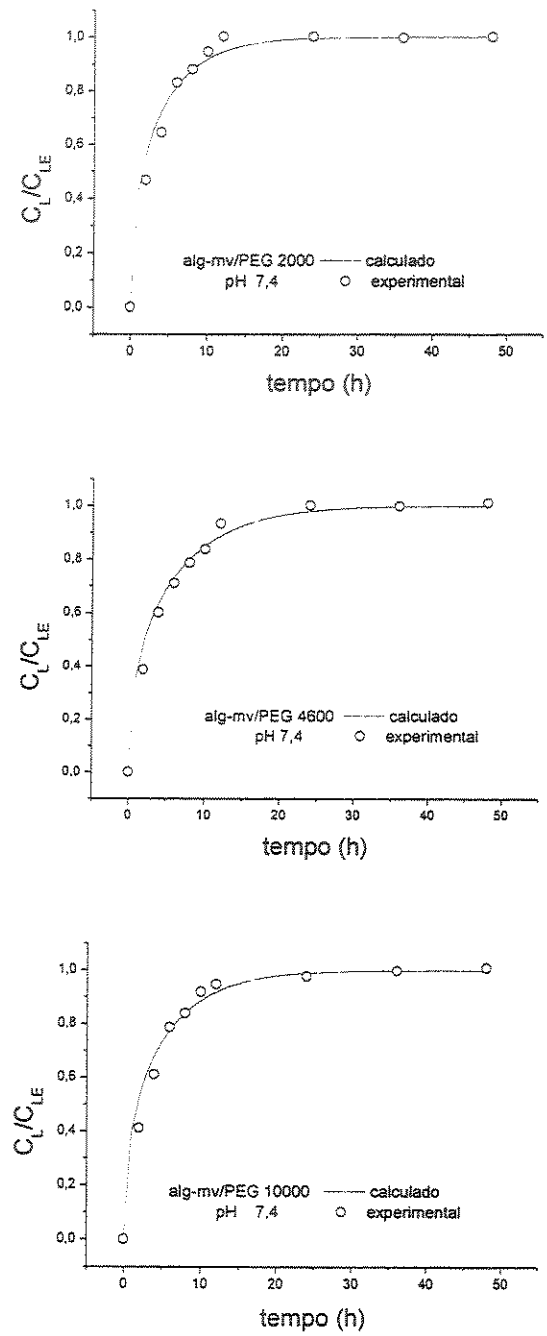



**Figura 4.27** Liberação controlada da OTC em microesferas de alginato média viscosidade (mv)/PEG com massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10 000; em meio básico sem reticulçao com GA , tampão 7,4.

No pH 7,4 a difusão é caracterizada ser Fickiana, por uma velocidade de difusão do solvente menor que a relaxação polimérica (Figura 4.28).

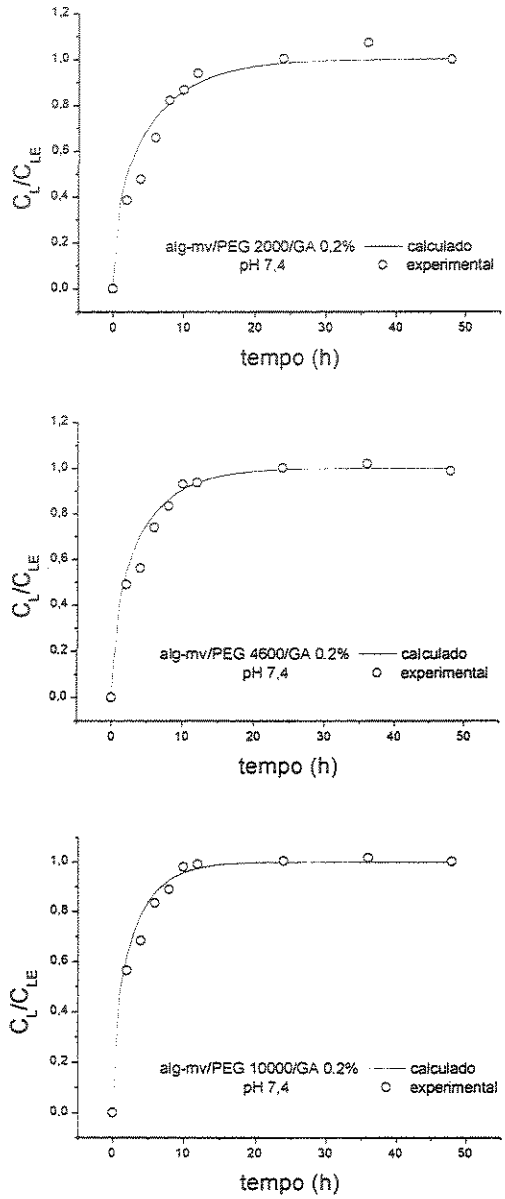



**Figura 4.28** Liberação controlada da OTC em microesferas de alginato média viscosidade (mv)/PEG com massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10 000; reticuladas com GA (0,2%), tampão 7,4.

Nas Figuras 4.29 e 4.30, a difusão do solvente é rápida, isto é indício que o processo é não-fickiano, ou seja, o polímero esta no estado vítreo.

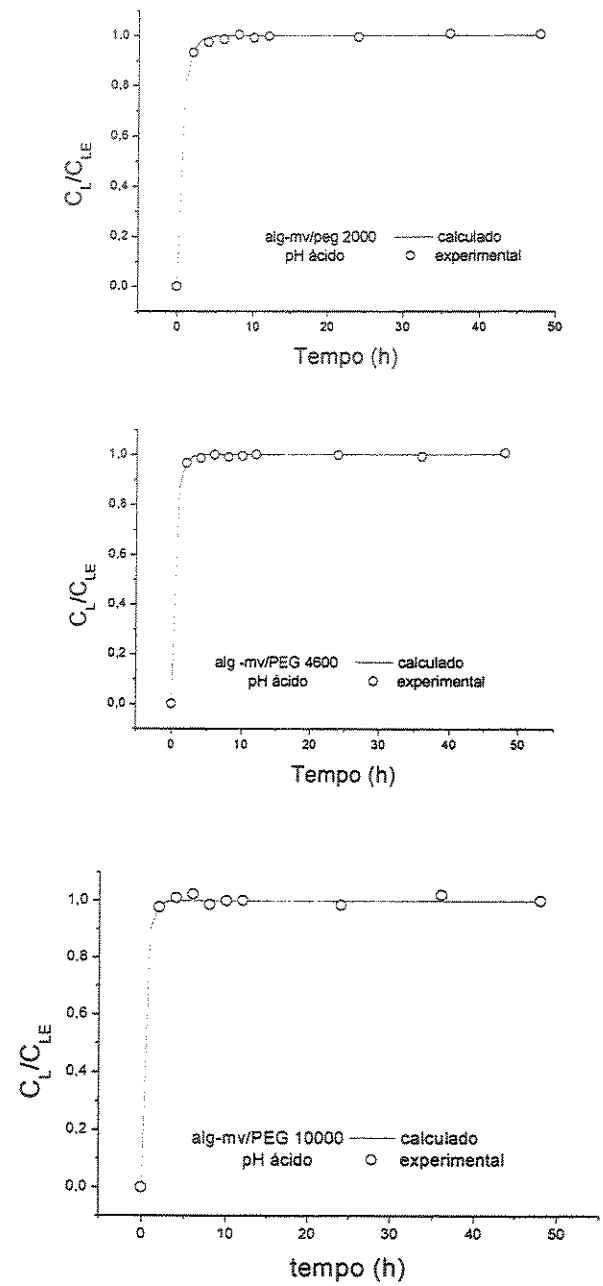



**Figura 4.29** Liberação controlada da OTC em microesferas de alginato média viscosidade (mv)/PEG de diferentes massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10000 sem reticulação pelo GA em meio ácido, HCl 0,1 M.

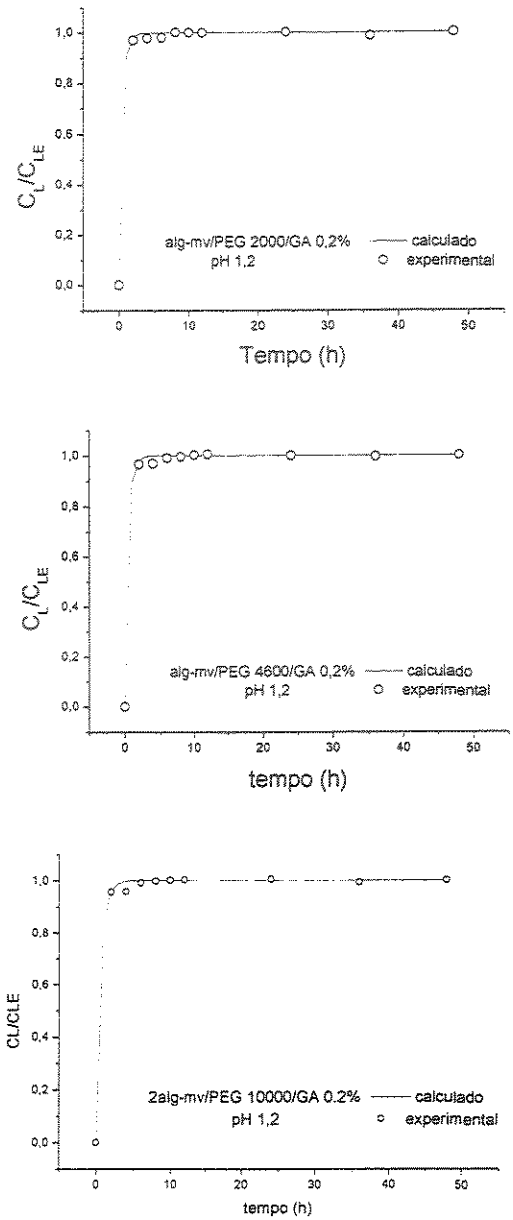



**Figura 4.30** Liberação controlada da OTC em microesferas de alginato média viscosidade (mv)/PEG de diferentes massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10000 reticulado pelo GA (0,2%) em meio ácido, HCl 0,1 M.

Para se retardar a liberação de fármacos, em microesferas de alginato, é utilizada a técnica onde uma outra camada de polímero é depositada sobre as microesferas, utilizando o método da coacervação complexa. A nova barreira formada pode prevenir possíveis defeitos de superfície das microesferas, como rupturas e poros. Assim, coacervou-se as microesferas de alginato média viscosidade com quitosana, de várias viscosidades, obtendo-se as microcápsulas.

Os valores médios de diâmetro, de porcentagem de intumescimento e de coeficiente de difusão obtidas para a OTC liberada em pH 1,2 e pH 7,4, durante 72 horas de ensaio em microcápsulas de alginato de cálcio coacervada com a quitosana, encontram-se na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8** Valores médios de diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficiente de difusão de OTC em solução de pH 7,4 e 1,2 para as microcápsulas de alginato de cálcio recobertas com quitosanas de diferentes viscosidades.

| Microcásulas de Alginato/quitosana | Diâmetro Médio (μm) | Porcentagem de intumescimento | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 7,4) | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 1,2) |
|---|---|---|---|---|
| Alg-mv/qui-av | 709 ± 74 | 93,8 ± 0,3 | (32,3 ± 5,7) | (86,4 ± 7,4) |
| Alg-mv/qui-mv | 680 ± 90 | 94,5 ± 0,4 | (22,8 ± 2,8) | (78,5 ± 18,3) |
| Alg-mv/qui-bv | 675 ± 59 | 93,9 ± 0,5 | (22,0 ± 2,8) | (61,0 ± 8,4) |
| Alg-mv | 662 ± 81 | 91,8 ± 0,3 | (23,6 ± 7,8) | (183,0 ± 16,4) |

Para uma melhor visualização dos resultados apresentaremos nas Figuras 4.31 e 4.32 os perfis de liberação de OTC, em meio básico e em meio ácido, referente às microcápsulas de alginato de cálcio média viscosidade coacervada com os diversos tipos de quitosana. Os resultados da Tabela 4.8 indicam que a quitosana retardou a liberação de OTC em pH 1,2, quando comparado ao coeficiente de difusão de (183,0 ± 16,4) $10^{-6}$ $cm^2/h$, referente à microesferas de alginato de cálcio, média viscosidade, não coacervada.

O volume livre representa os vazios onde as moléculas em difusão podem se alojar por um determinado tempo. Em termos gerais, o empacotamento ordenado das cadeias poliméricas num polímero tende a servir como barreira densa à difusão [11]. É conveniente lembrar aqui que a cristalização de um polímero é fortemente dependente de sua estrutura química, que poderá levar a um ordenamento das cadeias. A quitosana baixa viscosidade apresenta a maior cristalinidade (39,9%) em relação a quitosana média viscosidade (33,2%) e quitosana alta viscosidade (18,7%). Isto justifica uma menor liberação em meio ácido.

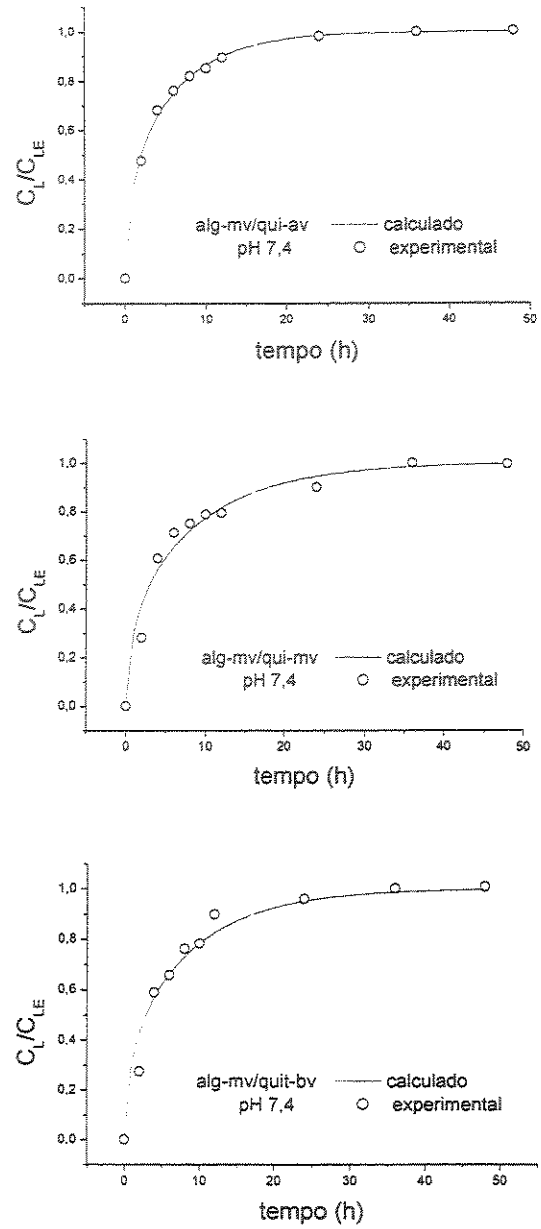



**Figura 4.31** Liberação controlada da oxitetraciclina em microesferas de alginato média viscosidade (alg-mv) e quitosanas de: a) alta viscosidade (qui-av), b) média viscosidade (qui-mv) e c) baixa viscosidade (qui-bv); em tampão 0,2 M tris-HCl, pH 7,4.

Segundo DALY and KNORR [62], os fatores que influenciam a formação de microcápsulas são: o grau de acetilação da quitosana; o grau de esterificação do alginato e a proporção de ácido manurônico e gulurônico do alginato. Quanto maior o grau médio de desacetilação ( $\overline{GD}$ ) da quitosana, maior será a proporção

de grupos aminos livres presentes na cadeia polimérica e, portanto, maior será a sua interação com o poliânion alginato. O rendimento da complexação entre os polieletrólitos aumenta também com o aumento da esterificação do alginato, ou seja, pelo aumento dos grupos carboxilatos presentes no polímero, como também pela distribuição dos monômeros na cadeia polimérica do alginato.

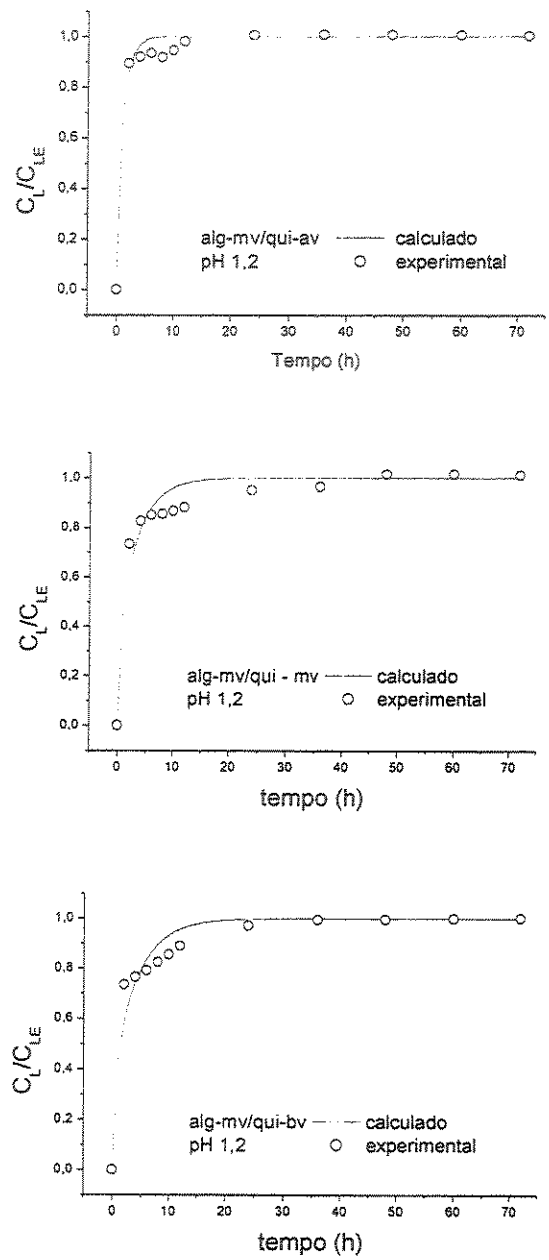



**Figura 4.32** Liberação controlada da oxitetraciclina em microesferas de alginato média viscosidade (alg-mv) recobertas com quitosanas: a) alta viscosidade (qui-av), b) mádia viscosidade (qui-mv) e c) baixa viscosidade (qui-bv); em meio ácido, HCl 0,1 M.

A quitosana baixa viscosidade, segundo resultados de RMN $H^1$, apresenta um grau de desacetilação de 83,9%, enquanto a quitosana média viscosidade possui o valor de 85,4% e finalmente, quitosana alta viscosidade apresenta o valor de 77,5%. Desta forma, era esperado que a interação entre a quitosana de média viscosidade e o alginato produzisse um retardo maior na liberação quando comparado aos demais; no entanto, o retardo foi maior na interação entre a quitosana de baixa viscosidade e o alginato de média viscosidade. Talvez, um efeito sinergético entre a cristalinidade e o grau de desacetilação redunde numa malha mais fechada. Isto tipifica uma correlação entre a difusividade e ordenamento das cadeias.

Provavelmente, a quitosana baixa viscosidade, contendo mais cristalitos, contribuiu para diminuir a liberação em pH 1,2. Estes cristalitos consistem de regiões onde as cadeias poliméricas estão densamente empacotadas; em uma configuração orientada e ordenada atuando como barreira à liberação. Difusividade dentro destes cristalitos acredita-se ser extremamente baixa, e essencialmente toda difusão em polímero semicristalino ocorre entre as regiões amorfas e cristalinas. Por isso, difusividade é menor em polímeros mais cristalinos que em polímeros menos cristalinos. Redução da velocidade de dissolução de OTC em ambiente gastro simulado pode reduzir a irritação que a OTC provoca neste meio.

Notou-se pelos valores dos coeficientes globais de difusão de OTC, liberada das microesferas de alg-mv/qui-mv e alg-mv/qui-bv em pH 7,4, que estes não diferem significativamente da liberação de microesfera de alginato de cálcio média viscosidade; enquanto que, para a microesfera de alg-mv/qui-av, o coeficiente chegou a aumentar. Tal resultado foi inesperado, pois assim como em meio ácido houve retardo, esperava-se o mesmo para o meio básico.

A difusão ocorre pela movimentação de moléculas de OTC dissolvidas em água, devido à ação de um gradiente de concentração. Novamente, o processo de intumescimento parece governar a velocidade de difusão em meio básico e não depende do número e do tamanho dos espaços vazios e da facilidade de sua formação. O número e o tamanho desses espaços vazios se relacionam ao espaço livre no polímero e ao grau de compactação das cadeias do polímero, que

é proporcional à cristalinidade e aos defeitos estruturais do gel formado. A facilidade de formação desses espaços vazios depende da rigidez das cadeias e das forças de ligação intermoleculares do polímero.

Vale salientar que a presença de quitosana nas microcápsulas as torna mucoadesivas e assim, podem permanecer em tempo maior que o tempo de esvaziamento do trato gastrointestinal. Para melhor compreensão do comportamento de esvaziamento das regiões do aparelho digestivo, a Figura 4.33 apresenta os diferentes pH encontrados no trato gastro-intestinal [107].

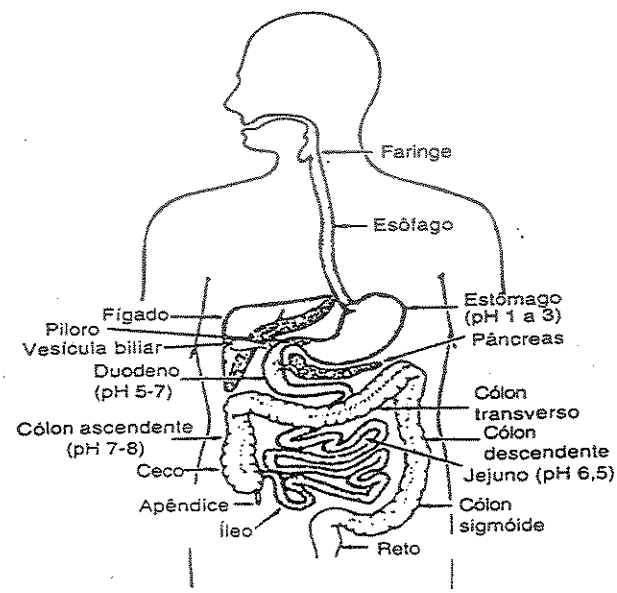



**Figura 4.33** Diagrama anatômico que mostra o sistema digestivo e as localizações implicadas na absorção dos fármacos e seus respectivos pH [107].

Um mecanismo de liberação controlada por um período maior que 14-15 h é improvável pelos aspectos fisiológicos envolvidos na absorção de fármacos. O tempo de esvaziamento do estômago varia de 2 a 6 h, sendo responsável por até 10% de absorção; enquanto que o esvaziamento do intestino delgado ocorre entre 3 a 5 h, sendo responsável por até 90% de absorção. Finalmente, o intestino grosso tem um tempo de esvaziamento de 3 a 10 h, sendo responsável por até 10% de absorção. Portanto, tentar reduzir a liberação para um tempo maior é inviável para a administração oral [46].

Foi escolhida a microcápsula de alg-mv/qui-bv para ser a microcápsula a ser revestida com os três diferentes PEG (2000, 4600 e 10000), porque

apresentou o menor coeficiente de difusão em meio ácido e também em meio básico.

De posse destas informações, continuamos nossas pesquisas com a introdução dos diversos PEG, a fim de tornar as microcápsulas menos mucoadesivas e avaliar o seu comportamento difusional.

Na Tabela 4.9 apresentamos os valores médios do diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficiente global de difusão, em meio ácido e básico, para as microcápsulas de alginato de cálcio coacervadas com a quitosana e revestidas com PEG 0,2% utilizando o GA (0,05%).como agente reticulante.

**Tabela 4.9** Valores médios do diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficientes globais de difusão para as microcápsulas de alginato de cálcio média viscosidade/quitosana baixa viscosidade/PEG (0,2%) em meio ácido e GA (0,05%) como reticulante.

| Microcápsulas de Alg-mv/qui-bv/PEG (0,2%) | Diâmetro Médio (μm) | Porcentagem de intumescimento | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 7,4) | Coeficiente de Difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 1,2) |
|---|---|---|---|---|
| **PEG 2000** | 805 ± 66 | 93,3 ± 0,3 | (17,5 ± 1,1) | (203,2 ± 61,7) |
| **PEG 4600** | 771 ± 63 | 94,2 ± 0,5 | (17,4 ± 1,4) | (272,5 ± 77,3) |
| **PEG 10000** | 733 ± 62 | 92,7 ± 0,6 | (21,3 ± 4,4) | (295,7 ± 25,1) |

Os resultados indicam que houve aceleração da liberação em meio ácido, quando comparada à liberação neste mesmo meio para as microesferas de alginato média viscosidade (183,0 ± 16,4) $10^{-6}$ $cm^2/h$ e alginato média viscosidade coacervada com a quitosana baixa viscosidade (61,0 ± 8,4) $10^{-6}$ $cm^2/h$. Além disso, a influência da massa molar sobre a liberação não está indicando correlação com o coeficiente de difusão, pois o desvio padrão é bastante significativo para as microcápsulas revestidas com o PEG 2000 e PEG 4600.

Nas Figuras 4.34 e 4.35 apresentamos o perfil de liberação destas microcápsulas.

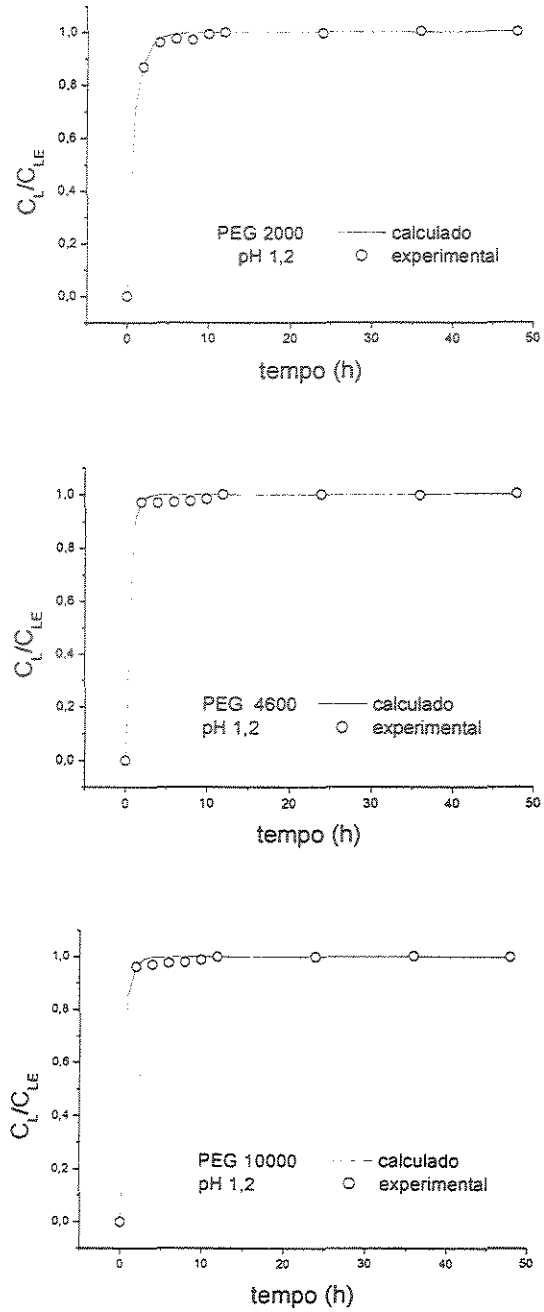
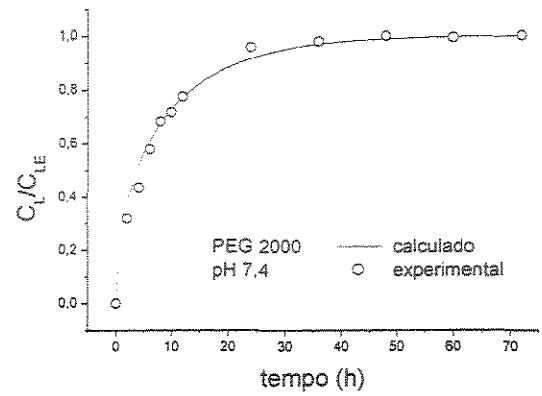
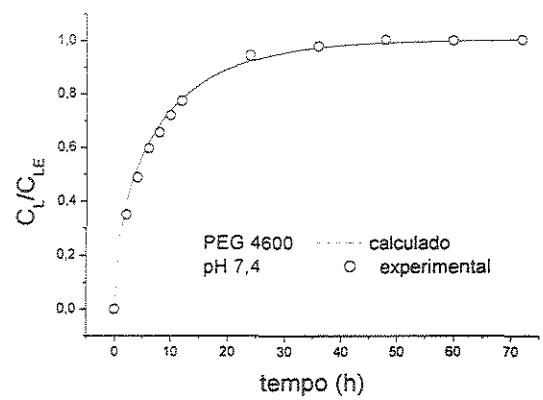



**Figura 4.34** Liberação controlada da oxitetraciclina em microesferas de alginato média viscosidade/quitosana baixa viscosidade/PEG de diferentes massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10000; em meio ácido, HCl 0,1 M e GA(0,05%).

Observa-se comportamento difusional similar às micropartículas anteriores. Em meio ácido uma liberação convencional e em meio básico um comportamento regido pelo intumescimento.



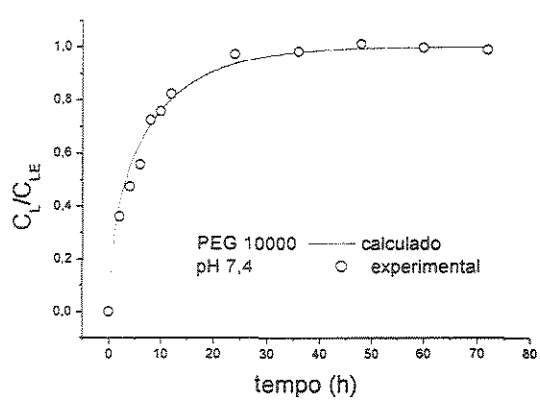




**Figura 4.35** Liberação controlada da oxitetraciclina em microesferas de alginato média viscosidade/quitosana baixa viscosidade/PEG com massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10000; em meio básico, tampão 7,4 e GA (0,05%).

O procedimento experimental adotado para produzir as microcápsulas recobertas com PEG foi similar ao proposto por CHANDY et. al. [24,25]. Segundo ele, houve redução significativa da liberação de hirudina e albumina quando utilizadas pequenas quantidades de PEG e glutaraldeído. Desta forma, esperávamos também uma redução na liberação; no entanto, isto não foi observado. Provavelmente, o tamanho da molécula do fármaco a ser difundida através da massa do polímero, e suas propriedades físico-químicas, colaboraram para sua liberação mais rápida.

A permeação de OTC nestas microcápsulas não depende somente de seu coeficiente de difusão, mas também da solubilidade no polímero [26]. Portanto, os dois principais fatores que influenciaram a difusão são a difusividade e a solubilidade. O primeiro é uma propriedade cinética e descreve a facilidade das moléculas do agente ativo de moverem-se dentro do sistema polimérico; por sua vez a solubilidade é uma propriedade de equilíbrio que descreve a interação, ou compatibilidade, entre o agente ativo e o sistema polimérico.

Os resultados podem indicar que a incorporação de baixos níveis de gutaraldeído, durante gelificação, não promoveu a reticulação nas microcápsulas, o que retardaria a difusão. No sentido de avaliar o efeito da concentração do PEG, mantivemos a concentração de glutaraldeído e refizemos o experimento a uma concentração menor (0,1%) do primeiro.

Na Tabela 4.10 apresentamos os valores médios do diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficientes globais de difusão para as microesferas de alginato de cálcio-mv/quitosana-bv/PEG (0,1%) em meio ácido e GA 0,05%.

**Tabela 4.10** Valores médios do diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficientes globais de difusão para as microcásulas de alginato de cálcio-mv/quitosana-bv/PEG(0,1%) em meio ácido e GA 0,05%.

| Microcápsulas de Alg-mv/qui-bv/PEG | Diâmetro Médio (μm) | Porcentagem de intumescimento | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 7,4) | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 1,2) |
|---|---|---|---|---|
| **PEG 2000** | 699 ± 65 | 94,2 ± 0,5 | (22,8 ± 5,8) | (304,7 ± 41,3) |
| **PEG 4600** | 726 ± 55 | 94,2 ± 0,6 | (31,4 ± 4,4) | (220,0 ± 45,2) |
| **PEG 10000** | 741 ± 45 | 92,1 ± 0,4 | (27,6 ± 7,9) | (261,5 ± 54,6 ) |

Os resultados indicam comportamento similar do PEG 0,1% em relação ao PEG 0,2%; mostrando que as concentrações de PEG utilizadas não afetaram significativamente a liberação, uma vez que a aceleração também foi observada para o caso de PEG 0,1%. Além disso, as diferentes massas molares não influenciam a liberação; portanto, sem correlação com o coeficiente global de difusão. Nas Figuras 4.36 e 4.37 apresentamos o perfil de liberação destas microcápsulas.

Estes resultados parecem interessantes por que nos mostra que uma menor percentagem em massa de PEG acelera ainda mais a liberação de OTC em meio básico. Desta forma, existe a possibilidade de modulação da liberação de OTC em função da concentração do PEG.

Sabe-se que os defeitos de difusão relatados em géis podem, em sua maioria, ser explicados com base na mudança de porosidade, mudança no coeficiente de partição, interação de moléculas grandes com a matriz do gel, interação entre solutos de diferentes difusões, e nos efeitos de temperatura.

Como a microcápsula de centro alginato, coacervada com quitosana, e recoberta com PEG, não promoveu uma redução significativa na liberação do fármaco quando tratada com 0,05% de GA, tentou-se aumentar a concentração do reticulante para tentar reduzir a malha. Em outras palavras, uma malha mais fechada pode retardar a liberação de um fármaco de massa molar baixa, como é o caso de OTC.

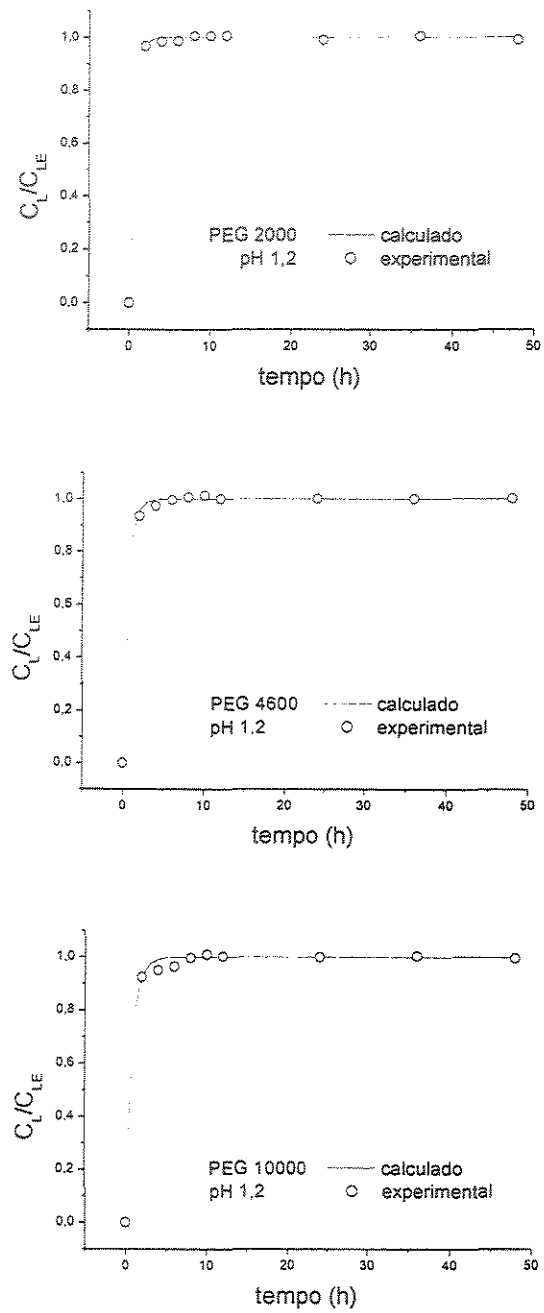
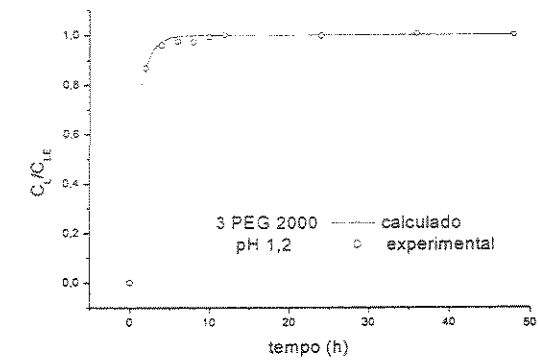
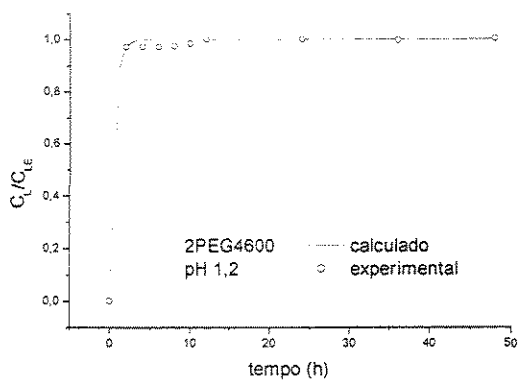



**Figura 4.36** Liberação controlada da OTC em microesferas de alginato-mv/quitosana-bv/PEG (0,1%) com massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10000; em meio ácido, HCl 0,1 M e GA 0,05%.



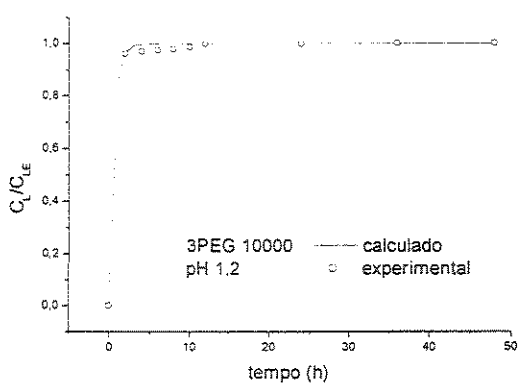




**Figura 4.37** Liberação controlada da oxitetraciclina em microesferas de alginato média viscosidade/quitosana baixa viscosidade/PEG de diferentes massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10000; em meio ácido, HCl 0,1 M e GA 0,05%.

Na Tabela 4.11 estão apresentados os resultados de diâmetro, de porcentagem de intumescimento, coeficiente de difusão em meio ácido e básico das microcápsulas de alginato de cálcio, coacervado com a quitosana, e revestidas com PEG (2000, 4600 e 10 000). Utilizou-se GA como agente reticulante, em uma proporção maior que os estudos anteriores, 0,08%. Os gráficos comparativos da cinética de liberação de OTC estão apresentados na Figura 4.38 e 4.39.

**Tabela 4.11** Valores médios do diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficiente de difusão de OTC para as microcápsulas de alginato de cálcio coacervada com a quitosana e revestidas com o PEG reticuladas com o GA 0,08%.

| Microcápsulas de Alginato/PEG | Diâmetro Médio (μm) | Porcentagem de intumescimento | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 7,4) | Coeficiente de difusão em $cm^2/h$ $10^6$ (pH 1,2) |
|---|---|---|---|---|
| **PEG 2000 – GA** | 710 ± 79 | 92,0 ± 1,2 | (53,7 ± 12,5) | (203,3 ± 29,8) |
| **PEG 4600 – GA** | 776 ± 98 | 93,7 ± 1,3 | (50,2 ± 10,5) | (315,3 ± 49,8) |
| **PEG 10000 – GA** | 708 ± 84 | 94,7 ± 1,1 | (69,5 ± 8,2) | (228,1 ± 22,9) |

Quando comparados os resultados com o sistema anterior, a difusão neste sistema foi maior, sugerindo que a formação de uma rede tridimensional PEG-GA não ocorreu satisfatoriamente.

Os resultados evidenciam que o aumento na concentração de glutaraldeído não vem atenuar o comportamento da liberação de OTC, quando comparando os resultados dos coeficientes de difusão e a modelagem matemática dos resultados (Figura 4.38 e 4.39).

Todos os sistemas estudados apresentam uma característica similar: liberação de OTC quase instantânea em meio ácido, característico de um comportamento não-fickiano. Em aplicação prática, estes sistemas deixam a desejar uma vez que a absorção do antibiótico OTC causa irritação no estômago (meio ácido) e que idealmente deveria ocorrer no intestino (meio básico).

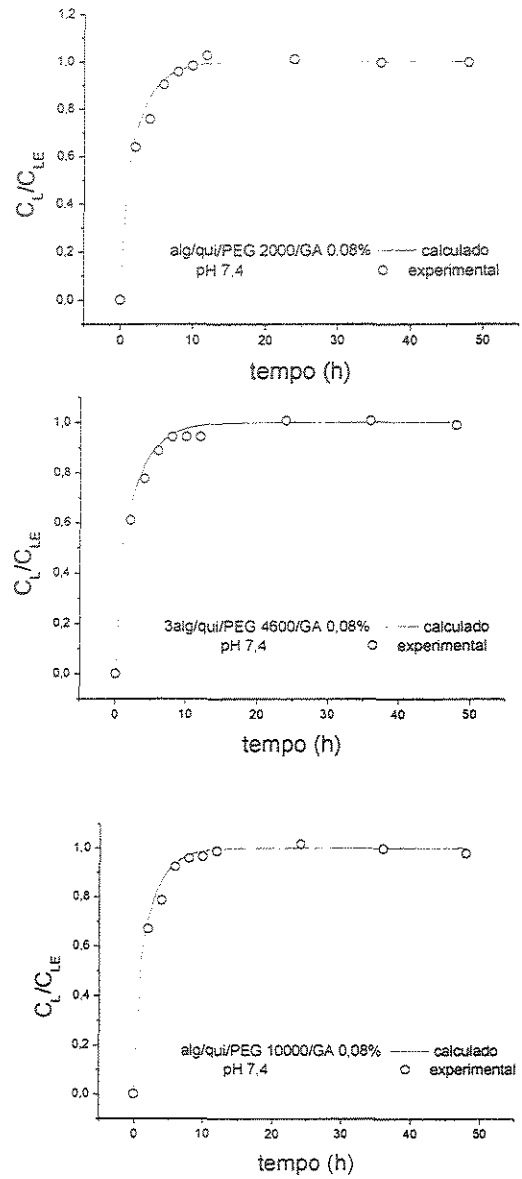



**Figura 4.38** Liberação controlada da OTC em microcápsulas de alginato média viscosidade (mv)/quitosana baixa viscosidade/PEG com massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10000; reticuladas com GA (0,08%), tampão 7,4.

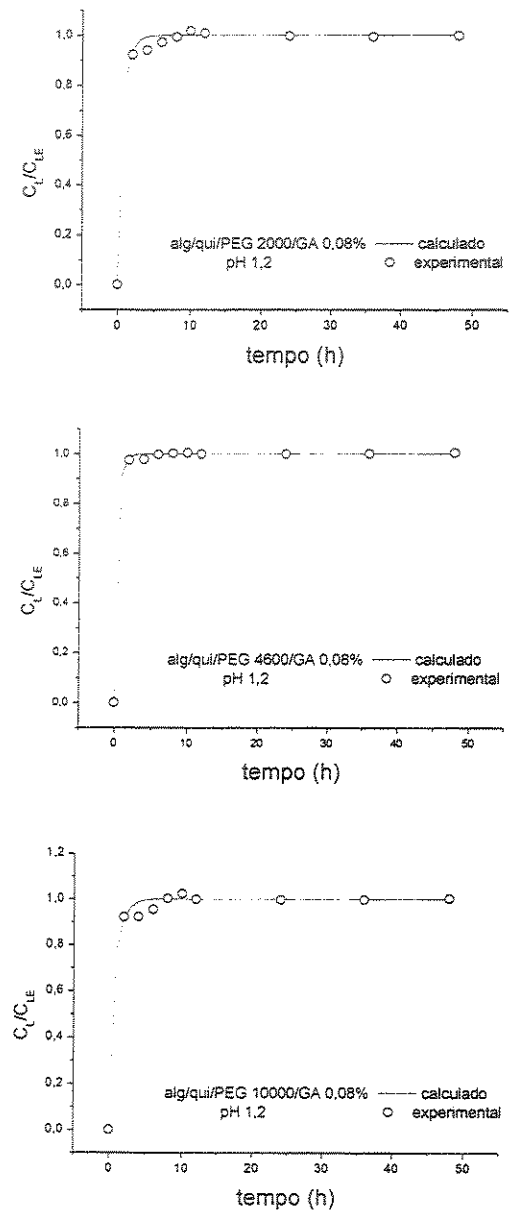



**Figura 4.39** Liberação controlada da OTC em microcápsulas de alginato média viscosidade (mv)/quitosana baixa viscosidade/PEG com massas molares: a) 2000, b) 4600 e c) 10 000; reticuladas com GA (0,08%), meio ácido.

Um outro assunto em discussão são os elevados desvios padrões nos coeficientes globais de difusão, nos diferentes sistemas poliméricos, o que pode ser indício de micropartículas não homogêneas. Para verificarmos isto, análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram feitas nas mesmas, no sentido de complementar nossos estudos.

Uma alternativa farmacotécnica moderna e consistente é revestir o fármaco incluso em um granulado, com substâncias estáveis em meio ácido, que se dissolvem em meios neutros ou ligeiramente alcalino, encontrados no duodeno e intestino. Nesta pesquisa decidiu-se revestir as microesferas de alginato de cálcio com EUDRAGIT®, uma família de revestimentos à base de resina acrílica termocurável, utilizados em Industrias Farmacêuticas. Adotou-se esta alternativa tendo em vista não existir cápsulas gastro-resistentes para assim serem usadas como veículos das micropartículas. Escolheu-se o sistema alginato de cálcio (mv)/EUDRAGIT® como modelo.

Na Tabela 4.12 estão apresentados os resultados do coeficiente de difusão da liberação da OTC em pH 7,4 e pH 1,2; e o diâmetro médio das microcápsulas de Alg-EUDRAGIT® e microesferas de alginato de cálcio.

**Tabela 4.12** Valores médios de diâmetro, porcentagem de intumescimento e coeficiente de difusão da OTC, para as microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/EUDRAGIT® em pH 1,2 e pH 7,4.

| **Micropartículas de Alginato e/ou EUDRAGIT® (3 tipos)** | **Diâmetro Médio (μm)** | **Coeficiente de difusão $cm^2/h$ $10^6$ (pH 7,4)** | **Coeficiente de difusão $cm^2/h$ $10^6$ (pH 1,2)** |
|---|---|---|---|
| **RS - 100** | 684 ± 78 | (29,1 ± 8,8) | (339,5 ± 29,9) |
| **S -100** | 673 ± 80 | (36,3 ± 4,9) | (163,8 ± 41,6) |
| **L -100** | 688 ± 85 | (32,6 ± 6,6) | (122,0 ± 28,3) |
| **Alg-mv** | 662 ± 81 | (23,3 ± 7,8) | (183,0 ± 16,4) |

Através do modelo matemático que segue a equação da segunda Lei de Fick [5,6], foram construídos os gráficos comparativos da cinética de liberação da OTC, Figuras 4.40 e 4.41.

Os resultados destes revestimentos mostram-se promissores para o EUDRAGIT® L 100 conforme Tabela 4.12. O revestimento é insolúvel em ácido diluído e fluído gástrico e solúvel em tampões e fluídos digestivos acima do pH 6,0; portanto, assegura tanto a não liberação do fármaco em meio gástrico, como a liberação deste em meio entérico.

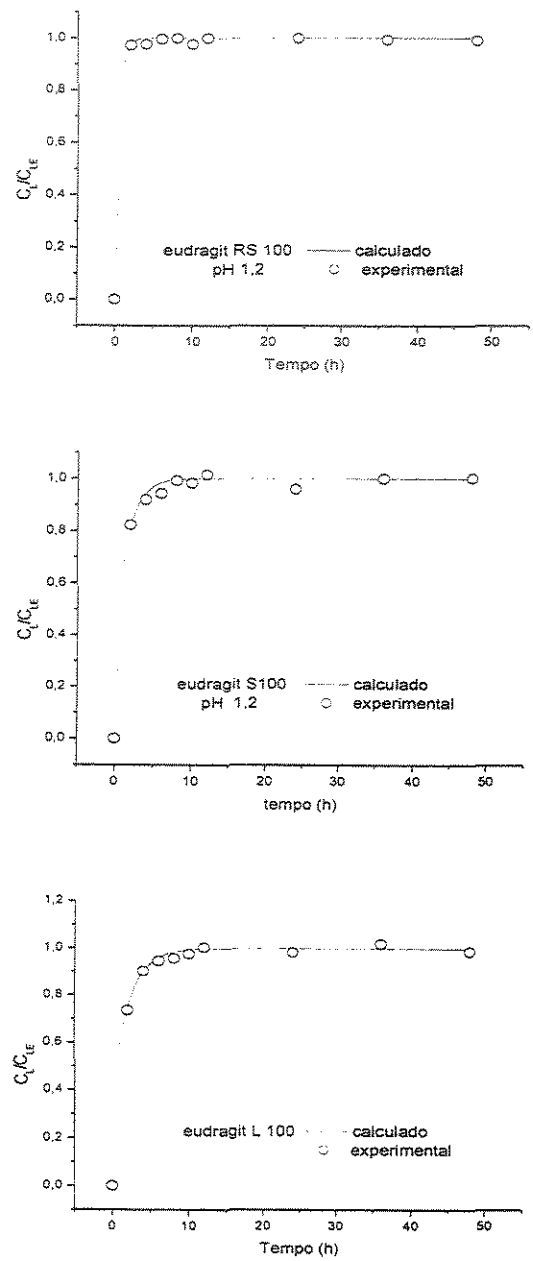



**Figura 4.40** Liberação controlada da OTC em microesferas de alginato média viscosidade (mv) revestidas com o EUDRAGIT® : a) RS - 100, b) S - 100 e c) L-100; em meio ácido, pH 1,2.

Vale salientar que esta microcápsula se desintegrará quando atingir o duodeno e irá intumescer para liberar a OTC de maneira controlada, devido ao transporte de água livre. Portanto, o sistema torna-se viável.

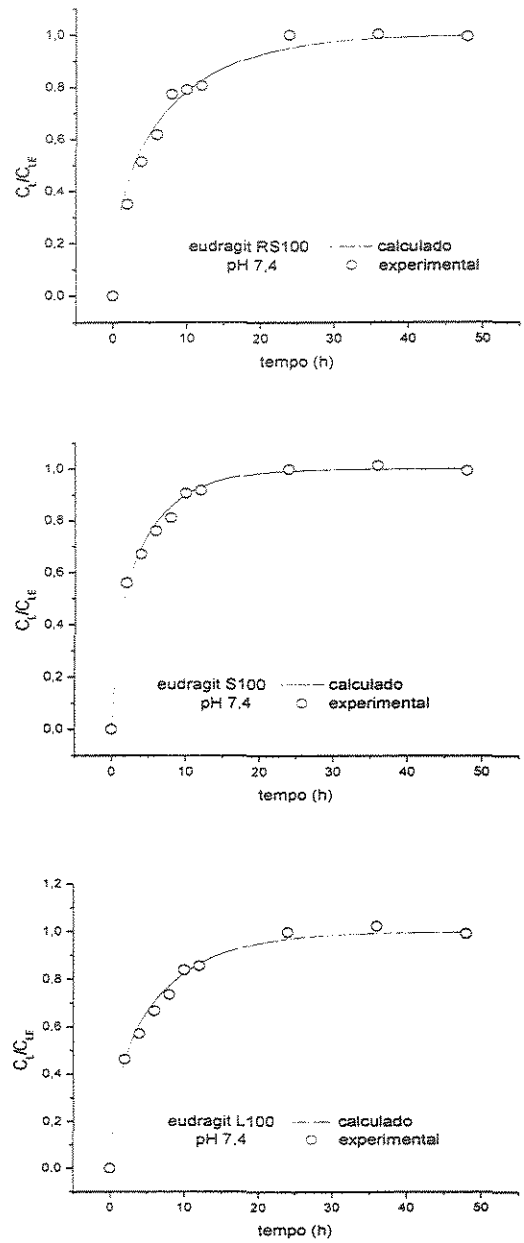



**Figura 4.41** Liberação controlada da OTC em microesferas de alginato média viscosidade (mv) revestidas com o EUDRAGIT® : a) RS - 100, b) S - 100 e c) L-100; em meio básico, tampão pH 7,4.

## 4.3 ANÁLISE MORFOLOGICA DAS MICROPARTÍCULAS

A análise morfológica das microesferas de alginato de cálcio foi realizada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As micrografias relativas a morfologia de superficie das microesferas obtidas, e a morfologia de fratura, são mostradas nas Figuras 4.42 e 4.43, respectivamente.

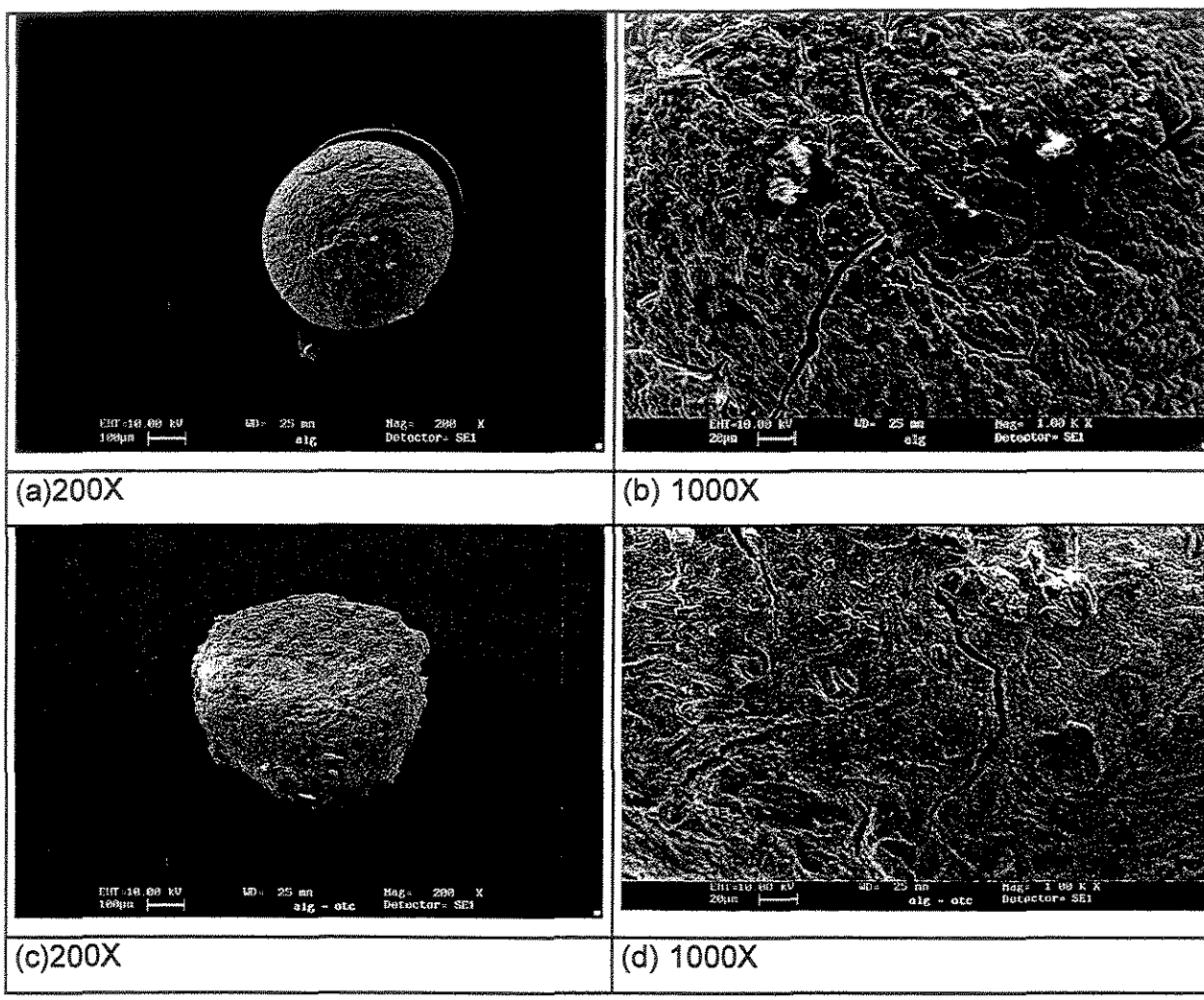



**Figura 4.42** Morfologia de superfície das microesferas de alginato de cálcio média viscosidade: (a) e (b) sem a OTC e (c) e (d) com a OTC.

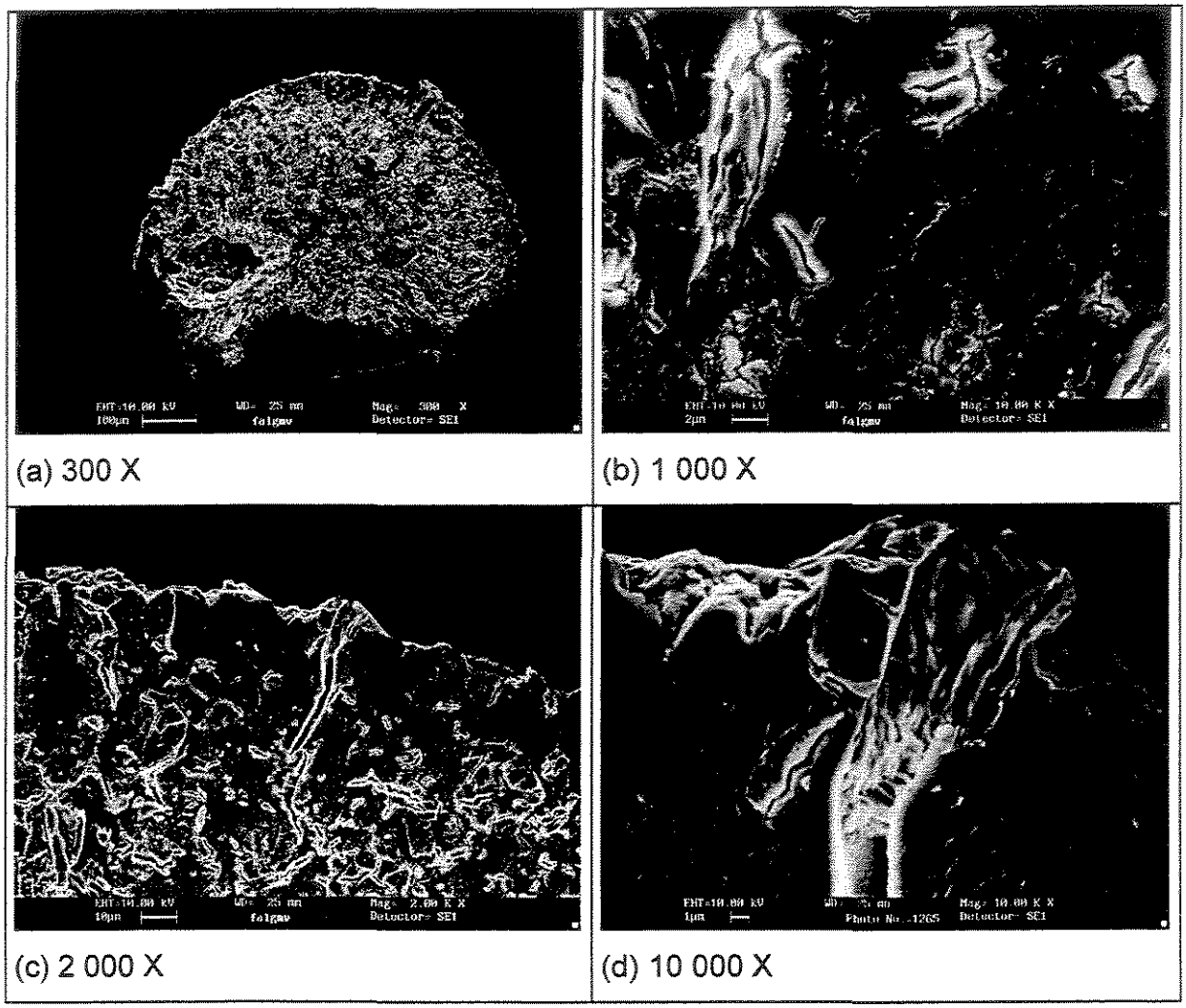



**Figura 4.43** Morfologia de fratura de microesfera de alginato de cálcio média viscosidade: a) sessão transversal de uma microesfera, (b) aumento sobre a sessão transversal, (c) interfase superfície parte interna e (d) sessão transversal de um canal.

A micrografia de MEV referente a Figura 4.42 (a) com aumento de 200 vezes, evidencia uma microesfera típica de alginato de cálcio sem o fármaco, apresentando-se na forma esférica. No entanto, segundo a Figura 4.42 (c), com o mesmo aumento, quando incorporada a OTC, a esfericidade diminui. Isto evidencia que a OTC, provavelmente, interfere na coacervação da microesfera, impedidndo um contato íntimo entre as cadeias, criando uma geometria final mais irregular. Ao secar a microesfera de alginato de cálcio, livre do fármaco, reduz de tamanho sem alterar grandemente seu formato; entretanto, as microesferas com OTC tornam-se irregulares, com a presença de cristais de OTC distribuídos na matriz.

Foi observada, nas duas micropartículas com e sem a OTC, a presença de fissuras, segundo ampliação de 1000 vezes nas Figuras 4.42 (b) e (d). Acredita-se que a presença de fissuras seja devido ao conteúdo G, responsável pela baixa reticulação das cadeias de alginato de sódio, o que provavelmente levou a formação das fissuras.

A formação de canais pode ser observada no corte transversal na microesfera da Figura 4.43 (c) e principalmente no aumento deste corte transversal, especificamente em um canal, Figura 4.43 (d). Provavelmente, a tendência da OTC é alojar-se em grande quantidade nestes canais, além de dissolvido ao longo da matriz de alginato. Isto justifica uma liberação rápida de OTC em meio ácido, pois seus cristais se dissolvem, dando origem ao fluxo responsável pelo disparo inicial na concentração do fármaco.

Os géis de alginato possuem a capacidade de reter, no interior de sua rede amorfa, moléculas de dimensões inferiores a seus poros e cavidades. Como o tamanho destes poros é determinado pela taxa de remoção do solvente, razão M/G e amorficidade do alginato, pode-se deduzir que o fluxo do fármaco ocorre por preenchimento de um certo volume de canais. Os materiais amorfos apresentam distribuição de tamanho de poros e/ou canais não uniforme. Como os poros e/ou canais são definidos também pela rede, as características e as propriedades de cada microesfera, que determinarão suas possíveis aplicações, serão definidas por tais poros e/ou canais. Esta propriedade confere uma

excelente seletividade de forma, tornando possível escolher, ou mesmo adaptar, o material mais adequado para uma determinada liberação, de acordo com a cinética de gelificação e o conteúdo G envolvido.

A distribuição de tamanhos de partículas cristalinas de OTC, obtida por espalhamento de luz, está apresentada na Figura 4.44. A determinação das partículas cristalinas de OTC baseia-se unicamente no seu diâmetro. Sabe-se que a OTC é fracamente solúvel em água, formando, portanto, uma dispersão tanto na água como na solução de alginato de sódio em meio aquoso. Assim, os tamanhos dos cristais serão preservados e provavelmente, após as reticulações das cadeias de alginato de sódio com íons cálcio, o fármaco se aloja nos canais da malha.

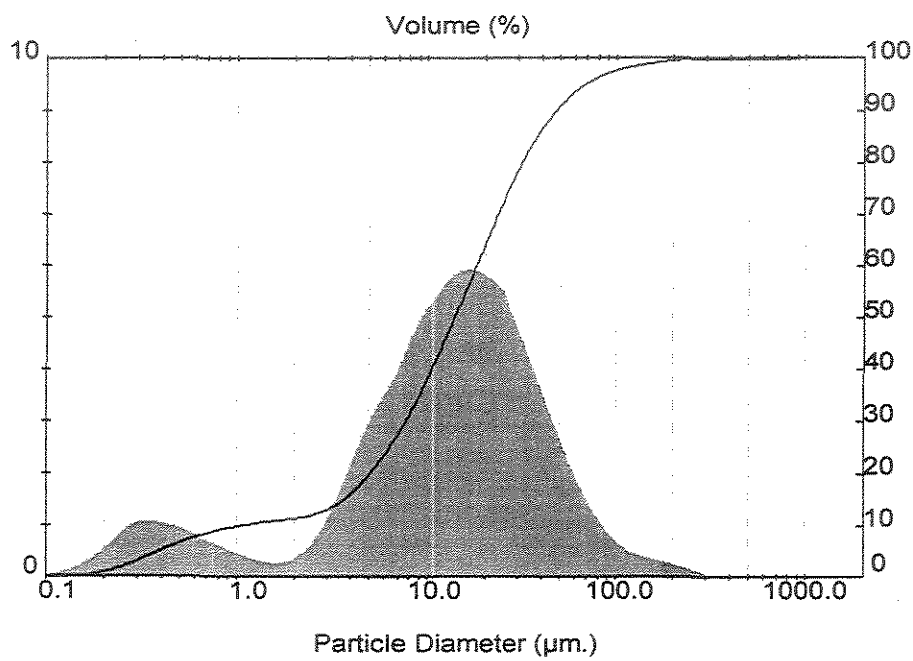
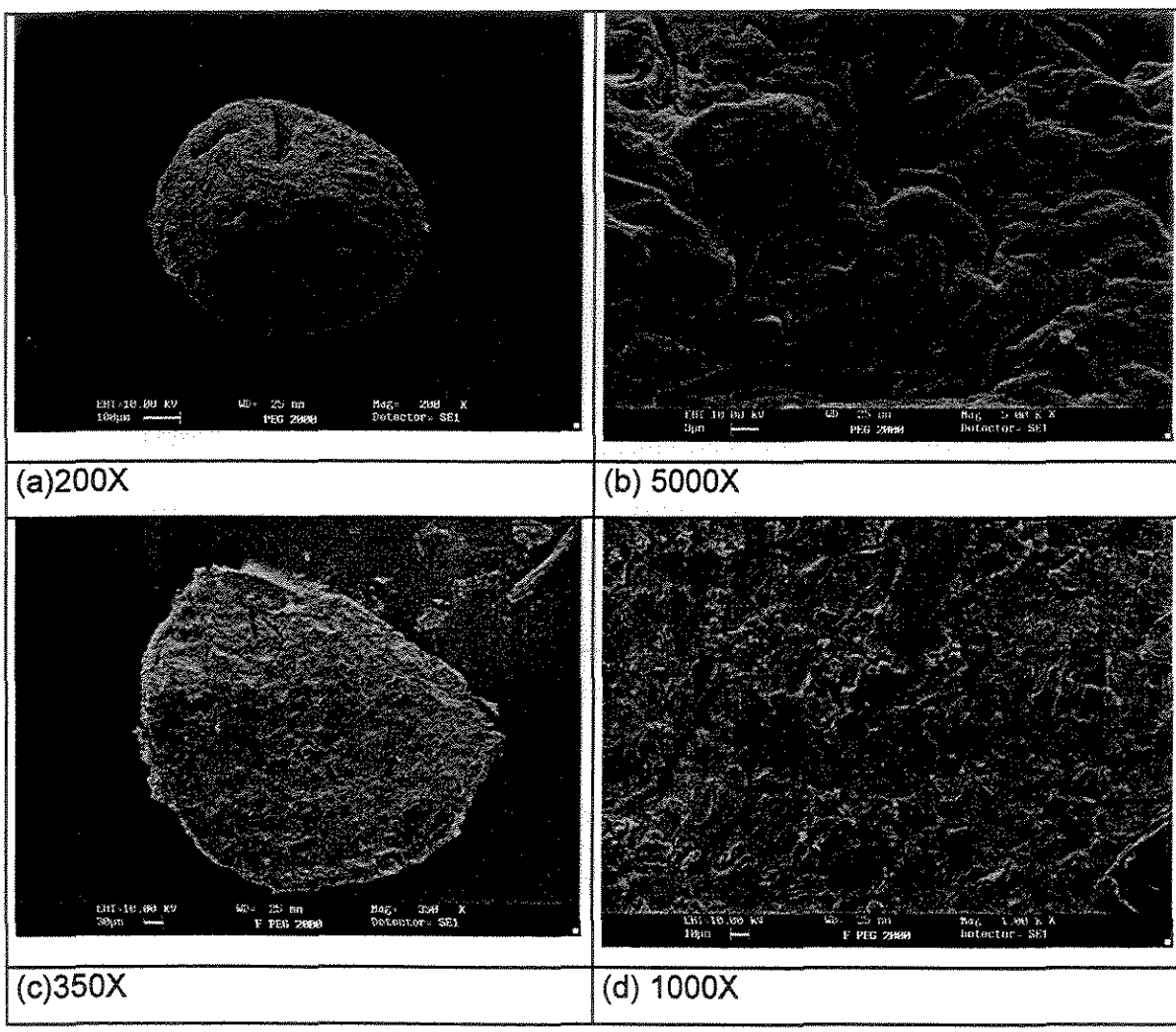



**Figura 4.44** Distribuição dos tamanhos de cristais da Oxitetraciclina obtida por Espectrômetro de Varredura a Laser (Laser Scattering Spectrometer).

O conhecimento da distribuição de tamanho de partículas é muito importante para entendermos a encapsulação de OTC. Dependendo do tamanho médio das mesmas teremos uma maior ou menor retenção de partículas na malha. Portanto, as partículas apresentam variação de tamanho de 0.1 µm a 300 µm, em dois tipos de populações de OTC, 0.34 µm e de 16,95 µm que

corresponde a 340 nm e 16.950 nm, respectivamente. Assim, as populações menores podem não ter sido retidas pela malha.

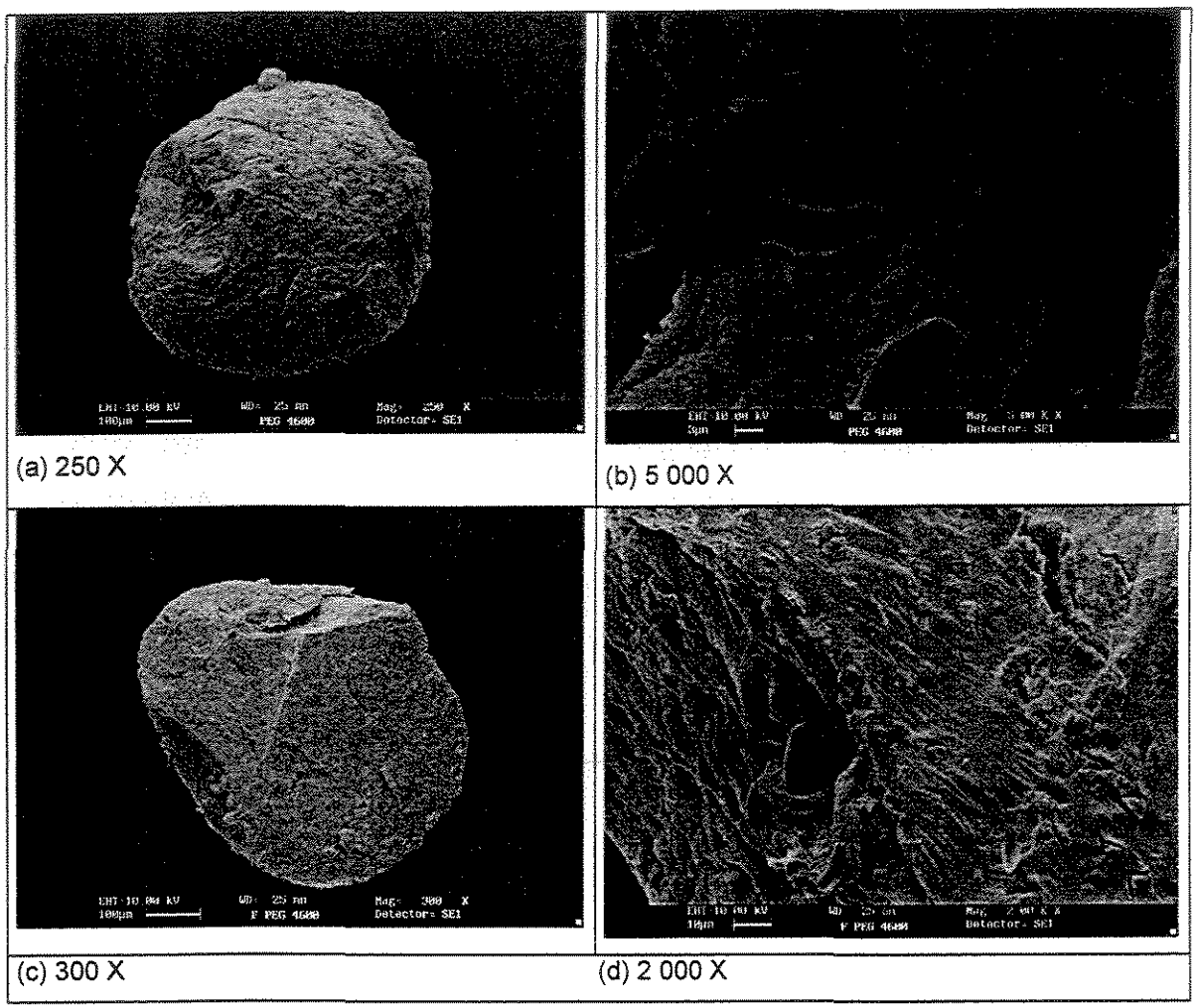
Nas Figuras 4.45 a 4.47 estão apresentadas as micrografias de superfície e de fratura das microesferas de alginato-mv, incorporadas com o PEG 0,5% e sem reticulação com o GA.



(a)200X | (b) 5000X

(c)350X | (d) 1000X

**Figura 4.45** Morfologia de superfície das microesferas de alginato de cálcio incorporadas com PEG 2000, sem reticulação com o GA: (a) microesfera (b) superfície da microesfera, (c) sessão transversal, (d) parte interna da fratura .



(a) 250 X

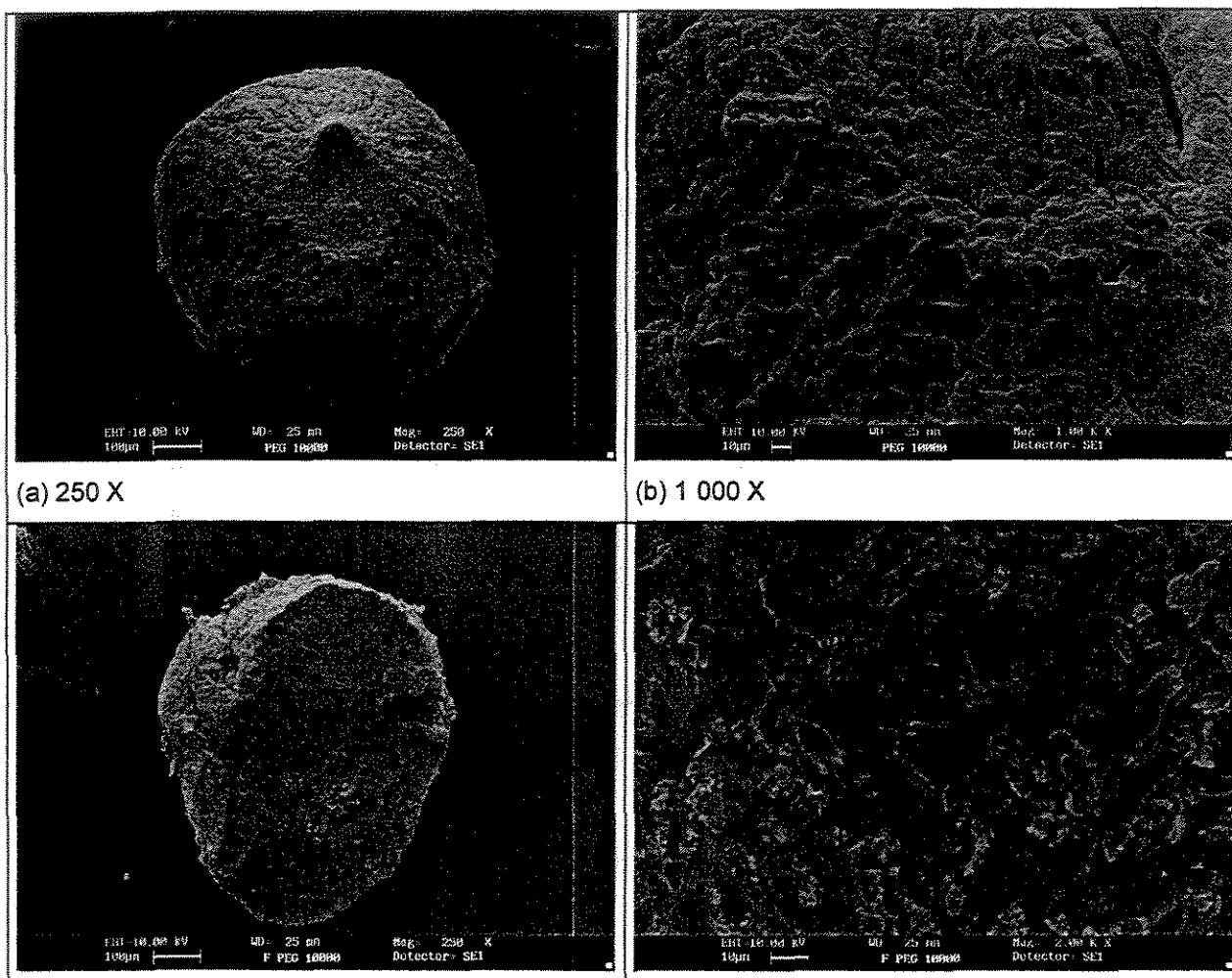
(b) 5 000 X

(c) 300 X

(d) 2 000 X

**Figura 4.46** Morfologia das microesferas de alginato de cálcio incorporadas com PEG 4600, sem reticulação com o GA: (a) microesfera e (b) superfície da microesfera, (c) sessão transversal de uma microesfera e (d) parte interna da fratura.

Observa-se nas Figuras 4.45 a 4.47 a presença de fissuras na superfície das microesferas de alginato/PEG, sem GA, sugerindo uma não homogeneidade das mesmas.

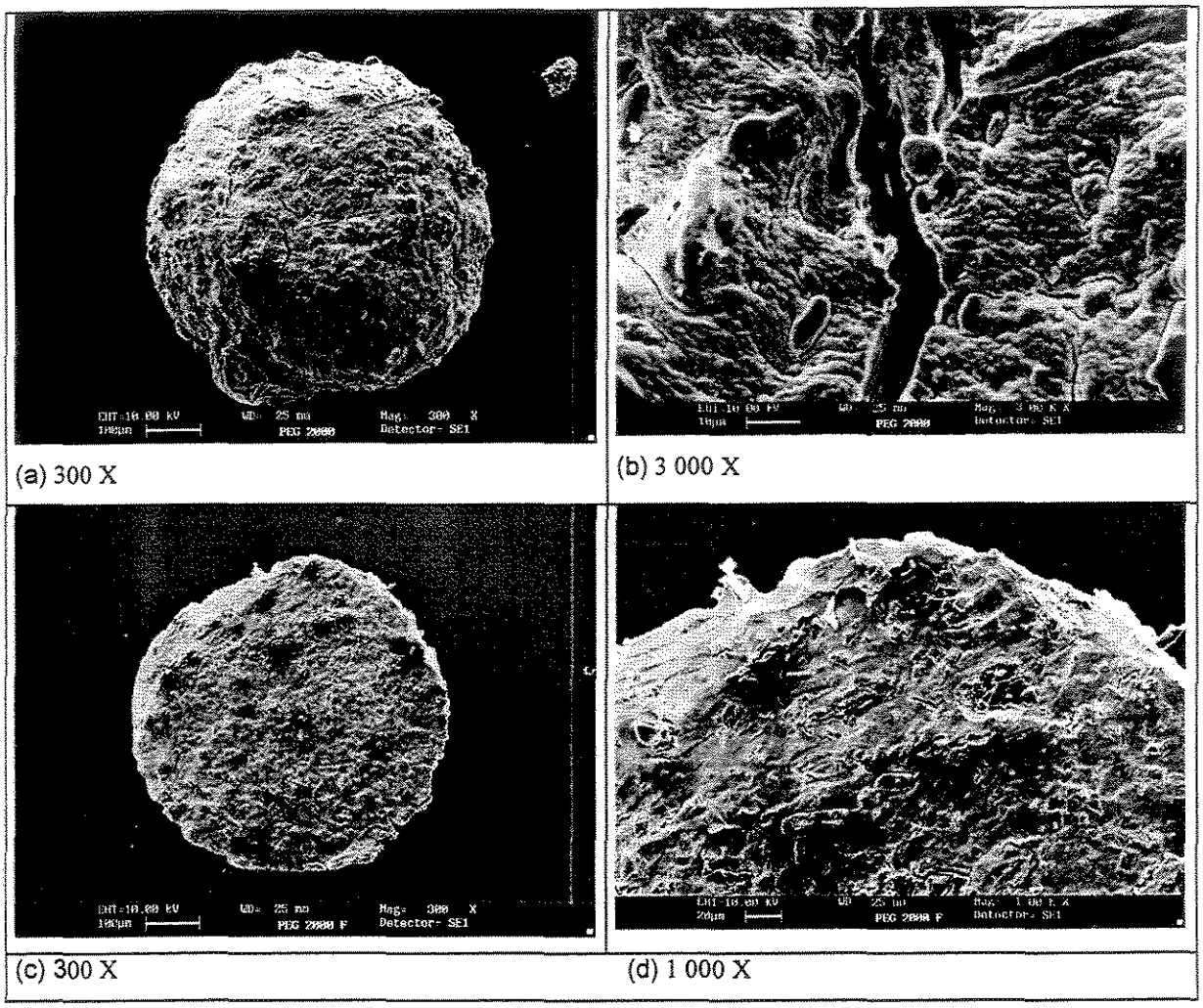


(a) 250 X (b) 1 000 X

(c) 250 X (d) 2 000 X

**Figura 4.47** Morfologia das microesferas de alginato de cálcio incorporadas com PEG 10000, sem reticulação com o GA: (a) microesfera e (b) superfície da microesfera, (c) sessão transversal de uma microesfera e (d) parte interna da fratura.

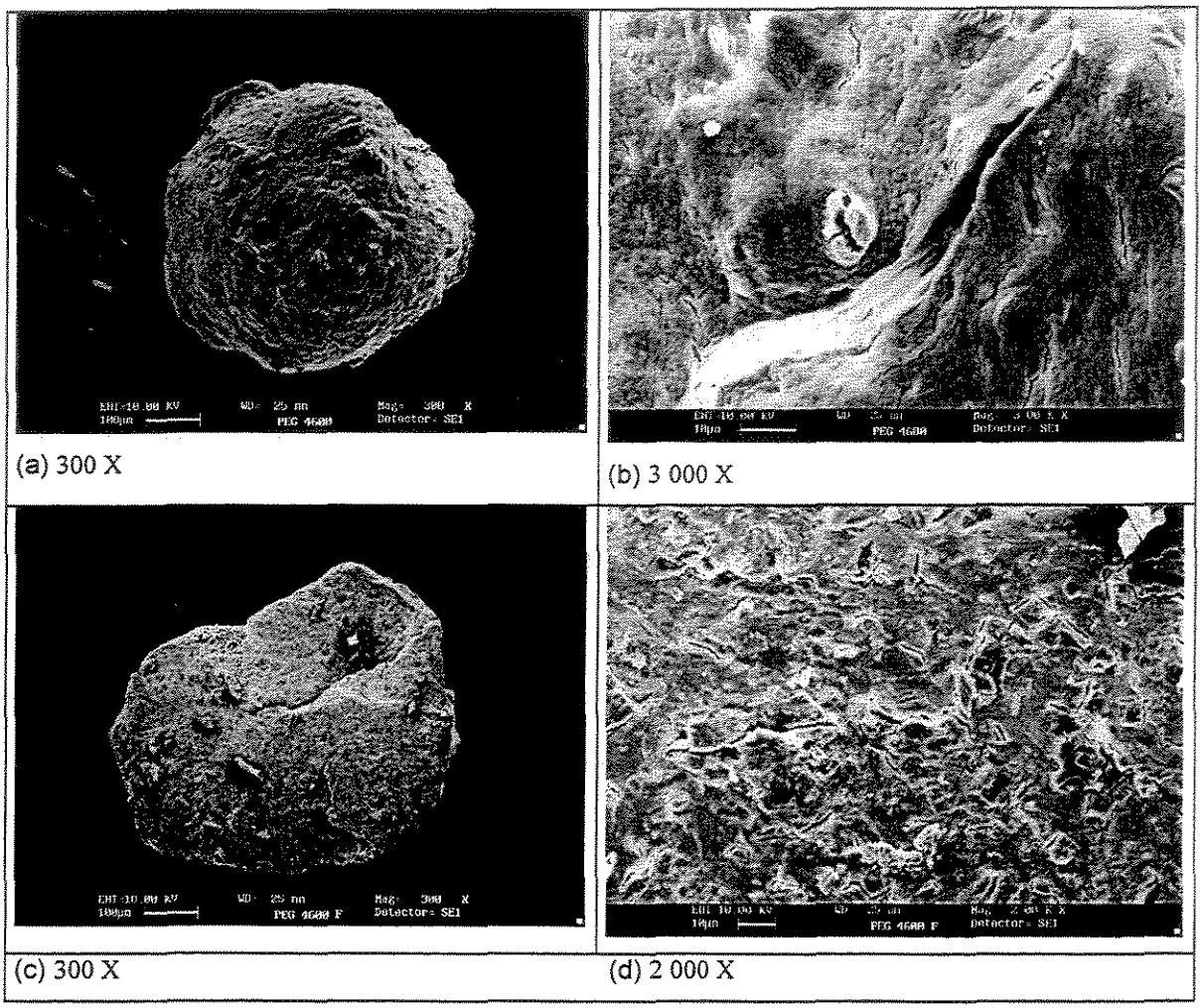
Nas Figuras 4.48 a 4.50 apresentamos as micrografias de microesferas de alginato de cálcio incorporada com PEG (0,5%), sendo reticuladas com o GA.



(a) 300 X (b) 3 000 X

(c) 300 X (d) 1 000 X

**Figura 4.48** Morfologia das microesferas de alginato de cálcio (mv)/PEG 2000/GA 0,2%: (a) microesfera e (b) superfície da microesfera, (c) sessão transversal de uma microesfera e (d) parte interna da fratura.



(a) 300 X

(b) 3 000 X

(c) 300 X

(d) 2 000 X

**Figura 4.49** Morfologia das microesferas de alginato de cálcio (mv)/PEG 4600/GA 0,2%: (a) microesfera (b) superfície da microesfera, (c) sessão transversal, (d) parte interna da fratura.

Nas Figuras 4.48 a 4.50, onde o glutaraldeído foi introduzido para promover a reticulação do PEG, nota-se uma superfície rugosa e a presença de fissuras, embora em quantidades menores. Isso reforça nossa hipótese de que o GA promoveu a reticulação do PEG, formando uma malha na superfície, tornando-a mais resistente às fissuras provocadas pela alta velocidade de evaporação da água no processo de secagem das mesmas. O mesmo comportamento anterior, quanto as fraturas, foi observado.

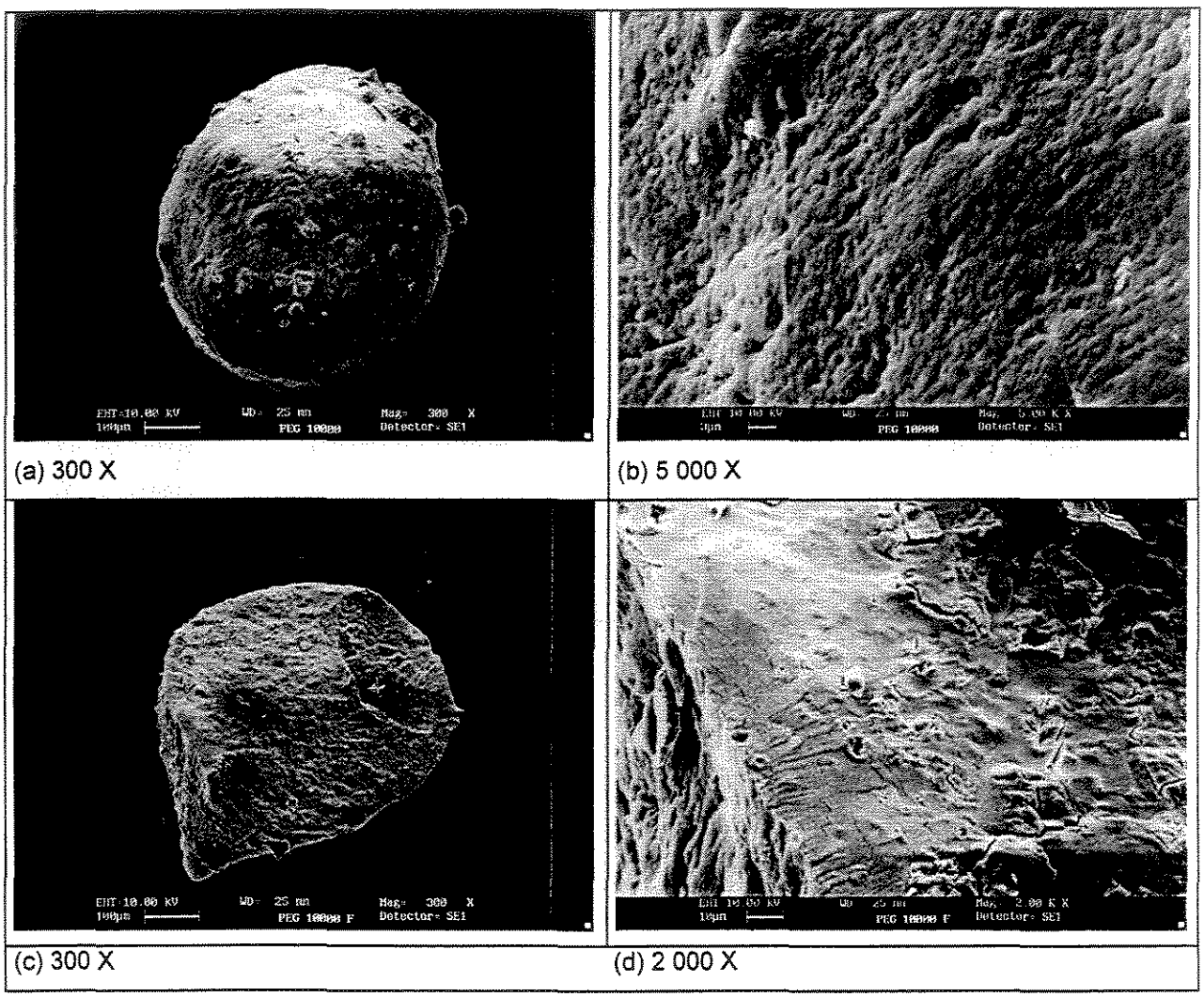



**Figura 4.50** Morfologia das microesferas de alginato de cálcio (mv)/PEG 10000/GA 0,2%: (a) microesfera e (b) superfície da microesfera, (c) sessão transversal de uma microesfera e (d) parte interna da fratura.

Nas Figuras 4.51 a 4.53 estão apresentadas a morfologia de microcápsulas de alginato de cálcio média viscosidade coacervada com quitosana de alta, média e baixa viscosidade.

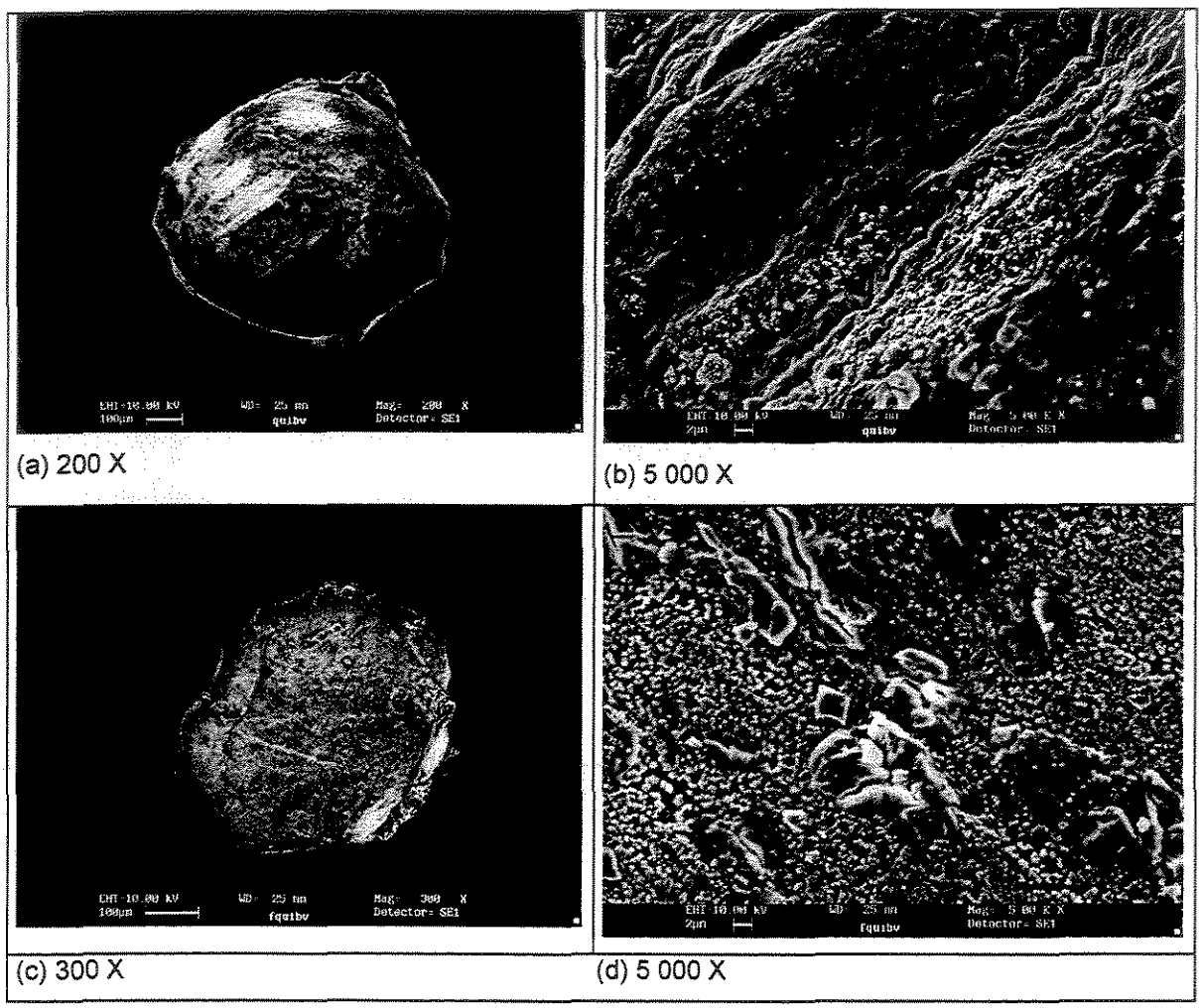



**Figura 4.51** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana baixa viscosidade: (a) microcápsulas e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsulas e (d) parte interna da fratura.

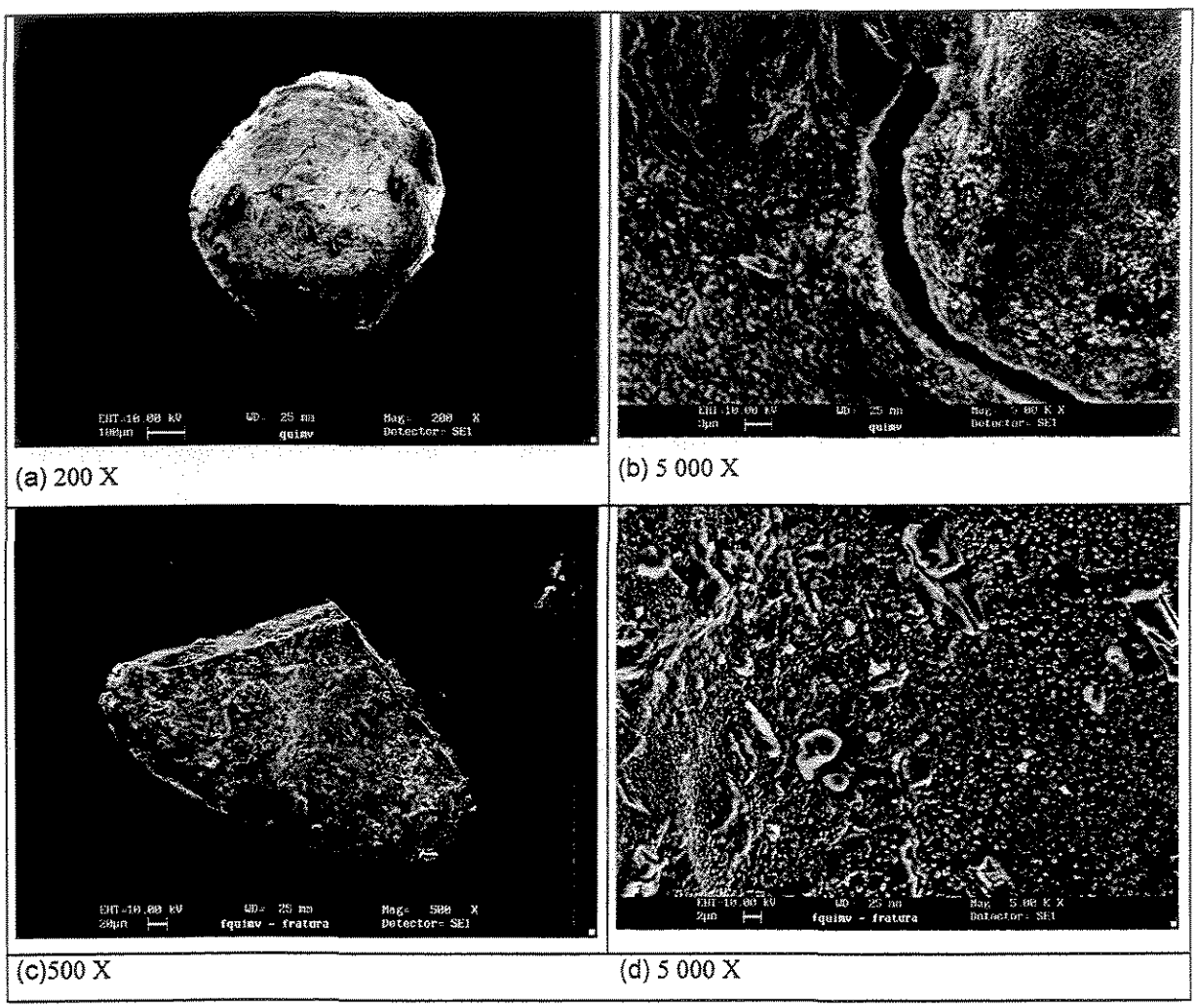



**Figura 4.52** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana média viscosidade: (a) microcápsulas e (b) superfície da microcápsulas, (c) sessão transversal de uma microcápsulas e (d) parte interna da fratura.

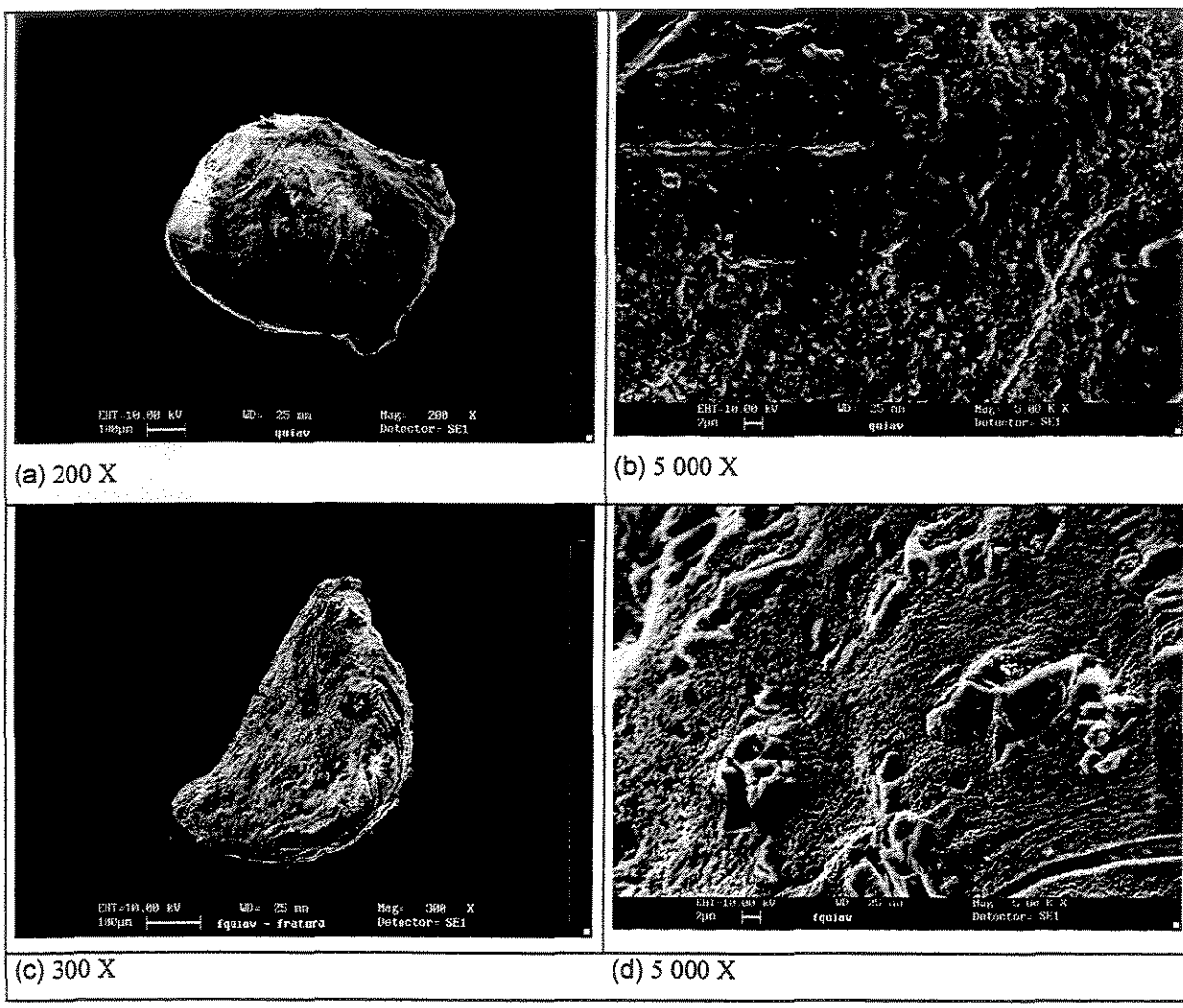



**Figura 4.53** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana alta viscosidade: (a) microcápsulas (b) superfície da microcápsulas , (c) sessão transversal, (d) parte interna da fratura.

As microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana são compostas de três camadas; um centro de alginato de cálcio, ligada por uma membrana alginato-quitosana interfásica e, por fim, uma última camada de quitosana precipitada. A membrana interfásica é formada por interação eletrostática entre o poliânion alginato, especificamente os grupos carboxílicos, e o policátion quitosana, especificamente os grupos amina. O cloreto de cálcio na solução de quitosana difunde para o centro das gotas de alginato mais rapidamente que a quitosana, devido a sua baixa massa molar, formando um gel. Subseqüentemente a microcápsula com centro gel de alginato coacerva com a quitosana e a membrana interfáfica é formada. A Figura 4.54 mostra o mecanismo proposto para ligação entre a quitosana e o alginato de cálcio [74].

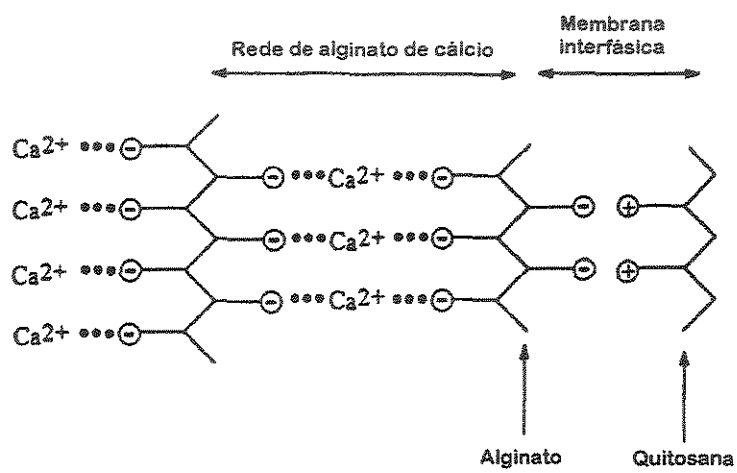



**Figura 4.54** Mecanismo proposto para ligação entre a quitosana e o alginato de cálcio [74].

Quando a solução aquosa de alginato contendo o fármaco é gotejada na solução de quitosana com íons cálcio, os íons cálcio iniciam a reação de gelificação, formando uma matriz porosa. No entanto, na superfície destas microcápsulas observa-se fissuras conforme mostradas nas ampliações das micrografias, referente a microcápsulas de alginato recoberta com quitosana baixa

viscosidade [Figura 4.51 (b)], média viscosidade [Figura 4.52 (b)] e alta viscosidade [Figura 4.53 (b)]. Acredita-se que uma possível causa para a formação de fissuras possa ser a presença de falhas na camada externa da microcápsula de alginato, formando canais preferenciais para a penetração de quitosana e futura liberação de OTC., não conseguindo revestir as cavidades maiores e não parece depender da massa molar de quitosana. Além disso, a OTC pode interferir na coacervação das microcápsulas, impedindo um contato intimo entre as cadeias, criando uma geometria final mais irregular.

Observou-se, ainda, nas micrografias de superfície de todas as microesferas de alginato-quitosana, uma dispersão de OTC em forma de particulas cristalinas muito pequenas. Durante secagem, a água difunde para fora das microesferas e a OTC dissolvida, provavelmente, é carregada junto e pode aderir na superfície; a água, no entanto, evapora. Isto justifica um disparo inicial da OTC em meio ácido e básico. Vale ressaltar que em meio ácido este efeito é mais pronunciado pelo efeito sinergético da alta solubilidade de OTC neste meio; a forma de dispersão de OTC quando incorporada na matriz de alginato-quitosana, por não ter interações secundárias e nem muitos canais na malha, elas ficam homogeneamente dispersas ao longo da matriz.

Os pH das dispersões poliméricas, tanto do alginato como da quitosana, foram ajustados para 5,7; pois, é nesse pH que se tem uma maior eficiência na ligação da quitosana ao gel de alginato. A explicação para isso pode estar no fato que, quando o pH aproxima-se do pKa da quitosana (pKa=6,3), a densidade de carga da molécula de quitosana reduz significativamente, levando à maior extensão da molécula com um maior coeficiente de difusão [68].

Não foi possível observar a membrana interfásica por MEV e nem a quitosana precipitada uma vez que cristais de OTC estavam dispersos na superfície e no interior das microesferas.

Nas Figuras 4.55 a 4.57 estão apresentadas as micrografias de superfície e de fratura das microcápsulas de centro alginato revestidas com quitosana de baixa viscosidade e recobertas com três diferentes tipos de PEG (2000, 4600 e 10000) utilizando glutaraldeído 0,05% como agente reticulante.

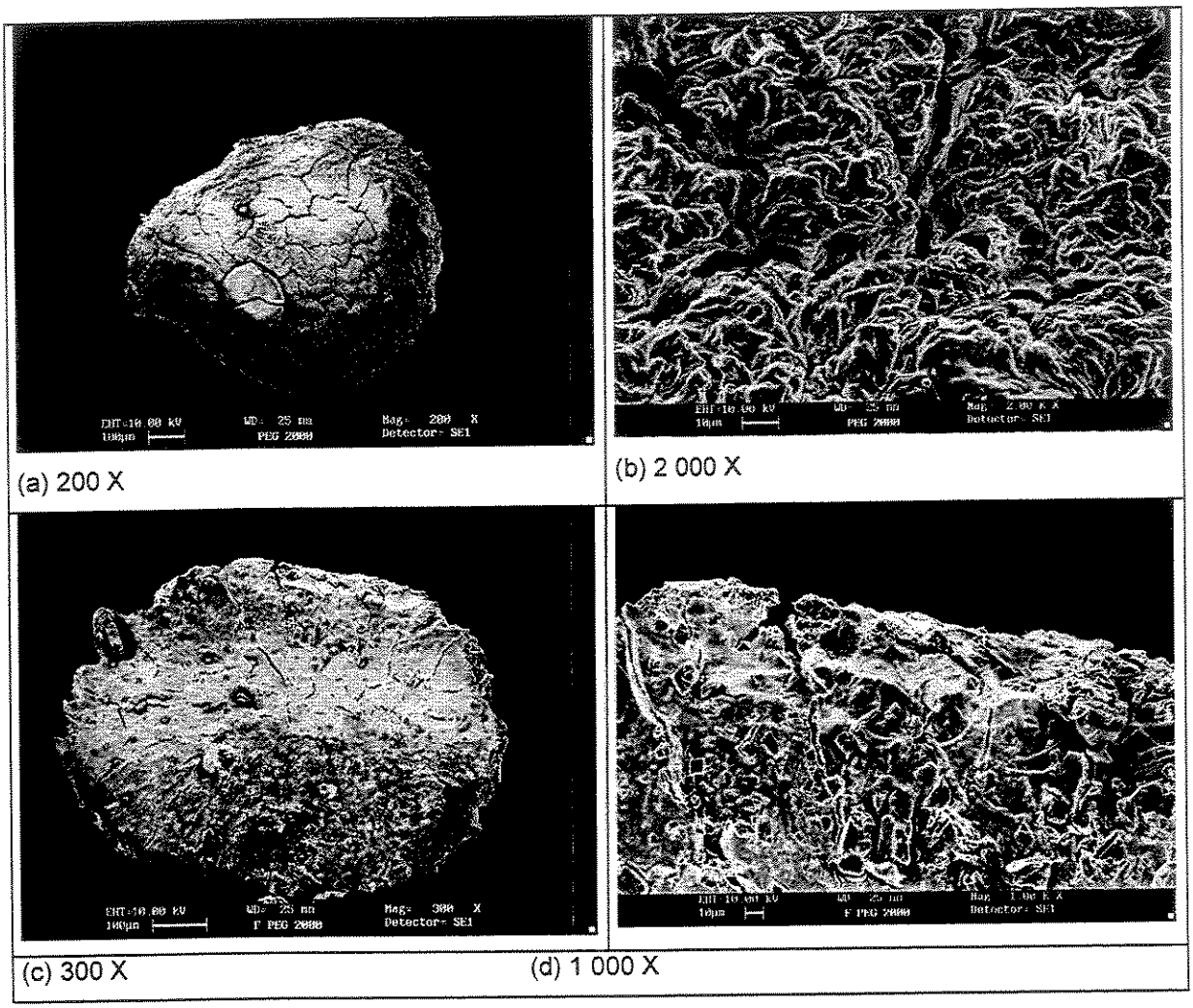



**Figura 4.55** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana baixa viscosidade/PEG 2000 (0.2%)/glutaraldeído (0,05%): (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

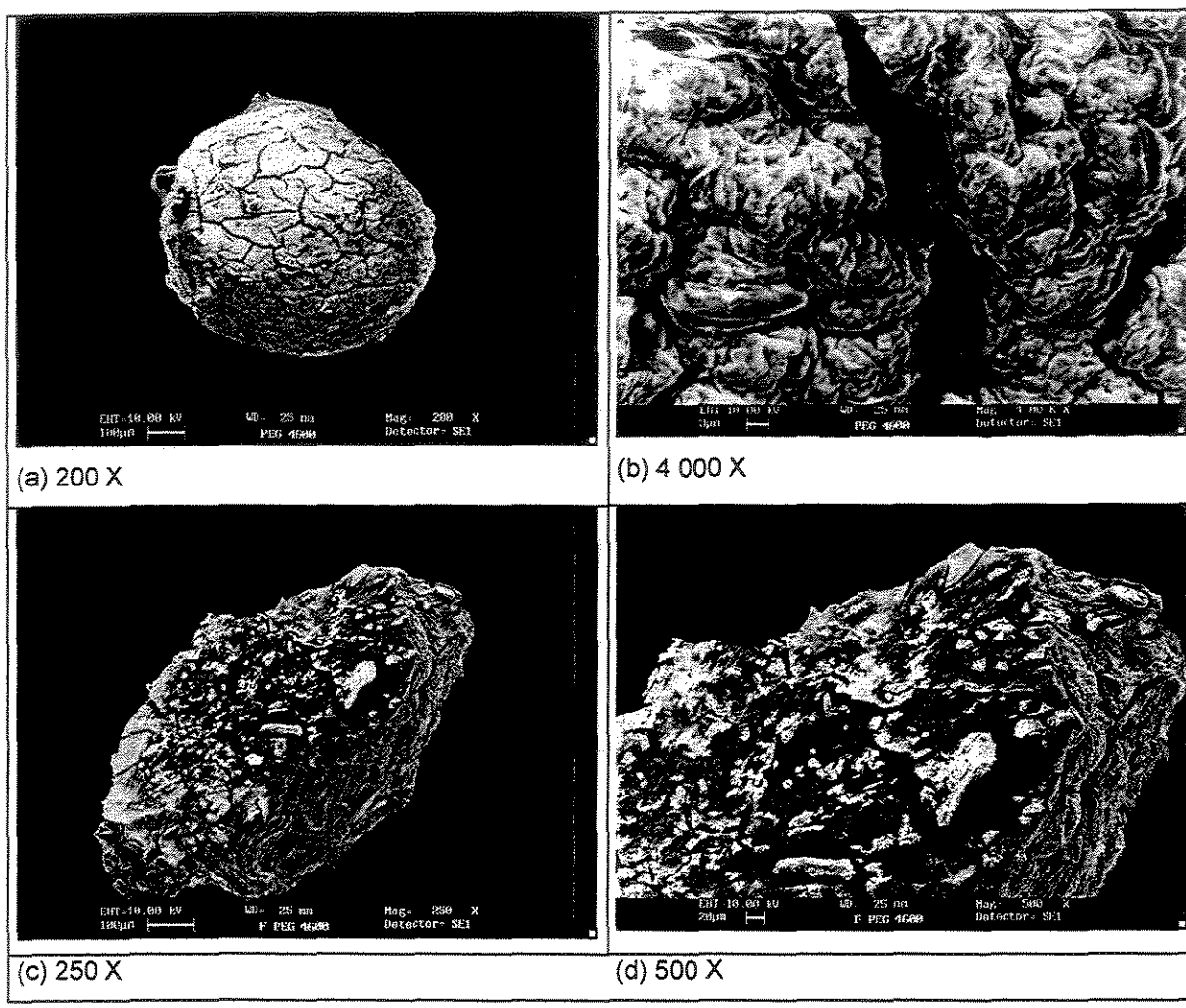



**Figura 4.56** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio(mv)/quitosana baixa viscosidade/PEG 4600 (0,2%)/GA (0,05%): (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

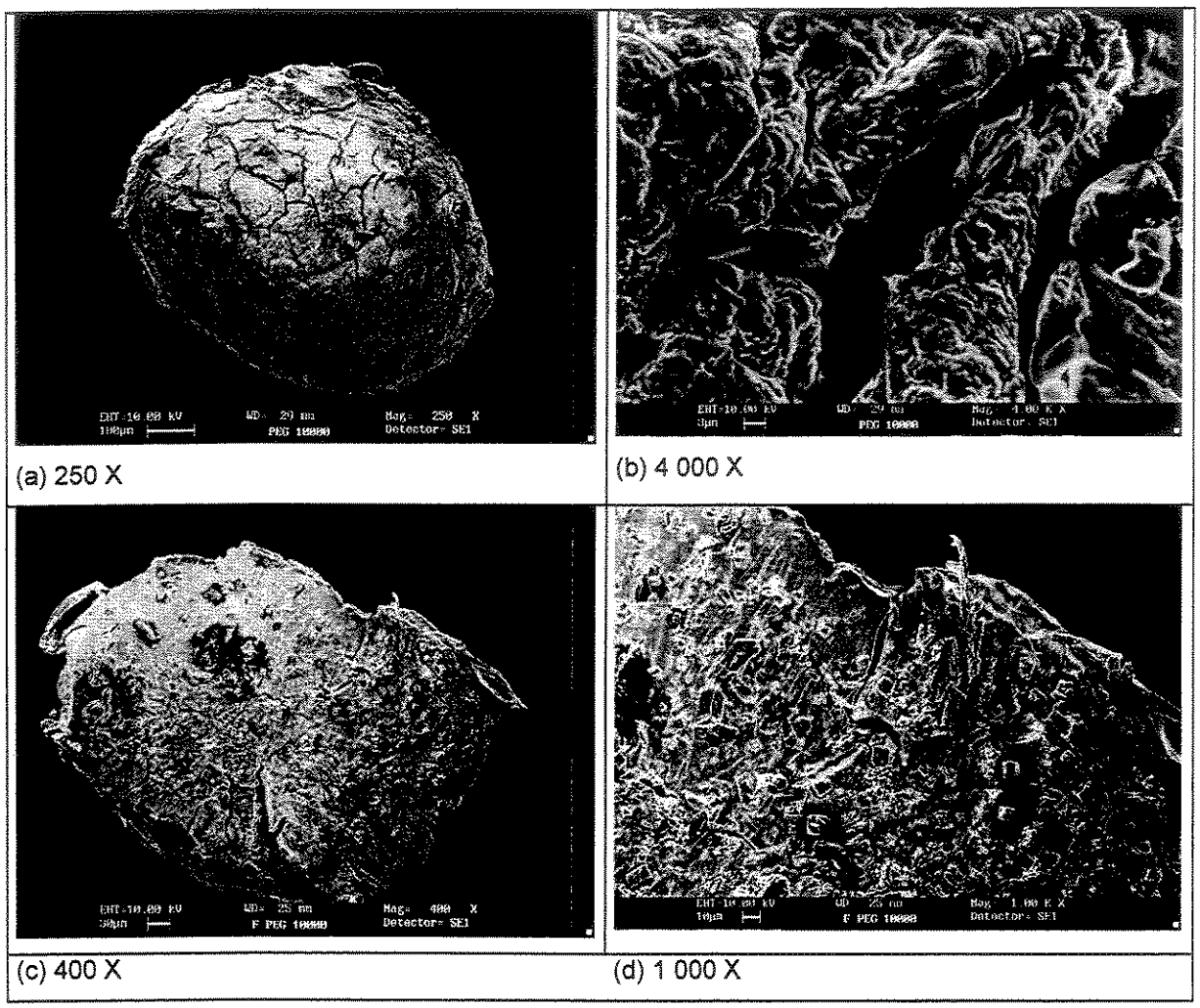



**Figura 4.57** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana baixa viscosidade/PEG 10000 (0,2%)/GA (0,05%): (a) microcápsula (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

A nova microcápsula de alginato de cálcio/quitosana/PEG é composta de quatro camadas; um centro de alginato de cálcio, ligada por uma membrana alginato-quitosana interfásica, uma camada de quitosana precipitada e , por fim, uma última camada de PEG com o glutaraldeído. O mecanismo proposto para o sistema alginato/quitosana já foi explicado. A nova barreira formada de PEG ligado pelo GA também poderia prevenir possíveis defeitos de superfície das microesferas como fissuras e poros, além de controlar a difusão. A Figura 4.58 mostra o mecanismo proposto para o sistema alginato/quitosana/PEG utilizando o glutaraldeído como reticulante entre a quitosana e o PEG.

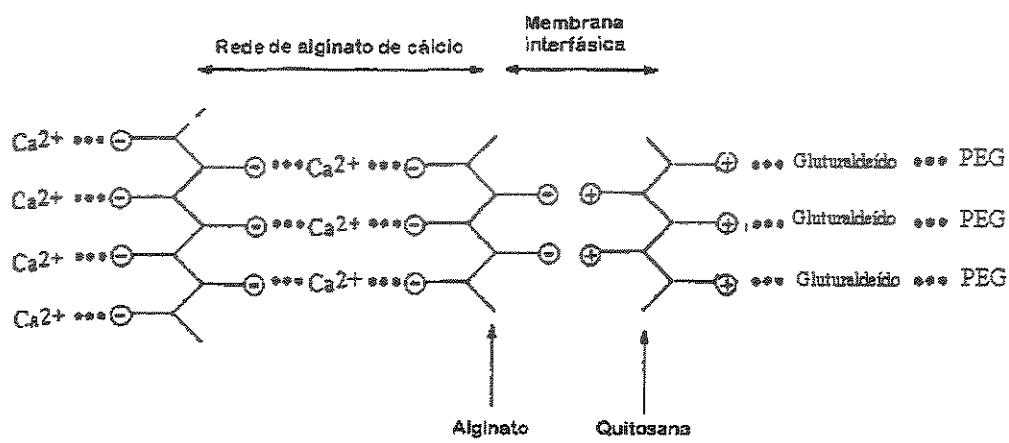



**Figura 4.58** Mecanismo proposto para o sistema alginato/quitosana/PEG utilizando o GA.

Observamos nas diversas microcápsulas de alginato/quitosana/PEG uma morfologia de superfície diferente das microcápsulas de centro alginato e de centro alginato coacervada com quitosana. Todas as superfícies se apresentaram rugosas, com fissuras ainda maiores. Entender o porque destas fissuras é algo que pode ser atribuído a vários fatores, e uma possibilidade é a forma que o gel tem sido feito, ou seja, gelificação homogênea como comentado anteriormente.

Nas Figuras 4.59 a 4.61 estão apresentadas a morfologia para microcápsulas com concentração de PEG de 0,1 %.

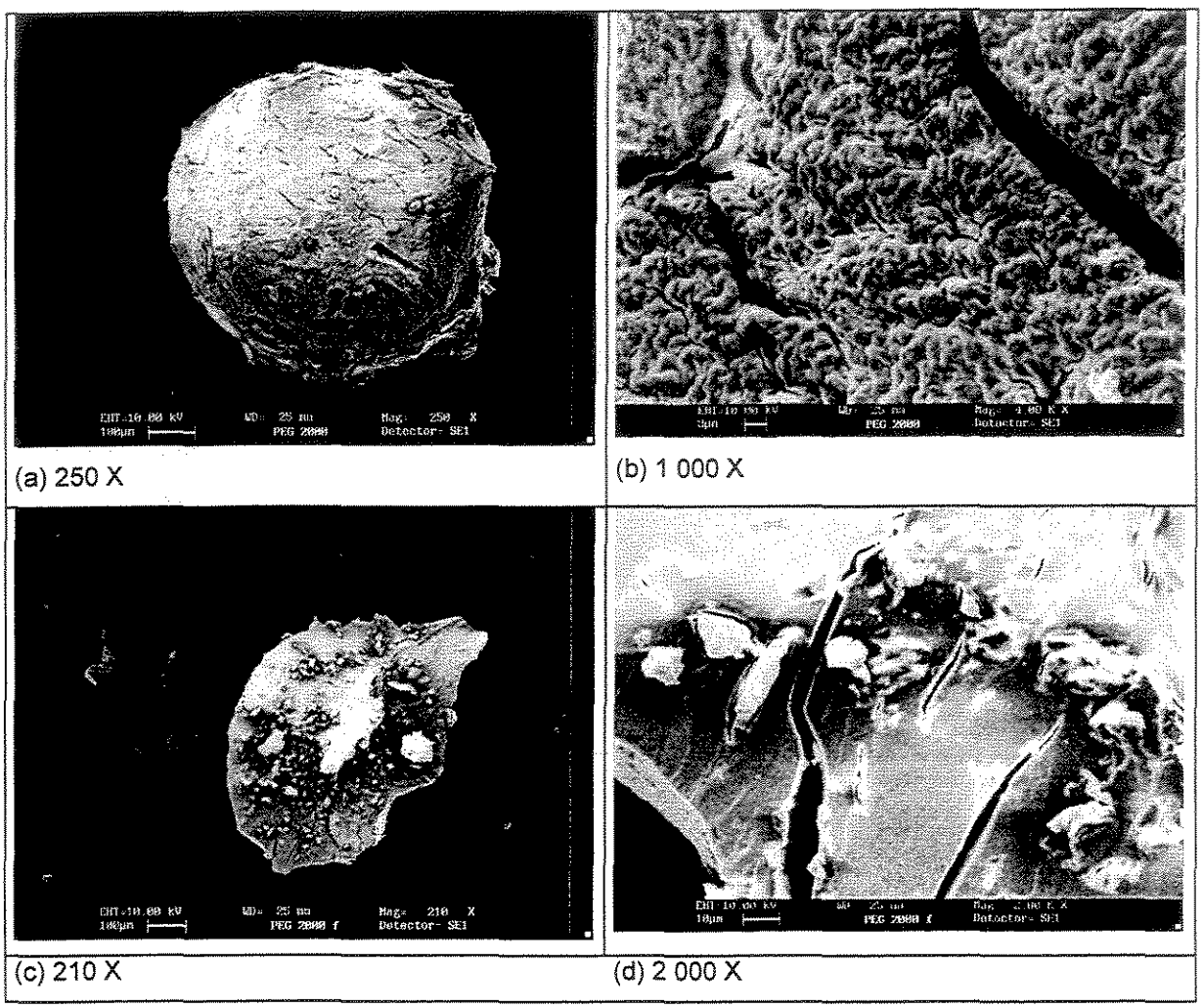



**Figura 4.59** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana baixa viscosidade/PEG 2000 (0,1%)/GA (0,05%): (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratrura.

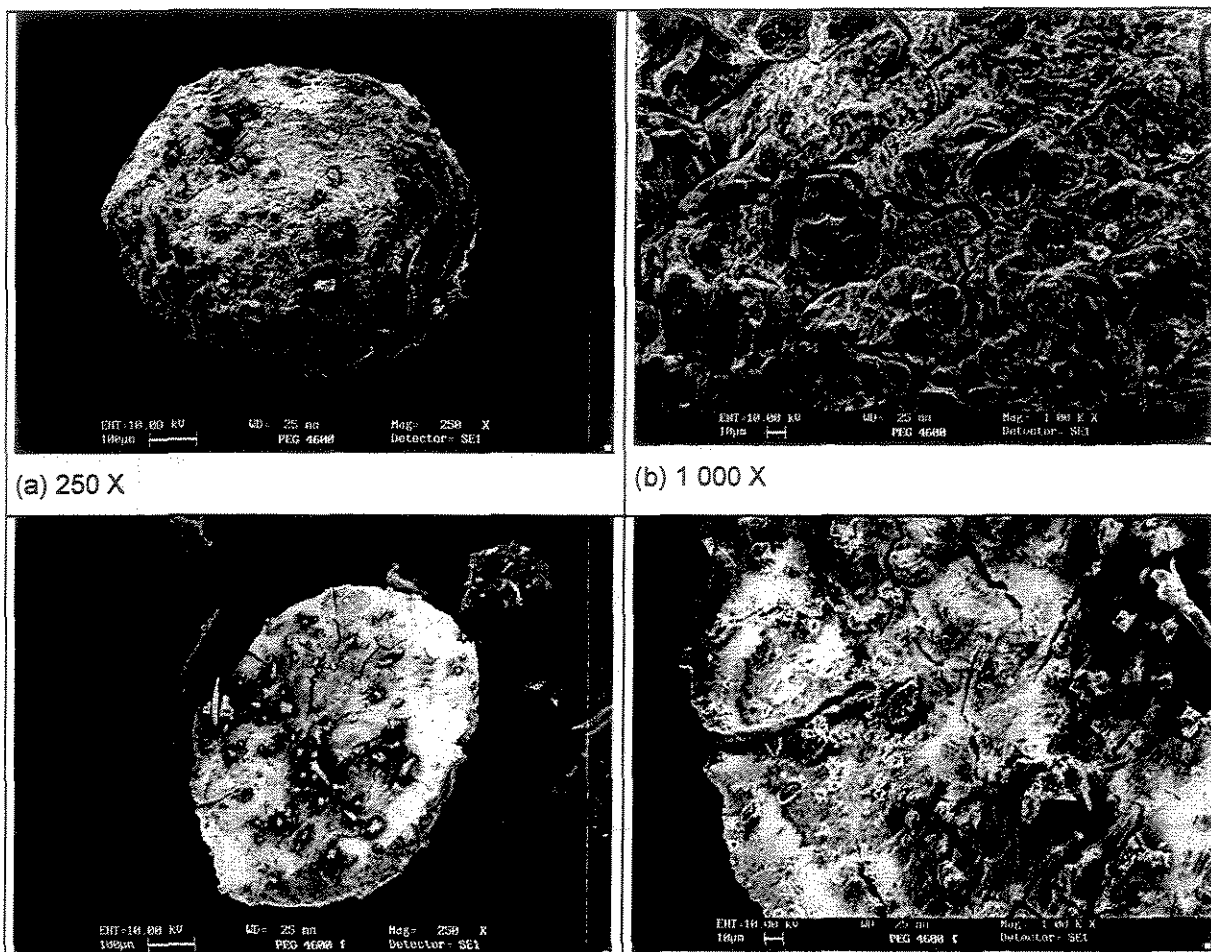



**Figura 4.60** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana baixa viscosidade/PEG 4600 (0,1%)/GA (0,05%): (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

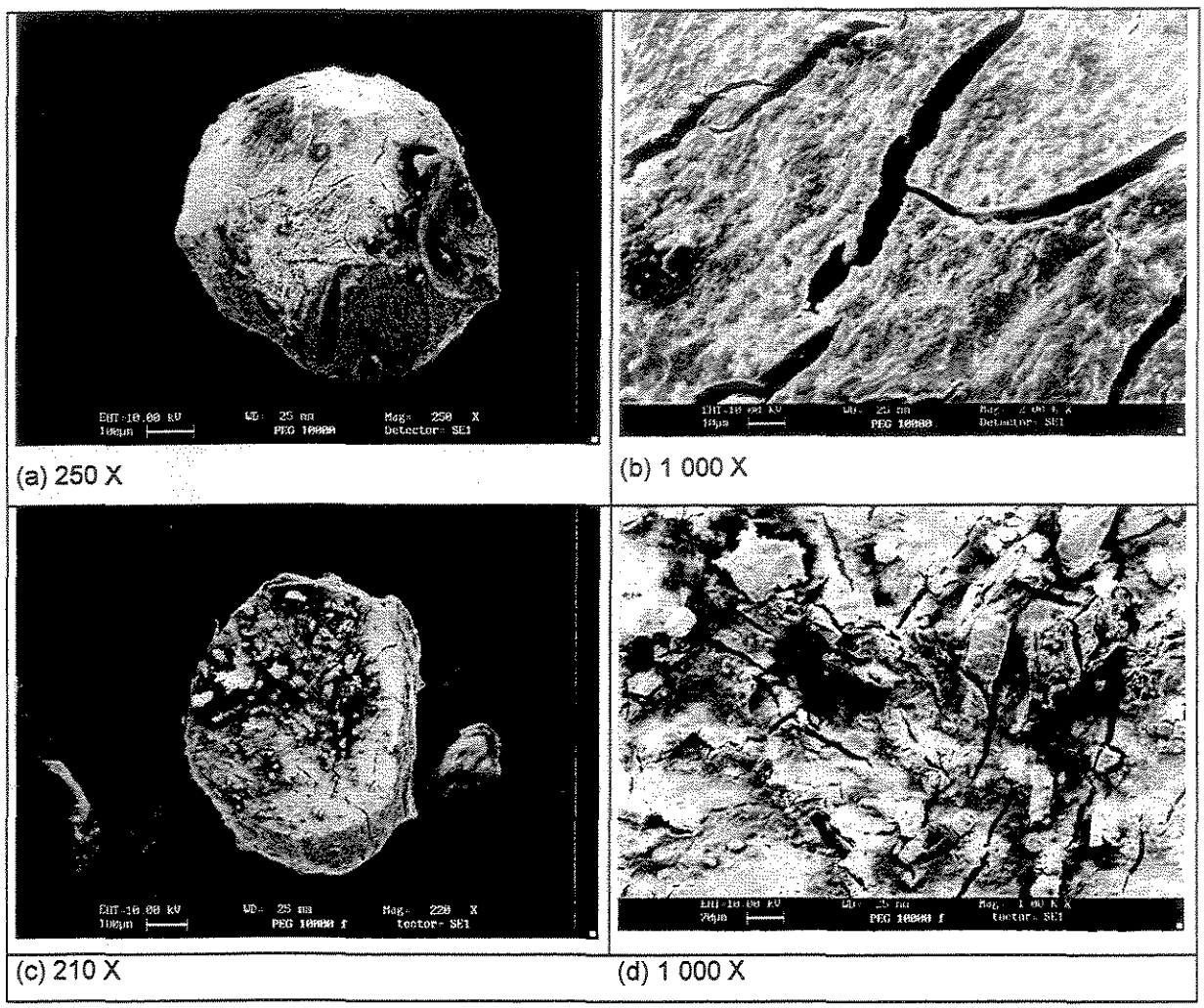



**Figura 4.61** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv)/quitosana baixa viscosidade/PEG 10000 (0,1%)/GA (0,05%): (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

As microcápsulas formadas com alginato de cálcio como centro, coacervadas com quitosana e revestidas com o PEG, utilizando o glutaraldeído em maior proporção (0,08%), estão apresentadas nas Figuras 4.62 a 4.64. A pretensão era tornar a rede polimérica na superfície mais fechada, utilizando maiores proporções de GA.

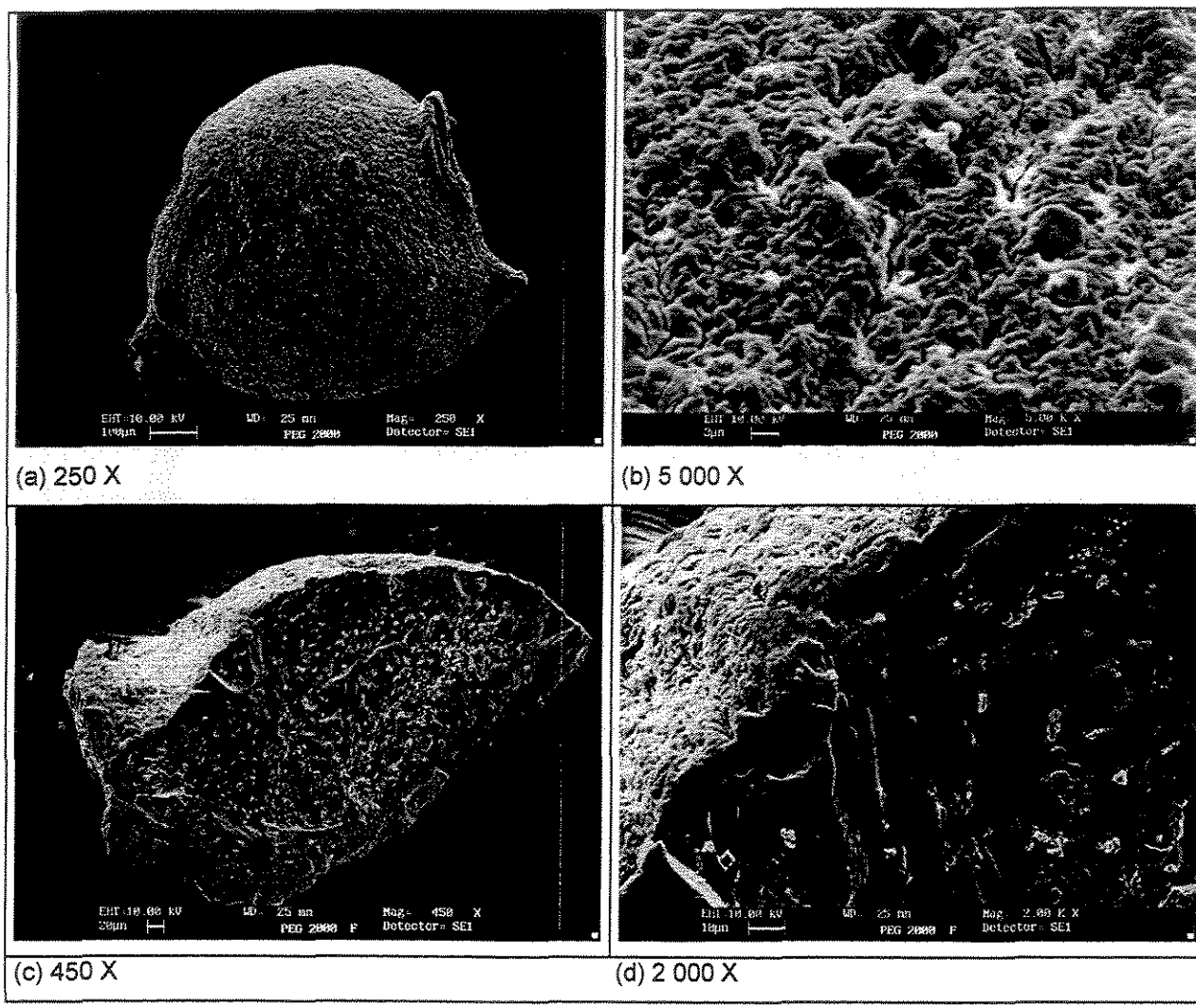



**Figura 4.62** Morfologia das microcápsulas de alg-mv/qui-bv/PEG 2000/GA 0,08%: (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

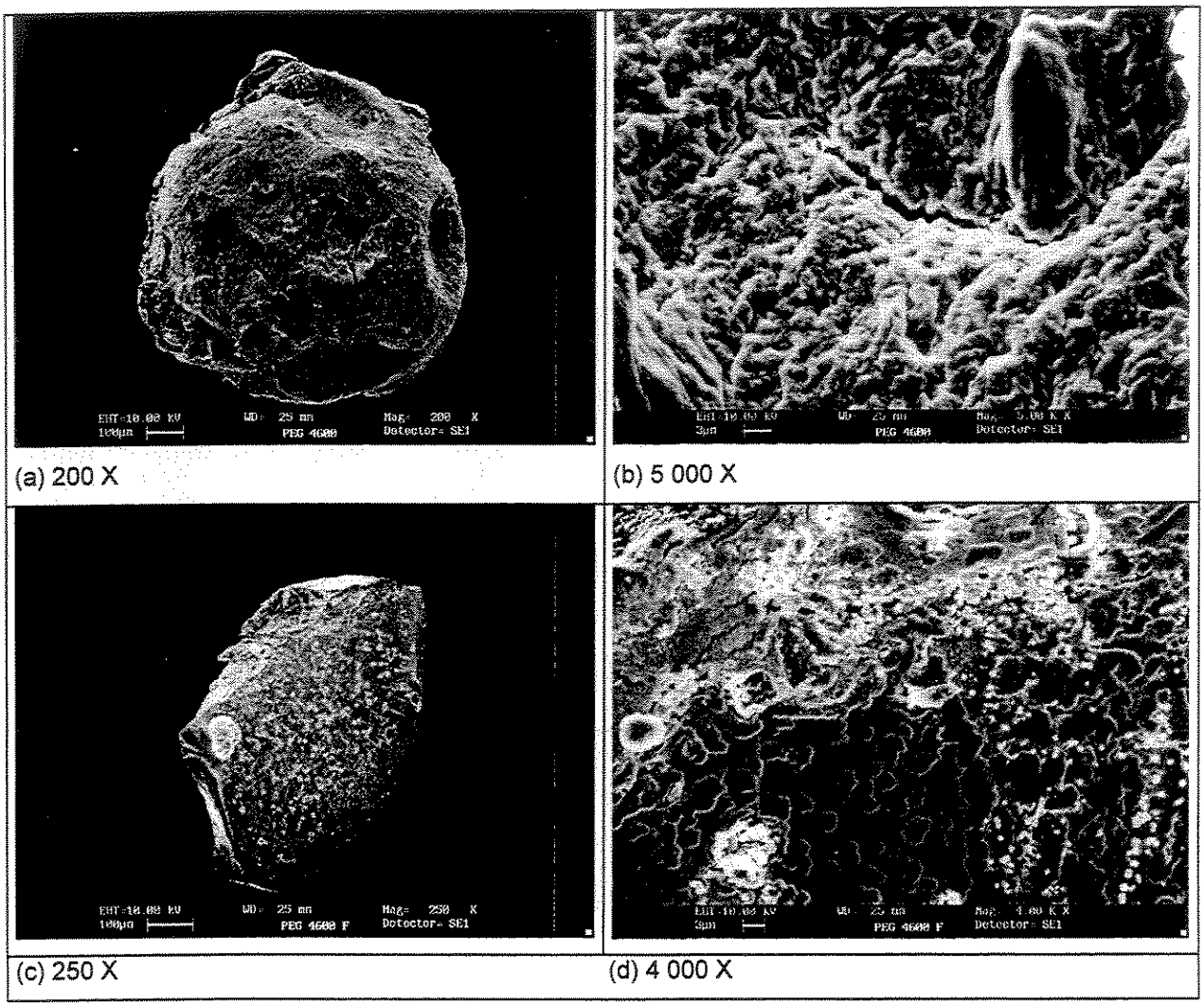



**Figura 4.63** Morfologia das microcápsulas de alg-mv/qui-bv/PEG 4600/GA 0,08%: (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

Observou-se que as microcápsulas apresentam a superfície com distribuição de fissuras bem inferiores que as utilizadas com o GA 0,05%. Porém a presença de quitosana também pode ter contribuído para a formação de uma matriz menos porosa.

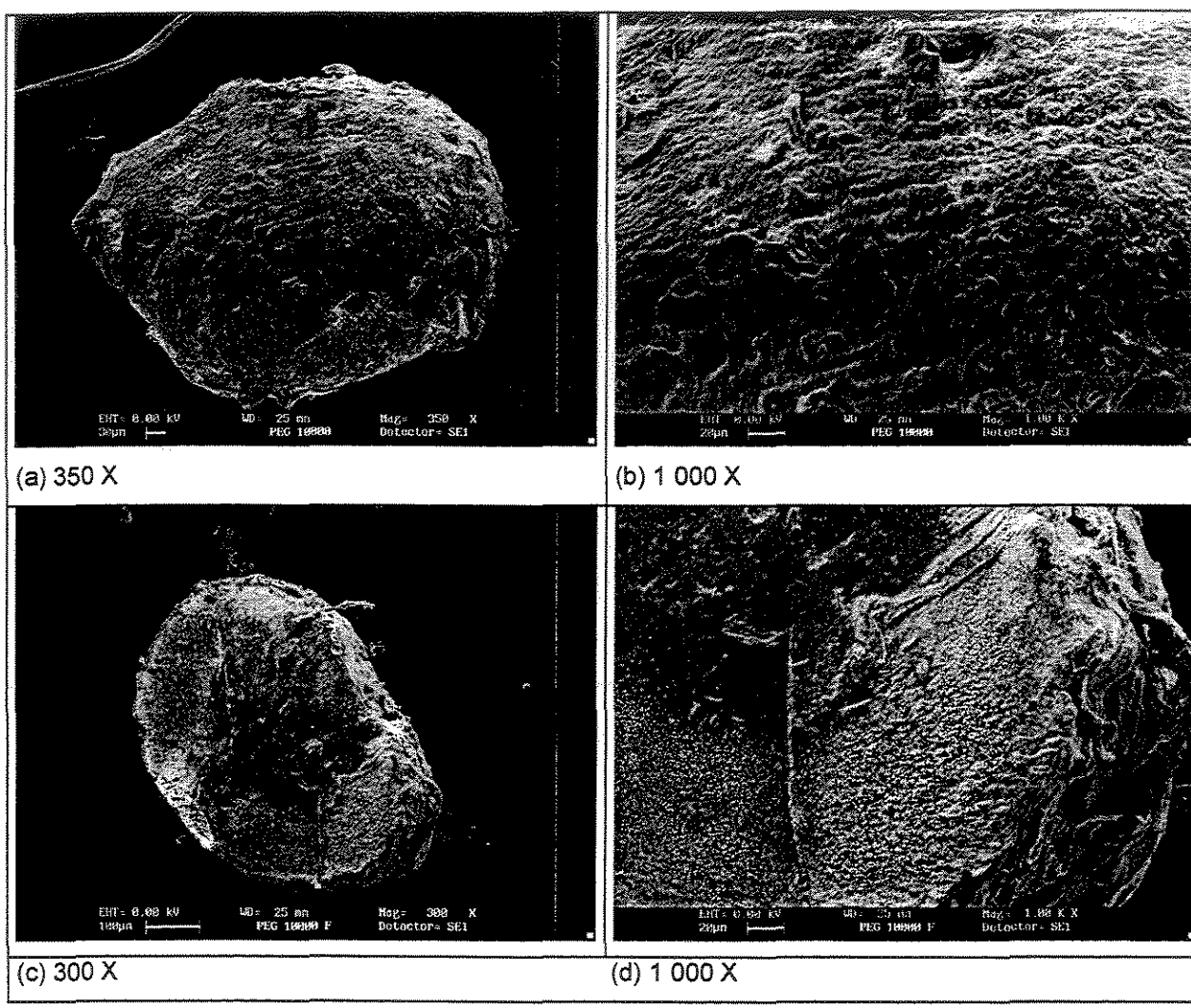
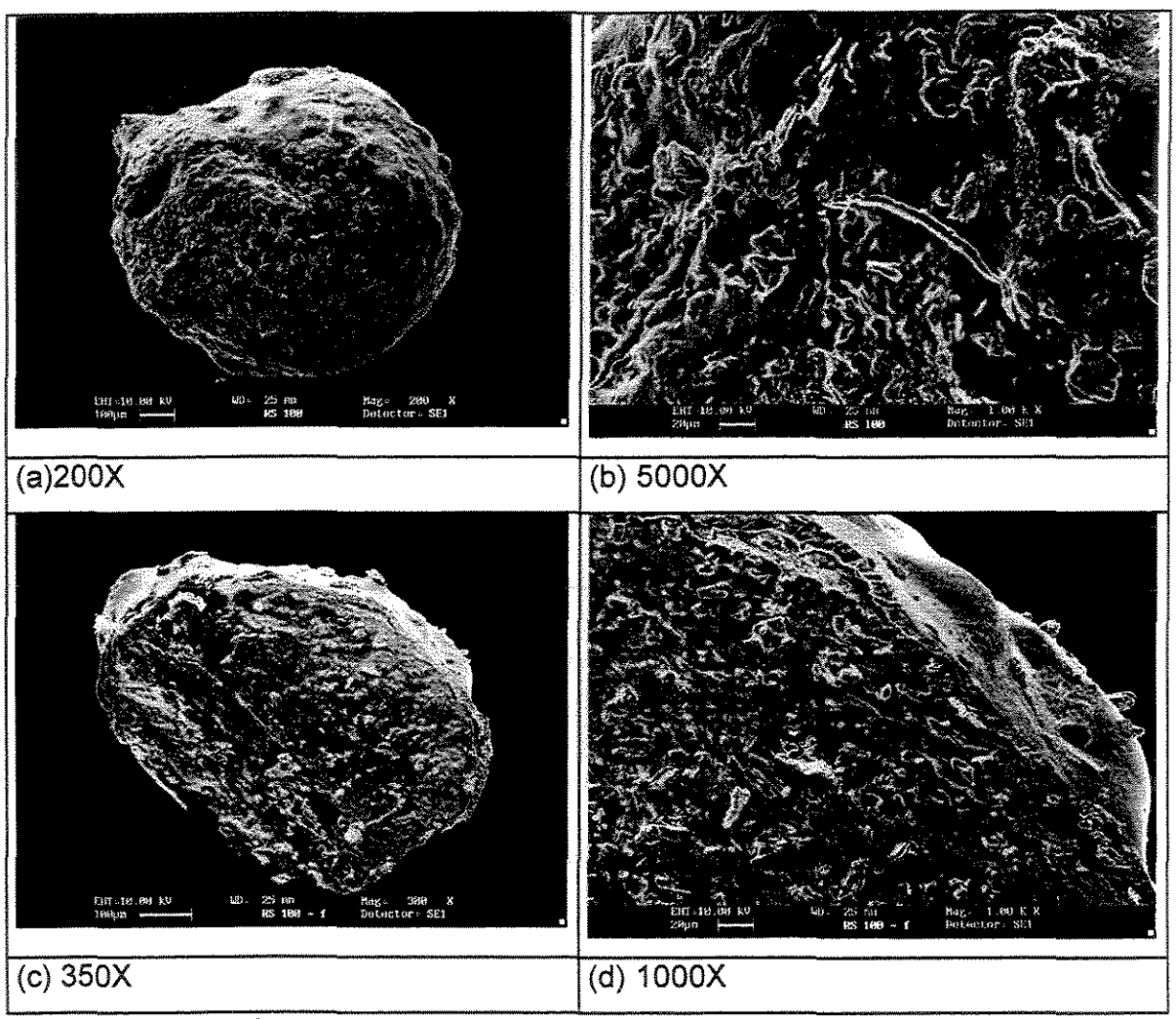



**Figura 4.64** Morfologia das microcápsulas de alg-mv/qui-bv/PEG 10000/GA 0,08%: (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

Nas Figuras 4.65 a 4.67 apresentamos as morfologias das microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com o EUDRAGIT® L 100, o EUDRAGIT® R 100, e o EUDRAGIT® RS – 100, os quais foram utilizados como mais um recurso para se impedir a formação de fissuras nas microcápsulas, prováveis, responsáveis pelo fluxo rápido de OTC para o meio externo.



(a)200X | (b) 5000X

(c) 350X | (d) 1000X

**Figura 4.65** Morfologia de superfície das microcápsulas de alginato de cálcio (mv) revestidas com o EUDRAGIT® RS - 100: (a) microcápsula (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal, (d) parte interna da fratura .

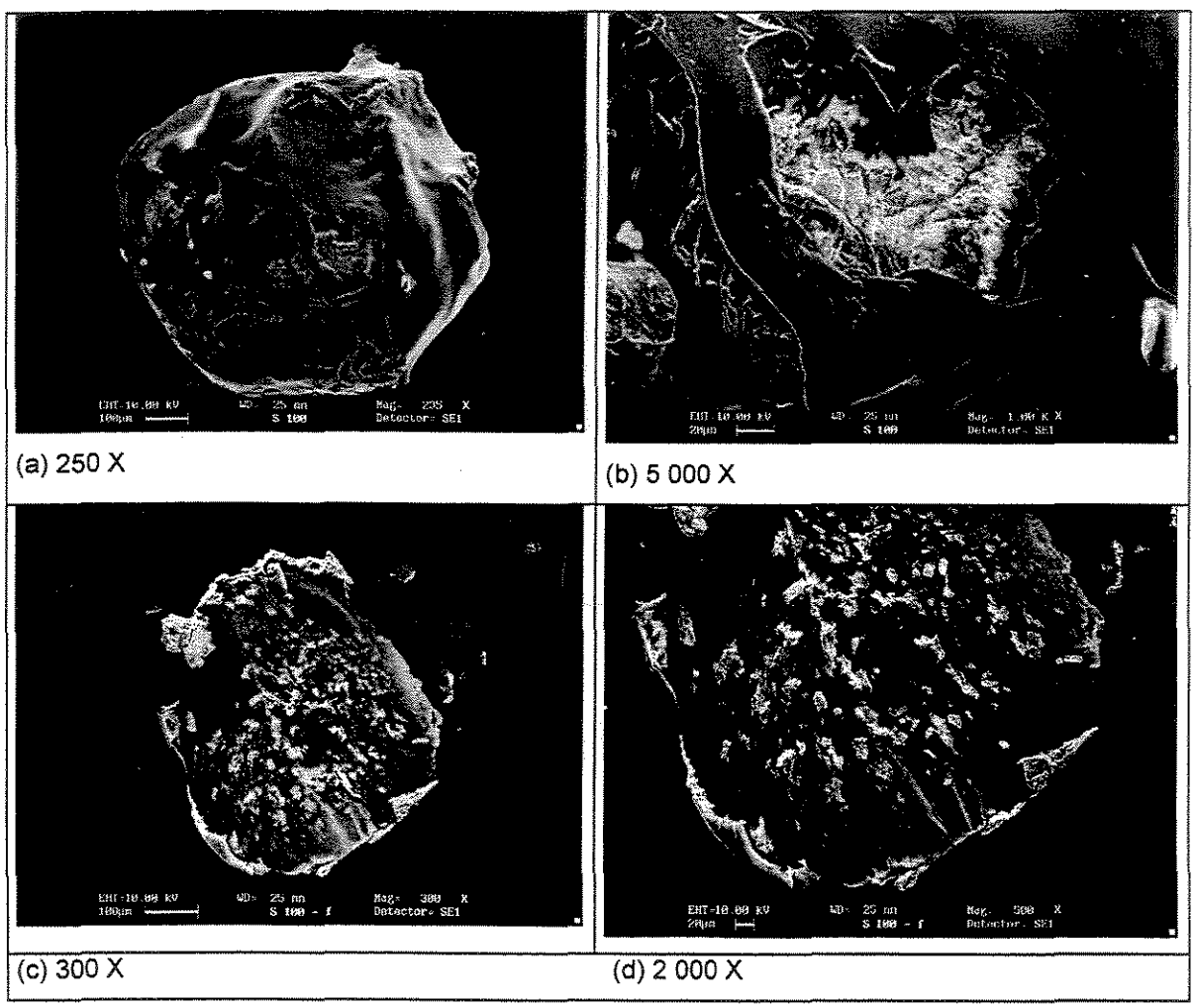



**Figura 4.66** Morfologia das microcápsulas de alginato de cálcio (mv) revestidas com o EUDRAGIT® S - 100: (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

A análise das micrografias revela um revestimento imperfeito em todas as microcápsulas. De certa forma isso era esperado, uma vez que o recobrimento das microcápsulas foi feito manualmente, ao contrário do que fazem as industrias farmacêuticas, os quais aplicam o revestimento com equipamento apropriado (Spray Dryer). Isto justifica a liberação em pH ácido, pois se o revestimento fosse efetivo, não haveria liberação para os EUDRAGIT® S e L neste pH. No entanto, para o EUDRAGIT® RS-100 o mesmo seria independente do pH e com isso, este é impróprio para nosso estudo.

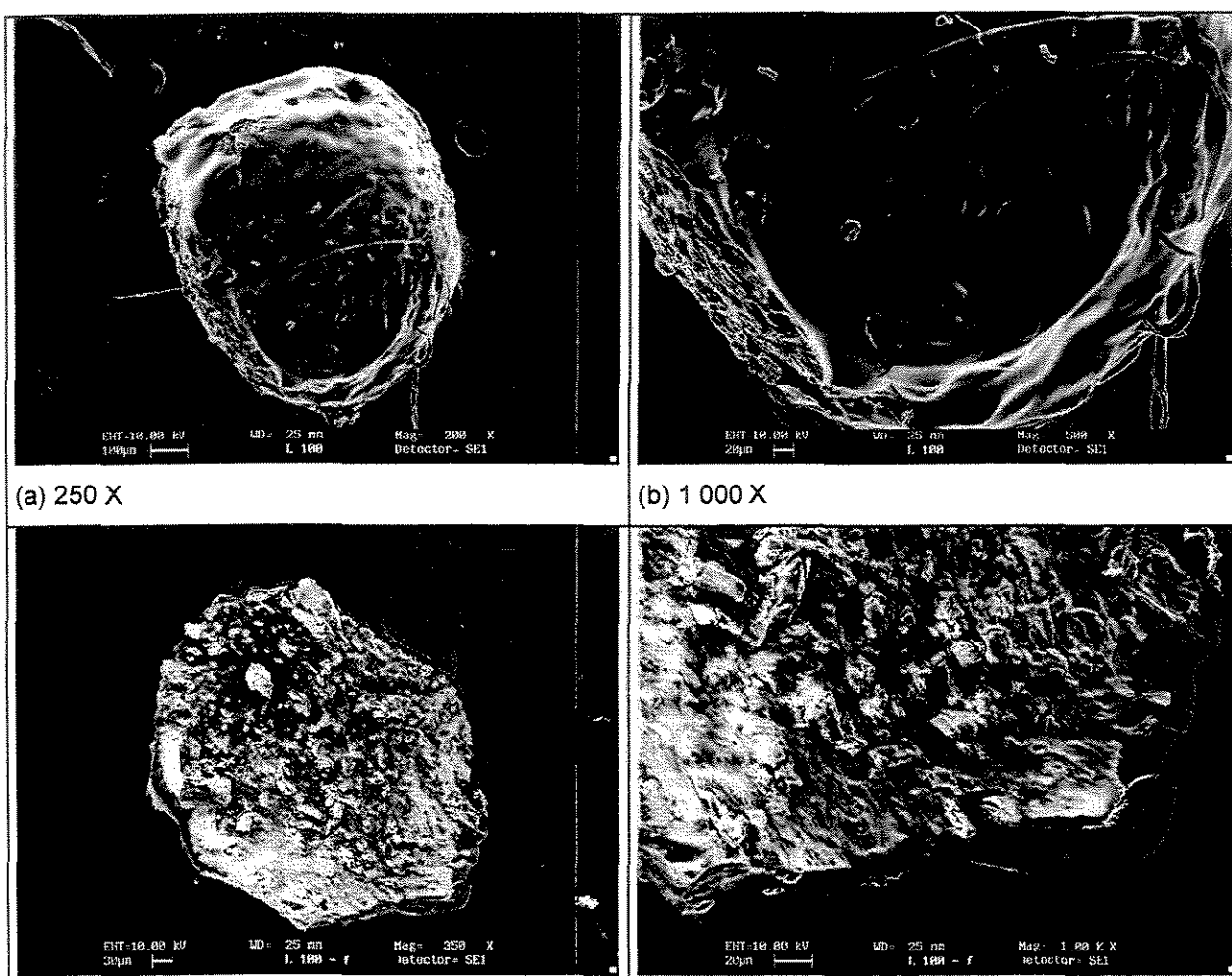



**Figura 4.67** Micrografias das microcápsulas de alginato de cálcio (mv) revestidas com o EUDRAGIT® L - 100: (a) microcápsula e (b) superfície da microcápsula, (c) sessão transversal de uma microcápsula e (d) parte interna da fratura.

# V. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na análise físico-química das estruturas dos biopolímeros, na liberação controlada de OTC nos diversos sistemas em pH 1,2 e 7,4 e na análise morfológica destes sistemas podemos conclui que:

• A Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética de próton ($^1$H-RMN) foi uma técnica eficaz na determinação da razão M/G de alginato de sódio, muito importante para formação de rede tridimensional na presença de $CaCl_2$ e para controlar a liberação. Além disso, o grau de flexibilidade de alginato de sódio, como uma função do conteúdo M e G, é um importante parâmetro no processo de ligações cruzadas usando $Ca^{2+}$(aq.).

• A técnica de GPC foi adequada neste trabalho para determinar a massa molar e índice de polidispersividade de quitosana.

• WAXS foi uma técnica efetiva para determinar o grau de cristalinidade das quitosanas e uma análise qualitativa dos demais materiais.

• A liberação de OTC, encapsulada em diferentes micropartículas, foi controlada somente a pH 7,4, sendo observado que o intumescimento e o transporte de água são fatores controladores da cinética difusional em todos esses sistemas nesse pH. É possível modular a liberação de OTC em função da concentração de quitosana e PEG.

• PEG 0,1% se mostrou efetivo como modulador da liberação de OTC em microesferas de alginato de cálcio e alginato de cálcio coacervada com quitosana, em tampão 7,4.

• Em meio ácido, a camada de quitosana de baixa viscosidade que recobriu as microesferas de alginato de cálcio causou uma significativa redução na liberação de OTC. A pH 1,2 o intumescimento das cadeias de alginato não ocorre, entretanto o efeito de disparo de OTC ocorre devido a alta solubilidade do fármaco neste pH.

• A análise morfológica das micropartículas por MEV revelou a presença de fissuras, provavelmente responsáveis por um alto desvio padrão nos resultados de difusão global a pH 7,4 e pH 1,2.

• O modelo matemático, obtido a partir das leis de difusão de FicK para a OTC, espécie difusiva, do interior das microesferas para a solução, tem uma representatividade muito boa para o pH 7,4; com comportamento típico

Fickiano. No entanto, para pH 1,2, o comportamento Fickiano não se adequa mais.

• Uma inerente dificuldade deste estudo foi devido aos polieletrólitos serem pH sensíveis. Mesmo com o controle de pH no preparo das micropartículas a reprodutibilidade fica prejudicada.

• O revestimento com o EUDRAGIT® L 100 reduziu a liberação em meio ácido quando comparada às microesferas de alginato de cálcio; no entanto, as mesmas sendo observadas por MEV apresentam imperfeições. Isto justifica a redução, mas não a supressão como esperado. Portanto, os resultados evidenciam que o revestimento com o EUDRAGIT® mostra-se promissor, desde que seja aperfeiçoada a técnica de revestimento.

# VI SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudos de secagem podem auxiliar a entender o aparecimento de fissuras. Para tal, é sugerido a utilização da técnica de liofilização das micropartículas, onde a estrutura pode ser preservada quando comparada com a utilizada neste trabalho.

Para uma utilização do método de liberação proposto, tem-se que adaptar as micropartículas para resistirem ao meio estomacal e, assim, alcançarem o intestino intactas e liberarem toda a OTC difundida nas micropartículas de maneira controlada. Existem meios para proteger as micropartículas do meio estomacal, como revestimentos gastro-resistente que se degradam no trato intestinal. Para isso, técnicas de revestimentos mais avançadas como leito fluidizado e spray drying podem ser utilizados, onde, utilizando o EUDRAGIT® L 100 o resultado, provavelmente, seria uma supressão da liberação em pH ácido com uma desintegração do revestimento em pH alcalino, intestinal.

Uso de alginatos com alto conteúdo G para observação do comportamento da formação de fissuras nas microcápsulas.

## VII REFERÊNCIAS


1. HIRATANI, H., ALVAREZ-LORENZO, C. The Nature of Backbone Monomers Determines the Performance of Imprinted Soft Contact lenses as Timolol Drug Delivery Systems. *Biomaterials*, vol 25, p. 1105-113, 2004.

2. COOMBES, A. G. A., RIZZI, S. C., WILLIAMSON, M., BARRALET, J. E., DOWNES, S. AND WALLACE, W. A., Precipitation Casting of Polycaprolactone for Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery *Biomaterials*, vol 25, p. 315-325, 2004.

3. LANGER, R., PEPPAS, N. A. Advances in Biomaterials, Drug Delivery and Bionanotechnology, *Bioengineering, Food and Natural Products*, vol. 49, nº 12, p. 2990-3006, December 2003.

4. RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHAEN, F. J., LEMONS, J. E., Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press, USA, 1996.

5. LYMAN, D. J., Polymer in Medicine – An Overview in Polymers in Medicine, Biomedical and Pharmacological Applications, Ed. E. Chiellini and P. Giusti, Plenum Press, New York, 1983.

6. HOFFMAN, A. S. Synthetic Polymeric Biomaterials, in Polymeric Materials and Artificial Organs. C. G. Gebelein (ed.), ACS Symposium Series, vol 256, Am. Chem. Soc., Washington, D. C., p. 13-29 (1984).

7. ORIVE, G., HERNÁNDEZ, R. M., GASCÓN A. R., DOMÍNGUEZZ-GIL, A., PEDRAZ, J. L., Drug Delivery in Biotechnology: Present and Future, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 14, p. 659-664, december 2003.

8. LANGER, R., PEPPAS, N. A. Present and Future Applications of Biomaterials in Controlled Drug Delivery Systems, *Biomaterials*, vol. 2, p. 201-214, October 1981.

9. MARK, H. F. Encyclopedia of Polymer Science and Engeneering, Ed. John Wiley & Sons, New York, Controlled Release Technology,"164-186 (1988).

10. BUCKLES, R.G., Biomaterials for Drug Delivery Systems, Journal of Biomedical Materials Research, vol. 17, p. 109-128, 1983.

11 www.quimica.matrix.com.br/artigos/drug_delivery.html

12. PARK, H., PARK, K. Polymers in Pharmaceutical Products in Polymers of Biological and Biomedical Significance, p. 3-15, Washington, 1992.

13. HOFFMAN, A. S., Hydrogels for Biomedical Applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 43, p. 3-12, july 2002.

14. PEPPAS, N. A. Hydrogels in Medicine and Pharmacy, CRC Press, Boca Raton, 1987.

15. KORSMEYER, R. W., JUSTIG, S. R. and PEPPAS, N. A. Solute and Penetrant Diffusion in Swellable Polymer I. Mathematical Modeling, *Journal Polymer Science*, vol 24, p. 395-407, 1986.

16. ANDREOPOLUS, A. G. Preparation and Swelling of Polymeric Hydrogels, *Journal Applied Polymer Science*, vol 37, p. 2121-2131 , 1989.

17 HARTING, G. W., DUCHEYNE, P., Macromolecular Biomaterials, CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1984.

18 RATNER B. D., CARTNER, D. G., Surface Modification of Polymeric Biomaterials, Plenum Press, New York, 1997.

19 Biocompatibility in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Francoise Candau, John Wiley, New York, vol 2, 216-267, 1987.

20 SHALABY, W., IKADA, Y., LANGER, WILLIAMS R., J. Interfacial Biocompatibility in Polymers of Biological and Biomedical Significance, American Chemical Society, Woshington D. C., 1992.

21 GRAHAM, S. Requirements for Biodegradable Water-soluble Polymers, *Polymer Degradation and Stability*, vol 59, p. 19-24, 1998.

22 GÖPFERICH, A. Mechanisms of Polymer Degradation and Erosion, *Biomaterials*, vol 17, p. 103-114, 1996.

23 POWELL,. G. M Handbook of Water-soluble Guns and Resins – Alginates, Cap. 2, Mc-Graw Hill Book Co., Nova York, 1980.

24 DRAGET, K. I., SKJAK- BRÆK, G. and SMIDSRØD, O. Alginate Based New Materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol 21, p. 47-55,1997.

25 PAUL, W., SHARMA, C. P.Chitosan, a Drug Carrier for the 21st Century: a Review, *S.T.P. Pharma Sciences*, vol 10, p. 5-22, 2000.

26 THIES, C. Chapter 8: Gelation. How to Make Microcapsules Combined Lecture and Laboratory Manual. In: Thies Technology. Saint Louis Missouri. p.1-51,1994.

27 MARTINSEN, A., SKJAK- BRÆK, G., SMIDSRØD, O., Alginate as Immobilization Materials: I. Correlation Between Chemical and Physical Properties of Alginates Gel Beads, *Biotechnology and Bioengineering*; vol 33, p. 79-89, 1989.

28 ERTESVAG, H., VALLA S., Biosynthesis and Applications of Alginates, *Polymer Degradation and Stability*, vol 59, p. 85-91, 1998.

29 LLANES, F., RYAN, D. H., MARCHESSAUT, R. H., Magnetic Nanostrutured Composites Using Alginates of Different M/G Ratios as Polymeric Matrix, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 27, p. 35-40, 2000.

30 MARTINSEN, A. A., SKJAK- BRÆK, G., SMIDSRØD, O., Comparision of Different Methods for Determination of Molecular Weight and Molecular Weight Distribution of Alginates, *Carbohydrate Polymer*, vol 15, p.171-193, 1997.

31 SIGNINI, R., CAMPANA FILHO, S. P., Purificação e Caracterização de Quitosana Comercial, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, out/dez, p. 63-68, 1998.

32 "Estudos de Obtenção de Carboximetilquitosanas e Derivados Entrecruzados e de sua Interação com íons Metálicos", dissertação de mestrado, USP, São Carlos, Fernanda Raimundo de Abreu, Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho, 2002.

33 RINAUDO, M., PAVLOV, G. , DESBRIÈRES, J. Influence of Acetic Acid Concentration on the Solubilization of Chitosan, *Polymer*, vol 40, p. 7029-7032, 1999.

34. KIM, C. Y, CHO, H., CHO,H. T. Effect of Deacetilation on Sorption of Dyes and Chromiun on Chitin, *Journal Applied Polymer Science.*, vol 63, p.725-736, 1997.

35 ANTHOSEN, M. W., VARUM, K. J. M., SMIDSRØD, O., "Solution Properties of Chitosans: Conformation and Chain Stiffness of Chitosans with Different Degrees of N-acetylation", *Carbohydrate Polymer*, vol 22, p.193-201, 1993.

36 MUZZARELLI, R., BALDASSARRE, V., CONTI, F., FERRARA, P., BRAGINI, G., Biological Activity of Chitosan: Ultrastructural Study, *Biomaterials*, vol 9, p. 247-252, 1988.

37 MI, F., SUNG, H., SHYU, S., SU, C. and PENG, C., Synthesis and Characterization of Biodegradable TPP/Genipin Co-crosslinked Chitosan Gel Beads, Polymer, vol 44, p. 6521-65330, 2003.

38 CHANDY, T., SHARMA, C. P., Chitosan Beads and Granules for Oral Sustained Delivery of Nefedipine: In Vitro Studies, *Biomaterials,* vol 13, p. 949-952, 1992.

39 ROBERTS, G. A. F., Chitin Chemistry, The Macmillan Press LDT, 1992.

40 POWELL, G. M., Handbook of Water- Soluble Guns and Resins – Polyethylene Glycol, cap. 18, Mc-Graw Hill Book Co., New York, 1980.

41 DEIBLE, C. R., PETROSKO, P., JOHNSON, P. C., BECKMAN, E. J., RUSSEL, A. J., W. R. Wagner, Molecular Barriers to Biomaterial Thrombosis by Modification of Surface Proteins with Polyethylene Glycol, *Biomaterials*, vol 19, p. 1885-1893, 1998.

42 TZIAMPAZIS, E., KOHN, J., MOGHE, P. V.PEG – Variant Biomaterials as Selectively Adhesive Protein Templates: Model Surfaces for Controlled Cell Adhesion and Migration, *Biomaterials*, vol 21, p. 511-520, 2000.

43 HARRIS, J. M., STRUCK, E. C., CASE, M. G., PALEY, M. S., Synthesis and Characterization of Poly(ethylene Glycol) Derivatives, *Journal Polymer Science; Polymer Chemistry.*, vol 22, p. 341-352, 1984.

44 ZALIPSKY, S., GILON, C., ZILKHA, A., Attachment of Drugs to Polyethylene Glycols, *European Polymer Journal.*, vol. 19, p. 1177-1183, 1983.

45 EUDRAGIT – Acrylic Polymers for Controlled Release, Degussa Röhm Pharma Polymers.

46 FERREIRA, A. O. Guia Pratico da Farmácia Magistral, 2° Edição, Juiz de Fora, 2000.

47 Encyclopedia Britannica, Tetracycline, in WWW. Britannica.com

48 KIRK-OTHMER, Encyclopedia of Chemical Technology, vol 3, John Wiley and Sons, p. 65-79,1978.

49 BLACKWOOD, R. K., ENGLISH, A. R. Structure-Activity Relationships in the Tetracycline series, *Advanced Applied Microbiology.*, vol. 13, p. 237-266, 1970.

50 WILLIAMS, D. F; Biocompatibility of Clinical Implant Materials, vol 2, Cap. 7, p. 145-175, CRC Press, Boca Raton, 1981.

51 GRAHAM, N. B., Wood, D. A., Polymeric Inserts and Implants for the Controlled Release of Drugs in Macromolecular Biomaterials, CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1984.

52 TAKKA, S. , ACARTÜRK, F. Calcium Alginate Microparticles for Oral Administration: I: Effect of Sodium Alginate Type on Drug Release and Drug Entrapment Efficiency *Journal Microencapsulation*, vol 16, p. 275-290, 1999.

53 ACARTÜRK, F., TAKKA, S. Calcium Alginate Microparticles for Oral Administration: II: Effect of Formulation Factors on Drug Release and Drug Entrapment Efficiency, *Journal Microencapsulation*, Vol 16, p. 291-301, 1999.

54 THU, B., BRUHEIM, P.; ESPEVK; T., SMIDSRØD, O.; SOON-SHIANG, P.; SKJÅK-BRÆK, G., "Alginate Polycations Microcapsules II. Some Functional Properties", *Biomaterials*, vol 17, p. 1069-1079, 1996.

55 BODMEIER, R., OH., K., PRAMAR; Y. Preparation and Evaluation of Drug-containing Chitosan Beads. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol 15, p. 1475-1494, 1989.

56 CHANDY, T., SHARMA, C. P. Chitosan Matrix for Oral Sustained Delivery of Ampicillin, *Biomaterials*, vol. 14, p. 939-944, 1993.

57 HE, P., DAVIS, S.S.ILLUM, L., Chitosan Microspheres Prepared by Spray Drying, International Journal of Pharmaceutics, vol 187, p. 53-65, 1999.

58 SHU, X. Z., ZHU, K. J., A novel Approach to Prepare Tripolyphosphate / chitosan Complex beads for controlled release drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, vol 201, p.51-58, 2000.

59 ARAL, C. AKBUĞA, J. Alternative Approach to the Preparation of Chitosan Beads, *International Journal of Pharmaceutics*, vol 168, p. 9-15, 1998.

60 MI, F. WONG, T. SHYU, S., CHANG S. Chitosan Microspheres: Modification of Polymeric Chem-Physical Properties of Spray-Dried Microspheres to Control the Release of Antibiotic Drug, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 71, p. 747-759, 1999.

61 KIMURA, I. Y., GONÇALVES JR.,A. C., STOLBERG, J., LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T., Efeito do pH e do Tempo de Cantato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesfera de Quitosana, Polímeros: Ciência e Tecnologia, jul/set, 1999.

62 DALY, M., KNORR, D. Mechanics and Diffusional Changes Observed in Multi-layer Chitosan/Alginate Coacervate Capsules. *Biotechnology Progress*, vol 4, p. 76-81, 1988

63 HUGUET, M. L., DELLACHERIE, E. Calcium Alginate Beads Coated with Chitosan: Effect of the Structure of Encapsulated Materials on Their Release. *Process Biochemistry*, vol. 31, p. 745-751, 1996.

64 HUGUET, M.; NEUFELD, L R. J., DELLACHERIE, E., Calcium-Alginate Beads Coated with Polycationic Polymers: Comparision of Chitosan and DEAE-Dextran. *Process Biochemistry*, vol. 31, p. 347-353, 1996.

65 POLK, A., AMSDEN, B., DE YAO, K.; PENG, T., GOOSEN., M. F. Controlled Release of Albumin from Chitosan-Alginate Microcapsules. A, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 83, p. 178-185, 1994.

66 MI, F., SUNG, H., SHYU, S. Drug Release from Chitosan-Alginate Complex Beads Reinforced by a Naturally Ocurring Cross-linking Agent *Carbohydrate Polymers*, vol 48, p. 61-72. 2002.

67 VANDENBERG, G. W., DE LA NOÜE, J Evaluation of Protein Release from Chitosan-Alginate Microcapsules Produced Using External or Internal Gelation. *Journal Microencapsulation*, vol. 18, p. 433-441, 2001.

68 GÅSERØD, O., SMIDSRØD, O, SKJÅK-BRÆK, G. Microcápsules of Alginate-Chitosan – I A Quantitative Study of the Interaction Between Alginate and Chitosan. *Biomaterials*, vol. 19, p. 1815-1825, 1998.

69 SEZER, A. D., AKBUĞA, J. Release Characteristics of Chitosan Treated Alginate beads: I. Sustained Release of a Macromolecular Drug from Chitosan Treated Alginate beads. *Journal Microencapsulation*, vol. 16, p. 195-203, 1999.

70 GÅSERØD, O., SANNES, A., SKJÅK-BRÆK, G. Microcapsules of Alginate-Chitosan. II. A Study of Capsule Stability and Permeability. *Biomaterials*, vol. 20, p. 773-783, 1999.

71 SEZER, A. D., AKBUGA, J. Release Characteristics of Chitosan Treated Alginate Beads: II. Sustained of a Low Molecular drug from Chitosan treated Alginate Beads. *Journal Microencapsulation*, vol. 16, p. 687-696, 1999.

72 VANDENBERG, G. W., DROLET, C., SCOTT, S. L., DE LA NOÜE, J. Factors Affecting Protein Release from Alginate-Chitosan Coacervate Microcapsules During Production ans gastric/intestinal simulation *Journal of Controlled Release*, vol. 77, p. 297-307, 2001.

73 GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, M. L., HOLGADO, M. A., SÁNCHEZ-LAFUENTE, C., RABASCO, A. M., FINI, A. Alginate/Chitosan Particulate Systems for Sodium Diclofenac Release. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 232, p. 225-234, 2002.

74 LEE, O., HA, B., PARK, S., LEE, Y., Studies on the pH-Dependent Swelling Properties and Morphologies of Chitosan/Calcium-alginate complexed beads. *Macromolecule Chemistry Physics*, vol 198, p. 2971-2976, 1997.

75 WHEATLEY, M. A., CHANG, M., PARK, E., LANGER, R. Coated Alginate Microspheres: Factors Influencing the Controlled Delivery of Macromolecules. *Journal Applied Polymer Science*, vol. 43, p. 2123-2135, 1991.

76 LEE, K. Y., PARK, W. H., HA, W. S. Polyelectrolyte Complexes of Sodium Alginate with Chitosan or Its Derivatives for Microcapsules. *Journal Applied Polymer Science*, vol. 63, p. 425-432, 1997.

77 HARI, P. R., CHANDY, T., SHARMA, C. P. Chitosan/Calcium-Alginate Beads for Oral Delivery of Insulin. *Journal Applied Polymer Science*, vol 59, p. 1795-1801, 1996.

78 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. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, vol 175, p. 237-246, 1998.

79 DE, S., ROBINSON, D. Polymer Relationships During Preparation of Chitosan-Alginate and Poly-1-lysine-Alginate nanospheres, *Journal of Controlled Release*, vol. 89, p. 101-112, 2003.

80 DALY, M. M., KNORR, D. Chitosan-Alginate Complex Coacervate Capsules: Effects of Calcium Chloride, Plasticizers, and Polyelectrolytes on Mechanical Stability, Biotechnology Progress, vol. 4, p. 76-81, 1988.

81 CHANDY, T., MOORADIAN, D. L., RAO, G. H. R., Chitosan/Polyethylene Glycol – Alginate Microcapsules for Oral Delivery of Hirudin, *Journal Applied Polymer Science.*, vol. 70, p. 2143-2153, 1998.

82 . CHANDY, T., MOORADIAN, D. L.,. RAO, G. H. R, Evaluation of Modified Alginate-Chitosan-Polyethylene Glycol Microcapsules for Cell Encapsulation, *Artificial Organs*, vol. 23, p. 894-903, 1999.

83 . OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V., BUENO, J. H. F., EVANGELISTA, R. C., Micro e Nanocápsulas: Um Eficiente Sistema, com Dimensões Reduzidas, para Liberação Controlada e Direcionamento de Fármacos Encapsulados, *Revista Ciência Farmacia*, vol 14. p. 37-49, 1992.

84. Microencapsulation in "*Encyclopedia of Polymer Science and Engeneering*", Françoise Candau, John Wiley, New York, vol. 9, vol. 725-745, 1987.

85 THIES, C. Chapter 8: Gelation. How to Make Microcapsules Combined Lecture and Laboratory Manual. In: Thies Technology. Saint Louis Missouri. p.1-51, 1994.

86 GRANT, G. T., MORRIS, E. R., REES, D. A., SMITH; P. J. C., THOM, D., Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: the Egg-box Model. *FEBs Letters*, vol 3, p.:195-198, 1973.

87 REES, D. A., Structure, conformation and Mechanism in the formation of Polysaccharide Gels and Networks. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, v. 24, p. 267-282, eds. Wolfrom M. L. e Tipson R. S., New York: Academic Press, 1969.

88 KUMAR, M. N. V. R., A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Funcional Polymers*, vol 46, p.1-27, 2000.

89 MASARO, L., ZHU, X. X., Physical Models of Diffusion for Polymer Solutions, Gels and Solids, *Progress in Polymer Science*, vol 24, p.731-775, 1999.

90 CRANK, J., *Mathematics in Diffusion*, Clarendon, Oxford, p.85 ,1957.

91 TANAKA, H., MATSUMURA, M., VELIKY A., Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads, *Biotechnology and Bioengineering*, vol 26, p. 53-58, 1984.

92 BARROSO, L. C., "*Cálculo Numérico (com aplicações)*", Editora Harbra, 2ª edição, São Paulo, 1987.

93 W. H. PRESS, "*Numerical Recipes in FORTRAN*", Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

94 SIGNINI, R., CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e Caracterização de Quitosana Comercial, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Out/Dez, p.63 – 98, 1998.

95 GRIGOLON, L. B., AZEVEDO, A., SANTOS, R. R., FRANCO, T. T. Modification of Chitosan with Free and Immobilizad Papais, *Chitin Enzymology*, p. 415-422, 2001.

96 SARTORI, C., FINCH, D. S., RALPH, B., GILDING K., Determination of the Cation Content of Alginate Thin Films by FT-IR. Spectroscopy, *Polymer.*, vol 38, p.43-50, 1997.

97 SABNIS, S., BLOCK, L. H., Improved Infrared Spectroscopic Method for the Analysis of Degree of N-deacetylation of Chitosan, *Polymer Bulletin* vol 39, p. 67-71, 1997.

98 GRASDALEN, H., LARSEN, B., SMIDSRØD, O. A P.M.R. of the Composition and Sequence of Uronate Residues in Alginate", *Carbohydrate Research*, vol. 69, p.23-31, 1979.

99 MIYAZAWA, T., FUKUSHIMA, K., IDEGUCHI, Y., "Molecular Vibrations and Structure of High Polymers. III. Polarized Infrared Spectra, Normal Vibrations and Helical Conformation of Polyethylene Glycol, *The Journal of Chemical Physics*, 37, p. 2764-2776, 1962.

100 TONELLI, A. E., "NMR Spectroscopy and Polymer Microstructure: the Conformational Connection", VCH Publishers, New York, 1989

103 GRASDALEN, H. "High-field, $^{1}$H-N.M.R. Spectroscopy of Alginate: Sequential Structure and Linkage Conformations", *Carbohydrate Research*, 118, p. 255-260, 1983.

104 FREEMAN, W. J., "Characterization of Polymers" , in: H. F. Mark, J. I. Kroschwitz (Ed.), "Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", ed., Vol. 3, p.290-327, John Wiley & Sons,New York, 1985.

105. ROE, R. J. "X-Ray Diffraction", in: J. I. Kroschwitz (Ed.), "Encyclopedia of Polymer Science and Engineering", Vol. 17, p.943-990, John Wiley & Sons,New York, 1989.

106 SIGNINI, R.,. Filho, S. P. C, "Características e Propriedades de Quitosanas Purificadas nas Formas Neutra, Acetato e Cloridrato", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11, p.58-64, 2001.

107 ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN JR., L. V., "Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberaçâo de Fármacos", 6º Edição, Editorial Premier, 2000.

108 KOIDA Y., TAKAHATA, H., KOBAYASHI, M. e SAMEJIMA, M., "Studies on Dissolution Mechanism of Drugs from Ethylcellulose Microcapsules", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35, p.1558-1545, 1987.

109 FLYNN, G. L., YALKOWSKY, S. H., ROSEMAN, T. Y., "Mass-transport Phenomena and Models-theorical Concepts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, p. 479-510, 1974.

110 DEASY, P. B., *Microencapsulation and Related Drug Processes*. Marcel Dekker. Inc. New York and Basel, p. 289-319, 1984.

111 BARRIE, J. A, *Diffusion in Polymers*. New York:: ED. By J. Crank and G. S. Park. Academic Press, p. 280-283, 1968

112 MATULOVIC, U., RASCH, D., WAGNER, F., "New Equipment For the Scaled Up Production for Small Spherical Biocatalists", *Biotechnology Letters*, 8, p. 485-489, 1986.

113 SKJAK- BRÆK , G., GRASDALEN, H., SMIDSRØD, O., "Inhomogeneus Polysaccharide Ionic Gels", *Carbohydrate Polymers*, 10, p. 31-40, 1981.

114 TOMIDA, H., NAKAMURA, C., YOSHITOMI, H., KIRYU, S., "Preparation of Theophylline – Loaded Calcium Alginate Capsules and Evaluation of their Drug Release Characteristics", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41, p. 2161-2165, 1993.

115 MARTINSEN, A., STORRØD, I., SKJAK- BRÆK, G., "Alginate as Imobilization Material. III: Diffusion Properties", *Biotechnology and Bioengineering*, 39, p.186-194, 1992.

116 OSTBERG T., GRAFFUR, C., "Calcium Alginate for Oral Multiple Unit Administration. III: Influence of Calcium Concentration, Amount of Drug Added and Alginate Characteristics Drug Release", *International Journal of Pharmaceutics*, 111, p. 271-282, 1994.

117 BRAZEL, C. S., PEPPAS, N. A., Mechanisms of Solute and Drug Transport in Relaxing, Swellable Hydrophilic Glassy Polymers, *Polymer*, Vol.40, p. 3383-3398, 1999.