

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Programa de Pós-Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
MICROESFERAS DE GLÚTEN DE TRIGO PARA  
UTILIZAÇÃO EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA.**

LARISSA ANDREANI

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Florianópolis

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROESFERAS  
DE GLÚTEN DE TRIGO PARA UTILIZAÇÃO EM SISTEMAS DE  
LIBERAÇÃO CONTROLADA.**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Química como  
requisito à obtenção do grau de Mestre  
em Química.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

LARISSA ANDREANI

FLORIANÓPOLIS

2008

**Larissa Andreani**

**“DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
MICROESFERAS DE GLÚTEN DE TRIGO PARA  
UTILIZAÇÃO EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO  
CONTROLADA”**

Essa dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2008.

---

Prof. Dr. Ademir Neves  
Coordenador do Programa  
QMC - UFSC

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Valdir Soldi  
Orientador  
QMC - UFSC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Marta de S. Sierra  
QMC - UFSC

---

Prof. Dr. José Roberto Bertolino  
QMC – UFSC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Machado de Campos  
Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFSC

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi pela confiança, atenção, apoio e principalmente paciência durante estes 5 anos de orientação.

À mestre Marly S. Soldi, pelas dicas, conversas e ajuda importantíssima nas análises.

À Dra. Betina G. Z. Ramos, por toda a ajuda e dedicação, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

À todos os colegas e amigos do POLIMAT pela companhia e apoio na realização deste trabalho, e por todas as horas do cafezinho, que sempre me ajudaram a relaxar um pouco. Em especial, agradeço ao Rodrigo, que sempre escutou as minhas dúvidas e tentou me ajudar da melhor maneira possível.

Às minhas amigas Maria Alice, Paula e Suellen, pelo companheirismo, amizade, bons momentos compartilhados e principalmente pela força nos momentos difíceis, e aos demais amigos que estiveram ao meu lado e me deram apoio em mais esta etapa.

Aos meus pais, Zeli e Odair, e ao meu irmão Denis, por se fazerem presentes na minha vida a todo momento e pelo apoio incondicional.

Ao meu namorado Daniel que, mesmo distante fisicamente em alguns momentos, sempre conseguiu se fazer presente e me deu todo o apoio possível e impossível na realização desse trabalho, além de conseguir me entender como mais ninguém consegue.

À todas estas pessoas e às demais que, por ventura, tenha me esquecido, meus mais sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
1.1 Introdução.....	2
1.2 Objetivo Geral .....	4
1.3 Objetivos Específicos .....	4
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 Polímeros e Proteínas .....	7
2.2 Glúten de Trigo.....	10
2.3 Sistemas de Liberação Controlada (SLC) .....	14
2.4 Microencapsulação de Agentes Ativos.....	16
2.5 Análise do Mecanismo de Liberação.....	19
2.6 Substâncias Modelo Utilizadas.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Materiais .....	25
3.1.1 Poli(etileno glicol) (PEG).....	25
3.1.2 Tween 80 .....	26
3.1.3 Span 80 .....	26
3.1.4 Rodamina B .....	27
3.1.5 Cloridrato de Diltiazem .....	27
3.2 Metodologia.....	28

3.2.1	Preparação das microesferas.....	28
3.2.2	Morfologia das Microesferas.....	30
3.2.3	Diâmetro Médio das Microesferas .....	30
3.2.4	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	31
3.2.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	31
3.2.6	Eficiência de Encapsulação (EE).....	32
3.2.7	Velocidade de Liberação <i>in vitro</i> de Agentes Ativos.....	32
3.2.8	Degradação <i>in vitro</i> das Microesferas .....	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.1	Morfologia das Microesferas.....	36
4.2	Diâmetro Médio das Microesferas .....	41
4.3	Espectroscopia no Infravermelho .....	45
4.4	Calorimetria Exploratória Diferencial.....	49
4.5	Eficiência de Encapsulação .....	53
4.6	Velocidade de Liberação <i>in vitro</i> de Agentes Ativos.....	55
4.6.1	Liberação <i>in vitro</i> de rodamina.....	55
4.6.2	Liberação <i>in vitro</i> de cloridrato de diltiazem .....	59
4.7	Degradação das Microesferas.....	62
5.	CONCLUSÕES .....	68
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo da cristalinidade dos polímeros.....	07
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.....	10
<b>Figura 3.</b> Modelo estrutural sugerido para o glúten de trigo.....	13
<b>Figura 4.</b> Comparação entre concentração plasmática de um fármaco em um modelo convencional (linha vermelha) e em um SLC (linha azul).....	15
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do polietileno glicol.....	25
<b>Figura 6.</b> Estrutura química do Tween 80, onde $x + y + w + z = 20$ .....	26
<b>Figura 7.</b> Estrutura química do Span 80.....	26
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da rodamina B.....	27
<b>Figura 9.</b> Estrutura química do cloridrato de diltiazem.....	28
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática das etapas utilizadas na preparação das microesferas de glúten de trigo.....	29
<b>Figura 11.</b> Micrografias obtidas por MEV das microesferas de glúten de trigo: (A) superfície, com aumento de 4000x e (B) fratura, com aumento de 2000x.....	35
<b>Figura 12.</b> Micrografias obtidas por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05: (A) superfície, com aumento de 4000x e (B) fratura, com aumento de 3000x.....	36
<b>Figura 13.</b> Micrografias obtidas por MEV das microesferas de Glúten/PEG 90/10: (A) superfície, com aumento de 2000x e (B) fratura, com aumento de 3000x.....	36
<b>Figura 14.</b> Micrografia obtida por MEV da substância modelo rodamina B, com aumento de 200x.....	37
<b>Figura 15.</b> Micrografias obtidas por MEV das microesferas de glúten de trigo com adição de 1,5% de rodamina: (A) superfície, com aumento de 1600x e (B) fratura, com aumento de 4000x.....	37
<b>Figura 16.</b> Micrografias obtidas por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com adição de 1,5% de rodamina: (A) superfície, com aumento de 2000x e (B) fratura, com aumento de 2000x.....	38

<b>Figura 17.</b> Micrografia obtida por MEV do fármaco modelo cloridrato de diltiazem, com aumento de 200x.....	39
<b>Figura 18.</b> Micrografias obtidas por MEV das microesferas de glúten com adição de 5% de diltiazem: (A) superfície, com aumento de 2000x e (B) fratura, com aumento de 2000x.....	40
<b>Figura 19.</b> Micrografias obtidas por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com adição de 5% de diltiazem: (A) superfície, com aumento de 2000x e (B) fratura, com aumento de 2000x.....	40
<b>Figura 20.</b> Micrografia obtida por MEV das microesferas de glúten de trigo puras com aumento de 500x.....	42
<b>Figura 21.</b> Micrografia obtida por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com aumento de 500x.....	42
<b>Figura 22.</b> Micrografia obtida por MEV das microesferas de Glúten/PEG 90/10 com aumento de 500x.....	43
<b>Figura 23.</b> Micrografia obtida por MEV das microesferas de glúten de trigo com 1,5% de rodamina com aumento de 500x.....	43
<b>Figura 24.</b> Micrografia obtida por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina com aumento de 500x.....	43
<b>Figura 25.</b> Micrografia obtida por MEV das microesferas de glúten de trigo com 5% de diltiazem com aumento de 500x.....	44
<b>Figura 26.</b> Micrografia obtida por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 5% de diltiazem com aumento de 500x.....	44
<b>Figura 27.</b> Espectros de infravermelho de: (A) glúten em pó, anterior a preparação das microesferas e (B) microesferas de glúten de trigo.....	45
<b>Figura 28.</b> Espectros de infravermelho de: (A) microesferas de glúten de trigo, (B) Glúten/PEG 95/05, (C) microesferas com 1,5% de rodamina, (D) microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina, (E) rodamina pura.....	47
<b>Figura 29.</b> Espectros de infravermelho de: (A) microesferas de glúten de trigo, (B) Glúten/PEG 95/05, (C) microesferas com 5% de diltiazem, (D) microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 5% de diltiazem, (E) diltiazem puro.....	48

<b>Figura 30.</b> Curvas de DSC obtidas para: (A) glúten de trigo em pó, anterior a formação de microesferas, e (B) microesferas de glúten de trigo.....	49
<b>Figura 31.</b> Curvas de DSC obtidas para: (A) microesferas de glúten de trigo, (B) microesferas Glúten/PEG 95/05, (C) microesferas de glúten de trigo com 1,5% de rodamina, (D) microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina e (E) rodamina pura.....	50
<b>Figura 32.</b> Curvas de DSC obtidas para: (A) microesferas de glúten de trigo, (B) microesferas Glúten/PEG 95/05, (C) microesferas de glúten de trigo com 5% de diltiazem, (D) microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 5% de diltiazem e (E) diltiazem puro.....	51
<b>Figura 33.</b> Curva de calibração de rodamina em NaOH 0,1M ( $R^2=0,9994$ ).....	53
<b>Figura 34.</b> Curva de calibração de cloridrato de diltiazem em NaOH 0,1M ( $R^2=0,9983$ ).....	54
<b>Figura 35.</b> Perfil de liberação <i>in vitro</i> de rodamina a partir de microesferas de glúten de trigo a 25°C (■) e 37°C (□) durante (A) 12 dias e (B) 12 horas.....	55
<b>Figura 36.</b> Perfil de liberação <i>in vitro</i> de rodamina a partir de microesferas de Glúten/PEG 95/05 a: (■) 25°C e (□) 37°C, durante (A) 9 dias e (B) 12 horas.....	57
<b>Figura 37.</b> Perfil de liberação <i>in vitro</i> de cloridrato de diltiazem a partir de microesferas de Glúten/PEG 95/05 (■) e microesferas de glúten de trigo (□) a 37°C em pH 1,2.....	59
<b>Figura 38.</b> Perfil de liberação <i>in vitro</i> de cloridrato de diltiazem a partir de microesferas de Glúten/PEG 95/05 (■) e microesferas de glúten de trigo (□) a 37°C em pH 7,4 durante 10 dias (A) e durante 12 horas (B).....	60
<b>Figura 39.</b> Representação dos processos de erosão heterogêneo e homogêneo na matriz polimérica.....	62
<b>Figura 40.</b> Micrografias das microesferas de glúten de trigo submetidas durante 10 dias às seguintes condições: (A,C) 25°C; (B,D) 37°C; (A,B) pH=1,2 e (C,D) pH=7,4.....	63
<b>Figura 41.</b> Micrografias das microesferas de glúten/PEG 95/05 submetidas durante 10 dias às seguintes condições: (A,C) 25°C; (B,D) 37°C; (A,B) pH=1,2 e (C,D) pH=7,4.....	64
<b>Figura 42.</b> Micrografias das microesferas de glúten de trigo e glúten/PEG (95/05) submetidas durante 3 a degradação por papaína (pH=6,5) nas seguintes temperaturas: (A,C) 25°C e (B,D) 37°C.....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Valores obtidos na determinação do diâmetro médio.....	42
<b>Tabela II.</b> Análise matemática realizada para as microesferas de glúten de trigo e microesferas de Glúten/PEG 95/05 com rodamina encapsulada.....	58
<b>Tabela III.</b> Análise matemática realizada para as microesferas de glúten de trigo e microesferas de Glúten/PEG 95/05 com cloridrato de diltiazem encapsulado, em pH 7,4 a 37°C.....	61

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Agente Ativo
A/O	Água em Óleo
$C_o$	Concentração inicial de agente ativo
$C_s$	Solubilidade da substância no polímero
$D$	Difusividade do agente ativo na matriz polimérica
$\Delta C_p$	Varição de capacidade calorífica
$\Delta H_c$	Varição da entalpia de cristalização
$\Delta H_m$	Varição da entalpia de fusão
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EE	Eficiência de Encapsulação
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HMW	Alta Massa Molar
LMW	Baixa Massa Molar
M	Molaridade
$M_t$	Quantidade de substância liberada no tempo $t$
$M_\infty$	Quantidade de substância liberada no tempo infinito
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
m/m	Massa/Massa
m/v	Massa/Volume
$n$	Expoente de liberação
O/A	Óleo em Água
PEG	Poli(etileno glicol)
$R^2$	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto

SLC	Sistema de Liberação Controlada
T <sub>c</sub>	Temperatura de cristalização
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusão
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
v/v	Volume/Volume

## RESUMO

O glúten de trigo é uma proteína muito interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais baseados em recursos renováveis, já que é disponível em grandes quantidades e a preços competitivos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar microesferas de glúten de trigo para utilização como dispositivo de liberação de agentes ativos, avaliando o efeito do aditivo poli(etileno glicol) na velocidade de liberação. As substâncias utilizadas na encapsulação e liberação de agentes ativos foram rodamina B e cloridrato de diltiazem. As propriedades físico-químicas e morfológicas das microesferas foram avaliadas, bem como sua eficiência de encapsulação. A obtenção de partículas esféricas com tamanhos entre 8,76 e 24,80  $\mu\text{m}$  foi verificada após visualização das microesferas por MEV. A porosidade, também visualizada por MEV, variou com a presença ou não do aditivo. As microesferas de glúten de trigo puro apresentaram uma superfície com leve rugosidade e com pequenos poros internos. As microesferas de glúten com PEG apresentaram-se mais rugosas em sua superfície e com um número elevado de grandes poros no interior. A eficiência de encapsulação de rodamina foi de 23,59% e 34,21% para as microesferas de glúten de trigo e Glúten/PEG 95/05, respectivamente. Para o diltiazem, a eficiência de encapsulação foi de 72,82% e 96,67%. Os resultados obtidos por DSC e FTIR indicaram interações entre as micropartículas e os aditivos utilizados. Os ensaios de liberação *in vitro* foram realizados utilizando como meio de liberação uma solução tampão fosfato (pH 7,4) a 25 e 37°C para a liberação de rodamina e solução tampão Clark-Lubs (pH 1,2) e solução tampão fosfato (pH 7,4) a 37°C para a liberação de diltiazem. Observou-se que para todos os sistemas estudados houve a ocorrência de efeito burst nas duas primeiras horas de liberação. Na tentativa de elucidar o mecanismo de liberação, os sistemas foram tratados com base em dois modelos matemáticos bastante conhecidos: o modelo de Higuchi e a lei das potências. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que o mecanismo de liberação das microesferas não é controlado exclusivamente por difusão. Provavelmente, a liberação ocorre via um mecanismo que combina a difusão parcial através da matriz intumescida e poros hidrofílicos. Através dos resultados obtidos no teste de degradação das microesferas, pode-se supor que a degradação não exerce influência significativa no mecanismo de liberação das microesferas de glúten de trigo.

**Palavras-chave:** glúten de trigo; microesferas; sistemas de liberação controlada.

## ABSTRACT

Wheat gluten is a very promising protein as a raw material for the development of new biomaterials based on renewable resources, because it is available in large quantities at competitive prices. The purpose of this work was the development and characterization of wheat gluten microspheres for future use as active agents controlled release device, evaluating the poly(ethylene glycol) addition effect. Rhodamine B and diltiazem hydrochloride were used as active agents in the encapsulation and *in vitro* release tests. The microspheres physical-chemical and morphological properties had been evaluated, as well as its encapsulation efficiency. It was verified the attainment of spherical particles with sizes between 8,76 and 24,80  $\mu\text{m}$  after microspheres visualization by MEV. The porosity, also visualized using MEV, varied with the presence or absence of additives. The wheat gluten microspheres presented a slight rugosity at the surface and small internal pores. The gluten microspheres with PEG presented rugosity in its surface and a high number of big pores in its interior. The rhodamine encapsulation efficiency was 23.59% and 34.21% for wheat gluten and Gluten/PEG 95/05 microspheres, respectively. For diltiazem, the encapsulation efficiency was 72.82% and 96.67%. The DSC and FTIR results indicated interactions between the microparticles and additives used. The *in vitro* release tests had been carried out using as release medium a phosphate buffer solution (pH 7.4) at 25 and 37°C for rhodamine release and Clark-Lubs buffer solution (pH 1.2) and phosphate buffer solution (pH 7.4) at 37°C for diltiazem release. It was observed that, for all the studied systems, there was the occurrence of burst effect in the first two hours of release. In the attempt to elucidate the release mechanism, the systems had been treated based in two well known mathematical models: the Higuchi model and the power law. Based on the results obtained, it can be affirmed that the microsphere release mechanism is not exclusively diffusion-controlled. Probably, the release occurs by a mechanism that combines the partial diffusion through the swelling matrix and hydrophilic pores. It can be assumed through the results obtained in the degradation test that this process does not exert significant influence in the wheat gluten microsphere release mechanism.

**Keywords:** wheat gluten; microspheres; controlled release systems.

## **1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1.1 Introdução

A idéia de liberação controlada de princípios ativos a partir de polímeros data dos anos 60 através do emprego de borracha de silicone [1] e polietileno [2]. No entanto, a necessidade de eventual remoção cirúrgica devido à falta de degradabilidade destes sistemas limitou a sua aplicabilidade. Nos anos 70 polímeros biodegradáveis foram sugeridos como materiais apropriados para liberação de fármacos, já que não necessitavam de remoção [3]. A partir de então, a liberação controlada de fármacos passou a ser uma das aplicações mais importantes e mais versáteis dos polímeros biodegradáveis [4].

Para ser utilizado em um sistema de liberação controlada com futuras aplicações *in vivo*, o polímero deve ter duas características fundamentais: biodegradabilidade (entende-se por biodegradação o processo natural pelo qual compostos orgânicos são convertidos a moléculas mais simples no ambiente biológico) e biocompatibilidade (aceitabilidade mútua entre o polímero e o ambiente fisiológico). Desta forma, a biocompatibilidade leva em conta a influência do meio biológico sobre a degradação do polímero e a resposta do tecido em contato com o polímero [5]. As proteínas são polímeros naturais que, desta forma, apresentam as características descritas acima. Dentro da classe das proteínas, as derivadas de plantas apresentam a vantagem de serem materiais renováveis produzidos em grande quantidade todo ano. Entre estas proteínas destacam-se o glúten de trigo, a soja e a ervilha [6].

Proteínas naturais como gelatina, albumina, caseína e colágeno são materiais já utilizados para a preparação de microesferas tendo como objetivo a liberação controlada de substâncias ativas, já que possuem as vantagens de serem absorvíveis e apresentarem produtos de degradação com baixa toxicidade [7]. O glúten de trigo, além de possuir todas as características citadas, ainda apresenta uma das mais rápidas degradações entre os polímeros. Estas propriedades do glúten, que é geralmente obtido como um subproduto agrícola da indústria de processamento de alimentos, o tornam um bom candidato para a utilização como dispositivo de liberação controlada [6]. É possível encontrar na literatura vários estudos envolvendo o glúten de trigo, principalmente visando sua aplicação como biofilme. Porém, não foram encontrados estudos explorando a utilização do glúten de trigo como microesferas para a liberação controlada de substâncias.

A indústria farmacêutica tem especial interesse no uso e aproveitamento de matérias-primas de baixo custo e fácil obtenção para o desenvolvimento de novos materiais

poliméricos, o que tem incentivado o uso de diferentes técnicas para a encapsulação de compostos em sistemas tais como microesferas e microcápsulas. São denominadas microesferas as partículas compactas constituídas por uma rede polimérica na qual o fármaco encontra-se distribuído no seu estado sólido ou molecular, e microcápsulas, as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o fármaco dissolvido recoberto por uma camada de polímero de espessura variável [8,9].

O uso de sistemas poliméricos para a encapsulação de fármacos oferece muitas vantagens em comparação à administração convencional. Em uma forma farmacêutica convencional, quando uma dose é administrada, a concentração plasmática do fármaco aumenta até a obtenção de um pico, decrescendo rapidamente até a sua metabolização e excreção. É necessária a administração de uma nova dose, produzindo um segundo pico plasmático, e desta forma é estabelecido um modelo cíclico que conduz a flutuações na concentração do fármaco, flutuações estas responsáveis pelos efeitos adversos do medicamento. A utilização de sistemas de liberação controlada apresenta como vantagem principal a manutenção de níveis plasmáticos constantes na faixa de concentração terapêutica por meio da contínua liberação do fármaco. Desta forma, não há a necessidade de administrações repetidas, o que aumenta a adesão do paciente ao tratamento. Outras vantagens são: o aumento da estabilidade do fármaco, ou seja, há a proteção do fármaco contra a umidade, calor e oxidação; a manutenção dos níveis terapêuticos por um período prolongado; o mascaramento do sabor e odor desagradáveis de substâncias ativas; o direcionamento do fármaco a alvos específicos e a possibilidade de encapsulação de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas [10].

Além da indústria farmacêutica, a microencapsulação encontra aplicações em diversas áreas: na indústria alimentícia, protegendo um ingrediente sensível contra a ação do oxigênio, água, luz ou calor e permitindo uma liberação controlada do ingrediente encapsulado [11,12,13]; na agricultura, reduzindo a toxicidade do solo, aumentando a eficiência do fertilizante ou nutriente, minimizando os efeitos negativos potenciais associados com a superdosagem e reduzindo a frequência de aplicações [14,15,16]; na indústria de cosméticos, onde a encapsulação de substâncias pode melhorar a estabilidade de armazenamento de materiais encapsulados e promover uma melhor penetração dos ativos na pele [17,18], entre outros.

A técnica de emulsificação/evaporação do solvente foi escolhida para a preparação das microesferas de glúten de trigo devido à simplicidade dos procedimentos envolvidos. Estas

microesferas foram preparadas com a adição ou não de poli(etileno glicol) (PEG), e a influência deste plastificante na porosidade e na velocidade de liberação *in vitro* das microesferas foi avaliada. Para avaliar a capacidade de encapsulação do sistema, utilizou-se rodamina B como substância modelo e cloridrato de diltiazem (antianginoso/vasodilatador) como fármaco modelo. O intuito do presente trabalho foi preparar microesferas de glúten de trigo para a liberação controlada de princípios ativos com aplicações futuras em diversas áreas, tais como a indústria farmacêutica, na agricultura ou na indústria de cosméticos.

## **1.2 Objetivo Geral**

Desenvolver e caracterizar microesferas de glúten de trigo para utilização como dispositivo de liberação de agentes ativos, avaliando o efeito do aditivo poli(etileno glicol) na velocidade de liberação do princípio ativo.

## **1.3 Objetivos Específicos**

- Preparar microesferas de glúten de trigo contendo rodamina e cloridrato de diltiazem;
- Determinar o tamanho de partícula e a morfologia através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Avaliar a influência de aditivos como o poli(etileno glicol) 400 na porosidade e na velocidade de liberação dos ativos incorporados.
- Avaliar o estado físico das substâncias encapsuladas nas microesferas por meio das técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho e calorimetria exploratória diferencial, verificando a ocorrência ou não de interações entre o princípio ativo e o polímero e relacionando os resultados com os perfis de liberação *in vitro*;

- Determinar a eficiência de encapsulação nas diferentes formulações;
- Determinar a velocidade de liberação dos agentes ativos encapsulados na microesferas a 25 e 37°C;
- Determinar o mecanismo de liberação a partir das microesferas estudadas para os princípios ativos encapsulados utilizando a Equação de Higuchi e a Lei das Potências.
- Observar qualitativamente a degradação das microesferas em meio ácido, neutro e enzimático a 25 e 37°C;

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 Polímeros e Proteínas

Os polímeros são moléculas de cadeia longa e de alta massa molar e, em virtude de seu tamanho, são chamados de macromoléculas. Sua estrutura é formada por unidades químicas simples repetidas chamadas de monômeros. Os polímeros apresentam um grande número de repetições da unidade mero, definido como grau de polimerização [19]. Podem ser classificados levando-se em conta vários aspectos. Os mais relevantes para o presente trabalho são os seguintes:

- Origem: Os polímeros naturais apresentam maior complexidade em sua estrutura que os sintéticos. São exemplos de polímeros naturais as proteínas e polissacarídeos, enquanto os polímeros sintéticos são obtidos industrialmente, como o polietileno, prolipropileno, entre outros.

- Forma molecular: Podem ser lineares (formados pelas ligações dos monômeros um ao lado do outro em posição fixa), ramificados (contém pelo menos uma unidade monomérica completa ligada lateralmente à cadeia principal) ou reticulados (estruturas nas quais as cadeias poliméricas estão ligadas entre si via ligações covalentes formando uma rede ou retículo).

- Cristalinidade: Os polímeros cristalinos apresentam uma ordenação da cadeia polimérica. Geralmente os polímeros que apresentam cadeias lineares ou que não tenham grupos volumosos ligados à cadeia principal favorecem a cristalização. Nos polímeros amorfos, as cadeias poliméricas estão dispostas aleatoriamente e desta forma, não cristalizam e em consequência não apresentam ponto de fusão, apenas temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Os polímeros semi-cristalinos apresentam regiões onde suas cadeias apresentam-se organizadas (cristalinas) e outras onde existe uma distribuição aleatória das cadeias (amorfo) [19] (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo da cristalinidade dos polímeros.

Atualmente, os polímeros são utilizados em praticamente todos os setores da economia de nossa sociedade. Servem como alternativa para a substituição de outros materiais por apresentarem melhores propriedades em comparação com os materiais substituídos, por serem mais baratos ou pela escassez de alguns materiais [20].

Polímeros naturais apresentam, em geral, características comuns e particulares que os distinguem dos polímeros sintéticos, entre elas se destacam a existência de cadeias de mesmo tamanho (monodispersidade) e a elevada especificidade e organização molecular. O uso de polímeros naturais como o algodão, a seda e a celulose em aplicações biomédicas data do início da civilização humana [4].

Polímeros biodegradáveis são polímeros que podem ser degradados pela ação de microorganismos como bactérias e fungos, e apresentam uma redução da sua massa molar quando em contato com o ambiente fisiológico. A degradação de um polímero envolve a cisão da cadeia polimérica e também a quebra da estrutura do retículo cristalino. Macromoléculas naturais, por exemplo, proteínas, celulose e amido, são geralmente degradadas em sistemas biológicos por hidrólise seguida de oxidação. No caso de biomateriais, as condições corpóreas são extremamente agressivas e podem acelerar os processos de degradação [4,20,21].

As proteínas são as moléculas mais abundantes e funcionalmente diversas dos sistemas biológicos. Praticamente todos os processos vitais dependem desta classe de moléculas. As proteínas apresentam uma incrível diversidade de funções, embora todas compartilhem a característica estrutural comum de serem polímeros lineares de aminoácidos. Cada aminoácido (exceto a prolina) possui um grupo carboxila, um grupo amino e uma cadeia lateral distinta (grupo "R"), todos ligados a um átomo de carbono. Em pH 7,4 o grupo carboxila é dissociado, formando o íon carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ), carregado negativamente, e o grupo amino é protonado ( $-\text{NH}_3^+$ ). Em proteínas, quase todos estes grupos carboxila e amino combinam-se por ligações peptídicas e não estão disponíveis para reação química (exceto para a formação de ligação de hidrogênio). Assim, é a natureza das cadeias laterais que determina o papel que um aminoácido desempenha em uma proteína [22].

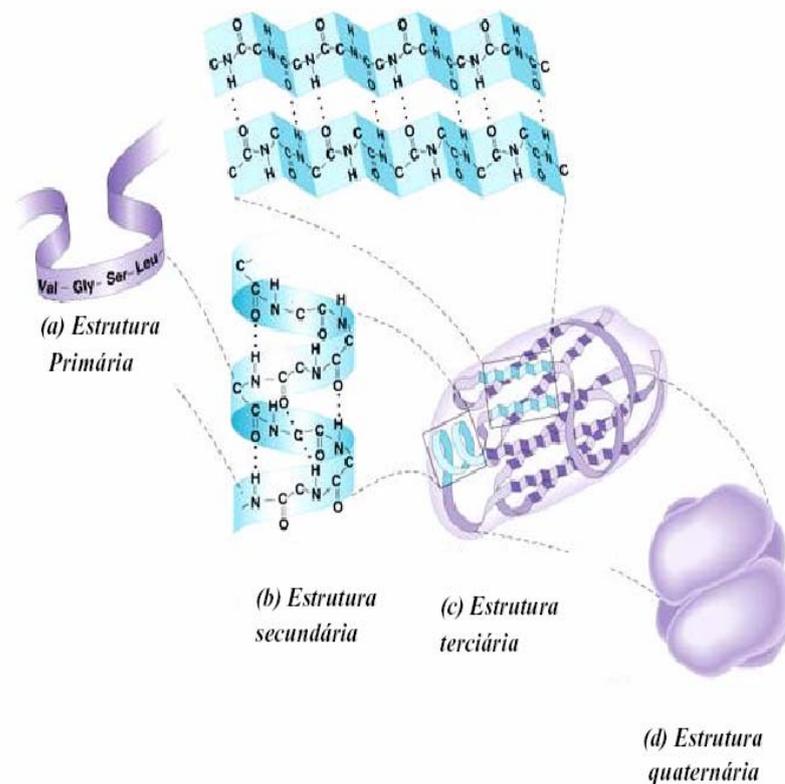
Os 20 aminoácidos comumente encontrados em proteínas estão ligados entre si por ligações peptídicas. A seqüência linear dos aminoácidos ligados contém a informação necessária para gerar uma molécula protéica com uma estrutura tridimensional única. A complexidade da estrutura protéica é mais bem analisada considerando-se a molécula em termos de quatro níveis organizacionais (Figura 2):

- Estrutura primária: é a seqüência de aminoácidos de uma proteína. Os aminoácidos são unidos covalentemente por ligações peptídicas, as quais são ligações amida entre o grupo  $\alpha$ -carboxila de um aminoácido e o grupo  $\alpha$ -amino de outro. As ligações peptídicas não são rompidas pelo manejo normal nem por condições que desnaturem as proteínas, como aquecimento ou altas concentrações de uréia.

- Estrutura secundária: O esqueleto polipeptídico forma arranjos regulares de aminoácidos que estão localizados próximos uns aos outros na seqüência linear. São exemplos de estruturas secundárias frequentemente encontradas em proteínas: a  $\alpha$ -hélice, que consiste de um esqueleto polipeptídico central bem agrupado e espiralado, com as cadeias laterais dos aminoácidos componentes estendendo-se para fora do eixo central, de modo a evitar a interferência estérica entre si. É estabilizada por várias ligações de hidrogênio; as  $\beta$ -pregueadas, onde todos os componentes da ligação peptídica estão envolvidos em ligações de hidrogênio. São também chamadas de beta-folhas, beta-dobraduras ou beta-lâminas. O restante dos aminoácidos são constituídos de estruturas secundárias não-repetitivas, que não são aleatórias, mas possuem um arranjo menos regular que as descritas acima.

- Estrutura terciária: Refere-se à relação espacial entre todos os aminoácidos na cadeia polipeptídica; é na verdade a estrutura tridimensional da proteína. Levando-se em conta a sua forma tridimensional, as proteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos: fibrosas e globulares. As proteínas fibrosas contêm cadeias longas de polipeptídeos, formando filamentos alongados, sendo rígidas e insolúveis em água. Nas proteínas globulares as cadeias polipeptídicas estão enoveladas em uma forma praticamente esférica, possuem uma melhor solubilidade em água e podem se deslocar dentro das células. Quatro tipos de interações cooperam para estabilizar a estrutura terciária das proteínas globulares: Ligações dissulfeto (ligação covalente formada pelo grupo sulfidril (-SH) de cada um de dois resíduos cisteína, para produzir um resíduo de cistina), interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas.

- Estrutura quaternária: maneira como várias moléculas de proteína se unem para formar grandes estruturas. Estas subunidades são mantidas juntas por interações não-covalentes, como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações iônicas.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.

A desnaturação protéica resulta no desdobramento e desorganização da estrutura da proteína, que não é acompanhada de hidrólise das ligações peptídicas. Os agentes desnaturantes incluem o calor, solventes orgânicos, agitação mecânica, ácidos ou bases fortes, detergentes e metais pesados como o chumbo e o mercúrio. A desnaturação pode, em casos raros, ser reversível; porém, a maioria das proteínas, uma vez desnaturadas, ficam permanentemente alteradas [22].

## 2.2 Glúten de Trigo

O glúten de trigo é uma proteína muito interessante para o desenvolvimento de novos biomateriais baseados em recursos renováveis, já que é disponível em grandes quantidades e a preços competitivos. Além disso, este biopolímero tem características tecnológicas interessantes, entre as quais se encontram a baixa solubilidade em água e a viscoelasticidade. Porém, a estrutura do sistema polimérico de glúten ainda está sendo debatida [23]. A

solubilidade limitada do glúten de trigo em solvente aquoso tem sido geralmente atribuída ao seu grande tamanho molecular e agregação intermolecular, surgidos de fortes interações não-covalentes, envolvendo ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas [24]. Mejri et al. (2005) mostraram que a solubilidade do glúten de trigo aumenta com a diminuição do pH, apresenta um valor mínimo de solubilidade em pH 6, e é seguido por um aumento da solubilidade na região de pH básico [25]. Este resultado já era esperado, visto que a mínima solubilidade das proteínas sempre ocorre no seu ponto isoelétrico (onde as proteínas estão com carga global neutra).

É possível encontrar na literatura diversos trabalhos envolvendo o glúten de trigo, principalmente visando sua aplicação como biofilme. Por exemplo, Gontard et al. (1993) avaliaram a influência da água e do glicerol como plastificantes nas propriedades mecânicas e de barreira de filmes comestíveis de glúten [26]. De fato, a água é um plastificante para o glúten, pois possui a habilidade de modificar a estrutura deste polímero natural [27]. Este efeito também foi observado por Micard et al. (2001), que investigaram o comportamento térmico de glúten de trigo nativo e processado. Os autores mostraram que a  $T_g$  diminuiu de 175°C para 20°C quando a quantidade de água aumentou de 0 para 16% [28].

Glúten de trigo é um termo geral para as proteínas da farinha de trigo pouco solúveis em água [29]. De um ponto de vista bioquímico, o glúten é uma mistura de quatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas. As albuminas e globulinas são aproximadamente 15% das proteínas. Os 85% restantes consistem de uma fração de proteína monomérica, a gliadina, e uma polimérica, chamada glutenina [30]. As gliadinas e gluteninas encontram-se em quantidades aproximadamente iguais no glúten de trigo, e podem ser diferenciadas levando-se em conta a solubilidade de cada fração em etanol: as gliadinas são solúveis em uma solução aquosa de etanol 60% enquanto as gluteninas são insolúveis nesta mesma solução [31].

Portanto, o glúten é formado por uma fração de proteína polimérica que consiste de seqüências de polipeptídeos ligados através de ligações dissulfeto e por uma fração de proteína monomérica que é formada por cadeias polipeptídicas simples, que interagem com cadeias laterais do macropolímero glutenina através de ligações secundárias [23]. Estas duas frações são caracterizadas por altas quantidades de glutamina e prolina e por baixas quantidades de aminoácidos com grupos laterais carregados [31].

Embora a cisteína exista em pouca quantidade nas proteínas do glúten (aproximadamente 2%), é extremamente importante para a estrutura e funcionalidade deste,

pois é a responsável pelas ligações dissulfeto entre uma mesma cadeia de proteína (ligação intramolecular) ou entre as proteínas (ligação intermolecular) [31]. Ali e colaboradores (1997) estudaram o efeito de diferentes tratamentos térmicos nas propriedades de filmes de glúten de trigo [32]. Este estudo demonstrou que durante o tratamento térmico ocorre a formação de ligações covalentes nos filmes de glúten, além de detectar uma diminuição na hidrofobicidade dos sistemas estudados. Os autores concluíram que proteínas de glúten podem sofrer ligações dissulfeto quando sob aquecimento, ou seja, o glúten pode ser reticulado quando aquecido. Além das ligações dissulfeto, a estrutura covalente da rede de glúten é formada por ligações não-covalentes como as ligações de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas, que contribuem significativamente para a estabilização da estrutura do glúten [31].

A maioria das gliadinas, como já dito anteriormente, estão presentes como monômeros e apresentam uma faixa de massa molar de 28.000 a 50.000 g mol<sup>-1</sup>. Podem ser agrupadas em quatro diferentes tipos:  $\omega$ 5-,  $\omega$ 1,2-,  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas. As  $\omega$ -gliadinas são caracterizadas pela maior quantidade de glutamina, prolina e fenilalanina, que juntas representam 80% da composição total. A maioria das  $\omega$ -gliadinas não contém cisteína, portanto não há a possibilidade de ligação dissulfeto. As  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas, principais constituintes da gliadina, tem proporções de glutamina e prolina muito menores que as  $\omega$ -gliadinas, e diferem significativamente na quantidade de alguns poucos aminoácidos como a tirosina. Estes dois tipos de gliadina apresentam os domínios N- e C-terminal diferentes. O domínio N-terminal consiste principalmente de seqüências repetitivas ricas em glutamina, prolina, fenilalanina e tirosina e é único para cada tipo de gliadina. Quanto ao domínio C-terminal, as  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas são homólogas, apresentando seqüências não-repetitivas que contêm menos glutamina e prolina que o domínio N-terminal. Com algumas exceções, as  $\alpha/\beta$ -gliadinas contêm seis e as  $\gamma$ -gliadinas oito cisteínas localizadas no domínio C-terminal e formam três e quatro ligações cruzadas intramoleculares, respectivamente [31].

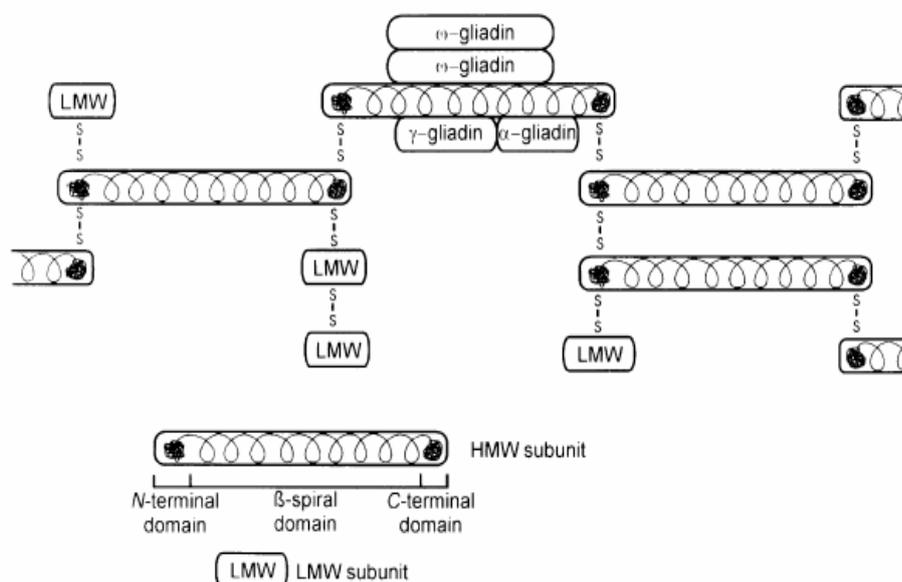
A fração glutenina compreende proteínas agregadas ligadas por ligações dissulfeto intermoleculares; têm um tamanho variável, indo de 500.000 g mol<sup>-1</sup> para mais de 10 milhões. Portanto, as gluteninas pertencem ao grupo das maiores proteínas da natureza. Após a redução das ligações dissulfeto, as subunidades de glutenina resultantes apresentam uma solubilidade em solução alcoólica similar às gliadinas, e são divididas em gluteninas de baixa massa molar (gluteninas LMW) e gluteninas de alta massa molar (gluteninas HMW). O tipo predominante de proteína são as subunidades de glutenina LMW, que estão relacionadas às  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas em massa molar e composição de aminoácidos. As gluteninas LMW contêm dois

domínios diferentes: o domínio N-terminal, que consiste de unidades repetitivas ricas em glutamina e prolina, e o domínio C-terminal, que é homólogo ao das  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas. As gliadinas LMW contêm oito cisteínas; seis resíduos estão em posições homólogas às  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas, e portanto, propõe-se que estão ligadas por ligações dissulfeto intramoleculares [31].

As subunidades de glutenina HMW têm as maiores massas molares de todas as proteínas do glúten, com seqüências ricas nos aminoácidos prolina, glutamina e glicina [33]. A glutenina HMW consiste de três domínios estruturais: um domínio não-repetitivo N-terminal (A), um domínio central repetitivo (B) e um domínio C-terminal (C). Os domínios A e C são caracterizados pela presença da maioria ou de todas as cisteínas [34].

Observa-se, portanto, que as ligações dissulfeto têm um papel importante na determinação da estrutura e propriedades das proteínas de glúten, visto que as  $\alpha/\beta$ - e  $\gamma$ -gliadinas apresentam três e quatro ligações dissulfeto intramoleculares, respectivamente, enquanto as gluteninas LMW e HMW incluem tanto ligações dissulfeto intramoleculares quanto ligações intermoleculares [35].

A Figura 3 resume uma visão muito aceita da estrutura do glúten, onde as subunidades de glutenina HMW se ligam através de ligações dissulfeto intermoleculares formado um esqueleto, que forma a base para as ramificações da subunidade de glutenina LMW (também ligadas por ligações dissulfeto). As gliadinas também podem interagir com os polímeros de glutenina por interações não-covalentes [33].



**Figura 3.** Modelo estrutural sugerido para o glúten de trigo [33].

## **2.3 Sistemas de Liberação Controlada (SLC)**

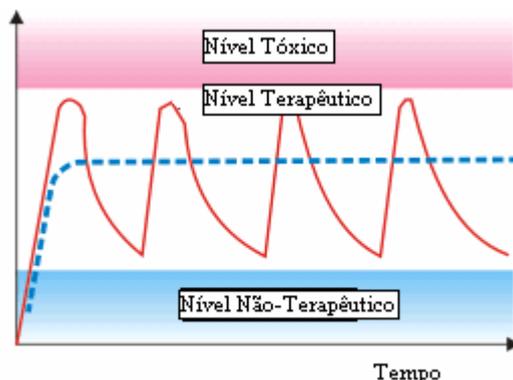
Sistemas de Liberação Controlada (SLC) podem ser definidos como aqueles sistemas nos quais o agente ativo (AA) é liberado de forma contínua e prolongada. O perfil de liberação ideal mostra uma liberação constante com o tempo, ou seja, com uma cinética de liberação de ordem zero. Porém, em muitos casos os perfis de liberação são mais complicados, geralmente envolvendo dois processos principais: o primeiro, chamado efeito “burst”, é caracterizado pela liberação inicial do agente ativo que está adsorvido na superfície da partícula; o segundo é um estágio geralmente mais constante com taxas de liberação dependentes da difusão do AA e/ou degradação do polímero [36].

Os fatores que afetam a velocidade de liberação dos agentes ativos envolvem a estrutura da matriz onde está contida a substância e as propriedades químicas associadas tanto com o polímero quanto com o agente ativo. Um AA encapsulado em uma matriz que se degrada lentamente dá a oportunidade, por exemplo, de efeitos de liberação mais lentos. Mas a liberação de agentes ativos, além de ser influenciada pela degradação, também é controlada pela difusão, já que a substância pode migrar através dos poros formados durante a etapa de preparação das microesferas. Outros fatores que afetam o perfil de liberação são a massa molar polimérica, distribuição do AA e cristalinidade [36].

Em geral, um SLC é composto por um AA (que pode ser um fármaco, fertilizante, nutriente, entre outros) unido a um transportador, geralmente de natureza polimérica, onde a taxa de liberação está relacionada com as características físico-químicas do polímero [37]. Como exemplos de SLC poliméricos temos: membranas para dispositivos de liberação transdérmica [38,39]; matrizes poliméricas (scaffolds) para uso em implantes [40,41]; e micro- e nanoesferas para liberação controlada de fármacos na via gastro-intestinal ou parenteral e liberação de pesticidas ou nutrientes na agricultura.

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada tem atraído grande interesse principalmente da indústria farmacêutica, uma vez que a administração de fármacos por meio de SLCs superam inúmeras limitações da administração convencional. A principal vantagem de um SLC em comparação com um sistema de administração convencional de fármacos está na manutenção do nível terapêutico por períodos mais prolongados. Em um sistema de administração convencional, os níveis plasmáticos podem aumentar além do necessário atingindo níveis tóxicos e diminuir rapidamente à medida que o fármaco é metabolizado,

caindo em pouco tempo para níveis abaixo do terapêutico [4]. Já em um SLC, a concentração do fármaco é mantida constante no organismo e permanece durante mais tempo em níveis terapêuticos, conforme esquematizado na Figura 4.



**Figura 4.** Comparação entre concentração plasmática de um fármaco em um modelo convencional (linha vermelha) e em um SLC (linha azul).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam ainda como vantagens: a possibilidade da aplicação do agente diretamente no sítio de ação; menor frequência de administração do fármaco; proteção do fármaco contra eventual degradação no organismo; e diminuição de custos devido à redução da quantidade de fármaco empregado [42].

Aplicações de liberação de fármacos utilizando microesferas poliméricas biodegradáveis estão se tornando um importante meio de liberação de agentes terapêuticos já que as microesferas oferecem uma administração fácil e não-invasiva através da injeção ou por ingestão, proteção do fármaco encapsulado e liberação de fármaco sustentada por períodos que vão de horas a meses ou até anos [36,43]. Por exemplo, Liu et al. (2005) prepararam microesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) e encapsularam o fármaco Huperzine A, utilizado no tratamento de pacientes com a doença de Alzheimer. Nos testes *in vivo*, estas microesferas demonstraram a capacidade de liberar o fármaco encapsulado durante duas semanas, mantendo a concentração plasmática de Huperzine A praticamente constante [44].

A liberação controlada de fármacos também está sendo estudada como possível aplicação na medicina veterinária. Microesferas da proteína zeína, proveniente do milho, foram preparadas por Liu et al. (2005) para a liberação controlada de ivermectina, um parasiticida aplicado no gado. Estas microesferas, segundo os autores, se mostraram úteis

como um sistema capaz de atingir tecidos e órgãos específicos devido à natureza e tamanho das partículas, o que possibilita o seu carregamento por macrófagos [7].

Microesferas poliméricas biodegradáveis também estão sendo aplicadas na liberação controlada de fertilizantes e nutrientes. A eficiência dos fertilizantes no solo depende principalmente da sua habilidade de manter uma concentração suficiente de nutrientes na zona da raiz da planta por um determinado período de tempo. Na maioria dos fertilizantes comerciais disponíveis, a concentração dos ingredientes ativos diminui rapidamente antes da planta absorver o necessário devido à degradação (química, fotoquímica e biológica), volatilização, lixiviação, adsorção ou imobilização [14]. Para aumentar a eficiência dos fertilizantes convencionais, doses maiores são geralmente aplicadas aumentando, desta forma, o risco para o meio ambiente. Fertilizantes de liberação controlada são feitos para liberar seu conteúdo de nutrientes gradualmente, e se possível, para coincidir com o requerimento de nutrientes de uma planta [15]. O uso desta forma de fertilizantes causa um aumento na sua eficiência, reduz a toxicidade do solo, minimiza os efeitos negativos potenciais associados com a superdosagem e reduz a frequência de aplicações. Além disso, esses materiais podem melhorar o solo para cultivo no que diz respeito a uma melhor aeração, além de prevenir a erosão [16].

## ***2.4 Microencapsulação de Agentes Ativos***

A microencapsulação consiste numa série de técnicas que tem por objetivo encapsular substâncias sólidas ou líquidas através da formação de matrizes ou pelo revestimento das mesmas por um polímero. Este princípio tem sido utilizado em uma ampla variedade de aplicações industriais: na área alimentícia, a incorporação de nutrientes bioativos como peptídeos e vitaminas pode proporcionar uma maneira simples de desenvolver novos alimentos funcionais, além de conferir proteção contra o oxigênio, água ou luz para ingredientes sensíveis [11,45]. Na indústria cosmética, a encapsulação de substâncias pode melhorar a estabilidade de armazenamento dos materiais encapsulados, além de proporcionar a liberação prolongada da substância em questão [17,18]. Já na área farmacêutica, a microencapsulação pode ser empregada para melhorar a estabilidade, mascarar o sabor, promover liberação prolongada ou vetorizar fármacos para locais específicos de ação [10]. As micropartículas resultantes podem ser administradas por via tópica, oral ou parenteral.

As micropartículas são partículas poliméricas que apresentam um diâmetro médio variando entre 1µm e 1mm e são classificadas segundo a sua estrutura em microesferas e microcápsulas. São denominadas microesferas as partículas compactas constituídas por uma rede polimérica na qual o agente ativo encontra-se distribuído no seu estado sólido ou molecular, e microcápsulas, as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo dissolvido recoberto por uma camada de polímero de espessura variável [8,9].

Existem várias técnicas descritas na literatura para a microencapsulação de agentes ativos em microesferas. Muitos destes processos de microencapsulação são modificações de três técnicas básicas: spray-drying, separação de fases (coacervação) e emulsificação/evaporação de solvente [46].

A técnica de spray-drying é um procedimento que se baseia na pulverização de uma solução polimérica contendo o agente ativo em uma câmara de secagem. Esta técnica é relativamente simples, além de apresentar uma ampla aplicação para a produção de micropartículas em escala industrial visando sobretudo a liberação de fármacos pela via oral [10]. No entanto, esta técnica não deve ser usada para compostos muito sensíveis a temperatura, o controle do tamanho das partículas é difícil e o rendimento para pequenas proporções é moderado [46]. Ventura et al. (2007) prepararam microesferas de quitosana para a administração intrapulmonar de moxifloxacina utilizando esta técnica. As microesferas formadas tinham entre 2,5 a 6 µm, e apresentaram morfologia esférica com uma superfície lisa [47]. Gavini et al. (2007) utilizaram a técnica de spray-drying para a preparação de microesferas de quitosana com o propósito de administração nasal, encapsulando metoclopramida como fármaco modelo. Os autores demonstram que as microesferas preparadas controlam a liberação *in vitro* de metoclopramida, e baseando-se nos resultados dos testes *in vitro* afirmam que este sistema pode ser usado com sucesso na administração nasal do fármaco estudado [48].

A coacervação ou separação de fases utiliza um procedimento que conduz à alteração das características do meio, por exemplo, mudança de temperatura, pH, adição de um não solvente, sal ou outro polímero incompatível, o que leva à deposição do polímero ao redor do material a ser recoberto [10]. É a técnica de microencapsulação mais antiga, e muito utilizada. Yu e Lee (1997) utilizaram o glúten para a microencapsulação de pirrolnitrina através da técnica de coacervação. Os autores obtiveram microcápsulas com tamanhos entre 5 e 80 µm, sendo que estas microcápsulas eram irregulares no formato, ou seja, não foram obtidas partículas esféricas [49]. Apesar de ser uma técnica muito utilizada, a coacervação é

frequentemente prejudicada por resíduos de solventes e agentes coacervantes encontrados nas microesferas. Além disso, não é muito útil para a produção de microesferas na faixa de poucos micrometros [46].

A técnica de emulsificação seguida de evaporação do solvente tem sido muito utilizada devido à simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das partículas, além de apresentar a possibilidade de modular as características físico-químicas das microesferas pela escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação. Esta técnica não requer temperaturas elevadas nem agentes que induzam a separação de fases e é possível atingir tamanhos de partícula controlados na faixa nano e micrométrica [46].

A preparação de microesferas por emulsificação/evaporação de solvente consiste de quatro passos principais: (i) dissolução ou dispersão do agente ativo em um solvente (geralmente orgânico) contendo o polímero; (ii) emulsificação dessa fase orgânica em uma segunda fase contínua (frequentemente aquosa) imiscível na primeira. Nesta etapa são formadas gotas da fase dispersa contendo o agente ativo e o polímero que formará a matriz polimérica; (iii) extração do solvente da fase dispersa na fase contínua, que é acompanhada pela evaporação do solvente, transformando gotas em microesferas sólidas; (iv) coleta e secagem das microesferas [46]. Muitas vezes é necessário fazer modificações desta técnica, a fim de obter valores satisfatórios de eficiência de encapsulação, e na maioria das vezes pode ser necessária a utilização de estabilizantes na emulsão resultante, a fim de evitar a agregação e coalescência das partículas.

A eficiência de encapsulação é definida como a diferença percentual entre a concentração de agente ativo inicialmente adicionado na formulação e a concentração retida no interior das partículas. Agentes ativos pouco hidrossolúveis são encapsulados com sucesso pela formação de uma emulsão O/A (óleo em água). Já agentes ativos com elevada hidrossolubilidade são preferencialmente encapsulados por meio da formação de emulsões A/O (água em óleo), onde um solvente polar contendo o fármaco e o polímero é emulsificado em uma fase oleosa, como o óleo mineral.

Entre os vários parâmetros de formulação que influenciam o perfil de liberação da substância ativa encapsulada no interior das partículas encontram-se as características físico-químicas do polímero, agente ativo, solventes e agentes emulsificantes, assim como a relação substância ativa/polímero na fase interna ou dispersa da emulsão, o tamanho da partícula e a velocidade de agitação [36,50]. Em grande parte, o diâmetro médio final das partículas

obtidas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente depende da velocidade de agitação e da concentração de polímero na fase interna da emulsão [10].

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos utilizando a técnica de emulsificação/evaporação de solvente na preparação de microesferas de diferentes polímeros. Pode-se citar entre eles diferentes polissacarídeos, tais como a celulose e seus derivados, os alginatos e as quitosanas. Chen et al. (2006) desenvolveram microesferas baseadas em alginato de sódio e proteína do soro para utilização como matrizes biocompatíveis para a administração oral de compostos bioativos sensíveis, usando riboflavina como modelo. As microesferas de alginato e proteína do soro demonstraram a habilidade de retardar a liberação de compostos no estômago, porém permitindo a completa liberação no intestino delgado [45]. Park et al. investigaram as propriedades de liberação *in vitro* a diferentes temperaturas de um peptídeo encapsulado em microesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) preparadas usando um método de emulsificação/evaporação de solvente. Todas as microesferas apresentaram superfícies não-porosas e a eficiência de encapsulação foi maior que 90% para os sistemas estudados [51]. Yang et al. também prepararam microesferas de poli(ácido láctico) e poli(ácido láctico-co-glicólico) pela técnica de emulsificação/evaporação de solvente a diferentes temperaturas. Os autores observaram que, para o sistema estudado, as maiores eficiências de encapsulação e as menores liberações iniciais (efeito “burst”) aconteceram nas maiores e menores temperaturas de preparação empregadas (à 4 e 38°C) [50]. Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura sobre a utilização de glúten na formação de microesferas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente.

## **2.5 Análise do Mecanismo de Liberação**

Na preparação de um novo sistema polimérico para a liberação controlada de agentes ativos, é muito importante a determinação da velocidade e do mecanismo de liberação da substância encapsulada. Os resultados obtidos podem ajudar a entender melhor a estrutura do sistema utilizado e os mecanismos envolvidos na liberação, além de ajudar a prever a conduta *in vivo* do sistema em estudo.

Baseado nas características físico-químicas do polímero, o mecanismo de liberação de agentes ativos a partir de uma matriz polimérica pode ser separada em 3 processos principais [37,52]:

- Sistema controlado pela difusão: fatores que influenciam significativamente a difusão são a solubilidade do AA na matriz polimérica, natureza química do polímero e do AA (polaridade) e a temperatura do sistema.

- Sistema controlado pelo intumescimento: neste sistema, a velocidade de intumescimento do polímero é o processo determinante para a difusão do AA, pois quando o SLC entra em contato com a água e ocorre a hidratação do material, há a formação de uma camada de alta viscosidade na interface água-polímero, cuja espessura aumenta a medida que a hidratação ou intumescimento progride.

- Sistema controlado pela erosão: este sistema depende da degradação do polímero, liberando o agente ativo para o meio externo. É útil para a aplicação em implantes ou administração oral, visto que a matriz polimérica sofre degradação, não sendo necessária a remoção do dispositivo. Este tipo de sistema apresenta ainda grande aplicação na liberação controlada de pesticidas e nutrientes no solo, tendo em vista a possibilidade de hidrólise pela umidade.

A difusão está envolvida em todos os processos citados acima. Quando a matriz polimérica em estudo é não-biodegradável, a liberação de agentes ativos pode acontecer por difusão ou intumescimento do polímero, em ambos os casos devido ao gradiente de concentração. Já para uma matriz polimérica biodegradável, a liberação é geralmente controlada pela clivagem hidrolítica das cadeias poliméricas, embora a difusão ainda possa ser o fenômeno dominante caso a erosão seja lenta [52].

A difusão de um AA através da matriz polimérica ocorre preferencialmente através das regiões amorfas do polímero. Este fenômeno também é favorecido pelo aumento do volume livre entre as cadeias, portanto uma forma de modular a velocidade de difusão de um AA através de uma matriz polimérica é a formação de ligações cruzadas, que diminuem o movimento das cadeias poliméricas e o volume livre, diminuindo, portanto, a difusividade do agente ativo. Já a adição de plastificantes pode aumentar o volume livre e conseqüentemente a difusão do AA, pois essas moléculas têm a capacidade de interpor-se entre as cadeias poliméricas, diminuindo as interações intramoleculares e reduzindo a  $T_g$  [53].

São encontradas na literatura várias equações que se propõem a elucidar o mecanismo da liberação de agentes ativos a partir de uma matriz polimérica. O modelo mais utilizado e provavelmente mais conhecido é o de Higuchi, que assume que o agente ativo é liberado a partir de uma matriz homogênea com um coeficiente de difusão constante [54]. A equação (1)

é conhecida como equação de Higuchi, onde  $M_t$  é a quantidade de substância liberada no tempo  $t$ ,  $M_\infty$  é a quantidade de substância liberada em tempo infinito (que deve ser igual a quantidade de AA inicialmente adicionado ao sistema),  $D$  é a difusividade do agente ativo na matriz polimérica e  $C_o$  e  $C_s$  são respectivamente, a concentração inicial do agente ativo e a solubilidade da substância no polímero [55].

$$\frac{M_t}{M_{inf}} = \sqrt{D \times C_o \times t \times (2 \times C_o - C_s)} \quad (1)$$

Admitindo que  $C_o$ ,  $C_s$  e  $D$  são constantes, a equação resume-se a:

$$\frac{M_t}{M_{inf}} = K\sqrt{t} \quad (2)$$

Portanto, a fração de agente ativo liberado é proporcional à raiz quadrada do tempo. Para a utilização confiável do modelo de Higuchi, o sistema em questão deve apresentar algumas características tais como [55]: i) a concentração inicial do agente ativo no sistema deve ser muito maior que a solubilidade deste agente ativo no polímero ( $C_o \gg C_s$ ); ii) o intumescimento e a dissolução da matriz polimérica devem ser negligenciáveis; iii) a difusividade do AA deve ser constante; iv) durante a liberação, devem ser mantidas as condições sink (a concentração máxima de agente ativo dissolvido na fase contínua não deve exceder 10% da sua concentração à saturação [56]).

Estas características nem sempre são encontradas em sistemas de liberação controlada preparados a partir de polímeros biodegradáveis. Devido a sua simplicidade, no entanto, a equação de Higuchi pode ser aplicada no tratamento de dados experimentais de liberação de agentes ativos para se ter uma idéia geral do mecanismo de liberação do sistema em estudo.

Um segundo método que descreve o comportamento da liberação de AA a partir de sistemas poliméricos é a lei das potências (equação 3), onde  $M_t$  e  $M_\infty$  são a quantidade de substância liberada no tempo  $t$  e no tempo infinito, respectivamente,  $K$  é uma constante relacionada às características estruturais e geométricas da matriz polimérica e  $n$  é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação do agente ativo [55].

$$\frac{M_t}{M_{\text{inf}}} = Kt^n \quad (3)$$

Para um dispositivo de liberação na forma de microesferas, um valor de  $n=0,43$  representa um mecanismo de liberação controlado por difusão Fickiana, ou seja, há a indicação de que o mecanismo de liberação do AA é controlado pela difusão. Quando  $n=0,85$ , temos o transporte caso-II, indicativo de uma cinética de liberação de ordem zero, o que significa que a liberação do agente ativo é independente do tempo. Valores de  $n$  entre 0,43 e 0,85 são considerados uma indicação da sobreposição dos dois fenômenos citados acima, conhecido como transporte anômalo [55]. Quando os valores de  $n$  são inferiores a 0,43 o principal mecanismo está relacionado com a difusão parcial através da matriz intumescida e através de poros hidrofílicos [57], e se  $n>0,85$  há o indicativo de uma cinética super caso-II, atribuída à associação dos mecanismos de difusão, erosão, relaxação das cadeias e intumescimento [58].

## **2.6 Substâncias Modelo Utilizadas**

Para a avaliação da velocidade de liberação *in vitro* a partir de microesferas de glúten de trigo foram escolhidas a rodamina B como substância modelo e o cloridrato de diltiazem como fármaco modelo.

São encontrados na literatura alguns estudos na área de liberação de agentes ativos utilizando a rodamina B como material encapsulado, principalmente devido à fluorescência deste composto, facilitando sua detecção. Por exemplo, Berkland et al. (2001) publicaram um estudo onde relatam a fabricação de microesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) com tamanhos controlados e monodispersos, e para testar a liberação *in vitro* das microesferas preparadas utilizaram a rodamina B como substância modelo [59]. Três anos mais tarde, em 2004, Berkland publicou outro trabalho, onde examina fatores que influenciam o mecanismo da liberação de agentes ativos a partir de microesferas de poli(anidrido sebácico) [43]. Para este objetivo, foram utilizadas três substâncias modelo, rodamina B, p-nitroanilina e piroxicam, que diferem em sua solubilidade em solução aquosa. O autor relata que a rodamina distribuiu-se preferencialmente na superfície das microesferas e a sua liberação foi rápida e se

completou em três dias. Bibby et al. (1999) prepararam microesferas de poli(ácido acrílico) e adicionaram  $\beta$ -ciclodextrina às partículas para avaliar se a incorporação desta substância mudaria a cinética de liberação do agente ativo encapsulado. Os corantes fenolftaleína e rodamina B foram utilizados para os estudos de encapsulação e liberação *in vitro*, mas não foi observado nenhuma diferença nos perfis de liberação das duas substâncias estudadas [60].

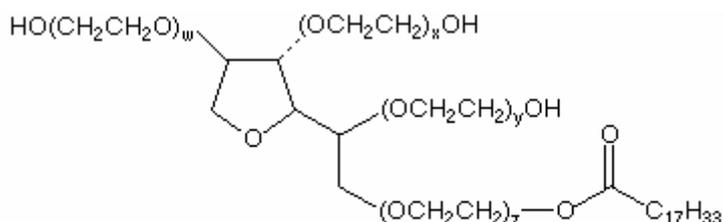
Também é possível encontrar na literatura alguns estudos visando a encapsulação e liberação controlada de cloridrato de diltiazem. Este fármaco antihipertensivo tem uma meia vida biológica relativamente curta, de 3 a 4 horas, e requer uma alta frequência de administração. Portanto, tentativas têm sido feitas para se desenvolver formulações de liberação lenta de diltiazem. Bayomi et al. (1998) prepararam microesferas de liberação sustentada de caseína e quitosana contendo cloridrato de diltiazem [61]. A liberação de diltiazem se tornou mais lenta com o aumento da concentração de caseína e do tempo de agitação. Por outro lado, o aumento da concentração de quitosana mostrou uma liberação inicial do fármaco mais rápida. Follonier et al. (1995) prepararam micropartículas de liberação sustentada com diltiazem encapsulado [62]. Os autores relatam que, utilizando a técnica de extrusão e controlando-se alguns fatores tais como o tipo do polímero utilizado, tamanho da partícula formada, quantidade de fármaco encapsulado e adição de componentes hidrofílicos para aumentar a porosidade do sistema, foi possível obter taxas de liberação *in vitro* de diltiazem no nível terapêutico requerido.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**



### 3.1.2 Tween 80

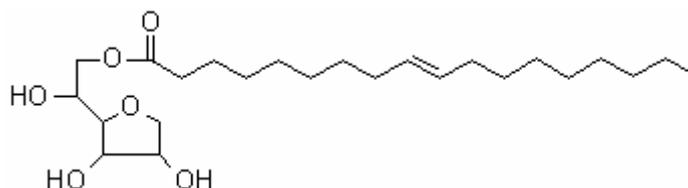
Os compostos agrupados sob o nome de Tween são ésteres de sorbitano etoxilados e agem como tensoativos hidrófilos, diferenciando-se com respeito ao ácido graxo presente em sua estrutura. Em especial, o Tween 80 (também conhecido como polissorbato 80) é um oleato. Este surfactante não-iônico é muito utilizado na indústria alimentícia, principalmente na preparação de soluções de proteína para ajudar na solubilização e estabilização desta. É um líquido amarelo solúvel em água e viscoso, com densidade de  $1,064 \text{ g cm}^{-3}$ .



**Figura 6.** Estrutura química do Tween 80, onde  $x + y + w + z = 20$ .

### 3.1.3 Span 80

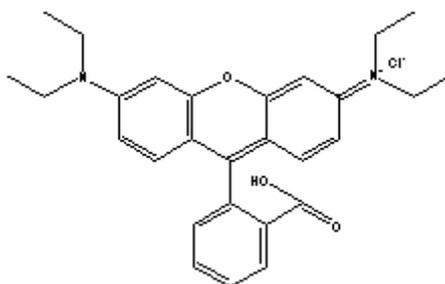
Os compostos agrupados sob o nome de Span são ésteres de sorbitano derivados da reação do sorbitol com um ácido graxo e estes compostos, assim como os Tweens, diferenciam-se em relação ao ácido graxo presente em sua estrutura. O Span 80 é um tensoativo lipófilo, sendo desta forma solúvel ou dispersível em óleo, e é muito utilizado em produtos alimentícios e na preparação de medicamentos de administração oral. O ácido graxo presente em sua estrutura também é um oleato, e este surfactante não-iônico apresenta-se como um líquido amarelo claro, de densidade  $0,840 \text{ g cm}^{-3}$ .



**Figura 7.** Estrutura química do Span 80.

### 3.1.4 Rodamina B

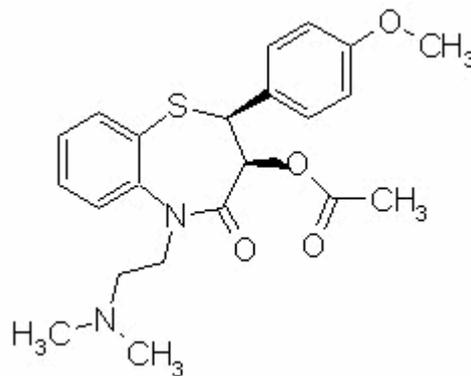
As rodaminas são um grupo de corantes fluorescentes, e como exemplos temos a rodamina B, rodamina 6G e rodamina 123, entre outras. A rodamina B foi utilizada neste trabalho como uma substância modelo por apresentar um ponto de fusão em 206°C, portanto não sofre fusão durante a etapa de preparação das microesferas. Além disso, apresenta fácil detecção pela técnica de espectroscopia no ultravioleta visível (UV/VIS), com um comprimento de onda em 554 nm e é solúvel em soluções aquosas, apresentando cerca de 11 mg ml<sup>-1</sup> de solubilidade.



**Figura 8.** Estrutura química da rodamina B.

### 3.1.5 Cloridrato de Diltiazem

O cloridrato de diltiazem foi utilizado no presente trabalho como fármaco modelo, apresenta-se na forma de cristais brancos com ponto de fusão em torno de 215°C e apresenta solubilidade em água de 530 mg ml<sup>-1</sup>, ou seja, é extremamente solúvel em água. É um agente bloqueador dos canais de cálcio ativo por via oral, sendo empregado no controle da hipertensão.



**Figura 9.** Estrutura química do cloridrato de diltiazem.

## **3.2 Metodologia**

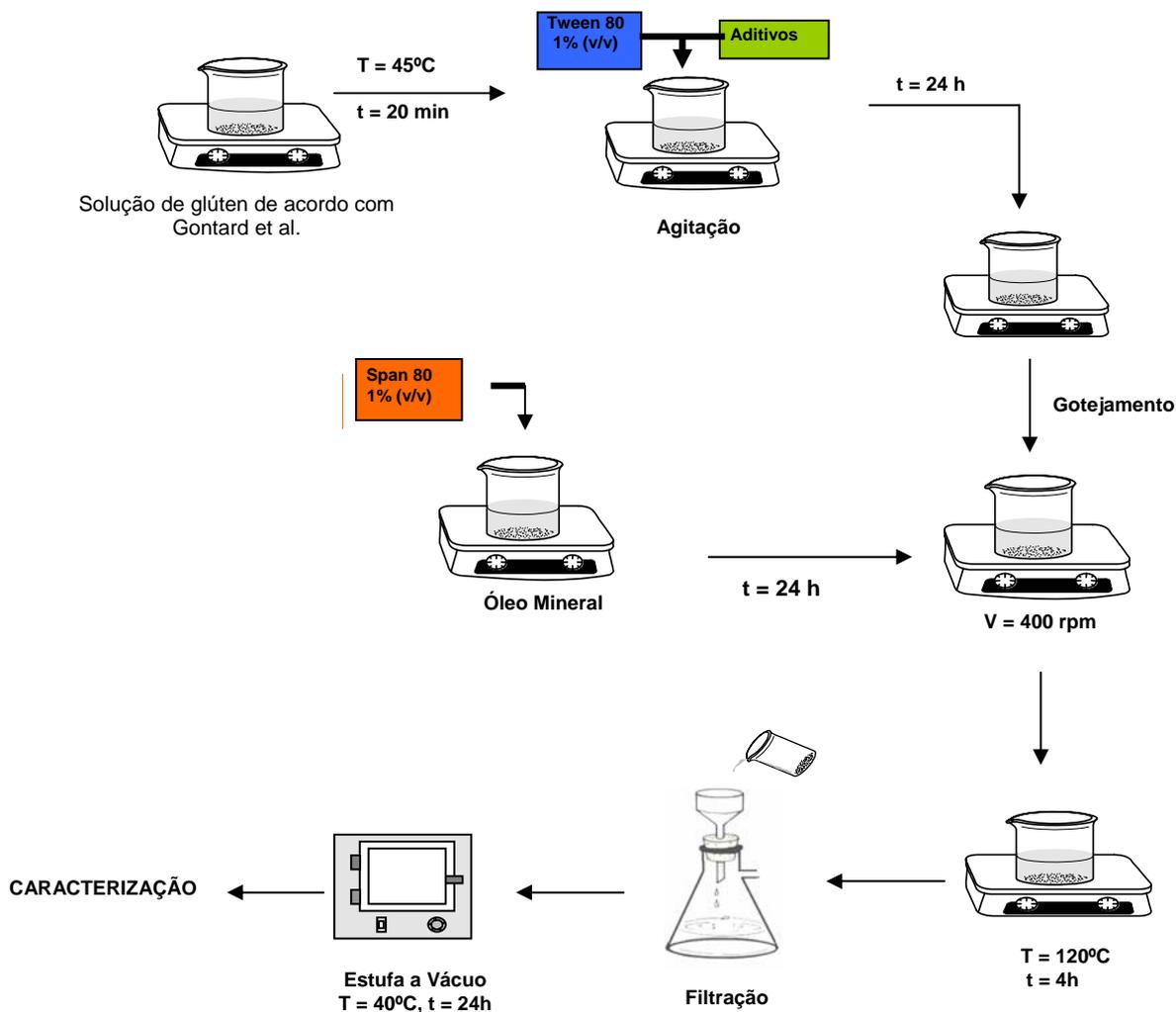
### **3.2.1 Preparação das microesferas**

São reportados três passos principais para o processamento de materiais baseados em biopolímeros de origem agrícola: i) a quebra de ligações intermoleculares que estabilizam os polímeros na sua forma nativa usando agentes de ruptura químicos ou físicos; ii) arranjo e orientação das cadeias poliméricas móveis na forma desejada; iii) permitir a formação de novas interações e ligações intermoleculares para estabilizar a rede tridimensional [1].

Como já citado anteriormente, as microesferas de glúten de trigo foram preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação do solvente. Inicialmente, preparou-se uma solução de glúten de trigo 10% (m/v) tendo como solvente uma solução água/etanol 55/45 (v/v) (fase interna). Adicionou-se à esta solução alguns miligramas de sulfito de sódio (0,0075% m/v), para auxiliar a quebra das ligações intermoleculares como as ligações dissulfeto. Para facilitar a solubilização da proteína, ajustou-se o pH desta solução para 3,0 com HCl 1 M, e esta foi então aquecida a 45°C durante 20 minutos, sob agitação constante. A concentração de glúten, etanol e pH da solução utilizadas neste trabalho foram escolhidas de acordo com Gontard et al. (1993), que descreveram um procedimento de casting preciso e observaram que esta formulação resultou em um filme resistente, homogêneo e transparente [26].

Posteriormente, adicionou-se Tween 80 (1% v/v) à solução, e esta ficou sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. Nesta etapa, quando necessário, os agentes ativos rodamina (1,5% m/m) ou cloridrato de diltiazem (5% m/m) também foram adicionados à

solução. Para a preparação das microesferas com PEG 400, utilizou-se uma razão glúten/PEG de 95/05 (m/m) e 90/10 (m/m).



**Figura 10.** Representação esquemática das etapas utilizadas na preparação das microesferas de glúten de trigo.

Paralelamente, preparou-se uma solução de óleo mineral com adição de Span 80 (1% v/v) (fase contínua ou externa). O Tween 80 e o Span 80 têm como função estabilizar a dispersão das gotas na forma de emulsão, prevenindo a agregação e a coalescência.

Após a preparação das soluções descritas acima, gotejou-se a solução de polímero (fase interna) na solução de óleo mineral (fase externa) com uma velocidade de agitação de aproximadamente 400 rpm e relação fase interna/fase externa de 10/50 (v/v). Nesta etapa houve a formação de emulsão a/o, em cuja fase interna estão dissolvidos o polímero e o AA. Para a solidificação do polímero contido nas gotículas da fase interna e conseqüente formação

das microesferas, aqueceu-se a solução resultante a 120°C sob agitação constante, durante 4 horas (possibilitando a evaporação da fase interna e reticulação do polímero). Por fim, as microesferas resultantes foram filtradas, lavadas com etanol, secas em estufa (a 40°C por 24 horas) e armazenadas para futuras caracterizações. A Figura 10 mostra as etapas utilizadas para a preparação das microesferas.

### **3.2.2 Morfologia das Microesferas**

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) a superfície de uma amostra ao ser examinada é rastreada por um feixe de elétrons, sendo possíveis ampliações entre 10 e 50000 diâmetros, e grandes profundidades de campo[19].

No presente trabalho, esta técnica foi empregada para analisar a morfologia das microesferas formadas, suas propriedades de superfície, sua porosidade e a distribuição dos agentes ativos nas microesferas. Algumas microesferas foram seccionadas transversalmente para a visualização da estrutura interna das partículas.

O aparelho utilizado foi um microscópio Philips modelo XL 30 com fonte de elétrons de tungstênio e detector de elétrons secundários e retroespalhados pertencente ao Laboratório de Materiais (LabMat) do Departamento de Engenharia Mecânica – Centro Tecnológico da UFSC. As amostras foram cobertas com ouro por *sputtering*, com um aparelho a vácuo Polaron E 5000, antes de efetuar-se as análises.

### **3.2.3 Diâmetro Médio das Microesferas**

O diâmetro médio das microesferas foi determinado por meio de medição das partículas visualizadas nas micrografias obtidas por MEV com aumento de 500x, levando-se em conta o diâmetro de Ferret (média das maiores dimensões em uma dada direção) e utilizando-se de 30 a 40 microesferas.

### 3.2.4 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A maior parte da energia das vibrações moleculares está localizada na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Os átomos ou grupos funcionais têm vibrações características, o que possibilita a sua identificação. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foi utilizada para detectar mudanças nas estruturas secundárias das proteínas e determinar as propriedades da ligação da água, além de possibilitar a avaliação da interação entre o polímero e os agentes ativos testados.

Os espectros vibracionais foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR modelo 16 PC com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  pertencente à Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

### 3.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial fornece valores de propriedades térmicas como a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), a temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a temperatura de cristalização ( $T_c$ ). Além disso, fornece valores de entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e variação da capacidade calorífica ( $\Delta C_p$ ). Portanto, esta técnica é importante para a determinação de possíveis interações existentes entre o polímero e os agentes ativos encapsulados.

Para as análises foi utilizado um aparelho DSC 50 SHIMADZU pertencente à Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. A calorimetria exploratória diferencial das microesferas de glúten e microesferas de Glúten/PEG 95/05 encapsuladas ou não com os agentes ativos em estudo, bem como o DSC dos agentes ativos puros, foram realizados sob atmosfera de nitrogênio (fluxo de  $50\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$ ) a uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ . Aproximadamente 10 mg das amostras foram aquecidas até  $110^\circ\text{C}$  e em seguida sofreram choque térmico. Após esta etapa, as amostras foram novamente aquecidas de  $25^\circ\text{C}$  a  $300^\circ\text{C}$ , sendo que esta segunda varredura foi usada para a determinação dos valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e temperatura de fusão ( $T_m$ ).

### 3.2.6 Eficiência de Encapsulação (EE)

Para determinar a quantidade de agente ativo (rodamina ou cloridrato de diltiazem) contido nas microesferas preparadas, utilizou-se a espectroscopia no UV/VIS. Inicialmente, construiu-se uma curva de calibração (absorbância vs. concentração) com o AA em questão dissolvido em NaOH 0,1M. A curva de calibração foi preparada pesando-se exatos 0,01 g de rodamina ou diltiazem e dissolvendo-os em 100 ml de NaOH 0,1 M (solução de 100 µg/ml). Esta solução foi diluída para obter soluções de rodamina em NaOH 0,1M nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 µg/ml. Para o cloridrato de diltiazem, as concentrações utilizadas foram 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5 µg/ml. Todas as concentrações foram feitas em triplicata.

De posse da curva de calibração dissolveu-se cerca de 10 mg, exatamente pesados, das microesferas com o AA a ser determinado em NaOH 0,1M, e esta solução ficou sob agitação em banho térmico a 37°C durante 24 horas. Após este período, as microesferas foram totalmente dissolvidas, e o AA encapsulado foi transferido para a solução. Procedeu-se então à medida da absorção da solução em espectroscopia de UV/VIS em 554 nm para a rodamina e 238 nm para o cloridrato de diltiazem. Este procedimento foi feito em triplicata, e o aparelho utilizado foi o espectrofotômetro Perkin Elmer UV-VIS 11/BIO Lambda, pertencente ao laboratório POLIMAT, do Departamento de Química da UFSC.

### 3.2.7 Velocidade de Liberação *in vitro* de Agentes Ativos

#### 3.2.7.1 Liberação *in vitro* de Rodamina

Inicialmente, construiu-se uma curva de calibração contendo a rodamina dissolvida em solução tampão fosfato (pH 7,4) nas concentrações 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 µg/ml para futura determinação da concentração de rodamina liberada. Após esta etapa, quantidades conhecidas de microesferas (0,3 g para microesferas de glúten e 0,2 g para microesferas de Glúten/PEG 95/05) contendo em média 1066 e 1080 µg de rodamina encapsulada, respectivamente, foram suspensas em 100 ml de solução de tampão fosfato (pH 7,4) e mantidas sob agitação constante de 150 rpm a 25 e 37°C. Em intervalos de tempo pré-determinados foram retiradas alíquotas de aproximadamente 4 ml do meio de liberação, e

efetuadas leituras das absorvâncias a 554 nm destas amostras em um espectrofotômetro Perkin Elmer UV-VIS 11/BIO Lambda. Após a medição da absorvância, as alíquotas foram devolvidas ao meio de liberação. Todas as medidas foram feitas em triplicata e durante o tempo de experimento foram mantidas as condições sink.

### **3.2.7.1 Liberação *in vitro* de Cloridrato de Diltiazem**

A liberação *in vitro* de cloridrato de diltiazem foi realizada de forma a simular o trânsito no trato gastrointestinal. Desta forma, os testes foram feitos a 37°C, em pH 1,2 (tampão Clark-Lubs) [64] durante 2 horas, para simular as condições de tempo de trânsito estomacal, e em pH 7,4 (tampão fosfato), para simular o trânsito intestinal [65].

Construiu-se uma curva de calibração contendo cloridrato de diltiazem dissolvido em tampão Clark-Lubs e em solução tampão fosfato nas concentrações 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5 e 9,5 µg/ml, para futura determinação da concentração de cloridrato de diltiazem liberado. Adicionou-se então a 100 ml do tampão apropriado 0,3 g de microesferas de glúten e de microesferas de Glúten/PEG 95/05, contendo em média 11720 e 14500 µg de cloridrato de diltiazem encapsulado, respectivamente. As soluções, feitas em triplicata, foram mantidas sob agitação constante de 150 rpm. Em intervalos de tempo pré-determinados foram retiradas alíquotas de 1 ml do meio de liberação. Estas amostras foram diluídas para 10 ml e efetuou-se leituras das absorvâncias a 238 nm destas amostras em um espectrofotômetro Perkin Elmer UV-VIS 11/BIO Lambda. Após a medida, 1 ml da solução diluída foi devolvida ao meio de liberação, para garantir a manutenção das condições sink.

### **3.2.8 Degradação *in vitro* das Microesferas**

Os estudos de degradação química *in vitro* das microesferas de glúten e Glúten/PEG 95/05 foram realizados em meio ácido (pH 1,2 ajustado com HCl 0,1M), meio neutro (solução tampão, pH 7,4) e em meio enzimático (realizado em água contendo a enzima papaína) nas temperaturas de 25 e 37°C. O estudo de degradação enzimática foi baseado em um procedimento descrito por Wang et al. (2007) [66], com algumas modificações. O pH da solução foi ajustado para 6,5 e a razão enzima/substrato utilizada foi de 6000 U/g.

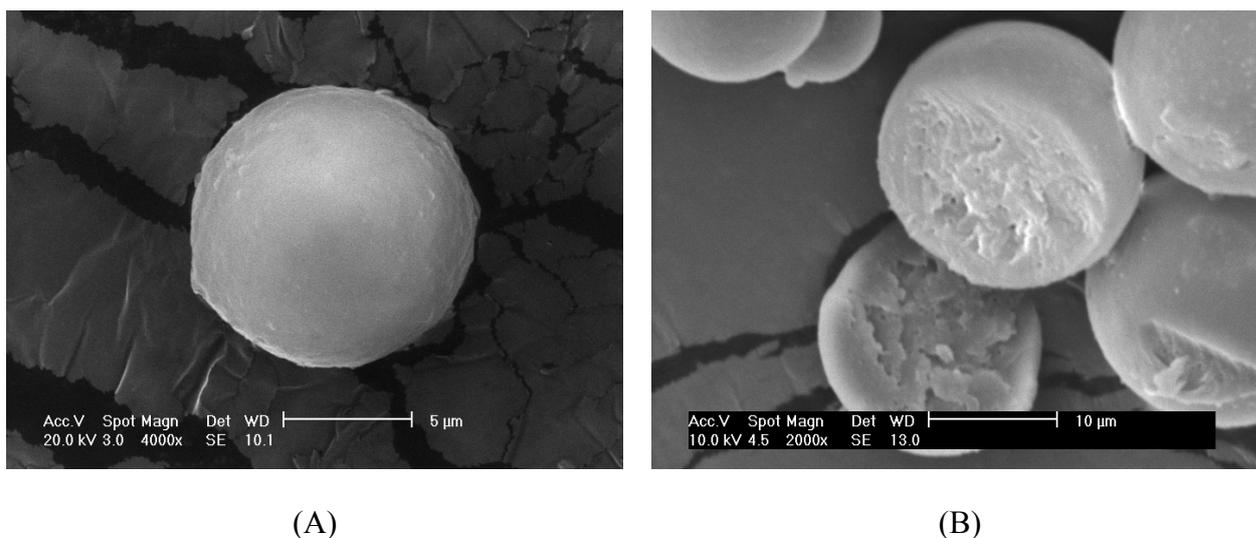
Adicionou-se 10 mg de microesferas em tubos de ensaio contendo 10 ml de cada solução descrita acima, e a cada dia uma amostra de cada meio de degradação foi retirada. As microesferas retiradas foram lavadas e centrifugadas, secas em estufa a 40°C durante 24 horas e levadas em seguida para análise por MEV. Este procedimento foi realizado durante 10 dias.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4.1 Morfologia das Microesferas

Observou-se que utilizando o procedimento de emulsificação/evaporação do solvente foi possível obter partículas perfeitamente esféricas para todas as formulações testadas. Quando esta técnica é aplicada, a rugosidade das microesferas aumenta quanto maior for a velocidade com que ocorre a eliminação do solvente da fase interna da emulsão durante o processo de microencapsulação [67].

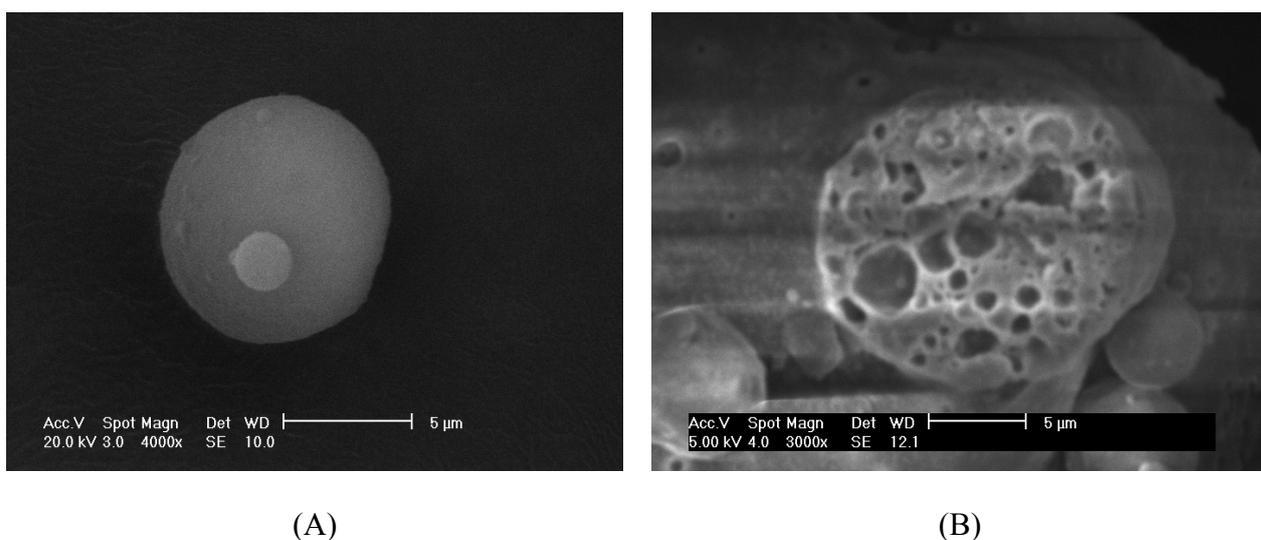
A morfologia das microesferas de glúten de trigo pode ser observada na Figura 11. As superfícies destas microesferas apresentam-se lisas e compactas. Observando-se a fratura para a microesfera de glúten é possível identificar a presença de uma leve rugosidade e pequenos poros no interior das microesferas.



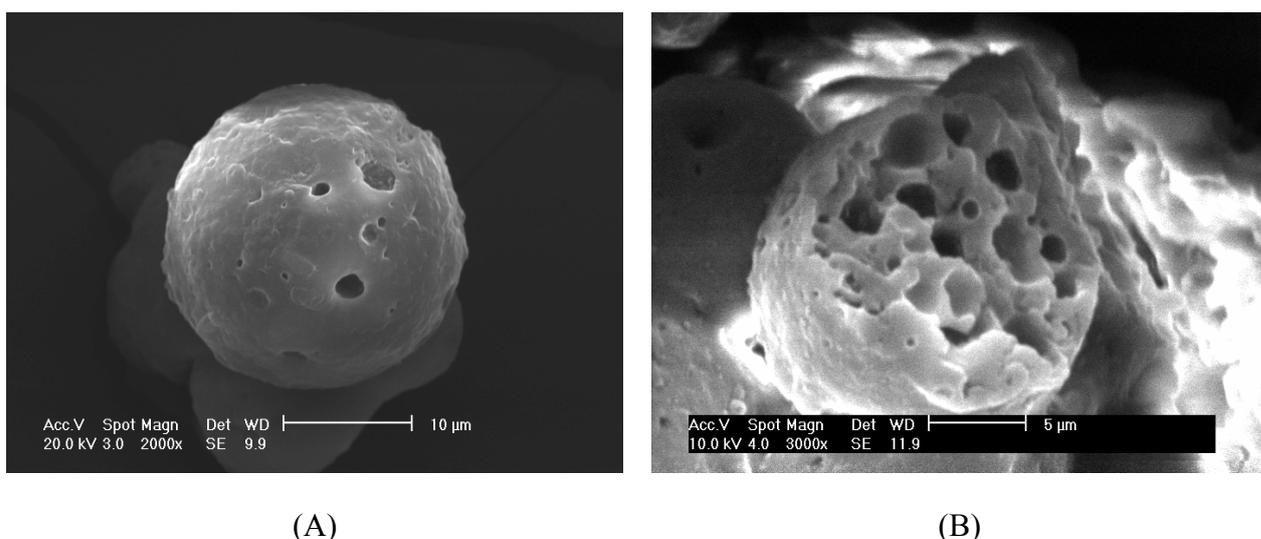
**Figura 11.** Micrografias obtidas por MEV das microesferas de glúten de trigo: (A) superfície, com aumento de 4000x e (B) fratura, com aumento de 2000x.

Nas Figuras 12 e 13 são mostradas as micrografias das microesferas com adição de 5 e 10% de PEG 400, respectivamente. A adição de 5% deste polímero conduziu à formação de partículas apresentando uma superfície lisa, compacta e sem a presença de poros. Observando-se a fratura destas microesferas, vemos que o seu interior apresenta uma grande quantidade de poros de tamanho elevado. As microesferas formuladas com adição de 10% de poli(etileno glicol) mostram uma superfície bastante rugosa, apresentando grande quantidade de poros tanto na superfície quanto na sua fratura. Além disso, as microesferas Glúten/PEG

90/10 apresentaram maior coalescência e aglutinação entre as partículas. Observa-se que a porosidade das partículas estudadas foi aumentada quando o PEG foi adicionado à formulação. Estudos anteriores já demonstraram que o poli(etileno glicol) atua como formador de poros na matriz polimérica, e portanto a adição deste polímero à formulações de microesferas pode ser um fator importante para modular a liberação de agentes ativos encapsulados [68].



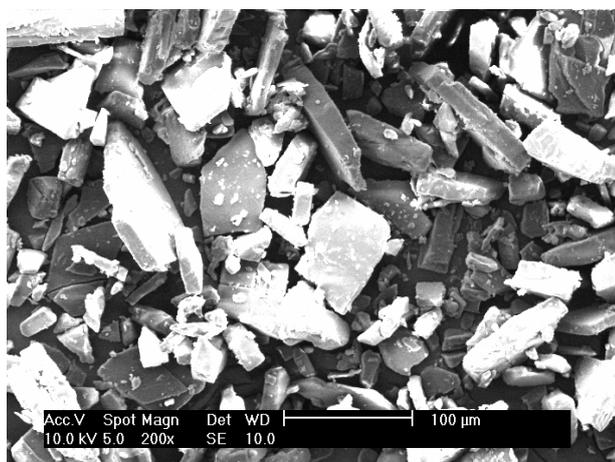
**Figura 12.** Micrografias obtidas por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05: (A) superfície, com aumento de 4000x e (B) fratura, com aumento de 3000x.



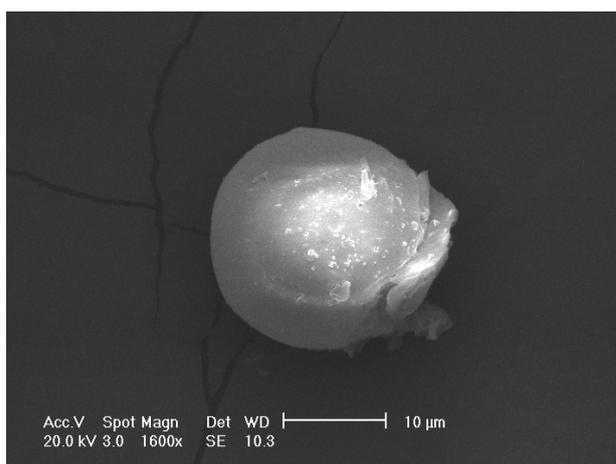
**Figura 13.** Micrografias obtidas por MEV das microesferas de Glúten/PEG 90/10: (A) superfície, com aumento de 2000x e (B) fratura, com aumento de 3000x.

Para os estudos de encapsulação de agentes ativos e liberação *in vitro* a microesfera Glúten/PEG 95/05 foi encolhida, por apresentar uma superfície mais compacta e menor coalescência entre as partículas.

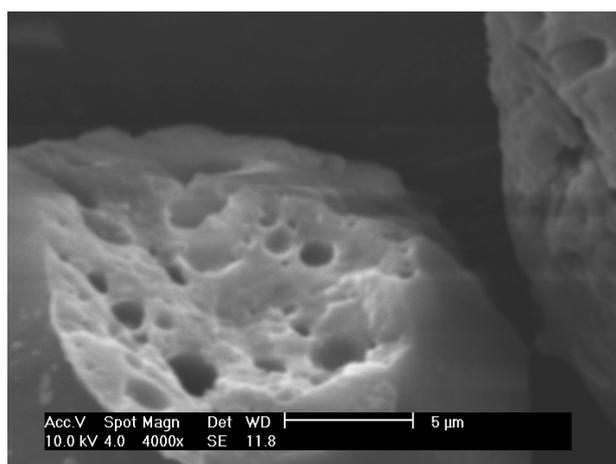
Com o objetivo de caracterizar os cristais de rodamina para posterior identificação nas microesferas de glúten, foram realizadas análises de MEV, cujos resultados são mostrados na Figura 14. Observa-se que estes cristais apresentam um formato irregular e grande variedade de tamanho. Nas Figuras 15 e 16 são apresentadas as micrografias das microesferas de glúten de trigo e de Glúten/PEG 95/05, ambos com a presença de 1,5% de rodamina incorporada.



**Figura 14.** Micrografia obtida por MEV da substância modelo rodamina B, com aumento de 200x.

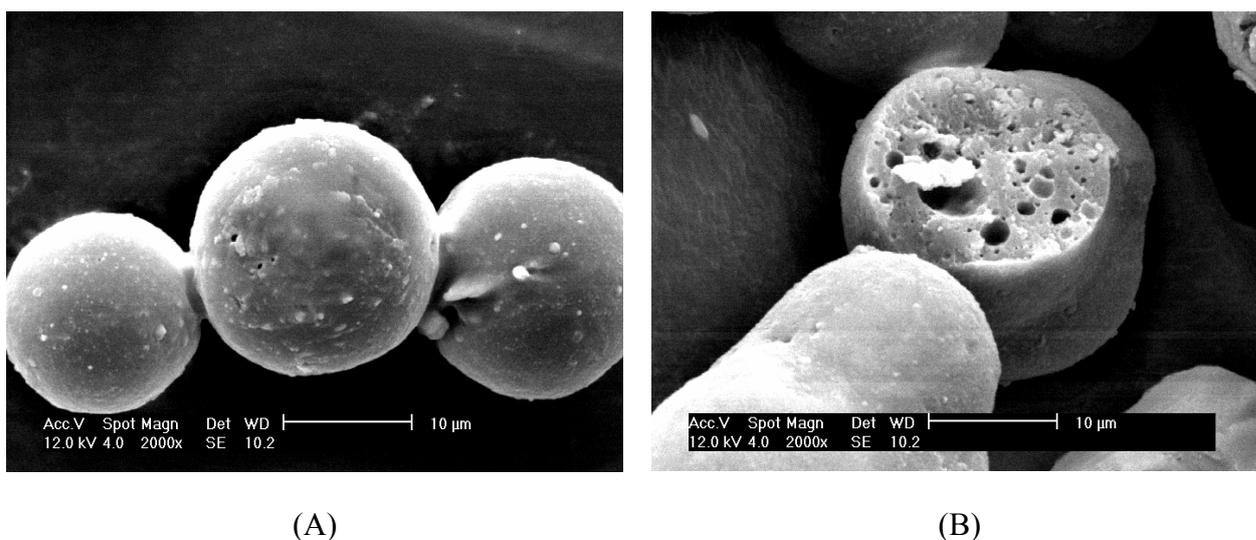


(A)



(B)

**Figura 15.** Micrografias obtidas por MEV das microesferas de glúten de trigo com adição de 1,5% de rodamina: (A) superfície, com aumento de 1600x e (B) fratura, com aumento de 4000x.



**Figura 16.** Micrografias obtidas por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com adição de 1,5% de rodamina: (A) superfície, com aumento de 2000x e (B) fratura, com aumento de 2000x.

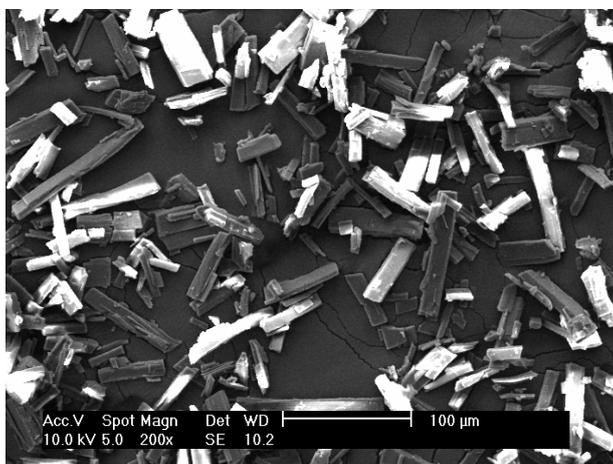
Para as microesferas de glúten com rodamina, observa-se uma superfície lisa e compacta e nota-se a presença de pequenos cristais de rodamina espalhados na superfície das microesferas. A fratura desta amostra apresenta um grande número de poros e não é possível visualizar cristais de rodamina no seu interior. Supõe-se que os cristais de rodamina encontrados na superfície das microesferas são devidos à fração de rodamina que durante a encapsulação sofreram um processo de cristalização e depositaram-se na matriz polimérica. Por outro lado, a rodamina solubilizada na fase interna e posteriormente encapsulada encontra-se dispersa molecularmente na matriz polimérica, não sendo desta forma possível a sua visualização por MEV. Porém, a presença de rodamina no interior das microesferas pode ser confirmada visualmente pela observação da cor rosa, característica da rodamina, presente na superfície e seção transversal das microesferas de glúten, observada durante a etapa de preparação da amostra para a análise por MEV.

As microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina apresentaram a superfície ligeiramente mais rugosa, quando comparadas com as microesferas sem a presença de PEG. Novamente foi possível observar alguns pequenos cristais de rodamina depositados na superfície destas microesferas, bem como a presença de poros. Na seção transversal das microesferas observa-se porosidade e também é possível notar uma pequena quantidade de rodamina cristalizada em seu interior.

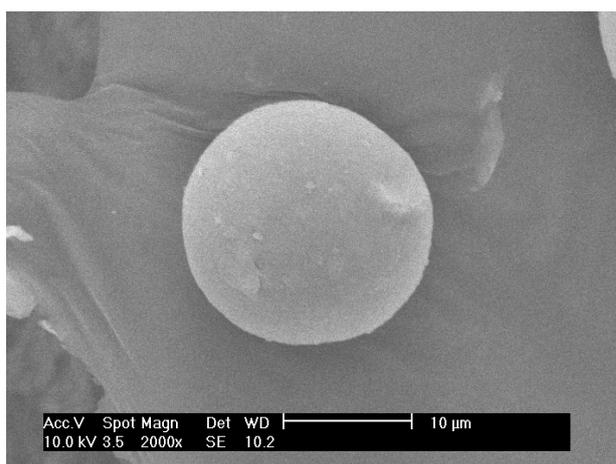
Na Figura 17 é mostrada a micrografia dos cristais de cloridrato de diltiazem puros. Estes cristais apresentam um formato retangular alongado e tamanhos variados. Nas Figuras 18 e 19 estão apresentadas as micrografias para as microesferas de glúten de trigo e Glúten/PEG 95/05, ambos com a presença de 5% de diltiazem.

Para as microesferas de glúten com diltiazem, a superfície apresentou-se bastante lisa e compacta, e a seção transversal desta amostra apresenta bastante rugosidade e pouca porosidade. Nas microesferas com adição de PEG, observa-se que a superfície continua lisa, mas apresenta agora uma pequena quantidade de poros. Percebe-se também um aumento na rugosidade da fratura desta amostra. Para estas duas formulações foi observado um aumento na coalescência quando comparado com as microesferas puras e com rodamina.

Não foram visualizados cristais de diltiazem nem na superfície nem no interior de ambas as amostras, provavelmente devido à elevada solubilidade do diltiazem na fase interna, dispersando-se totalmente na forma molecular na matriz polimérica, o que será futuramente confirmado por DSC e FTIR.



**Figura 17.** Micrografia obtida por MEV do fármaco modelo cloridrato de diltiazem, com aumento de 200x.

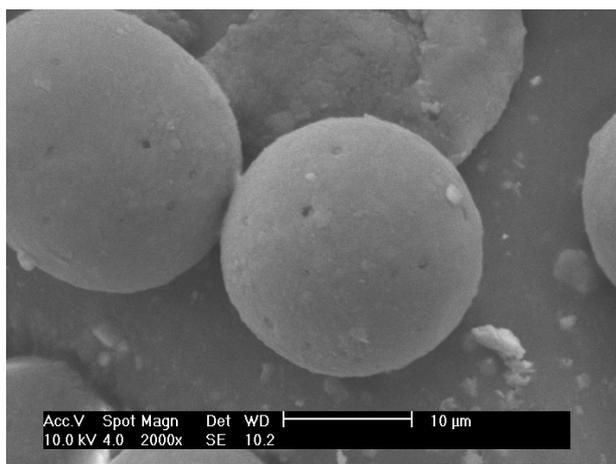


(A)

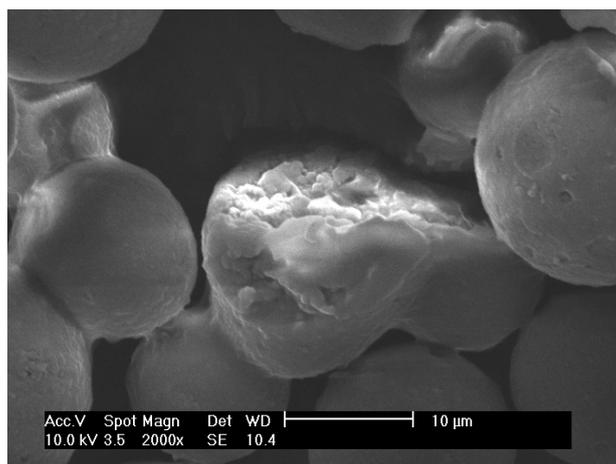


(B)

**Figura 18.** Micrografias obtidas por MEV das microesferas de glúten de trigo com adição de 5% de diltiazem: (A) superfície, com aumento de 2000x e (B) fratura, com aumento de 2000x.



(A)



(B)

**Figura 19.** Micrografias obtidas por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com adição de 5% de diltiazem: (A) superfície, com aumento de 2000x e (B) fratura, com aumento de 2000x.

## 4.2 Diâmetro Médio das Microesferas

O diâmetro médio das microesferas é afetado por diversos fatores, tais como concentração do polímero e viscosidade da fase interna, temperatura, velocidade de agitação e tipo e concentração de estabilizante na fase externa quando as microesferas são preparadas pela técnica de emulsificação/evaporação de solvente [36].

Os valores de diâmetro médio obtidos estão apresentados na Tabela I, e as micrografias utilizadas na determinação destes diâmetros estão mostradas nas Figuras 20 a 26.

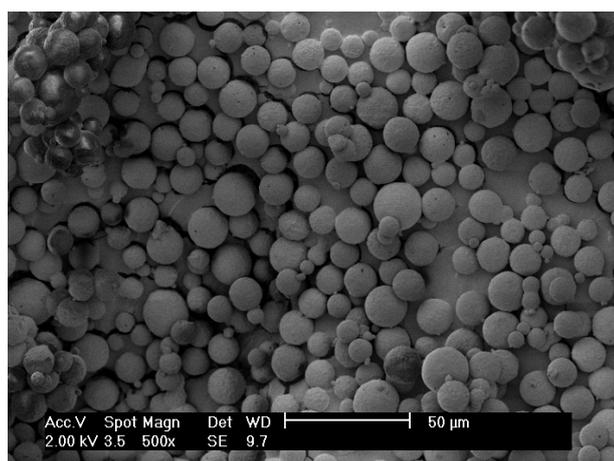
Comparando-se as microesferas de glúten de trigo puras com as microesferas preparadas com a adição de 5% de PEG, percebe-se uma redução no diâmetro médio das partículas, de aproximadamente 14,00  $\mu\text{m}$  para 9,86  $\mu\text{m}$ . Este diâmetro reduz-se mais ainda quando são observadas as microesferas com adição de 10% de poli(etileno glicol), que medem 8,76  $\mu\text{m}$ . Este resultado deve-se principalmente à menor concentração de polímero na fase interna, pois se observa uma diminuição progressiva do diâmetro médio quando a concentração de polímero nas microesferas passa de 100% para 95 e 90% nas microesferas de Glúten/PEG.

Observa-se que com a adição de 1,5% de rodamina às microesferas houve um grande aumento no diâmetro médio, de 14,00  $\mu\text{m}$  para 24,80  $\mu\text{m}$ . Este efeito pode ser devido à hidrofilicidade da rodamina que, durante a etapa de evaporação da fase interna, tende a migrar para a superfície das microesferas junto com a água, levando consigo material polimérico e, desta maneira, aumentando o diâmetro das microesferas. O diâmetro médio das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina (18,00  $\mu\text{m}$  aproximadamente) é menor quando comparado com as microesferas com rodamina encapsulada e sem a presença de PEG, mas é maior que as microesferas de glúten de trigo puras e Glúten/PEG 95/05. Podemos sugerir através desta observação que, apesar do PEG colaborar na diminuição do diâmetro médio das microesferas devido à diminuição da concentração de polímero na fase interna, ocorre um aumento no tamanho das microesferas devido à migração da rodamina para a superfície.

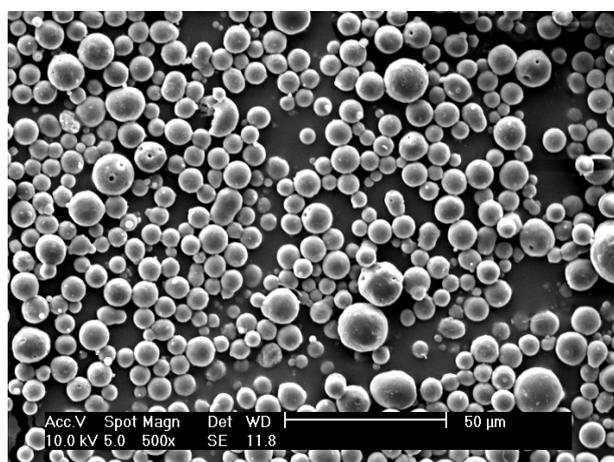
Para as microesferas encapsuladas com diltiazem, observa-se praticamente o mesmo diâmetro médio, seja para a formulação sem PEG (16,86  $\mu\text{m}$ ) ou para as microesferas preparadas com adição de PEG (17,00  $\mu\text{m}$ ). Este resultado indica que o PEG não é o fator determinante no tamanho das microesferas, e sim a presença do agente ativo. Com base nos resultados obtidos para as microesferas com rodamina e com diltiazem encapsulados, e sabendo-se que estas duas substâncias são hidrofílicas, podemos sugerir que o diltiazem apresenta maior interação com a matriz polimérica quando comparado com a rodamina, e desta forma migra em menor quantidade para a superfície, carregando desta forma menos material polimérico e resultando em microesferas com diâmetros médios menores.

**Tabela I.** Valores obtidos na determinação do diâmetro médio.

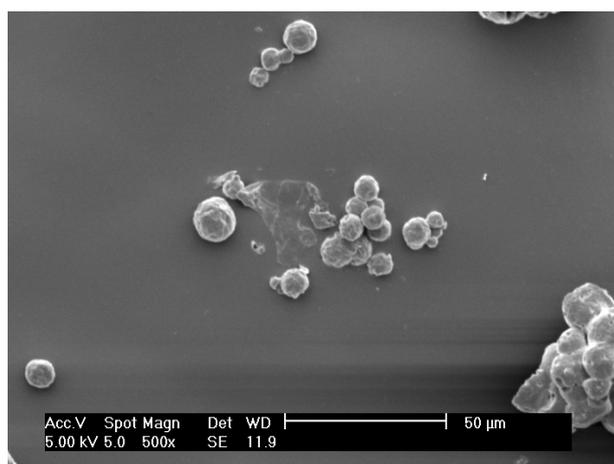
<b>Microesfera</b>	<b>Diâmetro Médio <math>\pm</math> Desvio Padrão (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
Glúten de Trigo	$13,99 \pm 1,72$
Glúten/PEG 95/05	$9,86 \pm 2,44$
Glúten/PEG 90/10	$8,76 \pm 1,97$
Glúten com 1,5% de rodamina	$24,80 \pm 4,09$
Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina	$17,98 \pm 2,34$
Glúten com 5% de diltiazem	$16,86 \pm 1,91$
Glúten/PEG 95/05 com 5% de diltiazem	$17,00 \pm 0,91$



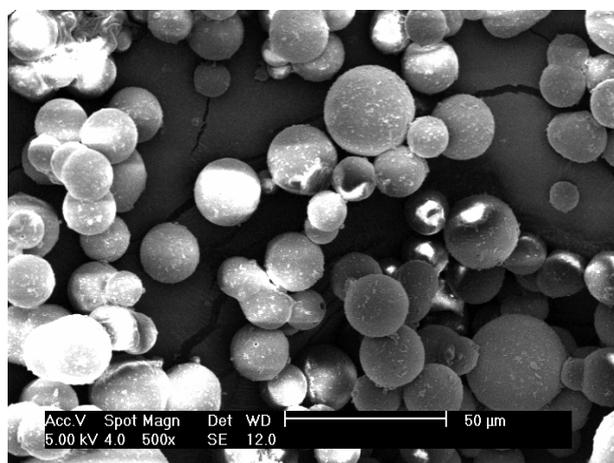
**Figura 20.** Micrografia obtida por MEV das microesferas de glúten de trigo puras com aumento de 500x.



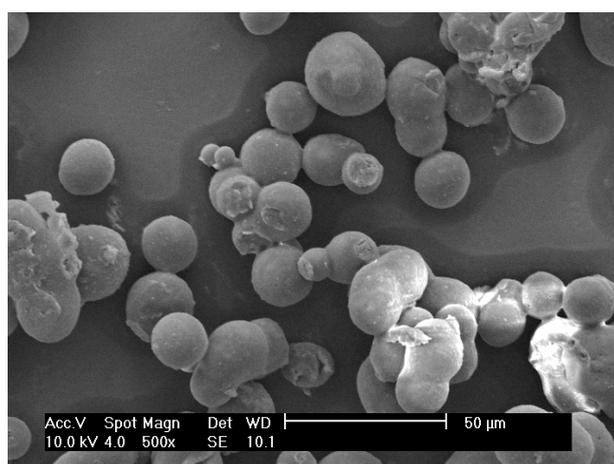
**Figura 21.** Micrografia obtida por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com aumento de 500x.



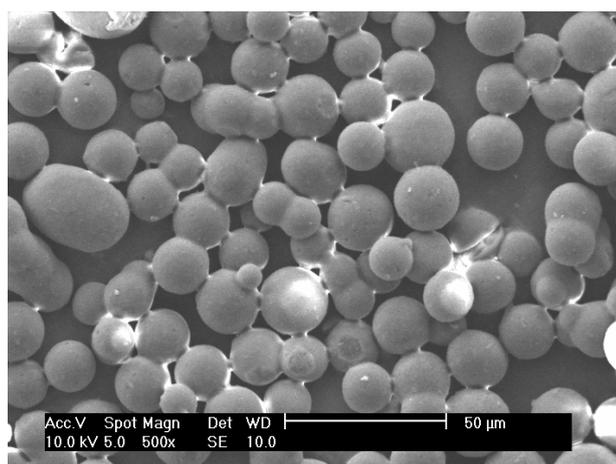
**Figura 22.** Micrografia obtida por MEV das microsferas de Glúten/PEG 90/10 com aumento de 500x.



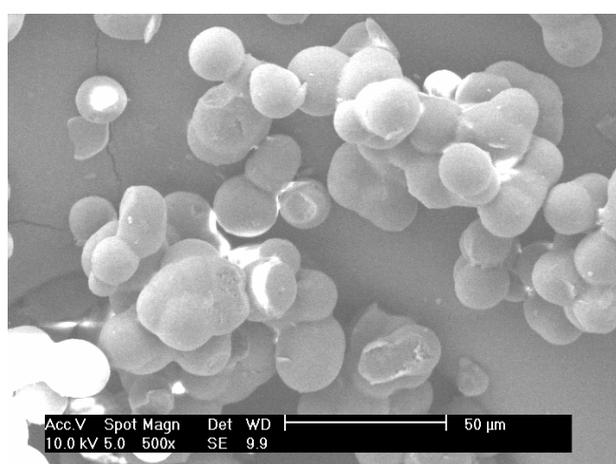
**Figura 23.** Micrografia obtida por MEV das microsferas de glúten de trigo com 1,5% de rodamina com aumento de 500x.



**Figura 24.** Micrografia obtida por MEV das microsferas de Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina com aumento de 500x.



**Figura 25.** Micrografia obtida por MEV das microesferas de glúten de trigo com 5% de diltiazem com aumento de 500x.



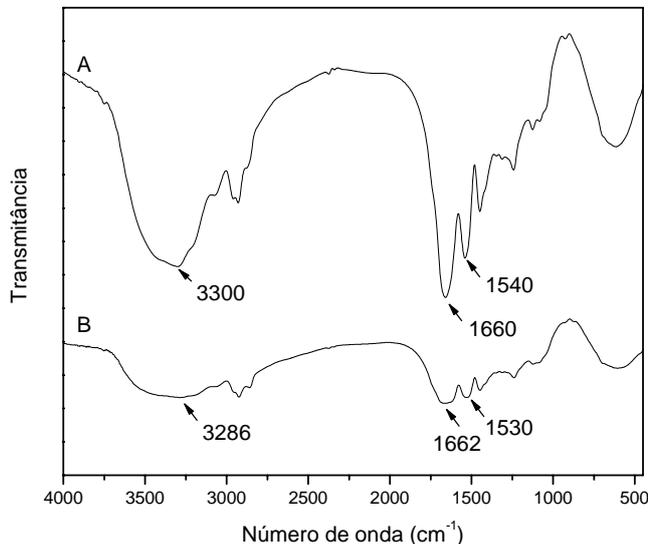
**Figura 26.** Micrografia obtida por MEV das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 5% de diltiazem com aumento de 500x.

### **4.3 Espectroscopia no Infravermelho**

Na Figura 27 são mostrados os espectros de FTIR para o pó de glúten de trigo, anterior à formação das microesferas, e para as microesferas de glúten de trigo após a preparação. No espectro do pó de glúten de trigo, é possível observar algumas bandas características desta proteína, como em  $1660\text{ cm}^{-1}$ , relacionada à frequência da banda de amida I. Esta banda é relativa ao estiramento vibracional das ligações C=O, fracamente ligadas ao estiramento C-N e N-H [69,70]. Também observa-se uma banda em  $1540\text{ cm}^{-1}$ , associada à frequência da banda de amida II (deformação N-H). É observada também uma banda larga e intensa na

região de 3460 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ , provavelmente resultado de uma sobreposição das vibrações de estiramento dos grupos N-H e O-H, porém estudos encontrados na literatura afirmam que esta banda de absorção larga observada é principalmente relacionada ao estiramento de OH da água presente na proteína [25].

Comparando-se o espectro das microesferas de glúten com o espectro obtido para o glúten em pó, observa-se um deslocamento na banda relacionada a vibração de estiramento de OH para um número de onda menor, significando que houve uma diminuição de grupos OH livres na amostra, provavelmente devido à formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de glúten. Embora não tenha sido observado nenhum deslocamento efetivo da banda de amida I, nota-se um deslocamento de 10  $\text{cm}^{-1}$  para a banda de amida II. Mudanças na frequência da banda de amida II, assim como para a banda de amida I, foram anteriormente correlacionadas com mudanças na estrutura secundária das proteínas [25]. Além disso, observa-se um pequeno deslocamento na banda de estiramento de  $-\text{CH}_3$ , de 2930  $\text{cm}^{-1}$  para o pó de glúten para 2924  $\text{cm}^{-1}$  para as microesferas de glúten. Com isso admite-se uma mudança estrutural ocorrida durante a formação das micropartículas em relação ao pó de glúten inicial.



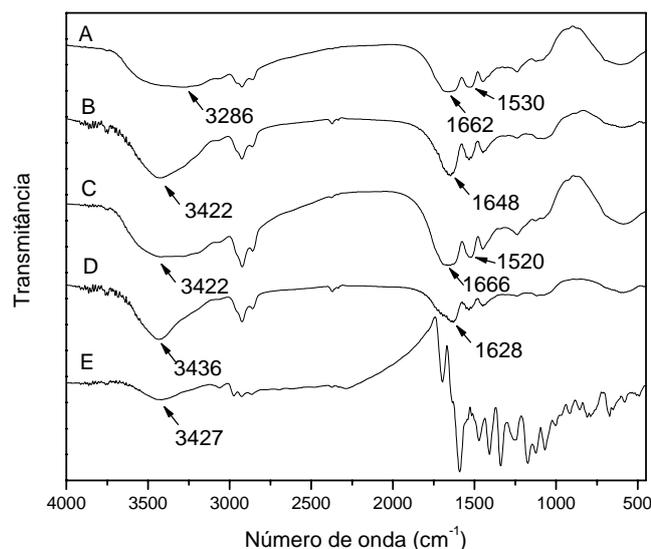
**Figura 27.** Espectros de infravermelho de: (A) glúten em pó, anterior a preparação das microesferas e (B) microesferas de glúten de trigo.

Os espectros de infravermelho obtidos para as microesferas preparadas com e sem adição de PEG e rodamina estão apresentados na Figura 28. Observando-se o espectro obtido para as microesferas de Glúten/PEG 95/05 e comparando-o com o espectro das microesferas

de glúten puras, nota-se que houve um deslocamento expressivo na banda de estiramento do OH, de  $3286\text{ cm}^{-1}$  para a microesfera de glúten pura para  $3422\text{ cm}^{-1}$  para a microesferas de Glúten/PEG 95/05, sugerindo a presença de mais grupos OH livres nesta última estrutura. Outro grande deslocamento é observado na banda referente à carbonila, de  $1662$  para  $1648\text{ cm}^{-1}$ . Estes deslocamentos indicam que o PEG está presente nas microesferas e interagindo com a matriz de glúten.

No espectro C da Figura 28 são mostradas as bandas de absorção no infravermelho para as microesferas com rodamina encapsulada. São observadas bandas relacionadas ao glúten em  $1666\text{ cm}^{-1}$  (amida I),  $1520\text{ cm}^{-1}$  (amida II) e em  $1448\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O). Por outro lado, as principais bandas relacionadas à rodamina, em  $1695\text{ cm}^{-1}$  (vibração C=O da rodamina) e em  $1590\text{ cm}^{-1}$  (atribuída a vibração do grupo C=N), não foram observadas no espectro das microesferas com rodamina encapsulada. Embora não tenha sido possível observar bandas características da rodamina, provavelmente porque esta se encontra em pequena quantidade nas microesferas, foi possível identificar alguns deslocamentos nas microesferas de glúten com rodamina em comparação com as microesferas puras, o que pode indicar alguma interação entre o agente ativo e a matriz de glúten. Por exemplo, a banda de amida II se deslocou de  $1530$  para  $1520\text{ cm}^{-1}$ , e nota-se também um deslocamento de  $3286$  para  $3422\text{ cm}^{-1}$  da banda de estiramento de OH.

O espectro das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com adição de 1,5% de rodamina apresenta bandas relacionadas ao glúten em  $1628$ ,  $1534$  e em  $1448\text{ cm}^{-1}$ , e novamente não foi possível observar picos característicos da rodamina em virtude de sua pequena quantidade nas microesferas, a exemplo das microesferas com rodamina e sem adição de PEG. A presença de interações entre os componentes deste sistema é confirmada pela mudança ocorrida nas bandas de OH,  $3286\text{ cm}^{-1}$  para a microesfera de glúten,  $3422\text{ cm}^{-1}$  para as microesferas de glúten com PEG e  $3436\text{ cm}^{-1}$  para as microesferas Glúten/PEG com rodamina. O mesmo ocorre com as bandas de amida I, que apresentaram um deslocamento considerável de  $1662\text{ cm}^{-1}$  para as microesferas de glúten, para  $1648\text{ cm}^{-1}$  para as microesferas de glúten com PEG e chegando a  $1628\text{ cm}^{-1}$  para o sistema contendo PEG e rodamina.

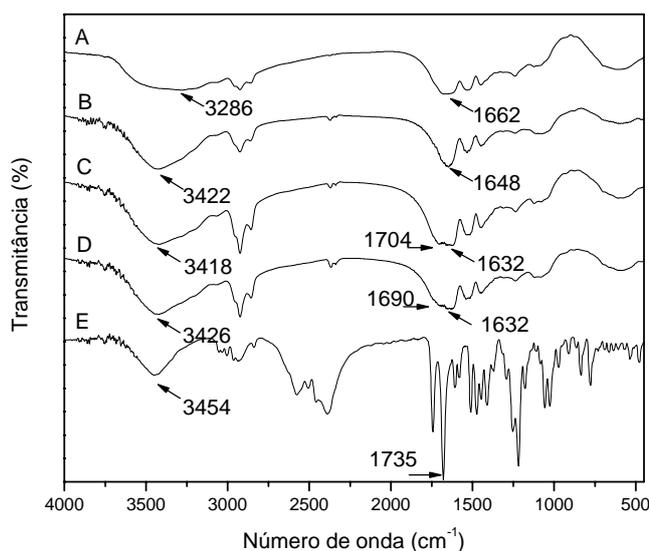


**Figura 28.** Espectros de infravermelho de: (A) microesferas de glúten de trigo, (B) Glúten/PEG 95/05, (C) microesferas com 1,5% de rodamina, (D) microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina, (E) rodamina pura.

Na Figura 29 estão apresentados os espectros de FTIR obtidos para as microesferas com e sem a presença de PEG e diltiazem. O espectro C apresenta as bandas de absorção no infravermelho para as microesferas com diltiazem encapsulado. A banda de estiramento de OH deslocou-se de  $3286\text{ cm}^{-1}$  (microesferas de glúten), para  $3418\text{ cm}^{-1}$  para as microesferas com diltiazem, indicando um aumento no número de OH livres no sistema. Além disso, observam-se mudanças nas frequências das bandas de absorção de amida I ( $1662$  para  $1632\text{ cm}^{-1}$ ) e amida II ( $1530$  para  $1516\text{ cm}^{-1}$ ), indicando que o diltiazem promove interações com o glúten e possivelmente modifica sua estrutura secundária. Nota-se também neste espectro o surgimento de uma banda em  $1704\text{ cm}^{-1}$  que não existia no espectro das microesferas de glúten, mas que aparece no espectro E, do diltiazem puro, relacionado ao estiramento da carbonila do fármaco ( $1735\text{ cm}^{-1}$ ). É importante ressaltar que o diltiazem presente nas formulações estudadas encontra-se disperso molecularmente na matriz de glúten, portanto sua determinação foi possível apenas utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho, não sendo possível a sua visualização por MEV ou DSC.

No espectro D da Figura 29 pode-se observar as bandas de absorção das microesferas de Glúten/PEG 95/05 com adição de 5% de diltiazem. Este espectro apresenta bandas relacionadas ao glúten em  $1632$ ,  $1536$  e em  $1452\text{ cm}^{-1}$ . Novamente, é possível observar uma

banda em  $1690\text{ cm}^{-1}$  relacionada ao diltiazem, comprovando a sua presença nas microesferas. A interação entre os componentes deste sistema pode ser comprovada principalmente pelo deslocamento da frequência de absorção da banda de amida I ( $1662\text{ cm}^{-1}$  para microesferas de glúten,  $1648\text{ cm}^{-1}$  para microesferas de Glúten/PEG 95/05 e  $1632\text{ cm}^{-1}$  para microesferas de Glúten/PEG com diltiazem) e da banda relacionada ao estiramento C-O ( $1448, 1448$  e  $1453\text{ cm}^{-1}$  para microesferas de glúten, Glúten/PEG e Glúten/PEG com diltiazem, respectivamente). Outra evidência da interação entre glúten e diltiazem é o deslocamento da banda de C=O do diltiazem, de  $1735\text{ cm}^{-1}$  para o diltiazem puro, para  $1690\text{ cm}^{-1}$  para a microesfera com PEG e diltiazem.

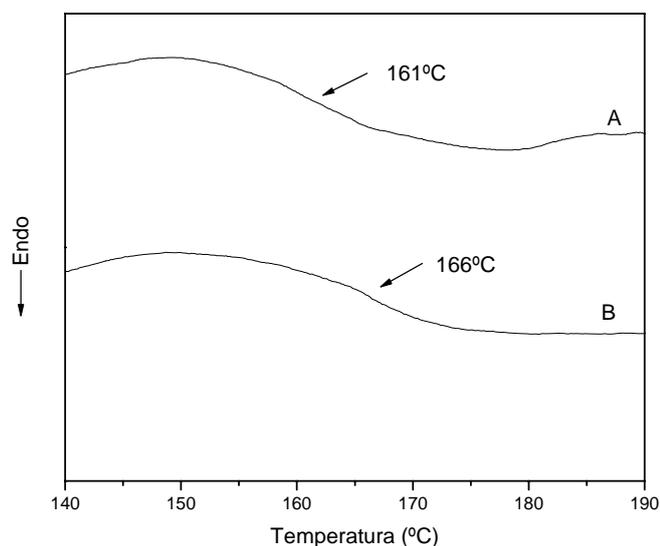


**Figura 29.** Espectros de infravermelho de: (A) microesferas de glúten de trigo, (B) Glúten/PEG 95/05, (C) microesferas com 5% de diltiazem, (D) microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 5% de diltiazem, (E) diltiazem puro.

#### **4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial**

A análise por DSC das microesferas preparadas permite determinar o estado físico do polímero e agentes ativos antes e após a preparação das microesferas, bem como verificar possíveis interações entre os componentes.

Na Figura 30 são apresentadas as curvas de DSC obtidas para o pó de glúten de trigo (antes de sua utilização na formação de microesferas) e para as microesferas de glúten de trigo. Observa-se que a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) aumentou de 161°C, para o glúten em pó, para 166°C para as microesferas de glúten, sugerindo a ocorrência de uma pequena mudança estrutural do sistema (pequeno aumento na rigidez). Além disso, observou-se uma diminuição no valor da variação de capacidade calorífica ( $\Delta C_p$ ) para as microesferas de glúten em comparação com o pó de glúten. Admite-se em geral que a  $T_g$  aumenta e o  $\Delta C_p$  diminui quando ligações cruzadas se formam em um sistema, restringindo a mobilidade e aumentando a rigidez das cadeias poliméricas [28]. Desta forma, pode-se concluir que as microesferas de glúten, após o tratamento térmico ocorrido durante a sua preparação, sofreram um processo de reticulação.



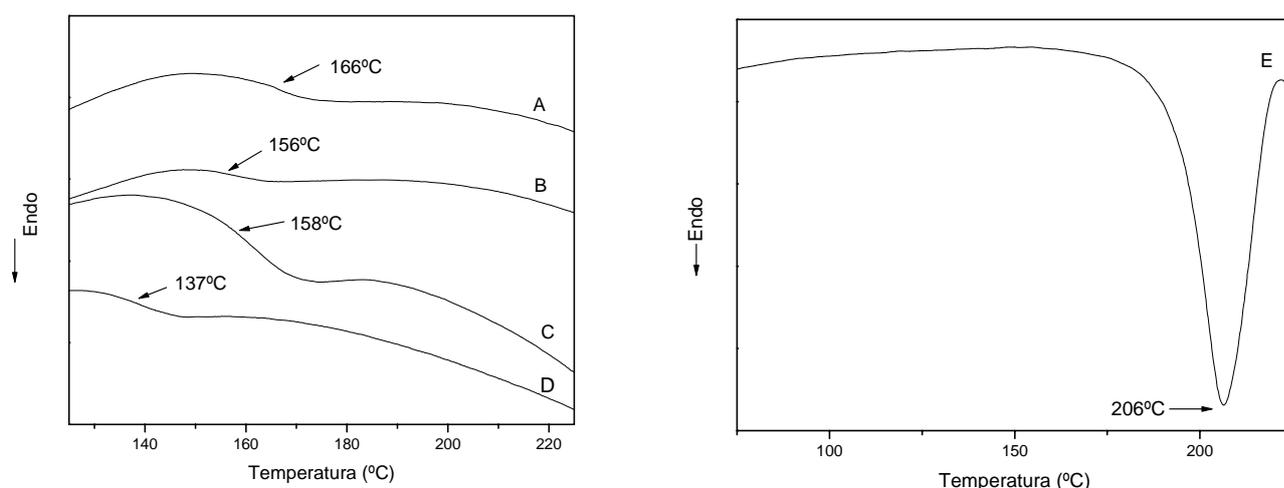
**Figura 30.** Curvas de DSC obtidas para: (A) glúten de trigo em pó, anterior a formação de microesferas, e (B) microesferas de glúten de trigo.

A Figura 31 apresenta uma comparação entre as curvas de DSC das microesferas de glúten com e sem adição de PEG ou de rodamina em sua composição, além de apresentar a curva de DSC para a rodamina pura. A rodamina apresenta um pico endotérmico bem definido em 206°C, referente a temperatura de fusão ( $T_m$ ), mostrando portanto característica cristalina. Nenhuma das microesferas estudadas apresenta um pico característico de fusão, apenas eventos térmicos referentes à  $T_g$ , indicado que o material estudado é em grande parte amorfo.

Observou-se ainda que com a adição de 5% de PEG às microesferas, a  $T_g$  diminuiu de 166°C para 156°C. Este resultado já era esperado, tendo em vista que o poli(etileno glicol) é uma molécula de baixa massa molar que atua como plastificante e, como tal, possui a característica de se colocar entre as cadeias poliméricas, reduzindo as interações polímero-polímero e facilitando, em consequência, a mobilidade das cadeias.

As microesferas com 1,5% de rodamina e sem a adição de PEG também apresentaram uma redução na  $T_g$  (para 158°C) em comparação com as microesferas de glúten de trigo puras. Este resultado sugere que as moléculas de rodamina estão localizadas entre as cadeias poliméricas, aumentando a sua mobilidade e em consequência reduzindo o valor de  $T_g$  das microesferas. Não foi observado nenhum pico endotérmico relacionado à fusão da rodamina, provavelmente devido a pequena quantidade deste corante presente nas microesferas e também devido ao fato da rodamina possivelmente estar dispersa molecularmente na matriz de glúten, não se apresentando portanto em sua forma cristalina.

Para as microesferas preparadas com 5% de PEG e 1,5% de rodamina, observou-se uma  $T_g$  em 137°C, uma diminuição de 29°C quando comparado com as microesferas de glúten puras. Esta diminuição na  $T_g$  é provavelmente devido ao efeito combinado da adição de PEG e rodamina, sendo que estas duas substâncias, como já discutido anteriormente, possuem a propriedade de se localizar entre as cadeias poliméricas aumentando desta forma a mobilidade do sistema.

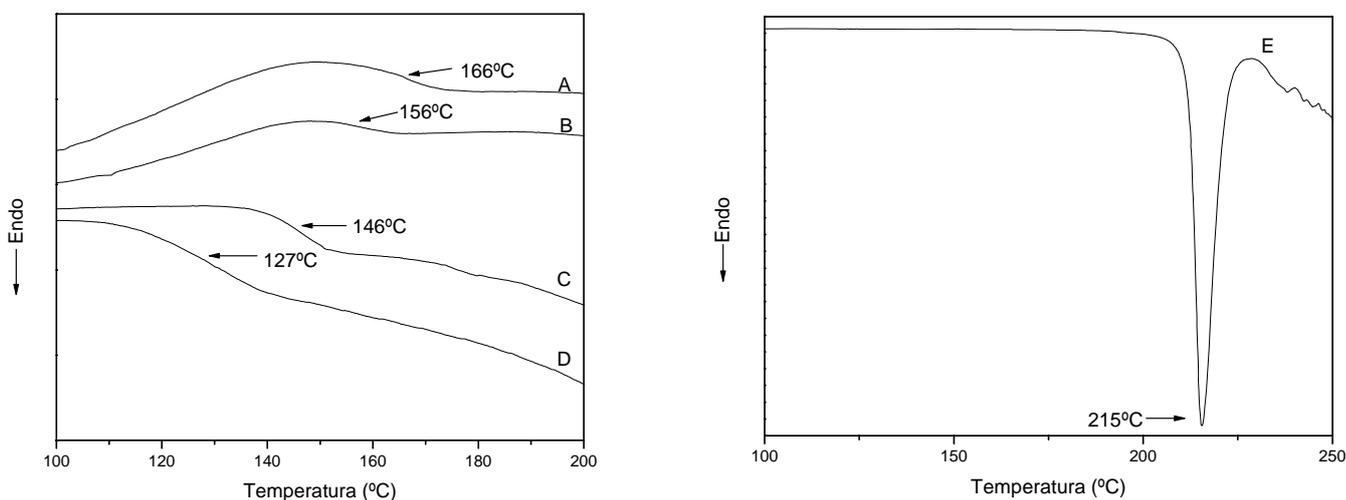


**Figura 31.** Curvas de DSC obtidas para: (A) microesferas de glúten de trigo, (B) microesferas Glúten/PEG 95/05, (C) microesferas de glúten de trigo com 1,5% de rodamina, (D) microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 1,5% de rodamina e (E) rodamina pura.

Na Figura 32 são comparadas as microesferas de glúten com e sem adição de PEG e com e sem a presença de diltiazem na formulação, além de apresentar a curva de DSC obtida para o diltiazem puro. Observa-se que o diltiazem possui uma característica cristalina, comprovada pelo pico endotérmico bem definido em 215°C, referente à temperatura de fusão. Novamente, as microesferas estudadas não apresentaram nenhum pico característico de fusão, indicado que o material estudado é em sua maioria amorfo.

As microesferas com 5% de diltiazem e sem a adição de PEG apresentaram uma  $T_g$  em 146°C, uma diminuição de 20°C quando comparadas com as microesferas de glúten de trigo puras. Este resultado indica que o diltiazem apresenta um efeito plastificante nas microesferas de glúten, colocando-se entre as cadeias e reduzindo as interações poliméricas. Portanto, espera-se neste caso que, a exemplo do que aconteceu com a rodamina, o diltiazem esteja disperso molecularmente na matriz de glúten. De fato, nenhum pico endotérmico relacionado à fusão do diltiazem foi observado.

As microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 5% de diltiazem apresentaram uma  $T_g$  em 127°C. Novamente sugere-se que esta diminuição na  $T_g$  é resultado de uma combinação da ação do PEG como plastificante e do efeito plastificante do diltiazem, ambos se inserindo entre as cadeias poliméricas e ocasionando o aumento da mobilidade do sistema.



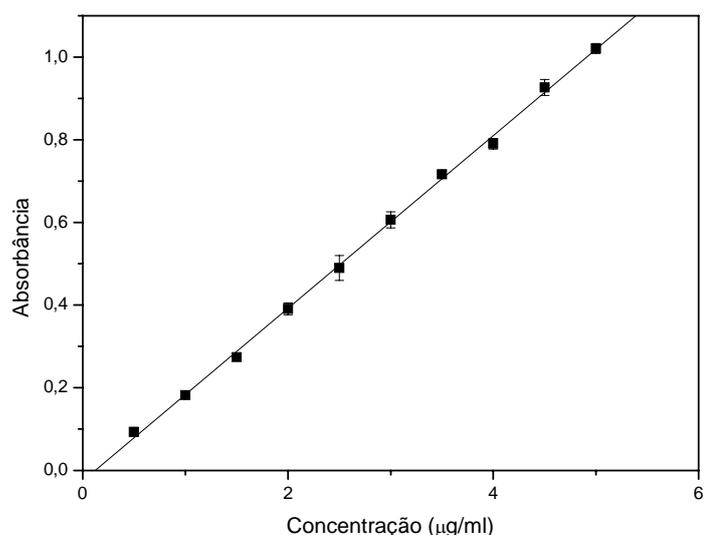
**Figura 32.** Curvas de DSC obtidas para: (A) microesferas de glúten de trigo, (B) microesferas Glúten/PEG 95/05, (C) microesferas de glúten de trigo com 5% de diltiazem, (D) microesferas de Glúten/PEG 95/05 com 5% de diltiazem e (E) diltiazem puro.

## **4.5 Eficiência de Encapsulação**

A eficiência de encapsulação das formulações testadas foi determinada conforme descrito no item 3.2.4. As curvas de calibração para determinação tanto da eficiência de encapsulação como da quantidade de substância ativa liberada são mostradas nas Figuras 33 (rodamina) e 34 (cloridrato de diltiazem). Observa-se que ambas as curvas apresentaram um valor de coeficiente de correlação satisfatório, 0,9994 (rodamina) e 0,9983 (diltiazem), indicando boa confiabilidade na utilização das mesmas.

A partir da curva de calibração calculou-se a eficiência de encapsulação. Para as microesferas de glúten de trigo com rodamina encapsulada obteve-se uma EE de  $23,59\% \pm 1,94$ . Para as microesferas de Glúten/PEG 95/05, a eficiência de encapsulação foi de  $34,21\% \pm 4,08$ . Estes valores são relativamente baixos, porém estão em concordância com os resultados encontrados na literatura para outros sistemas [43,60]. Berkland et al., por exemplo, prepararam microesferas de poli(anidrido sebácico) e obtiveram uma eficiência de encapsulação de rodamina de 21 a 31%.

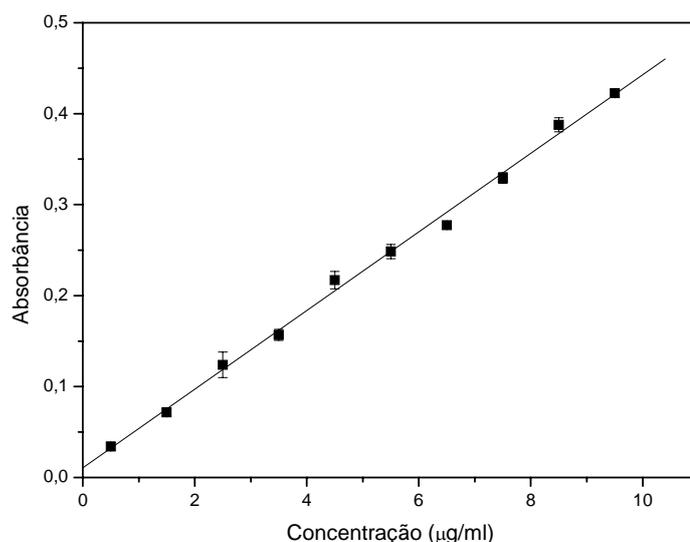
A baixa eficiência de encapsulação da rodamina em microesferas de glúten deve-se, provavelmente, à solubilidade do corante em água, que tende a migrar para a superfície da microesfera juntamente com a água durante o processo de emulsificação e evaporação da fase interna. Sugere-se que esta migração acontece com certa facilidade principalmente porque não ocorre uma interação efetiva entre a rodamina e o glúten, tendo-se a presença apenas de um processo de adsorção do corante na matriz polimérica. Para as microesferas com PEG a eficiência de encapsulação foi maior provavelmente porque, como observado através de MEV, estas partículas apresentaram maior porosidade, e portanto maior área superficial para incorporar a rodamina. Já as microesferas sem PEG apresentaram a superfície e interior mais compactos, dificultando desta forma a presença de rodamina.



**Figura 33.** Curva de calibração de rodamina em NaOH 0,1M ( $R^2=0,9994$ ).

A eficiência de encapsulação de cloridrato de diltiazem em microesferas de glúten de trigo foi de  $72,82\% \pm 1,85$ . Já para as microesferas de Glúten/PEG 95/05, a EE encontrada foi de  $96,67\% \pm 3,56$ . Os valores de EE obtidos para o diltiazem são muito maiores que os obtidos para a encapsulação de rodamina, o que pode ser resultado da maior interação existente entre o diltiazem e a matriz de glúten de trigo quando comparado com a interação entre glúten e rodamina, conforme já observado através das técnicas de DSC e FTIR. Devido a esta interação existente o cloridrato de diltiazem, mesmo apresentando elevada solubilidade em água, se mantém na matriz de glúten durante a etapa de evaporação do solvente.

Novamente, observou-se que para as microesferas com PEG a eficiência de encapsulação foi maior em comparação com as microesferas sem a presença de PEG. Este resultado sugere que as partículas com a presença de PEG apresentaram maior porosidade, e portanto maior área superficial para incorporar o diltiazem.



**Figura 34.** Curva de calibração de cloridrato de diltiazem em NaOH 0,1M ( $R^2=0,9983$ ).

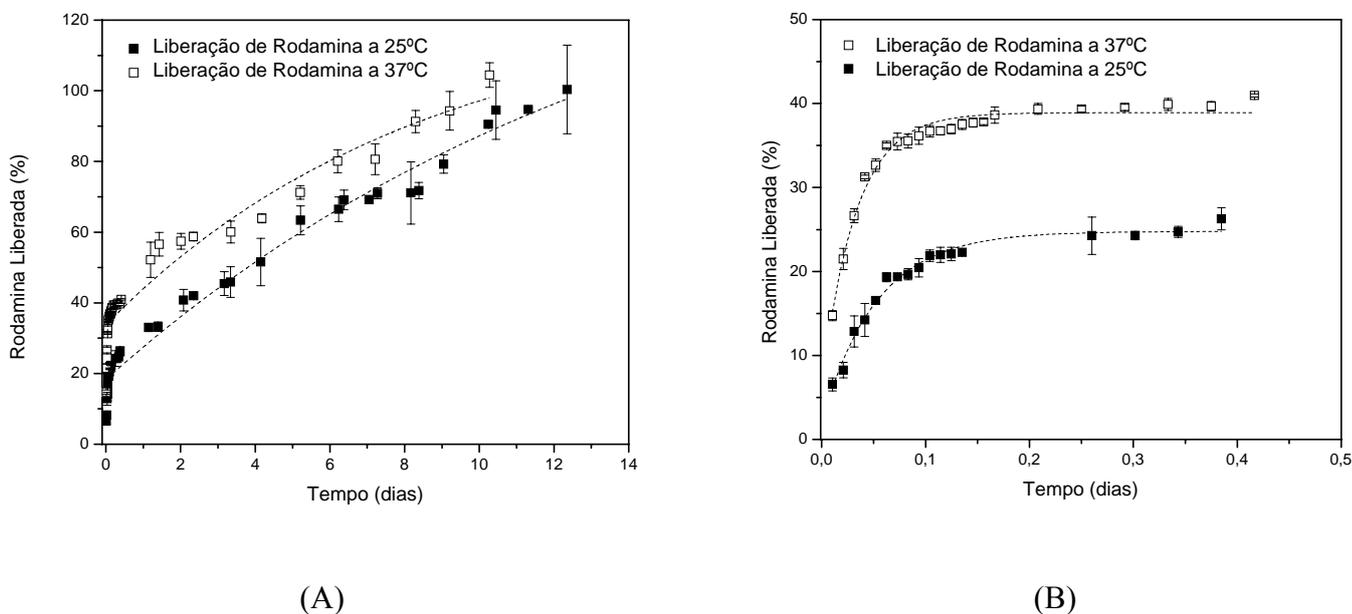
## **4.6 Velocidade de Liberação *in vitro* de Agentes Ativos**

### **4.6.1 Liberação *in vitro* de rodamina**

As Figuras 35 e 36 apresentam os perfis de liberação *in vitro* de rodamina a 25 e 37°C para as microesferas de glúten de trigo e Glúten/PEG 95/05, respectivamente. Enquanto nas figuras 35A e 36A é mostrada a liberação praticamente total da rodamina, as figuras 35B e 36B representam a liberação de rodamina somente para as primeiras 12 horas de testes.

Para o sistema de microesferas de glúten de trigo, constatou-se que toda a rodamina presente nas microesferas foi liberada após 12 dias para o sistema testado a 25°C, e após 10 dias para o sistema a 37°C. No ensaio realizado a 25°C, 50% da rodamina foi liberada em aproximadamente 4 dias. Para o mesmo sistema a 37°C, este tempo reduziu para aproximadamente 2 dias de liberação. Tipicamente é observado, nesta comparação, um efeito da temperatura na liberação da rodamina em microesferas de glúten. Este efeito é mais claramente observado na Figura 35B, e está aparentemente relacionado ao fato de que a 37°C a degradação das microesferas é facilitada, liberando, em consequência, uma maior quantidade inicial de rodamina. Por exemplo, após 9 horas de liberação, o sistema a 25°C apresentava 26% de rodamina liberada, enquanto o sistema a 37°C já havia liberado aproximadamente 40% de rodamina.

Nos perfis de liberação dos gráficos A e B da Figura 35 foram aplicadas correlações exponenciais de primeira ordem (curvas tracejadas) obtendo-se para o sistema glúten/rodamina a 25°C e 37°C coeficientes de correlação de 0,97786 e 0,93695, respectivamente, quando o tempo total de liberação foi levado em consideração. Para os gráficos representando apenas as 12 primeiras horas de liberação, os coeficientes de correlação encontrados foram de 0,98361 e 0,97999, para as liberações a 25 e 37°C, respectivamente. Esta análise sugere que, em geral, a 25°C a liberação de rodamina ocorre de forma mais regular e homogênea.



**Figura 35.** Perfil de liberação *in vitro* de rodamina em pH 7,4 a partir de microesferas de glúten de trigo a 25°C (■) e 37°C (□) durante (A) 12 dias e (B) 12 horas

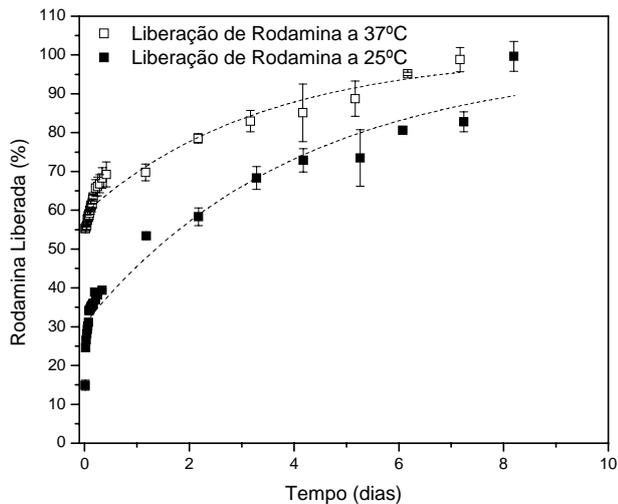
Na Figura 35 B também se observa que nas primeiras 2 horas houve uma rápida liberação inicial de rodamina. Este comportamento de rápida liberação inicial é conhecido como “efeito burst” e está associado a solubilização rápida no meio de liberação dos cristais de rodamina presentes na superfície das microesferas.

Na análise dos perfis de liberação da rodamina nas microesferas de Glúten/PEG 95/05 (Figura 36), observa-se que a rodamina foi liberada mais rapidamente quando comparada com o sistema sem a presença de PEG. A 25°C, toda a rodamina encapsulada foi liberada em 8 dias, e a 37°C a liberação completou-se após 7 dias. Essa liberação mais rápida era esperada,

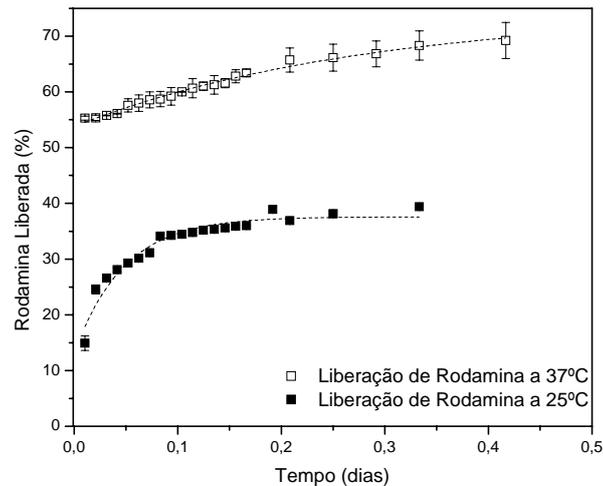
visto que o PEG aumentou a porosidade das microesferas facilitando, desta forma, a difusão das moléculas de rodamina para fora das partículas. Além disso, segundo a literatura a degradação das microesferas é acelerada na presença de PEG, o que resulta em maiores taxas de liberação [71]. Portanto, observa-se que neste sistema existem dois fatores que afetam tanto a forma dos perfis de liberação como a velocidade de liberação da rodamina: a temperatura e a presença de PEG. Comparando-se os perfis de liberação a 25°C das microesferas de glúten de trigo com as microesferas de glúten com PEG durante as primeiras 9 horas de testes, observa-se que enquanto as microesferas sem PEG liberaram 26% de rodamina, as microesferas preparadas com PEG apresentaram aproximadamente 40% de rodamina liberada.

Outro aspecto importante a ser observado na Figura 36B é a alta liberação inicial de rodamina para o sistema a 37°C (efeito burst). Observa-se que em 15 minutos de testes já havia 55% de rodamina liberada, e após 9 horas 68% de rodamina encapsulada havia sido liberada. Este resultado é provavelmente devido ao efeito combinado da presença de PEG e temperatura, já que não foi observado perfil semelhante para as microesferas de glúten de trigo a 37°C ou para as microesferas preparadas com poli(etileno glicol) a 25°C. O efeito burst está mais bem caracterizado para o sistema a 25°C, que apresenta uma rápida liberação inicial durante as primeiras 2 horas. Já o sistema a 37°C mostra uma liberação inicial relativamente homogênea.

Novamente, nos perfis de liberação dos gráficos A e B da Figura 36 foram aplicadas correlações exponenciais de primeira ordem. Para o sistema glúten/PEG/rodamina a 25°C e 37°C, foram obtidos coeficientes de correlação de 0,9448 e 0,9454, respectivamente, para o tempo total de liberação. Este resultado sugere que, para ambas as temperaturas testadas, houve um mecanismo de liberação similar nestes sistemas. Para as primeiras 12 horas de liberação, os coeficientes de correlação encontrados foram de 0,9478 e 0,9897, para as liberações a 25 e 37°C, respectivamente. Esta análise indica que, conforme pode ser observado na Figura 36B, a 37°C a liberação inicial de rodamina ocorre de forma mais regular e homogênea.



(A)



(B)

**Figura 36.** Perfil de liberação *in vitro* de rodamina em pH 7,4 a partir de microesferas de Glúten/PEG 95/05 a: (■) 25°C e (□) 37°C, durante (A) 9 dias e (B) 12 horas.

A Tabela II apresenta os valores de coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtidos para as equações de Higuchi e lei das potências e expoentes de liberação ( $n$ ) encontrados para as microesferas de glúten de trigo e Glúten/PEG 95/05 com rodamina encapsulada em ambas as temperaturas testadas. Nesta análise matemática as primeiras 2 horas de liberação, relativas ao efeito burst, foram desconsideradas.

De acordo com a equação de Higuchi, um processo de liberação é controlado por difusão quanto mais próximo da unidade for o coeficiente de correlação. Os resultados observados indicam que a microesfera de Glúten/PEG 95/05 a 25°C é o sistema que mais se aproxima deste ideal, porém ainda assim não se pode afirmar que seja controlado somente por difusão. Da mesma forma, para os demais sistemas em estudo os resultados sugerem que o mecanismo de liberação da rodamina não é controlado exclusivamente por difusão.

A lei das potências oferece uma indicação sobre qual mecanismo de liberação de agentes ativos está ocorrendo na matriz em estudo, e quanto mais próximo o valor de  $n$  estiver da unidade, maior o nível de confiabilidade. Os valores de coeficiente de correlação encontrados para a lei das potências foram satisfatórios para todos os sistemas estudados, garantindo um bom nível de confiança. O expoente  $n$  é menor que 0,43 para todos os casos, sugerindo que o mecanismo de liberação de rodamina ocorreu principalmente através de um

mecanismo que combina o intumescimento e a difusão através de poros hidrofílicos, concordando com os valores de  $R^2$  determinados aplicando-se a equação de Higuchi.

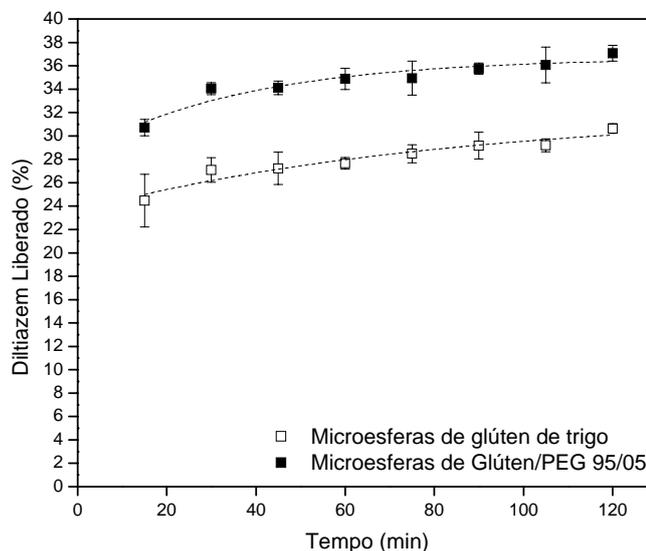
**Tabela II.** Análise matemática realizada para as microesferas de glúten de trigo e microesferas de Glúten/PEG 95/05 com rodamina encapsulada.

Sistema	Higuchi	Lei das Potências	
	$R^2$	$n$	$R^2$
Microesfera de glúten a 25°C.	0,96481	0,31506	0,96080
Microesfera de glúten a 37°C.	0,98777	0,20128	0,97230
Microesfera Glúten/PEG 95/05 a 25°C.	0,99195	0,21584	0,98924
Microesfera Glúten/PEG 95/05 a 37°C.	0,98884	0,10222	0,98056

#### 4.6.2 Liberação *in vitro* de cloridrato de diltiazem

Na Figura 37 observa-se os perfis de liberação a 37°C e pH 1,2 de microesferas de glúten de trigo e microesferas de Glúten/PEG 95/05 com cloridrato de diltiazem encapsulado, simulando-se o tempo de trânsito estomacal. Foram aplicadas correlações exponenciais de primeira ordem nos dois gráficos, obtendo-se os valores 0,9247 para o sistema sem PEG e 0,9074 para o sistema na presença de poli(etileno glicol). Através destes valores de coeficiente de correlação e da própria observação das curvas, nota-se que os perfis de liberação são bastante similares e homogêneos. Nos primeiros 15 minutos, a liberação de diltiazem foi de 24% e 31% para o sistema sem PEG e com PEG, respectivamente. Após 2 horas, pouco diltiazem adicional havia sido liberado, e no total as microesferas de glúten de trigo liberaram 30% de diltiazem, enquanto as microesferas de Glúten/PEG 95/05 liberaram 37%. Nota-se que o sistema preparado com a presença de PEG apresentou uma maior liberação durante estas duas horas. Este efeito está relacionado à maior porosidade conferida às microesferas quando preparadas com PEG, desta forma facilitando a difusão das moléculas de diltiazem para fora das partículas. Além disso, sabe-se que plastificantes possuem a propriedade de se colocarem entre as cadeias poliméricas facilitando a sua mobilidade,

característica esta que também auxilia na liberação mais rápida de fármaco a partir do dispositivo polimérico.



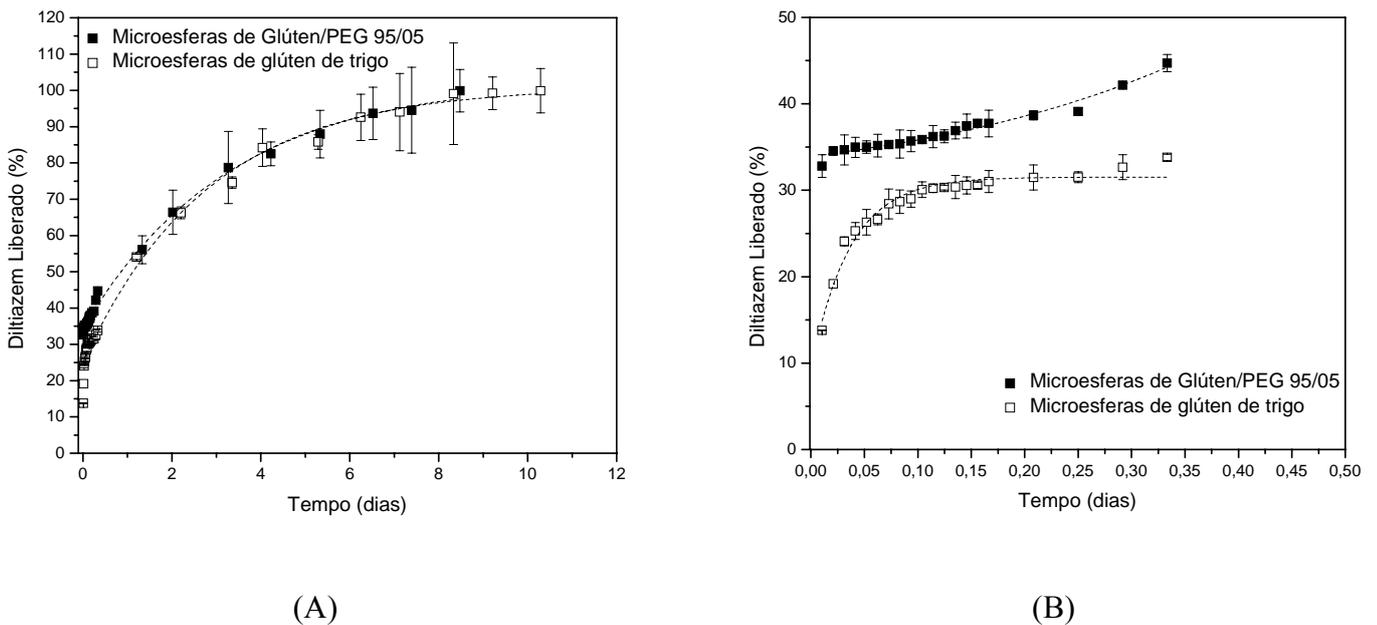
**Figura 37.** Perfil de liberação *in vitro* de cloridrato de diltiazem a partir de microesferas de Glúten/PEG 95/05 (■) e microesferas de glúten de trigo (□) a 37°C em pH 1,2.

Na Figura 38 estão apresentados os perfis de liberação *in vitro* de cloridrato de diltiazem a 37°C em pH 7,4 para as microesferas de glúten de trigo e Glúten/PEG 95/05. A figura 38A representa a liberação de diltiazem completa e a figura 38B representa a liberação de diltiazem nas primeiras 12 horas de ensaio.

Para o sistema de microesferas de glúten de trigo, constatou-se que todo o diltiazem presente nas microesferas foi liberado após 10 dias, enquanto que para o sistema com a presença de PEG a liberação completa ocorreu em 8 dias. Considerando a eficiência de encapsulação destes sistemas, nota-se que o sistema com PEG libera mais diltiazem, já que possui mais fármaco encapsulado em sua matriz. Mas avaliando-se apenas a liberação relativa destes dois sistemas, observa-se que, após 3 dias, a liberação de diltiazem é praticamente idêntica para ambos os sistemas. Por exemplo, 50% de diltiazem foi liberado em aproximadamente 26 horas para o sistema sem a presença de poli(etileno glicol), enquanto esta mesma quantidade de fármaco foi liberada em 21 horas para o sistema com PEG. Após o terceiro dia, nenhuma diferença no perfil e na velocidade de liberação pode ser observada entre os sistemas, sugerindo que nesta etapa o principal fator que afeta estas variáveis é a temperatura, e não o PEG. Observando-se a Figura 38B, nota-se uma diferença no

comportamento de liberação nas 12 horas iniciais para ambos os sistemas estudados. A liberação das microesferas de Glúten/PEG 95/05 é muito mais homogênea, enquanto a microesfera de glúten de trigo apresenta um efeito burst bem caracterizado nas primeiras 2 horas de teste. Após 9 horas, 31% e 44% de diltiazem foram liberados a partir das microesferas de glúten e Glúten/PEG 95/05, respectivamente.

Foram aplicadas correlações exponenciais de primeira ordem nos perfis de liberação dos gráficos A e B da Figura 38, sendo que para o tempo total de liberação os resultados obtidos foram de 0,9897 e 0,9973 para os sistemas sem e com PEG, respectivamente. Para os gráficos representando apenas as 12 primeiras horas de liberação, os coeficientes de correlação encontrados foram de 0,9635 e 0,9691, sugerindo que houve um mecanismo de liberação similar nestes sistemas, conforme pode ser confirmado visualmente.



**Figura 38.** Perfil de liberação *in vitro* de cloridrato de diltiazem a partir de microesferas de Glúten/PEG 95/05 (■) e microesferas de glúten de trigo (□) a 37°C em pH 7,4 durante 10 dias (A) e durante 12 horas (B).

Na Tabela III estão apresentados os valores de coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtidos para as equações de Higuchi e lei das potências e expoentes de liberação ( $n$ ) encontrados para as microesferas de glúten de trigo e Glúten/PEG 95/05 com diltiazem encapsulado para os testes realizados em pH 7,4. Nesta análise matemática as primeiras 2 horas de liberação, relativas ao efeito burst, foram desconsideradas.

Utilizando-se a equação de Higuchi, observa-se que os valores de coeficiente de correlação ficaram maiores que 0,99, indicando que a difusão apresenta um papel importante na liberação de cloridrato de diltiazem a partir de microesferas de glúten de trigo e microesferas de Glúten/PEG 95/05. Porém, existem outros fenômenos que também influenciam a liberação de diltiazem, conforme foi observado pela lei das potências.

Os valores de coeficiente de correlação encontrados para a lei das potências foram bastante satisfatórios para os sistemas estudados. O expoente  $n$  é menor que 0,43 para os casos, o que indica que o mecanismo de liberação de diltiazem ocorreu principalmente através de um mecanismo que combina o intumescimento e a difusão através de poros hidrofílicos.

**Tabela III.** Análise matemática realizada para as microesferas de glúten de trigo e microesferas de Glúten/PEG 95/05 com cloridrato de diltiazem encapsulado, em pH 7,4 a 37°C.

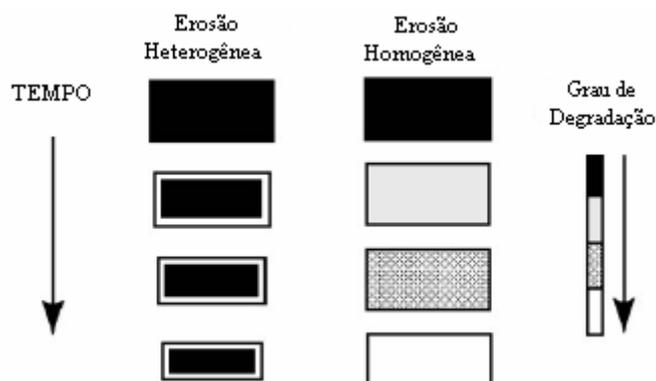
Sistema	Higuchi	Lei das Potências	
	R <sup>2</sup>	$n$	R <sup>2</sup>
Microesfera de glúten.	0,99275	0,28807	0,99303
Microesfera de Glúten/PEG 95/05.	0,99736	0,23525	0,99467

#### 4.7 Degradação das Microesferas

Neste item, é importante distinguir entre dois termos diferentes muito usados para descrever o fenômeno de erosão polimérica, a degradação e a erosão. A degradação refere-se à reações de clivagem ou cisão das cadeias ou ligações poliméricas (processo químico), enquanto a erosão, de característica mais geral, diz respeito a perda de material polimérico através de várias etapas físicas e químicas, incluindo a degradação [52]. A análise da degradação em diferentes condições (meios ácido e neutro e na presença de enzima) torna-se importante para a definição dos mecanismos de liberação *in vitro* de substâncias ativas como as estudadas neste trabalho.

Num contexto mais geral, uma matriz polimérica pode sofrer erosão superficial (heterogênea) ou em toda a sua massa (homogênea), como exemplificado na Figura 39. Na erosão heterogênea a degradação da microesfera tende a ser mais rápida do que a penetração

de água na matriz, ocorrendo a diminuição do diâmetro a medida que a erosão vai acontecendo na superfície. Já na erosão homogênea, a penetração de água no sistema é mais rápida que a degradação do material, ocorrendo primeiramente a hidratação da microesfera, iniciando em seguida a clivagem das ligações poliméricas. Neste processo de degradação o diâmetro da microesfera permanece praticamente constante [52].

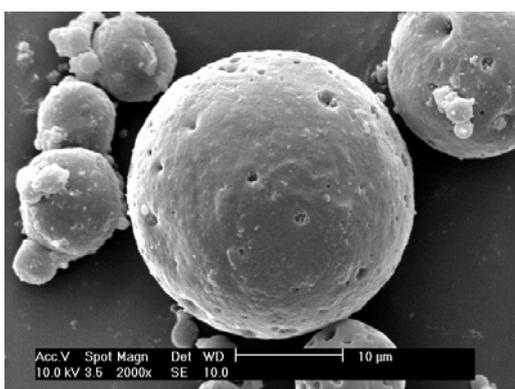


**Figura 39.** Representação dos processos de erosão heterogêneo e homogêneo na matriz polimérica [52].

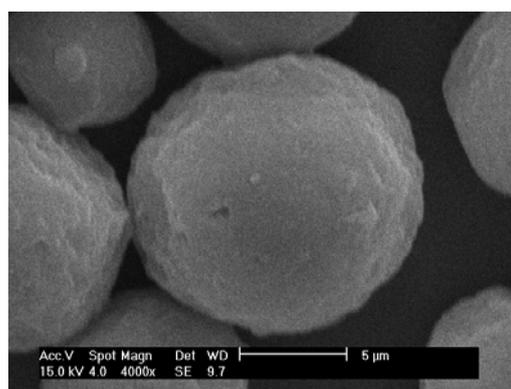
Na Figura 40 são mostradas as micrografias obtidas por MEV de microesferas de glúten de trigo em meio ácido e neutro após 10 dias, nas temperaturas de 25 e 37°C. Analisando primeiramente os resultados obtidos na degradação a 25°C, observa-se que a microesfera em pH 7,4 apresenta uma maior porosidade quando comparado com a microesfera em pH 1,2, indicando que a perda de massa é maior em pHs mais próximos da neutralidade. Porém, não foi observada nenhuma mudança no tamanho da microesfera nem em sua forma, sugerindo que ocorreu uma erosão do tipo homogênea. Um aspecto importante a ser destacado é que mesmo após 10 dias as microesferas mantiveram-se praticamente estáveis, sugerindo que a degradação não ocorreu em grande extensão neste período de tempo, não sendo, portanto, um fator de grande influência na liberação *in vitro*. No estudo de degradação realizado a 37°C já é possível observar uma alteração da característica esférica após 10 dias quando as partículas encontram-se em meio neutro, sugerindo a ocorrência de um processo heterogêneo de degradação. Apesar disso, esta degradação é bastante lenta, apresentando mudanças no formato da esfera somente após 9 dias de testes (micrografia não apresentada), o que indica novamente que a degradação da partícula não deve influenciar significativamente o perfil de liberação *in vitro* deste sistema.

Em resumo, as partículas de glúten mantiveram-se estáveis em meio ácido (pH 1,2), ou seja, não sofreram nenhum processo de degradação significativo. Já em um pH neutro

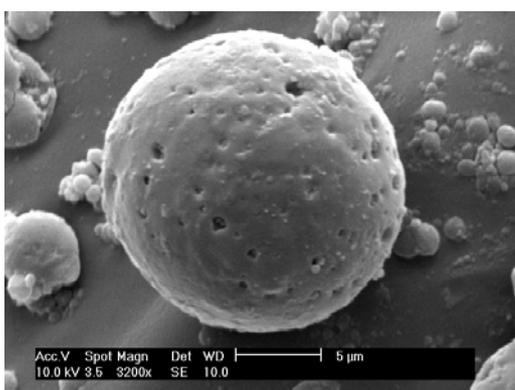
(7,4), as microesferas de glúten se mostraram menos estáveis, apresentando um início de degradação da matriz polimérica. Este resultado pode ser explicado levando-se que conta que o glúten possui uma grande quantidade de resíduos de glutamina e ácido glutâmico, portanto quando o pH é muito ácido estes resíduos deixam a estrutura da proteína carregada positivamente. Esta carga positiva aumenta a insolubilidade da proteína, que apresenta portanto cadeias mais enoveladas. Já em pHs afastados do ponto isoelétrico do glúten ( $pI \sim 6,0$ ), como em pH 7,4, há um aumento da solubilidade das proteínas, devido à um desdobramento parcial das cadeias enoveladas. Conforme o grau de desdobramento das cadeias de aminoácidos aumenta (por meio do aumento do pH do meio ou da temperatura, por exemplo), o ataque de fatores degradativos como a penetração de água é facilitada. Desta forma, a degradação em pH 7,4 é maior quando comparada ao pH 1,2.



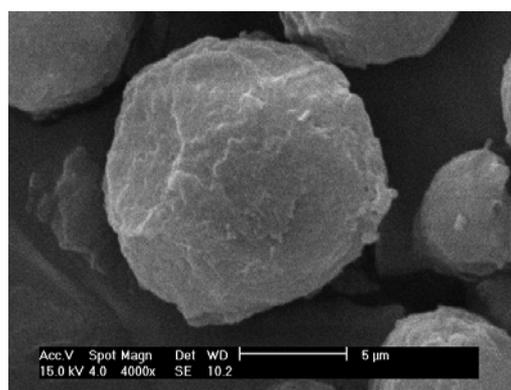
(A)



(B)

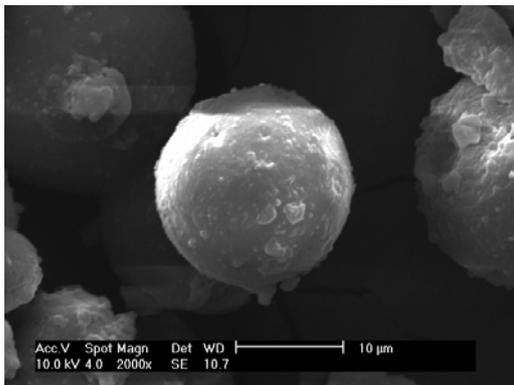


(C)

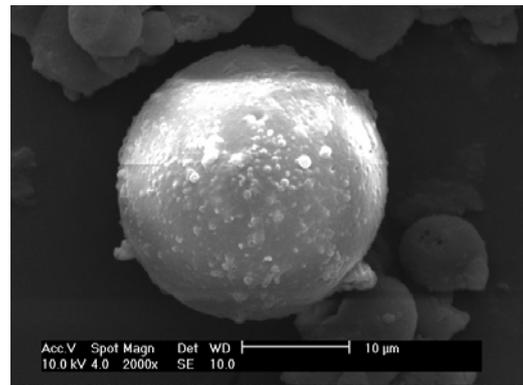


(D)

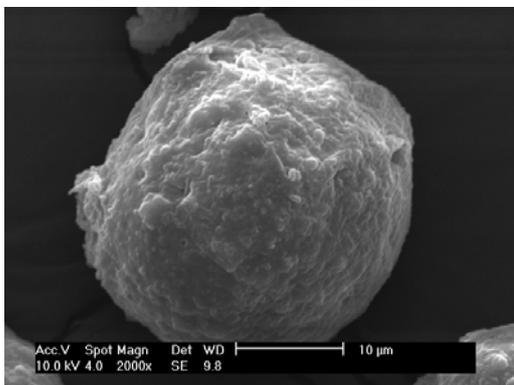
**Figura 40.** Micrografias das microesferas de glúten de trigo submetidas durante 10 dias às seguintes condições: (A,C) 25°C; (B,D) 37°C; (A,B) pH=1,2 e (C,D) pH=7,4.



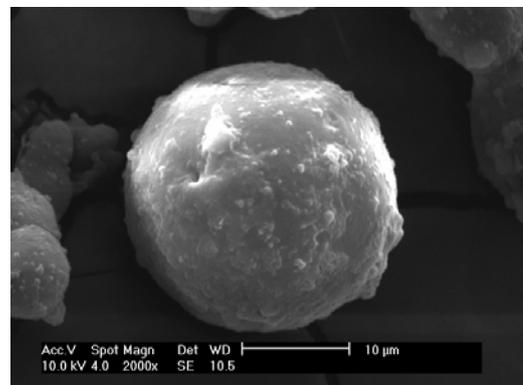
(A)



(B)



(C)

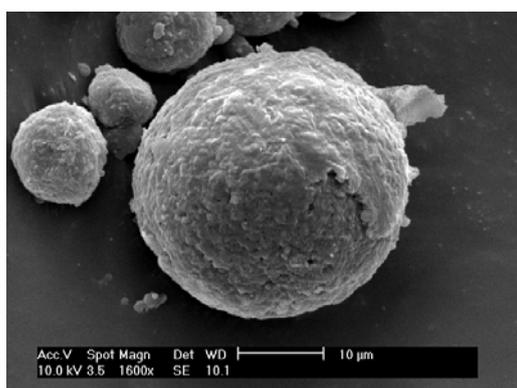


(D)

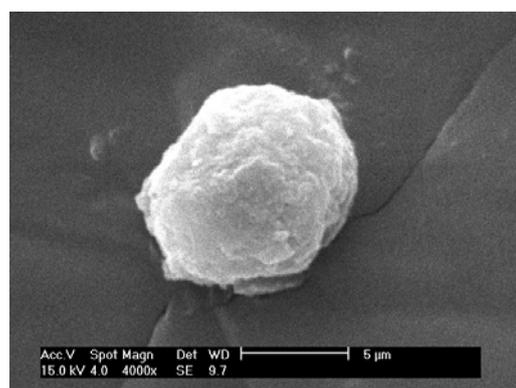
**Figura 41.** Micrografias das microesferas de glúten/PEG 95/05 submetidas durante 10 dias às seguintes condições: (A,C) 25°C; (B,D) 37°C; (A,B) pH=1,2 e (C,D) pH=7,4.

Na Figura 41 são apresentadas as micrografias obtidas por MEV de microesferas de Glúten/PEG 95/05 em contato com meio ácido e neutro durante 10 dias, a 25 e 37°C. Comparando-se as microesferas a 25°C em pH ácido e neutro, observa-se que em meio neutro houve uma alteração da característica esférica da partícula. Observa-se também um aumento na rugosidade, o que pode ser um indício de erosão superficial (heterogênea). O mesmo aumento na rugosidade pode ser observado para o sistema a 37°C porém, mesmo após 10 dias de ensaios a 25 e a 37°C, as microesferas não perderam a estabilidade. Este resultado mostra que a degradação não ocorreu em grande extensão no período de teste (10 dias), sugerindo que a liberação *in vitro* de substâncias ativas incorporadas em microesferas de Glúten/PEG 95/05 não deve ser influenciada pela degradação do sistema. Um outro aspecto a destacar é a presença de PEG que poderia ser um agente acelerador da degradação das partículas, já que

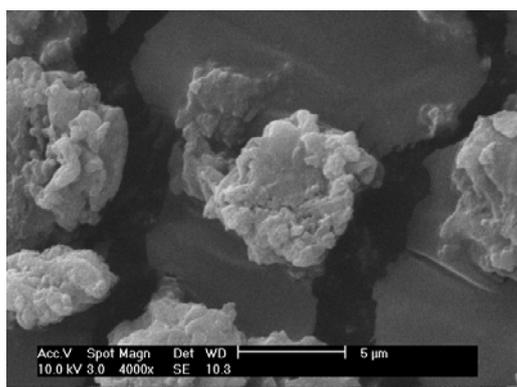
como plastificante favorece a mobilidade das cadeias poliméricas e em consequência, diminui as interações intramoleculares. No entanto, este efeito não foi observado nas micrografias abaixo, provavelmente devido ao processo de reticulação que diminuiu o caráter hidrofílico das microesferas.



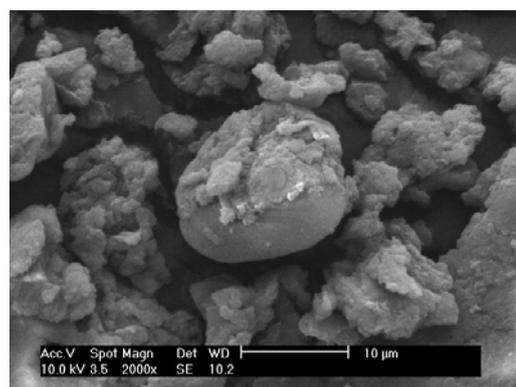
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figura 42.** Micrografias das microesferas de glúten de trigo e glúten/PEG (95/05) submetidas durante 3 dias a degradação por papaína (pH=6,5) nas seguintes temperaturas: (A,C) 25°C e (B,D) 37°C.

Na Figura 42 são mostradas as micrografias das microesferas de glúten de trigo e Glúten/PEG 95/05 em meio enzimático após 3 dias, a 25 e 37°C. Observa-se que a degradação aumentou substancialmente quando a papaína foi adicionada. Em geral, pHs próximos da neutralidade favorecem o ataque a sítios específicos pela papaína tanto na superfície quanto no interior das micropartículas protéicas [23]. Outro efeito que pode ter contribuído para a aceleração da degradação das partículas é o pH do meio estar próximo do ponto isoelétrico do glúten.

Comparando-se as microesferas preparadas sem a presença de PEG, observa-se que houve um aumento na rugosidade para ambos os sistemas. As microesferas de glúten de trigo a 37°C apresentam também uma mudança na forma esférica, possivelmente devido a ocorrência de degradação heterogênea nestas partículas. Portanto, neste sistema pode ser observado um efeito de maior degradação das microesferas com o aumento de temperatura.

No sistema com a presença de PEG, observa-se que em 3 dias de ensaios as partículas já se apresentam completamente disformes e aglutinadas, tanto a 25 quanto a 37°C. Em comparação com as microesferas sem adição de PEG, percebe-se que a presença de plastificante acelerou o processo de degradação destas partículas.

## **5. CONCLUSÕES**

Baseando-se nos resultados discutidos acima, pode-se concluir que através da técnica de emulsificação/evaporação de solvente foi possível a obtenção de partículas perfeitamente esféricas para todas as formulações testadas, quando utilizado como fase interna uma solução água/etanol e óleo mineral como fase externa. Foram obtidos rendimentos próximos a 100% para todas as microesferas. A técnica conduziu à obtenção de partículas com superfícies relativamente lisas e diâmetro médio variando de 8,76 a 24,80  $\mu\text{m}$ . A porosidade das esferas aumentou com a presença de PEG e rodamina, e a presença de cloridrato de diltiazem apresentou pouca influência na porosidade das partículas. Para a formulação preparada com 10% de PEG observou-se elevada coalescência e aglutinação, e por este motivo a formulação com 5% de PEG foi selecionada para os estudos de encapsulação de agentes ativos e liberação *in vitro*. As microesferas com cloridrato de diltiazem encapsulado apresentaram maior coalescência quando comparadas com as microesferas puras e microesferas com adição de rodamina.

Nas análises de FTIR e DSC foi possível comprovar interações entre as microesferas e seus aditivos. Através da técnica de espectroscopia no infravermelho foi possível concluir que ocorreu uma mudança estrutural das proteínas do glúten durante a etapa de formação das micropartículas, através da observação de mudanças na banda de amida II e na banda de estiramento da ligação  $-\text{CH}_3$ . Também foram observadas bandas características do poli(etileno glicol), comprovando que o PEG está presente nas microesferas e interagindo com a matriz polimérica. Além disso, foram observadas interações entre os agentes ativos encapsulados e a matriz de glúten. Avaliando-se os resultados obtidos por DSC foi possível confirmar que as microesferas de glúten, após o tratamento térmico ocorrido durante a sua preparação, sofreram um processo de reticulação. A adição de 5% de PEG às microesferas ocasionou uma diminuição da  $T_g$  do sistema. Este resultado já era esperado, tendo em vista que o poli(etileno glicol) atua como plastificante. O mesmo efeito foi observado com a adição de rodamina e diltiazem. As moléculas destes agentes ativos estão localizadas entre as cadeias poliméricas diminuindo a  $T_g$ , concluindo-se que estas se encontram dispersas molecularmente na matriz de glúten.

A eficiência de encapsulação variou com a composição das microesferas. Nas microesferas com rodamina encapsulada, a EE foi de 23,59% e 34,21% para as microesferas preparadas sem e com PEG, respectivamente. Já para as microesferas com diltiazem, a EE obtida foi de 72,82% e 96,67%, respectivamente. Os baixos valores de eficiência de encapsulação encontrados para a rodamina são resultado da migração de rodamina do interior

das microesferas juntamente com a evaporação da água, ocorrida durante a etapa de preparação das microesferas. Já os altos valores de EE obtidos para o diltiazem podem ser explicados como sendo resultado da interação existente entre o diltiazem e a matriz de glúten de trigo.

Os ensaios de liberação *in vitro* demonstraram que 100% da substância rodamina foi liberada em 12 dias e 10 dias para os sistemas a 25 e 37°C, respectivamente. Já no sistema com adição de 5% de PEG, a liberação completa de rodamina se deu em 8 e 7 dias, respectivamente. Para o cloridrato de diltiazem, a liberação total se deu em 10 dias para o sistema sem PEG a 37°C, e em 8 dias para o sistema com PEG nesta mesma temperatura. Todas as formulações testadas apresentaram efeito burst nas primeiras 2 horas de liberação. Os modelos de Higuchi e da lei das potências sugerem que a liberação de agentes ativos a partir das microesferas preparadas não é controlada exclusivamente por difusão, embora este processo tenha um papel importante na liberação dos ativos encapsulados nestes sistemas. Aparentemente, o mecanismo de liberação é uma combinação do intumescimento e da difusão através de poros hidrofílicos. O ensaio de degradação das microesferas está em concordância com este mecanismo de liberação, pois se observou que a degradação não ocorreu em grande extensão no período de teste (10 dias), sugerindo que a liberação *in vitro* de substâncias ativas incorporadas nas microesferas estudadas não deve ser influenciada significativamente pela degradação das micropartículas.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1) FOLKMAN, J.; LONG, D. M. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *Journal of Surgical Research*, v. 4, p. 139-142, 1964.
- 2) DESAI, S. J.; SIMONELL, A. P.; HIGUCHI, W. I. Investigation of factors influencing release of solid drugs dispersed in inert matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 54, n.10, p. 1459-1464, 1965.
- 3) JALIL, R.; NIXON, J. R. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *Journal of Microencapsulation*, v. 7, n. 3, p. 297-325, 1990.
- 4) ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- 5) OISHI, M.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. Functional PEG for drug delivery. In: KWON, G. S. (Ed.). *Polymeric Drug Delivery Systems*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 93-123.
- 6) JEREZ, A. et al. Rheology and processing of gluten based bioplastics. *Biochemical Engineering Journal*, v. 26, n. 2-3, p. 131-138, 2005.
- 7) LIU, X. et al. Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials*, v. 26, p. 109-115, 2005.
- 8) BATYCKY, R. P. et al. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *Journal Pharmaceutical Sciences*, v. 86, n. 2, p. 1464-1477, 1997.
- 9) LINHARD, R. Biodegradable polymers for controlled release of drugs In: ROSOFF, M. *Controlled release of Drugs: Polymers and aggregate systems*. New York: VCH Publisher, 1988. p.53-85.
- 10) WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.
- 11) IVANOVA, E.; TEUNOU, E.; PONCELET, D. Encapsulation of water sensitive products: effectiveness and assessment of fluid bed dry coating. *Journal of Food Engineering*, v. 71, p. 223-230, 2005.
- 12) CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 1-7, 2007.
- 13) TURCHIULI, C. et al. Oil encapsulation by spray drying and fluidised bed agglomeration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 6, p. 29-35, 2005.
- 14) TOMASZEWSKA, M.; JAROSIEWICZ, A.; KARAKULSKI, K. Physical and chemical characteristics of polymer coatings in CRF formulation. *Desalination*, v. 146, p. 319-323, 2002.

- 15) SHAVIT, U. et al. Release characteristics of a new controlled release fertilizer. *Journal of Controlled Release*, v. 43, p. 131-138, 1997.
- 16) TZIKA, M.; ALEXANDRIDOU, S.; KIPARISSIDES, C. Evaluation of the morphological and release characteristics of coated fertilizer granules produced in a Wurster fluidized bed. *Powder Technology*, v. 132, p. 16-24, 2003.
- 17) KIM, D. –G. et al. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 319, p. 130-138, 2006.
- 18) LEE, M. –H. et al. Preparation of silica particles encapsulating retinol using o/w/o multiple emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 240, p. 83-89, 2001.
- 19) CALLISTER, W. D. *Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2002.
- 20) ROSA, D. S.; PÂNTANO FILHO, R. *Biodegradação: um ensaio com polímeros*. Itatiba: Moara, 2003.
- 21) RAGHAVAN, D. Characterization of biodegradable plastics. *Polymer – Plastics Technology and Engineering*, v. 34, n. 1, p. 41-63, 1995.
- 22) CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. *Bioquímica Ilustrada*. 2ª Edição. Porto Alegre: ARTMED, 1996.
- 23) DOMENEK, S. et al. Swelling behavior and structural characteristics of wheat gluten polypeptide films. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 1002-1008, 2004.
- 24) WEEGELS, P. L. et al. Effects on gluten of heating at different moisture contents. II. Changes in functional properties. *Journal of Cereal Science*, v. 19, p. 39-47, 1994.
- 25) MEJRI, M. et al. Effects of some additives on wheat gluten solubility: a structural approach. *Food Chemistry*, v. 92, p. 7-15, 2005.
- 26) GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat film. *Journal of Food Science*, v.58, p.206-211, 1993.
- 27) MANGATA, J. I. et al. New plasticizers for wheat gluten films. *European Polymer Journal*, v.37, p.1533-1541, 2001.
- 28) MICARD, V. et al. Thermal properties of raw and processed wheat gluten in relation with protein aggregation. *Polymer*, v. 42, p. 477-485, 2001.
- 29) PALMU, P. S. T. *Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo*. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003. 244 p.
- 30) BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. *Química do Processamento de Alimentos*. 2ª Edição. São Paulo: Varela, 1992.

- 31) WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, v. 24, p. 115-119, 2007.
- 32) ALI, Y.; GHORPADE, V. M.; HANNA, M. A. Properties of thermally-treated wheat gluten films. *Industrial Crops and Products: an International Journal*, v. 6, n. 2, p. 177-184, 1997.
- 33) SHEWRY, P. R. et al. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, p. 433-441, 2001.
- 34) SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; TATHAM, A. S. The high molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, v. 15, p. 105-120, 1992.
- 35) SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of Cereal Science*, v. 25, p. 207-227, 1997.
- 36) FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 1-18, 2004.
- 37) EVANGELISTA, R. C. Tecnologia farmacêutica para produção de medicamentos de liberação controlada. Encontro Técnico Científico para as Indústrias Farmacêuticas e Cosméticas. Racine Qualificação e Acessória, p. 01-80. São Paulo, 1998.
- 38) MEIER, M. M., KANIS, L. A., SOLDI, V. Characterization and drug-permeation profiles of microporous and dense cellulose acetate membranes: influence of plasticizer and pore forming agent. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 99-110, 2004.
- 39) KANIS, L. A. et al. Poly(ethylene-co-methyl acrylate) membranes as rate-controlling barriers for drug delivery systems: characterization, mechanical properties and permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 60, n. 3, p. 383-390, 2005.
- 40) HOKUGO, A.; TAKAMOTO, T.; TABATA, Y. Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. *Biomaterials*, v. 27, p. 61-67, 2006.
- 41) LEACH, J. B.; SCHIMIDT, C. E. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, v. 26, p. 125-135, 2005.
- 42) VULCANI, V. A. S. Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Química de São Carlos, 2004.
- 43) BERKLAND, C. et al. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 94, p. 129-141, 2004.
- 44) LIU, W. H. et al. Preparation and in vitro and in vivo release studies of Huperzine A loaded microspheres for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, v. 107, p. 417-427, 2005.

- 45) CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, v. 27, p. 4646-4654, 2006.
- 46) FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, v. 102, p. 313-332, 2005.
- 47) VENTURA, C. A. et al. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: interaction with biomembrane models and in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. No prelo.
- 48) GAVINI, E. et al. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. No prelo.
- 49) YU, J. -Y.; LEE, W. -C. Microencapsulation of pyrrolnitrin from *Pseudomonas cepacia* using gluten and casein. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84, n. 5, p. 444-448, 1997.
- 50) YANG, Y. -Y. et al. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science*, v. 55, p. 2223-2236, 2000.
- 51) PARK, E. J.; NA, D. H.; LEE, K. C. *In vitro* release study of mono-PEGylated growth hormone-releasing peptide-6 from PLGA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 343, p. 281-283, 2007.
- 52) ARIFIN, D. Y.; LEE, L. Y.; WANG, C. -H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1274-1325, 2006.
- 53) WANG, F. J. et al. Cellulose acetate membranes for transdermal delivery of scopolamine base. *Materials Science and Engineering*, v. 20, n. 1-2, p. 93-100, 2002.
- 54) HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, p. 874-875, 1961.
- 55) SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 139-157, 2001.
- 56) WASHINGTON, C. Drug release from microparticulate systems. In: BENITA, S. (Ed.). *Microencapsulation methods and industrial applications*. New York: Marcel Dekker. 1996. p. 155-181.
- 57) PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v.60, p. 110-111, 1985.

- 58) LLABOT, J.M.; MANZO, R.H.; ALLEMANDI, D.A. Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 276, p. 59-66, 2004.
- 59) BERKLAND, C.; KIM, K.; PACK, D. W. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions. *Journal of Controlled Release*, v. 73, p. 59-74, 2001.
- 60) BIBBY, D. C.; DAVIES, N. M.; TUCKER, I. G. Poly(acrylic acid) microspheres containing  $\beta$ -cyclodextrin: loading and in vitro release of two dyes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 187, p. 243-250, 1999.
- 61) BAYOMI, M. A. et al. Preparation of casein-chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 73, p. 187-192, 1998.
- 62) FOLLONIER, N.; DOELKER, E.; COLE, E. T. Various ways of modulating the release of diltiazem hydrochloride from hot-melt extruded sustained release pellets prepared using polymeric materials. *Journal of Controlled Release*, v. 36, p. 243-250, 1995.
- 63) SIEPMANN, J.; LECOMTE, F.; BODMEIER, R. Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles. *Journal of Controlled Release*, v. 60, p. 379-389, 1999.
- 64) JOSUÉ, A. et al. Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli(ácido acrílico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 10, n. 3, p. 116-121, 2000.
- 65) NA, K; BAE, Y. H. pH-Sensitive polymers for drug delivery. In: KWON, G. S. (Ed.). *Polymeric Drug Delivery Systems*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 129-180.
- 66) WANG, J. -S. et al. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*, v. 101, p. 1658-1663, 2007.
- 67) RADWAN, M. A.; PRICE, J. C.; TACKETT, R. L. *In vitro* release of disopyramide from cellulose acetate butyrate microspheres. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 12, n. 21, p. 1453-1462, 1995.
- 68) ZANETTI, B. G.; SOLDI, V.; SENNA, E. L.; Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, p. 229-236, 2002.
- 69) TATTINI Jr, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 127-136, 2006.
- 70) BELTON, P. S. New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, v. 41, p. 203-211, 2005.

71) Ramos, B. G. Z. Avaliação do potencial de utilização de um poliuretano obtido a partir de um poliol de origem natural como material polimérico para a micro e nanoencapsulação de fármacos. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.