

Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Química
Curso de Pós-Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SISTEMA DE
MICROENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS A PARTIR
DA QUITOSANA PARA USO ORAL**

Atche Josué

Tese apresentada no Curso de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial à obtenção do
Título de Doutor em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Rozangela C. Pedrosa

Florianópolis
2002

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SISTEMA DE
MICROENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS A PARTIR DA
QUITOSANA PARA USO ORAL**

ATCHE JOSUÉ

**Esta tese foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e
membros da banca examinadora**



**Prof. Dr. Valdir Soldi
Coordenador da Pós-Graduação
QMC - UFSC**

BANCA EXAMINADORA:



**Prof. Dr. Mauro C. Marghetti Laranjeira
Orientador
QMC - UFSC**



**Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa
Co-orientadora
Dep. de Bioquímica - UFSC**



**Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Dep. de Processos Biotecnológicos - UNICAMP**



**Profa. Dra. Irene Kimura
Dep. de Química - UEM**



**Profa. Dra. Miriam Falkenberg
Dep. Ciências Farmacêuticas - UFSC**



**Prof. Dr. César Zucco
QMC - UFSC**



**Prof. Dr. Valdir Soldi
QMC - UFSC**

**Universidade Federal de Santa Catarina
Março de 2002**

Agradecimentos

- A Deus por me indicar o caminho certo;
- Aos meus pais, Beugre Denis e Djobo Albertine, por terem suportado a minha ausência;
- A minha esposa Elusa Cristina, pelo constante apoio e incentivo;
- Ao Prof. Dr. Mauro M. C. Laranjeira, meu eterno mestre, pela sua orientação;
- Ao Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère pela contribuição durante este trabalho;
- Aos amigos do Laboratório *Quitech*: Irene, Amarildo, Viviane, Amauri, Vanessa, Salete e Mellatie (*in memoriam*);
- Aos funcionários Jadir e Graça, do Curso de Pós-Graduação em Química, pela colaboração e estímulo;
- À Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio institucional;
- Ao CNPQ pela oportunidade de concretizar este estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ESQUEMAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIações E SIGLAS.....	xii
LISTA DE EQUAções.....	xiii
GLOSSÁRIO	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. Quitina e quitosana	21
2.2. Caracterização da quitosana	23
2.2.1. Determinação do grau de desacetilação	24
2.2.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13(RMN ¹³ C).....	25
2.2.3. Espectroscopia vibracional no infravermelho	24
2.3. Modificações químicas na quitosana	26
2.3.1. Reticulação da quitosana	26
2.3.2. Copolimerização de enxerto	28
2.3.2.1. O uso de cério como iniciador redox	28
2.3.2.2. Copolimerização de enxerto de ácido acrílico sobre a quitosana	29
2.4. Eosina	31
2.5. Rifampicina	33
2.6. Análises de TGA e de DSC	36
2.7. Microencapsulação.....	37
2.7.1. Classificações das partículas (microesferas e microcápsulas)	39
2.7.2. Microencapsulação por matriz polimérica de quitosana	41
2.8. Sistemas poliméricos de liberação de fármacos	43
2.9. Mecanismos de liberação controlada de fármacos microencapsulados	51
2.10. Liberação controlada de compostos microencapsulados	52
2.10. 1. Condições fisiológicas que influenciam a liberação controlada de fármacos microencapsulados	53
2.10.2. Liberação controlada de fármacos microencapsulados em sistemas quitosana/poli(ácido acrílico)	55
2.10.3. Liberação controlada da rifampicina microencapsulada.....	56

2.10.4. Cinética dos fármacos encapsulados.....	58
3. OBJETIVOS	62
3.1. Objetivo Geral	62
3.2. Objetivos Específicos	62
4. METODOLOGIA	65
4.1. Materiais	65
4.1.1. Produtos químicos e gases	65
4.1.2. Animais	65
4.2. Reagentes e soluções	66
4.3. Métodos	68
4.3.1. Obtenção e purificação da quitosana	68
4.3.2. Caracterização da quitosana	69
4.3.2.1. Grau de desacetilação (% \overline{GD})	70
4.3.2.2. Espectroscopia de RMN ^{13}C	70
4.3.2.3. Espectroscopia no infravermelho (IV) da QTS	70
4.3.3. Preparação das microesferas de QTS	72
4.3.4. Reticulação das microesferas de QTS	73
4.3.5. Determinação dos grupos amino após reticulação	73
4.3.6. Redução dos grupos imino das microesferas de QTS reticulada	73
4.3.7. Reação de copolimerização de enxerto: enxerto do poli(ácido acrílico) sobre a QTS	73
4.3.8. Caracterização das microesferas de QTS modificada	74
4.3.8.1. Espectroscopia no infravermelho (IV)	74
4.3.8.2. Análise de porosimetria	74
4.3.8.3. Análise termogravimétrica (TGA)	75
4.3.8.4. Análise do grau de intumescimento das microesferas de QTS modificada em função dos pHs similares aos do TGI	75
4.3.9. Determinação da quantidade máxima de eosina impregnada em microesferas de QTS modificada em função do tempo, como de liberação controlada de fármacos de baixo peso molecular e sensíveis ao pH	76
4.3.10. Estudo de liberação <i>in vitro</i> e estudo cinético da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada.....	77
4.3.10.1. Estudo de liberação <i>in vitro</i> da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada	77
4.3.10.2. Estudo cinético de liberação <i>in vitro</i> da eosina impregnada nas	

microesferas de QTS modificada	78
4.3.11. Micrografia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas de QTS modificada contendo a eosina	78
4.3.12 Determinação da quantidade máxima de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada em função do tempo	79
4.3.13. Estudos de liberação <i>in vitro</i> e estudos cinéticos da rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada nas soluções tampões similares ao do TGI e nos fluidos gastrintestinais artificiais	80
4.3.13.1. Estudos de liberação <i>in vitro</i> da rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada nas soluções tampões similares aos do TGI e nos fluidos gastrintestinais.....	80
4.3.13.2. Estudos cinéticos da liberação <i>in vitro</i> da rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada no fluido intestinal e na solução tampão de pH 6,8.....	81
4.3.14. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	81
4.3.15. Estudo de liberação <i>in vivo</i> da rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada	82
4.3.15.1. Ensaio de dose/dependente	82
4.3.15.2. Ensaio de tempo/dependente.....	82
4.3.15.3. Ensaio do trânsito das microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina no TGI	83
4.3.16. Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina após o trânsito no TGI	83
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.1. Caracterização da amostra de QTS.....	84
5.1.1. Grau de desacetilação da quitosana (% \overline{GD})	84
5.1.2. Espectroscopia de Ressonância nuclear de carbono-13.....	86
5.1.3. Espectroscopia no infravermelho (IV) da quitosana	87
5.2. Redução dos grupos imino das microesferas reticuladas	88
5.3. Grau de enxertia das microesferas de QTS reticuladas e reduzidas (microesferas de QTS modificada)	90
5.4. Caracterização das microesferas reticuladas, reduzidas e enxertadas (microesferas de QTS modificada).....	92
5.4.1. Espectroscopia no infravermelho (IV) das microesferas modificadas.....	92
5.4.2. Porosimetria de mercúrio das microesferas de QTS modificada	93
5.4.3. Análise termogravimétrica (TGA) das microesferas modificadas, da QTS e do	

poli(ácido acrílico).....	94
5.5. Análise do grau intumescimento das microesferas de quitosana modificadas em função dos pH similares aos do TGI	97
5.6. Determinação da quantidade de eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada.....	99
5.7. Estudos de liberação <i>in vitro</i> e cinéticos da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada nos tampões similares aos do TGI	100
5.7.1. Estudo de liberação <i>in vitro</i> da eosina impregnada nas microesferas de quitosana modificada nos tampões similares aos do TGI	100
5.7.2. Estudo cinético da liberação <i>in vitro</i> da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada.....	102
5.8. Micrografia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas de QTS modificada contendo a eosina	105
5.9. Estudos de liberação <i>in vitro</i> e cinético de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada nas soluções tampões similares aos do TGI, em suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais.....	107
5.9.1. Estudo de liberação <i>in vitro</i> de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada nas soluções tampões similares ao do TGI, em suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais.....	107
5.9.2. Estudo cinético de liberação de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada no tampão de pH 6,8 e no fluido intestinal	109
5.10. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)	110
5.11. Estudo de liberação <i>in vivo</i> de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada	112
5.11.1. Estudo dose/dependente	112
5.11.2. Estudo tempo/dependente	114
5.12. Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de QTS modificada sem a rifampicina e as contendo a rifampicina	117
5.13. Ensaio sobre o trânsito gastrointestinal das microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina	119
6. CONCLUSÕES	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estrutura da quitina.....	21
FIGURA 2.	Estrutura da quitosana	23
FIGURA 3.	Reticulação da QTS com glutaraldeído	28
FIGURA 4.	Estrutura do ácido poliacrílico	30
FIGURA 5.	Estrutura da eosina	33
FIGURA 6.	Estrutura da rifampicina	34
FIGURA 7.	Obtenção da QTS purificada e seus posteriores testes de caracterização.....	69
FIGURA 8.	Preparação das microesferas de QTS.....	71
FIGURA 9.	Obtenção das microesferas de QTS modificada para posteriores estudos.....	72
FIGURA 10.	Gráfico de representação da condutância em função do volume da base titulante.....	85
FIGURA 11.	Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 da QTS...	87
FIGURA 12.	Espectro de infravermelho da QTS em KBr	88
FIGURA 13.	Reação de redução dos grupos imino das microesferas de QTS modificada.....	89
FIGURA 14.	Espectros de infravermelho da QTS (a) e da QTS modificada (b).....	93
FIGURA 15.	Distribuição do tamanho dos poros nas microesferas de QTS modificada	94
FIGURA 16.	TGA e DrTGA da QTS	95
FIGURA 17.	TGA e DrTGA do poli(ácido acrílico)	96
FIGURA 18.	TGA e DrTGA das microesferas de QTS modificada	96
FIGURA 19.	Análises termogravimétricas (TGA) da QTS, do poli(ácido acrílico) (PAA) e das microesferas de QTS modificada (QTSM)	97
FIGURA 20.	Grau de intumescimento das microesferas de QTS modificada em função do tempo e dos pHs	99
FIGURA 21.	Curva de liberação de eosina impregnada nas microesferas de QTS..	102
FIGURA 22.	Curva cinética de liberação de eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada em função do tempo, em solução tampão de pH 6,8.....	104
FIGURA 23.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV): (a ₁) e (a ₂) da morfologia	

	da microesfera de QTS sem eosina e com a eosina	106
FIGURA 24.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV): (b ₁) e (b ₂) seção transversal da microesfera de QTS sem eosina e com a eosina	106
FIGURA 25.	Curvas de liberação de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificadas nas soluções-tampão similares aos do TGI, no suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais	108
FIGURA 26.	Curvas cinéticas de liberação de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada na solução de pH 6,8 e no fluido intestinal artificial	110
FIGURA 27.	Termograma do DSC de (a) pó de rifampicina, (b) mistura física de pós de rifampicina e microesferas de QTS modificada (proporção fármaco polímero 4:10), (c) microesfera de QTS modificada contendo rifampicina e (d) microesfera de QTS modificada	111
FIGURA 28.	Curva teórica de concentração sanguínea de rifampicina após administração de um comprimido convencional contendo 600 mg de rifampicina	113
FIGURA 29.	Curva de concentrações séricas de rifampicina em função do tempo obtidas a partir de administração de microesferas de QTS modificada contendo 400 mg de rifampicina	116
FIGURA 30.	Fotomicrografias A ₁ e B ₁ das morfologias, A ₂ e B ₂ das seções transversais de microesferas de QTS modificada sem ou com rifampicina	118
FIGURA 31.	Morfologia da microesfera após o trânsito no TGI dos animais de experiência	121

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.	Representação de uma microesfera	37
ESQUEMA 2.	Mecanismo de liberação de fármacos a partir de uma matriz polimérica.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Classificação das micropartículas baseada nas técnicas de preparação.....	40
TABELA 2.	Valores de % \overline{GD} (%mmol/g) para QTS	86
TABELA 3.	Grau de enxertia em função das massas de microesferas de QTS.....	91
TABELA 4.	Média dos graus de intumescimento das microesferas de QTS modificada em diferentes pHs.....	98
TABELA 5.	Quantidade de eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada em função do tempo.....	100
TABELA 6.	As constantes cinéticas de liberação de rifampicina para as microesferas de QTS modificada na solução-tampão e no fluido intestinal	110
TABELA 7.	Concentração sanguínea de rifampicina após administração oral de microesferas de QTS modificada contendo rifampicina durante 12 horas	114
TABELA 8.	Distribuição das microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina ao longo do TGI durante 14 horas de estudo.....	120

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

DSC	Análise de calorimetria exploratória diferencial
DrTGA	Derivada primeira de análise termogravimétrica
% G.D	Grau de desacetilação (%)
% G.E	Grau de enxertia (%)
% G.I	Grau de intumescimento (%)
QTS	Quitosana
TGI	Trato gastrointestinal
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
FDA	Food and Drug Administration
HIV	Human Immunodeficiency Virus
DL ₅₀	(Dose letal) é a dose mínima que mata 50% dos animais tratados
mL	Mililitros
min	Minutos
mmol	Milimol
g	Gramas
IV	Espectroscopia no infravermelho
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono - 13
L	Litro
M ₀	Massa do fármaco encapsulado
M _t	Massa do fármaco liberado na solução no tempo t
h	Hora
t	Tempo
V	Volume da solução (mL ou L)
mS	MiliSiemens (unidade da condutância)
W	Massa da amostra de quitosana (g)
TGA	Análise termogravimétrica

LISTA DAS EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 a 8.	Reações do mecanismo de copolimerização por via radical livre	31
EQUAÇÃO 9.	Determinação do grau de enxertia	32
EQUAÇÃO 10.	Equação básica do modelo de HIGUCHI.....	58
EQUAÇÃO 11.	Equação de HIGUCHI simplificada.....	59
EQUAÇÃO 12.	Equação de HIGUCHI mais conhecida.....	59
EQUAÇÃO 13.	Segunda da lei de difusão de FICK.....	60
EQUAÇÃO 14.	Equação de RITGER e PEPPAS.....	61
EQUAÇÃO 15.	Regressão linear de eosina.....	66
EQUAÇÃO 16.	Regressão linear de rifampicina.....	66
EQUAÇÃO 17.	Equação de YOUNG-LAPLACE.....	75
EQUAÇÃO 18 a 20.	Equações envolvidas nas reações de titulação condutométrica.....	84-85
EQUAÇÃO 21.	Determinação do grau de desacetilação.....	85
EQUAÇÃO 22.	Determinação do grau de intumescimento.....	97
EQUAÇÃO 23.	Linearização da equação de RITGER e PEPPAS.....	103

GLOSSÁRIO

cecum (ceco) - porção do intestino grosso na qual se abrem o íleo e o apêndice vermiforme.

estômago - Viscera na qual se faz parte da digestão dos alimentos, situada entre o esôfago e o duodeno.

intestino delgado - órgão formado por três segmentos: duodeno (parte superior), jejuno (parte mediana) e o íleo (parte inferior), este último caracteriza-se por constituir-se de um agregado de tecido linfático: placas de Peyer.

intestino grosso - órgão composto por três segmentos: cólon, reto e canal anal.

luz intestinal - calibre (espaço) interior dos intestinos (grosso e delgado).

plasma - fluido intercelular (histologicamente homogêneo) e ligeiramente alcalino. Representa 55% do sangue e contém os elementos figurados, globulinas, albumina, sais inorgânicos, principalmente, cloreto, bicarbonato e fosfato de sódio.

RESUMO

Microesferas de quitosana com grau de desacetilação médio de 85,6% foram enxertadas com poli(ácido acrílico) para aplicação como sistemas de liberação controlada de fármacos. O corante eosina impregnado nas microesferas de quitosana modificada foi utilizado como marcador para estudo *in vitro* de liberação de fármacos. A rifampicina é o fármaco escolhido para este estudo. As microesferas de quitosana foram obtidas pelo método de inversão de fases com NaOH, seguidas de reticulação com glutaraldeído, redução com cianoboroidreto de sódio e enxertia com poli(ácido acrílico), na presença de uma solução de nitrato de cério(IV) amoniacal como iniciador redox. As microesferas de quitosana foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (IV); análise de porosidade e grau de intumescimento; análise termogravimétrica e na microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os estudos *in vitro* de liberação da eosina, a partir de microesferas de quitosana modificada, mostraram que o corante foi liberado em função do tempo a pH 6,8 e 9,0 que simulam as condições fisiológicas do trato gastrointestinal, não havendo liberação a pH 1,2. Os ensaios *in vitro* de liberação de rifampicina, impregnadas nas microesferas de quitosana modificada, mostraram que a liberação de rifampicina nas soluções tampões similares ao do TGI é superior aos do meio biológico artificial (suco gástrico, fluidos intestinal e cecal artificiais). Esta diferença é devida, possivelmente, à composição das soluções tampões e do meio biológico artificial. Os resultados dos estudos cinéticos de liberação *in vitro* da eosina ou a rifampicina impregnada nas microesferas de quitosana modificada foram interpretados pela equação de RITGER e PEPPAS e revelaram que essas microesferas atuam, possivelmente, por sobreposição de dois mecanismos independentes de liberação de fármacos (a difusão Fickiana e o intumescimento). Os ensaios de liberação *in vivo* da rifampicina, impregnada nas microesferas de quitosana, sugerem que microesferas, contendo 400 mg do fármaco, manteriam as concentrações sanguíneas necessárias para impedir a proliferação do agente infeccioso da tuberculose.

ABSTRACT

Chitosan microspheres with an average deacetylation degree of 85,6% were grafted with poly (acrylic acid) in order to be used as drug delivery systems. The eosin dye impregnated at the modified chitosan microspheres was used as a marker for *in vitro* study of drugs release. Chitosan microspheres were obtained by coacervation-phase separation with NaOH, followed by cross-linkage with glutaraldehyde, reduction with sodium cyanohydroborate and grafted with poly(acrylic acid), using ammonium cerium(IV) nitrate as redox initiator. The chitosan microspheres were characterized by the following technics: infrared spectroscopy; porosimetry; swelling degree; thermogravimetric analyses; and scanning electronic microscopy (SEM). The *in vitro* release studies of eosin from the modified chitosan microspheres, showed that dye release was time dependent at pH 6.8 and 9.0, typical of the gastrointestinal tract. No eosin release could be observed at pH 1.2. The *in vitro* release assays of rifampicin impregnated in the modified chitosan microspheres showed that the release of rifampicin in buffer solutions similar to that of TGI is higher than that at the synthetic biological environment (gastric juice, synthetic intestinal and cecal fluids). This difference is likely due to the composition between buffer solutions and the synthetic biological environment. The results of kinetic studies of the *in vitro* release of eosin or rifampicin impregnated in the modified chitosan microspheres were interpreted by the RITGER and PEPPAS equation and revealed that the microspheres likely should act by superposition of two mechanisms (a Fickian diffusion and swelling). The *in vivo* release assays of the rifampicin impregnated at the modified chitosan microspheres showed that the microspheres containing 400 mg would be the best form to keep the necessary rifampicin concentrations in the blood in order to inhibit the proliferation of the tuberculosis infectious agents.

1. Introdução

Nos últimos anos, tem-se constatado um notável crescimento em torno da criação de novos sistemas de liberação controlada de fármacos. Durante esse período, a indústria farmacêutica se destacou no uso e no aproveitamento de matérias-primas de baixo custo e fácil obtenção para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, o que permitiu o uso de várias técnicas para encapsulação de muitos compostos em sistemas de multipartículas, como microesferas e microcápsulas, no intuito de proteger, estabilizar e mascarar os sabores indesejáveis ou modificar as propriedades de liberação^{1,2}. Os sistemas de multipartículas têm suscitados um grande interesse nas formulações orais por apresentarem muitas vantagens, tais como, redução no número de doses, variabilidade do tempo de trânsito no trato gastrointestinal e a possibilidade de mistura de fármacos de diferentes propriedades de liberação^{3,4}.

O avanço das pesquisas acerca desses sistemas de liberação permite fazer algumas observações:

- muitos ensaios realizados com fármacos antigos, e até mesmo com os novos, não são realizados com o único intuito de melhorar a sua eficácia e a saúde do paciente, mas também para permitir, em alguns casos, testar novas terapias;
- os fármacos complexos ou novos, como as proteínas, produzidas pela engenharia genética, cuja liberação é, às vezes, mais complicada que os convencionais, necessitam de novos sistemas de liberação;

- existe uma consciência de que as moléculas do fármaco liberado afetam significativamente as respostas terapêuticas;
- calcula-se que, em média, o custo de uma nova molécula farmacêutica não menor que 150 milhões de dólares, ao passo que o gasto para melhorar o sistema de liberação de um fármaco já existente apresenta um custo muito mais reduzido (exemplo de ácido acetilsalicílico encapsulado), dessa forma, mostrando, ser uma alternativa importante;
- os avanços nas ciências dos materiais e da biotecnologia permitirão o desenvolvimento de novos métodos físico-químicos de liberação de fármacos⁵.

Nesse contexto, o encapsulamento de fármacos para o tratamento de tuberculose é de grande importância. A ciência que trata a tecnologia da microencapsulação constitui um dos exemplos de aplicação de uma técnica em determinado campo que pode ser estendida a outras áreas, incluindo às das ciências físico-químicas e farmacêuticas.

Nos anos 80, a microencapsulação de substâncias começou a se firmar como uma tecnologia de compartimentalização das substâncias, possibilitando a manutenção ou o isolamento de agente ativo no interior das microesferas ou das microcápsulas cujas dimensões variam de nanômetros a alguns milímetros de diâmetros. Devido ao seu avanço promissor, os cientistas das áreas tecnológicas estão usando o processo de microencapsulação nas aplicações industriais de alimentos, de produtos cosméticos, fertilizantes e outros⁶⁻⁸.

Principalmente na área farmacêutica, a microencapsulação está atualmente se tornando uma das alternativas viáveis para o desenvolvimento de novas formulações, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, aumentar a eficiência terapêutica

de substâncias já utilizadas no tratamento de grande variedade de doenças. A aplicação de sistema de microencapsulação nessa área está sendo também amplamente estudada, e tem sido utilizada para obtenção de formas sólidas de óleos, no mascaramento do sabor e odor desagradáveis de substâncias ativas, na proteção de fármacos contra a umidade, calor e oxidação, na alteração da solubilidade, na diminuição da volatilização de fármacos líquidos, na prevenção de incompatibilidade entre substâncias ativas contidas na mesma formulação, para materiais tóxicos manipuláveis de maneira segura, para aumentar características de fluxo de materiais sólidos em processos de compressão, e para produzir liberação controlada e vetorização de fármacos, entre outras⁶⁻⁸.

A tuberculose, conhecida como *mal de pott*, é uma das doenças transmissíveis que mais afetam o homem há muito tempo. Seus vestígios foram constatados em muitos povos pré-históricos como, por exemplo, em múmias egípcias. Também a doença se alastrou em toda a Europa e, depois, nas Américas, com a chegada dos colonizadores europeus elevando, ainda, o índice de mortalidade nesse continente no século XIX e na primeira metade do século⁹ XX.

Inicialmente, a etiologia da doença foi associada aos "hábitos pessoais negativos" (como luxo excessivo, a ingestão de alimentos deteriorados, o sedentarismo) a sífilis e o abuso da terapêutica mercurial, entre outros fatores¹⁰. Após a descoberta do agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, por Robert Koch, em 1882, especulou-se a possível erradicação da doença. Mas, até hoje, a tuberculose é uma infecção bacteriana que ainda persiste como um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, voltando a preocupar os países desenvolvidos, devido ao aumento progressivo da doença associada à epidemia de infecção pelo HIV¹¹.

Os desafios do diagnóstico clínico e laboratorial encontram diversas dificuldades devido aos sinais clínicos, muitas vezes não específicos. No entanto, apesar de suas limitações, a baciloscopia parece ser o método básico. O tratamento da tuberculose foca um complexo regime de fármacos (rifampicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol ou estreptomicina) que pode durar um ano, expondo os pacientes aos efeitos tóxicos dos agentes antituberculose, que podem ser graves para alguns pacientes¹².

A rifampicina, desde seu isolamento em *Streptomyces mediterranei*, tem sido utilizada como antibiótico de amplo espectro junto com a isoniazida na terapia da tuberculose¹³⁻¹⁴. Alguns estudos realizados com pacientes mostraram que a sua concentração no soro alcança o máximo em duas horas e depois o nível sérico decai drasticamente. A análise farmacocinética deste composto tem mostrado que a taxa intestinal de absorção aumenta com o tempo. A contínua administração da rifampicina leva a indução de enzimas no fígado com uma concomitante diminuição da concentração no plasma que pode levar a graves variações nos níveis plasmáticos^{15,16}. Por causa dessa aguda variação da concentração da rifampicina no plasma, algumas formulações farmacêuticas de liberação controlada pH-dependente vêm sendo desenvolvidas para favorecer uma liberação prolongada do fármaco. Estas formulações são as nano e microcápsulas, constituídas de polímeros resistentes ao pH do estômago e ao pH neutro do intestino delgado dissolvendo-se no pH alcalino¹⁷⁻²⁰.

A principal preocupação desta pesquisa é desenvolver produtos alternativos e viáveis para microencapsulação da rifampicina na quitosana modificada por enxertia com poli(ácido acrílico) e mostrar as características de biodisponibilidade da rifampicina quando administrada na forma encapsulada.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Quitina e quitosana

Após décadas sem esclarecer a estrutura e caracterizar a quitina, foi somente na metade dos anos 70 que o Professor Ricardo MUZZARELLI desvendou esse mito, publicando um livro no qual esclareceu algumas propriedades desta molécula. Desde então, pesquisadores se interessaram pelo estudo e pela descoberta de outras fontes desse composto natural²¹.

A quitina, o maior dos polímeros naturais²², produzida por vários animais marinhos, insetos e fungos, é um biopolímero de peso molecular relativamente alto ($1,6 \times 10^5$ - $3,3 \times 10^5$) e constituído principalmente de unidades de $\beta(1 \rightarrow 4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (Figura 1)

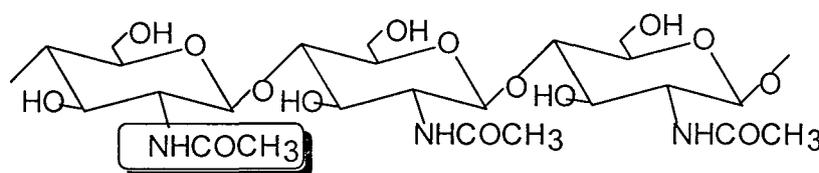


Figura 1. Estrutura da quitina

Muitos estudos realizados sobre o conteúdo dos grupos amino livres na quitina indicaram que cerca de 10% destes grupos nas cadeias não se encontram acetilados, embora alguns autores tenham proposto que 16% dos resíduos são desacetilados^{23,24} e outros, ainda, afirmam que a proporção de N-acetil varia de acordo com a origem do polímero²⁵.

Quando o grau de N-acetilação é inferior a 50% a quitina apresenta-se solúvel em soluções ácidas diluídas e é chamada de quitosana (QTS)²². Todavia, na natureza a quitina se encontra em diferentes formas, como microfibrilas nos tegumentos de crustáceos e insetos, cristalina hidratada, polimérica e γ -quitina²⁶⁻²⁷.

A quitosana [β (1Z4) -2-amino-2-desoxi- β -D-glicopirranose] (Figura 2) obtida por N-desacetilação, tem atraído atenção como matriz polimérica para liberação controlada de fármacos. Este polímero é biocompatível²⁸⁻²⁹, biodegradável e quase atóxico, com DL₅₀ em camundongos de 16 g/kg, sendo que o seu processo de biodegradação ocorre via hidrólise enzimática, através de um mecanismo de despolimerização, semelhante ao das paredes celulares das bactérias e dos fungos. Essa molécula de estrutura química similar à da celulose, é degradada por lisozima, presente no corpo humano, e por quitosanase bacteriana³⁰. Devido a fácil degradação e por que os produtos gerados não são tóxicos, a quitosana tem atraído a atenção como excipiente para liberação controlada de fármacos, mas o seu uso tem sido limitado por causa de sua insolubilidade em água e em alguns solventes orgânicos³¹, tais como, acetona, DMF, etc.

A presença de grupos amino confere à quitosana a solubilidade em solventes orgânicos e inorgânicos, diluídos na faixa específica de pH até aproximadamente 6,0 e mais versatilidade química do que a celulose, assim aumentando, o seu campo de atuação como, por exemplo, na medicina, odontologia, agricultura, indústrias cosméticas e de alimentos²³.

A quitosana devido a seu caráter catiônico, atua como um polieletrólito, agindo como floculante nos tratamentos de efluentes líquidos e como resina quelante na remoção de metais pesados^{23-24,32}.

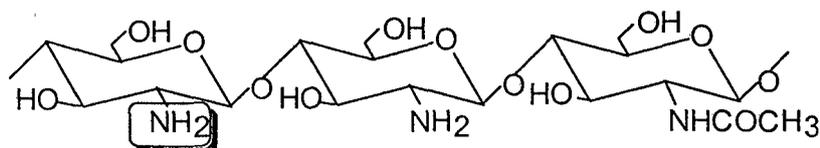


Figura 2. Estrutura da quitosana

2.2 Caracterização da quitosana

2.2.1. Determinação do grau de desacetilação

Segundo ASAKO e colaboradores³³ a estrutura molecular e as propriedades da quitosana são largamente afetadas pelo grau de desacetilação. Por essa razão, necessita-se estabelecer um método para determinar exatamente o grau de desacetilação. De acordo com os citados pesquisadores, existem várias técnicas para esta determinação, tais como: a titulação coloidal, a análise elementar, a proporção absorvida no infravermelho e a espectroscopia em RMN ^1H .

O uso da quitosana em diferentes áreas requer a escolha de um método de determinação do grau de desacetilação seja confiável para satisfazer as exigências da utilização preferida para este polímero.

O teor dos grupos amino de quitosana será determinado usando a titulação coloidal por condutometria. Obtém-se um gráfico de condutância em função do volume de titulante, o qual permite a determinação dos volumes relativos aos pontos de equivalência, cuja diferença corresponde ao volume requerido para neutralizar os grupos amino³⁴.

O princípio desse método está baseado no somatório das condutâncias individuais das espécies presentes na solução. Como na solução estão presentes os

íons hidrogênio e hidroxila, que são os mais condutores, observa-se uma mudança na condutância destes, visualizada no monitor do condutímetro, devido a concentração desses íons ser função do volume do titulante adicionado. O valor algébrico da condutância varia proporcionalmente à concentração dos íons presentes no meio, mas a condutância de uma determinada solução não varia linearmente com adição de reagente, devido ao efeito da diluição da água que está sendo adicionado junto com o reagente e a influência da temperatura na condutividade. Assim os trabalhos de precisão exigem que as experiências devam ser feitas em banho termostatizado³⁵⁻³⁶.

2.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN ¹³C)

A espectroscopia de RMN é uma forma de espectroscopia de absorção, na qual uma amostra absorve radiação eletromagnética, na região de radiofrequência, em uma frequência governada pelas características estruturais da amostra. Esta absorção é função de determinados núcleos da molécula. O espectro RMN obtido de uma amostra apresenta um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades³⁷.

Em virtude do desenvolvimento científico, muitas inovações estão sendo feitas sobre esta instrumentação, permitindo aumentar as vantagens no seu uso. Uma delas, foi a transformação de Fourier que converte através de software adequado a informação obtida em um espectro convencional de RMN¹³C, permitindo a caracterização e identificação dos compostos químicos. Pode-se usar as amostras tanto na forma líquida como sólida³⁷. Os deslocamentos químicos observados no

espectro de ^{13}C vão até 240 ppm, isto é, uma faixa 20 vezes maior aproximadamente, que a observada em espectros de ^1H (cerca de 12 ppm). Esta característica fornece a resolução da maioria dos sinais individuais³⁷.

O espectro ^{13}C de polissacarídeos, apresenta um deslocamento químico de carbono anomérico (C) na região de 95-110 ppm bem separado dos outros sinais. Na região de 60-65 ppm encontra-se um sinal distinto do carbono (C_6) primário do álcool. Os dois sinais próximos de 80 ppm estão relacionados ao (C_4). Os deslocamentos, na região de 75 ppm, são dos carbonos secundários (C_3) e (C_5) e são sinais difíceis de identificar. O sinal do (C_2) aparece de 56 a 57 ppm. No caso específico da QTS duas linhas correspondentes ao $\text{C}=\text{O}$ e CH_3 aparecem no espectro devido ao polímero não estar completamente desacetilado³⁸⁻⁴¹.

2.2.3. Espectroscopia vibracional no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é também uma instrumentação usada freqüentemente para identificação dos compostos. Nesse caso, a região do espectro eletromagnético, correspondente ao infravermelho, representa a localização da maior parte da energia das vibrações moleculares e tem o comprimento de onda^{37,42-44} entre 2,5 e 15 μm (4000 a 667 cm^{-1}). Os grupos funcionais e os átomos de uma amostra estudada apresentam, por exemplo, as freqüências características permitindo, após um estudo minucioso, determinar as estruturas esperadas ou não³⁵⁻³⁷.

Esta técnica é muito importante na obtenção de informações estruturais dos polímeros e suas modificações, assim como na identificação da ocorrência ou não das interações fracas (pontes hidrogênicas, dipolares) entre os componentes

poliméricos⁴⁵⁻⁴⁷, deslocamentos de bandas de absorção de certos grupos funcionais -OH (3200 - 3600 cm^{-1}), =NH (3300 cm^{-1}), grupos carbonílicos (1640 - 1870 cm^{-1}). Por essa razão, o espectro no infravermelho será usado para identificar a QTS e a QTS modificada³⁷.

2.3. Modificações químicas na quitosana

A QTS é geralmente usada na forma de pó ou de flocos, ambos não porosos mas solúveis em meio ácido. Essa solubilidade limita seu uso nas diferentes áreas tecnológicas, como a da recuperação dos íons metálicos em água residual com valores baixos de pH. Também sua transformação em gel no TGI impede a absorção de vitamina C.

A transformação da QTS em flocos ou pó, em microesferas ou microcápsulas porosas, pode superar muitas destas limitações. Ainda, alguns tratamentos químicos como a reticulação dos grupos aminos, a redução dos iminos e a enxertia com o poli(ácido acrílico) feitos nas microesferas ou microcápsulas permitem melhorar sua resistência biológica e química.

2.3.1. Reticulação da quitosana

As bases de Schiff ou iminas substituídas são formadas por desidratação espontânea das α -hidroxi-aminas, após reação das aminas primárias e secundárias com os grupos carbonila de aldeídos e cetonas, em presença de catalisadores ácidos⁴⁴.

A QTS, devido à presença de grupos amino livres na sua estrutura, pode reagir com glutaraldeído para formar ligações intermoleculares ou reticuladas através das bases de Schiff resultantes, obtendo um formato de redes. As ligações covalentes entre os grupos amino e os aldeídos terminais extremos do agente reticulante são irreversíveis e resistentes a pH e temperatura. A razão para o uso do agente reticulante bifuncional glutaraldeído (1-5 pentanodiol) para inibir a solubilização através da formação de bases de Schiff com os grupos amino livres da unidade glucosamina do polímero²³ (Figura 3). A reticulação da QTS resulta na formação de molécula insolúvel na faixa de pH do TGI, apresentando um aumento da resistência biológica, química e mecânica⁴⁸.

NAKATSUKA e ANDRADY estudaram a permeabilidade e a difusão da vitamina B-12 em QTS, QTS reticulada e blenda de QTS/álcool polivinílico (PVA). Esses estudos mostraram que aparentemente o coeficiente de difusão, D , para membranas de blendas e QTS reticulada depende somente do equilíbrio de intumescimento, Q , do material na água⁴⁹.

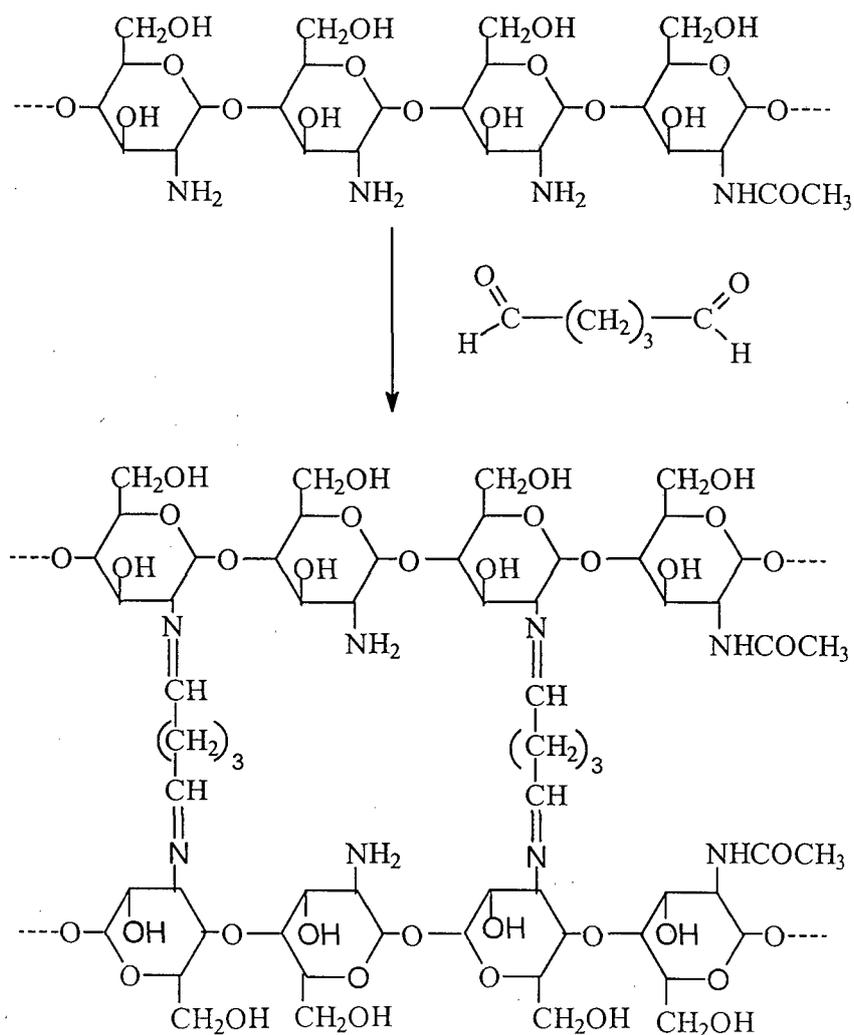


Figura 3. Reticulação da QTS com o glutaraldeído

2.3.2. Copolimerização de enxerto

2.3.2.1. O uso de cério como iniciador redox

O uso dos íons cério para iniciar a copolimerização foi proposto pela primeira vez por MINO e KAIZERMANN⁵⁰ em 1958. Essa técnica, por ser de aplicação relativamente fácil e de alta eficiência, atraiu os pesquisadores durante três décadas.

Salienta-se, todavia, que a natureza heterogênea da reação dificultou o acerto entre a cinética e o mecanismo da mesma.

Estudos realizados sobre substratos celulósicos, utilizando-se cério(IV) como iniciador redox, têm sido publicados⁵¹⁻⁵³. LEZA e colaboradores⁵⁴⁻⁵⁵ realizaram estudos sobre a capacidade do íon Ce^{4+} de iniciar a polimerização do monômero 4-vinilpiridina na celulose, nas fibras de celulose modificadas e na ausência de agente redutor.

Também comprovaram que quando a celulose é oxidada por sais de cério, como o nitrato de cério(IV) amoniacal, radicais livres capazes de iniciar a polimerização vinílica são formados na celulose. Quando os radicais produzidos são abundantemente formados, a reação de copolimerização de enxerto é mais favorecida que a do homopolímero. Outras pesquisas envolvendo monômeros vinílicos, tal como ácido acrílico, com iniciador redox, também têm sido investigadas⁵⁶.

2.3.2.2. Copolimerização de enxerto de ácido acrílico sobre a quitosana

Nos últimos anos, tem sido observado um crescente interesse pela modificação de polímeros, através da copolimerização de enxerto, com o objetivo de melhorar as suas propriedades. Nesse sentido, a reação de enxertia, iniciada por sistemas redox (Ce IV), tem mostrado grande eficiência, apresentando as seguintes características: curto período de indução, baixa energia de ionização, condição reacional à temperatura abaixo ou igual à ambiente e pouca formação de homopolímero^{53,55}.

Os copolímeros consistem em uma cadeia principal de um homopolímero com ramificações de um outro homopolímero, através de ligações covalentes. Os

copolímeros enxertados são heterogêneos e multifásicos, sendo suas propriedades atribuídas diretamente ao seu caráter multifásico, o qual é inerente à incompatibilidade entre as diferentes seqüências de polímeros⁵³.

Os copolímeros enxertados com cadeias laterais de monômeros vinílicos, apresentam uma promissora perspectiva como novos materiais para um grande número de aplicações, tais como trocadores iônicos, agentes quelantes, eletrodos modificados, bactericidas, membranas de separação, suporte para enzimas e revestimento para papéis etc.⁵⁷⁻⁶²

O poli(ácido acrílico) (Figura 4) é solúvel em solventes polares, tais como, metanol, etanol, etileno, glicol, dioxano, dimetilformamida (DMF), água e também em bases diluídas. É insolúvel em solventes apolares, como os hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos. Esse polímero, devido a sua solubilidade em água, tem muitas aplicações como gomas têxteis, agente de suspensão para pigmentos inorgânicos, adesivos e espessantes.

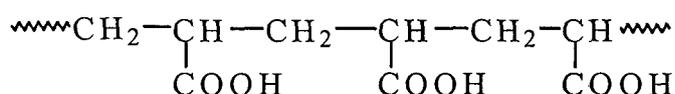


Figura 4. Estrutura do ácido poliacrílico

O ácido poliacrílico é preferido por apresentar a melhor estabilidade hidrolítica e é suscetível de polimerização devido a existência de um radical simples. Este polímero, de fácil aproveitamento, apresenta baixo custo de síntese.

O arranjo tático dos resíduos monoméricos nos polímeros hidrofílicos, pode influenciar a solução ou as propriedades de intumescimento⁶³. O ácido poliacrílico é muito sensível ao pH, mas a sua forma espiral "estendida" pode suportar até 25% de

ionização⁶⁴. Por essa razão, a sua titulação, quando realizada de alto valor de pH até baixo valor de pH permite determinar o pK_a ou pK_b aparente⁶⁵⁻⁶⁶ como função do grau de ionização ou de protonação. Conclui-se que o tamanho do ácido poliacrílico diminui com a redução dos monômeros nos polímeros e desaparece quando a fração molar está ao redor⁶⁶ de 10%. O peso molecular do ácido poliacrílico é de aproximadamente 20.000 daltons, sendo que sua função é introduzir nova funcionalidade no polímero e uma das vantagens de seu uso é a sua biocompatibilidade⁶⁷.

Um mecanismo de copolimerização de enxerto foi proposto por MOHANTY e colaboradores para o enxerto de metacrilato na celulose⁶⁸, conforme mostrado abaixo:

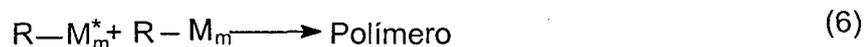
Iniciação:



Propagação:



Terminação:



Onde R é a celulose, M o ácido acrílico, R^* e M^* são radicais livres da celulose e do ácido acrílico respectivamente.

Certas reações de enxerto foram estudadas cuidadosamente, como por exemplo, o acrilato de etila na gelatina usando o nitrato de cério em meio aquoso⁶⁹, o metacrilato de metila na celulose⁷⁰, que permitiram calcular a concentração dos compostos empregados (iniciador, monômero e gelatina) e o grau de enxerto em função dos parâmetros reacionais o tempo e a temperatura.

Cálculo do grau de enxerto (%GE):

$$\%GE = \frac{P_2 - P_1}{P_1} \times 100 \quad (9)$$

onde

%GE: grau de enxerto

P_1 : massa do polímero não enxertado

P_2 : massa do polímero enxertado

2.4. Eosina

A eosina (Figura 5) é um corante utilizado como marcador para estudo da liberação de fármacos microencapsulados, apresentando-se sob duas formas:

- cristal vermelho com tom azul e pó vermelho com tom marrom

A eosina na forma de pó vermelho que será utilizada na padronização da reação de liberação da rifampicina, apresenta as seguintes características:

- é muito solúvel em água, pouco solúvel em álcool e insolúvel em éter;

- a solução aquosa concentrada acentua a coloração vermelho-azulada, mas a diluição 1/500, apresenta a coloração vermelho-amarelada;

- a solução alcoólica exibe uma forte fluorescência verde;

- a DL_{50} no porco é de 5 g/Kg;
- apresenta peso molecular 691,91 mol/g ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$);
- é útil para a coloração de diversos materiais, como, por exemplo, papéis, seda, unhas etc ⁷¹⁻⁷².

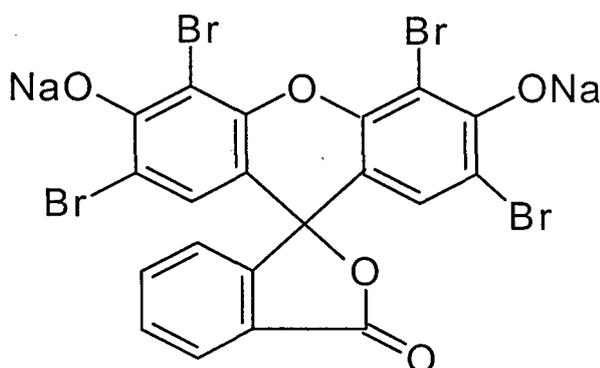


Figura 5. Estrutura da eosina

2.5. Rifampicina

A rifampicina (Figura 6), antibiótico de amplo espectro, de peso molar 822,95; e de fórmula molecular $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, apresenta uma cor laranja que varia a vermelho intenso, possui a absorção máxima em pH 7,38 nos comprimentos de ondas: 237, 255, 334, e 475 nm, com absorvidades molares de 33.200, 32.100, 27.000, 15.400, respectivamente⁷³.

Esta molécula é fracamente solúvel em água de pH 6,0 e seu ponto de fusão oscila entre 183 e 188 °C. Também a rifampicina apresenta um comportamento polimorfo, devido a complexidade de sua estrutura, que exhibe as diferentes possibilidades para interações por ligações de hidrogênios, conformação e

ionização, em conseqüência permitindo a existência de formas cristalinas diferentes⁷³.

Nos pH 1,7 e pH 7,6 a rifampicina comporta-se com um zwitterion, relacionado, respectivamente, para o grupo 4-hidroxi e para o grupo nitrogênio 3-piperazina. Sua DL₅₀ em cobaias é de 885,17 mg/Kg para administração oral, todavia, esta concentração muda para 260,33 mg/Kg para a administração intravenosa e 640,55 mg/Kg intraperitonal⁷³.

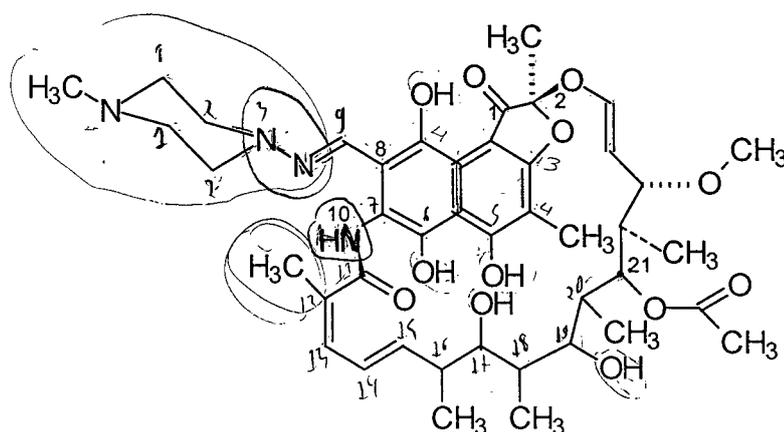


Figura 6. Estrutura da rifampicina⁷⁴

A rifampicina inibe a síntese do RNA bacteriano pela ligação à subunidade β da RNA-polimerase-DNA dependente, bloqueando desta forma a transcrição. Este fármaco é biotransformado extensivamente pelo fígado durante sua passagem no sistema hepato-portal e sua eliminação nas fezes e na urina representa 60-65% e 30% respectivamente; mas existe uma pequena parte representando 15-30% que é eliminada sem alteração. A molécula de rifampicina é bem absorvida oralmente atingindo uma concentração sérica máxima entre 2 e 4 horas e podendo permanecer até 24 horas. Também os alimentos podem retardar ligeiramente ou reduzir esta concentração sérica por isso sua administração deve ser feita quando o estômago

está vazio ou 1a 2 horas após uma refeição. Dentre os tuberculostáticos em uso a rifampicina é mais eficaz com índice de toxicidade baixo¹⁵⁻¹⁶, por essa razão representa o agente antituberculose de escolha, devido a sua capacidade de matar os bacilos (*Mycobacterium tuberculosis*) semi-inativos¹⁶.

A rifampicina possui um substrato enzimático CYP3A3/4 que induz CYP1A2, 2C9, 2C18 -19, 3A3/4, 3A5 -7. Este fármaco também induz as enzimas hepáticas que diminuem a concentração plasmática dos bloqueadores do cálcio, dos corticoides, dos inibidores de protease, dos anticoagulantes orais, da teofilina, do cloranfenicol, do paracetamol, dos contraceptivos orais ou sistêmicos e inibe a transcriptase reverse não-nucleotídica. Sua administração junto com halotano aumenta a sua hepatotoxicidade e as concentrações séricas de seus metabólitos. Os efeitos adversos observados após administração da rifampicina são por exemplo rubor, mudança comportamental, tontura, sonolência, prurido, hemólise, anemia hemolítica, enxaqueca, mialgia, fraqueza, distúrbio epigástrico, náusea, anorexia, pancreatite, colite pseudomembranar e exantema⁷⁴⁻⁷⁶.

Alguns estudos de biodisponibilidade realizados com pacientes infectados com *Mycobacterium tuberculosis* de virulência atenuada e em pacientes com HIV, mostraram que o nível de rifampicina no plasma atinge o máximo após duas horas de administração oral e decai drasticamente, devido a uma baixa absorção do fármaco, denotando uma ineficácia terapêutica. Contudo, a análise da farmacocinética tem mostrado que a taxa de absorção intestinal aumenta com o tempo, bem como a taxa de sua biotransformação¹⁶.

2.6. Análises de TGA e de DSC

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica na qual se pode acompanhar as mudanças na massa de uma amostra durante um período de tempo, enquanto varia sua temperatura. Durante o processo, a temperatura é aumentada, mas a taxa de aquecimento da amostra permanece constante. Na prática, alguns itens como a evaporação, a sublimação, a decomposição, a oxidação, a redução podem ser medidos⁷⁷⁻⁷⁸.

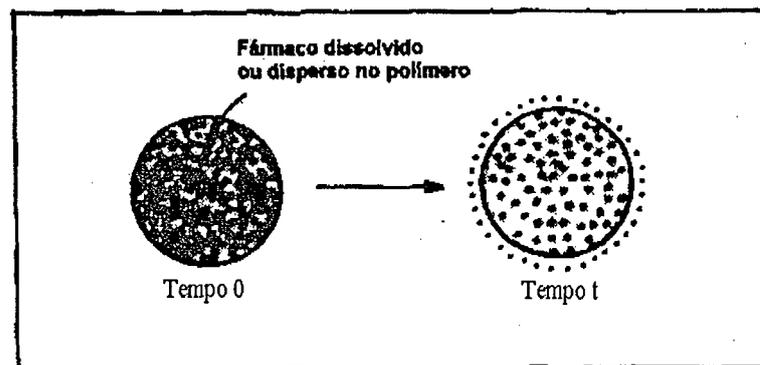
A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é a técnica pela qual se podem acompanhar as transições de fase ou reações químicas por observação de calor absorvido ou liberado. Essa é especialmente adaptada ao estudo das estruturas no interior de um sólido a uma temperatura elevada e também empregada para determinar a entalpia do processo⁷⁷⁻⁷⁸.

O processo consiste em aquecer, simultaneamente, num aparelho típico uma referência (R) e uma amostra (A), sendo que a temperatura tem aumento linear em função do tempo. A técnica é muito usada no estudo de matrizes copoliméricas (QTS modificada) ou de blendas poliméricas, podendo fornecer a informação com relação à enxertia ou à miscibilidade entre os componentes poliméricos⁷⁷⁻⁷⁹.

Quando a referência e a amostra são aquecidas, uma variação de temperatura gera uma diferença de potencial, que é captada por dois termopares conectados. Essa variação de temperatura (ΔT) é compensada por um fluxo de calor que é registrado no termograma⁷⁷⁻⁷⁹.

2.7. Microencapsulação

Um dos métodos de imobilização de enzimas ou de proteção de fármacos consiste na sua introdução em microesferas semipermeáveis (Esquema 1). A microencapsulação e a liberação controlada são conceitos relativamente antigos, mas suas aplicações começaram nos anos⁸⁰ 80.



Esquema 1. Representação de uma microesfera (Alonso, 1992)

Em 1978, LIM e SUN introduziram o par alginato/polisina para encapsulação das ilhotas de Langerhans, por combinação entre um poliânion e um policátion. Essa matriz polimérica (alginato/polisina) apresentou estabilidade, devido às interações eletrostáticas⁸¹.

A partir desse princípio, DAUTZENBERG e outros usaram a combinação do sulfato de celulose com poli(dimetildialilamônio) para formar microesferas. Do mesmo modo, DUPUY e colaboradores fizeram uso da acrilamida e do metilenobis(acrilamida) com agarose com a mesma finalidade, sendo que nas ditas microesferas foi encapsulada a fosfatase ácida⁸²⁻⁸⁴.

A microencapsulação é uma variante de imobilização, na qual o encapsulado (enzima ou hormônio ou fármaco) é disperso em pequenas esferas (2 μ m a 500 μ m) de membranas poliméricas semipermeáveis, com poros de tamanho variado,

dependendo do material utilizado, geralmente pode ser polímeros naturais ou sintéticos⁸⁵.

Existem duas razões básicas envolvidas na utilização deste processo: a necessidade de proteção do material encapsulado contra agentes externos ou a proteção do meio em que se encontra o encapsulado, tendo, como exemplo, a proteção do encapsulado contra produtos químicos, temperatura, calor e outros agentes⁸⁵.

Também podem ser citadas situações em que a microesfera será administrada ao organismo humano, para evitar lesão nas mucosas da parede do TGI (trato gastrointestinal), isto é, sem apresentar conseqüências danosas devido à presença do encapsulado, como no caso de irritação gástrica, originada pela ingestão de medicamentos⁸⁵⁻⁸⁶ (exemplo do uso de ácido acetilsalicílico encapsulado). A microencapsulação pode ser usada em diferentes funções e tem sido empregada em muitos campos da tecnologia, freqüentemente associada com aplicações nas quais o encapsulado (proteínas, gases, líquidos ou materiais sólidos), pode ser modificado na sua forma, volume, aparência, cor, densidade, reatividade, durabilidade e fotossensibilidade, sendo liberado em condições controladas⁸⁵⁻⁸⁶.

Inúmeros métodos permitem microencapsular um material ativo dependendo do tipo de material, da aplicação e do mecanismo de liberação, podendo, ainda, influenciar nas suas características morfológicas. Dependendo do tipo de envolvimento do agente encapsulante e do material ativo, os métodos usados podem ser de natureza física, química ou físico-química.

Entre os métodos físicos está o "spray drying" (secagem de gotículas), o "spray cooling" (solidificação de gotículas por resfriamento) e a extrusão (modelamento de microesferas por meios mecânicos)⁸⁷. Já nos métodos químicos

está a inclusão molecular (encapsulamento de certas moléculas por outros polímeros) e a polimerização interfacial (reação de polimerização no limite de duas soluções, uma delas contendo o material ativo em suspensão)⁸⁷.

Os métodos físico-químicos incluem a coacervação ou separação de fases (separação do polímero encapsulante de um meio líquido e sua precipitação na superfície do material ativo disperso no mesmo meio) e o envolvimento lipossômico (encapsulação por membranas lipídicas)⁸⁸.

Geralmente os sistemas de microesferas e microcápsulas de quitosana são produzidos por essas técnicas.

Esses processos de microencapsulação diferem uns dos outros por pequenos detalhes, dependendo da molhabilidade e da solubilidade do núcleo, da elasticidade, da permeabilidade e das características da parede do polímero⁷⁶⁻⁸¹. Contudo, neste trabalho, a técnica utilizada será a *separação de fases*, na qual a microesfera é formada devido à interação entre o polímero ou emulsão polimérica, e um meio contendo um agente, que induz esse processo chamado de coacervação. Quando o agente indutor é um eletrólito, em alta concentração, denomina-se de "salting out"⁸⁵⁻

86,89-92

2.7.1. Classificações das micropartículas (microesferas e microcápsulas)

Em relação às suas estruturas, as microcápsulas podem ser definidas como partículas nas quais os encapsulados ou fármacos (sólidos, líquidos ou vapores) são recobertos pelas membranas semi-permeáveis formadas por um ou mais polímeros. A membrana atua como fator limitante na liberação do encapsulado. Esses sistemas microcapsulares podem ser classificados como os reservatórios ou as represas.

Denominam-se microesferas aqueles sistemas cujos diâmetros variam de micrômetros a alguns milímetros e em que o fármaco ou o agente encapsulado encontra-se homogeneamente disperso ou dissolvido no interior da matriz polimérica ou cerosa. Dessa forma, obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Também nesse caso um ou mais polímeros podem constituir a matriz estrutural. As micropartículas podem ser classificadas baseando-se nas técnicas de preparação⁹³ (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das micropartículas baseada nas técnicas de preparação⁹³

Técnicas	Micropartícula
Coacervação (Inversão de fases)	Microcápsula/microesfera
Polimerização interfacial	Microcápsula
Camada fluída	Microcápsula
Encapsulação eletrostática	Microcápsula
Emulsificação/ evaporação de solvente	Microcápsula/microesfera
Emulsificação/ extração de solvente	Microcápsula/microesfera
Fusão/emulsificação	Microesfera
"Spray-drying"	Microesfera
Spray por policondensação	Microesfera
Spray por resfriamento	Microesfera
Spray por desolvatação	Microesfera

Todavia, o termo "micropartículas" pode ser usado nas duas situações devido à dificuldade de distinguir a microcápsula da microesfera. Assim, quando os

sistemas microparticulares contêm muitos fármacos nas formas de cristais podem ser chamados de microcápsulas multinucleares ou de microesferas heterogêneas⁹⁴.

As micropartículas podem ser administradas pelas seguintes vias: *oral*, quando os fármacos são encapsulados nas microcápsulas de gelatina⁹⁵, transmucosal (nasal)⁹⁶ e parenteral (intramuscular⁹⁷, intraperitonal⁹⁸, intra-articular⁹⁹).

A administração das micropartículas depende do tamanho, do fármaco, da constituição polimérica das micropartículas e da terapia para a qual o sistema foi desenvolvido⁹⁴.

2.7.2. Microencapsulação por matriz polimérica de quitosana

Alguns trabalhos têm demonstrados a importância da utilização da quitosana na microencapsulação de fármacos e peptídeos, devido às suas características físico-químicas, à sua fácil obtenção e ao seu baixo custo, por ser um subproduto da indústria pesqueira¹⁰⁰.

A quitosana, sendo um polissacarídeo catiônico, tem sido utilizada como excipiente em algumas formulações farmacêuticas orais, para melhorar a solubilização de fármacos de baixa solubilidade ou para sustentar a liberação de fármacos pelo processo de erosão lenta¹⁰¹.

Publicações recentes têm mostrado que a quitosana pode ser degradada pela microflora presente no cólon, o que facilitaria sua utilização como polímero para a produção de microesferas, pois a liberação de fármacos ou proteínas nesta região do intestino pode ser facilitada¹⁰².

Um dos aspectos mais importantes do processo de microencapsulação é o controle da porosidade. Ressalte-se que esse processo envolve a formação de microcápsulas ou microesferas por adição de gotas de uma solução polimérica, catiônica ou aniônica, sobre uma outra solução polimérica carregada opostamente. Assim, a escolha do contra-íon, para formação do complexo, determina as características das microesferas ou microcápsulas, como, por exemplo, um contra-íon de baixo peso molecular com um polieletrólito que atua como reticulador, resultam na formação de géis, tais como géis de quitosana formados pelo fosfato.

SHIRAIISHI e colaboradores prepararam as microesferas de quitosana/tripolifosfato, gotejando com uma seringa as soluções de quitosana hidrolisada, cujo peso molecular oscila entre 7600 até 83000. Com as microesferas obtidas encapsularam a indometacina e estudaram o efeito do peso molecular da quitosana na taxa de liberação deste fármaco¹⁰³.

Também foi demonstrado que as microesferas obtidas com uma solução polimérica de quitosana apresentaram uma boa geometria esférica e uma superfície lisa. Essas microesferas ajudaram no estudo do grau de intumescimento, através da densidade das ligações feitas por reticulações, e também na quantidade de ácido acetilsalicílico, teofilina ou de griseofulvina incorporada e na taxa de liberação de cada um desses fármacos¹⁰⁴.

O método de separação de fases é usado para preparar microesferas de quitosana/carboximetilcelulose (CMC). Nesse caso, a carboximetilcelulose sódica (NaCMC) pulverizada é adicionada à parafina líquida antes da emulsificação. Quando a concentração do ácido acético é inferior a 35% da concentração total do meio reacional, não há emulsão água/óleo, mas aparece um precipitado branco, devido à neutralização do ácido acético pela carboximetilcelulose sódica na parafina

líquida. Em alta concentração de ácido acético, as microesferas apresentam-se com tamanho menor, resultando numa liberação rápida do fármaco encapsulado, no caso da teofilina¹⁰⁵.

Um estudo feito sobre as microesferas e microcápsulas, obtidas a partir do complexo quitosana/alginate, demonstrou que essas cápsulas são resistentes, flexíveis e permitem a permeabilidade das proteínas de pequeno peso molecular, quando preparadas com a quitosana de peso molecular médio¹⁰⁶ ($M = 1,6 \times 10^5 - 3,3 \times 10^5$).

Um estudo das características físico-químicas das cadeias de quitosana foi feito para observar as condições de seu uso, após a produção de microcápsulas de quitosana para encapsular a hemoglobina e a dextrana¹⁰⁷.

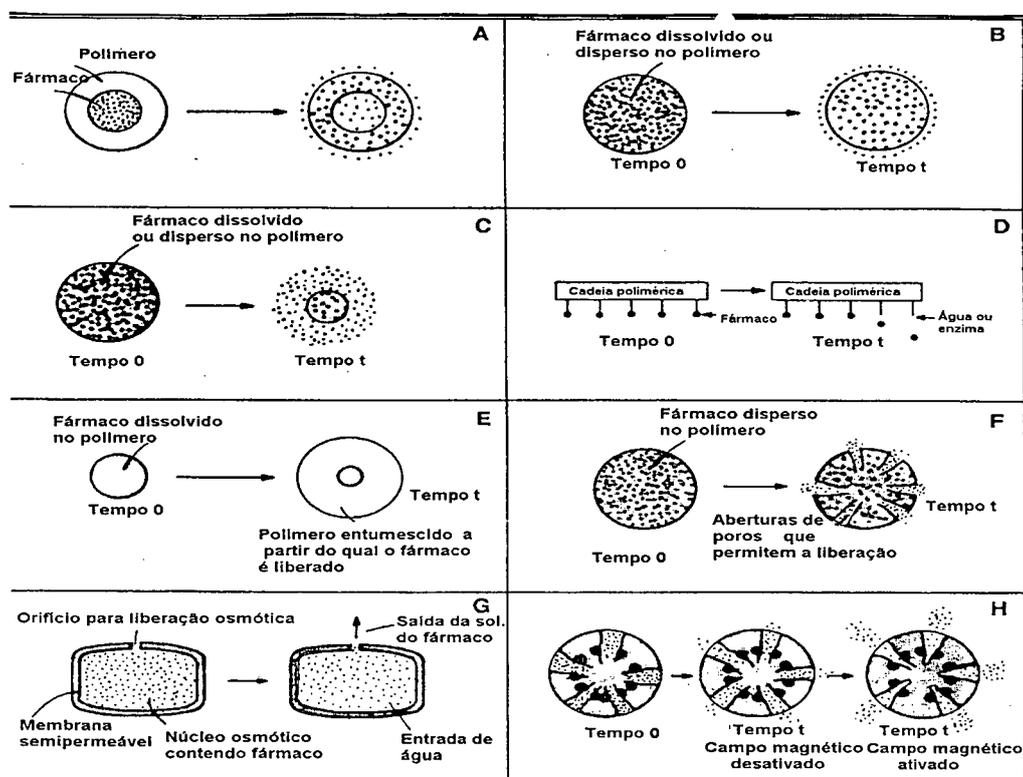
Atualmente, muitas micropartículas e microesferas preparadas a partir da matriz de quitosana, usando as técnicas de separação de fase e evaporação ou extração de solvente, estão sendo utilizadas para microencapsular os peptídeos, como a insulina para que seja administrada oralmente¹⁰⁸.

2.8. Sistemas poliméricos de liberação de fármacos

Os sistemas poliméricos (Esquema 2) em geral, têm as taxas de liberação determinadas pelo modelo do sistema e quase independem das condições do meio, tais como o pH.

Esses sistemas podem também liberar os fármacos durante um longo período (dias, até anos). Apesar das macromoléculas, conjugadas às vesículas ou aos fármacos, serem capazes de prolongar a liberação dos fármacos, um melhor controle é permitido se a substância é encapsulada em um material polimérico¹⁰⁰.

Estes diferem das velhas preparações de “liberação sustentada” ou de “liberação lenta”, as quais incluem complexos (de sal ou de resinas trocadoras de íon), suspensões, emulsões, revestimentos de diluição lenta (que se dissolvem somente no intestino) e os comprimidos¹⁰⁹.



Esquema 2. Mecanismo de liberação de fármacos a partir de matriz polimérica (A e B : difusão; C: degradação do polímero; D: clivagem do fármaco; E: intumescimento; F: abertura de poros por pressão osmótica; G: pressão osmótica; H: campo magnético) (LANGER, 1990)

Os sistemas de liberação controlada possuem algumas vantagens sobre as terapias com formas farmacêuticas convencionais, por exemplo, após ingestão ou injeção da forma farmacêutica padrão, o nível do fármaco no sangue eleva-se até atingir um pico máximo e depois decresce, o que pode causar uma variação na

resposta terapêutica, como também efeitos tóxicos. Todavia, as preparações de liberação sustentada diminuem os valores das concentrações máximas e mínimas do fármaco, mantendo os níveis mais constantes. Já as preparações de liberação controlada mantêm o nível terapêutico do fármaco, a partir da simples administração.

Existem outras vantagens da liberação controlada, as quais são:

- liberação localizada do fármaco em um compartimento corporal, diminuindo, deste modo, o nível sistêmico do fármaco;
- proteção dos fármacos que poderiam ser rapidamente destruídos pelo organismo, o que é particularmente importante para as moléculas biologicamente ativas, como por exemplo, insulina e heparina;
- pouca necessidade de se prevenir contra possíveis flutuações dos níveis do fármaco no organismo;
- maior aceitação do medicamento pelo paciente com melhor adesão ao tratamento

Existe um outro sistema de liberação de fármacos, além das microesferas, que é constituído pelas **bombas**, as quais são semelhantes a seringas em miniatura que, em contato com o organismo, liberam as substâncias nelas inseridas. Pode-se classificar as bombas em dois tipos: a de uso externo e a implantável¹⁰⁹.

A bomba de uso externo, cujo esgotamento se faz através de pressão orientada, é uma seringa em miniatura, que libera o fármaco nela contido pelo cano, à velocidade constante, a qual é ajustada pela alteração da concentração do respectivo fármaco.

A bomba implantável de pressão orientada, por sua vez, é desenvolvida utilizando-se um propulsor de fluorocarbono, como força motriz. Neste caso, a bomba controla um fole dobrável, o qual divide o seu interior em duas câmaras, uma

contendo o propulsor e a outra a solução do fármaco. Na temperatura corporal, o vapor da pressão exercida pelo propulsor força a solução do fármaco através do filtro, regulando o fluxo a uma velocidade constante¹⁰⁹.

As bombas são usadas no tratamento de câncer, em que um catéter é estendido a partir da bomba, sendo inserido no vaso sanguíneo, a fim de alimentar o órgão doente, como, por exemplo, o fígado ou o cérebro debilitados, aumentando, dessa maneira, a sua velocidade de liberação e realizando uma economia de força para o resto do corpo¹⁰⁹.

Nos dois casos (bomba de uso externo e implantável), a força motriz é uma diferença de pressão que resulta no volume de escoamento do fármaco, através de um orifício. Registre-se, também, que algumas bombas são recarregáveis¹⁰⁹.

Segundo LANGER, as bombas são mais abundantes e baratas que o sistema polimérico. Apesar de requererem uma cirurgia para a sua implantação, oferecem a vantagem de um controle preciso do fármaco e podem liberá-lo diretamente no sangue¹⁰⁹.

O uso dos polímeros para liberar esteróides foi largamente estudado, sendo examinados quatro tipos de sistemas:

- implantes de reservatório subdermal, compostos de polímeros não degradáveis, que liberam fármacos por mais de cinco anos (como no caso do Norplant). Esses sistemas se baseiam no estudo de difusão seminal, através de silicone de borracha;
- implantes subdermal ou de microesferas injetáveis, compostos de materiais degradáveis, como copolímeros de ácido glicólico-ácido lático, policaprolactonas ou colesterol;

- liberação esteróidica intra-uterina, como reservatório copolimérico de acetato de vinil-etileno;
- anéis vaginais que são os sistemas de reservatório de silicone, usado, geralmente, para cada ciclo menstrual, durante três a seis meses¹⁰⁹.

Outros sistemas de liberação controlada estão sendo pesquisados, incluindo a liberação localizada de difosfonatos (quelantes de cálcio), para prevenir a calcificação valvular do coração, e dopamina ou bromocriptina, para tratamento da doença de Parkinson¹⁰⁹.

As **vesículas** são microesferas ou transportadores coloidais, compostas de substâncias como proteínas, lipídios (lipossomos), carboidratos ou polímeros sintéticos. As vesículas possuem algumas das vantagens do fármaco macromolecular conjugado, como por exemplo, a farmacocinética como a biodistribuição alteradas, além de colaborarem para que o fármaco apresente-se altamente carregado. Dentre as várias espécies de vesículas, as mais estudadas são os lipossomos, constituídos por várias composições e estruturas lipídicas, sendo atóxicos, degradáveis, não imunogênicos. Entretanto, apresentam uma baixa estabilidade, tanto na estocagem quanto durante o uso¹⁰⁹.

A estabilidade lipossomal aumenta conforme a elevação do conteúdo do colesterol, bem como dos lipossomos polimerizados sintéticos, mas a biodegradabilidade, por sua vez, pode ser diminuída¹⁰⁹.

Nos **sistemas transdérmicos** a pele é considerada muitas vezes como barreira que guarda os agentes, e também os fármacos fora do corpo. Todavia, alguns fármacos possuem as propriedades de penetrar na pele com taxas apreciáveis. A pele possui uma capacidade de absorção adequada para que as baixas doses sejam suficientes. No entanto, comparada com a via oral, as perdas

devido ao metabolismo hepático são reduzidas. A barreira limitante para a entrada de fármacos é a camada externa chamada de *stratum corneum* que é composta de queratina e lipídios. Um fármaco de baixo peso molecular e de solubilidade apreciável na água e óleo pode penetrar na pele para exercer seu efeito.

O primeiro sistema transdérmico usado clinicamente libera a escopolamina dos sistemas de reservatório para prevenir cinetose. Após sua aplicação, o sistema precisa de 4 a 6 horas de liberação para atingir as doses terapêuticas. O mais usado dos sistemas transdérmicos é a nitroglicerina para o tratamento das doenças coronárias¹⁰⁹.

O outro desafio na liberação transdérmica é aumentar o número de fármacos que podem ser administrados, por isso quatro experiências estão sendo testadas, como a da carga elétrica dos íons, isto é, iontoforese, na qual as moléculas carregadas atravessam a pele, sendo inferido que a iontoforese permite a liberação transdérmica das moléculas de alto peso molecular, como a insulina. A segunda é baseada no uso do ultra-som para aumentar a permeação dos fármacos, evitando o atraso no tempo de liberação transdérmica, observado nos animais de experiência¹¹⁰⁻¹¹¹. A terceira consiste na modificação química, na qual uma molécula de fármaco lipofílico pode ser sintetizada assim que atravessar a pele e, conseqüentemente, convertida por enzimas epidérmicas na sua forma terapêutica original, e a última experiência realizada é a dos estimuladores de penetração como Azona, DMSO (dimetil sulfóxido) e DMF(dimetil formamida)¹⁰⁹.

Cabe mencionar os **sistemas de liberação para peptídeos e proteínas**. Durante muitos anos, os sistemas de liberação controlada foram somente capazes de liberar, lentamente, fármacos de baixo peso molecular, as moléculas maiores, como as proteínas, foram, dessa forma, excluídas, porque os polipeptídeos eram

vistos como muito grandes para difundir através da maioria dos materiais poliméricos, mesmo após o intumescimento¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

As moléculas grandes podem difundir-se através de grandes poros membranares, como filtros, miliporos ou alguns géis, como poliacrilamida. Entretanto, nesses casos, a difusão é geralmente muito rápida e os tecidos danificados não são facilmente observados.¹¹²

A descoberta de que pequenas moléculas poderiam ser liberadas por sistema poliméricos, por tempo prolongado, estimulou alguns pesquisadores a trabalharem na hipótese de que as moléculas maiores, como as proteínas poderiam também ser liberadas por este sistema¹¹². São exemplos de polímeros que atuam nesse processo: o acetato de vinil-etileno (não degradável) e o copolímero ácido glicólico-ácido lático.¹¹²

Alguns géis como poli(hidroxietilmetracrilato) ou álcool polivinílico (PVA) também atuam na liberação de proteínas, por um período mais curto do que os polímeros acima¹¹².

O mecanismo de liberação geralmente envolve um movimento de polímeros através dos poros da matriz polimérica. Se o polímero desgastar, isso pode afetar a estrutura dos poros e acelerar a liberação. Os fatores que influenciam a velocidade de liberação incluem o tamanho, a carga, a solubilidade e o peso molecular da partícula protéica, a dimensão e a forma da matriz polimérica¹¹³⁻¹¹⁵.

Esses sistemas poliméricos, que estão sendo atualmente usado nos estudos para liberação de proteína, fazem uso da insulina, de fatores de crescimento e de inibidores de angiogênese¹¹⁵.

O primeiro sistema de liberação de peptídeo, a ser aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) é o copolímero ácido glicólico-ácido lático e acetato de leuprolídeo, introduzidos no tratamento de câncer¹¹⁵.

Vários desafios ainda existem na liberação de peptídeos, como, por exemplo, quando as proteínas encapsuladas permanecem por um longo tempo na luz intestinal, podendo se agregar ou se desnaturar, devido à ação da microflora local a 37°C. Isto pode causar menor atividade biológica e possível mudança na imunogenicidade^{112,115-118}.

Por fim, deve-se fazer menção ao **sistema polimérico de liberação pulsátil**, o qual seria desejável se pudesse ser concebido para liberar fármacos em níveis altos, quando necessário, isto é, imitando os processos do corpo humano, sendo que a abertura e o fechamento desse sistema estão, ainda, em processo de estudo¹⁰⁹.

A abertura do sistema polimérico pulsátil atuaria com a presença de um fármaco e de uma cápsula magnética, os quais revestidos com a matriz polimérica. Todavia, as taxas de liberação aumentariam com a oscilação do campo magnético. Essas taxas seriam afetadas por alguns parâmetros, que são a frequência e a força do campo magnético, a composição polimérica e a força e a orientação dos ímãs, embebidas com a matriz polimérica¹⁰⁹.

Quando um campo magnético é aplicado sobre o sistema polimérico pulsátil, causa um aumento de 30 vezes mais nas taxas de liberação¹⁰², efeito semelhante é causado pelo uso de ultra-som¹¹⁹.

Também o fechamento dos sistemas poliméricos pulsáteis está sendo desenvolvido; um dos casos é o aumento da liberação de insulina na presença de excesso de glicose, isto é, a glicose oxidase imobilizada, juntamente com a insulina,

na membrana de poliamina, converte a glicose em ácido glucônico, tendo os grupos amina protonados juntos com a membrana. A repulsão eletrostática dos grupos amina carregados positivamente causa uma expansão da membrana e aumenta a liberação de insulina. A diminuição da concentração fisiológica da glicose, em resposta a atuação da insulina, faz com que a membrana se contraia e diminua a taxa de produção de insulina¹²⁰.

2.9. Mecanismos de liberação controlada de fármacos microencapsulados

A escolha do agente encapsulante depende do método utilizado para formar as microcápsulas ou as microesferas, do tipo de aplicação do produto (aditivos para alimentos, fármacos, fragrâncias, pesticidas, etc.) e da forma como ela agirá. A substância encapsulada pode ser liberada por estímulos mecânicos (rompimento das microcápsulas ou das microesferas, através da pressão) ou outros (variação da temperatura ou de pH no meio onde se encontram as microesferas ou as microcápsulas). Em uma loção para o corpo, por exemplo, as microcápsulas ou as microesferas que contêm a fragrância são rompidas, liberando-a, pela pressão dos dedos durante a aplicação na pele (ruptura mecânica). Já em um medicamento oral, para que a mucosa do estômago seja protegida do contato com o princípio ativo e este seja liberado apenas no local exato de sua absorção (intestino), pode-se usar um agente encapsulante que só se dissolve em meio alcalino.

Geralmente os materiais poliméricos liberam substâncias pelos seguintes mecanismos: difusão, reação química e ativação de solventes. Todavia, o mecanismo de liberação mais comum é a difusão pela qual o fármaco ou a

substância migra da posição inicial no polímero para a superfície e depois para o lugar de atuação.

Existem dois tipos de mecanismos de controle da difusão, reservatório e matriz. Um dos primeiros usos clínicos do sistema polimérico de liberação controlada é o do reservatório para melhorar o tratamento de glaucoma¹⁰⁹.

A reação química é efetuada por degradação polimérica ou clivagem do farmoquímico no polímero. A ativação de solventes, por sua vez, envolve o intumescimento do polímero ou efeito osmótico¹⁰⁹.

As taxas de liberação dos sistemas poliméricos podem ser controladas pela natureza polimérica (por exemplo, cristalinidade, poros do sistema de difusão controlada, labilidade das ligações; hidrofobicidade dos monômeros nos sistemas controlados quimicamente) e pelo projeto do sistema (por exemplo, a espessura e a forma)¹²¹.

2.10. Liberação controlada de compostos microencapsulados

As primeiras tentativas de aplicação da liberação controlada de compostos microencapsulados datam dos anos 30, mas o primeiro produto com material microencapsulado só surgiu em 1954. A indústria norte-americana *National Cash Register* foi a primeira a comercializar um papel de cópia sem carbono que revolucionaria a indústria de formulários. Esse papel recebia uma fina camada de microcápsulas contendo uma tinta sem cor. Tal camada era recoberta com um reagente também incolor. A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando a tinta incolor que ao entrar em contato com o reagente,

torna-se colorida, produzindo em outra folha uma cópia idêntica ao que estava sendo escrito no primeiro papel.

As primeiras pesquisas na indústria farmacêutica também datam da década de 50. As microcápsulas foram projetadas inicialmente para administração oral¹²² e são usadas principalmente para aumentar a estabilidade de um fármaco, para modificar ou retardar sua liberação em locais de ação, mascarar o gosto inadequado de alguns fármacos^{68,119} ou prevenir sua degradação e sustentar a liberação de fármacos no compartimento intestinal¹²¹. As substâncias antiinflamatórias, após microencapsuladas podem, por exemplo, aumentar o tempo de atuação no plasma sanguíneo, prolongando assim seu efeito no organismo¹²².

As primeiras intenções da microencapsulação centralizaram-se no desenvolvimento de revestimento que continham os materiais hidrofílicos que intumesceriam na presença de umidade, isto é, o material começaria a intumescer no estômago e quebraria no intestino¹²³.

2.10.1. Condições fisiológicas que influenciam a liberação controlada de fármacos microencapsulados

O sistema de liberação deve ser projetado considerando as condições fisiológicas por onde terá que passar até atingir seu destino final. Assim, o meio gastrointestinal deve ser considerado para a produção de um novo sistema de microencapsulação de fármacos para uso oral.

Os fatores mais importantes do meio gastrointestinal que podem afetar a eficácia da microesfera são o pH, o esvaziamento do gástrico e a atividade de enzimas digestivas¹¹⁷.

De maneira simplificada, o trato gastrointestinal pode ser dividido em três partes que são o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso, cujos valores de pH variam, de 1,0 a 3,5; de 3,8 a 6,6 e de 7,5 a 8,0 respectivamente. Geralmente, as células secretoras do estômago produzem o muco que protege e lubrifica a mucosa gástrica¹²⁴⁻¹²⁵. Esses valores de pH acima relacionados, dependem da presença ou ausência do alimento no estômago e também da diluição progressiva do ácido do estômago, pelos íons bicarbonatos da secreção pancreática¹²⁴.

No esvaziamento gástrico, o controle da mobilidade é uma barreira fisiológica importante para um sistema de liberação de fármacos de uso oral¹¹⁸. Há relatos na literatura que o tempo de esvaziamento gástrico médio é de 6 horas, mas é de consenso geral que o tempo de 1 a 2 horas não é real para se basear em um perfil de liberação¹²⁴. Todavia, o mecanismo de esvaziamento gástrico dos líquidos e dos sólidos é diferente e mal entendido, enquanto que o esvaziamento dos líquidos é controlado pela região proximal do estômago e o dos sólidos é controlado pela região distal do mesmo¹¹⁸.

Após uma refeição considerada normal a mobilidade passa do estado de jejum ao estado alimentado, dependendo do conteúdo calórico da comida. A viscosidade dos alimentos afeta o esvaziamento, assim, a alta viscosidade dos alimentos aumenta o tempo de esvaziamento em relação a baixa viscosidade¹¹⁶. A grande presença de gordura na refeição afeta a taxa de esvaziamento do estômago e o nível da atividade peristáltica¹¹⁷. Um outro parâmetro que afeta o esvaziamento é o tamanho das partículas, isto é, as partículas menores (1-5mm) são arrastadas simultaneamente com os alimentos durante o esvaziamento, por isso as partículas maiores devem atingir uma redução antes do esvaziamento.

As partículas com diâmetro superior a 5 mm são esvaziadas somente após a passagem da maioria dos alimentos. O controle do tempo de esvaziamento de um sistema pode ser mantido por alimentação, assim os fármacos com perfil de absorção, com sítios específicos, podem permitir uma absorção completa quando o tempo de esvaziamento é lento¹²⁶.

Já a atividade enzimática possui um papel importante na liberação dos fármacos. Algumas das enzimas estão envolvidas na clivagem dos pró-fármacos. As enzimas presentes no trato gastrointestinal são geralmente α -amilase, pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase e aminopeptidase. Essas enzimas estão envolvidas na digestão dos carboidratos, das proteínas e dos lipídios. As proteases do intestino grosso possuem uma atividade que varia do pH neutro ao alcalino¹²⁷.

Para que um fármaco seja absorvido por via oral é necessário que esteja dissolvido nos líquidos do trato gastrointestinal. Assim, quando se administra um comprimido de liberação convencional por essa via, observa-se sua desintegração em grânulos, que, por sua vez, se desagregam em partículas menores. A dissolução do princípio ativo já ocorre pelo contato dos sucos digestivos com a superfície do comprimido, mas adquire importância significativa a partir dos grânulos e das pequenas partículas. Uma vez dissolvido, o fármaco na forma não ionizada atravessa as membranas biológicas alcançando a corrente sanguínea¹²⁸.

2.10.2. Liberação controlada de fármacos microencapsulados em sistemas quitosana/poli(ácido acrílico)

Atualmente poucas pesquisas são feitas usando o conjunto polimérico de quitosana e poli(ácido acrílico). No entanto, YAZDANI e colaboradores sintetizaram

as microcápsulas, a partir da enxertia da quitosana com o poli(ácido acrílico), introduzindo, assim, um grande número de grupos carboxílicos no complexo quitosana/poli(ácido acrílico). Os estudos do espectro de infravermelho da quitosana e o do copolímero quitosana/poli(ácido acrílico) evidenciaram as características de solubilidade desses produtos. O grau de enxertia foi controlado pela variação da quantidade do íon ferroso usado na reação de co-catálise. Também, um estudo de intumescimento tem sido feito para analisar o comportamento dos copolímeros enxertados para uma eventual liberação controlada de fármacos¹²⁹.

Uma nova matriz mucoadesiva polimérica foi preparada, a partir da polimerização do ácido acrílico com a quitosana. O estudo dos espectros de infravermelho deste complexo quitosana/poli(ácido acrílico) mostrou que a ligação entre os dois polímeros é feita por ligações de hidrogênios. O sistema foi utilizado para liberação de fármaco transmucosal, cuja taxa de dissolução foi dependente da proporção quitosana/poli(ácido acrílico). A força de adesão desta matriz mucoadesiva pode ser comparada ao do carbopol¹³⁰.

2.10.3. Liberação controlada da rifampicina microencapsulada

As microcápsulas preparadas pelo método de enxertia da quitosana com formaldeído foram usadas para encapsular a rifampicina. Os efeitos do agente de enxertia sobre a taxa e a cinética de liberação foram investigados¹³¹.

O'HARA e HICKEY propuseram a preparação de micropartículas, a partir de poli (latídeo-co-glicolídeo) (PLGA), pelo método de evaporação de solvente. As microesferas obtidas por essa técnica, apresentaram o diâmetro variando de 1 a 5 micrômetros e nelas foi microencapsulada a rifampicina. Um outro estudo realizado

com essas microesferas demonstrou que a liberação dos fármacos nos pulmões melhorou o tratamento da tuberculose¹⁸. Também, BAIN e colaboradores preparam as microesferas por "*spray drying*" usando poli(ácido D,L-lático), nelas encapsularam 20% de rifampicina(m/m). A taxa de liberação dessas microesferas aumenta com a temperatura vítrea (T_g), após a correção da superfície específica¹³² ($r(2)= 0,963$). Quando o poli(D,L-látideo) foi empregado para microencapsular a rifampicina, observou-se que a liberação desse fármaco se fez em função do tempo, isto é, uma liberação tempo/dependente e, também, quando houve um aumento da atividade bioquímica, a liberação do fármaco pode ser dirigida a um alvo específico¹³³.

SCHIERHOLZ usou uma matriz de silicone para imobilizar a rifampicina (sistema de aprisionamento), sendo que o estudo da liberação em soro fisiológico (NaCl 0,9%), a pH 7, pretendia mostrar o perfil de liberação, constatou-se dois períodos para a taxa de liberação, o primeiro depende da dispersão do fármaco na matriz e o segundo, da difusão do mesmo através da matriz elastomérica¹³⁴.

As micropartículas de poliidroxibutirato obtidas pela técnica de evaporação do solvente, apresentam um diâmetro médio, variando de 5 a 100 μ , e foram usadas para microencapsular a rifampicina, podendo encapsular uma grande quantidade do fármaco, sendo que 90% é liberado em até 24 horas¹³⁵.

Também, existe um relato de microencapsulação de rifampicina na forma sólida em blenda polimérica de QTS - PVA em meio altamente salino. O processo de liberação da rifampicina nesse caso se realizou em meios altamente salino e fisiológico. As tentativas de liberação nas soluções tampões por exemplo similares aos do TGI foram frustrantes por essas microesferas serem destruídas nesses meios¹⁷.

2.10.4. Cinética de liberação dos fármacos encapsulados

Os sistemas poliméricos de liberação controlada que liberam os fármacos a uma taxa constante, são de grande importância por que eles envolvem uma melhor administração e uma liberação prolongada dos fármacos encapsulados. Contudo, com o advento desses sistemas, algumas expressões matemáticas foram desenvolvidas para descrever a cinética de liberação das substâncias encapsuladas nos polímeros¹³⁶⁻¹³⁷. Há três tipos de equações que descrevem as cinéticas de liberação de fármacos encapsulados nos sistemas poliméricos de acordo com a forma física (cilindro, esfera, filmes, gel, etc), o modo de difusão (estático ou dinâmico) e as características (porosa ou densa). Entre eles podemos citar:

1. A difusão Fickiana,
2. transporte não-Fickiano ou transporte anômalo e;
3. Transporte do tipo II (cinética de ordem Zero)

Uma das equações mais requisitadas e mais conhecidas, foi publicada por HIGUSHI no início dos anos 60 para elucidar a taxa de liberação do fármaco encapsulado a partir de um sistema polimérico¹³⁸⁻¹³⁹. A equação do modelo de HIGUSHI é:

$$Q = \frac{M_t}{M_\infty} = \sqrt{DC_s t(2C_0 - C_s)} \quad (10)$$

Onde Q é a quantidade absoluta de fármaco liberado por área no tempo t, D é a difusividade do fármaco através da matriz polimérica, C₀ e C_s são respectivamente, a concentração saturada de fármaco e a solubilidade do fármaco no polímero¹³⁸⁻¹³⁹. Nesse modelo C₀ >> C_s, por essa razão a equação passa a ser:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \sqrt{2C_0DC_s t} \quad (11)$$

De acordo com HIGUSHI, a equação acima pode também ser simplificada tendo em vista que C_0 , C_s e D são constantes, dando assim, a equação abaixo que é a forma mais conhecida da equação de HIGUSHI¹³⁸⁻¹³⁹.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2} \quad (12)$$

onde M_t/M_∞ representa a fração total do fármaco liberado no tempo t e k , a constante.

Os estudos realizados mostraram inicialmente que a equação era válida para os sistemas poliméricos onde a liberação de fármacos ocorria unidirecionalmente. Uma modificação posterior dessa equação foi feita considerando outras formas geométricas dos sistemas poliméricos. Porém para obter resultados ótimos com a equação simplificada de HIGUCHI, alguns requisitos devem ser respeitados¹⁴⁰:

1. A concentração inicial do fármaco deve ser bem maior que a solubilidade do fármaco no polímero ($C_0 \gg C_s$).
2. As partículas de fármaco em suspensão devem estar menores em diâmetro que a espessura do sistema da matriz polimérica.
3. O intumescimento e a dissolução do sistema polimérico devem estar negligenciáveis.
4. A difusividade do fármaco deve ser constante
5. Perfeitas condições devem ser mantidas durante o experimento (A concentração de fármaco não pode exceder 10 a 20% de sua solubilidade).
6. A equação HIGUCHI deve valer somente para sistemas poliméricos onde a liberação de fármaco ocorre unidirecionalmente.

De acordo com a segunda lei de difusão de FICK , existe uma forma de obter uma proporcionalidade entre a quantidade de fármaco liberado e a raiz quadrada do tempo para os filmes de espessura δ , mantidas sob perfeitas condições e $c_0 < c_s$, onde a difusividade (D) é considerada constante¹³⁸⁻¹⁴⁰.

A segunda lei de difusão de FICK representada pela equação (13) onde M_t e M_∞ são respectivamente a quantidade de fármaco liberada num tempo t e em tempo infinito, permite obter resultados confiáveis quando as condições abaixo são preenchidas:

1. $c_0 < c_s$;
2. $M_t/M_\infty < 0,60$;
3. difusividade constante durante o experimento;
4. condições experimentais de liberação do fármaco cuja concentração não deve exceder 10 a 20% da sua solubilidade no meio¹³⁸⁻¹³⁹.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left(\frac{Dt}{\pi\delta^2} \right)^{1/2} = Kt^{1/2} \quad (13)$$

Algumas interpretações experimentais foram feitas por pesquisadores usando as equações de HIGUCHI (equação 12) e FICK (equação 13). Estas Equações, diferentes entre elas, apresentam semelhança na forma matemática mas obedecem principalmente ao mecanismo de difusão durante a liberação de fármaco. Nas equações de HIGUCHI e FICK, verificou-se que o valor de n é previamente fixado a 0,5 o que confirma a especificidade dessas equações no seu uso¹³⁷⁻¹³⁸.

Geralmente a matriz polimérica responsável pela encapsulação do fármaco sofre intumescimento ou erosão durante o processo de liberação, fazendo com que as microesferas ou microcápsulas apresentem um desvio de comportamento contrário às equações de HIGUCHI e FICK. Por essa razão, uma última equação empírica

chamada inicialmente de *power law* (lei da potência) foi proposta por RITGER e PEPPAS para generalizar a descrição dos mecanismos de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos¹³⁸⁻¹⁴¹.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (14)$$

Onde M_t representa a quantidade em mg do fármaco ou da substância liberada no tempo t , M_∞ é a quantidade total em mg de fármaco ou substância encapsulada, M_t/M_∞ é a fração de fármaco ou de substância no tempo t , k é a constante de difusão, e n o expoente da difusão e o indicador do mecanismo de liberação, isto é, um valor que permite ter informações importantes sobre o mecanismo de liberação do polímero. Assim, quando o valor de n é inferior ou igual a 0,5 o mecanismo de liberação obedece a difusão de FICK, mas quando o valor de n é entre 0,5 e 0,9 o mecanismo de liberação não obedece a difusão de FICK. Nesse situação as microesferas ou microcápsulas atuam com a cinética de ordem zero. Segundo PEPPAS, esse mecanismo de liberação não-Fickiano ocorre pela sobreposição de dois mecanismos independentes de liberação de fármacos: a difusão, chamada de difusão Fickiana e o intumescimento da matriz polimérica¹³⁸⁻¹⁴¹.

Também quando o valor de n é superior a 0,9, a taxa de liberação do fármaco encapsulado é independente do tempo e a cinética de ordem é exclusivamente zero¹³⁸⁻¹⁴⁰.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver microesferas a partir do copolímero de quitosana e poli(ácido acrílico), como uma matriz para sistemas de liberação controlada de fármacos e aplicar em áreas de interesse, como a de novos materiais poliméricos úteis nos processos de microencapsulação e de liberação controlada de rifampicina para tratamento de tuberculose.

3.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar a quitosana purificada através da determinação do grau de desacetilação por titulação condutimétrica (%GD), espectroscopia no infravermelho (IV) e espectroscopia de ressonância nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C);
- Preparar as microesferas de quitosana (QTS) pelo método de inversão de fases;
- Reticular os grupos amino das microesferas de QTS com o glutaraldeído para aumentar sua resistência em meio ácido;
- Determinar os grupos amino livres após a reticulação das microsferas de QTS com o glutaraldeído;
- Reduzir os grupos imino (base de Schiff) obtidos após a reticulação com cianoboroidreto de sódio (NaBH₄CN);

- Preparar as microesferas de QTS modificada através da enxertia do poli(ácido acrílico) sobre a quitosana reticulada e reduzida e determinar o grau de enxerto;
- Caracterizar as microesferas de QTS modificada através da espectroscopia no infravermelho (IV), análise de porosimetria, análise termogravimétrica (TGA);
- Avaliar o grau de intumescimento das microesferas de QTS modificada nas soluções tampões cujos pH são similares aos do TGI;
- Microencapsular o composto modelo eosina, por impregnação das microesferas de QTS modificada e determinar a quantidade de eosina contida nas microesferas por espectrofluorimetria;
- Estudar a liberação *in vitro* da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada nas soluções tampões similares aos do TGI e estudar a cinética dessa liberação;
- Caracterizar as microesferas de QTS modificada contendo ou não a eosina em relação ao tamanho médio, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e comparar suas morfologias;
- Microencapsular a rifampicina por impregnação e determinar a quantidade impregnada por espectrofotometria;
- Estudar a cinética das liberações *in vitro* de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada nas soluções tampões similares aos do TGI e nos fluidos gastrointestinais artificiais (suco gástrico e fluidos intestinal e cecal),
- Avaliar a solubilidade da rifampicina na matriz da QTS modificada através de DSC das amostras em pó de rifampicina, de microesferas de QTS

modificada, de microesferas contendo a rifampicina e o conjunto de pós de rifampicina e de microesferas de QTS modificada ;

- Avaliar a liberação *in vivo* nos ratos de linhagem *Wister* da rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada estudando a concentração dependente e tempo dependente;
- Estudar o trânsito das microesferas de QTS modificada no TGI e avaliar a micrografia da microesfera de QTS, após sua excreção do TGI dos ratos.

4. Metodologia

4.1. Materiais

4.1.1. Produtos químicos e gases

O ácido acrílico de pureza 99%, $d = 1,05$; a hidroquinona e o nitrato de cério (IV) amoniacal ($(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$), 99%, foram adquiridos da Riedel-de- Haën AG-D- 3016 Seelza-1. A eosina, 98%, e a quitina foram obtidas da Sigma Chemical Company. A rifampicina, 99%, foi obtida da Aldrich Chemical Company, Inc. Todos esses materiais foram utilizados sem purificações prévias.

O ácido acético, o hidróxido de sódio ou de potássio e os principais sais empregados eram de pureza analítica e obtidos da Vetec Química Fina Ltda. ou Merck Chem.

O gás N_2 purificado foi adquirido da White Martins AS.

4.1.2. Animais

Os ratos usados nos ensaios *in vivo* foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os diferentes ensaios foram realizadas utilizando, aproximadamente, 50 animais de linhagem *wistar* com peso oscilando entre 280 e 300 g , com idade média de 2 meses e do sexo masculino.

4.2. Reagentes e soluções

As soluções tampões de pH 9,8 foram obtidas por diluição do tampão tris-(hidroximetil)-aminometano 0,1 mol/L e ajustado com HCl 0,1 mol/L; as soluções de pH 6,8 foram obtidas pela mistura de 15,45 mL de solução de Na_2HPO_4 0,2 mol/L e 4,55 mL de solução de ácido acético 0,2 mol/L, as de pH 7,4 foram obtidas ajustando as soluções de pH 6,8 com uma solução de NaOH de 0,1 mol/L e as de pH 1,2 (solução tampão Clark-Lubs) pela mistura de 50,0 mL de KCl 0,2 mol/L e de 64,5 mL de HCl 0,2 mol/L.

As curvas analíticas de eosina na faixa de $7,5 \times 10^{-9}$ - $7,5 \times 10^{-8}$ mol/L e de rifampicina na faixa de 3×10^{-6} - 6×10^{-5} mol/L foram preparadas usando soluções estoques de eosina e rifampicina de 8×10^{-8} mol/L e de 10^{-4} mol/L, respectivamente.

As equações (10) e (11) representam, respectivamente, as regressões lineares dos pontos experimentais obtidos de absorvância (Abs) em função da concentração da eosina e da rifampicina (C).

$$\text{Abs} = 0,08897 + 0,21247C, \quad R_c = 0,99839 \quad (15)$$

$$\text{Abs} = 0,03352 + 10847,31C, \quad R_c = 0,9984 \quad (16)$$

A preparação da solução de nitrato de cério (IV) amoniacal 0,1 mol/L foi feita pela dissolução de 2,02 g de $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ em 100 mL de solução aquosa de ácido nítrico 1 mol/L¹²⁸.

O suco gástrico artificial foi preparado pela dissolução de 2,0 g de NaCl e 3,2 g de pepsina em 7,0 mL de ácido clorídrico concentrado e uma quantidade suficiente de água para completar a 1,0 L¹⁴². A solução tem um pH 1,2.

Os fluidos intestinal e cecal artificiais também foram obtidos pela dissolução de 6,8 g de K_2HPO_4 em 250 mL de água acrescentado com 190 mL de NaOH 0,2 mol/L e 400 mL de água. A essa mistura adicionou-se 10,0 g de pancreatina e as

soluções de pH requeridas foram ajustadas adicionando-se uma solução de NaOH 0,2 mol/L. Na presente pesquisa, o fluido intestinal foi ajustado para o pH 6,8 e o fluido cecal¹⁴³ para o pH 7,4.

4.3. Métodos

4.3.1. Obtenção e purificação da quitosana

A quitosana foi preparada seguindo o método de Broussignac¹⁴⁴, que consiste em refluxar a quitina com KOH 50% (m/v) e um sistema de solvente etanol/etilenoglicol (Figura 7). Esse meio reacional foi refluxado durante uma hora e meia a 110 °C, sob atmosfera de nitrogênio inerte evitando, dessa forma, uma despolimerização excessiva. A quitosana obtida foi lavada com água destilada até atingir o pH neutro e seca em estufa a 50 °C.

A quitosana seca foi dissolvida em ácido acético 3% (m/v) e filtrada em cadinho sinterizado com porosidade média para eliminar resíduos insolúveis em ácido acético. A quitosana foi precipitada em NaOH 1 mol/L, filtrada, lavada com água destilada até atingir pH neutro e seca novamente a 50 °C.

Foram preparadas 28,7g de quitosana pura, a partir de 50,0 g de quitina, equivalendo a um rendimento de 57,4%.

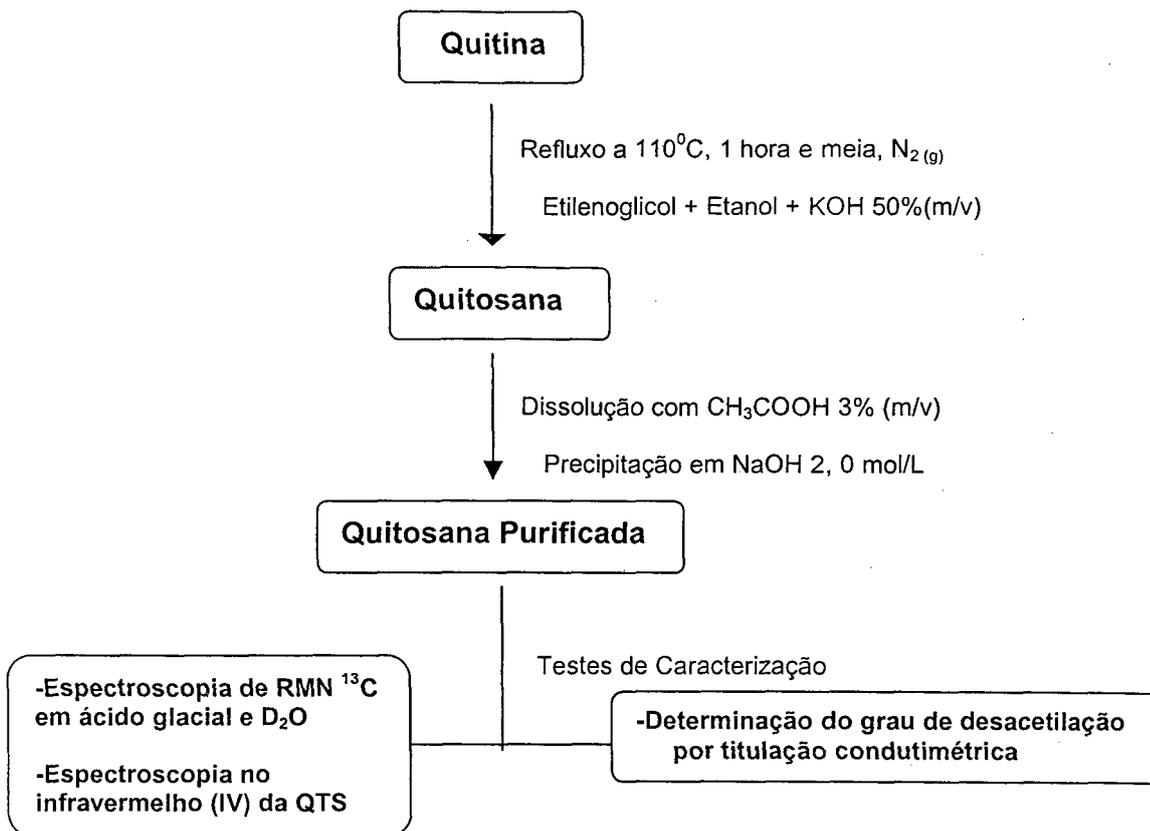


Figura 7. Obtenção da QTS purificada e posteriores testes de caracterização

4.3.2. Caracterização da quitosana

4.3.2.1. Grau de desacetilação (% \overline{GD})

O grau de desacetilação (% \overline{GD}) ou porcentagem de grupos amino livres foi determinado por titulação condutimétrica com auxílio de um condutivímetro Micronal (modelo B330) e um titulador automático Schott Geräte (modelo T80/20). Uma amostra de 200 mg de quitosana foi transferida para um béquer de 600 mL, contendo 450 mL de solução de NaCl 0,001 mol/L, 5,0 mL de HCl 1, 0 mol/L e, após a dissolução do polímero, a titulação foi conduzida com adição de NaOH 0,100 mol/L

a cada 20 segundos, sob atmosfera de nitrogênio³⁵. A titulação condutimétrica foi feita em triplicata.

4.3.2.2 Espectroscopia de RMN ¹³C

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13 (RMN ¹³C) foi obtido num espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C Brucker - modelo AC - 200F. Uma amostra de 100 mg foi dissolvida numa solução contendo 0,4 mL de ácido acético glacial e 2,5 mL de D₂O¹⁴⁵. A amostra foi centrifugada e uma alíquota foi separada para análise.

4.3.2.3. Espectroscopia no infravermelho (IV) da QTS

O espectro no infravermelho (IV) foi obtido na região de 400 - 4000cm⁻¹ com espectrofotômetro FT Perkin Elmer - modelo 16 PC.

4.3.3. Preparação das microesferas de quitosana

A quitosana (4,0 g) foi dissolvida em 100,0 mL de ácido acético 5% (m/v). A solução polimérica de quitosana foi gotejada com auxílio de uma bomba peristáltica de marca Ismatec sobre uma solução de NaOH 2 mol/L (Método de inversão de fases). As microesferas formadas foram deixadas durante 30 minutos numa solução de NaOH 2 mol/L sob agitação para completar a precipitação, posteriormente lavadas com água destilada até alcançar o meio neutro¹⁴⁶ (Figura 8).

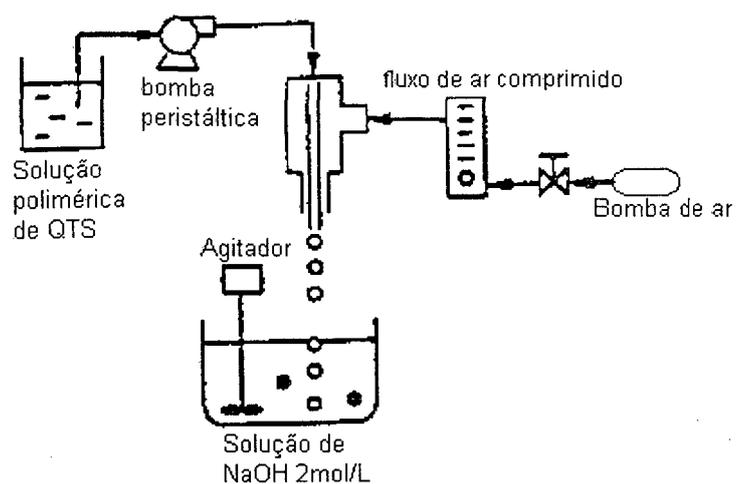


Figura 8. Preparação das microesferas de QTS

Em seguida, é descrito o método de obtenção das microesferas de QTS modificada quimicamente, introduzindo os grupos carboxilato na cadeia polimérica enxertada com poli(ácido acrílico), a fim de se preparar um sistema entérico de liberação controlada de fármacos (Figura 9).

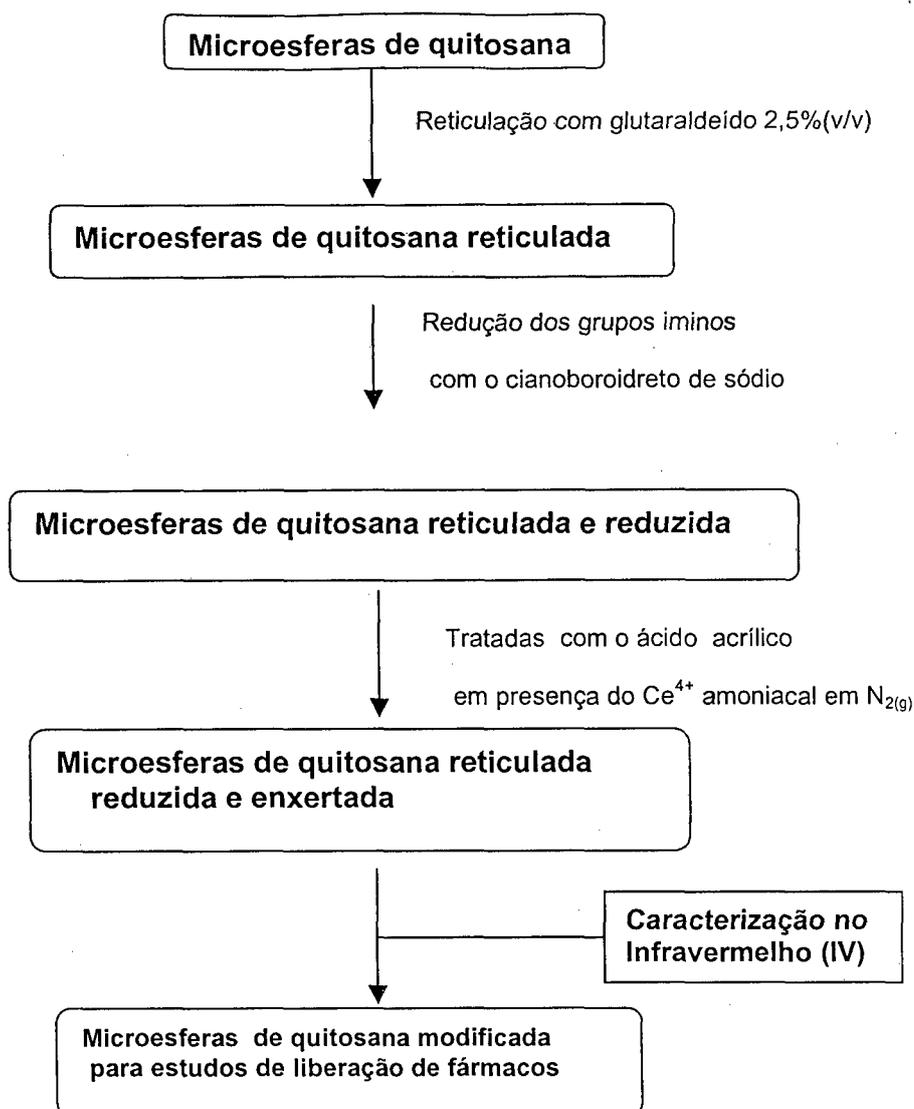


Figura 9. Obtenção das microesferas de QTS modificada para posteriores estudos

4.3.4. Reticulação das microesferas de quitosana

As microesferas de quitosana (4,0 g) foram colocadas em contato com uma solução de glutaraldeído 2,5% (v/m) cuja proporção foi de 1,5 mL por grama de microesferas. A mistura reacional foi mantida durante 24 horas, sob temperatura ambiente, para completar a reação de reticulação. Após esse tempo de

permanência, o material foi filtrado com uma peneira, cujo diâmetro médio é inferior a um milímetro, e lavado com água destilada para retirar o excesso do agente reticulante¹³¹.

4.3.5. Determinação de grupos amino após a reticulação

O conteúdo de grupos amino livres (-NH₂) foi determinado após a reticulação por uma titulação ácido-base. Uma amostra triturada de 200 mg de microesferas de QTS reticulada foi colocada em contato com 100 mL de solução padrão de HCl 0,100 mol/L e a mistura permaneceu 24 horas, a fim de permitir a protonação dos grupos amino livres. Uma alíquota de 25,0 mL foi retirada e titulada com NaOH 0,100 mol/L. A titulação foi feita em triplicata.

4.3.6. Redução dos grupos imino das microesferas reticuladas

As microesferas reticuladas (4,0 g) foram suspensas em uma solução de cianoboroidreto de sódio 1 mol/L durante 48 horas, à temperatura ambiente, para redução dos grupos imino da QTS reticulada. O material foi lavado com água destilada para retirar o excesso do agente redutor.

4.3.7. Reação de copolimerização de enxerto: enxerto do poli(ácido acrílico) sobre a quitosana

As microesferas reticuladas e reduzidas (2,50 g) foram colocadas num balão de 250,0 mL de 3 bocas, contendo 50,0 mL de água milli-Q e 10,0 mL de ácido

acrílico sob atmosfera de nitrogênio. Após 1 hora e 30 minutos, foram adicionados 8 mL de solução de nitrato de cério(IV) amoniacal 0,1 mol/L dissolvido em ácido nítrico 1 mol/L, e o meio reacional foi mantido sob atmosfera de nitrogênio durante 3 horas⁶⁹⁻⁷⁰. A reação foi interrompida pela adição de uma pequena quantidade do agente redutor hidroquinona e, em seguida, o material foi lavado com água para eliminar o excesso de ácido acrílico que não reagiu e o homopolímero poli(ácido acrílico) formado na reação de enxertia.

4.3.8. Caracterização das microesferas de QTS modificada

4.3.8.1. Espectroscopia no infravermelho (IV)

As amostras de microesferas de quitosana modificada e da quitosana purificada foram pulverizadas para análise através da espectroscopia na região do infravermelho (IV). Os espectros de IV foram obtidos utilizando-se o aparelho Perkin Elmer Modelo FT-PC-16. As amostras foram prensadas com KBr na forma de pastilhas.

4.3.8.2. Análise de porosimetria

A análise de porosimetria foi feita usando o aparelho Poresizer 9320 da marca Micrometrics (USA) do Laboratório de Meios Porosos e Propriedades Termofísicas dos Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. A análise porosimétrica permitiu medir a distribuição dos poros nas microesferas de quitosana modificada. No procedimento, aproximadamente 2,0 g de microesferas de quitosana modificada foram colocadas em uma câmara fechada ligada a um capilar graduado e um volume de mercúrio foi injetado sob pressão, preenchendo-a. A

variação da pressão do sistema foi observada através do capilar graduado pela variação do volume de mercúrio injetado¹³³. Desta forma, pode-se aplicar a equação de Young-Laplace que correlaciona a pressão e o diâmetro possibilitando a determinação do tamanho médio dos poros conforme a equação 12 :

$$D = \frac{-4\gamma \cos\theta}{P} \quad (17)$$

Onde, D é o diâmetro (m), γ é a tensão superficial (N/m), θ é o ângulo de contato superficial entre o mercúrio e P é pressão.

4.3.8.3. Análise termogravimétrica (TGA)

Foram feitas TGA das amostras de poli(ácido acrílico), de quitosana, de microesferas de quitosana reticuladas e de microesferas de quitosana modificada. A amostra de 5,0 g foi colocada dentro de uma panela de alumínio e submetida a uma temperatura de 0 - 700 °C com uma taxa de 10 °C/Min no aparelho *Shimadzu termogravimetric analyser* (TGA50, Kyoto, Japan). Os testes foram feitos em duplicata.

4.3.8.4. Análise do grau de intumescimento das microesferas de quitosana modificadas em função dos pH similares aos do TGI

Foi estudado o intumescimento das microesferas de QTS modificada em função dos valores de pH similares aos do trato gastrointestinal. Uma amostra de 5,0 g de microesferas de quitosana modificada foi colocada em contato com 50,0 mL de solução tampão de pH 1,2 e mantida sob agitação termostatizado de 37°C

durante 2 horas. As microesferas retiradas do meio reacional, durante esse período, foram secas retirando o excesso de água e pesadas para medir a diferença de massa com uma outra amostra de mesma massa que não foi submetida a esse procedimento. Em seguida, as mesmas microesferas imediatamente foram colocadas em contato com 50,0 mL de solução tampão de pH 6,8, nas mesmas condições, para estudar também o aumento de massa de 2 até 6 horas e na solução tampão de pH 9,8 de 6 até 12 horas. Este ensaio foi repetido em triplicata para obter uma média.

4.3.9. Determinação da quantidade máxima de eosina, impregnada em microesferas de quitosana modificada, em função do tempo como modelo de liberação controlada de fármacos de baixa massa molar e sensíveis ao pH

Foi estudada a quantidade máxima de eosina impregnada em 6, 12, 18, 24, 30 e 36. Seis amostras de 5,0 g de microesferas de quitosana modificada foram colocadas em 100 mL de solução aquosa de eosina de concentração 1 mol/L em pH 6,8 e permaneceram para impregnação durante os períodos citados, posteriormente, filtradas e secas a vácuo. Essa experiência foi realizada em triplicata.

Para cada tempo de impregnação, dez amostras (50,0 mg cada) de microesferas de quitosana modificada contendo eosina foram colocadas em tubo de ensaio com 5,0 mL de água Milli-Q em banho termostaticado a 37⁰C. Após uma hora

de contato, em meio aquoso, as microesferas foram trituradas com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, o conteúdo de cada tubo foi centrifugado e o sobrenadante retirado para determinar a quantidade de eosina liberada em meio aquoso. A eosina foi quantificada por fluorescência em 520 nm, após excitação em 490 nm no espectrofluorímetro Perkin Elmer (England).

Este procedimento foi repetido várias vezes com as amostras trituradas até a extração total da eosina das microesferas. Isto foi comprovado quando o sobrenadante testado não apresentou absorção no comprimento de onda máxima de 520 nm.

4.3.10. Estudo de liberação *in vitro* e estudo cinético da eosina impregnada nas microesferas de quitosana modificada

4.3.10.1. Estudo de liberação *in vitro* da eosina impregnada nas microesferas de quitosana modificada

Amostras (40,0 mg) de microesferas de quitosana modificadas contendo eosina foram suspensas em 10,0 mL de soluções tampão de pH 1,2; pH 6,8; pH 9,0 e mantidas sob agitação em banho termostaticado a 37°C, simulando as condições do trato gastrointestinal¹⁴⁷.

A determinação da quantidade de eosina liberada das microesferas foi feita retirando um volume do sistema de liberação em pH 1,2; de 30 em 30 minutos até 2 horas para simular as condições de tempo de trânsito estomacal. As alíquotas foram retiradas no pH 6,8; de 2 até 6 horas; e no pH 9,0 de 6 até 12 horas para, simular as condições de trânsito intestinal e cecal; respectivamente. A quantidade de eosina liberada foi monitorada pela leitura das absorvâncias das alíquotas no

espectrofluorímetro Perkin Elmer (England) em λ_{\max} de 520nm após excitação em 490nm.

4.3.10.2. Estudo cinético da liberação *in vitro* da eosina impregnada nas microesferas de quitosana modificada

Amostras (40,0 mg) de microesferas de quitosana modificadas contendo eosina foram suspensas em 10,0 mL de solução tampão de pH 6,8 e mantidas sob agitação em banho termostatizado a 37°C durante 12 horas. A cada hora, uma alíquota era retirada do tampão e sua absorvância lida em espectrofluorímetro no λ_{\max} 520nm para monitorar a quantidade de eosina liberada durante as 12 horas.

4.3.11. Micrografia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas de quitosana modificada contendo a eosina

As microesferas de quitosana modificada sem corante e as contendo a eosina foram caracterizadas por microscopia de varredura em relação ao tamanho médio e a morfologia. As amostras foram colocadas em estaves, recobertas de ouro e micrografadas num microscópio eletrônico de varredura (Philips -modelo XL30). O diâmetro médio foi determinado a partir da média de 20 microesferas modificadas utilizando-se medidas dos eixos vertical e horizontal.

4.3.12. Determinação da quantidade máxima de rifampicina impregnada em microesferas de quitosana modificada em função do tempo

Foi estudada a quantidade máxima de rifampicina impregnada em 6, 12, 18, 24, 30 e 36 horas. Seis amostras de 5,0 g de microesferas de quitosana modificada foram colocadas em 100 mL de solução aquosa de rifampicina de concentração 1 mol/L em pH 6,8 e durante os períodos mencionados sendo, posteriormente, filtradas e secas a vácuo. Essa experiência foi repetida por mais duas vezes.

Para cada tempo de impregnação, dez amostras (50,0 mg cada) de microesferas de QTS modificada contendo rifampicina foram colocadas em tubo de ensaio com 5,0 mL de água Milli-Q em banho termostático a 37°C. Após uma hora de contato no meio aquoso as microesferas foram trituradas com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, o conteúdo de cada tubo foi centrifugado e o sobrenadante retirado para determinar a quantidade de rifampicina liberada em meio aquoso. Este procedimento foi repetido várias vezes com as amostras trituradas até a extração total da rifampicina das microesferas. Isto foi comprovado quando o sobrenadante testado não apresentou absorção no comprimento de onda máximo de 476 nm no espectrofotômetro UV-Vis, marca Hitachi - modelo U3000.

4.3.13. Estudos de liberação *in vitro* e estudos cinéticos da rifampicina impregnada nas microesferas de quitosana modificada em soluções tampões similares aos do TGI e nos fluidos gastrointestinais artificiais

4.3.13.1. Estudo de liberação *in vitro* da rifampicina impregnada nas microesferas de quitosana modificada em soluções tampões similares aos do TGI e nos fluidos gastrointestinais

Amostras (40,0 mg) de microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina foram suspensas em 10,0 mL de soluções tampões e mantidas sob agitação em banho termostaticado, a 37°C, simulando as condições do trato gastrointestinal¹³⁰.

A determinação da quantidade de rifampicina liberada das microesferas foi realizada retirando uma alíquota de solução tampão de pH 1,2 de 30 em 30 minutos até duas horas para simular as condições de tempo de trânsito estomacal. As alíquotas foram retiradas na solução tampão de pH 6,8 de 2 até 6 horas para simular as condições de trânsito intestinal e de 6 até 12 horas na solução tampão de pH 7,4 para simular o trânsito cecal. A quantidade de rifampicina liberada foi monitorada pela leitura das absorvâncias das alíquotas no espectrofotômetro UV-Vis, marca Hitachi - modelo U3000 em λ_{\max} 476nm.

A mesma experiência foi repetida usando, o suco gástrico de pH 1,2; o fluido intestinal de pH 6,8 e o fluido cecal de pH 7,4.

4.3.13.2. Estudos cinéticos da liberação *in vitro* da rifampicina impregnada nas microesferas de quitosana modificada no fluido intestinal e na solução tampão de pH 6,8

Amostras (40,0 mg) de microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina foram suspensas em 10,0 mL de solução tampão de pH 6,8 e mantidas sob agitação em banho termostaticado a 37^oC durante 12 horas. A cada hora, uma alíquota é retirada do fluido e sua absorvância lida no espectrofotômetro UV-Vis, marca Hitachi - modelo U3000 em λ_{max} 476nm para monitorar a quantidade de rifampicina liberada durante as doze horas.

A mesma experiência foi repetida usando o fluido intestinal de pH 6,8.

4.3.14. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Foram feitas DSC das amostras de rifampicina, de microesferas de quitosana modificada, de microesferas de quitosana modificada contendo rifampicina e da mistura física da rifampicina com a microesfera de quitosana modificada na proporção de 40%.

Uma amostra de 5,0 g foi colocada dentro de uma panela de alumínio e submetida a uma temperatura de 0 - 500 °C com uma taxa de 10 °C/min no aparelho *Shimadzu diferencial calorimeter* (DSC50, Kyoto, Japan)¹⁴⁸.

4.3.15. Estudo de biodisponibilidade de rifampicina impregnada nas microesferas de quitosana modificada

4.3.15.1. Ensaio dose/dependente

5 lotes de ratos da linhagem *wistar* ($n = 6$, $p = 280-300$ g) foram tratados por via oral com as microesferas de quitosana modificada contendo rifampicina nas quantidades de 100, 200, 400, 600 e 800mg.

Após 12 horas, foi coletado o sangue de cada lote e centrifugado no aparelho de marca Sigma Laborzentrifugen GMBH 3600 Osterode, modelo 2- 15 rotor 11192, a 4000 rpm, durante 8 minutos. O soro foi separado através de uma pipeta Pasteur e feita a leitura da concentração sérica de rifampicina, usando o espectrofotômetro UV-Vis, marca Hitachi em λ_{\max} 476nm.

4.3.15.2. Ensaio tempo/dependente

Sete lotes de ratos da linhagem *wistar* ($n = 6$, $p = 280-300$ g) foram tratados por via oral com as microesferas de quitosana modificada contendo a rifampicina na dose de 400 mg. Após 4, 6, 8, 12, 24, 36 e 48 horas. Foi coletado o sangue de cada lote e centrifugado a 4000 rpm durante 8 minutos e o soro separado com ajuda da pipeta Pasteur para determinar a concentração sérica de rifampicina por espectrofotometria.

4.3.15.3. Ensaio do trânsito das microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina no TGI

Doze lotes de ratos da linhagem *wistar* ($n = 4$, $p = 280 - 300$ g) foram tratados por via oral com as microesferas de quitosana modificada contendo 400 mg de rifampicina. Cada lote de ratos após 1/2, 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 14 horas foi sacrificado e sucessivamente retirados e analisados o estômago e o intestino, para localização das microesferas no TGI.

4.3.16. Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de quitosana modificada contendo a rifampicina, após o trânsito no TGI

As microesferas de quitosana modificada contendo a rifampicina e as que foram submetidas ao trânsito gastrointestinal foram caracterizadas morfológicamente por microscopia de varredura. As amostras foram colocadas em estabes, recobertas de ouro e micrografadas num microscópio eletrônico de varredura (Philips -modelo XL30).

5. Resultados e discussão

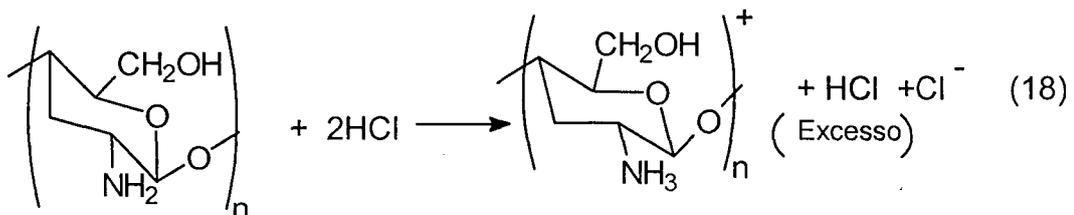
5.1. Caracterização da amostra de quitosana

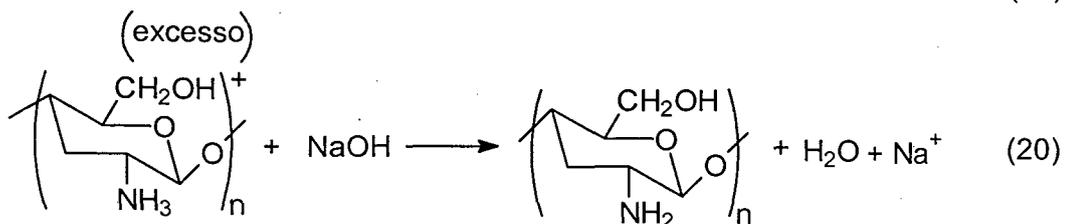
A amostra de quitosana purificada foi pulverizada e caracterizada por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear e grau de desacetilação.

5.1.1. Grau de desacetilação da quitosana (%GD)

A Figura 10 representa o protótipo da curva de titulação condutométrica da solução de quitosana acidificada com HCl em excesso e conduzida com NaOH. A condutância depende dos íons presentes na solução, assim os íons H_3O^+ e OH^- presentes vão contribuir na condutância.

A titulação condutométrica foi monitorada pela mudança da condutância desses íons em função do volume de titulante adicionado. A curva obtida apresentou dois pontos de inflexão onde o primeiro representa o ponto de equivalência do excesso de ácido forte e o segundo a forma ácida do polímero. A diferença entre os dois pontos de equivalência correspondeu ao volume utilizado para neutralizar os grupos amino³⁵. As reações envolvidas nessa titulação foram:





O grau médio de desacetilação (% $\overline{\text{GD}}$) é calculado conforme a equação:

$$\% \overline{\text{GD}} = \frac{M \times (V_2 - V_1) \times 161}{W} \times 100 \quad (21)$$

Onde M é a molaridade da solução de NaOH; V_1 e V_2 são os volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de ácido clorídrico e a quitosana protonada; 161 é a massa molar da unidade monomérica do polímero quitosana e W é a massa de amostra tomada para titulação.

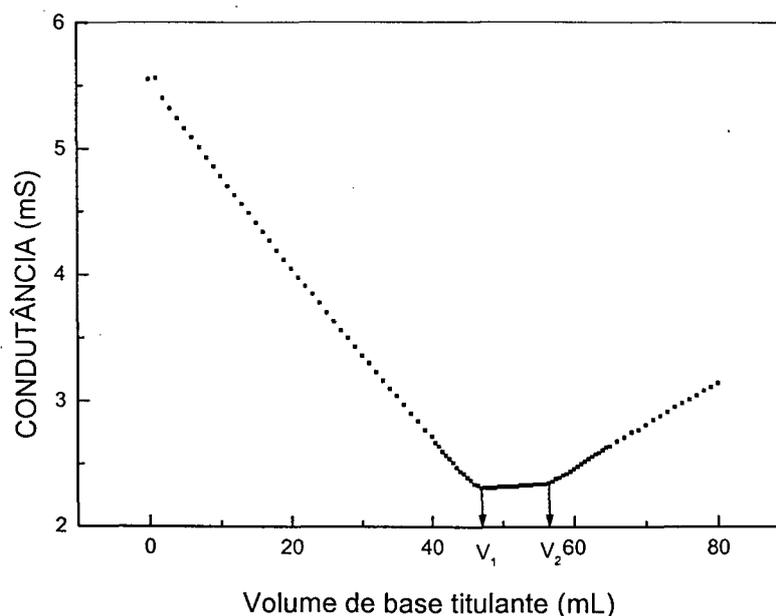


Figura 10. Gráfico de representação da condutância em função do volume da base titulante

Os resultados obtidos da titulação condutométrica da quitosana purificada e após reticulação das microesferas são apresentados na tabela 2. Os valores de $\overline{\%GD}$ correspondem à média de três determinações.

Tabela 2. Valores de $\overline{\%GD}$ e mmol NH_2/g QTS

QTS	Forma	$\overline{\%GD}$	mmol NH_2/g QTS
Pulverizada	Sem reticulação	85,6	5,32
Microesfera	reticulada	50,2	3,12

Na tabela 2 observem-se que a QTS na forma de microesferas apresenta um grau de reticulação de 50,2% restando, ainda 35,4% de grupos amino livres para posterior reação de copolimerização de enxerto com o poli(ácido acrílico).

5.1.2. Espectroscopia de ressonância nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C)

Na Figura 11, foi observado no espectro um deslocamento químico do carbono anomérico C_1 em 98 ppm e está bem afastado dos outros sinais. Os dois sinais próximos de 77 ppm estão relacionados ao C_4 . O deslocamento na faixa de 70 ppm está relacionado aos carbonos C_3 e C_5 . O sinal de 60 ppm é característico do carbono do álcool primário e os sinais ao redor de 56 ppm são atribuídos ao carbono C_2 .

Os sinais com deslocamento em torno de 178 ppm e 20 ppm respectivamente, estão relacionados ao carbono do grupo $C=O$ e ao do grupo CH_3 comprovando que a quitosana não é totalmente desacetilada⁴¹⁻⁴⁸.

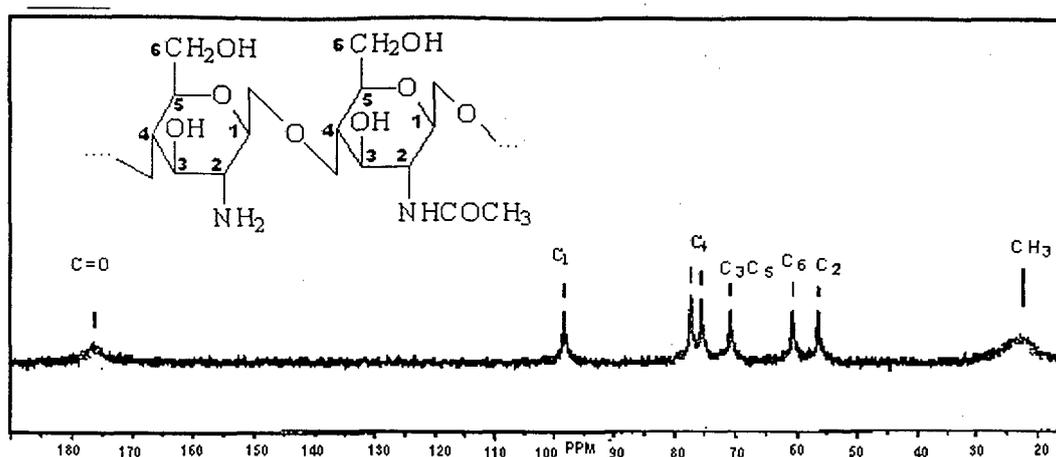


Figura 11. Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono-13 da QTS em D₂O e ácido acético glacial

5.1.3. Espectroscopia no infravermelho (IV) da quitosana

Na Figura 12, foi observado a presença das bandas na região de 3400 cm^{-1} que corresponde ao estiramento de hidroxilas (OH) e da água; e em 2900 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-H. As bandas 1655 cm^{-1} e 1590 cm^{-1} correspondem, respectivamente, às vibrações de estiramento C=O da amida e às de deformação N-H da amina primária. A banda de 1379 cm^{-1} é atribuída ao C-H do grupo CH₃ referente ao grupo acetamida presente, indicando que a quitosana não é totalmente desacetilada. A banda presente em 1082 cm^{-1} é a vibração de estiramento de C-O do álcool primário^{41,149}.

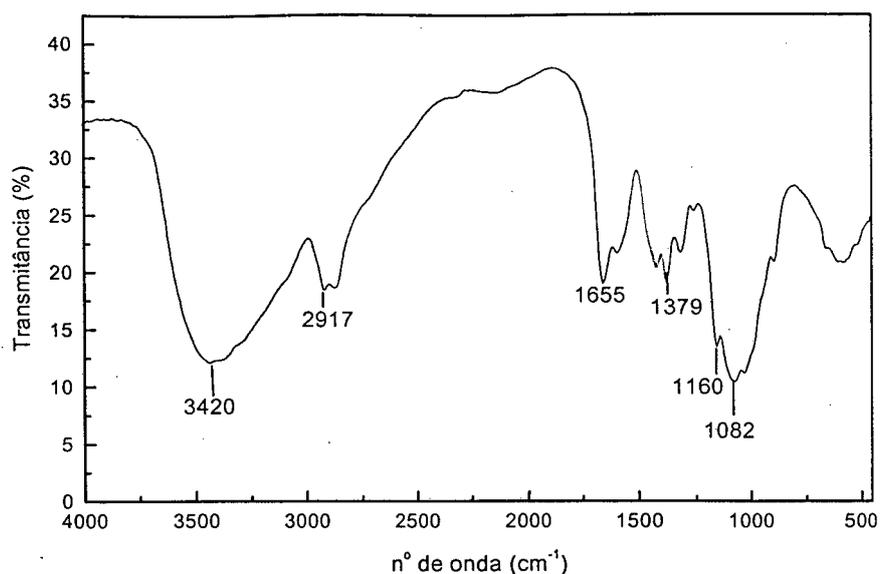


Figura 12. Espectro de infravermelho da QTS em KBr

5.2. Redução dos grupos imino das microesferas de QTS reticuladas

Os grupos imino das bases de Schiff obtidos por reação das aminas primárias e secundárias, reagem com o cianoboroidreto de sódio em temperatura ambiente e se reduzem à aminas secundárias. A transformação das microesferas de QTS na forma reticuladas com glutaraldeído, seguida da redução dos grupos imino, foi necessária para inibir a solubilização do copolímero em soluções ácidas com $\text{pH} \leq 1,5$; para melhorar sua resistência à degradação química e biológica¹⁴⁹ (Figura 13).

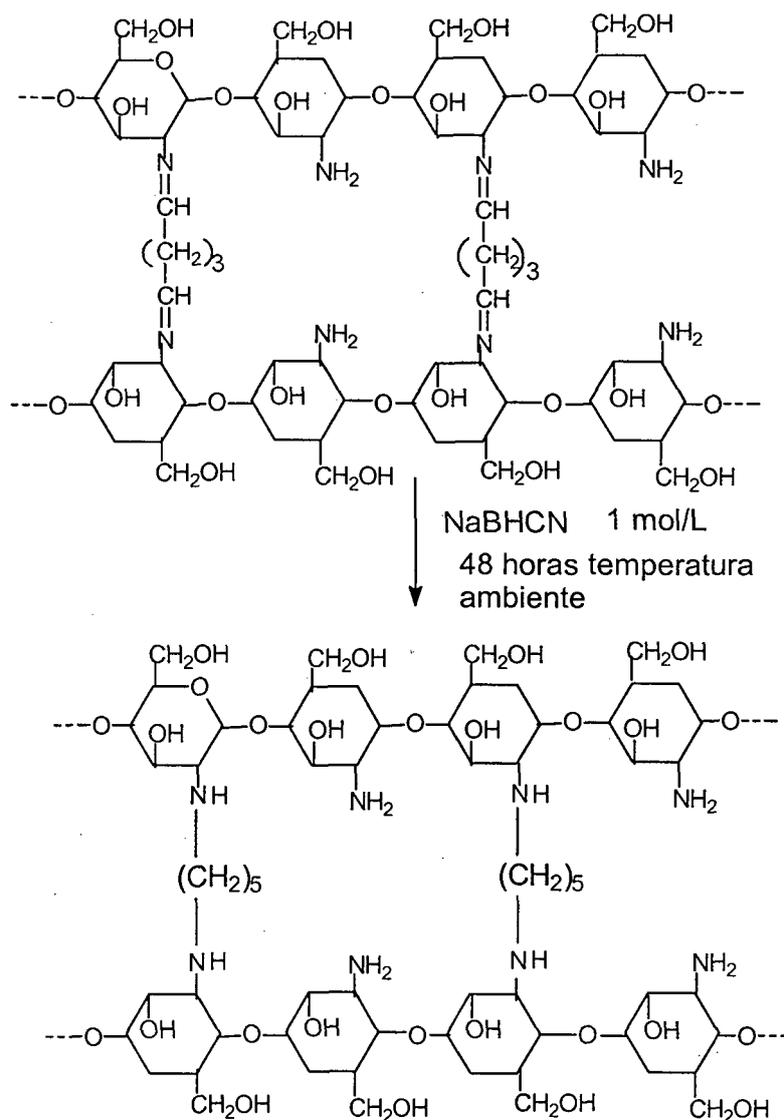


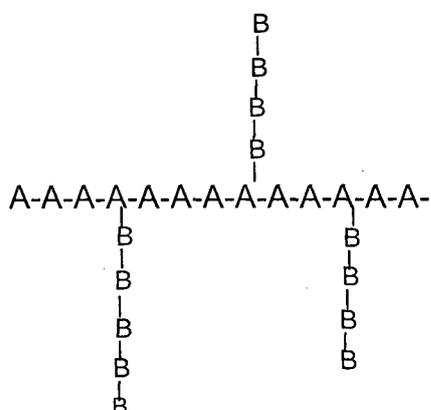
Figura 13. Reação de redução dos grupos imino das microesferas de QTS enxertada

Os espectros de infravermelho da microesfera de QTS reticulada e a obtida após a redução não foram realizados isoladamente. Contudo, foram analisados os espectros de infravermelho das amostras de QTS enxertada, onde são observados

os grupos funcionais correspondentes às modificações de formação da base de Schiff e da redução.

5.3. Grau de enxertia das microesferas de quitosana reticuladas e reduzidas (Microesferas de QTS modificada)

Os copolímeros de enxerto consistem de uma cadeia principal de homopolímero de -A-A-A-A-A-A-A-A-A- com ramificações de um outro homopolímero do tipo -B-B-B-B-B-B-B, formando a estrutura abaixo:



A copolimerização de enxerto requer a formação de centros reativos sobre a molécula polimérica na presença de um monômero que seja ionizável^{48,149-151}. O processo neste trabalho foi via radical livre.

A reação de copolimerização de enxerto do ácido acrílico com o íon Ce^{4+} nas microesferas de QTS reticulada foi realizada em 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente. Foi observado um aumento na massa de

microesferas enxertadas com o poli(ácido acrílico), o que permitiu a determinação do grau de enxertia usando a equação (9).

A Tabela 3 apresenta os graus de enxertia com diferentes massas de microesferas de quitosana. Os valores encontrados referem-se a média de cinco determinações para cada grau de enxertia determinado. O valor médio encontrado foi de $54,6 \pm 2,0\%$.

As porcentagens de grau de enxertia não são significativamente diferentes para as distintas massas de microesferas de QTS. Isto pode ser atribuído ao fato de que o aumento de massa das microesferas de QTS, após a enxertia, é independente da massa das microesferas de QTS modificada empregada na experiência, mas é proporcional ao número de sítios reativos presentes. A explicação provável deve-se ao fato de que a QTS reticulada e reduzida pode ser enxertada com o ácido poli(ácido acrílico) no grupo amino livre, nos álcoois primários e nos 1,2 glicóis. Essas observações foram confirmadas, respectivamente, pelos estudos realizados por BLAIR e colaboradores¹⁵² com o enxerto de acetato de vinila sobre a quitosana e também por IWAKURA¹⁵³ quando ele estudou a polimerização do estireno por via radical livre, demonstrando que os álcoois primários e 1,2 glicóis são mais efetivos.

Tabela 3. Grau de enxertia em função das massas de microesferas de QTS

Quitosana (mg)	Grau de enxerto (%)
99,3	$54,9 \pm 1,2$
308,7	$54,3 \pm 1,1$
313,0	$54,5 \pm 1,1$

5.4. Caracterização das microesferas reticuladas, reduzidas e enxertadas (Microesferas de QTS modificada)

5.4.1. Espectroscopia no infravermelho (IV) das microesferas modificadas

A Figura 14 ilustra os espectros no infravermelho da QTS (a) e da QTS modificada (b).

No espectro (b), foi observado a presença de uma banda em 1731 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento C=O do grupo carboxílico ausente no espectro da quitosana, confirmando a enxertia do poli(ácido acrílico) sobre a quitosana. Também no mesmo espectro uma banda de intensidade forte de 1390 cm^{-1} relativa ao estiramento C-N de amina secundária ausente no espectro (a) da quitosana, confirmando a redução do grupo imino da base de Schiff, e uma outra banda de 1543 cm^{-1} , ausente no espectro (a) da quitosana, é atribuída ao estiramento da ligação C=N, o qual corresponderia a alguns grupos imino não reduzidos^{41,48, 149}.

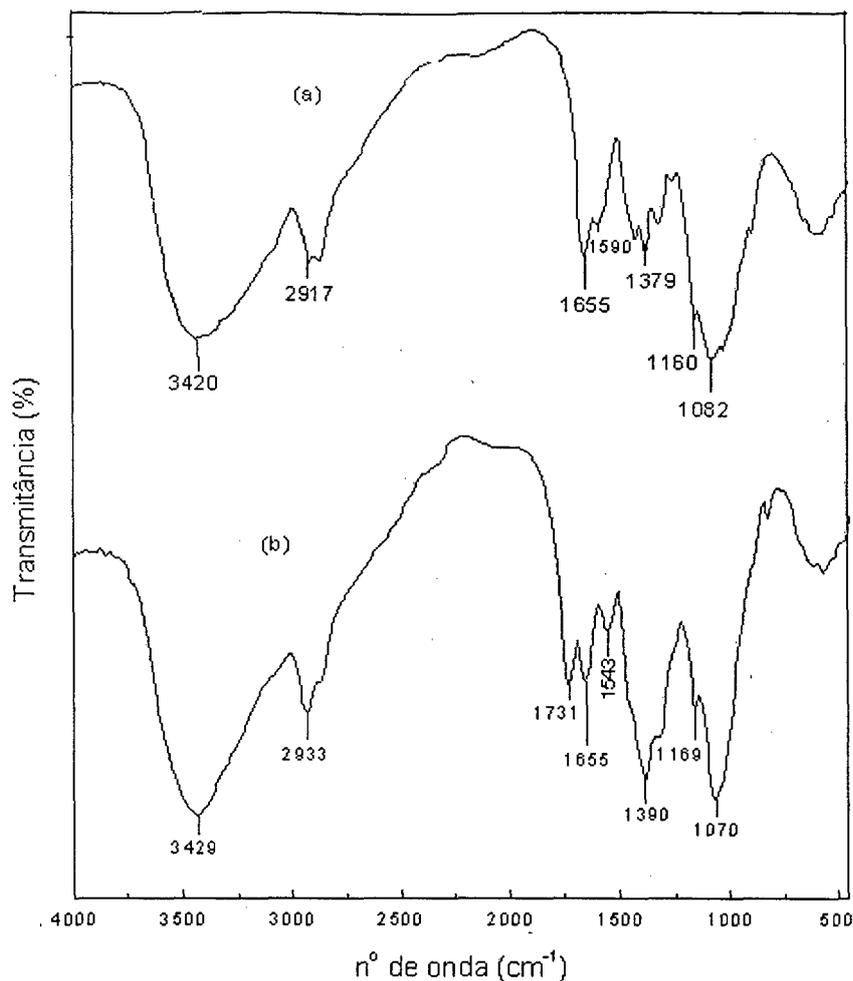


Figura14. Espectros de infravermelho da QTS (a) e da QTS modificada (b)

5.4.2. Porosimetria de mercúrio das microesferas de QTS modificada

A análise de volume acumulado por grama de microesferas em função da distribuição do tamanho dos poros revelou que o tamanho médio dos poros varia entre 40 e 50 Å¹⁴⁶⁻¹⁴⁷ (Figura 15). A existência de poros poderia facilitar a liberação dos fármacos impregnados ou encapsulados à medida que as microesferas estão transitando nos compartimentos do TGI com diferentes valores de pH.

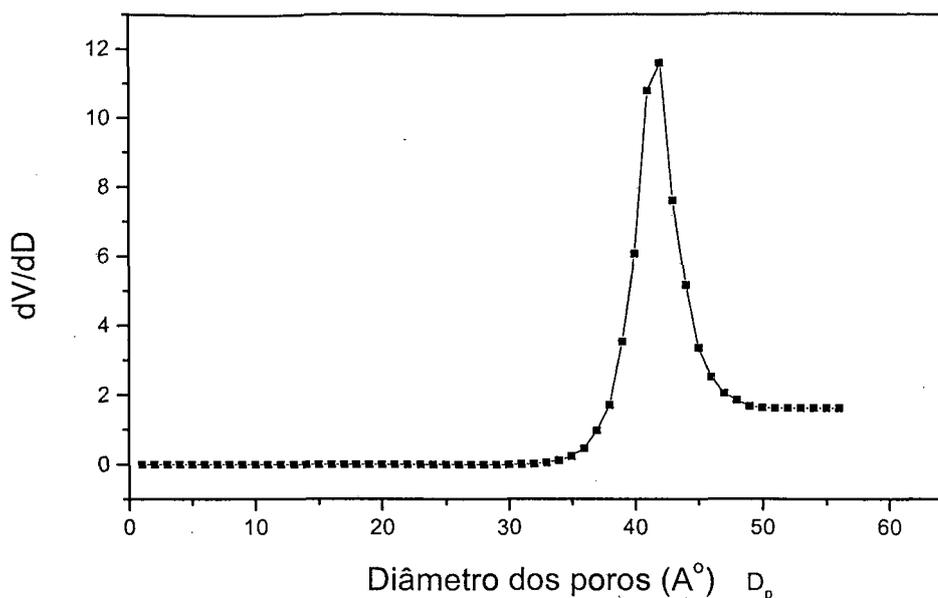


Figura 15. Distribuição do tamanho dos poros da microesferas da QTS modificada

5.4.2. Análise termogravimétrica (TGA) das microesferas modificadas, da quitosana e do poli(ácido acrílico)

As análises termogravimétricas feitas com a QTS, PAA e as microesferas de quitosana modificada revelaram a perda de água e de massa (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Para a análise do TGA, a QTS foi usada na forma pulverizada (Figura 16). A perda de massa se iniciou em 190 °C e finalizou em 800 °C correspondendo a 65% de perda. A massa restante se deve à formação de carvão. A perda de massa até 190 °C refere-se à evaporação de água de hidratação.

O TGA do poli(ácido acrílico) - PAA apresenta dois picos: o primeiro corresponde a uma perda de massa de 4,9%, referindo-se à perda de água por

evaporação, e o segundo pico é atribuído à perda da massa do PAA. A perda total de massa foi de 84,6% (Figura 17).

A análise do TGA das microesferas de QTS modificada mostrou 3 picos: o primeiro corresponde a perda de massa por evaporação da água, em 12,58%; os outros dois picos correspondem à perda de massa no intervalo de temperatura 166,53 °C até 800 °C, em 59,86% (Figura 18).

As análises termogravimétricas da QTS, do poli(ácido acrílico) e das microesferas de QTS modificada mostrada na Figura 19 indicaram que a estabilidade térmica da microesfera de QTS modificada é diminuída pela presença das cadeias laterais ramificadas resultantes da enxertia do poli(ácido acrílico) na QTS reticulada e reduzida¹⁵⁴.

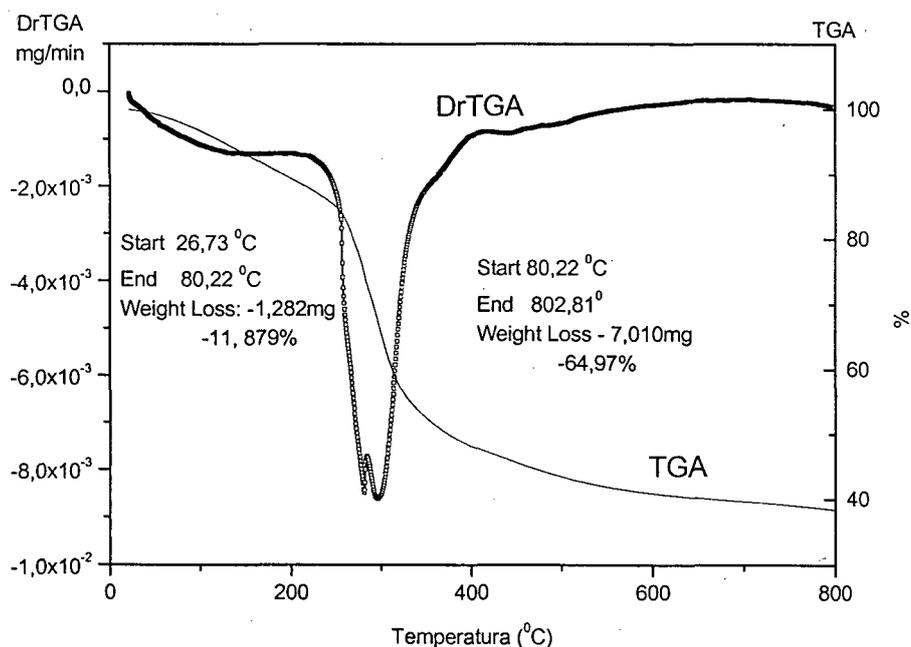


Figura 16. TGA e DrTGA da QTS

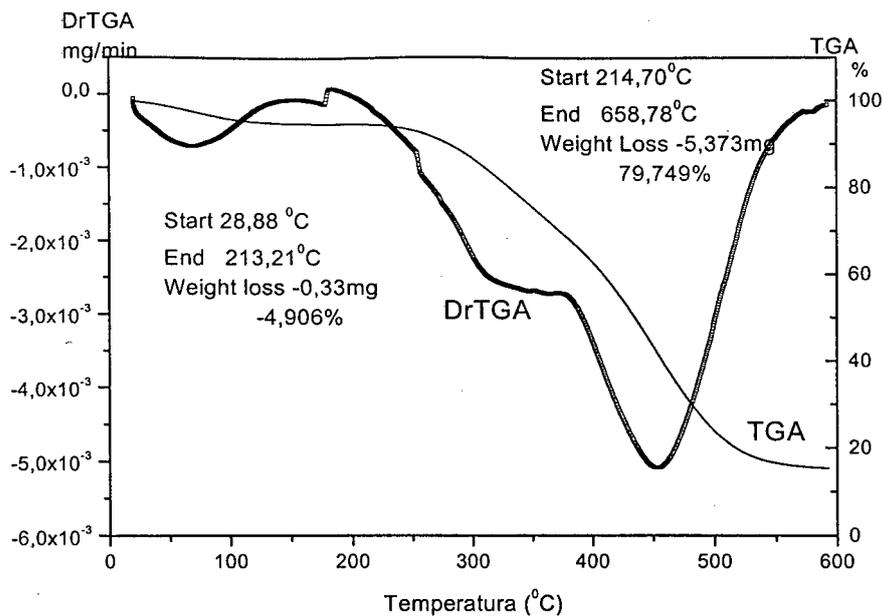


Figura 17. TGA e DrTGA do poli(ácido acrílico)

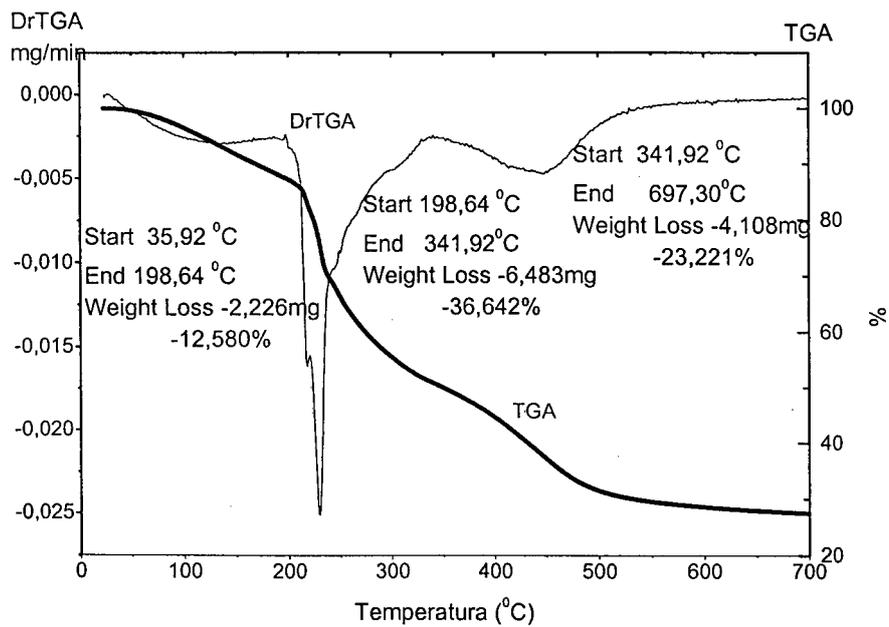


Figura 18. TGA e DrTGA das microesferas de QTS modificada

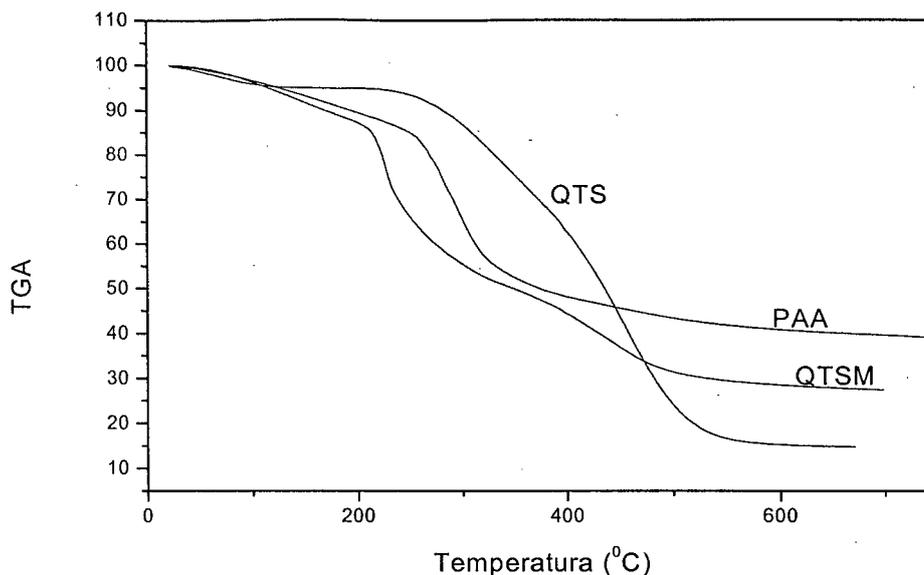


Figura 19. Análises termogravimétricas (TGA) da QTS, do poli(ácido acrílico) (PAA) e das microesferas de QTS modificada (QTSM)

5.5. Análise do grau de intumescimento das microesferas de quitosana modificadas em função dos pH similares aos do TGI

O grau médio de intumescimento (Tabela 4) pode ser determinado usando a equação:

$$GI = \frac{M_2 - M_1}{M_1} \times 100 \quad (22)$$

onde M_1 representa a massa seca das microesferas de QTS modificada após desidratação em temperatura ambiente até massa constante, M_2 a massa de microesferas de QTS modificada obtida pela retirada de água com lenço de papel após sua passagem na solução de pH similar ao do TGI.

O equilíbrio e o grau médio de intumescimento são parâmetros relacionados ao mecanismo e às cinéticas de liberação dos hidrogéis (Tabela 4). Com relação ao presente estudo, as microesferas de QTS modificada são formadas por matrizes poliméricas que se comportaram como hidrogéis polieletrólitos intumescendo-se instantaneamente nas três soluções tampões similares aos do TGI^{155,156}.

Como pode ser observado na Figura 20, houve um aumento gradual do grau de intumescimento em função do pH e do tempo de contato podendo ser verificado que em pH 1,2 as microesferas intumescem muito pouco, em pH 6,8 há um grande aumento no intumescimento e em pH 9,0 esse continua gradativamente aumentando até se estabilizar com o decorrer do tempo.

O aumento crescente do intumescimento em pH 6,8 está de acordo com a presença dos grupos amino parcialmente desprotonados da QTS e dos grupos carboxilatos totalmente desprotonados do poli(ácido acrílico), enquanto que em pH 9,0 ambos os grupos estão desprotonados. Esse intumescimento é acompanhado com a variação das dimensões das microesferas, o que influenciaria na retração ou no afrouxamento das moléculas, assim, controlando o comportamento de liberação dos fármacos impregnados¹⁵⁷.

Tabela 1. Média dos graus de intumescimento das microesferas de QTS modificada em diferentes pHs

pH	Tempo (h)	Grua de intumescimento médio (%)
1,2	0 -2	9,0 ± 0,1
6,8	2 -6	60,0 ± 1,0
9,0	6 -12	20,0 ± 1,0

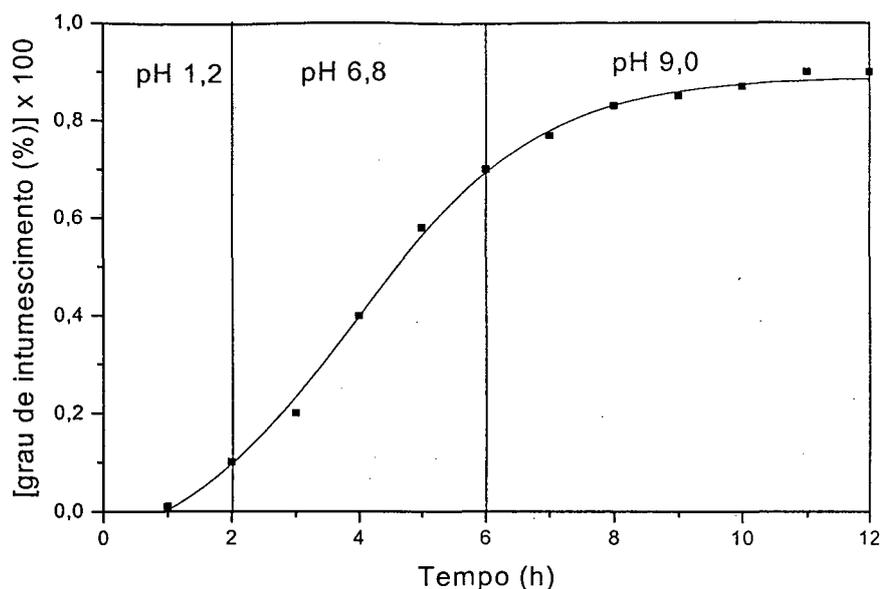


Figura 20. Grau de intumescimento das microesferas de QTS modificada em função do tempo e dos diferentes valores de pH

5.6. Determinação da quantidade de eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada

As quantidades médias de eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada (Tabela.5) mostraram que os valores obtidos aumentavam com o tempo, atingindo o máximo em 24 horas e depois permanecendo constantes. Alguns fatores, tais como os poros existentes nas microesferas, a hidrofiliabilidade e a solubilidade em água dessas moléculas (eosina), podem ter influenciado na impregnação com a eficiência de 95%.

Tabela 5. Quantidade de eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada em função do tempo

Tempo (horas)	Eosina (mg impregnada/g de microesferas de QTS modificada)
6	200 ± 1
12	299 ± 1
18	401 ± 2
24	601 ± 2
30	603 ± 2
36	603 ± 2

5.7. Estudos de liberação *in vitro* e cinéticos da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada nos tampões similares aos do TGI.

5.7.1. Estudos de liberação *in vitro* da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada nos tampões similares aos do TGI

A Figura 21 mostra que em pH 1,2, o qual simula a região estomacal, não ocorreu a liberação da eosina, durante o intervalo de tempo de 0 até 2 horas. Enquanto que em pH 6,8, simulando a região intestinal, o estudo se estendeu de 2 até 6 horas e nesse intervalo foi observado que 44,1% da eosina foi liberada. Finalmente, em pH 9,8, simulando a região cecal, de 6 até 12 horas, a liberação foi de 99,1%.

Para valores elevados de pHs a quitosana possui uma baixa densidade de carga, ao contrário do poli(ácido acrílico). O pKa da quitosana que corresponde à cadeia principal do copolímero quitosana/poli(ácido acrílico) é aumentado pela presença do poliânion poliacrilato (cadeias ramificadas enxertadas), sugerindo que o

grupo carboxilato induza a ionização do grupo amino da quitosana¹⁵⁸. O copolímero estudado pode ser comparado a um protenóide polipeptídico, tendo um grande número de grupos carboxílicos na sua cadeia³⁰. Assim, um protenóide pode ser carregado tanto positivamente como negativamente, dependendo do pH do meio, visto que os grupos amino são protonados ($-\text{NH}_3^+$) em meio ácido, enquanto que os grupos carboxílicos são ionizados ($-\text{COO}^-$) em meio alcalino.

Os dados de liberação da eosina impregnadas nas microesferas, durante as 2 horas no fluido gástrico, confirmam que, apesar da pequena permeabilidade das microesferas de quitosana neste meio, não ocorreu nenhuma liberação do corante, possivelmente devido à pouca solubilidade da eosina que está protonada neste meio, e também pelo fato do poli(ácido acrílico) não ser ionizado em pH 1,2¹⁵⁹.

É esperado o copolímero intumescer em pH acima de 6,3, que corresponde ao pKa da quitosana. Em pH 6,8, praticamente a metade dos grupos amino da quitosana estaria protonada, enquanto que o poli(ácido acrílico) estaria praticamente ionizado, afetando as propriedades de intumescimento e da liberação da eosina pelas microesferas.

No entanto, em pH 9,0, todos os grupos carboxílicos apresentam-se ionizados e os grupos amino completamente desprotonados. A grande liberação da eosina neste meio, depende, além da sensibilidade do copolímero ao pH, das características de intumescimento do copolímero reticulado e da grande solubilidade da eosina no meio alcalino. Por outro lado, o intumescimento do copolímero na sua forma ionizada pode ser atribuído à diferença nas pressões osmóticas exercida pela presença da eosina ionizada na microesfera e na solução tampão¹⁶⁰.

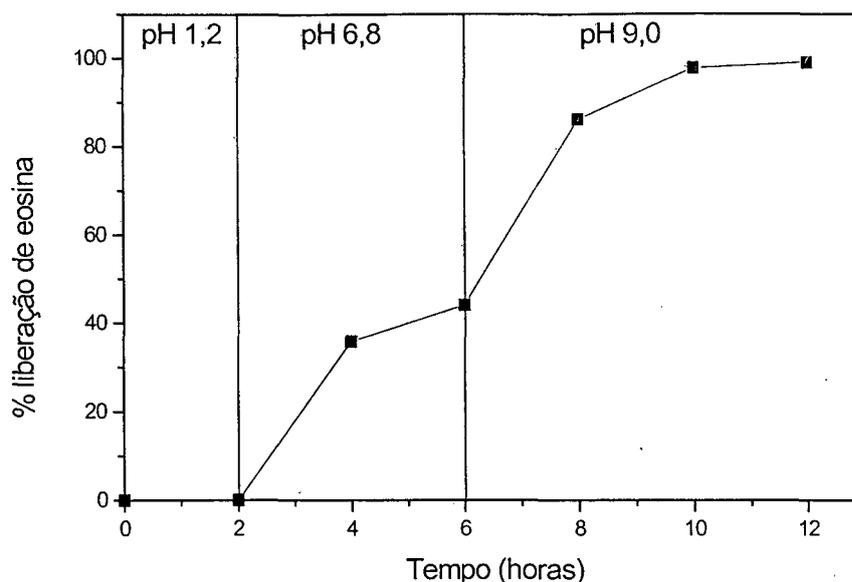


Figura 21. Curvas de liberação da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada

5.7.2. Estudo cinético da liberação *in vitro* da eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada

A Figura 22 ilustra a curva cinética de liberação de eosina na solução tampão de pH 6,8, possível de ser obtida após a análise dos dados apresentados na Figura 21.

Na Figura 21, o perfil da curva de liberação de eosina, impregnada nas microesferas de quitosana modificada em função do tempo de contato com as soluções de pH 1,2; 6,8 e 9,0, mostrou ser exponencial, sugerindo que a cinética de liberação de eosina se comportaria de acordo com a equação (14) de RITGER E PEPPAS^{141,162}.

A equação (14) permite especular se o mecanismo de liberação é de Fick ou não, para as microesferas de QTS modificada.

Assim aplicando o logaritmo natural, a equação (14) passa a ser:

$$\ln(M_t/M_\infty) = n \ln(t) + \ln(K) \quad (23)$$

Onde n é calculado a partir da inclinação e K da interseção da reta $\ln(M_t/M_\infty)$ versus $\ln(t)$.

A cinética de liberação de eosina pelas microesferas de QTS modificada, ilustrada na Figura 22, mostra um aumento gradativo da taxa de liberação. Na solução tampão de pH 6,8; os grupos amino da QTS estão protonados, enquanto que os grupos carboxílicos do poli(ácido acrílico) estão ionizados. Esses grupos amino protonados reagem com a água de hidratação da solução tampão para aumentar a quantidade de água na composição do copolímero. O excesso de água afeta a estrutura molecular do copolímero afrouxando as moléculas e por consequência aumenta o grau de intumescimento das microesferas, permitindo a liberação^{155,158,162}.

As microesferas de QTS contendo a eosina apresentaram um valor de " n " igual a 0,6 com K igual a 14,1. Esse valor de " n " superior a 0,5 indica que a liberação dos fármacos pelas microesferas de QTS modificada não obedece ao mecanismo difusional de Fick, mas a sobreposição de dois mecanismos de liberação aparentemente independentes : a difusão, chamada de difusão Fickiana, e o intumescimento. Por esta razão, podemos concluir que a cinética de liberação para as microesferas de QTS modificada é de ordem zero.

Todavia, na cinética de ordem zero, o processo de relaxamento dos polímeros, decorrente da penetração da água no sistema formado, é o que controla a taxa de liberação do fármaco. A água atua como plastificante diminuindo a

temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero. Uma vez que a T_g esteja igualada à temperatura ambiente, as cadeias dos polímeros adquirem maior mobilidade e aumentam o volume do sistema (expansão do volume do sistema) ¹⁴¹.

As microesferas QTS modificada são formadas pelos polímeros tridimensionais reticulados e reduzidos que, por sua vez, são enxertados pelo polímero solúvel em água. De acordo com a composição do sistema polimérico formado, em pH 6,8 a liberação dos fármacos não está sujeita a um equilíbrio de dissolução, mas a um processo de afrouxamento molecular além da difusão, o que confirma que as microesferas de QTS modificada atuam possivelmente por sobreposição de dois mecanismos independentes (difusão Fickiana e intumescimento) ^{141,163-165}.

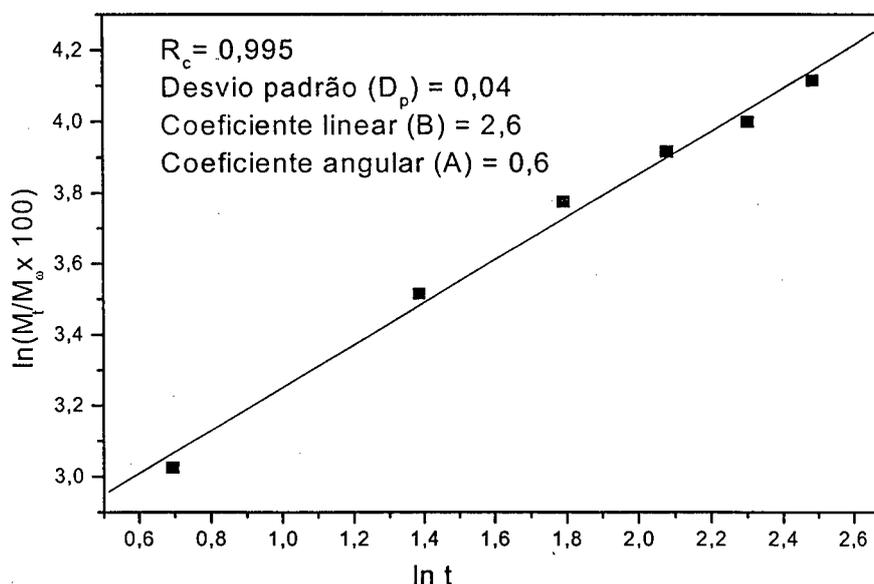


Figura 22. Curva cinética de liberação de eosina impregnada nas microesferas de QTS modificada em função do tempo em solução tampão de pH 6,8

5.8. Micrografia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas de quitosana modificada contendo a eosina

As Figuras 23 (a₁) e (a₂) ilustram as fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura mostrando as morfologias da microesfera de quitosana modificada sem eosina e de microesfera de quitosana modificada contendo a eosina, respectivamente.

O diâmetro médio de $1,52 \pm 0,20$ mm foi determinado a partir da média de 20 microesferas, utilizando-se as medidas dos diâmetros nos eixos vertical e horizontal de cada microesfera.

Durante o processo de impregnação com a eosina, as superfícies das microesferas de quitosana modificada se apresentaram com aspecto áspero e seus diâmetros aumentaram quase três vezes em relação ao diâmetro inicial, sem que houvesse ruptura das microesferas.

As Figura 24 (b₁) e (b₂) ilustram as seções transversais da microesfera de quitosana modificada sem eosina e da microesfera de quitosana modificada contendo a eosina.

A morfologia da microesfera sem eosina na seção transversal apresenta-se na forma de escamas e compactada, enquanto que na microesfera impregnada com eosina a morfologia é alterada para uma forma de grânulos poligonais. Essa diferença na morfologia pode ser atribuída à grande solubilidade da eosina na matriz polimérica. Também, a impregnação da eosina nas microesferas de quitosana modificada foi confirmada visualmente pela cor avermelhada, característica do corante eosina, na superfície e no interior (seção transversal) das mesmas.

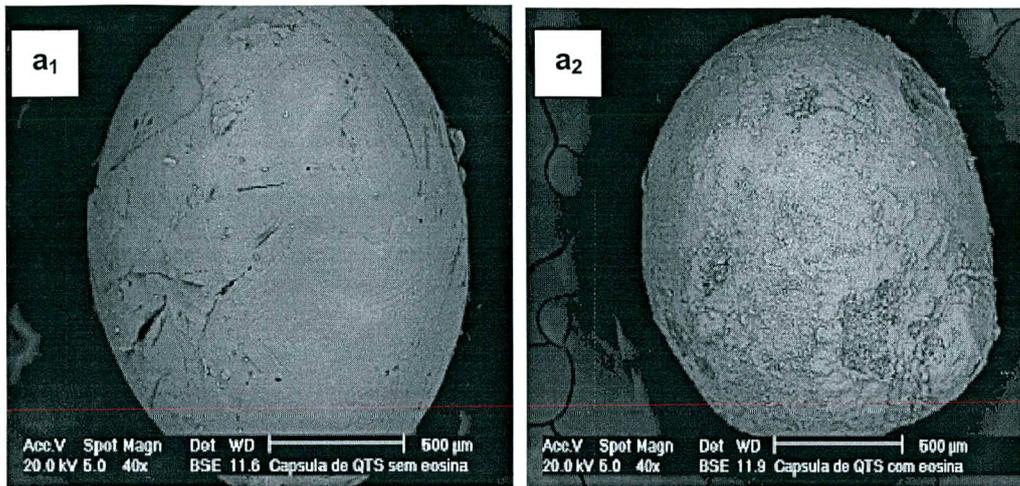


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): (a₁) e (a₂) da morfologia da microesfera de QTS modificada sem eosina e com eosina, respectivamente.

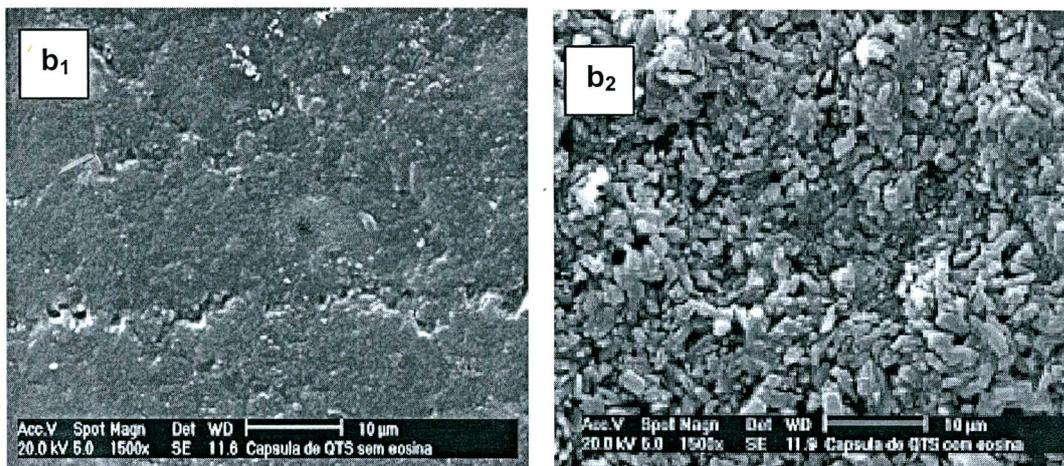


Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): (b₁) e (b₂) seção transversal da microesfera de QTS modificada sem eosina e com eosina, respectivamente.

5.9. Estudos de liberação *in vitro* e cinético de rifampicina, impregnada nas microesferas de QTS modificada, nas soluções tampões similares aos do TGI, em suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais

5.9.1. Estudo de liberação *in vitro* de rifampicina, impregnada nas microesferas de QTS modificada, nas soluções tampões similares ao do TGI, em suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais

Os estudos de liberação de rifampicina nas soluções tampões similares aos do TGI, no suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais foram realizados com objetivo de avaliar se as microesferas de QTS modificada podem liberar a rifampicina impregnada, nos conteúdos do TGI. Registre-se que o suco gástrico e os fluidos intestinal e cecal artificiais empregados apresentam as mesmas composições biológicas e bioquímicas que as dos fluidos do TGI¹⁴³.

A Figura 25 ilustra as liberações de rifampicina nas soluções tampões similares aos do TGI (pH 1,2; 6,8; 7,4) e no suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais.

Nas soluções tampões similares aos do TGI; em pH 1,2 não há liberação de rifampicina de 0 até 2 horas; em pH 6,8 de 2 até 6 horas foi constatada uma liberação de 25% e em pH 7,4 de 6 a 12 horas a liberação foi de 47%. Resultados similares também foram descritos na literatura¹⁵⁹.

Com respeito ao suco gástrico e aos fluidos intestinal e cecal, observou-se uma pequena liberação de rifampicina no suco gástrico artificial (pH 1,2) de 0 a 2 horas. De 2 até 6 horas, percebeu-se que no fluido intestinal artificial (pH 6,8) as

microesferas liberaram 22,3% de rifampicina e no fluido cecal de pH 7,4 a liberação se estendeu de 6 até 12 horas e representou de 41,2%, o que está de acordo com os dados da literatura¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

A pequena quantidade de rifampicina liberada no suco gástrico pode ser devida à solubilização da rifampicina, que ficou na superfície da microesfera de QTS modificada durante o processo de impregnação. Já na solução tampão de pH 7,4 e no fluido cecal artificial, o copolímero de QTS modificada intumescceu devido ao fato de seu pH 7,4 ser superior ao do pK_a da QTS, em que todos os grupos amino estariam protonados e todos os grupos carboxílicos do poli(ácido acrílico) estariam ionizados. Essa propriedade de intumescimento favorece a liberação de rifampicina impregnada nas microesferas. Registre-se que a pequena liberação nesse meio é devido a pouca solubilidade da rifampicina no pH 7,4 (quase neutro). Isto foi descrito também para outros fármacos^{30,159-160}.

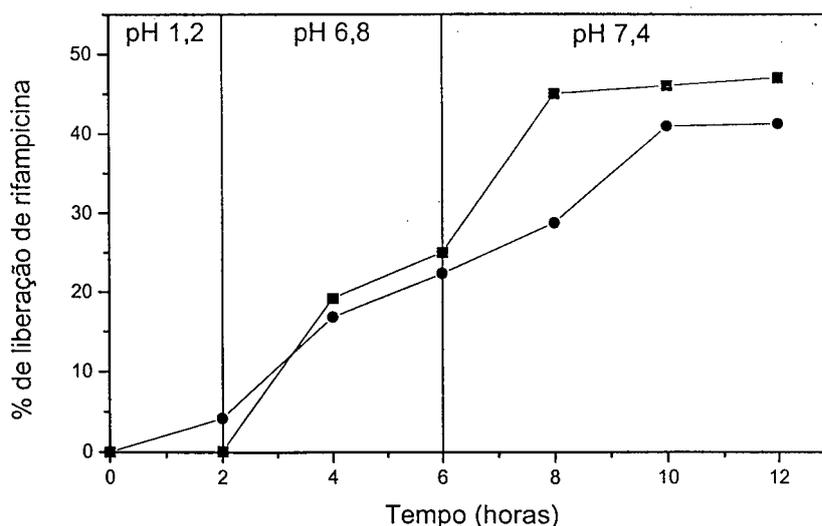


Figura 24. Curvas de liberação de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada nas soluções tampões similares aos do TGI (●), no suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais (◻).

Os perfis dos gráficos de liberações (nas soluções tampões e no suco gástrico e nos fluidos intestinal e cecal artificiais) de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada apresentam-se na forma de uma função exponencial.

5.9.2. Estudo cinético de liberação *in vitro* de rifampicina, impregnada nas microesferas de QTS modificada, na solução tampão de pH 6,8 e no fluido intestinal artificial

Os valores de "n" determinados são, respectivamente, de 0,79 para a liberação de rifampicina no fluido intestinal e de 0,81 para a liberação de rifampicina na solução tampão de pH 6,8 (Tabela 6 e Figura 26). Esses valores são superiores a 0,5. Isto indica que a liberação de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada no fluido intestinal como na solução tampão de pH 6,8 não obedeceria ao mecanismo difusional de Fick¹⁶¹⁻¹⁶².

Nesses meios, a liberação da rifampicina não é sujeita a um equilíbrio de dissolução, mas a um processo de afrouxamento molecular além da difusão. Todavia, as constantes cinéticas (n e k) de liberação de rifampicina para as microesferas de QTS modificada nas diferentes soluções (tampão e fluido intestinal) são iguais, confirmando, assim, os resultados obtidos para a eosina na solução tampão de pH 6,8. As microesferas de QTS modificada atuariam possivelmente pela sobreposição de dois mecanismos independentes (difusão Fickiana e intumescimento) com as cinéticas de ordem zero^{141,160-162,165}.

Tabela 6. As constantes de liberação de rifampicina para as microesferas de QTS modificada na solução tampão e no fluido intestinal

Solução	n	k
Solução tampão de pH 6,8	0,81	4,7
Fluido intestinal de pH 6,8	0,79	5,1

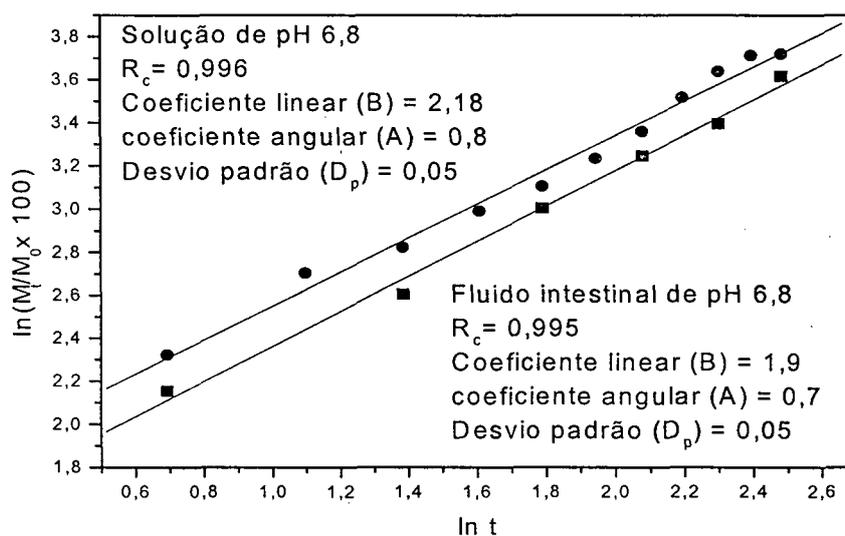


Figura 25. Curvas cinéticas de liberação de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada na solução de pH 6,8 (●) e no fluido intestinal artificial (◻)

5.10. Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise da solubilidade e do estado físico foi feita a partir das curvas de calorimetria diferencial para entender o comportamento do fármaco com a matriz polimérica na qual ele foi impregnado ou encapsulado.

Na Figura 27, observa-se o pico exotérmico, (a), do ponto de fusão da rifampicina em 260 °C. O mesmo pico apareceu bem marcado no termograma da mistura física, (b), embora a proporção fármaco-polímero seja baixa (4:10) e mude pouco nas temperatura acima de zero grau¹⁶¹.

Todavia, um pico do ponto de fusão exotérmico de tamanho médio existente no termograma, (c), mostra a existência isolada de rifampicina na matriz polimérica, indicando que durante o processo de impregnação a rifampicina não se dissolveu na matriz polimérica. Todavia, tal impregnação se realizou como se fosse um processo de mistura física, durante o qual o fármaco foi armazenado nas microesferas por intermédio dos poros^{148,163}.

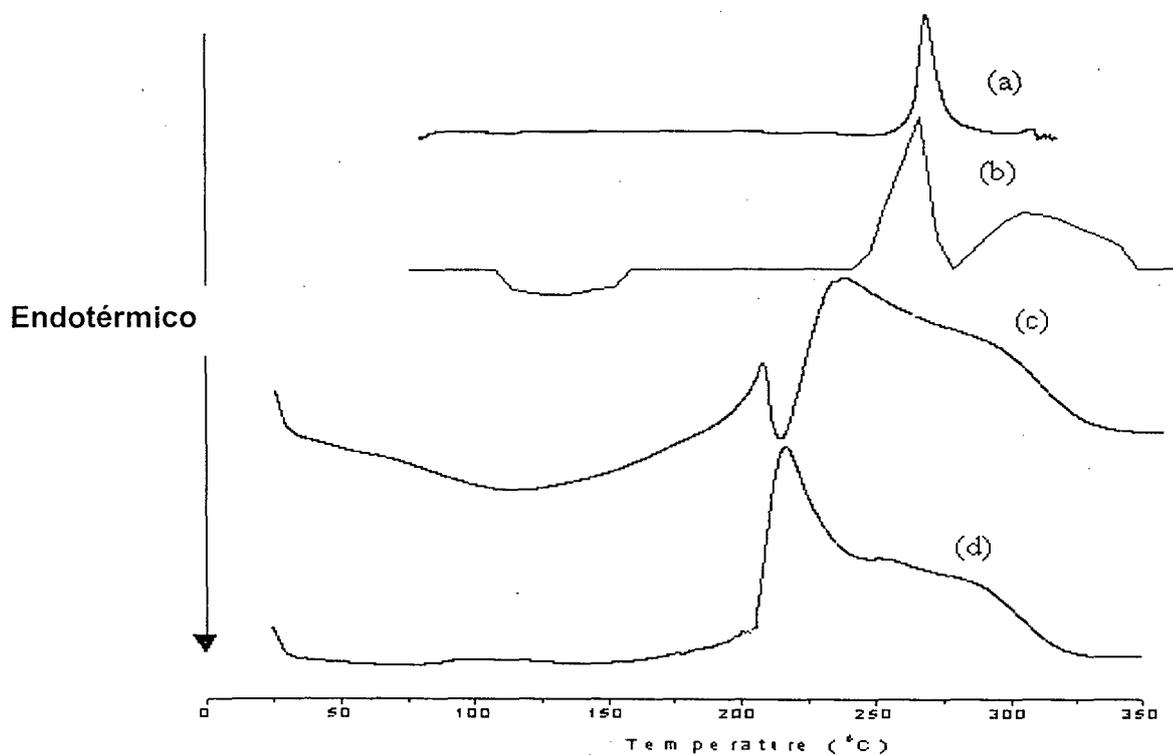


Figura 27. Termograma do DSC de (a) pó de rifampicina, (b) mistura física de pós de rifampicina e microesferas de QTS modificada (proporção fármaco-polímero 4:10), (c) microesferas de QTS modificada contendo rifampicina e (d) microesferas de QTS modificada.

5.11. Estudo de liberação in vivo de rifampicina impregnada nas microesferas de QTS modificada

5.11.1. Estudo dose/dependente

Geralmente, quando um comprimido convencional de rifampicina de 600mg de dose diária é administrado, oralmente, a um homem de 70 kg, obtem-se, após 2 horas, uma concentração plasmática em torno de 12 $\mu\text{g/mL}$. Para a rifampicina poder atuar sobre o microorganismo causador da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) deve ter uma concentração plasmática terapêutica mínima de 7 a 9 $\mu\text{g/mL}$. Contudo, quando um comprimido convencional de rifampicina, de doses maiores que 600 mg, é administrado, oralmente, seus níveis na veia portal ultrapassam o limiar da saturação hepática, tendo como resultado a biodisponibilidade sistêmica crescente. A alteração na taxa de absorção por alimentos causa uma crítica redução terapêutica na biodisponibilidade da rifampicina^{11-12,166-168}.

A curva obtida da literatura (Figura 28) mostra que, após a administração oral de um comprimido de 600 mg de rifampicina a humanos, observa-se um pico em 2 horas, que atinge uma concentração sanguínea de rifampicina de 20 $\mu\text{g/mL}$ e decresce rapidamente até 4 $\mu\text{g/mL}$ em 10 horas¹⁶⁸.

No ensaio dose/dependente desenvolvido neste estudo, percebeu-se que para atingir a concentração sérica efetiva mínima de rifampicina no tempo de 12 horas, foi necessário usar as microesferas de QTS modificada contendo 400 mg de rifampicina. (Tabela 7).

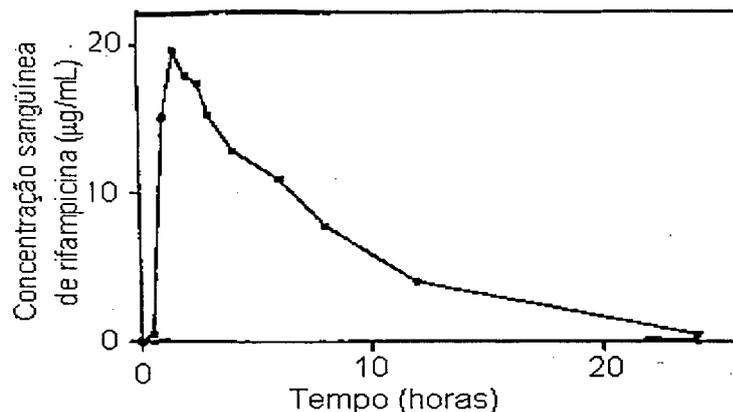


Figura 28. Curva teórica de concentração sérica de rifampicina após administração de um comprimido convencional contendo 600 mg de rifampicina (Fonte SMITH e Colaboradores, 1999)

A dose de 400 mg de rifampicina é relativamente inferior ao do comprimido convencional, contudo, deve-se considerar que a farmacocinética da rifampicina é profundamente afetada pela taxa de absorção intestinal. Desta forma, a liberação progressiva de rifampicina pelas microesferas de QTS modificada, provavelmente, deve-se ao intumescimento progressivo das microesferas, fazendo com que a taxa de absorção desse fármaco seja razoavelmente controlada, mantendo, assim, o nível da concentração sérica dentro da faixa terapêutica mesmo com a dose máxima.

As microesferas de QTS, contendo 600 e 800 mg de rifampicina também levaram a concentrações séricas superiores à concentração mínima necessária para inibir a ação do agente causador da tuberculose (Tabela 7)

Uma vez que a rifampicina é considerada hepatotóxica, pode-se supor que a ingestão de uma quantidade menor poderia causar um impacto tóxico menor. Por isso, para continuação do presente estudo a dose de escolha foi de 400 mg de rifampicina, impregnada em microesferas de QTS modificada.

Tabela 7. Concentrações séricas de rifampicina após a administração oral de microesferas de QTS modificada contendo rifampicina após 12 horas

Dose de					
rifampicina	100 mg	200 mg	400 mg	600 mg	800 mg
Concentração					
sérica ($\mu\text{g/mL}$)	3,35 \pm 0,10	4,58 \pm 0,12	7,25 \pm 0,18	9,17 \pm 0,14	10,01 \pm 0,13

5.11.2. Estudo tempo/dependente

Para qualquer forma farmacêutica, a taxa e a biodisponibilidade do fármaco afetam o início, a duração e a intensidade da resposta farmacológica. Os fatores importantes na absorção da rifampicina no trato gastrointestinal são a forma cristalina, o tamanho das partículas, a relativa quantidade das substâncias inertes ou os agentes de desintegração e os processos de fabricação. Os alimentos e os excipientes como talco, caolim ou bentonita reduzem a absorção gastrointestinal da rifampicina¹⁶⁹⁻¹⁷⁰. Além disto, os baixos níveis de rifampicina no soro são observados nos pacientes da tuberculose após um longo período de tratamento. A meia-vida biológica aumenta com a dose do fármaco, fazendo com que o metabolismo hepático se torne saturado e as cinéticas de eliminação decaiam da primeira a zero ordem¹⁷¹.

Após administração oral de 600mg de rifampicina, percebeu-se que o nível de rifampicina sangüínea, logo após um curto período de tempo, aumente e em 2 horas atinja o máximo 20 $\mu\text{g/mL}$, decaindo rapidamente até atingir 4 $\mu\text{g/mL}$ em 10 horas.

Segundo a literatura a meia vida do fármaco na forma convencional de uso (isto é, em associações com outros fármacos) é de 6 horas¹⁶⁸.

A curva obtida pela administração das microesferas de QTS modificada contendo 400mg de rifampicina (Figura 29), mostra que houve aumento da concentração sérica de rifampicina até 12 horas. Em 8 horas, a concentração atingiu 7,1 µg/mL e em 12 horas; 9,08 µg/mL. A concentração sanguínea de rifampicina não decai rapidamente, como no caso dos comprimidos convencionais, mas o decaimento se efetua progressivamente até 48 horas. A meia vida determinada a partir desse ensaio é de 12 horas.

A baixa concentração sérica de rifampicina nas primeiras 4 horas pode ser devida ao tempo que as microesferas de QTS modificada levaram para passar do estômago ao intestino e para intumescer neste último, permitindo, assim, a liberação do fármaco e também a absorção da rifampicina.

A rifampicina administrada na forma de comprimido convencional de 600mg em humanos tem uma meia vida de 6 horas¹⁶⁸, enquanto que as microesferas de QTS modificada, contendo 400mg de rifampicina, apresentaram uma meia vida de 12 horas em ratos. No caso do comprimido com essa meia vida curta, o paciente necessita, para manter as concentrações plasmáticas inibitórias tomar o comprimido de 600 mg de rifampicina a cada 12 horas.

Registre-se que as microesferas de QTS modificada de 400 mg de rifampicina, em que ocorreu a diminuição de 30% da dose diária, a meia vida é relativamente longa em relação ao do comprimido, o paciente poderia tomar essas microesferas a cada 24 horas, evitando alcançar elevadas concentrações sanguíneas de rifampicina num dado momento, prevenindo, assim, uma maior hepatotoxicidade.

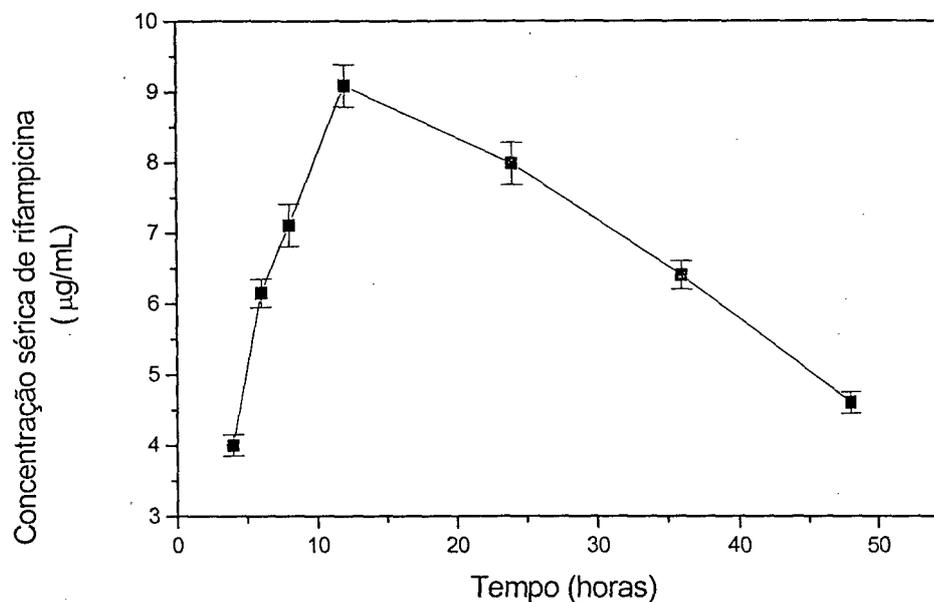


Figura 29. Curva de concentrações sérica de rifampicina em função do tempo obtida a partir de administração das microsferas de QTS modificada contendo 400 mg de rifampicina

Salienta-se, ainda, que BUINA e colaboradores¹⁶⁶ estudaram a diferença de biodisponibilidade nos lotes de rifampicina encapsulados e nas formulações de rifampicina comercializadas, tendo como referência a rifadin, que apresenta uma baixa biodisponibilidade. Nos estudos empreendidos foram utilizadas 600 mg de rifampicina de diferentes formulações, sendo administradas aos seres humanos (voluntários) em jejum. Comprovou-se que os parâmetros farmacocinéticos de todas as cápsulas testadas, contendo a rifampicina, são praticamente idênticos, apesar de serem aplicadas em diferentes tempos e grupos de voluntários.

Evidenciou-se, também, que a variação do tamanho das partículas dos excipientes, dos métodos experimentais de preparação ou cápsulas comercializadas pode produzir uma mudança na biodisponibilidade da rifampicina.

Um outro estudo de biodisponibilidade realizado com quatro voluntários, administrando-se, desta vez, 450 mg de rifampicina, mostrou que a absorção do fármaco é menor quando ingerido junto com os alimentos. Por essa razão, infere-se que a fraca variabilidade nos níveis séricos de rifampicina pode ser imputada a uma fraca absorção por alguns pacientes, fazendo com que a terapia se torne ineficaz, principalmente quando existem outros fatores indesejáveis, como o efeito dos alimentos e a pequena quantidade de fármaco¹⁶⁶.

5.12. Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de QTS modificada sem a rifampicina e as contendo a rifampicina

A impregnação de rifampicina em microesferas de QTS modificada foi confirmada pela coloração vermelha característica do fármaco, na superfície e no interior das mesmas.

A figura 30 (A₁), (A₂), (B₁) e (B₂) ilustra as fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando as morfologias e as seções transversais das microesferas de QTS modificada sem e com a rifampicina.

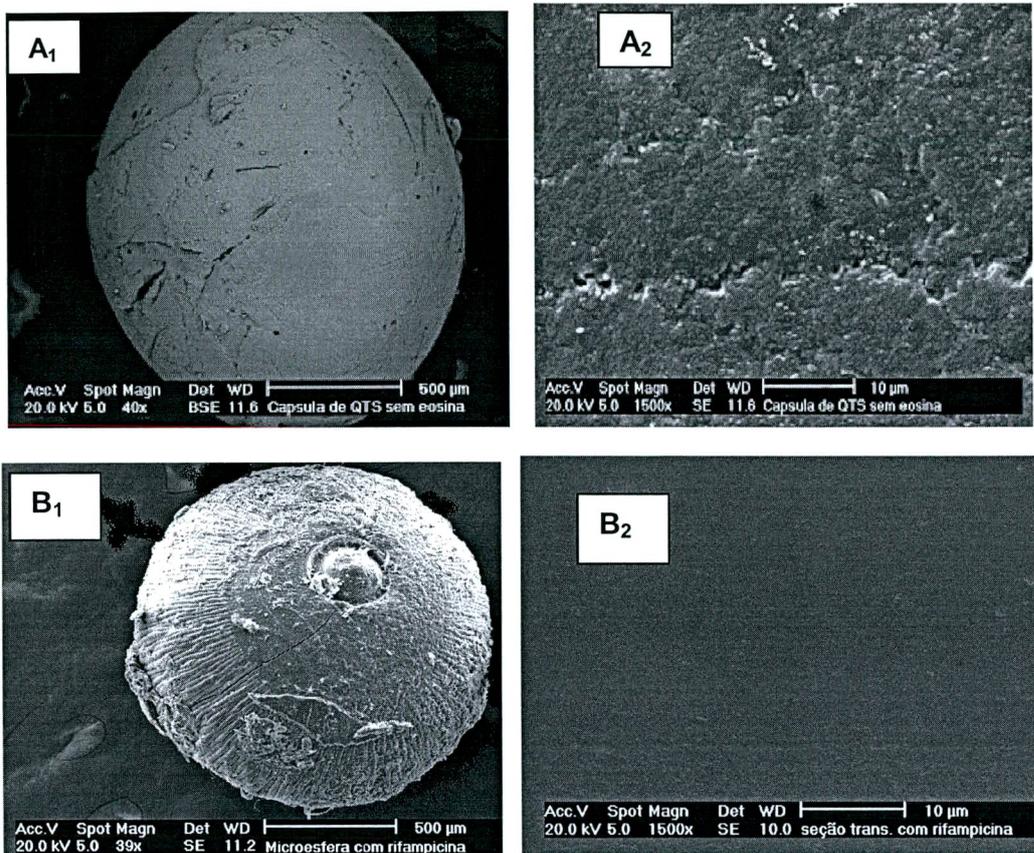


Figura 30. Fotomicrografias A1 e B1 das morfologias, A2 e B2 das seções transversais de microesferas de QTS modificada sem ou com rifampicina

A seção transversal da microesfera de QTS modificada sem rifampicina apresenta uma morfologia compactada em forma de escamas, enquanto que, na seção transversal da microesfera com a rifampicina, a estrutura é compactada, uniforme e sem poros aparentes. Também se percebeu a ausência de escamas. Esta diferença na morfologia pode ser atribuída à pouca solubilidade da rifampicina na matriz polimérica confirmando, desta forma, a observação feita com a análise de calorimetria diferencial.

5.13. Ensaio sobre o trânsito gastrointestinal das microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina

A Figura 31 ilustra a distribuição das microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina ao longo do TGI durante 14 horas de estudo.

Após administração oral, as microesferas foram deixam o estômago em 2 horas, se movendo para o intestino delgado, onde permaneceram de 2 a 6 horas, depois alcançaram o intestino grosso, no qual ficaram de 6 a 12 horas e finalmente foram excretadas.

Geralmente, o tempo do trânsito até a excreção total do corpo é de 14 horas. Este estudo confirma as investigações de MRSNY,¹⁷² que relatou que, de 6 a 12 horas, as microesferas de QTS modificada após uma administração oral alcançaram o intestino grosso (Tabela. 8)

TOZAKI e colaboradores assim como, NARAYANI e RAO investigaram a morfologia das microesferas de QTS após o trânsito gastrintestinal e observaram que as microesferas foram degradadas por enzimas como as quitosanases produzidas pelas bactérias chamadas *Bacteroides vulgatus* existentes no conteúdo cecal.^{30,147} Também explicaram que o possível mecanismo da degradação seria devido ao aumento de intumescimento e à diminuição da força de estiramento da matriz polimérica de QTS, causados pela presença das quitosanases na região colônica³⁰.

Na presente pesquisa, as microesferas de QTS modificada que fizeram este trajeto não foram praticamente degradadas e quase nem sofreram nenhuma erosão pelo suco gástrico e pelo conteúdo cecal (Figura 31).

Tabela 8. Distribuição das microesferas de QTS modificada contendo a rifampicina ao longo do TGI durante 14 horas de estudo

Estômago (Est), Intestino grosso (I.g), Excreção (Exc), • microesfera ingerida, 1 a 8 representam as partes do Intestino delgado (I.d)

Tempo de transito (horas)	Regiões do TGI											Exc	
	Est	I.d(1)	I.d(2)	I.d(3)	I.d(4)	I.d(5)	I.d(6)	I.d(7)	I.d(8)	Cecum	I. g		
1/2	●●●●●●●●												
1	●●●●	●	●	●	●								
2					●	●●	●●●●	●					
4								●●●	●●●	●●			
5									●●●●●	●●	●		
6										●●●	●●		
8											●●●●		
9											●●●●	●	
10											●●●●	●●●	
12											●●●●	●●●●	
14												●●●●	●●●●

A não degradação das microesferas de QTS modificada poderia ser atribuída ao fato de que as enzimas, como as quitosanases liberadas por *Bacteroides vulgatus*, que são geralmente as bactérias presentes na região colônica, não serem capazes de digerir a microesfera, por causa do processo de reticulação que sofreu a matriz polimérica de quitosana das microesferas. Além disso, os produtos de fermentação bacteriana acidificam o conteúdo colônico e baixam o pH no cólon fazendo com que a variação do pH neste ambiente afete a estabilidade da QTS e permita, assim, sua degradação^{30,160}. Ressalta-se que, curiosamente, no presente

trabalho as microesferas de QTS modificada não sofreram degradação com a mudança do pH no cólon (Figura 31).

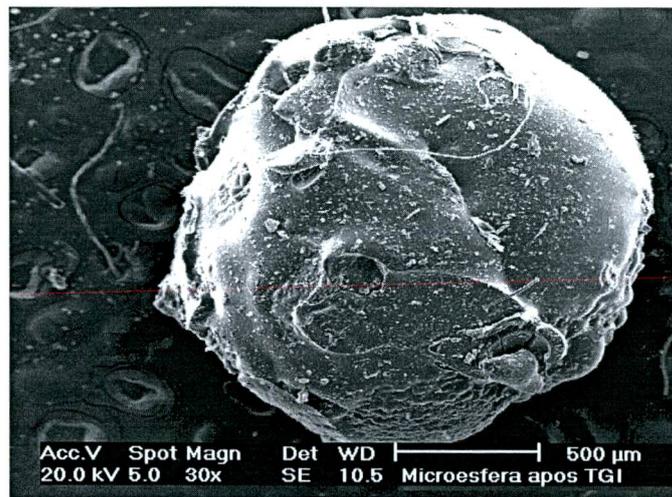


Figura 31. Morfologia da microesfera após o trânsito no TGI dos animais de experiência

6. Conclusões

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho, pode-se fazer as seguintes considerações finais:

- As modificações químicas nas microesferas, obtidas por inversão de fases, realizadas através da reticulação com glutaraldeído e redução com cianoboridreto de sódio, resultaram na formação de microesferas quimicamente resistentes a pH do meio;
- Os grupos carboxilatos do poli(ácido acrílico), introduzidos na cadeia polimérica da QTS reticulada através da reação de enxerto, permitiram a formação de microesferas adequadas para o revestimento entérico de sistemas de liberação oral de fármacos de baixo peso molecular;
- As microesferas de QTS modificada, impregnadas pela técnica de absorção por contato, apresentaram uma elevada retenção dos impregnantes eosina e rifampicina e também uma eficiente difusão para o meio externo dos ingredientes retidos;
- Os estudos de intumescimento das microesferas de QTS modificada revelaram que as matrizes poliméricas se comportam com hidrogéis polieletrólitos nas soluções tampões de pH 1,2; 6,8; e 9,0 similares ao do TGI, sendo que a influência do intumescimento está relacionada com a presença dos grupos amino e carboxilatos presentes no copolímero enxertado;
- A eosina confirmou ser um excelente modelo para liberação de fármacos de baixo peso molecular para a matriz polimérica de QTS modificada;
- As análises termogravimétricas da QTS e das microesferas de QTS modificada revelaram que a estabilidade térmica das microesferas de QTS

modificada é diminuída pela presença das cadeias laterais ramificadas resultantes da enxertia do poli(ácido acrílico) sobre a QTS reticulada e reduzida;

- Os estudos cinéticos de liberação *in vitro* da eosina ou da rifampicina revelaram que as microesferas de QTS modificada liberam tanto a eosina quanto a rifampicina possivelmente pelo mecanismo difusional por apresentarem $n = 0,5$;

- As análises de MEV mostraram que as microesferas de QTS contendo a eosina ou a rifampicina apresentam uma estrutura diferente das microesferas de QTS modificada e comprovaram que as microesferas de QTS modificada, obtidas após o trânsito no TGI, resistiram à erosão e à degradação em pH ácido do estômago, à variação do pH do intestino delgado e do cólon durante 14 horas;

- A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) revelou que durante a impregnação o fármaco foi armazenado nas microesferas por intermédio dos poros como se fosse um processo de mistura física;

- Os estudos de liberação *in vivo* mostraram que as microesferas de QTS modificada, contendo 400 mg de rifampicina, representam a dose ótima para o tratamento da tuberculose, uma vez que a sua meia vida é mais longa que a do comprimido convencional, além disso, apresenta uma baixa hepatotoxicidade.

De acordo com os resultados, as microesferas de QTS modificada, mostraram-se com boas perspectivas para a liberação controlada de fármacos de baixo peso molecular como a rifampicina, utilizados no tratamento de doenças infecciosas, como a tuberculose, e, de um modo mais amplo, para o desenvolvimento de novas formulações orais, que permitam a redução da toxicidade e o aumento da eficácia terapêutica de um grande número de fármacos usados no tratamento de várias doenças.

7. Referências bibliográficas

1. KAZUHIRO, I. ; YOSHIHARU, M. ; TAKANORI, S. and TSUNEJI, N. Buoyant Sustained Release Granules Based on Chitosan. **Drug Design and Delivery**, v. 4, p 55-67, 1989.
2. KAZUHIRO, I. ; YOSHIHARU, M. ; TAKANORI, S. and TSUNEJI, N. Sustained Release Tablets Based on Chitosan and Carboxymethylcellulose Sodium. **Drug Design and Delivery**, v. 1, p 297-305, 1987.
3. FLORENCE, A. T. and JANI, P. U. Novel -drug Formulations - Their Potencial in Modulating Adverse - Effects. **Drug safety**, v. 19, 233-266, 1994
4. SILVA, J. P. S. and FERREIRA, J. P. M. Effect of Drug Properties on the Release from CAP Microspheres prepared by a Solvent Evaporation Method. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, n. 1, p 95-103, 1999.
5. LANGER, R. New Methods of Drug Delivery. In: **Review Science (American Association for the Advancement of Science)**, v. 249, p. 1473-1624, 1990.
6. OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V., BUENO, J. H. F., EVANGELISTA, R. C. Micro e nanocápsulas : Um eficiente sistema, com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 14, p. 37-49, 1992.
7. DONBROW, M. Microcapsules and Nanoparticules in Medicine and Pharmacy. Boca Raton: CRC Press, p. 1-13, 1991.
8. ANDREO FILHO, N., OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, v. 9, n. 1/5, p. 18-21, 1999.

9. LEITE, C. Q., TELAROLLI JUNIOR, R. Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Tuberculose. **Rev. Ciên. Farm.**, v 18, n. 1, p 17-28, 1997.
10. FERREIRA, M. A. S., FONSECA, L. S. Diagnóstico Sorológico da tuberculose. **Rev. Ciên. Farm.**, v. 18, n. 1, p. 41-56, 1997.
11. DE COCK, KEVEN M., WILKINSON, DAVID. "Terculosis control in Resource-poor Countries: Alternative Approches in the era of HIV. **The Lancet**, v. 346, n. 8976, p.675(3), set 9, 1995.
12. MWINGA, A. Treatment in developing Countries on Global and Prevention. **The Lancet**, v. 346, n. 8978, p. 812 (2)n, Setembro 23, 1995.
13. HIRATA, R. D. C. HIRATA, M. H., MAMIZUDA, W. M., et al. Aplicação de Técnicas Biologia Molecular na Avaliação da Resistência de *M. Tuberculosis* a Drogas antimicrobianas. **Rev. Ciên. Farm.** v. 18, n. 1, p. 87-100, 1997.
14. SMITH, P. J., VAN DYK, J., FREDERICKS, A. Determination of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide by High Perfomance Liquid Chromatography After their Simultaneous Extraction from Plasma. **Int. J. Tubercu. Lung Dis.** V. 3, n. 11, p 325-328, 1999.
15. JARURATANASIRIKUL, S. The Pharmacokinetics of Oral Rifampicin in AIDS Patients. **J. Med. Assoc. Thai**, v. 81, n. 1, p 25-28, 1998. **Medline Bookstore**.
16. HODINESS, M. R. Clinical Pharmacokinetics of Antituberculosis Drugs. **Clin. Pharmacokinetics**, v. 9. p. 511- 544, 1984
17. RODRIGUES, B. C. **Microencapsulação e liberação controlada do fármaco rifampicina utilizando o sistema polimérico quitosana - PVA**. Florianópolis 1999. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina, 1999.

18. O'HARA, P., HICKEY, A. J. Repirable PLGA Microspheres containing Rifampicin for the Treatment of Tuberculosis: Manufacture and Characterization. **Pharm. Res.** V. 17, n. 8, p. 955-961, 2000.
19. BAIN, D. F., MUNDAY, D. L., SMITH, A. Solvent Influence on Spray-dried Biodegradable Microspheres. **J. Microenc.** V. 16, n. 4, p. 453-474, 1999.
20. BAIN, D. F., MUNDAY, D. L., SMITH, A. Modulation of Rifampicin Release from Spray-dried Microspheres using combinations of poly-(DL-lactide). **J. Microenc.** V. 16, n. 3, p. 369-385, 1999.
21. MUZZARELLI, R. A. A., JEUNIAUX, C., GOODAY, G.W. **Chitin in nature and technology**. New York: Plenum Press, 1986.
22. ROBERTS, G. **Chitin Chemistry**. Hong Kong: Macmillan Press, 1992.
23. MARTHUR, N. K., NARANG, K. C. Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals. **J. Chem. Educ.**, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.
24. MUZZARELLI, R. A. A. **Enciclopedia of Polymer science and engeneering**. 2ed., 1995.
25. RINAUDO, M., MILAS, M., DUNG, P. Water Soluble Derivaties obtained by Controlled Chemical Modifications of Chitosan. **Int. J. J. Biol. Macromol.** v. 15, p. 258, 1993.
26. MUZZARELLI, R. A. A., **Chitin**. 1. ed. New York : Pergamon Press, p. 207-253, 1977.
27. FURLAN, L. **Copolímeros grafitizados de quitina e quitosana com monômeros acrílicos: estudos de adsorção de Ca (II) e aplicações na tecnologia do papel**. Florianópolis, 1993. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 1993.

28. AMANO, K., ITO, E. The action of lysozyme on partially deacetylated chitin. **Eur. J. Biochem.**, v. 85, p. 97-104, 1978.
29. NAKAMURA, F. ONISCHI, H., MACHIDA, Y. et al. Lysozyme catalysed degradation properties of conjugates between chitosans having some deacetylation degrees and methotrexate. **Yakuzaigaku**, v. 52, p. 59-67, 1992.
30. TOZAKI, H., KOMOIKE, J., TADA, C., et al. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. **J. Pharm. Sci.**, v.86, n. 9, p. 1016-1021, 1997.
31. THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. Cross-linked Chitosan Microspheres Preparation and Evaluation as Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44, p. 283-283, 1991.
32. MUZZARELLI R.A.A. **Natural chelating polymers**. Oxford: Pergamon Press, 1973.
33. ASAKO, H., HISASHI, O., AKIO, N. Determination of degree of Deacetylation of Chitosan by ^1H NMR Spectroscopy. **Pol. Bull.**, v. 26, p. 87-94, 1991.
34. TAN, C. S., KHOR, E., TAN, T. K., WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, p. 713-719, 1998. Apud PETERS, M. G. Application and environmental aspects of chitin and chitosan. **J. Mat. Sci - Pure Appl. Chem.** V. A32, p. 629-640, 1995.
35. RAYMOND, L., MORIN, F. G., MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, p. 331-336, 1993.
36. EWING, G. W. Métodos instrumentais de análise química. Tradução de Aurora Giora Albanese e Joaquim Teodoro de Souza Campos. São Paulo: Edgard Blücher, 1993.

37. SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. Ed.. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A.,1994.
38. FÁVERE, V. T. **Adsorção dos íons Cu(II), Cd(II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas**. Florianópolis: universidade Federal de Santa Catarina, 1994. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, UFSC, 1994.
39. HIMMELBACH, D. S., BARTON, F. E., AKIN, D. E. Comparison of responses of ^{13}C NMR and NIR diffuse reflectance spectroscopies to change in particle size and order in cellulose. **Applied Spect.**, v. 40, n. 7, p. 1054-1058, 1986.
40. DUNG, P., MILAS, M., RINAUD, M., DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrates Polymers**, v. 24, p. 209-214, 1994.
41. PERLIN, A. S., HAWER, G. K. Characterization of carbohydrate polymers by carbon-13 NMR spectroscopy. **Carbon-13 NMR in Poly. Sci ACS. Sympos.**, p. 123-145, 1979.
42. DYER, J. R. **Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1977.
43. NAKANISHI, K., SOLOMON, P. H. **Infrared absorption spectroscopy**. San Francisco: Holden-Day, 1978.
44. ALLINGER, N. L., CAVA, M. P., JONGH, D. C., JOHNSON, C. R., LEBEL, N. A., STEVENS, C. L. **QUÍMICA ORGÂNICA**. 2. ed.: Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 1976.

45. FIORI, S. **Remoção seletiva de níquel (II) em cápsulas de quitosana/álcool polivinílico adsorvido com agente quelante dimetilglioxima.** Florianópolis, 1996. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.
46. CESTEROS, L. C., REGO, J. M., VAZQUEZ, J. J., KATIME, I. evidence from infrared-spectroscopy for hydrogen-bonding in poly(n-vinyl pyrrolidone) poly(monobenzyl itaconate) blends. **Polymer Comm.**, v. 31, n. 4, p. 152-155, 1990.
47. CESTEROS, L. C., MEAURIO, E., KATIME, I. Miscibility and specific interactions in blends of poly(hydroxy methacrylates) with poly(vinylpyridines). **Macromolecules**, v. 26, p. 7256-7262, 1993.
48. LONGHINOTTI, E., FURLAN, L., LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, T. V. Adsorção de azul de metileno e croconato amarelo pelo biopolímero quitina . **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 221-224, 1996.
49. NAKATSUKA, S., ANDRADY, L. A. Permeability of Vitamin B-12 in Chitosan Membranes: Effect of Cross-linking and Blending with Poly (vinyl alcohol) on Permeability. **J. Appl. Pol. Sci.** v. 44, p. 17-28, 1992.
50. MOECKE, E. H. S. **Copolimerização e Enxerto de Monômeros Vinílicos sobre Quitina e Quitosana iniciada por Cério(IV): Aplicações na Tecnologia do Papel.** Florianópolis, 1993. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina, 1993.
51. NOROBU, N., HIDEKI, Y., KOSAI, K. Permeability through Cellulose Membranes Grafted with vinyl Water in Membranes Swollen in Solutions. **J. Appl. Pol. Sci.** v. 40, p. 2007-2014, 1990.

52. EGBOH, S.H.O., AKONWU, L. N. Graft Polymerization of Acrylamide Onto Cellulose Acetate initiated by Ceric Ion. **Acta Polymerica** 16. EGBOH, S.H.O., AKONWU, L.N. Graft Polymerization of Acrylamide, v. 42, n. 6, p. 279-281, 1991.
53. GRACZYK, T., HORNOF, V. Graft Copolymerization Reaction Conditions on the Consumption of Ceric Ion. **J. Pol. Sci.**, v. 26, p. 2019-2029, 1988.
54. LEZA, M. L., CASINOS, I., GUZMAN, G. M. Graft Copolymerization of 4-Vinilpyridine Onto Modified Cellulosic Fibers. The Ceric Ion Concentration Effect. **J. Macromol. Sci-Chem.**, v. A27, n. 4, p. 413-421, 1990.
55. _____. Graft Copolymerization of 4-vinilpyridine Onto partially Carboxymethylated Cellulose. The Degree of substitution Effect. **J. Macromol. Sci-Chem.**, v. A27, n. 4, p. 423-434, 1990.
56. KURITA, K., KAWATA, M., KOYAMA, Y., NISHIMURA, S.I. Graft copolymerization of vinyl monomers on chitin with cerium (IV) ion. **J. Appl. Pol. Sci.**, v. 42, p. 2885-2891, 1991.
57. FURLAN, L., FÁVERE, V. T., LARANJEIRA, M.C.M. Adsorption of Calcium Ions by Graft Copolymer of Acrylic acid on Biopolymer Chitin. **Polymer**, v. 37, n. 5, p. 843, 1996.
58. BAGGIO, O. C., STADLER, E., LARANJEIRA, M.C.M. Extração e Preparação de Quitina e Quitosana. Estudos de Reações de Copolymerização de Enxerto. **Revista de Química Industrial**, v. 672, p. 09-13, 1989.
59. _____, MOECKE, E. H. S., LARANJEIRA, M.C.M. Graft Copolymerization of Acrylamide on Biopolymer Chitin using Ce^{4+} as the Redox Initiation **J. Braz. Chem. Soc.**, n. 147, p. 07, 1996.

60. LARANJEIRA, M. C. M., FURLAN, L., ZIMMERMANN, R. C. et al. XII Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica, Recife-PE, 1993.
61. _____, LEVY, N. M., OLIVEIRA, S. M. III Seminário de Materiais no Setor Elétrico, COPEL, Curitiba-PR, outubro, 1992.
62. RODRIGUES, C. A., STADLER, E., LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T. Pre-concentration of Anions on Poly(N-acetyl-D-glucosamine) Derivative-modified Carbon Paste Electrode. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 04, n. 01, p.14-16, 1993.
63. TINLAND, B., MAZET, J., RINAUDO, M. Receptation in Semidilute Solutions of Wormlike Polymers. **Makromol Chem Rapid Commun**, v. 9, p. 69, 1988.
64. ARMSTRONG, R. W., STRAUSS, U. P. Polyelectrolytes . In: **Encyclopedia of polymer science and technology**. New York: Wiley J. v. 10, p. 78, 1969.
65. SHAO, W., YIN, X., STEVENSON, W.T.K. Microcapsules through Polymer Complexation. I: Complex Coacervation of Polymers containing a high Charge Density. **J. Appl. Pol. Sci.**, v. 42, p. 1399, 1991.
66. _____ . Microcapsules through Polymer Complexation. II: By Complex Coacervation of Polymers containing a low Charge Density **J. Appl. Pol. Sci.**, v. 43, p. 205, 1991.
67. POMMERSHEIM, R., SCHREZENMEIR, J., VOGT, W. Immobilization of Enzymes by Multilayer Microcapsules. **Macromol. Chem. Phys.**, v. 195, p. 1557-1567, 1994.
68. MOHANTY, N., PRADHAN, B., MAHANTA, M. C. Kinetics of vinyl polymerization. I. ceric ion induced polymerization of acrylonitrile in the presence of butane-1,4-diol. **J. Macromol. Sci.-Chem.**, v. 16, p. 1413, 1981.

69. KHETARPAL, R. C., GILL, K. D. MEHTA, I. K., MISRA, B. N. Grafting onto gelatin II. Graft copolymerization of ethyl acrylate and methyl methacrylate onto gelatin in the presence of Ce^{4+} as redox initiator. **J. Macromol. Sci-Chem.**, v. 18, n. 3, p. 445-454, 1982.
70. OGIWARA, Y., KUBOTA, H. Effects of carbonyl and aldehyde groups in the graft copolymerization of the methyl methacrylate on cellulose with a ceric salt. **J. Pol. Sci.**, v. A1, n. 5, p. 2791-2805, 1967.
71. **THE MERCKE index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals.** Windholz, editor [et al] 9th ed. Rahway , Merck, 1996.
72. **The dictionary substances and effects.** Bugbrooke (UK): Sharat Gangolli. 2 ed. V. 4, p. 42-43, 1999.
73. PELIZZA, G., NEBULONI, M., FERRARI, P., et al. Polymorfism of Rifampicin. **IL Farmaco.** V. 32, fasc.6, p.471-481, 1997.
74. ROTH, H. J., FENNER, H. **Pharmazeutische Chemie III.** Arznetooffe.2. Überarb Aufi. Stuttgart, NewYork: Thieme, 1994.
75. LACY, F. C., ARMONSTRONG, L. L., GOLDMAN, P. M. **Drug information handbook.** Hudson (Cleveland) USA. Lexicomp & Apha. 8 ed. p. 1052-1053, 2000.
76. **The dictionary substances and effects.** Bugbrooke (UK): Sharat Gangolli. 2 ed. V. 6, p. 697-699, 1999.
77. BRANDRUP, J., IMMERGUT, E. H. **Polymer Handbook.** 2ed., New York: John Wiley & Sons, 1975.
78. MCNAUGHTON, J. C. Differential scanning calorimetry, Reprinted from IRS; **Physical chemistry 2**, v. 10, 1975.

79. NIETO, J. M., PENICHE- COVAS, C., Del BOSQUE, J. Preparation and characterization of a chitosan - Fe(III) complex. **Carbohydrate polym.**, v. 18, p. 221- 224, 1992.
80. ALONSO, M. J. Controlled Release of Peptides and Antigens from Biodegradable Polymer Micro and Nanospheres. **J. Pharm. Sci.**, v. 81, p 808-811, 1992.
81. LIM, F., SUN, A. Encapsulation of living tissue or active biological material for implantation. **Science**, v. 210, p. 980, 1980.
82. DAUTZENBERG H., LOTH, F., FECHNER, B., et al. Preparation and performance of simplex capsules. **K. Makromol. Chem.**, Suppl. 9, p. 203, 1985.
83. POMMERENING, K., RISTAU, O., REIN, H. et al. Immobilization of proteins and cell fragments by use of a new method of microencapsulation. **Biomed. Biochim. Acta** v. 42, p. 813, 1983.
84. DUPUY, B.; CADIC, CH.; ROUAIS, F. et al. Production of biocompatible microcapsules by seeded polymerization around agarose microspheres. **Makromol. Chem.**, v. 192, p. 1821, 1991.
85. SPARKS, R. **Microencapsulation in encyclopedia of chemical technology**. 3.ed. New York: Kirk Othmer, v. 15, 1990.
86. FINCH, C.A. Microencapsulation. In: **Ullmann's encyclopedia of industrial chemical**, Weinheim: VCH verlagsgesellschaft, v.A16, p. 575, 588, 1990.
87. PAVANETTO, F., GENTA, I., GIUNCHEDI, P. and CONTI, B. Evaluation of spray-drying as method for polylactide and polylactide - co- glycolide microspheres preparation. **J. microencapsulation**, v. 10, p. 487-497, 1993.

88. LI, Y. P., MACHIDA, Y., SANNAN, T., NAGAI, T. Preparation of chitosan microspheres containing fluorouracil using the 'dry-in-oil' method and its release characteristics. **S. T. P. Pharma Sciences**, v.1, p. 363-368, 1991.
89. KARSA, D. R., STEPHENSON, R. A. **Encapsulation and controlled release**, Cambridge:RSC, 1993.
90. DUNN, R. L., OTTENBRITE, R. M. **Polymeric drugs and drug delivery systems**. ACS Symposium Series 469, Washington, 1990.
91. SHALABY, S. W., IKADA, Y., LANGER R., WILLIAMS, J. **Polymers of biological and biomedical significance**. ACS Symposium Series 540, Washington, 1992.
92. KOST, J., LANGER, R. Responsive polymeric delivery systems. **Advanced drug delivery Reviews**,6, 1991.
93. KYDONIEUS, A. F. **Controlled release technologies: Methods. Theory and applications** . Boca Raton: CRC Press, 1980.
94. AFTABROUSHHAD, S. and DOELKER, E. Factors influencing the entrapment of a water soluble model drug using solvent evaporation and phase separation techniques. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.40, p. 237-242, 1994.
95. HOFFMAN, A., BABAY, D. and BENITA, S. The design of controlled release indometacin microspheres for oral use. **Proc. Int. Control. Rel. Bioact. Mater.**, v. 14, p. 115-116, 1987.
96. ILLUM, L., JORGENSEN, H., BISGAARD, H., KROGSGAARD, O. and ROSSING, N. Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system. **Int. J. Pharm.**, v39, p. 189-199, 1987.

97. DAVIS, S. S., ILLUM, L., BURGESS, D., BATCLIFFE, J. and MILLS, S. N. Microspheres as controlled- release systems for parenteral and nasal administration. **ACS Symp. Ser.**, V. 348, P. 201-213, 1987.
98. CONTI, B., PUGLISI, G., VENTURA, C. A., GIUNCHEDI, P., CONTE, U. et al. Tolmentin poly-D-L-lactide microspheres: *in vitro/ in vivo* evaluation. **STP Pharma Sci.**, v. 4, p. 269-274, 199.
99. MAHATORI, I., HALBERT, G. W., WILLMET, N. and WHATELEY, T. L. Preparation of microspheres for intra-articular administration. **Proc. Int. Control. Rel. Bioact. Mater.**, v. 19, p. 341-342, 1992.
100. MUZZARELLI, R.A.A. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. **Enzy. Microb. Technol.**, v. 2, p. 177-184, 1980.
101. KRISTL, J.; SMID-KORBAR, J.; STRUC, E. et al. Hidrocolloides and gels of chitosan as drug carriers. **Int. J. Pharm.**, v. 99, p. 13-19, 1993.
102. BODMEIER, R., CHEN, H., PAERATAKUL, O. A novel approach to tje oral delivery of micro- or nanoparticles. **Pharm. Res.**, v. 6, p. 413-417, 1989
103. SHIRAIISHI, S., IMAI, T. and OTAGIRI, M. Controlled-release preparation of indomethacin using calcium alginate gel .**J. Control. Release**, v. 25, p. 217-220, 1993.
104. THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. Cross-linked Chitosan Microspheres Preparation and Evaluation as a Matrix for Controlled Release of Pharmaceutics. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44, p. 283-286, 1991.
105. LIN, S. Y., and LINP. C. Effect of acid type, acetic-acid and sodium carboxymethyl cellulose concentrations on the formation, micromeritic, dissolution and floating properties of theophylline chitosan microcapsules **Chem. Pharm. Bull.**, v. 40, n. 9, p. 2491- 2494, 1992.

106. MCKNIGHT, C. A., KING, G. A., GOOSEN, M. F. A., MARCOTTE N. Animal-cell culture engineering using alginate polycation microcapsules of controlled membrane molecular-weight cutoffs. **J. Mem. Sci.**, v. 41, p. 323-343, 1989.
107. CHEN, R. H., TSAIH, M. L., LIN, W. C. Effects of Chain Flexibility of Molecules Chitosan on the Preparation, Physical, and Release Characteristics of the Prepared Capsules. **Carbohydrate Polymers**, v 31, p. 141-148, 1996.
108. BUGAMELLI, F., RAGGI, M. A., ORIENTI, I. and ZECCHI, V. Controlled Insulin Release from Chitosan Microparticules. **Arch. Pharm. Med. Chem.**, v. 331, p. 133-138, 1998.
109. LANGER, R. New methods of drug delivery. In: **Review Science (American Association for the Advancement of Science)**. v. 249, p. 1473-1624, 1990.
110. KARI, B. Controlled of Blood-glucose Levels in Alloxan- diabetics Rabbits by Iontophoresis of Insulin. **Diabetes**. V. 35, n. 14, p. 217-221, 1989.
111. LEVI, D., KOST, J., MESHULAM, Y., LANGER, R. Effect of Ultrasound on Transdermal Drug Delivery to Rats and Guinea Pigs. **J. Clin. Invest.** V . 85 n. 6, p. 2074-2078, 1989.
112. LANGER, R., FOLKMAN, J. Polymers for the sustained release for proteins and other macromolecules. **Nature**. v. 263, p. 797, 1976.
113. BAWA, R., SIEGEL, R., MARASCA, B. et al. An explanation for the controlled release of macromolecules from polymers. **J. Controlled Release**, v. 1, p. 259, 1985.
114. HSU, T., LANGER, R. J. Polymer for the controlled release of macromolecules: effect of molecular weight of ethylene-vinyl acetate copolymer. **Biomed. Mater. Res.** v. 19, p. 455, 1985.

115. SALTZMAN, W. M., LANGER, R. Transport rates of proteins in porous materials with known microgeometry. **Biophys.**, v. J.55, p. 163, 1989.
116. KLIBANOV, A.M. Approaches to enzyme stabilization. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 29, p.1, 1983.
117. BROWN, L., SIEMER, L., MUNOZ, C. et al. Controlled release of insulin from polymer matrixes. In vitro kinetics. **Diabetes**, v. 35, p. 692, 1986.
118. VOLKIN, D.B., KLIBANOV, A. M. In: Protein Function: A practical approach, T.E. Creighton, Ed. (IRL Press, Oxford), p. 1-24, 1989.
119. EDELMAN, E., KOST, J., BOBECK, H., LANGER, J. Regulation of Drug Release from Polymer matrices by Oscillating Magnetic-fields **J. Biomed. Mater. Res.** V. 19, p. 67-68, 1985.
120. KOST, J., LEONG, K., LANGER, R. Ultrasound-Enhanced Polymer Degradation and Release of Incorporated Substances (Controlled Release Drug Delivery Systems). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 86, p. 7663-7666, 1989.
121. KOST, J., BOBECK, H., LANGER, J., EDELMAN,E. Regulation of Drug Release from Polymer matrices by Oscillating Magnetic-fields . **J. Biomed. Mater. Res.** V. 19, p. 1117-1119, 1985.
122. LANGER, J. and PEPPAS, N. A. **J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.** V. 23, p. 61, 1983.
123. RABISKOVA, M., SONG, J., OPAWALE, F. O., et al. The Influence of Surface Properties on Uptake of Oil into Complex Coacervate Microcapsules. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 631-635, 1994.
124. VOIGT, R., MANFRED, B. Cápsulas. In: Tratado de tecnologia farmacêutica. Espanha: Acribia Zaragoga, p. 259-269, 1982.

125. AGYLYRAN, G. A., BANKER, G. S. Polymers for enteric coating applications. In: Tarcha, Peter J. **Polymer for controlled drug delivery**; p. 39-66, Boston: CRC Press, 1991.
126. KNUTH, K., AMIJI, M. ROBSON, J. R. Hydrogel delivery systems for vaginal and oral applications. **Advance Drug Delivery**, n. 11, p. 137-167, 1993.
127. KOST, J., LANGER, R. Responsive polymeric delivery system. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 6, p. 19-50, 1991.
128. SORPIRTIS, S. Avaliação biofarmacotécnica de medicamentos - Aspectos tecnológicos e de garantia de qualidade. **Revista Racine**, n. 47, p. 53-57, 1998.
129. YAZDANI-PDRAM, M., RETUERT, J. and QUIJADA, R. Hydrogels based on modified chitosan, 1 - Synthesis and swelling behavior of poly(acrylic acid) grafted chitosan. **Macrom. Chem. Phys.**, v. 201, n. 9, p. 923-930, 2000.
130. AHN, J. S., CHOI, H. K. and CHO, C. S. A novel mucoadhesive polymer prepared by template polymerization of acrylic acid in presence of chitosan. **Biomaterials**, v. 22, n. 9, p. 923-9928, 2001.
131. RAO, B. S. and MURTHY, K. V. R. Preparation and in vitro evaluation of chitosan matrices cross-linked by formaldehyde vapors. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 26, n. 10. P. 1085-1090, 2000.
132. BAIN, D. F. MUNDAY, D. L. and SMITH, A. Solvent influence on spray-dried biodegradable microspheres. **Jour. Microencapsulation**, v16, n. 4, p. 453-474, 1999.
133. _____. Modulation of rifampicin release from spray-dried microspheres using combinations of poly-(DL-Lactide). **Jour. Microencapsulation.**, v. 16, n. 3, p. 369-385, 1999.

134. SCHIERHOLZ, J. Physico-chemical properties of a rifampicin-release polydimethylsiloxane shunt. **Biomaterials**, v. 18, n. 8, p. 635-641, 1997.
135. KASSAB, A. C., XU, K., DENKBAS, E. B., DOU, Y., ZHAO, S. and PISKIN, E. Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent. **Jour. Biomat. Science-polym. Edi.** V. 8, n. 12. P. 947-961, 1997.
136. PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helvetica**, v. 60, p. 110-111, 1985.
137. LINDNER, W. D., MOCKEL, J. E., LIPPOLD, B. C. Controlled release of drugs from hydrocolloid embeddings. *Pharmazie*, v. 51, p. 263-272, 1996.
138. SIEPMANN, J., PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose. **Advanced Drug delivery Review**, v. 48, p. 139-157, 2001
139. HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspensions. *Journal Pharmaceutical Sciences*, v. 50, p. 874-875, 1961.
140. KALIA, Y. N., GUY, R. H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 48, p. 159-172, 2001.
141. RITGER, P. L., PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release : II Fick and anomalous release from swellable devices. **J. Controlled. Release**, v. 5, p. 37-42, 1987.
142. NEUSE, E. W., NAIDOO, S., JUGGA, N. R. Polyacrylonitrile-grafted guaran. Part 1. Long- chain grafting. **S. Afr. J. Chem.**, v. 40, n. 2, p. 111-115, 1987.
143. The United States Pharmacopeia, 23 ed., United States Pharmacopeial convention, Rockville: MD, p. 809, 1995.

144. BROUSSIGNAC, P. Un polymère peu connu dans l'industrie : Le chitosane. **Chem. Ind. Gén. Chim.**, v. 99, n. 9, p. 1241-1247, 1970.
145. HIRAI, A., HORII, F., KITAMURU, R. CP/MAS ^{13}C NMR study of never-dried cotton fibers. **J. Polym. Sci.: Part C: Polym. Letters.**, v. 28, p. 357-361, 1996.
146. RORRER, G. L., HSIEN, T., WAY, J. D. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from waste water. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 32, p. 2170-2178, 1993.
147. TSENG, Ru-L., WU, Feng-C., JUANG, Ruey-S. Pore structure and metal adsorption ability of chitosan prepared from fishery wastes. **J. Environ. Sci. Health.**, v A34, n. 9, p. 1815-1828, 1999.
148. RODRIGUÉZ, M., VILA-JATO, J. L., TORRES, D. Design of new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region. **J. Contr. Rel.**, v 55, p. 67-77, 1998.
149. ATCHE, J., LARANJEIRA, M. C. M.; VÁFERE, V. T.; KIMURA, Y. I.; PEDROSA, C. R. Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli(ácido acrílico). **Polímeros**, v. 10, n. 3, p. 116-1121, 2000.
150. LI, Z., FU, Z. Graft copolymerization of butyl acrylate onto gelatin in the presence of ceric ion. **J. Macromol. Sci - Chem.**, v. 25, n. 12, p. 1487-1513, 1988.
151. KUMARASWAMY, M. D. K., RAO, K. P., JOSEPH, K. T. Grafting onto naturally occurring on gelatin in water -acetic acid medium. **Eur. Polym. J.**, v. 16, p. 259-353, 1979.

152. BLAIR, H. S., GUTHRIE, J., LAW, T. K., TURKINGTON, P. Chitosan and modified chitosan membranes I. Preparation and characterization. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 33, p. 641-656, 1987.
153. IWAKURA, Y., KUROSAKI, T., UNO, K., IMAI, Y. Reactive fiber II. **J. Polym. Sci.**, v. 4, p. 573-698, 1963. Apud MCDOWALL, D. J., GUPTA, B. S., STANNETT, V. T. Grafting of vinyl monomers to cellulose by ceric ion initiation. **Prog. Polym. Sci.**, v. 10, p. 1-50, 1984.
154. BROWN, M. E. Introduction to thermal analysis techniques and application published by Chapman and Hall Ltda., p. 19, 1988.
155. LIU, Z., WU, X. Y., BENDAYAN, R. In vitro investigation of ion polysaccharide for simultaneous delivery of chemosensitizer and antineoplastic agent to multidrug-resistant cells. **J. Pharm. Sci.**, v. 88, n. 4, p. 412-418, 1999.
156. LEE, P. I. Diffusion-controlled matrix systems. In: KYDONIEUS, A. **Treatise on controlled drug delivery**. Ed. Marcel Dekker: New York, 1992.
157. RAMARAJ, B., RADHAKRISHNAN, G. Hydrogel capsules for sustained drug release. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 51, p. 0979-988, 1994.
158. AKBUGA, J. Use of chitosonium malate as a matrix in sustained release tablets. **Intern. J. Pharm.**, v. 86, p. 19-24, 1993.
159. NARAYANI, R., RAO, P. pH- responsive gelatin microspheres for oral delivery of anticancer drug methotrexate. **J. applied Polym. Sci.**, v. 38, p. 1761-1769, 1995.
160. KUBOTA, N., KIKUCHI, Y. In: **Polysaccharides**. B. Complex with polysaccharides, edited by Dimitriu (New York: Marcel Dekker), p. 599, 1998.
161. RITGER, P. L., PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release : I Fick and non-Fickian release from non-swellable devices in the forms

- of slabs, spheres, cylinders or discs. **J. Controlled. Release**, v. 5, p. 23-36, 1987.
162. AKBUGA, J. The effect of physicochemical properties of a drug on its release from chitosonium malate matrix tablets. **Intern. J. Pharm.**, v. 100, p. 257-261, 1993.
163. BODMEIER, R., PAERATAKUL, I. Biopharmaceutical aspects of multiparticulates. In: **Multiparticulate oral drug delivery**, edited by I. Ghebre-sellassie (New York, Basel and Hong - Kong: Marcel Dekker), p. 143-155, 1994.
164. GOTO, S., KAWATA, M., NAKAMURA, M., MAEKAWA, K., AOYAMA, T. Eudragit RS and RL (acrylic resins) microcapsules as pH insensitive and sustained release preparations ketoprofen. **J. Microencapsulation**, v. 3, p. 293-304, 1986.
165. SILVA, J. P. S., FERREIRA, J. P.M. Effect of drug properties on the release from CAP microspheres prepared by a solvent evaporation method. **J. Microencapsulation**, v. 16, n. 1, p. 95-103, 1999.
166. BUINA, G., PAGANI, V., CAROZZI, A. Bioavailability of rifampicin capsules. **J. Clin. Pharmacol. Therap. and Toxicol.**, v. 21, n. 8, p. 404-409, 1983.
167. ZENT, C., SMITH, P. Study of the effect of concomitant food on the bioavailability of rifampicin, isonizid and pyraznamide. **Tuberc. Lung Dis.**, v. 76, p. 109-113, 1995.
168. SMITH, P. J., VAN DYK, J., FREDERICKS, A. Determination of rifampicin isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simutaneous extraction from plasma. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 3, n. 11, p. 235-238, 1999
169. ZILLY, W., BREIMER, D. D., RICHTER, E. Pharmacokinetics interactions with rifampicin. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 2, p. 61-70, 1977.

170. PAWLOWSKA, I., PNIEWSKI, T. Studies on pharmacokinetics of rifampicin in body of patients with pulmonary tuberculosis. **Arzneimittel-Forsch**, v. 29, p. 1906-1911, 1979.
171. VIRTANEN, S., TALA, E. Serum concentration of rifampicin after oral administration. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 16, p. 817-823, 1974.
172. MRSNY, R. J. The colon as a site for drug delivery. **J. Controlled release**, V. 22, n. 1, p. 15-34, 1992.