

Luanda Chaves Vieira Lins

**MICROPARTÍCULAS COMPOSTAS DE
PHB/CETOPROFENO RECOBERTAS COM QUITOSANA
RETICULADA: OBTENÇÃO E ESTUDO DA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DO FÁRMACO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
graduação em Ciência e Engenharia de
Materiais da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de Mestre
em Ciência e Engenharia de Materiais.
Orientador: Prof. Dr. Alfredo T. N. Pires
Coorientador: Profa. Dra. Giovana C. Bazzo

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca
Universitária da UFSC.

Lins, Luanda Chaves Vieira

MICROPARTÍCULAS COMPOSTAS DE PHB/CETOPROFENO
RECOBERTAS COM QUITOSANA RETICULADA [dissertação] :
OBTENÇÃO E ESTUDO DA LIBERAÇÃO CONTROLADA DO
FÁRMACO / Luanda Chaves Vieira Lins ; orientador, Alfredo Tibúrcio
Nunes Pires ; co-orientador, Giovana Carolina Bazzo. - Florianópolis,
SC, 2012.

100 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais.

Inclui referências

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. Quitosana. 3. Spray Drying. 4.
Sistema de liberação Controlada. 5. Micropartículas. I. Pires, Alfredo
Tibúrcio Nunes. II. Bazzo, Giovana Carolina. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais. IV. Título.

Luanda Chaves Vieira Lins

**MICROPARTÍCULAS COMPOSTAS DE
PHB/CETOPROFENO RECOBERTAS COM QUITOSANA
RETICULADA: OBTENÇÃO E ESTUDO DA LIBERAÇÃO
CONTROLADA DO FÁRMACO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de julho de 2012.

Prof.º Dr.º Antonio Pedro N. de Oliveira,
Coordenador do Curso

Prof.º Dr.º Alfredo Tibúrcio Nunes Pires,
Orientador - Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof.ª Dr.ª Giovana Carolina Bazzo,
Corientadora - Universidade da Região de Joinville.

Banca Examinadora:

Prof.º Dr.º Guilherme Mariz de Oliveira Barra,
Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof.º Dr.º Valderes Drago.
Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof.º Dr.º Pedro Henrique H. de Araújo,
Universidade Federal de Santa Catarina.

*À minha grande amiga, meu
anjo, minha Mãe,
Que em seu breve tempo, soube
cativar todos que a
conheceram.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Alfredo que há todos os dias me mostrou o valor de ser não só um Professor, mas também um Educador. Por ser um transmissor de verdades e inverdades, um cultivador de amizades e um construtor de seres, de vidas!

À Doutora Giovana Bazzo pela coorientação, carinho, atenção e pelas inúmeras contribuições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Pedro Barreto por conceder a utilização de seu laboratório para o trabalho ser realizado e à Sabrina Matos de Carvalho pela colaboração e auxílio para a realização da técnica de *spray drying*.

A todo o grupo POLIMAT que me recebeu com muito carinho desde o início do trabalho, me proporcionando valiosas discussões, em especial à Fernanda, Maria, Paula, Rodrigo, Carmen e Marcos.

À minha amiga Clarice, pelo companheirismo, amizade, bons momentos compartilhados e principalmente pela força nos momentos difíceis.

Ao meu companheiro Gustavo Estivalet que esteve ao meu lado nas horas que chorei, nas horas que sorri, e que fez, faz e sempre fará parte da minha história.

À minha família por todo o amor e respeito, em especial à minha irmã Bartira e ao meu irmão Ricardo.

À Teté que com todo seu amor não me deixou desistir e esteve ao meu lado todos os momentos, me fazendo acreditar que sou capaz.

À minha Mãe, pela imensidão do seu amor, pela incansável solicitude de seus cuidados e seu amor incondicional. Para sempre te amarei!

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais por todos os recursos disponibilizados. Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

*“Bom mesmo é ir à luta com
determinação, abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se
atreve.”*

(Augusto Branco, 2009)

RESUMO

Micropartículas de poli(3-hidroxitirato) (PHB) contendo cetoprofeno (CET) como fármaco modelo foram preparadas através da técnica de emulsão-evaporação do solvente O/A. Com o intuito de atribuir uma barreira adicional à liberação do cetoprofeno, micropartículas de CET/PHB foram revestidas por um filme de quitosana através da técnica *spray drying*. A quitosana é um dos biopolímeros mais utilizados para aplicações farmacêuticas e biomédicas, porém, como é um polímero hidrofílico, há necessidade de uma reticulação visando modificar determinadas propriedades do biopolímero, tais como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade e capacidade de modular a liberação de agentes ativos. O filme de quitosana foi reticulado com glutaraldeído ou genipin. A morfologia das micropartículas foi avaliada, bem como sua eficiência de encapsulação. As micrografias de MEV mostraram partículas esféricas com tamanhos entre 10 a 20 μm . A eficiência de encapsulação foi da mesma ordem de grandeza para todas as formulações de micropartículas estudadas. O perfil de liberação do fármaco foi obtido em condições tamponadas de uma solução de fosfato pH 7,4 utilizando espectrometria UV-Vis. A influência das concentrações de quitosana e do agente reticulante (glutaraldeído e genipin) na quantidade de cetoprofeno liberado após 1 h e sobre o prolongamento de liberação em 72 h, foi avaliada através de análises estatísticas, indicando que ambas as variáveis influenciaram as respostas. A liberação do cetoprofeno a partir de micropartículas compostas recobertas com quitosana reticulada foi lenta e sustentável, sendo um transportador polimérico muito promissor para a liberação de fármacos. Para elucidar o mecanismo de liberação, os sistemas foram tratados com base no modelo de Higuchi e na Lei das Potências, sendo os perfis descritos por uma equação biexponencial. A partir do ajuste dos dados de liberação à equação de Baker-Lonsdale, determinou-se que o mecanismo de liberação é controlado, sobretudo por difusão pelas matrizes poliméricas.

Palavras-chave: Quitosana, *Spray Drying*, Sistema de liberação Controlada, Micropartículas.

ABSTRACT

Microparticles of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) containing ketoprofen (KET) as a model drug were prepared using the technique of emulsion-evaporation solvent (O/W). In order to assign an additional barrier to the release of the ketoprofen and decrease the burst effect, microparticles of KET/PHB were coated with a film of chitosan by spray drying technique. Chitosan is one of the most biopolymers commonly used for pharmaceutical and biomedical applications, however, as it is a hydrophilic polymer, there is a need for crosslinking in order to modify certain properties of the biopolymer, such as chemical and thermal stability, structural strength, permeability and the ability to modulate the release of active agents. The film surface was modified by two chitosan crosslinking agents, glutaraldehyde and genipin. The morphology of the microparticles was evaluated as well as their encapsulation efficiency. The SEM micrographs showed spherical particles with sizes between 10 and 20 μm . The encapsulation efficiency was, approximately, the same order for all microparticles with different formulations of chitosan. The profile release of the drug was obtained at a buffered phosphate solution pH 7.4 using UV-Vis spectrometry. The influence of chitosan concentration and crosslinker agents (glutaraldehyde or genipin) on the amount of ketoprofen released after 1 h and on the extended-release after 72 h was evaluated by statistical analyzes, indicating that both variables influenced the responses. The release of ketoprofen from composite microparticles coated with crosslinked chitosan was slow and sustainable, being a polymeric carrier to a very promising drug delivery. To elucidate the mechanism of release, the systems were treated with the model of Higuchi and power law, these profiles were described by biexponential equation. From the adjustment of the data release to the equation of Baker-Lonsdale, we determined that the release mechanism is controlled primarily by diffusion through polymeric matrices.

Keywords: Chitosan, Spray Drying, Controlled Release Systems, Microparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfis de liberação de fármaco em função do tempo: forma convencional e controlada.	32
Figura 2- Representação esquemática de microesferas e microcápsulas, indicando possíveis distribuições do fármaco.	36
Figura 3 - Representação esquemática de uma micropartícula do tipo <i>core-shell</i> e de uma micropartícula do tipo reservatório.	37
Figura 4- Fórmula estrutural da unidade de repetição do PHB.	39
Figura 5- Representação estrutural das unidades de repetição da cadeia macromolecular da quitosana, em que x e y denotam a forma desacetilada e acetilada, respectivamente.	41
Figura 6- Fórmula estrutural do glutaraldeído.	44
Figura 7- Esquema do mecanismo proposto para a reticulação dos grupamentos amino da quitosana com glutaraldeído.	44
Figura 8- Representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído.	45
Figura 9- Fórmula estrutural do genipin.	46
Figura 10- Esquemas dos mecanismos propostos para a reticulação do genipin com grupamentos amino da quitosana.	48
Figura 11- Representação esquemática da quitosana reticulada com genipin.	48
Figura 12 – Fórmula estrutural do cetoprofeno.	49
Figura 13- Fluxograma do procedimento experimental.	51
Figura 14 - Esquema de obtenção das microesferas através do método emulsão evaporação do solvente O/A.	53
Figura 15 – Spray Dryer - Büchi Mini Spray Dryer B-290.	54
Figura 16 Esquema de preparação de micropartículas compostas de PHB/CET com quitosana pela técnica de spray drying.	55

Figura 17 – Fluxograma do processo de reticulação das micropartículas compostas de CET/PHB-Qt pelo agente reticulante glutaraldeído.....	57
Figura 18 - Fluxograma do processo de reticulação das micropartículas compostas de CET/PHB-Qt pelo agente reticulante genipin.....	59
Figura 19 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura ampliada por um fator 600X de micropartículas com seguintes formulações: A- micropartícula de CET/PHB, B- micropartícula de CET/PHB-1%Qt, C- micropartícula de CET/PHB-1,5%Qt e D- micropartícula de CET/PHB-2%Qt.....	65
Figura 20 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura ampliadas por um fator 3000X de micropartículas com seguintes formulações: A- micropartícula de CET/PHB, B- micropartícula de CET/PHB-1%Qt e C- micropartícula de CET/PHB-2%Qt.	66
Figura 21 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura ampliadas por um fator 1500X de micropartículas com seguintes formulações: A, B e C- micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de Qt respectivamente, reticuladas com glutaraldeído, D, E e F- micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de Qt respectivamente, reticuladas com genipin.	67
Figura 22 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura ampliadas por um fator 1500X de micropartículas com as seguintes formulações: A- micropartículas de CET/PHB recobertas com 1,5% de Qt antes da liberação, B- micropartículas de CET/PHB recobertas com 1,5% de Qt após a liberação.	68
Figura 23 - Representação esquemática da reação de ninidrina com a quitosana.	71
Figura 24 – Aspecto visual da coloração das micropartículas antes e após o tratamento com os agentes reticulante. A- partículas de CET/PHB-Qt antes da reticulação, B- partículas de CET/PHB-Qt após a reticulação com glutaraldeído, C- partículas de CET/PHB-Qt após a reticulação com genipin.	74
Figura 25 - Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas não reticuladas, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 6 h.....	76
Figura 26 - Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas reticuladas com glutaraldeído, em tampão	

fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 6 h.	77
Figura 27 - <i>Efeito burst</i> e efeito de prolongamento da liberação de micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de quitosana não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído.	79
Figura 28 - Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas reticuladas com genipin, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 6 h.....	81
Figura 29 - <i>Efeito burst</i> e efeito de prolongamento da liberação de micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de quitosana não reticuladas e reticuladas com genipin.	82
Figura 30 - <i>Efeito burst</i> e efeito de prolongamento de liberação de micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de quitosana não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído com genipin.	84
Figura 31 - Curvas obtidas após a linearização dos perfis de liberação de acordo com o modelo matemático de Baker-Lonsdale.	86
Figura 32 - Modelagem monoexponencial e biexponencial do CET. ...	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Eficiência de encapsulação do fármaco nas micropartículas compostas.	69
Tabela 2 – Porcentagens de grupamentos amina livres nas partículas com quitosana.	72
Tabela 3 – Constantes de velocidade de dissolução (k) e coeficiente de correlação linear (R) referentes aos perfis de liberação do cetoprofeno.	87
Tabela 4 - Modelagem cinética monoexponencial e biexponencial do perfil de liberação.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PHB - Poli(3-hidroxi-butirato)
CET - Cetoprofeno
Qt - Quitosana
SLC - Sistema de Liberação Controlada
AA - Agente ativo
PLGA - Poli(ácido lático-co-glicólico)
PVAL - Poli(vinil álcool)
PBS - Tampão fosfato
TRIS - 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UV - Ultra Violeta
EE% - Eficiência de Encapsulação
O/A - Óleo em água
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
m/v - Massa/volume
v/v - Volume/volume
ANOVA - Análise de Variância
PHBV - Poli(hidroxi-butirato-co-hidrovalerato)
PCL - Poli(ϵ -caprolactona)
ASC - Área sob a curva do perfil de dissolução

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	31
3.2 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	33
3.3 ENCAPSULAÇÃO DE AGENTE ATIVOS	36
3.4 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS	37
3.5 POLI(HIDROXIBUTIRATO)	39
3.6 QUITOSANA	40
3.7 AGENTES RETICULANTES	43
3.7.1 Glutaraldeído	43
3.7.2 Genipin	46
3.8 CETOPROFENO	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	52
4.1.1 Materiais	52
4.1.2 Obtenção das micropartículas PHB/CET	52
4.1.3 Obtenção das micropartículas compostas a partir da técnica de <i>spray drying</i>	54
4.1.4 Reticulação das micropartículas	56
4.1.4.1 Reticulação com Glutaraldeído	57
4.1.4.2 Reticulação com Genipin	58
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	59
4.2.1 Materiais	59
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	59
4.2.3 Determinação de Grupamento Amina	60
4.2.4 Eficiência de Encapsulação do Fármaco	61

4.2.5 Ensaio de Liberação do fármaco <i>in vitro</i>	61
4.2.6 Análise estatística da liberação	61
4.2.7 Análise do mecanismo de liberação	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	64
5.1 MORFOLOGIA DAS MICROPARTÍCULAS	64
5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO FÁRMACO	68
5.3 ENSAIO DE RETICULAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE GRUPAMENTOS AMINA	70
5.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	75
5.5 ANÁLISE DO PERFIL DE LIBERAÇÃO	85
6 CONCLUSÕES	90
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXO A – Tabelas de dados com os valores utilizados para análise do efeito burst e da eficiência de dissolução	100

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa um campo emergente nas indústrias e pesquisas científicas a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares. Os sistemas de liberação, frequentemente descritos como *drug delivery systems*, oferecem inúmeros benefícios quando comparados a outros de dosagem convencional.

De fato, a encapsulação e liberação controlada de fármacos fornecem numerosas vantagens tal como a diminuição do número de administrações diárias do medicamento, a redução dos efeitos adversos locais ou sistêmicos, a redução da toxicidade de drogas, assim como a possibilidade de empregar menores quantidades de fármaco (RANADE 2004) diminuindo também a liberação de grande quantidade de substância ativa nos primeiros minutos após o contato aquoso, chamado de efeito *burst release* (BAZZO, LEMOS-SENNA e PIRES 2009). Tais vantagens na encapsulação de fármacos justificam o desenvolvimento de novas estratégias na preparação de micropartículas e pesquisas envolvendo novos materiais e modificações das propriedades físico-químicas de polímeros.

Uma variedade de materiais pode ser utilizada no preparo de micropartículas, sendo que a utilização de polímeros para esta aplicação tem sido bastante promissora. Porém para a aplicação em sistemas de liberação controlada, os polímeros devem ter duas características fundamentais: biodegradabilidade (entende-se por biodegradação o processo natural pelo quais compostos orgânicos são convertidos a moléculas mais simples no ambiente biológico) e biocompatibilidade (aceitabilidade mútua entre o polímero e o ambiente fisiológico) (OISHI, NAGASAKI e KATAOKA 2005).

Entre os principais polímeros que possuem as características de biocompatibilidade e biodegradabilidade estão o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e a quitosana ($\beta(1\rightarrow4)2$ -amino-2-dioxi-D-glucose).

O PHB vem sendo amplamente produzido no Brasil utilizando matérias-primas de baixo custo como o açúcar da cana, tornando-se uma alternativa interessante e de custo acessível para utilização em sistemas de liberação de fármacos.

Já a quitosana também tem sido bastante empregada em sistemas de liberação de fármaco, apresentando as mesmas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade que o PHB, além de produção de baixo custo, pois é comumente encontrado em carapaças de crustáceos e feito por um processo de desacetilação da quitina.

Entre as estratégias que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de sistema de liberação controlada tem-se a elaboração de sistemas mais complexos, como micropartículas compostas, formadas por diversas microesferas inseridas em uma matriz polimérica ou por uma única microesfera recoberta por uma camada de polímero. Esses sistemas de liberação apresentam uma barreira adicional à difusão do fármaco, possibilitando a redução do *efeito burst* e o prolongamento da sua liberação (POLLAUF, KIM e PACK 2005).

Inúmeros são os métodos de microencapsulação para a preparação de micropartículas compostas, tais como: Coacervação, dupla emulsão, *spray drying*, entre outros. Entretanto, o método a ser escolhido não deve afetar a estabilidade e atividade biológica do fármaco, ter uma boa eficiência de encapsulação e apresentar escoamento livre. Os métodos de dupla emulsão e coacervação propiciam a formação de aglomerados, requerem mais de uma etapa podendo permanecer resíduos de solventes nas micropartículas. Por outro lado, o processo de *spray drying* é rápido, de fácil operação e ampliação de escala, de condições moderadas e apresenta menor dependência da solubilidade do fármaco e do polímero (HE, DAVIS e ILLUM 1999).

A preparação de micropartículas compostas recobertas com quitosana é uma forma para controlar e melhorar as propriedades requeridas. Uma outra forma de aperfeiçoar essas propriedades é o uso de substâncias chamadas agentes reticuladores. Estes reticuladores irão reagir com a quitosana formando redes com maior estabilidade para o material. No entanto, a maiorias desses reagentes têm efeitos citotóxicos.

Pesquisas para a substituição de agentes reticulantes tóxicos comumente empregados e utilização de reticulantes biocompatíveis são cada vez mais abrangentes. genipin, que é encontrada na tradicional medicina chinesa e faz parte de inúmeros trabalhos científicos na área de saúde, é extraído da fruta da Gardênia. O genipin é comumente usado para reagir com amino ácidos. Este reagente natural, dado a sua baixa citotoxicidade, é uma substância que pode ser usada para preparação de filmes e matrizes para o desenvolvimento de micropartículas para sistemas de liberação de fármacos (SUNG, et al. 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi preparar micropartículas compostas de PHB com o fármaco cetoprofeno, recobertas com uma camada de quitosana reticulada, com aplicação como sistema de liberação controlada do cetoprofeno.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar microsferas de PHB com cetoprofeno como fármaco modelo, através da técnica de emulsão e evaporação do solvente;
- Obter micropartículas compostas de cetoprofeno/PHB recobertas com filmes de quitosana utilizando a técnica de *spray drying*;
- Determinar a eficiência da encapsulação do cetoprofeno no interior das micropartículas;
- Reticular os filmes de quitosana sobre as micropartículas compostas de PHB/fármaco com dois diferentes agentes reticulantes: genipin ou glutaraldeído ;
- Caracterizar a morfologia das micropartículas através de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar o perfil de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas;
- Relacionar o efeito da concentração da solução de quitosana coma espessura da camada de quitosana nas micropartículas, o efeito *burst* e a liberação do fármaco em função do tempo;
- Avaliar o efeito do tipo de reticulantes sobre o efeito *burst* e o prolongamento da liberação do cetoprofeno.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

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 complexos, apresentando primeiramente um efeito *burst* inicial, que consiste na liberação de grande quantidade da substância ativa nos primeiros minutos, e depois a liberação atinge um estágio de liberação mais constante.

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 (ANDREANI, et al. 2009) . 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 micropartículas. Outros fatores que afetam o perfil de liberação são a massa molar polimérica, distribuição do AA e cristalinidade da matriz polimérica (FREIBERG e ZHU 2004).

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, entre outros fatores, com as características físico-químicas do polímero (EVANGELISTA, 1998).

Nas formas de administração convencionais (spray, injeção e comprimidos/cápsulas) a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atingindo um pico máximo e então declina. Isto acontece quando o AA entra em contato com os fluidos biológicos, cuja composição depende da região de absorção do fármaco. Desde que cada droga possua uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica (MEGEED, et al., 2002).

O objetivo de sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (MEGEED, et al., 2002). A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser observada na Figura 1.

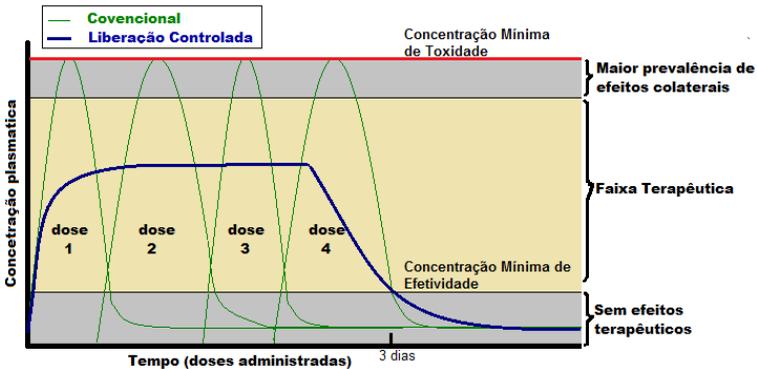


Figura 1 - Perfis de liberação de fármaco em função do tempo: forma convencional e controlada.

Aplicações de liberação de fármacos utilizando micropartículas poliméricas estão se tornando um importante meio na encapsulação de agentes terapêuticos já que estas oferecem uma administração fácil e não invasiva, além de formar com estas micropartículas uma camada que pode proteger e sustentar sua liberação por períodos que vão de horas até anos (EVANGELISTA 1998). Liu e colaboradores prepararam micropartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PGLA) e encapsularam o fármaco Huperzine A, utilizado no tratamento de pacientes com a doença de Alzheimer. Nos testes *in vivo*, estas micropartículas demonstraram a capacidade de liberar o fármaco encapsulado durante duas semanas, mantendo a concentração plasmática de Huperzine A praticamente constante (LIU 2005).

3.2 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Métodos de modelagem matemática avaliam a aproximação de pontos experimentais a um modelo descrito pela comparação estatística de parâmetros de sistemas microparticulados. Os modelos no estudo da liberação de fármacos a partir desses sistemas estão bem estabelecidos, particularmente em vista das investigações extensivas sobre sistemas macroscópicos, cujos princípios podem ser também aplicados para micropartículas (WASHINGTON 1990). Idealmente, o fármaco pode encontrar-se completamente dissolvido no polímero ou disperso como partículas sólidas discretas na matriz. O conhecimento do estado físico do fármaco é fundamental, pois a cinética de liberação de cada caso é diferente.

A expressão matemática para a liberação de fármacos dissolvidos em matrizes poliméricas esféricas pode ser descrita pela Lei de Fick. Diversos parâmetros influenciam na difusão de fármacos, assim como temperatura, pressão e natureza química do material. A difusão está relacionada com mobilidade da substância analisada através do meio fluido em movimento ou em repouso no sentido decrescente da concentração da propriedade transferida, sendo matematicamente definido como uma constante de proporcionalidade entre o gradiente de concentração (dc/dx) e o fluxo (J) da substância. A grandeza D é o coeficiente de difusão quantificador do processo conforme a Equação 1.

$$J = -D \cdot \left(\frac{dc}{dx} \right) \quad (1)$$

Essa equação é conhecida como Primeira Lei de difusão de Fick. O sinal negativo indica que o fluxo da substância ocorre em direção a regiões de menor concentração da mesma.

Em 1958, Higuchi estudou a cinética de liberação e de dissolução de sólidos em soluções reagentes, utilizando o método de reações químicas simultâneas e difusão. Em seu estudo, o autor desenvolveu vários modelos teóricos de liberação de fármacos dispersos em matrizes sólidas e semi-sólidas, em que foi assumida uma linearidade de concentração entre o fármaco não dissolvido e dissolvido em uma matriz, chamada de aproximação de pseudo-estacionário. Higuchi mostrou então, que a complexa equação a que chegou poderia ser reduzida a uma forma bem mais simples sob certas circunstâncias (WASHINGTON 1990).

Modelos baseados nas considerações de Higuchi foram desenvolvidos para várias geometrias de liberação. A equação conhecida como equação de Baker-Lonsdale descreve a liberação controlada de um fármaco a partir de uma matriz esférica, conforme a Equação 2 (WASHINGTON 1990).

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (2)$$

Em que, k corresponde à constante de liberação, t ao tempo, M_t e M_∞ à quantidade de fármaco liberado no tempo “ t ” e no tempo infinito, respectivamente, esta equação é aplicável se há uma correlação linear do primeiro termo da equação em função do tempo (ARIFIN, LEE e WANG 2006).

Poletto e colaboradores (2007) estudaram o perfil de liberação do diclofenaco e indometacina em partículas de blenda de PHBHV/PCL, aplicando o modelo de Baker-Lonsdale. Os autores relataram que a liberação ocorreu através do sistema difusivo e que as taxas de liberação de diclofenaco e indometacina aumentam de acordo com o aumento da concentração de PCL nas partículas (POLETTI, et al. 2007).

No entanto, modelos baseados nas considerações de Higuchi não podem descrever adequadamente a liberação de fármacos dispersos em uma matriz em determinadas situações. Por exemplo, quando a velocidade de dissolução de um fármaco é mais lenta que a sua velocidade de difusão, o primeiro deve se dissolver em contato com o meio para instituir uma diferença no potencial químico e difundir para fora da matriz (VERMA, GARG e KRISHNA 2002).

Dois tipos de sistemas microparticulados são controlados por difusão. Em sistemas denominados microcápsulas o agente ativo forma um núcleo cercado por uma barreira difusional inerte. A taxa de liberação nesses sistemas é constante. A velocidade de liberação é dependente da espessura, da área superficial e da permeabilidade da membrana. Outro tipo de sistema controlado por difusão é o sistema monolítico, no qual o agente é disperso uniformemente na matriz polimérica, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. O perfil de liberação é controlado pela carga do agente, natureza dos componentes e pela geometria do sistema (VERMA, GARG e KRISHNA 2002).

Métodos empíricos para descrever a liberação de fármaco são direcionados por observações experimentais em detrimento de considerações teóricas. Korsmeyer propôs um modelo empírico simples, relacionando exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo decorrido t , conforme a Equação 3 (KORSMEYER, et al. 1983).

$$f_t = a \cdot t^n \quad (3)$$

Em que, a é uma constante que incorpora características estruturais e geométricas dos sistemas, n é o expoente de liberação e a função de t é M_t/M_∞ . Esta equação também é conhecida como Lei da Potência sendo aplicável à porção das curvas de liberação.

Ritger e Peppas (1987) utilizaram a Lei da Potência para descrever sistemas de liberação de fármacos que não sofrem inchamento em contato com o meio aquoso. Os autores propuseram que, no caso de sistemas microparticulados polidispersos, a quantidade de fármaco liberado em qualquer tempo t é igual à soma das contribuições individuais da mistura de populações. Em comparação com o comportamento de liberação a partir de uma amostra monodispersa, a presença de uma distribuição de tamanho de partícula causa aceleração do transporte do fármaco nos tempos iniciais e retardo do mesmo nos tempos finais. A aceleração nas primeiras porções da curva é resultado da liberação a partir das micropartículas de menores tamanhos em relação ao tamanho médio. Por sua vez, partículas maiores são as responsáveis pelo retardo (PEPPAS e RITGER 1987).

Uma das relações empíricas mais utilizadas é a que descreve o processo difusional através de uma equação Biexponencial (Equação 4):

$$C = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} \quad (4)$$

Onde C é a quantidade de fármaco liberado no tempo t e α e β são as constantes relacionada ao tempo de duração dos dois componentes nos quais a função é decomposta. Usualmente estas exponenciais consistem de uma função rápida e outra lenta, chamadas respectivamente de fase de liberação rápida (*burst phase*) e fase de liberação controlada. Para Washington a origem da rápida liberação decorre de processos físicos como, ligação do fármaco à superfície da partícula, fármaco solubilizado por um tensoativo livre presente e contribuição de partículas menores (WASHINGTON 1990).

Quando apenas uma fase é detectada, a cinética de liberação é dita de primeira ordem, ou seja, segue um modelo monoexponencial, conforme a Equação 5.

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (5)$$

Onde C_0 é a concentração inicial de fármaco presente na partícula e k é a constante que descreve o processo de liberação. Perfis de dissolução descritos por esta equação apresentam uma relação linear entre o logaritmo da quantidade de fármaco liberado versus o tempo.

3.3 ENCAPSULAÇÃO DE AGENTE ATIVOS

As micropartículas podem ser obtidas por diferentes métodos e dependendo deste método, microesferas ou microcápsulas podem ser obtidas.

O termo micropartícula refere-se a dois tipos de estruturas, microesferas e microcápsulas. Microcápsulas são sistemas do tipo reservatório ou casca-núcleo, em que uma substância é confinada em uma cavidade cercada por uma membrana polimérica. Enquanto microesferas são matrizes onde a substância está dispersa fisicamente e uniformemente (AHSAN, et al.), como pode ser visto na Figura 2.

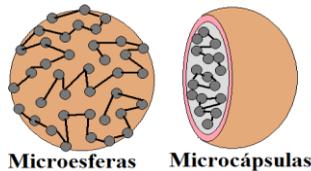


Figura 2- Representação esquemática de microesferas e microcápsulas, indicando possíveis distribuições do fármaco.

Entre as estratégias que podem ser utilizadas para controlar a liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados pode-se citar a preparação de micropartículas compostas a partir de dois ou mais polímeros, as quais podem ser do tipo *core-shell* ou um reservatório de micropartículas. Denomina-se *core-shell* quando uma única partícula é recoberta com uma ou mais camadas de espessura variável, normalmente constituídas por um outro polímero (POLLAUFG, KIM e PACK 2005).

As micropartículas compostas formadas por uma partícula recoberta com um segundo polímero, conforme representado na Figura 3, serão denominadas neste trabalho de micropartículas do tipo *core-shell*.

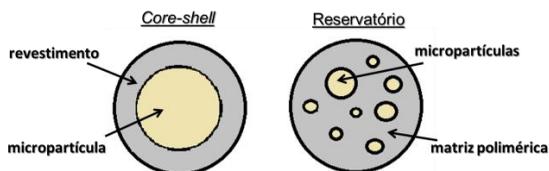


Figura 3 - Representação esquemática de uma micropartícula do tipo *core-shell* e de uma micropartícula do tipo reservatório.

A principal finalidade da utilização deste tipo de sistema é promover uma barreira adicional à difusão do fármaco, diminuindo o *efeito burst*, muito comum no caso de microesferas, e também prolongar a liberação do ativo. Com este objetivo, alguns trabalhos foram desenvolvidos, Zheng e colaboradores (2004) prepararam micropartículas de PLGA recobertas com uma camada de alginato e outra de quitosana (ZHENG, et al. 2004), assim como Wang e colaboradores recobriram com várias camadas de polissacarídeos microesferas de PHBV contendo ibuprofeno (WANG, et al. 2007). Microcápsulas formadas por alginatos revestidos com quitosana reticulada com genipin foram estudadas por Chen e colaboradores (CHEN, et al. 2006).

3.4 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS

Entre os diferentes métodos de preparação de sistemas microparticulados os mais destacados e utilizados são:

i. Métodos Físico-químicos: de um modo geral, estes métodos estão baseados na dissolução de um fármaco, juntamente com um polímero, em determinado solvente, seguida pela adição, sob agitação constante, de um não-solvente à mistura. A emulsão obtida por esta técnica é denominada óleo em água (O/A) e aplica-se apenas nos casos em que o polímero e o fármaco são insolúveis em água. Baixas eficiências de encapsulação são obtidas quando se utilizam fármacos

hidrossolúveis, uma vez que estes tendem a difundir e solubilizar-se na fase aquosa (GIBAUD, BONNEVILLE e ASTIER 2002).

Nesta técnica é utilizado um emulsificante na fase aquosa para evitar a aglomeração das micropartículas; o tipo e a concentração do emulsificante utilizado afeta principalmente o tamanho das micropartículas.

Maia e colaboradores produziram microesferas de PHB empregando diversas concentrações de PVA na fase aquosa da emulsão e evidenciaram que, quando foi utilizada a concentração de 0,5% de PVA, o tamanho das micropartículas obtidas foi cerca de 10 vezes maior do que quando se utilizou 2,0 % de PVA. Os autores demonstraram que não foi possível a obtenção de micropartículas individuais na ausência do estabilizante. Resultados semelhantes foram obtidos por Lee e colaboradores, os quais utilizaram diversas concentrações de polissorbato 80 no preparo de microesferas de polimetacrilatos (MAIA, SANTANA e RÉ 2004) (LEE, PARK e CHOI 2000).

ii. Métodos de transferência de calor e massa: se pensarmos em produção em maior escala, os métodos de transferência de calor e massa podem ser úteis comercialmente. Existem vários exemplos deste método como o revestimento em leito fluidizado, centrifugação multi-orifício ou então o método mecânico mais utilizado, que é o *Spray Drying* (secagem por spray), em que o fármaco, em solução ou dispersão, é nebulizado, juntamente com o material revestidor solubilizado ou fundido. Isto é feito em uma câmara de evaporação, causando a rápida solidificação das gotículas originando as partículas (LIMA 2008).

Micropartículas biodegradáveis têm sido produzidas pelos métodos de emulsão e coacervação. Entretanto, o processo de coacervação propicia a formação de aglomerados de micropartículas, é difícil ampliação de maior escala e requer grande quantidade de solventes orgânicos, dos quais podem permanecer resíduos nas micropartículas formadas. Já métodos de dupla emulsão requerem muitas etapas, um controle rígido de temperatura e da viscosidade da emulsão interna, além de ser difícil a encapsulação de fármacos hidrossolúveis. Por outro lado, o processo de *spray drying* é rápido, de fácil operação e ampliação de escala, de condições moderadas e apresenta menor dependência da solubilidade do fármaco e do polímero.

Braga e colaboradores (2007) estudaram as especificações do processo de *spray drying* para incorporação do fármaco cetoprofeno em uma matriz de quitosana para liberação controlada do fármaco. Os resultados apresentaram uma boa esfericidade das partículas e uma superfície lisa e compacta (BRAGA e OLIVEIRA 2007).

He e colaboradores (1999) estudaram a liberação da cimetidina em partículas de quitosana reticuladas obtidas por *spray drying*. Eles também obtiveram partículas esféricas, porém com uma taxa de liberação grande do fármaco que, segundo os autores, foi devido ao fármaco ser hidrossolúvel. Também observaram o intumescimento das partículas, onde constataram que micropartículas não reticuladas não mantiveram a forma esférica em água, e especialmente em meio ácido (HE, DAVIS e ILLUM 1999).

3.5 POLI(HIDROXIBUTIRATO) - PHB

O PHB é um poliéster sintetizado por bactérias a partir de substratos naturais. Este polímero vem sendo uma alternativa interessante e de custo acessível para utilização em sistemas de liberação de fármacos. Apesar da alta cristalinidade, o PHB ainda é bastante utilizado em SLC devido à simplicidade dos procedimentos envolvidos no preparo de micropartículas. A Figura 4 representa a fórmula estrutural da unidade de repetição na cadeia macromolecular do PHB.

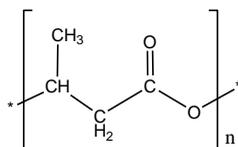


Figura 4- Fórmula estrutural da unidade de repetição do PHB.

A biodegradabilidade e biocompatibilidade são as propriedades mais importantes do PHB para o uso na área farmacêutica, pois este polímero de baixa massa molar complexado a outras macromoléculas possui a capacidade de penetrar nas células, podendo ser encontrado no citoplasma e em fluidos intracelulares.

A degradação *in vivo* do PHB origina o ácido 3-hidroxi-butírico, um componente presente no organismo, podendo ser encontrado no citoplasma e em fluidos intracelulares. Por isso muitos trabalhos vêm sendo publicados visando o melhoramento na administração de fármacos envolvendo a preparação de micropartículas para o controle de liberação de AA (VANIN, et al. 2004).

Maia e colaboradores prepararam microesferas de PHB e PHBV pelo método de emulsão e evaporação do solvente e estudaram o efeito de alguns parâmetros utilizados no processo sobre as características das micropartículas. Estudos de degradação *in vitro* evidenciaram que as microesferas de PHB apresentaram cerca de 2% de perda de massa após 30 dias de incubação em tampão pH 7,4 a 37° C, enquanto que a perda de massa das micropartículas de PHBV foi de 6%, em virtude deste polímero possuir menor grau de cristalinidade (MAIA, SANTANA e RÉ 2004).

Trabalhos mais recentes propõem realizar modificações na estrutura do polímero, com o objetivo de modificar as suas propriedades, como a síntese de um copolímero em bloco (PHB-PEG-PHB) capaz de originar nanopartículas do tipo *core-shell* em meio aquoso, as quais podem ser utilizadas como sistemas de veiculação de fármacos (CHEN, et al. 2006).

Ikejima e colaboradores (2000) investigaram o comportamento de cristalização e capacidade de biodegradação de filmes da blenda PHB/quitosana, a fim de obter melhores propriedades do PHB com uma biodegradação controlada. Os autores observaram que ocorreu um decréscimo significativo do grau de cristalinidade do PHB na presença de quitosana devido à formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila do PHB e os grupos hidroxila e amina da quitosana. Além disso, estudos de biodegradabilidade dos filmes evidenciaram que o sistema PHB/quitosana degradou mais rapidamente do que aqueles contendo apenas quitosana (IKEJIMA e INOUE 2000).

3.6 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração do exoesqueleto de insetos e crustáceos. A cadeia polimérica da quitosana é formada principalmente por unidades de β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, conforme representado na Figura 5 (DHAWAN, K. e V. 2004).

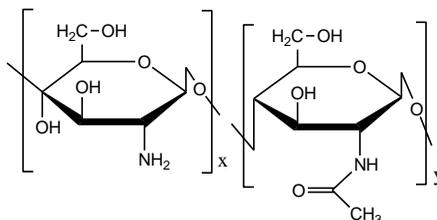


Figura 5- Representação estrutural das unidades de repetição da cadeia macromolecular da quitosana, em que x e y denotam a forma desacetilada e acetilada, respectivamente.

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando à elaboração de micro e nanopartículas de quitosana para liberação controlada de fármacos. Isto porque a quitosana apresenta uma propriedade mucoadesiva, devido à força atrativa molecular formada pela interação eletrostática entre a quitosana positivamente carregada e mucosas do corpo humano negativamente carregadas (DHAWAN, K. e V. 2004). Estudos recentes salientam que a propriedade mucoadesiva da quitosana é muito útil para sistemas de liberação de fármacos.

De fato a quitosana é um polímero natural útil para fins médicos e sistemas de liberação de fármacos (MUZZARELLI 2009), pois além de propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade este polímero apresenta propriedades como baixa citotoxicidade, ação antimicrobiana e desempenha interessantes atividades biológicas. Como um polieletrólito catiônico comercialmente disponível, a quitosana tem despertado interesse em diversas áreas, como células combustíveis, em adesão celular e mesmo na área de alimentos, pois é considerada uma fibra dietética com várias propriedades benéficas para a saúde. (BUTLER, YIU-FAI e PUDNEY 2003).

Os principais parâmetros que influenciam as propriedades físico-químicas da quitosana e, conseqüentemente, a liberação de fármacos a partir de micropartículas preparadas com este polissacarídeo são a sua massa molar e o seu grau de reticulação. Dini e colaboradores estudaram o efeito da variação da massa molar da quitosana e a concentração de quitosana nas micropartículas na liberação de hidroquinona. Os resultados ilustraram uma diminuição na liberação do fármaco nas primeiras horas com o uso de quitosana de mais alta massa molecular e uma maior concentração de quitosana na preparação das micropartículas. Segundo os autores a diminuição da liberação se deve a

uma maior densidade de cadeias de quitosana resultando em um maior emaranhamento, dificultando assim a difusão do fármaco (DINI, ALEXANDRIDOU e KIPARISSIDES 2003)

Micropartículas de quitosana podem ser preparadas por diferentes técnicas, tais como a emulsão/evaporação do solvente, coacervação, secagem por pulverização, entre outros. He e colaboradores prepararam microesferas de quitosana pelo método *spray drying* para a liberação de cimetidina, famotidina e nizatidina, modificando concentrações da solução de quitosana e reticulando com diferentes agentes reticulantes para a análise dos perfis de liberação.

Complexos polieletrólíticos de quitosana possuem limitações no uso como carregadores de fármaco via oral, devido a sua capacidade de dissolução em meio ácido como encontrado em fluidos gástricos. Com a finalidade de superar esse problema, bem como criar sistemas com maiores resistências química e física, os complexos polieletrólíticos podem ser reforçados pela adição de agentes reticulantes de quitosana (BEGER, et al. 2004).

Gupta e Jabrail (2006) prepararam microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e glioxal e observaram que a reticulação com glioxal originou microesferas mais hidrofóbicas e compactas, capazes de sustentar a liberação do fármaco por um período de tempo maior (GRUPTA e JABRAIL 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Yuan e colaboradores (2007) que observaram que microesferas de quitosana não reticulada liberaram a albumina bovina mais rapidamente do que as microesferas reticuladas com genipin e que o grau de reticulação da quitosana depende da concentração do reticulante e do tempo de reticulação (YUAN, et al. 2007).

A quitosana e seus derivados têm sido extensivamente utilizados para aplicações biomédicas, devido à sua biocompatibilidade e sua biodegradabilidade enzimática. No entanto, por ser um polímero hidrofílico, a quitosana não é capaz de prolongar a liberação de um AA durante longos períodos de tempo, havendo a necessidade de ser reticulada. O polímero reticulado apresenta um menor grau de intumescimento e a camada de quitosana torna-se mais compacta (MI, SHYU e PENG 2005).

3.7 AGENTES RETICULANTES

A reticulação das cadeias poliméricas de quitosana, processo também denominado de reação de entrecruzamento, é um tipo de modificação química que visa unir suas cadeias poliméricas, ou ainda, ligar suas cadeias às de outros polímeros gerando redes poliméricas híbridas. Esse procedimento ocorre por meio da reação entre sítios reativos específicos presentes nas unidades estruturais de polímeros e alguns reagentes reticulantes. No caso da quitosana, os sítios mais reativos são os grupos amina e hidroxila das unidades de quitosana (BEGER, et al. 2004).

Reações de reticulação visam principalmente modificar determinadas propriedades do biopolímero, tais como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, cor, eficiência em quelação e capacidade de imobilização proteica e celular. O processo de reticulação sofre influência tanto de algumas características físico-químicas da quitosana utilizada quanto das condições reacionais adotadas.

As reticulações também sofrem influência do tipo e da concentração do agente de entrecruzamento envolvido no processo. Com a elevação do grau de reticulação, reduz-se a porosidade do material obtido, a permeabilidade à água e a difusão de possíveis substâncias aprisionadas nas redes poliméricas formadas (BEGER, et al. 2004). Vários agentes reticulantes têm sido usados para reticulação da quitosana como glutaraldeído, etileno glicol, genipin, éter diglicídico e diisocianato. Estes estudos demonstraram que as taxas de liberação de fármacos podem ser mais controladas não só pelo grau de reticulação das micropartículas, mas também pelo tipo de ligação realizada.

3.7.1 Glutaraldeído

Glutaraldeído é um reticulante saturado que integra o grupo dos aldeídos, é uma substância hidrofílica, passível de rápida degradação e com limitada persistência no ar, solo e água pela qual apresenta baixo potencial de risco ao compartimento terrestre e aquático.

Dentre os diversos reagentes já utilizados para a reticulação do biopolímero, o mais empregado ainda continua sendo o glutaraldeído, tendo em vista que ele é utilizado na maioria das publicações relacionadas à reticulação da quitosana. A fórmula estrutural do glutaraldeído pode ser visualizada na Figura 6.

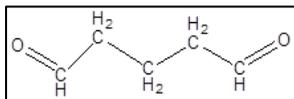


Figura 6- Fórmula estrutural do glutaraldeído.

Ao se empregarem aldeídos monofuncionais (formaldeído) ou bifuncionais (glioxal e glutaraldeído) como agentes reticulante, a reação ocorre via adição nucleofílica. A formação dessas ligações cruzadas ocorre por um ataque de elétrons livres da amina ao grupo carbonila para render iminas, levando a uma ligação dupla entre o carbono do glutaraldeído e o nitrogênio da quitosana (MCMURRY 2005). A Figura 7 representa o mecanismo de reação dos grupamentos amina da quitosana com o glutaraldeído.

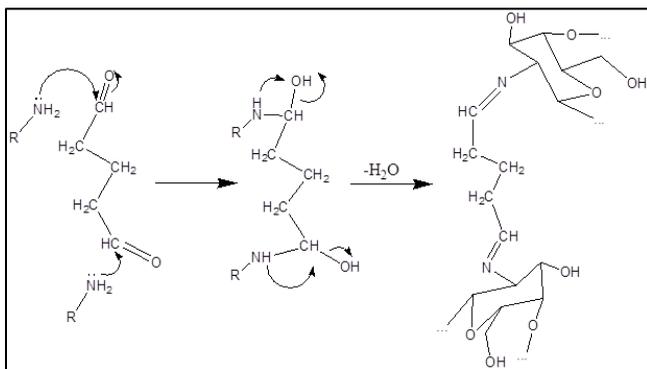


Figura 7- Esquema do mecanismo proposto para a reticulação dos grupamentos amino da quitosana com glutaraldeído.

Monteiro Jr e Airoidi (1999) estudaram a reticulação da quitosana com glutaraldeído e a partir das técnicas de espectroscopia (ressonância magnética nuclear de ^{13}C , infravermelho e Raman) e identificaram a formação de uma ligação entre os grupos amina livre da quitosana e o grupo aldeído do glutaraldeído, formando ligações iminas, conforme a Figura 8. Os autores acrescentaram que a formação de ligações cruzadas pode envolver duas unidades de quitosana pertencentes, ou não a mesma cadeia polimérica (MONTEIRO JR e AIROLDI 1999).

As iminas formam ligações covalentes e resistente a diferentes pHs e temperaturas, além de melhorar a estabilidade à água enquanto mantém a biodegradabilidade (BEPPU, ARRUDA e SANTANA 1999).

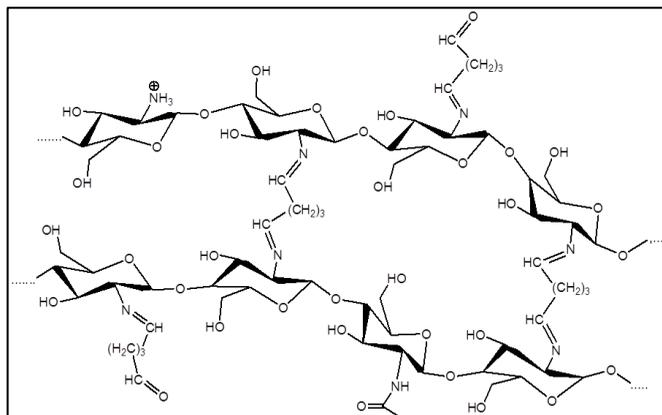


Figura 8- Representação esquemática da quitosana reticulada com glutaraldeído.

Micropartículas reticuladas com glutaraldeído têm mostrado ótimas propriedades de armazenamento dinâmico, íons de adsorção, imobilização de enzima e liberação controlada de fármacos. Dini e colaboradores (2003) relataram que microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, com grau de reticulação 6, 12 e 24,5% liberaram 85%, 65% e 38% do fármaco hidrofílico incorporado, respectivamente, depois de 300 min (DINI, ALEXANDRIDOU e KIPARISSIDES 2003).

Gupta e Jabrail (2006) reticularam esferas de quitosana com glutaraldeído e glicoxal para a liberação de um contraceptivo não esteroidal (ormeloxifeno). Em seus estudos 67,3% do fármaco foram rapidamente liberados em 30 h a partir das esferas não reticuladas, enquanto que esferas reticuladas com 6% de glutaraldeído ou 4% de glicoxal tiveram significativa redução da liberação em 30 e 40 h (29,6% e 22,2%, respectivamente) (GRUPTA e JABRAIL 2006).

3.7.2 Genipin

Muitos trabalhos têm usado genipin como agente de reticulação de quitosana, ele é um produto extraído do geniposídeo que é encontrado na fruta da Gardênia. Gardênia é um gênero de cerca de 250 espécies de plantas da família do café, *Rubiaceae*, nativa das regiões tropicais e subtropicais. A fruta de *Gardenia Jasminoides Ellis* foi usada na tradicional medicina chinesa para tratar irritabilidade, doenças febris, conjuntivites agudas, hematemeses e úlceras da pele (BUTLER, YIU-FAI e PUDNEY 2003).

A estrutura do genipin foi proposta em 1960, como mostrado na Figura 9. Por ser uma substância natural, é uma molécula biodegradável com baixa citotoxicidade.

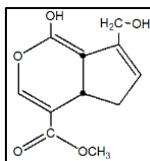


Figura 9- Fórmula estrutural do genipin.

Novas substâncias têm sido testadas para a reticulação da quitosana devido à toxicidade apresentada por a maioria dos agentes reticulantes, principalmente o glutaraldeído, que ainda é o agente reticulante amplamente utilizado. Estudos indicam que o genipin é muito mais biocompatível do que o glutaraldeído. Sung e colaboradores (2004) testaram o genipin como agente de reticulação do colágeno. Neste trabalho, verificaram que o genipin era 10 000 vezes menos citotóxico que glutaraldeído, o que justifica seu uso em biomateriais (SUNG, et al. 2000) (JIN, SONG e HOURSTON 2004).

O genipin tem sido utilizado em extratos de frutas como corante alimentar, em que a reação das aminas primárias com o genipin conduz a uma pigmentação azul quando formam ligações covalentes com o alimento na presença de oxigênio. Park e colaboradores (2002) verificaram que a reação da proteína com o genipin, leva a produtos que conferem propriedades altamente estável ao calor, luz e pH (PARK, et al. 2002) (MUZZARELLI 2009).

Yim e colaboradores (2004) estudaram atividades metabólicas dos compostos bioativos do Geniposídeo na microflora intestinal

humana, onde verificaram que o genipin é convertido no trato gastrointestinal, sem efeitos adversos (YIM, et al. 2004). Subsequentemente, a reticulação de genipin com aminas primárias da quitosana foi utilizada em estudos de fixação do tecido para reticulação colágeno e gelatina.

Butler e colaboradores (2003) estudaram o mecanismo de reação do genipin com a quitosana em membranas contendo soro de albumina bovino (BSA) e gelatina. A reação foi avaliada por espectroscopias de infravermelho, ultravioleta-visível, RMN e massa, na qual observaram duas reações concludentes que levou à formação de ligações cruzadas entre o grupamento das aminas primárias da quitosana e o agente reticulante (BUTLER, YIU-FAI e PUDNEY 2003). Dois mecanismos foram propostos pelos pesquisadores para explicar a reação de reticulação. Uma reação mais lenta, representada pelo mecanismo A da Figura 10, é a substituição nucleofílica, a qual envolve um ataque nucleofílico ao carbono do grupo éster do genipin ocorrendo uma substituição deste grupo por uma amida secundária com a liberação de metanol.

O outro mecanismo observado, representado pelo mecanismo B da Figura 10, onde a reação acontece por um ataque nucleofílico da amina primária no carbono C3 do genipin formando um aldeído intermediário. Isto causa uma abertura do anel heterocíclico do genipin, seguido de um ataque no grupo do aldeído intermediário formado, pelo grupo da amina secundária. Um composto heterocíclico ligado ao grupo amina é formado (BUTLER, YIU-FAI e PUDNEY 2003).

Resultados promissores para liberação de fármacos têm sido apresentados com micropartículas de quitosana reticuladas com genipin. Yuan e colaboradores (2007) investigaram o efeito da reticulação de microesferas de quitosana com genipin na liberação de proteína. As esferas apresentaram uma intensificação da cor azul com o aumento da concentração de genipin e tempo de reticulação. Os autores mostraram que o grau máximo de reticulação foi 33-34% com 8h de reticulação e concentração de $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$. Esse valor máximo de grau de reticulação não aumentou com o tempo ou concentração de genipin. A suposição dos autores é que isto se deva à reticulação da camada superficial das microesferas, o que impediria a reticulação das camadas internas. A liberação de proteína foi reduzida de 75,4 a 60% após 31 dias, se comparado a microesferas sem reticulação (YUAN, et al. 2007).

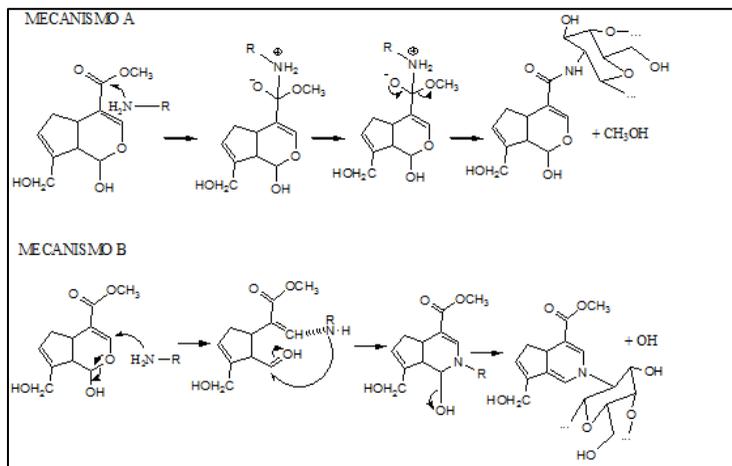


Figura 10- Esquemas dos mecanismos propostos para a reticulação do genipin com grupamentos amino da quitosana.

A reação completa dos grupos amina da quitosana com o genipin forma uma estrutura interconectada (Figura 11), ocorrendo ligações covalentes cruzadas intermoleculares entre as cadeias de quitosana altamente estáveis.

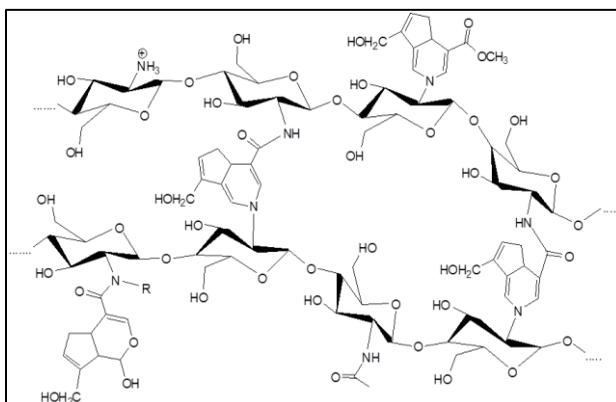


Figura 11- Representação esquemática da quitosana reticulada com genipin.

Mi e colaboradores (2001) investigaram o efeito do pH na liberação da indometacina em partículas de quitosana reticuladas com genipin. Os resultados indicaram que a liberação do fármaco modelo foi mais lenta para partículas reticuladas em soluções com o pH mais elevado e neutro, onde os grupos aminos não estão protonados. Enquanto uma liberação mais pronunciada ocorreu para partículas reticuladas em soluções com pH mais baixos. O autor relata que tal comportamento deve-se à inonização dos grupos carboxila da quitosana em pH baixo, comportamento padrão dos polieletrólitos (MI, SUNG e SHYU 2001).

3.8 CETOPROFENO

O cetoprofeno é um anti-inflamatório não esteroideal utilizado principalmente no tratamento da osteo-artrite e artrite entre outras doenças, podendo ser administrado por via oral. Este fármaco apresenta um curto tempo de meia-vida plasmática e deve ser administrado 3 ou 4 vezes ao dia para a manutenção dos níveis plasmáticos (BAZZO, LEMOS-SENNA e PIRES 2009).

O cetoprofeno é ácido fraco e possui baixa solubilidade em água, a qual é dependente do pH do meio. A solubilidade do cetoprofeno aumenta gradativamente com o aumento do pH, em tampão pH 4,0, a 37 °C a solubilidade de saturação é de 0,28 mg mL⁻¹, a qual aumenta para 3,68 mg mL⁻¹ em pH 6,0 (SHENG, et al. 2006). A fórmula estrutural do cetoprofeno pode ser visualizada na Figura 12.

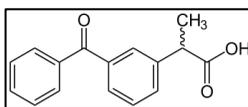


Figura 12 – Fórmula estrutural do cetoprofeno.

Com o objetivo de prolongar a liberação por via oral e, conseqüentemente, diminuir a frequência das administrações diárias e minimizar os efeitos adversos, a encapsulação deste fármaco em micropartículas poliméricas vem sendo estudada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas utilizadas para preparação das micropartículas, encapsulação com quitosana, reticulação e técnicas utilizadas na caracterização são apresentadas no fluxograma da Figura 13.

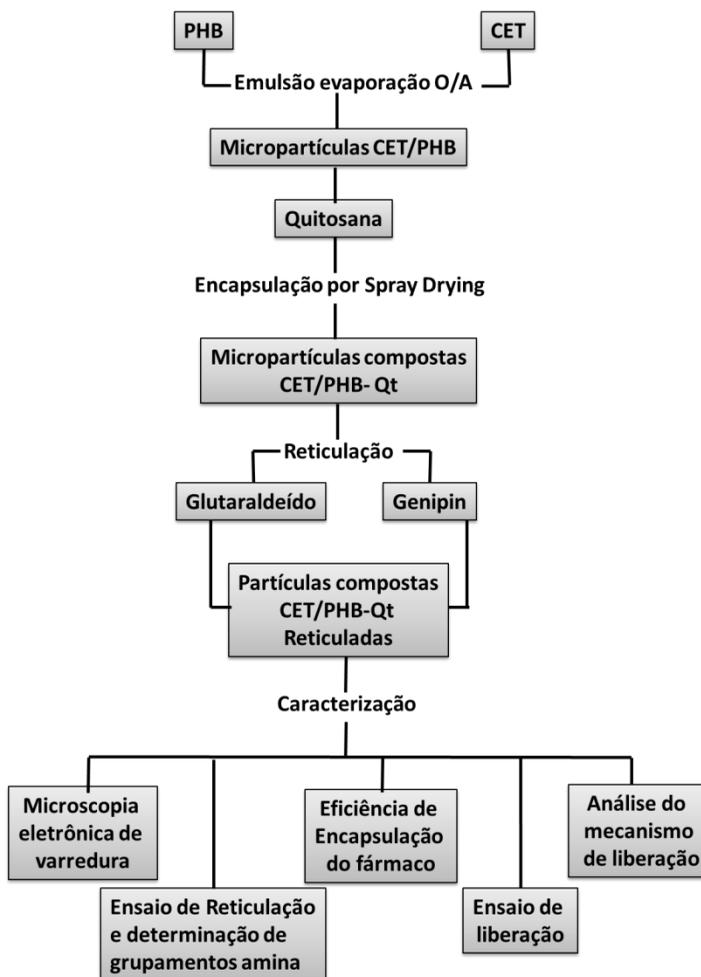


Figura 13- Fluxograma do procedimento experimental.

4.1 OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

4.1.1 Materiais

O PHB ($M_n = 312.800 \text{ g mol}^{-1}$ e grau de polidispersão de 1,23, determinado através de cromatografia de permeação em gel) foi doado pela PHB Industrial (Serrana, SP). O cetoprofeno foi adquirido da All Chemistry (São Paulo, SP) e o poli(álcool vinílico) (massa molar de $92.000 \text{ g mol}^{-1}$, conforme especificação do fabricante) da Vetec (Rio de Janeiro, RJ). Isopropanol (Nuclear) e o diclorometano (Vetec) foram utilizados sem prévia purificação. Quitosana (cat.3419419, Sigma-Aldrich Chemical) massa molar média, $MM = 161.000 \text{ g mol}^{-1}$, grau de desacetilação, $GD = 75\text{-}85\%$, utilizada sem purificação adicional. genipin (grau de pureza $>98\%$ determinado por ensaio de HPLC, Challenge Bioproducts, Taiwan). Glutaraldeído P.S. Vetec Química Fina Ltda (25 % em água).

4.1.2 Obtenção das micropartículas PHB/CET

A preparação das micropartículas de CET/PHB foi realizada de acordo com a metodologia de Bazzo e colaboradores (BAZZO, LEMOS-SENNA e PIRES 2009), sendo a avaliação das condições do processo, a eficiência de encapsulação desse fármaco e estudos de liberação, fatores de grande interesse para serem estudados.

O encapsulamento do fármaco cetoprofeno em uma matriz polimérica foi seguido utilizando a técnica de emulsão e evaporação do solvente. O método de emulsão e evaporação do solvente consiste em dissolver o polímero e o fármaco em um solvente orgânico e seguido de emulsificação em uma solução aquosa, com um estabilizante ou emulsificante, sob agitação. A evaporação do solvente orgânico, realizada em temperatura adequada, leva à formação das micropartículas.

A fase interna da emulsão foi constituída por 500 mg de PHB, que foi previamente fundido a 180°C e resfriado em banho de gelo, para solubilização do fármaco no polímero, e 200 mg do fármaco CET, solubilizados em 20 mL de diclorometano (fase oleosa ou fase interna). A emulsificação foi feita em 200 mL de uma solução aquosa contendo 0,1% (m/v) de PVAL como estabilizante (fase aquosa ou fase externa).

Foram adicionados 6% (v/v) de co-solvente isopropanol para promover uma rápida eliminação do solvente da fase interna. Nesse caso, a adição de isopropanol aumentou a solubilidade do diclorometano na fase aquosa, facilitando a sua extração. A adição de um co-solvente que tenha elevada afinidade pela fase externa promove a rápida eliminação do solvente da fase interna, contribuindo a aceleração da solidificação das micropartículas e, conseqüentemente, dificultar a migração do CET para a fase externa, promovendo a sua encapsulação no interior das partículas.

A emulsão foi mantida sob agitação, em um agitador magnético a 600 rpm, à temperatura ambiente, até a completa evaporação do solvente orgânico. As micropartículas foram lavadas com água destilada, decantadas, secas à temperatura ambiente e armazenadas. O esquema de obtenção das micropartículas está representado na Figura 14.

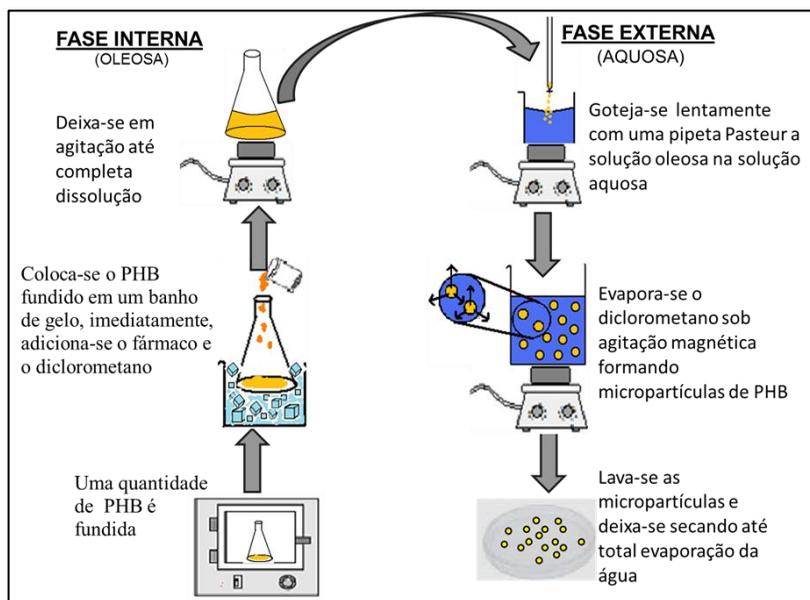


Figura 14 - Esquema de obtenção das microesferas através do método emulsão evaporação do solvente O/A.

4.1.3 Obtenção das micropartículas compostas a partir da técnica de *spray drying*

Micropartículas compostas, do tipo *core shell*, foram preparadas realizando um recobrimento com a Quitosana através da técnica de *spray drying*. O equipamento utilizado para a secagem foi um Mini Spray Dryer “B-290”, conforme ilustrado na Figura 15.



Figura 15 – Spray Dryer - Büchi Mini Spray Dryer B-290.
Fonte: Site do fabricante (Buchi Inc.,2009)¹

O princípio da técnica *spray drying*, ou secagem por nebulização, é o processo de obtenção de partículas esféricas e de escoamento livre através da pulverização de uma solução ou suspensão, com formação de gotículas e secagem em uma corrente de ar quente. Simplificadamente, o processo pode ser descrito como o bombeamento do líquido até o pulverizador, onde é aspergido na forma de *spray* até a câmara de secagem, onde é seco pelo ar quente, transformando assim, gotas líquidas em partículas sólidas, que são recolhidas no ciclone ou em outro sistema de coleta de pó (LIMA 2008).

A concentração e composição da formulação inicial pode ter um efeito apreciável na estrutura da partícula, pois o tamanho da gota

¹ Acesso em: 15 jun. 2012. Disponível em:
http://www.buchi.com/index.php?eID=tx_cms_showpic&file=uploads%2Fpics%2Fb-290_1_big.jpg&width=2000m&bodyTag=%3Cbody%20style%3D%22background-color%3A%20%23fff%3B%22%3E&wrap=%3Ca%20href%3D%22javascript%3Aclose%28%29%3B%22%3E%20%7C%20%3C%2Fa%3E&md5=92dfc6f34e95b8db9f50f3eef8e8eb4.

formada está diretamente relacionado com o tamanho das partículas obtidas. Quando micropartículas suspensa em uma solução polimérica é injetada no *spray dryer* irá resultar em um aprisionamento ou recobrimento da micropartícula por esta matriz. Assim, variando a concentração da solução polimérica diferentes espessuras de recobrimento da micropartícula composta poderão ser obtidas.

Para se obter micropartículas compostas menos porosas e aumentar a barreira difusional do fármaco foram preparadas soluções de quitosana com diferentes concentrações, 1%, 1,5% e 2% (m/v) em 100 mL de solução de ácido acético 1% (v/v). Deixou-se as soluções de quitosana sob agitação magnética durante um período de 24 h para total solubilização do polímero.

A estas soluções de quitosana, em diferentes concentrações, foram adicionadas 1g de micropartículas CET/PHB (preparadas conforme o esquema da Figura 14), formando uma dispersão. Em seguida, foram submetidas à pulverização e secagem no equipamento *spray dryer*, conforme o esquema da Figura 16.

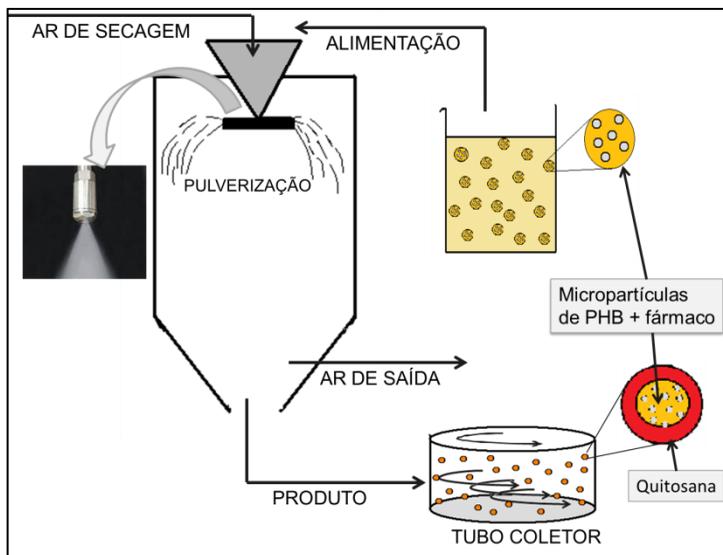


Figura 16 Esquema de preparação de micropartículas compostas de PHB/CET com quitosana pela técnica de spray drying

O contato gota/ar de secagem ocorre quando as gotas caem pela câmara de secagem no mesmo sentido do fluxo de ar de secagem. Dessa forma, a temperatura final do produto é menor que a temperatura de entrada. Sendo a solução submetida a um ar de secagem abaixo da temperatura de degradação dos polímeros, PHB e quitosana, e do fármaco, ocorrendo uma rápida evaporação do solvente.

A direção e a uniformidade da velocidade do fluxo de ar pela câmara influenciam na qualidade do produto final. O desenho da distribuição do ar quente deve prevenir um superaquecimento local ao mesmo tempo deve garantir a secagem das partículas antes que alcancem as paredes da câmara de secagem (FILKOVÁ e MUJUMDAR 1995).

As partículas são removidas por um tubo perpendicular na parte inferior do equipamento a uma temperatura entre 60 e 100°C, ou seja, temperaturas mais baixas que a do ar de entrada. Estas partículas removidas são arrastadas pelo ar, sendo depositados na parte inferior do equipamento em um tubo coletor separado submetidas a um ciclone para recuperar partículas menores através da força centrífuga (GAVA 1983).

Os parâmetros para pulverização e secagem das micropartículas foram fixados para todos os experimentos:

- Inlet (temperatura de entrada da câmara de ar de secagem) = 180°C
- Outlet (temperatura de saída da câmara de ar de secagem) = 18°C
- Aspirator (vazão de ar de secagem) = 100%
- Pump (vazão da bomba peristáltica) = 25%
- Tempo médio (duração da pulverização de toda a solução) = 30 min.

4.1.4 Reticulação das micropartículas

A reticulação oferece uma estabilidade em certas propriedades físico-químicas da quitosana, entretanto menores concentrações de agente reticulante devem ser usadas para não inibir as propriedades mucoadesivas da quitosana (GENTAA, et al. 1998). Para reticulação das cadeias macromoleculares de quitosana na superfície das micropartículas de CET/PHB empregam-se glutaraldeído e genipin, como agentes reticulantes. A estequiometria da reação é de 1mol de agente reticulante para cada 2 mol de unidade de repetição da cadeia macromolecular de quitosana.

Para manter os mesmos parâmetros quanto a concentração de ambos agentes reticulantes, foi mantido a mesma proporção entre o número de mols de ambos agentes reticulantes com a quitosana, 1 mol de agente reticulante para 10 mols da unidade de repetição da cadeia macromolecular de quitosana.

4.1.4.1 Reticulação com Glutaraldeído

A reticulação da quitosana é expressivamente dependente do pH sendo a reação de formação de imina favorecida em melhores condições em pH levemente ácido ou neutro para que ocorra a saída do grupamento OH_2 . Porém, valores de pH muito baixos podem favorecer a completa protonação da amina (GRUPTA e JABRAIL 2006). Neste trabalho, micropartículas de CET/PHB recobertas com quitosana foram reticuladas à temperatura ambiente em uma solução tampão fosfato aquosa, pH 7,4, com glutaraldeído.

A Figura 17 apresenta o fluxograma do processo de reticulação do filme de quitosana sobre as micropartículas de CET/PHB.

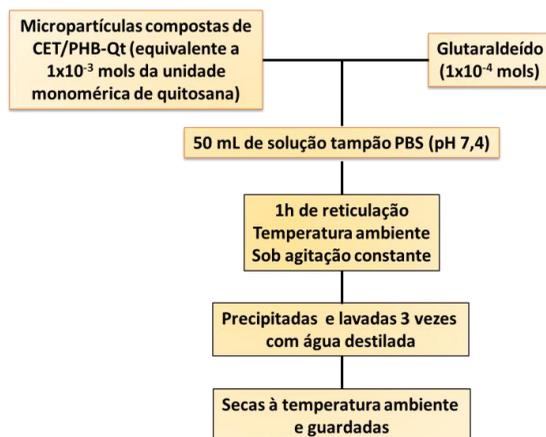


Figura 17 – Fluxograma do processo de reticulação das micropartículas compostas de CET/PHB-Qt pelo agente reticulante glutaraldeído.

Oliveira e colaboradores (2006) verificaram que em 10 min obtiveram um grau de reticulação máximo para a reação da quitosana em presença de solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) (OLIVEIRA e VIEIRA 2006). Neste trabalho optou-se por manter o sistema reacional por um tempo de 1h.

Micropartículas compostas com filmes de quitosana depositado a partir de soluções aquosas de quitosana na composição de 1%, 1,5% e 2% (m/v) foram imersas em solução aquosa de glutaraldeído contendo 1×10^{-4} mol para 1×10^{-3} mol da unidade repetição estimada de quitosana. Estas quantidades molares foram utilizadas para se manter uma proporção de 1:10 de grupos reacionais, com excesso de unidades de repetição da quitosana. Em seguida, as micropartículas foram lavadas três vezes com água destilada para a remoção de glutaraldeído livre, secas à temperatura ambiente e armazenadas.

4.1.4.2 Reticulação com genipin

Inicialmente uma solução de genipin contendo 1×10^{-4} mol foi preparada em solução TRIS (pH 10). Posteriormente, determinadas quantidades de micropartículas foram adicionadas à solução de genipin, mantendo a proporção de 1:10 de mol de genipin para 1 mol da unidade de repetição da quitosana.

A Figura 18 apresenta o fluxograma do processo de reticulação do filme de quitosana sobre as micropartículas de CET/PHB.

As micropartículas compostas foram mantidas sob agitação e temperatura ambiente por um período de 6 h. Após, as micropartículas foram lavadas três vezes com água destilada para remoção do genipin livre, secas à temperatura ambiente e armazenadas.

Mi e colaboradores (2005) investigaram a influencia do pH na reticulação da quitosana pelo genipin, pelos resultados relatados verificou-se que em pH 1,2 (ácido forte) e 13,6 (base forte) as reticulações de micropartículas de quitosana não foram tão eficientes. Logo, essas reações levam à formação de diferentes extensões de reticulação, os quais, por sua vez, irão influenciar as propriedades de intumescimento e degradabilidade das partículas (MI, SHYU e PENG 2005). Com base em tais resultados selecionou-se pH 10 para garantir a reticulação da quitosana no desenvolvimento deste trabalho.

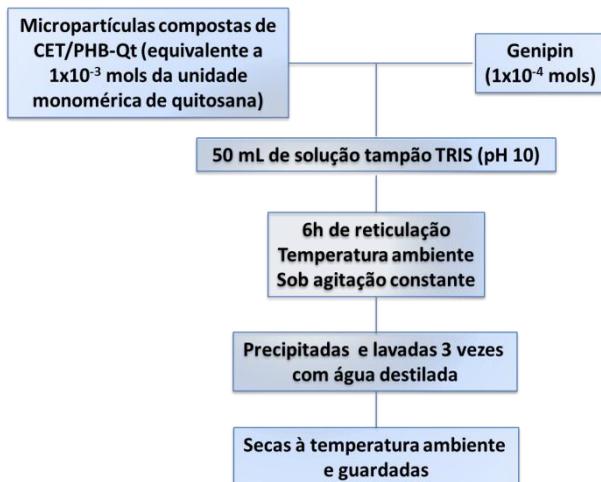


Figura 18 - Fluxograma do processo de reticulação das micropartículas compostas de CET/PHB-Qt pelo agente reticulante genipin.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

4.2.1 Materiais

Foram utilizados ácido acético glacial (P.A.) (Vetec), Ninhidrina P.A. pH (1%, 20°C) (Nuclear), Etilenoglicol P.A. Teor mín. 99,5% (Vetec), Cloreto de estanho anidro (P.A.) (dosagem mín. 97%) (Vetec).

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das micropartículas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras de cada formulação foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro em um metalizador Bal-Tec MD 020 (Balzers) e observadas em um microscópio eletrônico Philips XL30.

4.2.3 Determinação de Grupamento Amina

A determinação dos grupamentos amina livres na superfície das micropartículas compostas reticuladas foram determinados por ensaio de ninidrina segundo a metodologia discutida por Yuan e colaboradores (YUAN, et al. 2007). O ensaio determina a percentagem de grupos amino livres remanescente na micropartículas com quitosana após reticulação.

A solução ninidrina foi preparada da seguinte maneira: Solução A: 1 mL de ácido acético, 10 mL ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) de NaOH e 0,04 g de SnCl_2 foram misturados a 25 mL de água destilada e mantida sob agitação mecânica por 30 min. Solução B: 1 g Ninidrina foi adicionado a 25 mL de etileno glicol e mantida sob agitação mecânica, até a solubilização da ninidrina. As duas soluções A e B foram misturadas e mantidas sob agitação mecânica durante 45 min, em seguida a solução foi armazenada em um frasco de âmbar.

Para o ensaio 10 mg de micropartículas de CET/PHB-Qt reticuladas e não reticuladas foram colocadas em tubos de ensaio com 4 mL de uma solução de ninidrina (pH 3,5) a uma temperatura de 100°C durante o período de 20 min. O produto foi resfriado até a temperatura ambiente e após a absorvância desta solução foi medida em um espectrofotômetro UV (Spectrophotometer model Nova 1800 UV) com um comprimento de onda fixado em 570 nm.

A percentagem de grupamentos amina livre das micropartículas após a reticulação foi obtido fazendo uma razão das medidas de absorvâncias de grupamento aminos livre de partículas reticuladas com as partículas não reticuladas, conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ de Grupamentos amina livre} = \frac{Abs_{Ret}}{Abs_{NRet}} \times 100 \quad (6)$$

Em que:

Abs_{Ret} = absorvâncias de grupamento aminos livre de partículas reticuladas.

Abs_{NRet} = absorvâncias de grupamento aminos livre de partículas não reticuladas.

4.2.4 Eficiência de Encapsulação do Fármaco

Para a determinação do teor de CET nas micropartículas foi utilizado o método de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta. Foram pesadas micropartículas que correspondessem a uma massa conhecida de fármaco (da ordem de 10 mg), considerando-se uma eficiência de encapsulação de 100 %. Após a adição de 10 mL de clorofórmio, as amostras foram mantidas em frascos vedados, sob agitação durante 72 horas. Em seguida, a solução foi diluída até a concentração estimada de 10 mg L⁻¹ e a absorbância foi determinada em 254 nm, utilizando clorofórmio como branco. O teor de fármaco nas micropartículas foi calculado a partir de uma curva de calibração (BAZZO, LEMOS-SENNA e PIRES 2009).

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada através da equação 7:

$$EE\% = \frac{\text{quantidade de fármaco encapsulado}}{\text{quantidade de fármaco adicionado}} \times 100 \quad (7)$$

4.2.5 Ensaio de Liberação do fármaco *in vitro*

Micropartículas contendo o equivalente a 10 mg de fármaco foram colocadas em frascos vedados, seguido da adição de 45 mL de tampão fosfato pH 7,4, sob condição *sink*, isto é, em meio de dissolução com concentração do fármaco equivalente a até 10% da concentração de saturação, e mantidas em banho-maria Quimis Dubnoff, a 37± 2°C, sob agitação. Em intervalos pré-determinados, foram retiradas alíquotas de 4 mL, para determinação da absorbância (BAZZO, LEMOS-SENNA e PIRES 2009). A concentração de CET no meio foi determinada através de espectrofotometria de absorção na região do UV, em $\lambda_{\text{máx}} = 260$ nm. Utilizando uma curva de calibração de fármaco calculou-se a percentagem de CET liberada para o meio em função do tempo, em que a faixa de concentração de 0,040 mg L⁻¹ (limite de detecção) e 15,0 mg L⁻¹ (limite de quantificação) foram calculados previamente.

4.2.6 Análise estatística da liberação

Os dados obtidos no ensaio de liberação foram avaliados através de análise estatística, com o objetivo de avaliar a influência da

concentração de quitosana empregada no preparo das micropartículas compostas e o emprego da reticulação sobre o efeito *burst* e o prolongamento da liberação do fármaco. Os valores percentuais de fármaco liberado em 1 h foram utilizados para comparar as formulações testadas com relação ao efeito *burst*. A área sob a curva dos perfis de dissolução foi estabelecida como resposta para avaliar a capacidade dos sistemas em prolongar a liberação do cetoprofeno.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada com o auxílio do software Design-Ease[®], seguida do teste de Tukey, empregando-se o software GraphPad Prism[®].

4.2.7 Análise do mecanismo de liberação

Tratamentos matemáticos envolvendo a liberação de fármacos a partir de carregadores são amplamente descritos na literatura. Com intuito de investigar a influência da morfologia dos sistemas na liberação *in vitro* do fármaco modelo cetoprofeno, bem como os mecanismos envolvidos nesse processo, o modelo de Baker-Lonsdale baseado nas considerações de Higuchi, foi aplicado aos dados experimentais pela equação abaixo:

$$\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (2)$$

Em que,

$\frac{M_t}{M_\infty}$ = fração do fármaco liberado no tempo t

k = constante de liberação

t = tempo (h)

Os perfis de liberação do CET foram modelados utilizando os modelos monoexponencial (Equação 4) e biexponencial (Equação 5). A seleção do modelo foi baseada no melhor valor de coeficiente de correlação do ajuste da curva experimental para cada um dos dados. A modelagem matemática dos dados foi feita no programa Oringin[®] 8.0 para analisar os perfis de liberação.

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (4)$$

$$A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} \quad (5)$$

Em que:

C = concentração (% de fármaco liberado)

A = quantidade de fármaco liberado na velocidade α ;

B = quantidade de fármaco liberado na velocidade β ;

α , β e k = constantes de liberação;

C_0 = concentração de fármaco no tempo zero.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 MORFOLOGIA DAS MICROPARTÍCULAS

As imagens obtidas por microscopia eletrônica das micropartículas de CET/PHB e CET/PHB-Qt permitiram a visualização de partículas densas com formato esférico. No entanto, as partículas de CET/PHB antes do recobrimento com a quitosana apresentam poros na sua superfície e uma superfície externa bastante rugosa (Figuras 19-A e 20-A). Segundo Martin e colaboradores, a rugosidade da matriz polimérica está relacionada ao elevado grau de cristalinidade do PHB e é normalmente observada em microesferas de PHB preparadas através da técnica de emulsão-evaporação do solvente (MARTIN, et al. 2000).

Nas micrografias das partículas preparadas através da técnica de *spray drying* com soluções de quitosana de 1%, 1,5% e 2 % (m/v) pôde-se observar que as micropartículas de CET/PHB recobertas com quitosana apresentam características de textura da superfície diferentes, os quais são uma forte evidência do efetivo recobrimento, conforme micrografias apresentadas (Figuras 19 B, C e D). As micropartículas recobertas por quitosana através da técnica de *spray drying* apresentam-se com características semelhantes a da quitosana pura, ou seja, com uma superfície lisa e pouco porosa.

Observa-se através das micrografias que micropartículas de CET/PHB apresentaram o tamanho médio de 50 a 60 μm corroborando com os resultados obtidos pela técnica de tamanho e distribuição de micropartículas Mastersizer 2000. Já micropartículas recobertas com quitosana apresentaram, também, através da técnica de tamanho e distribuição um tamanho médio de 91,20 μm cercadas por partículas satélites de 20 μm compostas apenas por quitosana. Tais resultados estão em conformidade com estudos de He e colaboradores no preparo de micropartículas de quitosana por *spray drying* (HE, DAVIS e ILLUM 1999).

As micropartículas recobertas com 2% de quitosana apresentaram um maior volume de micropartículas com o tamanho de 91,2 μm , isto indica que com o aumento da concentração de quitosana o recobrimento das micropartículas de CET/PHB foi mais efetivo apresentando-se em maior quantidade. Visto que o *spray drying* é um processo muito rápido, a arquitetura da gota é fixa e reflete a estrutura da partícula seca formada. Logo, quando as gotículas da solução de quitosana contendo as micropartículas de CET/PHB são aspergidas no tubo de secagem do

spray ocorre uma secagem rápida do solvente da quitosana levando a um aprisionamento da micropartícula.

Assim o aumento da viscosidade da solução, quando se utilizou uma maior concentração de quitosana facilitou a incorporação das microesferas de CET/PHB no interior das gotículas de solução, originando micropartículas compostas mononucleadas após a evaporação do solvente. Porém apesar de ser clara a diferença nas superfícies das micropartículas recobertas com quitosana ainda se observa uma leve rugosidade na superfície das micropartículas recobertas com uma concentração de quitosana mais baixa, devido ao recobrimento com uma fina camada de quitosana em algumas micropartículas.

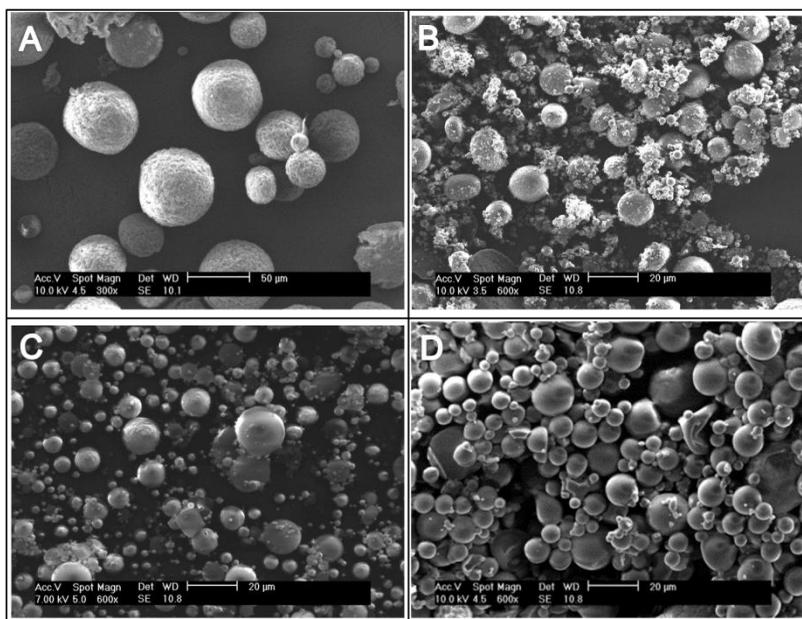


Figura 19 – Micrografias de microscopia eletrônica de varredura ampliada por um fator 600X de micropartículas com seguintes formulações: **A**- micropartícula de CET/PHB, **B**- micropartícula de CET/PHB-1%Qt, **C**- micropartícula de CET/PHB-1,5%Qt e **D**- micropartícula de CET/PHB-2%Qt.

Nas micrografias (Figura 20) é possível observar que micropartículas preparadas a partir de uma menor concentração de quitosana apresentaram uma menor viscosidade da solução, resultando em uma morfologia da superfície ligeiramente enrugada devido à fina

camada de recobrimento. Enquanto micropartículas preparadas a partir de uma solução com uma viscosidade mais elevada de quitosana apresentaram uma superfície mais lisa, o que se mostra coerente com a literatura pesquisada (HE, DAVIS e ILLUM 1999).

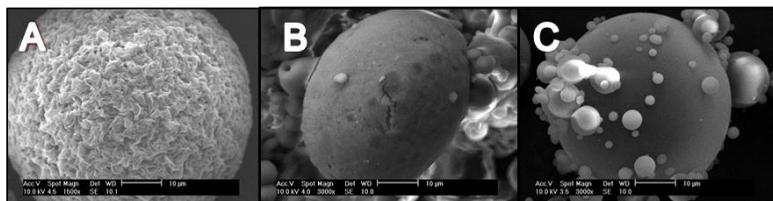


Figura 20 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura ampliadas por um fator 3000X de micropartículas com seguintes formulações: **A**-micropartícula de CET/PHB, **B**- micropartícula de CET/PHB-1%Qt e **C**-micropartícula de CET/PHB-2%Qt.

Não foram observados cristais de CET aderidos à superfície dessas partículas. Estudos realizados por Bazzo e colaboradores relataram que não ocorre forte adesão interfacial das microesferas de polímero/fármaco com a matriz de quitosana, conforme pode ser observado pelas micropartículas de CET/PHB-Qt (BAZZO, LEMOS-SENNA e PIRES 2009).

Também foram analisadas por microscopia eletrônica as micropartículas de CET/PHB-Qt após a reticulação da quitosana (Figura 20 e 21). As micropartículas reticuladas mantiveram-se com uma superfície lisa, apesar de ter ocorrido uma pequena distorção na esfericidade das partículas, especialmente para micropartículas reticuladas com uma menor quantidade de quitosana.

O fato de esta agregação ter ocorrido pode ser devido à formação das ligações covalentes entre os grupamentos amina da quitosana e o agente reticulante, que forma uma rede de ligações cruzadas ocorrendo assim a agregação das micropartículas. A interação dos polímeros de PHB e quitosana em micropartículas compostas é devido à formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos carbonila do poliéster com os grupamentos hidroxila e amina da quitosana (IKEJIMA e INOUE 2000). Caneluras de conexões de quitosana e agente reticulante entre as partículas esféricas são constituídas devido à formação de iminas devido à reticulação.

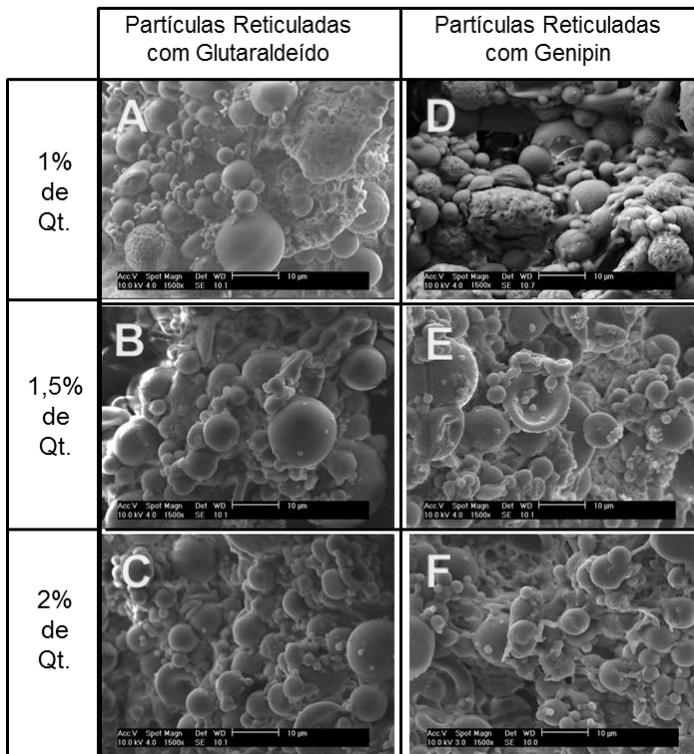


Figura 21 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura ampliadas por um fator 1500X de micropartículas de seguintes formulações: **A**, **B** e **C**-micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de Qt respectivamente, reticuladas com glutaraldeído, **D**, **E** e **F**- micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de Qt respectivamente, reticuladas com genipin.

Como pode ser visualizado nas Figuras 21-A e 21-B, nas micropartículas recobertas com 1% de quitosana as distorções foram mais acentuadas. Pode-se supor de que com uma concentração menor de quitosana há uma menor quantidade de grupamentos hidroxila e amina que formam as ligações de hidrogênio com o PHB. Já nas micropartículas com 1,5% e 2% de quitosana essa distorção foi menor, pois possuíam uma quantidade de grupamentos suficiente para formação de pontes de hidrogênio e de aminas sucessíveis para a formação de ligações com o agente reticulante.

Na Figura 22 pode-se observar que houve um leve aumento de rugosidade na superfície de partículas após a liberação. Este aspecto de maior rugosidade das partículas após a liberação pode ser devido a difusão do fármaco pela matriz. Todavia, não houve uma mudança significativa na morfologia das partículas após a liberação.

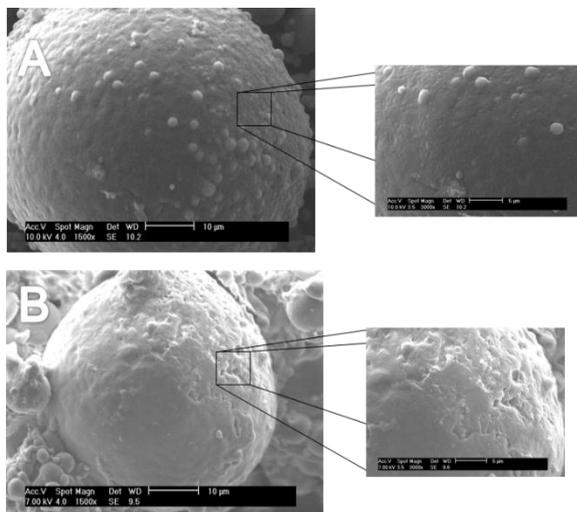


Figura 22 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura ampliadas por um fator 1500X de micropartículas com as seguintes formulações: **A**-micropartículas de CET/PHB recobertas com 1,5% de Qt antes da liberação, **B**-micropartículas de CET/PHB recobertas com 1,5% de Qt após a liberação.

5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO FÁRMACO

A eficiência de encapsulação de fármacos no interior de micropartículas poliméricas compostas preparadas através da técnica de emulsão-evaporação do solvente e da técnica de *spray drying* depende das características físico-químicas do fármaco e do polímero, bem como das condições utilizadas no processo, como o tipo e volume dos solventes das fases interna e externa da emulsão, a proporção fármaco/polímero, o tipo e concentração do estabilizante, entre outros.

Na Tabela 1 encontram-se os resultados da eficiência de encapsulação do cetoprofeno nas micropartículas de PHB-Qt.

Tabela 1 - Eficiência de encapsulação do fármaco nas micropartículas compostas.

Micropartículas compostas de CET/PHB-Qt			
Teor de Qt (% em m/v)	Não Reticuladas (%)	Reticuladas com Glutaraldeído (%)	Reticuladas com Genipin (%)
1	52,5 ± 0,4	52,2 ± 0,3	54,5 ± 0,5
1,5	53,2 ± 0,3	53,6 ± 0,4	56,0 ± 0,3
2	62,0 ± 0,1	58,4 ± 0,1	61,3 ± 0,2

O teor de fármaco nas micropartículas foi determinado para as micropartículas com CET/PHB; e posteriormente para micropartículas compostas com /CETPHB/Qt reticuladas e não reticuladas. Através da diferença entre a quantidade de fármaco inicialmente empregada no preparo das micropartículas, considerando-se uma eficiência de encapsulação de 100 % e a quantidade perdida para o meio, o teor de fármaco nas micropartículas foi determinado e o resultado foi expresso em %.

Para as micropartículas de CET/PHB obteve-se o valor médio de encapsulação de 64,0% ±0,2. Resultados semelhantes foram encontrados por Bazzo e colaboradores ao prepararem tais micropartículas com planejamentos fatoriais para maiores teores de fármaco encapsulado (BAZZO, LEMOS-SENNÁ e PIRES 2009). Para as micropartículas compostas de CET/PHB/Qt obteve-se valores de eficiência de encapsulação de 52,5%, 53,2% e 62,0% para concentrações de quitosana de 1%, 1,5% e 2%, respectivamente, podendo-se concluir que não houve perda de fármaco durante a técnica de encapsulação por *spray drying*.

O teor de CET presente nas micropartículas compostas sofreu uma pequena variação em função da concentração de quitosana no recobrimento das partículas. As gotículas mais densas da solução contendo uma maior concentração do polímero podem ter dificultado a difusão do fármaco para o meio externo, originando os teores mais altos de CET nas micropartículas compostas.

Resultados semelhantes foram obtidos por He e colaboradores ao prepararem microesferas de quitosana com 0,1 e 0,2% (m/v) contendo cimetidina. Maiores valores de EE% foram obtidos quando a concentração do polímero na fase externa foi aumentada, sendo justificada pela formação de gotículas mais densas as quais dificultaram

a difusão da cimetidina para a fase externa, originando elevados valores de EE% (HE, DAVIS e ILLUM 1999).

Os valores de percentagem de eficiência de encapsulação indicaram que uma pequena quantidade de fármaco foi perdida para o meio durante o preparo das micropartículas compostas. O processo de encapsulação por secagem é um processo rápido em que micropartículas de CET/PHB ficam pouco tempo em contato com o meio ácido. A solubilização dos fármacos na solução de ácido acético poderia levar à consequente perda do princípio ativo para a fase externa durante o processo de preparação. Ao prepararem micropartículas compostas de CET/PHB recobertas com quitosana através da técnica de emulsão e evaporação do solvente, Bazzo e colaboradores (2009) evidenciaram uma perda significativa de fármaco para o meio externo durante o processo, o que levou a uma diminuição significativa da eficiência de encapsulação (BAZZO, LEMOS-SENNA e PIRES 2009). Conforme mencionado anteriormente, essa perda de fármaco foi minimizada através do emprego da técnica de *spray drying*.

Sendo assim, os valores de EE% menores do que 100% são decorrentes da solubilização do fármaco próximo à superfície externa das partículas CET/PHB na preparação por emulsão/evaporação e também à perda de fármaco para o meio à solução de ácido acético durante o processo de *spray drying*.

Comparando os teores de ativo antes e após a reticulação, não foram observadas variações significativas no teor de fármaco, conforme os valores listados na Tabela 1. O CET tem uma baixa solubilidade em meio básico, e como as partículas foram reticuladas em pH 7,4 e 10,0, para o glutaraldeído e genipin, respectivamente, a permanência do fármaco nas partículas durante a reticulação foi favorecida, mantendo os valores de EE% praticamente os mesmos.

5.3 ENSAIO DE RETICULAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE GRUPAMENTOS AMINA

A ninidrina é um poderoso agente oxidante que reage com aminoácidos, e normalmente é utilizada na detecção de aminoácidos por apresentar a uma função amina primária. Quando um aminoácido é aquecido com Ninidrina forma-se um composto intensamente corado, conhecido como Púrpura de Rühemann. Todos aqueles que têm grupamentos amino livre produzem este composto, no qual a intensidade

da cor é proporcional à concentração de espécies presentes (aminoácidos, peptídeos ou proteínas) (RETINGER 1916).

Na reação com quitosana (Figura 23) a solução de ninidrina assume uma forma colorida, essa coloração é devida a presença da camada de valência livre ou pelo número ímpares de elétrons (cromóforos) apresentando uma frequência baixa, o suficiente para absorver a luz do visível. Entretanto, isto deixa de acontecer quando estas amins formam amins secundárias ou terciárias, neste caso, na reação com um agente reticulante. Em consequência destas ligações, diferentes intensidades de coloração são medidas dependendo da quantidade de amins livres que na solução (YUAN, et al. 2007).

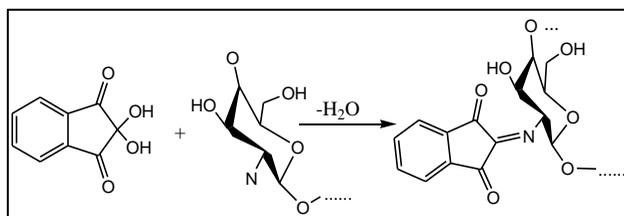


Figura 23 - Representação esquemática da reação de ninidrina com a quitosana.

A reação com a ninidrina foi positiva com todas as micropartículas compostas de CET/PHB-Qt após a reticulação, dessa maneira foi possível calcular as porcentagens de grupamentos amina livre nas micropartículas. As porcentagens de grupamentos amina livres aumentaram conforme o aumento da quantidade de quitosana, 1%, 1,5% e 2%, o que está em conformidade com o esperado, já que com o aumento da quantidade de quitosana uma maior quantidade de grupamentos amina estará disponível (Tabela 2).

Com o cálculo de grupamentos amina livre pôde-se também verificar o grau de reticulação nas partículas, visto que as amins que estão formando ligações covalentes com agente reticulante não regem com a ninidrina. Pela Tabela 2 é possível verificar a paridade entre as porcentagens de reticulações obtidas pelos agentes reticulante glutaraldeído e genipin. Estes resultados estão de acordo com os mecanismos de reação propostos nas Figuras 7 e 10 em que 1 mol de reagente reticulante reage com 2 mols da unidade de repetição da quitosana, uma vez que a proporção em mols utilizadas dos dois

agentes foram exatamente as mesmas (GONSALVES e ARAÚJO 2011).

A porcentagem de reticulação da quitosana é importante, pois se houver um grau de reticulação elevado, as partículas de quitosana perdem suas propriedades bioadesivas. Genta e colaboradores (1998) verificaram que uma grande quantidade de grupamento aminos modificados perderam suas propriedades bioadesivas (GENTAA, et al. 1998).

Tabela 2 – Porcentagens de grupamentos amina livres nas partículas com quitosana.

Teor de Qt (% em m/v)	Partículas reticuladas com glutaraldeído	Partículas reticuladas com genipin
	% grupos aminos livres	
1	43,83 ±0,92	43,03 ±2,09
1,5	55,02 ±1,04	51,03 ±0,97
2	59,97 ±2,29	56,93 ±2,46

A reticulação das micropartículas com o glutaraldeído mostrou-se eficiente em 1 h em solução PBS pH 7,4. O glutaraldeído possui uma alta capacidade de promover ligações cruzadas entre peptídeos. Grupta e colaboradores reticularam partículas de quitosana em diferentes pH e constataram que a reticulação glutaraldeído é alcançada em melhores condições em pH levemente ácido ou neutros para evitar a completa protonação da amina (GRUPTA e JABRAIL 2006).

Mi e colaboradores (2005) investigaram a influência do pH na reticulação da quitosana pelo genipin avaliando a reação dos grupamentos amino da quitosana em pH 5, 7,4 , 9 , 13,4. Os resultados mostraram que na reticulação com pH 13 ocorreu uma polimerização do genipin indicando que genipin pode ser submetidos a uma mudança estrutural em base forte. Em condição acídica, pH 1,2 , o ataque nucleofílico do genipin de carbono C-3 por quitosana é inibida devido à protonação dos grupos amina. Para as duas condições de pH houve um intumescimento das partículas (MI, SHYU e PENG 2005).

Os valores de grau de reticulação foram compatíveis com os valores publicados em estudos de reticulação com genipin por Mi e colaboradores. Os autores pesquisaram a reticulação de filmes de

quitosana com genipin em diferentes condições de pH, em que encontram uma porcentagem de reticulação de 45,4 % para filmes com 1% (m/v) de quitosana reticuladas em pH 9,0 (MI, SHYU e PENG 2005).

Yuan e colaboradores (2007) relataram que o grau máximo de reticulação para partículas de quitosana reticuladas com 0,5mM de genipin, durante 8h, foi de 32%. Os autores atribuem a baixa porcentagem devido à reticulação de apenas as camadas exteriores das micropartículas sendo limitada a reticulação nas camadas mais interna (YUAN, et al. 2007).

Estudos têm demonstrado que a taxa de liberação de fármacos pode ser mudada não somente pelo grau de reticulação de micropartículas, mas também pelo tipo de reticulação usada. As reações de reticulação das micropartículas com quitosana apresentaram diferentes aspectos visuais. As micropartículas recobertas com quitosana apresentam tonalidade bege, quando reticuladas com glutaraldeído ou com o genipin, elas tornaram-se coloridas.

O tratamento das micropartículas com glutaraldeído modificou a sua coloração de bege para laranja após o processo de reticulação da quitosana. Já o tratamento com o genipin modificou a coloração para azul. Resultados análogos foram encontrados por Bazzo e colaboradores (2009) no tratamento com glutaraldeído, e por Yuan e colaboradores (2007) no tratamento com genipin (BAZZO, LEMOS-SENNA e PIRES 2009) (YUAN, et al. 2007). Essa variação de coloração após a reticulação pode ser visualizada na Figura 24.

A cor de substâncias orgânicas é atribuída às ligações insaturadas. Em moléculas orgânicas, geralmente é a conjugação de ligações duplas e simples que gera a cor nestas substâncias. É exatamente a estrutura química da molécula que determina a cor de um composto. A mudança de cor nas micropartículas reticuladas com os diferentes agentes reticulantes é devido ao estabelecimento dessas diferentes estruturas formadas da reação das aminas primárias da quitosana com glutaraldeído ou com genipin.

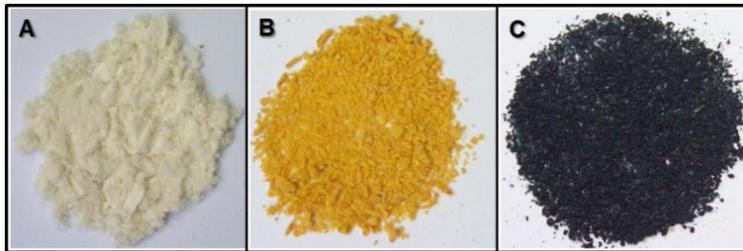


Figura 24 – Aspecto visual da coloração das micropartículas antes e após o tratamento com os agentes reticulante. A- partículas de CET/PHB-Qt antes da reticulação, B- partículas de CET/PHB-Qt após a reticulação com glutaraldeído, C- partículas de CET/PHB-Qt após a reticulação com genipin.

Os produtos formados pela reticulação com o glutaraldeído são através de reações de adição nucleofílica, enquanto com o genipin são por substituição nucleofílica. As reações com glutaraldeído normalmente são mais rápidas do que reações com o genipin. Com o glutaraldeído as reações de reticulação com as duas moléculas de quitosana ocorrem ao mesmo tempo, já com genipin ocorre primeiro um ataque em grupo funcional para a ligação de uma cadeia de quitosana e depois de outro grupo funcional com a quitosana, formando a ligação cruzada. Apesar da reação com genipin ser mais lenta seu produto formado é mais estável, mesmo que ambos agentes reticulantes reajam pelo mesmo grupo funcional, o aldeído. Em outras palavras, o genipin também atua como um dialdeído, mas seus produtos de condensação são muito mais estáveis em comparação com glutaraldeído (BUTLER, YIU-FAI e PUDNEY 2003).

Ligações insaturadas geram fenômenos que ajudam na formação da cor, como a absorção em certos comprimentos de onda da luz, podendo levar à ocorrência de reflexão de uma parte da luz em outros comprimentos de onda (GUARATINI e ZANONI 2000). À medida que o sistema de duplas ligações conjugadas aumenta o comprimento de onda de máxima absorção também aumenta. Por exemplo, enquanto a quitosana reticulada com glutaraldeído têm duas duplas insaturadas apresenta uma cor laranja, (porque absorve parte do azul), e a quitosana reticulada com o genipin apresenta uma cor azul, pois com um sistema conjugado maior, absorve luz de comprimentos de onda também maiores, de amarelo a vermelho. Logo produtos com diferentes saturações geram colorações variadas, como é o caso da quitosana com os agentes reticulantes glutaraldeído e genipin.

5.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A velocidade de liberação de fármacos a partir de sistemas microparticulados pode ser influenciada pela combinação de diversos fatores, como características da matriz polimérica (espessura, porosidade, capacidade de intumescimento), tamanho das micropartículas, localização do ativo no interior das partículas, das propriedades físico-químicas do fármaco e do polímero, entre outros.

Os perfis de liberação de micropartículas de CET/PHB, CET/PHB-Qt e CET/PHB-Qt reticuladas com glutaraldeído e genipin podem ser visualizadas nas Figuras 25, 26 e 28. De maneira geral pôde-se observar que a incorporação de partículas de CET/PHB em uma matriz de quitosana levou a uma pequena diminuição na quantidade de fármaco liberado inicialmente promovendo maior controle da liberação do fármaco.

Experimentalmente, em uma dada temperatura, diferentes quantidades de fármaco são retiradas a um determinado volume de suspensão. Depois de estabelecido o equilíbrio, pela distribuição do fármaco entre a fase fluida e o adsorvente (micropartículas), uma alíquota de cada mistura da concentração do fármaco é determinada no sobrenadante.

A isoterma de adsorção, que expressa a variação da concentração de equilíbrio no adsorvente, é obtida plotando-se os valores de concentração de equilíbrio contra os valores de fármaco liberados em porcentagem. Além disso, uma pequena variação nas quantidades adsorvidas pode induzir a grandes diferenças no perfil de liberação do fármaco, principalmente para aqueles fracamente ligados às micropartículas.

Os perfis de liberação do cetoprofeno das micropartículas de CET/PHB e de CET/PHB com 1%, 1,5% e 2% de quitosana podem ser visualizados na Figura 25. A liberação do CET a partir das microesferas de PHB foi extremamente rápida, apresentando um *efeito burst* inicial bem acentuado, seguido da liberação de 85 % do fármaco após um período de 5h.

A liberação do fármaco das micropartículas de CET/PHB com 1% de quitosana apresentou-se muito semelhante ao das microesferas de PHB/CET, com um pronunciado *efeito burst*, pelo fato das micropartículas terem sido revestidas com uma fina camada de quitosana. Por outro lado, uma diminuição da quantidade de CET liberado e um prolongamento da liberação do fármaco foram observados.

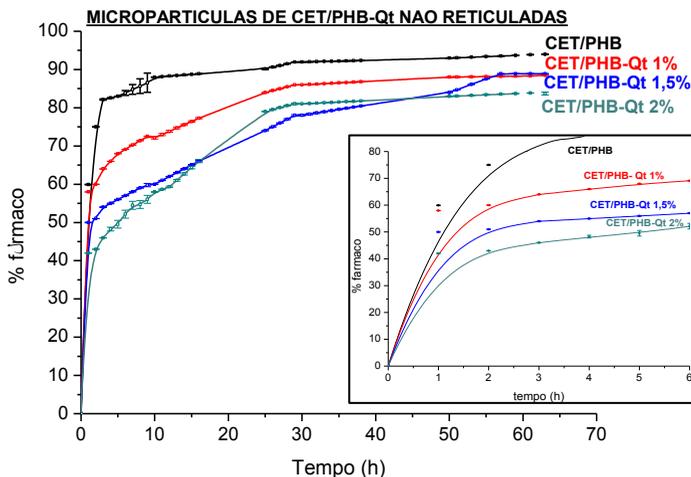


Figura 25 - Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas não reticuladas, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 6 h.

Ocorreu uma diminuição de aproximadamente 10% para partículas de CET/PHB com 1,5% de quitosana e 20% para partículas de CET/PHB com 2% de quitosana da quantidade de CET inicialmente liberada, quando comparadas às micropartículas preparadas apenas com CET/PHB ou CET/PHB com 1% de quitosana. A diminuição do *efeito burst* foi observada especialmente quando as micropartículas tiveram uma matriz mais espessa de quitosana.

Resultados semelhantes foram obtidos por He e colaboradores. Com aumento da concentração de quitosana de 0,1 para 2% em solução aquosa houve uma redução do *efeito burst* na liberação da cimetidina em virtude da maior viscosidade da solução de quitosana (HE, DAVIS e ILLUM 1999).

Micropartículas compostas com quitosana obtidas por *spray drying* permitiram que o fármaco permanecesse encapsulado na partícula interna de PHB tornando a membrana de quitosana uma barreira adicional para a liberação. Estudos realizados por Bazzo e colaboradores (BAZZO, et al. 2008) relataram que a incorporação de partículas de CET/PHB na matriz de quitosana pela técnica de emulsão-evaporação O/A/O apresentou um *efeito burst* menos pronunciado, no entanto as partículas tornaram-se grandes e uma menor EE% foi obtida.

A liberação de fármacos a partir de micropartículas preparadas com quitosana pode ser modificada através da reticulação do polímero, o que torna a matriz mais rígida, compacta e hidrofóbica. Nesse estudo optou-se por utilizar como agente reticulante o glutaraldeído e o genipin, com o objetivo de avaliar a sua influência sobre o perfil de liberação do CET. Os perfis de liberação do CET das micropartículas compostas reticuladas com glutaraldeído encontram-se na Figura 26.

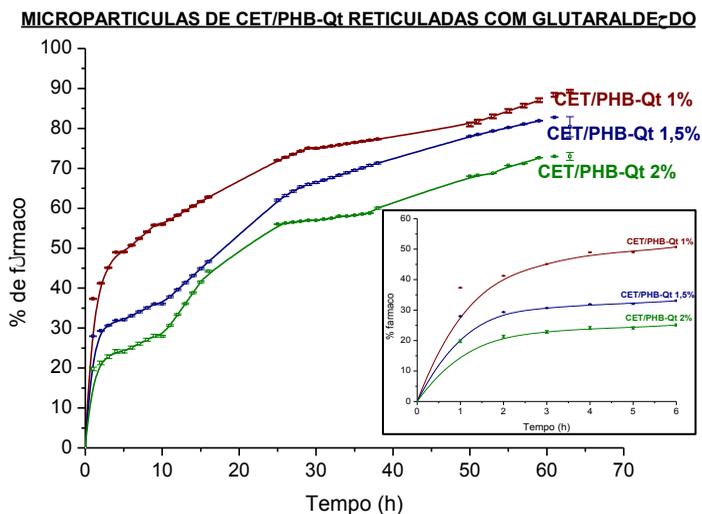


Figura 26 - Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas reticuladas com glutaraldeído, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 6 h.

Os perfis de liberação indicam haver diferenças na liberação do fármaco após a reticulação da quitosana, especialmente nas primeiras horas. Após um determinado período de tempo, uma menor quantidade de fármaco passa a ser liberada, e os perfis de dissolução atingem um platô.

A liberação do fármaco das micropartículas reticuladas com glutaraldeído apresentou uma diminuição considerável em relação às micropartículas não reticuladas. As micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de quitosana diminuíram a liberação na primeira hora em cerca de 20% em comparação às partículas não reticuladas com as respectivas concentrações de quitosana.

Além disso, pôde-se constatar pelos gráficos um efeito de prolongamento na liberação de CET em comparação às partículas não reticuladas com as mesmas concentrações de Qt. Apresentado um aumento no prolongamento na liberação de 12% para partículas com 1% de Qt, 17% para partículas de com 1,5% de Qt. e 27% para partículas com 2% de Qt. O efeito de prolongamento das liberações pode ser calculado comparando a área sob as curvas das liberações.

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de quitosana e a reticulação com glutaraldeído sobre a capacidade das micropartículas em prolongar a liberação do fármaco e diminuir o *efeito burst*, os valores de liberação na primeira hora e a área sob a curva (ASC) dos perfis de liberação (Figura 27) foram analisados através de ANOVA, indicando que ambas as variáveis influenciaram a liberação do CET ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$; $\alpha = 0,05$).

Pela ANOVA pôde-se verificar que houve diferenças significativas entre os valores de ASC das micropartículas compostas não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído, independente da concentração da quitosana utilizada.

Através da aplicação do teste de Tukey demonstrou-se que o aumento da concentração de quitosana de 1% para 1,5% ou 2% diminuiu significativamente a ASC em 72h (Figura 27). Porém o efeito de prolongamento foi mais relevante quando a concentração de quitosana foi aumentada de 1% para 1,5% ($P > 0,05$). Conforme discutido anteriormente, a incorporação das microesferas de PHB na matriz de quitosana provocou uma barreira adicional à difusão do fármaco, prolongando a liberação do ativo por um maior período de tempo. No entanto, apesar de também significativo, o efeito de prolongamento foi menos relevante nos valores de ASC em 72 h quando a concentração de quitosana foi aumentada de 1,5% para 2% ($P > 0,05$).

Para avaliar a influência da concentração de quitosana e da concentração de reticulante sobre o *efeito burst*, os resultados da quantidade de fármaco liberado em 1h (Figura 27) foram analisados. Através da ANOVA verificou-se que as concentrações de quitosana nas micropartículas reticuladas com glutaraldeído influenciaram a quantidade de fármaco liberada na primeira 1 h de ensaio (*burst release*) ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$; $\alpha = 0,05$).

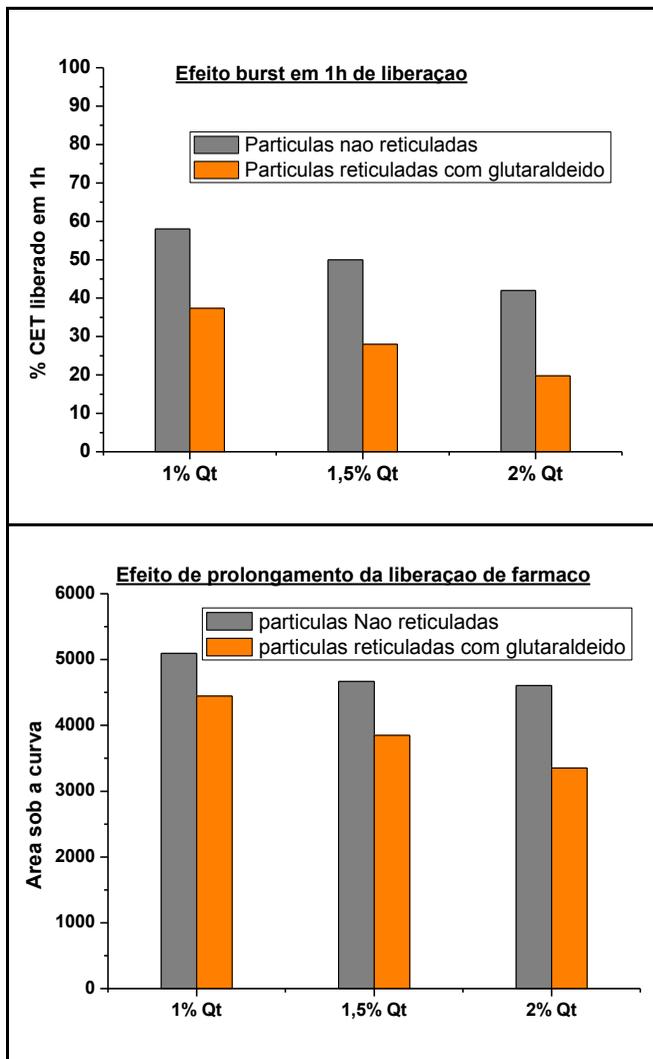


Figura 27 - *Efeito burst* e efeito de prolongamento da liberaçao de micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de quitosana não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído.

A aplicação do teste de Tukey demonstrou que ocorreu uma redução significativa em 1 h de liberação quando a concentração de quitosana foi aumentada de 1% para 1,5% e de 1,5% para 2% ($P < 0,05$), indicando que a redução do *efeito burst* foi efetiva quando se utilizou uma maior concentração de quitosana, tanto antes da reticulação quanto após a reticulação.

A aplicação do teste de Tukey demonstrou, também, que a adição de reticulante diminuiu significativamente a ASC, independente da concentração de quitosana, levando a um prolongamento da liberação do fármaco, em consequência da maior rigidez e hidrofobicidade da matriz.

As taxas de liberação de fármaco podem ser alteradas não só variando a concentração de polímero ou de agente reticulante, mas também o tipo de agente reticulante utilizado. Afim de estudar a liberação do CET a partir das micropartículas compostas de CET/PHB-Qt utilizando um agente reticulante natural, o genipin foi empregado como uma alternativa de agente reticulante para a quitosana.

Os perfis de liberação do CET das micropartículas compostas reticuladas com genipin encontram-se na Figura 28. Assim como o glutaraldeído, houve diferenças na liberação do fármaco após a reticulação da quitosana, especialmente nas primeiras horas, mostrando que o genipin também é um agente reticulante igualmente eficaz.

Em 1 h de liberação micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de quitosana diminuíram a liberação em cerca de 20%, 35% e 30% respectivamente, em comparação às partículas não reticuladas com as respectivas concentrações. O efeito de prolongamento na liberação de cetoprofeno também se mostrou efetivo em comparação às partículas não reticuladas com as mesmas concentrações de Qt, apresentado um aumento no prolongamento na liberação de 13% para partículas com 1% de Qt, 15% para partículas de com 1,5% de Qt. e 20% para partículas com 2% de Qt (Figura 28). Assim como nos resultados de liberação com o glutaraldeído, o efeito de prolongamento das liberações pode ser calculado comparando as ASC dos perfis de liberação.

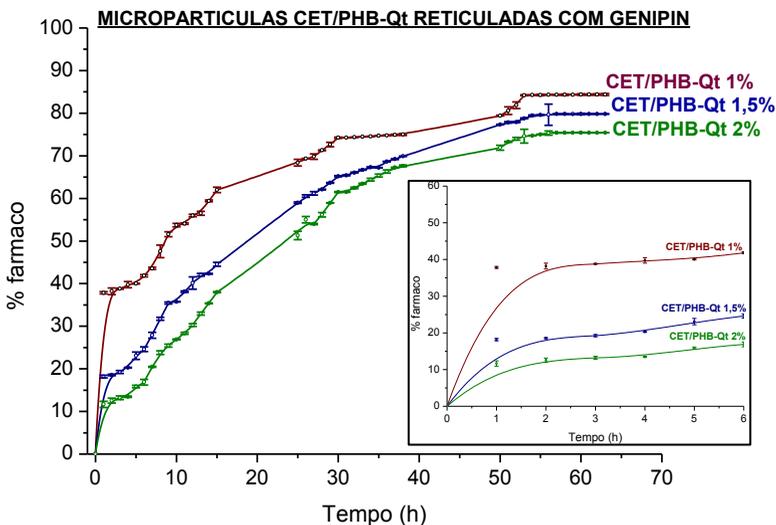


Figura 28 - Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas compostas reticuladas com genipina, em tampão fosfato pH 7,4. O gráfico menor apresenta a faixa de tempo de 0 a 6 h.

Yuan e colaboradores (2007) mostraram que a liberação de albumina a partir de esferas de quitosana tornou-se mais lenta após a reticulação com genipina e a liberação variava com o tempo e a concentração de genipina utilizado (YUAN, et al. 2007).

O efeito da concentração de quitosana e da reticulação com genipina sobre a capacidade das micropartículas em prolongar a liberação dos fármacos e diminuir o *efeito burst* também foram avaliados através da ANOVA (Figura 29) ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$; $\alpha = 0,05$).

O efeito do prolongamento da liberação do cetoprofeno após a reticulação com o genipina também foi significativo em todas as concentrações de quitosana. O teste de Tukey apresentou resultados análogos da liberação com micropartículas reticuladas com glutaraldeído, tendo um prolongamento da liberação do CET mais relevante com o aumento da concentração de quitosana de 1% para 1,5%, do que de 1,5% para 2% ($P > 0,05$).

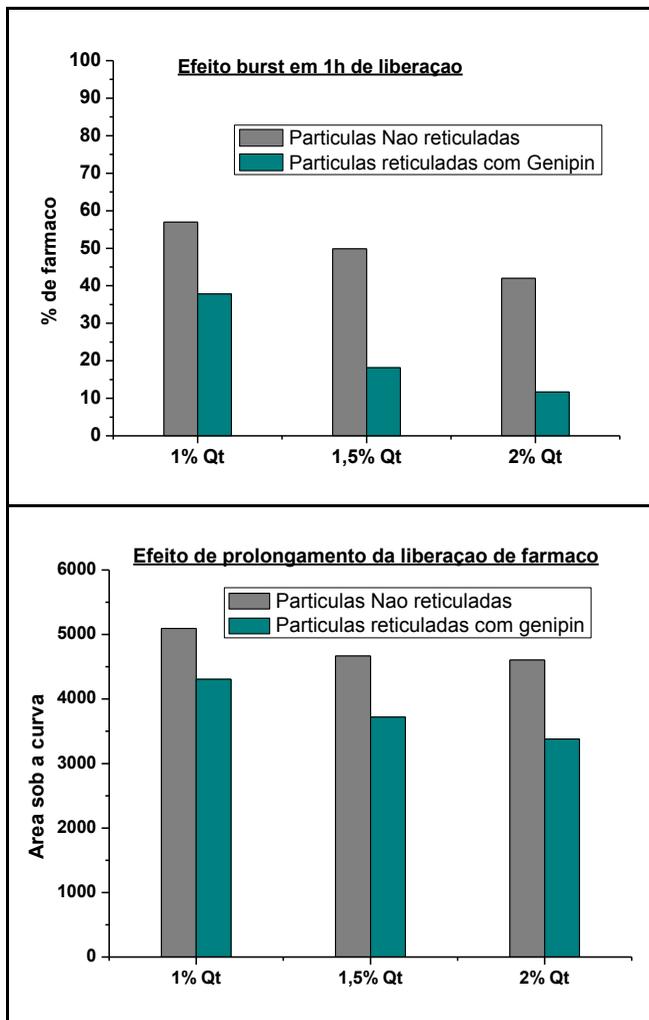


Figura 29 - *Efeito burst* e efeito de prolongamento da liberaçao de micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de quitosana não reticuladas e reticuladas com genipin.

A influência da concentração de quitosana e reticulante sobre o *efeito burst* também foi analisada através da ANOVA, pelos resultados da quantidade de fármaco liberado em 1h (Figura 29). Verificou-se que as concentrações de quitosana após a reticulação com o genipin influenciaram a quantidade de fármaco liberada na primeira 1 h de ensaio (*burst release*) ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$; $\alpha = 0,05$).

A aplicação do teste de Tukey demonstrou que ocorreu uma redução significativa da liberação do CET em 1h a partir das micropartículas reticuladas com genipin quando a concentração de quitosana aumentou de 1% para 1,5% indicando que a redução do *efeito burst* foi efetiva ($P < 0,05$). No entanto, quando a concentração de quitosana foi aumentada de 1,5% para 2% não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores para 1h de liberação ($P < 0,05$).

Desta forma, conclui-se que os resultados do ensaio de liberação indicaram que a adição de ambos agentes reticulante levou a um prolongamento da liberação do CET e minimizou o *efeito burst release*. A utilização de maiores concentrações de quitosana foi um fator determinante na diminuição do *efeito burst* e também no prolongamento da liberação dos fármacos a partir das micropartículas reticuladas com genipin. Na Figura 30 é possível observar ambos efeitos nas micropartículas não reticuladas e nas partículas reticuladas com glutaraldeído e com genipin.

A análise de comparação quanto ao *efeito burst* entre os agentes reticulantes indica que não há diferença significativa quando a concentração de quitosana nas micropartículas compostas é de 1%, porém, quando a concentração de quitosana é aumentada o agente reticulante genipin foi mais eficaz. Todavia no efeito de prolongamento da liberação, não houve diferença significativa entre os agentes reticulantes.

Em face das reações químicas descritas para a reticulação da camada de quitosana nas micropartículas compostas, fica evidente que o genipin é um agente reticulante tão apropriado quanto o glutaraldeído, podendo ser um substituto natural e muito menos tóxico que o glutaraldeído, não comprometendo assim a biodegradabilidade dos polímeros utilizados.

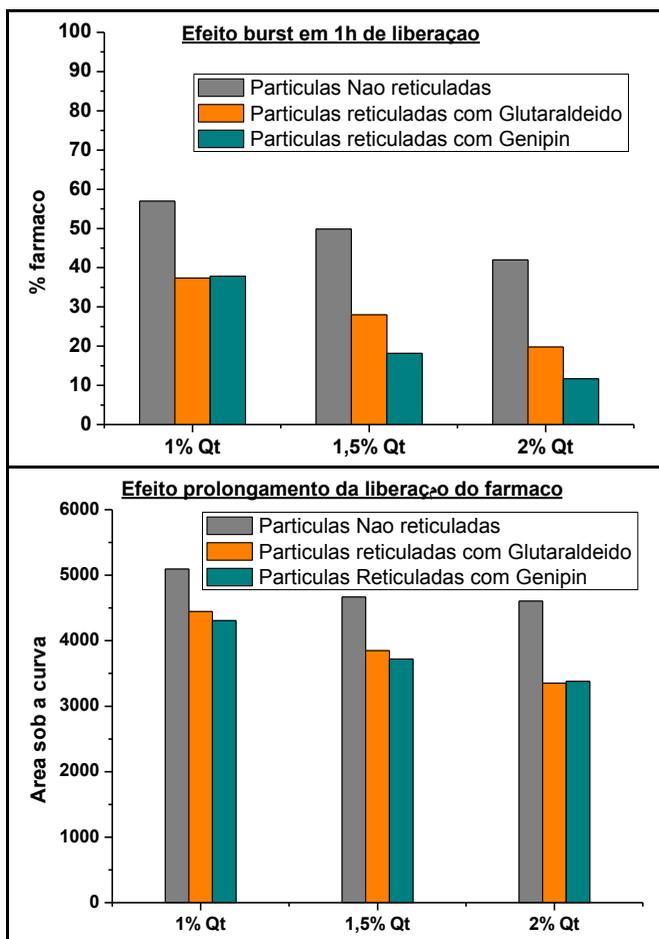


Figura 30 - *Efeito burst* e efeito de prolongamento de liberaçao de micropartículas de CET/PHB recobertas com 1%, 1,5% e 2% de quitosana não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído com genipin.

5.5 ANÁLISE DO PERFIL DE LIBERAÇÃO

Baseando-se nas características físico-químicas do polímero, os mecanismos de liberação de fármaco em uma matriz polimérica podem ser caracterizados por três tipos de processo (ARIFIN, LEE e WANG 2006):

- i) difusão através dos poros da matriz polimérica,
- ii) difusão através de uma matriz hidrofílica intumescida,
- iii) erosão da matriz ou degradação do polímero.

Com o intuito de investigar a influência da camada de quitosana nas liberação *in vitro* do cetoprofeno e o mecanismo envolvido nesse processo, o modelo teórico de Baker-Lonsdale foi aplicado aos dados experimentais. Este modelo matemático descreve a liberação de um fármaco a partir de uma matriz esférica heterogênea por um processo de difusão e tem sido utilizado para linearizar resultados de ensaios de liberação de microesferas e microcápsulas.

O ajuste dos dados de liberação à equação de Baker-Lonsdale foi feito através dos mínimos quadrados, apresentando valores de R elevados. Nessa modelagem foram descartados os pontos de fármaco liberado após atingirem um platô.

Uma abordagem mecanística dos processos envolvidos na liberação de fármacos é fundamental para ampliar o entendimento desses sistemas. Na Figura 31 encontram-se as curvas obtidas após a linearização dos perfis de liberação através do modelo matemático descrito. Coeficientes de correlação linear próximos a 1 foram obtidos para as microesferas de CET/PHB recobertas com quitosana não reticuladas e reticuladas, conforme apresentado na Tabela 3.

Além disso, as micropartículas compostas não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído e genipin apresentaram características morfológicas semelhantes antes e após o ensaio de liberação, sugerindo que o principal mecanismo envolvido na liberação dos fármacos é realmente a difusão através dos poros da matriz polimérica.

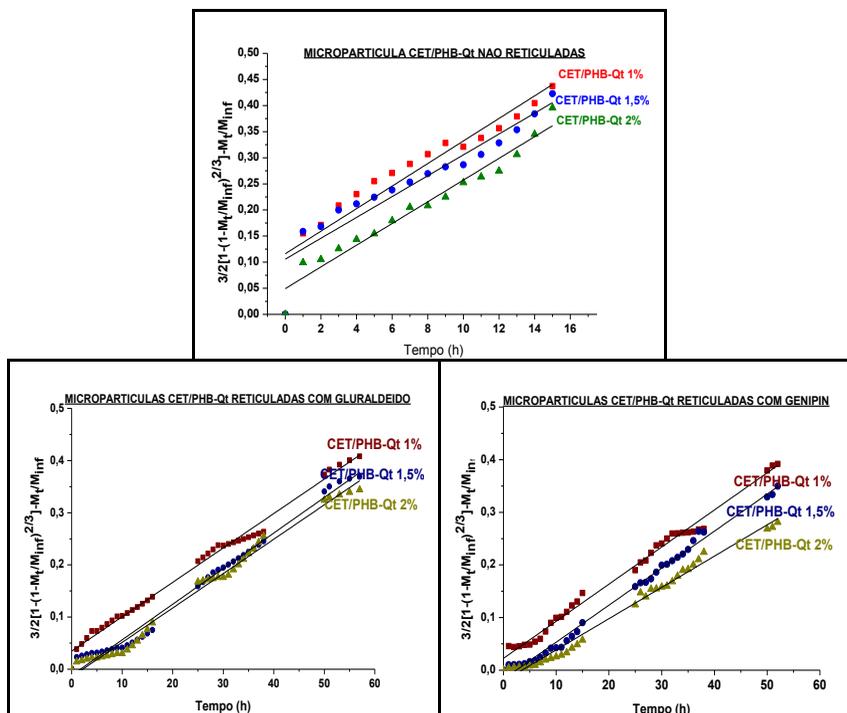


Figura 31 - Curvas obtidas após a linearização dos perfis de liberação de acordo com o modelo matemático de Baker-Lonsdale.

A utilização do PHB nas micropartículas deve-se não só ao fato das suas características biodegradáveis e biocompatíveis, mas também de apresentar um alto grau de cristalinidade o que interfere na degradação do polímero mantendo as micropartículas e liberando o fármaco apenas por difusão. Além disso, com base nos estudos por Maia e colaboradores (2004), a erosão de partículas de PHB e PHBV pode ser considerada desprezível em experimentos de liberação. A matriz polimérica com o polímero PHB é muito hidrofóbica com o meio aquosa, o que poderia resultar em transporte anômalo do fármaco (MAIA, SANTANA e RÉ 2004).

Os valores das constantes de velocidade de dissolução (k) inseridos na Tabela 3 correspondem ao coeficiente angular das retas, conforme representado na Equação 2.

Tabela 3 – Constantes de velocidade de dissolução (k) e coeficiente de correlação linear (R) referentes aos perfis de liberação do cetoprofeno.

Teor de Qt. (% em m/v)	Baker-Lonsdale					
	Partículas Não reticuladas		Partículas reticuladas com glutaraldeído		Partículas reticuladas com genipin	
	R	k	R	k	R	k
1	0,9785	0,0183	0,9837	0,0073	0,9839	0,0074
1,5	0,9710	0,0189	0,9865	0,0066	0,9865	0,0068
2	0,9882	0,0094	0,9875	0,0044	0,9875	0,0045

A constante de velocidade de dissolução calculada para as micropartículas diminuíram proporcionalmente conforme o aumento da concentração de quitosana, para todas as partículas, não reticuladas e reticuladas, indicando uma liberação mais lenta para maiores concentrações de quitosana, estando assim de acordo com os dados estatísticos descritos anteriormente para os perfis de liberação.

Os valores das constantes de dissolução para partículas reticuladas com glutaraldeído e com genipin foram bastante semelhantes, pois conforme os perfis de liberação as velocidades de dissociação foram bastante parecidas.

Por outro lado, houve um decréscimo na constante de dissolução de quase quatro vezes entre partículas não reticuladas e reticuladas com 1% e 1,5% de quitosana. Já para partículas com 2% de quitosana essa variação da constante de dissociação foi apenas de metade comparando partículas reticuladas e não reticuladas. Estes dados concordam com os perfis de liberação das micropartículas apresentados nos gráficos, as quais apresentaram um *efeito burst* mais pronunciado para micropartículas antes do processo de reticulação.

Os dados obtidos nos experimentos de liberação do cetoprofeno foram matematicamente modelados pelo programa Oringin[®] (versão 8). A descrição matemática das curvas de liberação foi realizada pelo ajuste dos pontos experimentais aos modelos monoexponencial (Equação 5) e biexponencial (Equação 4). Os ajustes estão representados na Figura 32.

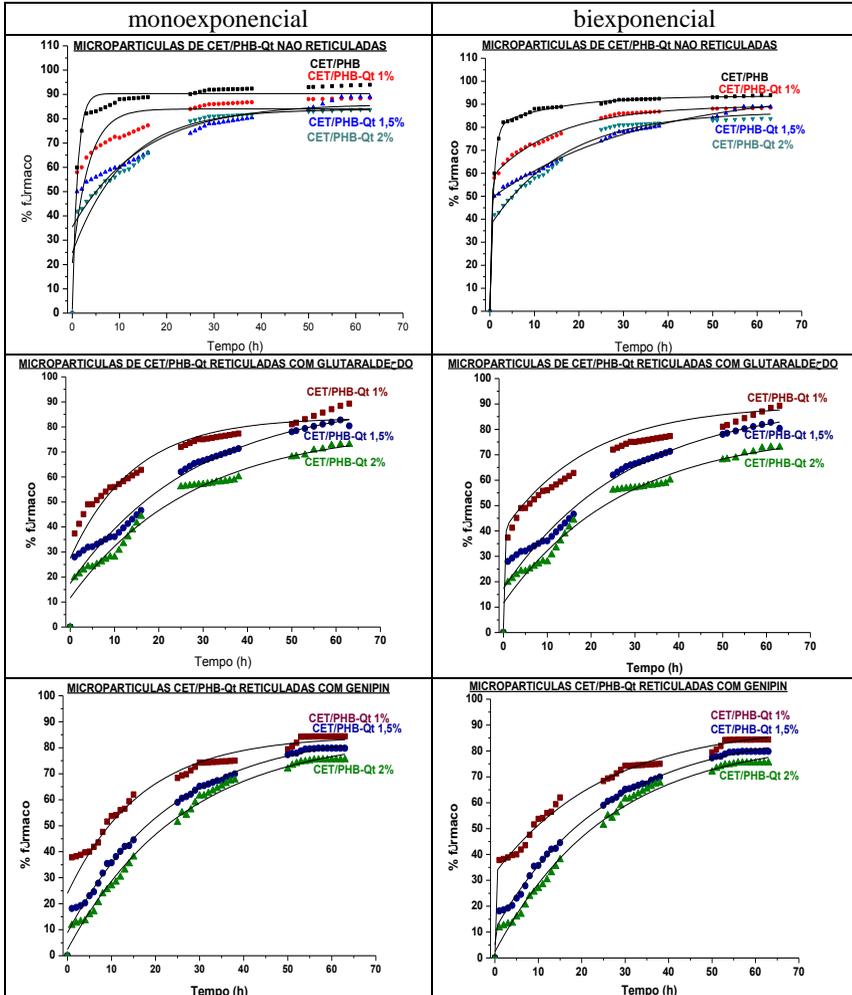


Figura 32 - Modelagem monoexponencial e biexponencial do CET.

Os coeficientes de correlação linear (R) dos perfis de liberação do cetoprofeno podem ser visualizados na Tabela 4.

A escolha da equação que melhor descreveu os perfis foi baseada no critério de seleção do modelo (MSC), coeficiente de correlação R . Quanto maiores os valores de R , melhor é o ajuste dos dados ao modelo. A partir dos resultados, constatou-se que a equação Biexponencial foi a mais adequada para descrever os dados experimentais.

Tabela 4 - Modelagem cinética monoexponencial e biexponencial do perfil de liberação.

	Teor de Qt. (% em m/v)	R	
		<u>Monoexponencial</u>	<u>Biexponencial</u>
Não	1	0,7948	0,9973
Reticulada	1,5	0,8185	0,9876
	2	0,9103	0,9988
Reticulada	1	0,8957	0,9475
com	1,5	0,9634	0,9712
Genipin	2	0,9781	0,9922
Reticulada	1	0,9386	0,9925
com	1,5	0,9930	0,9962
Glutaraldeído	2	0,9935	0,9942

Dessa maneira, foi possível inferir que o processo de liberação consiste de duas fases. Em uma modelagem biexponencial de perfil de liberação, representa uma etapa de liberação rápida do fármaco, *burst release*, e uma etapa mais lenta se dá por uma liberação mais controlada.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que através da elaboração de micropartículas compostas utilizando um segundo polímero biocompatível e biodegradável, a exemplo da quitosana, é possível prolongar a liberação do CET a partir de micropartículas de PHB.

A técnica de *spray drying* mostrou-se viável para a obtenção de micropartículas de CET/PHB-Qt, podendo ser considerada uma promissora técnica para o preparo de micropartículas compostas. A utilização de maiores concentrações de quitosana e de reticulante provocou uma diminuição do *efeito burst* e também um prolongamento da liberação do CET.

A reticulação da quitosana influenciou a liberação do CET a partir das micropartículas compostas ocorrendo assim uma diminuição efetiva do *efeito burst* e um prolongamento da liberação do fármaco estudado. O genipin mostrou-se tão bom agente reticulante quanto o glutaraldeído, podendo ser um substituto natural e muito menos tóxicos para reticulação da quitosana para fins farmacêuticos e medicinais.

Portanto, a liberação de ativos a partir de micropartículas recobertas com quitosana pode ser modificada através da utilização de diferentes quantidades do polímero submetido ao processo de reticulação e de diferentes tipos de agentes reticulante. Além disso, também é possível modular a liberação de ativos a partir desses sistemas através da obtenção de diferentes graus de reticulação da quitosana.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como desdobramento da presente pesquisa, pode-se ainda destacar as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliar a liberação do fármaco cetoprofeno com as micropartículas compostas *in vivo*,
- Reticular as micropartículas compostas durante a técnica de *spray drying*,
- Avaliar a influência da temperatura no o grau de reticulação,
- Estudar a biodegradabilidade do sistema nas partículas compostas após a reticulação,
- Pesquisar modelagem matemática envolvendo a liberação do fármaco por técnicas de simulação numérica e correlações empíricas,
- Calcular através métodos teóricos e experimentais o coeficiente de difusão considerando o sistema poroso e não-poroso.

REFERÊNCIAS

- AHSAN, F., I.P. RIVAS, M.A. KHAN, e A.I. J. TORRES SUAREZ. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. **Control. Release.** 29-40.
- ANDREANI, L., R. CERCENÁ, B.G.Z. RAMOS, e V. SOLDI. Development and characterization of wheat gluten microspheres for use in a controlled release system. **Materials Science and Engineering**, , 524-531, 2009.
- ARAFIN, D Y, L Y LEE, e C-H WANG. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 1274- 1325, 2006.
- ARIFIN, D Y, LAI Y LEE, e CHI-HWA WANG. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 1274-1325, 2006.
- BAZZO, G C, E L SENNA, A T PIRES, e M C GONÇALVES. “Effect of Preparation Conditions on Morphology, Drug Content and Release Profiles of Poly(hydroxybutyrate) Microparticles Containing Piroxicam. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** 914-921, 2008.
- BAZZO, G.C., E.M.T. LEMOS-SENNA, e A.T.N. PIRES. Poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan/ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. **Carbohydrate Polymers.** 839-844, 2009.
- BEGER, J, M REIST, J M MAYER, O FELT, N A PEPPAS, e R GURNY. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** 19-34, 2004.
- BEPPU, M M, E J ARRUDA, e C C SANTANA. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana . **Polímeros.** 163-169, 1999.

BRAGA, G K, e W P OLIVEIRA. Manufacturing Drug loaded Chitosan Microspheres by Spray Drying: Development, Characterization, and Potential Use in Dentistry. **Drying Technology**. 303-310, 2007.

BUTLER, M F, N G YIU-FAI, e P D A PUDNEY. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups. **Journal of Polymer Science**. 3941–3953, 2003.

CHEN, C, C YU, Y C CHENG, e M K CHEUNG. Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. *Biomaterials*. 4804-4814, 2006.

CHEN, H, W OUYANG, B LAWUYI, e S PRAKASH. Genipin cross-linked alginate-chitosan microcapsules: membrane characterization and optimization of cross-linking reaction. **Biomacromolecules** 2091, 2006.

DHAWAN, SINHA, SINGLA K., e V. **Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods**. University Institute of Pharmaceutical Sciences, India, Panjab University, Chandigarh, 2004.

DINI, E, S ALEXANDRIDOU, e C KIPARISSIDES. Synthesis and characterization of cross-linked chitosanmicrospheres for drug delivery applications. **Journal of Microencapsulation**. 375–385, 2003.

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*. São Paulo. 01-80. 1998

FILKOVÁ, I, e A S MUJUMDAR. **Industrial Spray Drying Systems in Handbook of Industrial Drying**. 2. New York: Dekker, 1995.

FREIBERG, S., e X. X. ZHU. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**. 1-18, 2004.

GAVA, A.J.

“http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=4193757&pid=

S1516-8913200900050002600026&lng=en.” *Scielo Brazil*. Dezembro de 1983. (acesso em março de 2011).

GENTAA, I, M COSTANTINIB, A ASTI, B CONTI, e L MONTANARIB. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**. 81-88, 1998.

GIBAUD, S., A. BONNEVILLE, e A. . . , v. , p. , . ASTIER. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. **Int. J. Pharm.** 197-201, 2002.

GONSALVES, A A, e C R M ARAÚJO. Diferentes Estratégias para a Reticulação de Quitosana. **Química Nova**. 1-9, 2011.

GRUPTA, K C, e F H JABRAIL. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**. 43-54, 2006.

GUARATINI, C C I, e M ZANONI. Corantes Têxteis. **Química Nova**. 23, 2000.

HE, P, S S DAVIS, e L ILLUM. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**. 53-65, 1999.

IKEJIMA, T, e Y INOUE. Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly(3-hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**. 351–356, 2000.

JIN, J, M SONG, e D J HOURSTON. Novel Chitosan-Based Films Cross-Linked by Genipin with Improved Physical Properties. **Biomacromolecules**. 162-168, 2004.

KORSMEYER , R W, R GURNY, E DOELEKER, P BURI, e N A PEPPAS . Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**. 25-35, 1983.

LEE, J. H., T. G. PARK, e H. K. CHOI. Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method. **International Journal of Pharmaceutics**. 75-83, 2000.

LIMA, F. **Emprego de nanopartículas sólidas na liberação de fármacos pouco solúveis**. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2008.

LIU, W. H. 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**. 417-427, 2005.

MAIA, J. L., M. H. A. SANTANA, e M. I. RÉ. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process” **Brazilian Society of Chemical Engineering**. 1-12, 2004.

MARTIN, M A, F C MIGUENS, J RIEUMONT, e S SANCHEZ. Tailoring of the external and internal morphology of poly-3-hydroxy butyrate microparticles. **Colloids Surface B**. 111-116, 2000.

MCMURRY, J. *Química Orgânica*. Thomson Learning, 2005.

Megeef, Z, H Ghandehari, e J Cappello. Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery. **Advance Drug Delivery Reviews**. 1075-1091, 2002.

MENG, F T, G H MA, Y D LIU, W QIU, e Z G SU. Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 177-183, 2004.

MI, F-L, H-W SUNG, e S-S SHYU. Release of Indomethacin from a Novel Chitosan Microsphere Prepared by a Naturally Occurring Polycation-Anionic Drug Interaction. **Journal of Applied Polymer Science**. 1700-1711, 2001.

MI, F-L, S-S SHYU, e C-K PENG. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**. 1985-2000, 2005.

MONTEIRO JR, O A C, e C AIROLDI. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogenous system. **International Journal of Biological Macromolecules**. 119-128, 1999.

MUZZARELLI, R A A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**. 1-9, 2009.

OISHI, M., Y. NAGASAKI, e K. . In: KWON, G. S. KATAOKA. Functional PEG for drug delivery. Edição: Boca Raton: Taylor & Francis. **Polymeric Drug Delivery Systems**. 93-123, 2005.

OLIVEIRA, I Z, e I VIEIRA. Construção e Aplicação de Biossensores Usando Diferentes Procedimentos de Imobilização da Peroxidase de Vegetal em Matriz de Quitosana. **Química Nova**. 932-939, 2006.

PARK, J E, J Y LEE, H G KIM, T R HANG, e Y S PAIK. Isolation and Characterization of Water-Soluble Intermediates of Blue Pigments Transformed from Geniposide of *Gardenia jasminoides*. **Journal of Agricultural and food chemistry**. 6511 –6514, 2002.

PEPPAS, N A, e P L RITGER. A simple equation for description of solute release i. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**. 23-36, 1987.

POLETTI, F S, E JAGER, M I RÉ, S S GUTERRES, e A R POHLMANN. Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. 70-80, 2007.

POLLAUF, E. J., K. K. KIM, e D. W. PACK. Small-Molecule Release from Poly(D,L-lactide)/Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Composite Microparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2013-2022, 2005.

RANADE, V.V. **Drug delivery systems 2.ed.** 2.ed. New York: CRC Press, 2004.

RETINGER, J M. **The Mechanism of the Ninhydrin Reaction**. Contribution From the Otho S. A. Sprague Memorial Institute and the University of Chicago. 1059-1066, 1916.

SHENG, J J, N A KASIM, R CHANDRASEKHARAN, e G L AMIDON. Solubilization and dissolution of insoluble weak acid,

ketoprofen: Effects of pH combined with surfactant. **European Journal of Pharmaceutics Science**. 306-314, 2006.

SUNG, W H, Y CHANG, I L LIANG, W H CHANG, e Y C CHEN. Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration. **Journal Biomedical Materials Research**. 77-87, 2000.

VANIN, M, C C SANTANA, I L TORRIANI, T PRIVELIC, e E A R DUEK. Estudo da degradação "in vitro" de blendas de poli(beta-hidroxibutirato) (PHB) / poli(L-ácido lático) (PLLA) na forma de filmes. **Polímeros**. 1-9, 2004.

VERMA, R K, S GARG, e D M KRISHNA. Formulation aspects in the development of osmotically controlled oral drug delivery systems. **Journal Controlled Release**. 7-27, 2002.

WANG, C, Y ZHENG, W YE, Y LIU, e Z TONG. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly. **Int. J. Pharm.** 165-173, 2007.

WANG, F. J., WANG, C. H. Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres. **Journal Microencapsulation**. 495- 510, 2002.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**. 1-12, 1990.

YIM, J S, et al. Metabolic Activities of Ginsenoside Rb1, Baicalin, Glycyrrhizin and Geniposide to Their Bioactive Compounds by Human Intestinal Microflora. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 1580-1583, 2004.

YUAN, Y, et al. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. **Carbohydrate Polymers**. 561-567, 2007.

ZHENG, C H, J Q GAO, Y P ZHANG, e W Q LIANG. A protein delivery system: biodegradable alginate-chitosan-poly(lactic-co-

glycolic acid) composite microspheres. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 1321-1327, 2004.

ANEXO A – Tabelas de dados com os valores utilizados para análise do efeito burst e da eficiência de dissolução

Teor de Qt	Efeito burst		
	Não Reticulada	Glutaraldeído	Genipin
1%	56,98 ±1,7	37,33 ±0,2	37,84±0,2
1,5%	49,83 ±0,3	27,95 ±0,1	18,16±0,3
2%	41,99 ±0,5	19,78 ±0,4	11,66±0,7

Teor de Qt	Eficiência de Dissolução		
	Não Reticulada	Genipin	Genipin
1%	84,9 ± 0,7	74,1± 0,3	71,8 0,2
1,5%	77,7 ± 0,4	64,1± 0,2	61,9±0,2
2%	76,7 ± 0,8	55,8± 0,5	56,3±0,1