



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos



**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE AMIDO  
RETROGRADADO E GOMA GELANA UTILIZADOS COMO MATRIZ  
EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CÓLON ESPECÍFICA DE  
FÁRMACOS**

**VALÉRIA MARIA DE OLIVEIRA CARDOSO**

Araraquara  
2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de Araraquara  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE AMIDO  
RETROGRADADO E GOMA GELANA UTILIZADOS COMO MATRIZ  
EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CÓLON ESPECÍFICA DE  
FÁRMACOS**

**VALÉRIA MARIA DE OLIVEIRA CARDOSO**

Araraquara  
2014

VALÉRIA MARIA DE OLIVEIRA CARDOSO

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE AMIDO RETROGRADADO E  
GOMA GELANA UTILIZADOS COMO MATRIZ EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO  
CÓLON ESPECÍFICA DE FÁRMACOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Beatriz Stringhetti Ferreira Cury.**

**Araraquara**

**2014**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**C268s** Cardoso, Valéria Maria de Oliveira  
Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos / Valéria Maria de Oliveira Cardoso . – Araraquara, 2014  
198 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

1. Micropartículas. 2. Goma gelana. 3. Amido retrogrado. 4. Geleificação ionotrópica. 5. Liberação controlada I. Cury, Beatriz Stringhetti Ferreira, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

**VALÉRIA MARIA DE OLIVEIRA CARDOSO**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE AMIDO  
RETROGRADADO E GOMA GELANA UTILIZADOS COMO MATRIZ  
EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CÓLON ESPECÍFICA DE  
FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data da aprovação: 01/12/2014

Titulação: Mestrado em Ciências Farmacêuticas

**Comissão Examinadora**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury (*Presidente*)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Dóris de Castro (*Examinador*)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ruth Meri Lucinda Silva (*Examinador*)

**Araraquara, 01 de Dezembro de 2014.**

***A Deus***

*O maior responsável por essa conquista. Que nunca me abandonou e me deu a força, a determinação e a perseverança necessária para prosseguir e nunca desistir.*

***Aos meus orientadores***

*Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista (**in memoriam**) pelos longos anos dedicados a pesquisa e formação de tantos alunos. Meu eterno carinho e agradecimento àquele que abriu as portas para que um sonho se tornasse realidade.*

*E a Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, por sua incontestável dedicação, paciência para que eu pudesse concluir com êxito este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Em especial, aos meus pais **José Alves de Oliveira** e **Maria Aparecida dos Santos de Oliveira**, exemplos de vida, força e dedicação, bases da minha educação que sempre me apoiaram e com seus ensinamentos morais e principalmente amor, se dedicaram para que eu pudesse conduzir minha vida da melhor maneira possível e realizar feitos como este. Tenho a certeza de que seu amor e demonstrações de carinho contribuíram para que eu tivesse forças para continuar e me tornar uma pessoa cada vez melhor. Com certeza vocês foram acima de tudo a principal motivação pelo qual me empenhei em iniciar essa caminhada.

Ao meu marido **Wagner Cardoso**, exemplo de ser humano e profissional, por seu companheirismo, sempre colaborando e oferecendo todo suporte emocional e afetivo, pela compreensão, respeito e tolerância em todos os momentos que tive que me ausentar para realização deste trabalho. Para sempre eternizo a minha admiração e felicidade em poder compartilhar essa vida com uma pessoa tão maravilhosa. Nosso amor resistiu a dois anos e meio de trabalho intenso, superou dores e angústias e como não deveria deixar de ser, foi muito mais fácil suportar toda dificuldade e ultrapassar todos os obstáculos com a serenidade que só o amor oferece.

Aos meus irmãos **Isabel Cristina de Oliveira Escabelo** e **José Augusto de Oliveira** pelo apoio e por todas as palavras de incentivo, amor e fé quando nos momentos mais difíceis precisei ouvi-las. Por serem meus verdadeiros amigos, se orgulharem de mim e nunca terem me abandonado nos momentos que mais necessitei.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista**, a quem gostaria de prestar sentida homenagem, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade concedida em um momento tão delicado. A minha orientadora **Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury**, por toda confiança depositada em mim, pela paciência e incentivos em todas as oportunidades proporcionadas e ensinamentos passados, que foram indispensáveis para ampliar meus conhecimentos e conquista do tão sonhado título de mestre.

Aos docentes do departamento de Fármacos e Medicamentos, em especial a **Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião** e **Profa. Dra. Ana Dóris de Castro**, pela amizade, indispensável contribuição e auxílio enriquecedores dados no exame geral de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento do trabalho.

Ao **Profa. Dra. Ruth Meri Lucinda da Silva** e **Profa. Dra. Ana Dóris de Castro**, pela contribuição na defesa de dissertação.

## *Agradecimentos*

---

Aos amigos do laboratório, que tiveram cada um sua parcela de contribuição para realização deste trabalho: **Bruno Fonseca dos Santos, Ana Luiza Ribeiro, Charlene Kill, Flávia Chiva, Lilian Barbassa, Gisela Rolfsen, Flavio Campos, Giovana Calixto, Cristiane Pissinato, Leonardo Miziara, Fabíola Garavello Prezotti, Fernanda Boni.** Muito obrigada pela amizade e ajuda prestada em todos os momentos que necessitei.

Em especial, à amiga **Andréia Bagliotti Meneguim**, pessoa que sem dúvida nenhuma teve enorme contribuição para realização deste trabalho, por seus conhecimentos transmitidos de forma tão espontânea e solidária sem nunca exigir nada em troca. Por estar sempre disposta a me ajudar, mesmo a distância, todas as vezes que precisei, por me incentivar sempre e me fazer acreditar que eu seria capaz de realizar este trabalho. À amiga **Márcia Helena Oyafuso** e **Aline dos Santos**, pelas conversas e apoio nos momentos de angústia, pelo carinho e preocupação com meu bem estar e por me incentivarem sempre a nunca perder a esperança e a fé. Você três com certeza estarão sempre no meu coração e nunca vou esquecer tudo que fizeram por mim. Muito obrigada pelo apoio sempre e amizade incontestável, são pessoas como vocês que me fazem ter a certeza que a verdadeira amizade é possível.

Ao **Instituto de Química da UNESP/Araraquara**, em especial ao Grupo de Físico-química de Materiais do Instituto de Química da UNESP, pelas medidas de Difração de Raios X e análises reológicas,

Ao **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa**, do Laboratório de Parasitologia, pela disponibilização do estereoscópio e do analisador de imagens para realização dos estudos de tamanho e forma,

Ao **Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro**, do Instituto de Química, pela disponibilização dos equipamentos para a realização das análises térmicas, e às suas alunas **Mariana** e **Ana Luiza**, pelo auxílio na realização das análises de TG e DSC.

Ao **LMA-IQ** pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**, especialmente à técnica de Laboratório **Natália**, pela disponibilidade e boa vontade para realização de meus experimentos,

À Seção de Pós-graduação, em especial à **Cláudia, Flavia, Daniela, Joyce** e **Márcia**, pela atenção e apoio,

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro na forma de Bolsa de Mestrado.



“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

*(Martin Luther King)*

## **Síntese e caracterização de hidrogéis de amido retrogradado e goma gelana utilizados como matriz em sistemas de liberação cólon específica de fármacos**

### **RESUMO**

O amido resistente é um polissacarídeo que apresenta elevada estabilidade térmica e baixa solubilidade. A gelana é um polissacarídeo natural com importantes propriedades bioadesivas. Ambos os polímeros podem formar hidrogéis capazes de controlar a liberação de fármacos. A associação desses polissacarídeos naturais pode permitir o aperfeiçoamento das características físico-químicas desses materiais que muitas vezes são inexistentes nos polímeros isolados. A mistura de gelana/amido retrogradado, bem como a reticulação desses polímeros bioadesivos permite a modificação de importantes propriedades como resistência mecânica, intumescimento e mucoadesividade e desta forma, representam uma estratégia importante para aperfeiçoar o desempenho de sistemas de liberação sítio-específica de fármacos. No presente trabalho, hidrogéis de gelana/amido retrogradado foram utilizadas para obtenção de micropartículas pelo método de geleificação ionotrópica ou reticulação iônica (interações entre íons de cargas opostas) e dupla reticulação (introdução de ligações covalentes). A caracterização físico-química dos hidrogéis foi realizada através das análises de textura (dureza, adesividade e coesividade), propriedades reológicas, morfologia e difração de raios-x. Na análise do comportamento de textura foi verificado que as maiores concentrações de polímeros melhoraram as propriedades mecânicas dos hidrogéis e que a reticulação iônica contribuiu para o aumento da dureza e coesividade, enquanto a dupla reticulação aumentou a adesividade. A análise reológica demonstrou que as técnicas de reticulação contribuíram para obtenção de sistemas de caráter predominantemente elástico, sendo que a dupla reticulação originou estruturas com maior grau de elasticidade. As análises da estrutura interna dos hidrogéis evidenciaram a formação de estruturas mais densas e compactas na presença do cetoprofeno. De acordo com os dados de DRX, os hidrogéis apresentaram estruturas semicristalinas, sendo que a DR promoveu o aumento da cristalinidade. A caracterização físico-química das micropartículas foi realizada por análises de teor de umidade, rendimento, eficiência de encapsulação, tamanho e forma. A técnica de obtenção foi eficiente para o preparo das micropartículas, com rendimento máximo de 93,95% e a máxima eficiência de encapsulação foi de 72,48%. A faixa de tamanho das micropartículas foi de 1 a 1,3 mm de diâmetro com média de circularidade próxima de 0,84. Os dados de análise térmica evidenciaram a redução da temperatura de degradação dos sistemas, entretanto para dupla reticulação esta temperatura foi maior. A presença de fármaco disperso molecularmente nas micropartículas obtidas pela reticulação iônica e dupla reticulação foi demonstrada através da microscopia eletrônica de varredura. O teste de digestão enzimática *in vitro* das micropartículas demonstrou a presença de elevado teor de amido resistente e, portanto, baixa taxa de digestão enzimática. A análise de intumescimento evidenciou a maior capacidade de intumescimento das micropartículas reticuladas ionicamente e o aumento da concentração de gelana favoreceu a capacidade mucoadesiva das micropartículas. O perfil de liberação demonstrou as baixas taxas de liberação em meio ácido e uma aceleração da liberação em pH 7,4. As amostras M253RI-CP, M255RI-CP e M21053DR-CP foram as que promoveram o mais efetivo controle em meio ácido e o perfil de liberação teve melhor ajuste ao modelo cinético de Weibull, indicando que a liberação do fármaco obedeceu à difusão Fickiana associada ao transporte caso II.

**PALAVRA-CHAVE:** micropartículas, goma gelana, amido retrogradado, geleificação ionotrópica, liberação controlada.

## **Synthesis and characterization of retrograded starch and gellan gum hydrogel utilized as matrix for colon-specific drug delivery systems.**

### ***ABSTRACT***

Resistant starch exhibits high thermal stability and low solubility. Gellan gum is a natural polysaccharide with important bioadhesive properties. Both polymers can build hydrogels able to control drug release rates. The blending of these natural polysaccharides can improve the physicochemical characteristics of these materials that are often absent in the isolated polymers. Gellan gum/retrograded starch association and crosslinking reaction should promote important modification of properties of these materials such as mechanical strength, swelling and mucoadhesiveness and thus, these strategies can improve the performance of site-specific drug delivery systems. In this study, hydrogels of gellan gum/retrograded starch were used to obtain microparticles by ionotropic gelation or ionic crosslinking (interactions between oppositely charged ions) and dual crosslinking (introducing covalent bonds) methods. The physicochemical characterization of the hydrogels was performed by analysis of profile (hardness, adhesiveness and cohesiveness), rheological properties, morphology and X-ray diffraction. Texture analysis of the behavior was found that higher concentrations of polymer improved the mechanical properties of hydrogels and that the ionic crosslinking improved the hardness and cohesiveness of hydrogels, while the dual crosslinking increased adhesiveness. The set of rheological properties showed that the crosslinking techniques contributed to the elastic character of the systems, and the dual crosslinking originated structures with the most elasticity degree. SEM analysis showed that denser and more packed structures were built in the presence of the ketoprofen. According to the XRD data, the microparticles showed semicrystalline structures and the DR increased the crystallinity. Physicochemical characterization of microparticles was performed by analyzes as moisture content, yield, encapsulation efficiency, size and shape. Ionotropic gelation technique was effective for obtaining microparticles and maximum yield of 93.95% and encapsulation efficiency of 72.48% were reached. The size range of microparticles was 1 to 1.3 mm of diameter with circularity around 0.84. Thermal analysis showed a reduction of degradation temperature of the systems, however for dual crosslinking it was higher. The presence of molecularly dispersed drug in the microparticles obtained by both methods (ionic and dual crosslinking) was evidenced by scanning electron microscopy. Enzymatic digestion of the microparticles revealed the high resistant starch content of the samples. The swelling analysis showed the greatest swellability of the microparticles ionically crosslinking and the mucoadesiveness was higher in samples containing high concentrations of gellan gum. The drug release profiles showed low release rates in acid media and higher rates in pH 7.4. Samples M253RI-CP, M255RI-CP and M21053DR-CP were those that promoted a more effective control in acid media and the release profile fitted better with Weibull model, indicating that the drug release followed the Fickian diffusion associated with transport case II.

**Keywords:** microparticles, gellan gum, retrograded starch, ionotropic gelation, controlled release.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Etapas da mucoadesão: (a) contato e interpenetração das cadeias poliméricas, (b) detalhes da interpenetração das cadeias poliméricas com as cadeias de mucina. ....	31
Figura 2: Localização dos órgãos do TGI. ....	33
Figura 3: Ilustração histológica do intestino grosso. ....	35
Figura 4: Esquema ilustrativo de intumescimento em micropartículas constituídas por hidrogéis poliméricos. ....	36
Figura 5: Representação esquemática da geleificação ionotrópica. ....	40
Figura 6: Fórmula estrutural do glutaraldeído. ....	41
Figura 7: Representação esquemática da formação da ligação covalente entre as cadeias de amido retrogradado (AR), gelana e glutaraldeído. ....	42
Figura 8: Estrutura de amilose e amilopectina. ....	44
Figura 9: Estrutura da gelana nativa e deacetilada. ....	47
Figura 10: Representação esquemática do mecanismo de formação do gel de gelana. ....	48
Figura 12: Estrutura do cetoprofeno. ....	51
Figura 13: Representação esquemática da obtenção dos hidrogéis de gelana e amido retrogradado pelos métodos 1 e 2 (AR-M1 e AR-M2) reticulados ionicamente e duplamente reticulados. ....	56
Figura 14: Representação esquemática do teste TPA ( <i>Texture Profile Analysis</i> ). ....	58
Figura 15: Representação esquemática do processo de obtenção de micropartículas de goma gelana e amido através da geleificação ionotrópica e dupla reticulação. ....	61
Figura 16: Esquema ilustrativo do metodologia utilizada no teste de mucoadesão <i>ex vivo</i> . ....	67
Figura 17: Gráfico da $F_{MA}$ (N) e do $T_{MA}$ (N.s), dados pela pico de força e área sob a curva força <i>versus</i> tempo, respectivamente. ....	67
Figura 18: Dureza dos hidrogéis reticulados ionicamente contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana reticulados ionicamente (b e c). ....	73
Figura 19: Dureza dos hidrogéis duplamente reticulados contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana duplamente reticulados (b e c). ....	74

Figura 20: Coesividade dos hidrogéis reticulados ionicamente contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana reticulados ionicamente (b e c).....	75
Figura 21: Coesividade dos hidrogéis duplamente reticulados contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana duplamente reticulados (b e c).....	76
Figura 22: Adesividade dos hidrogéis reticulados ionicamente contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana reticulados ionicamente (b e c).....	77
Figura 23: Adesividade dos hidrogéis duplamente reticulados contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana duplamente reticulados (b e c).....	78
Figura 24: Espectros da varredura de tensão das dispersões não-reticuladas (a) e dos hidrogéis reticulados ionicamente (b e c) e duplamente reticulados (d, e, f). ....	81
Figura 25: Espectros de varredura de frequência das dispersões de gelana/AR não-reticuladas. ....	83
Figura 26: Espectros de varredura de frequência dos hidrogéis reticulados ionicamente (H153-RI (a), H1103-RI (b), H253-RI (c), H2103-RI (d), H255-RI (e) e H2105-RI (f) sem e com fármaco, respectivamente). ....	84
Figura 27: Efeito da concentração de gelana no módulo G' e na viscosidade ( $\eta^*$ ) dos hidrogéis reticulados ionicamente. ....	86
Figura 28: Efeito da concentração de amido retrogradado no módulo G' e na viscosidade ( $\eta$ ) dos hidrogéis RI.....	87
Figura 29: Efeito da variação da concentração de agente reticulante ( $Al^{3+}$ ) no módulo G' e na viscosidade ( $\eta^*$ ) dos hidrogéis reticulados ionicamente. ....	87
Figura 30: Espectros de varredura de frequência dos hidrogéis duplamente reticulados.....	88
Figura 31: Efeito do aumento da concentração de gelana no comportamento elástico (G') (a) e na viscosidade ( $\eta^*$ ) (b) dos hidrogéis duplamente reticulados.....	91
Figura 32: Efeito do aumento da concentração de AR no comportamento elástico (G') e na viscosidade ( $\eta^*$ ) dos hidrogéis duplamente reticulados. ....	91
Figura 33: Efeito da variação dos agentes reticulantes no comportamento elástico (G') e na viscosidade ( $\eta^*$ ) dos hidrogéis duplamente reticulados. ....	92
Figura 34: Fotomicrografias da estrutura interna das dispersões não-reticuladas liofilizadas dos polímeros, sem e com fármaco respectivamente, e nos aumentos 250 e/ou 500 e	

1000x. (Amostras D15 (a), D15-CP (b); D25 (c), D25-CP (d); D210 (e) e D210-CP (f)). .....	97
Figura 35: Fotomicrografias evidenciando a estrutura interna dos hidrogéis reticulados ionicamente liofilizados, sem e com fármaco, respectivamente, e nos aumentos 250 e/ou 500 e 1000x. H153RI (a), H153RI-CP (b); H253RI (c), H253RI-CP (d); H255-RI (e) e H255RI-CP(f). ....	98
Figura 36: Fotomicrografias evidenciando estrutura interna dos hidrogéis duplamente reticulados liofilizados, sem e com fármaco respectivamente, nos aumentos 250 e/ou 500 e 1000X. H1535DR (a), H1535DR-CP (b); H2553DR (c), H2553DR-CP (d); H21031DR (e), H21031DR-CP (f); H21051DR (g), H21051DR-CP (h); H21053DR (i), H21053DR- CP (j); H21055DR (k) e H21055DR-CP (l). ....	100
Figura 37: Difratoograma de raios-x do cetoprofeno. ....	102
Figura 38: Difratoogramas dos polímeros isolados: alta amilose (AA), gelana e amido retrogradado (AR). ....	104
Figura 39: Difratoogramas das amostras não reticuladas de gelana/AR, sem e com fármaco. ....	106
Figura 40: Difratoogramas dos hidrogéis reticulados ionicamente ....	108
Figura 41: Difratoogramas dos hidrogéis dupla reticulação. ....	110
Figura 42: Fotomicrografia das micropartículas reticuladas ionicamente, sem e com cetoprofeno: M153RI (a); M153RI-CP (b); M253RI (c); M253RI-CP (d); M255RI (e) E M255RI-CP (f). ....	113
Figura 43: Fotomicrografia das micropartículas duplamente reticuladas, sem e com cetoprofeno: M1535DR (a); M1535DR-CP (b); M2553DR (c); M2553DR-CP (d); M21031DR (e); M21031DR-CP (f); M21051DR (g); M21051DR-CP (h); M21053DR (i); M21053DR-CP (j); M21055DR (k) e M21055DR-CP (l). ....	114
Figura 44: Fator forma analisado pelo diâmetro do círculo equivalente. ....	116
Figura 45: Distribuição de tamanho de partícula para as micropartículas reticuladas ionicamente. ....	118
Figura 46: Distribuição de tamanho de partícula para as micropartículas duplamente reticuladas. ....	120

Figura 47: Proporções de amido rapidamente digerível (ARD), lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR) das micropartículas RI e DR. ....	124
Figura 48: Perfil de digestão do amido nas micropartículas reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas .....	125
Figura 49: Comparação da eficiência de encapsulação (%) entre amostras RI e DR.: .....	130
Figura 50: Espectros de absorção na região do ultravioleta de cetoprofeno em (a) HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; (b) tampão fosfato pH 6,0 e (c) tampão fosfato pH 7,4. ....	131
Figura 51: Espectro de absorção na região do UV de misturas de gelana e amido retrogradado (1:1 (v/v)) em (a) HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; (b) tampão fosfato pH 6,0 e (c) tampão fosfato pH 7,4. ....	132
Figura 52: Curvas TG/DTG do cetoprofeno e polímeros isolados (gelana e amido retrogradado (5 e 10%))......	134
Figura 53: Curvas de TG/DTG das micropartículas reticuladas ionicamente.....	136
Figura 54: Curvas de TG/DTG das micropartículas duplamente reticuladas.....	139
Figura 55: Curvas DSC do cetoprofeno e polímeros isolados (Gelana, alta amilose e amido retrogradado (5 e 10%))......	143
Figura 56: Curvas DSC das micropartículas reticuladas ionicamente, com e sem fármaco. .	145
Figura 57: Curvas DSC das micropartículas duplamente reticuladas, com e sem fármaco. .	147
Figura 58: Gráfico comparativo dos parâmetro força de mucoadesão - $F_{MA}$ (N) e trabalho de mucoadesão - $T_{MA}$ (N.s) para micropartículas RI, sem e com fármaco. ....	149
Figura 59: Gráfico comparativo dos parâmetro Força de mucoadesão - $F_{MA}$ (N) e trabalho de mucoadesão - $T_{MA}$ (N.s) para micropartículas duplamente reticuladas, sem e com fármaco. ....	151
Figura 60: Fotomicrografia da amostra M153RI-CP. ....	153
Figura 61: Perfil de intumescimento (%) das micropartículas reticuladas ionicamente em meio ácido (pH 1,2).....	154
Figura 62: Perfil de intumescimento (%) das micropartículas reticuladas ionicamente em pH 7,4. ....	155

Figura 63: Perfil de intumescimento (%) das micropartículas reticuladas ionicamente em pH 6 .....	155
Figura 64: Perfil de intumescimento (%) das micropartículas duplamente reticuladas em ácido (pH 1,2).....	157
Figura 65: Perfil de intumescimento (%) das micropartículas duplamente reticuladas em pH 7,4. ....	157
Figura 66: Perfil de intumescimento (%) das micropartículas duplamente reticuladas em pH 6. .....	158
Figura 67: Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas reticuladas ionicamente em meios com diferentes valores de pH. ....	161
Figura 68: Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas duplamente reticuladas em meios com diferentes valores de pH.....	162
Figura 69: Fotomicrografias da superfície (aumentos de 70 e 300x) e estrutura interna (aumento de 1500x) das micropartículas reticulados ionicamente e duplamente reticulados.....	171



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Estratégias empregadas na obtenção de SLC cólon-específicas com base nas características fisiológicas do TGI. ....	29
Quadro 2: Técnicas de microencapsulação .....	38
Quadro 3: Denominação e composição dos hidrogéis de gelana e AR-M1 ou AR-M2 reticulados ionicamente e duplamente reticulados. ....	57
Quadro 4: Denominação e composição das dispersões não-reticulados submetidas a reologia. ....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Hidrogéis de gelana/AR-M2 selecionados para a determinação do comportamento reológico.....	79
Tabela 2: Valores $G'$ , $G''$ e $\eta^*$ do teste oscilatório para as dispersões não-reticuladas sem e com fármaco (tensão, 1 Pa e frequência, 1 Hz).....	83
Tabela 3: Valores de $G'$ , $G''$ e $\eta^*$ para os hidrogéis reticulados ionicamente, sem e com fármaco (tensão, 5 Pa e frequência, 1 Hz).....	85
Tabela 4: Valores $G'$ , $G''$ e $\eta^*$ do teste oscilatório dos hidrogéis duplamente reticulados, com e sem fármaco (tensão 5 Pa e frequência 1 Hz).....	90
Tabela 5: Valores da regressão linear ( $r$ ), expoente viscoelástico ( $n$ ) e da resistência do gel ( $S$ ) das dispersões não-reticuladas, hidrogéis reticulados ionicamente e duplamente reticulados, sem e com fármaco. ....	95
Tabela 6: Amostras selecionadas pelos testes reológicos para análise de morfologia de superfície e estrutura interna e DRX. ....	96
Tabela 7: Circularidade, diâmetro do círculo equivalente e índice Span das micropartículas reticuladas ionicamente, sem e com cetoprofeno. ....	119
Tabela 8: Circularidade, diâmetro do círculo equivalente e índice Span das micropartículas duplamente reticuladas, sem e com cetoprofeno. ....	122
Tabela 9: Digestão enzimática (%) das amostras reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas sem fármaco ( $n=3$ ). ....	123
Tabela 10: Rendimento (%) do processo de obtenção das micropartículas com fármaco pela RI e DR.....	126
Tabela 11: Teor de umidade (%) das micropartículas reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas contendo cetoprofeno. ....	127
Tabela 12: Valores do teor e eficiência de encapsulação (%) do fármaco nas micropartículas reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas (média $\pm$ DP).....	128
Tabela 13: Percentual de perda de massa do cetoprofeno e polímeros isolados (gelana e amido retrogradado (5 e 10%)) (200-400 °C).....	135

Tabela 14: Percentual de perda de massa degradada das amostras reticuladas ionicamente (200-400 °C). .....	137
Tabela 15: Percentual de perda de massa degradada das amostras duplamente reticuladas (200-400 °C) (dois eventos principais). .....	141
Tabela 16: Valores de temperatura e entalpia dos eventos endotérmicos do cetoprofeno e polímeros isolados (alta amilose (AA), gelana e amido retrogradado (AR) 5 e 10%)..	144
Tabela 17: Valores de temperatura e entalpia dos eventos endotérmicos das amostras reticuladas ionicamente. ....	145
Tabela 18: Valores de temperatura e entalpia dos eventos endotérmicos das amostras duplamente reticuladas. ....	148
Tabela 19: Força de mucoadesão - $F_{MA}$ (N) e trabalho de mucoadesão - $T_{MA}$ (N.s) das micropartículas reticuladas ionicamente (n = 5). ....	150
Tabela 20: Força de mucoadesão - $F_{MA}$ (N) e trabalho de mucoadesão - $T_{MA}$ (N.s) das micropartículas duplamente reticuladas (n = 5). ....	151
Tabela 21: Intumescimento (%) das micropartículas reticuladas ionicamente no equilíbrio (120 min) em diferentes meios. ....	155
Tabela 22: Intumescimento (%) das micropartículas duplamente reticuladas no equilíbrio (120 min), em diferentes meios. ....	158
Tabela 23: t80% de liberação do cetoprofeno nas amostras reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas. ....	163
Tabela 24: Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos ( $r^2$ = coeficiente de determinação) em meio ácido (HCl 0,1 N, pH 1,2). ....	168
Tabela 25: Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos ( $r^2$ = coeficiente de determinação) em pH 7,4. ....	169
Tabela 26: Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos ( $r^2$ = coeficiente de determinação) em pH 6. ....	170

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- %EE** = Eficiência de encapsulação
- AA** = Alta amilose
- AINE** = Anti-inflamatório não esteroideal
- ALD** = Amido lentamente digerível
- AR** = Amido retrogradado/Amido Resistente
- ARD** = Amido rapidamente digerível
- CP** = Cetoprofeno
- D10** = Diâmetro em  $\mu\text{m}$  determinado para o percentil 10
- D50** = Diâmetro em  $\mu\text{m}$  determinado para o percentil 50
- D90** = Diâmetro em  $\mu\text{m}$  determinado para o percentil 90
- DNS** = ácido 3,5 – dinitrossalicílico
- DR** = Dupla reticulação/Duplamente reticulada (o)
- DRX** = Difração de raios-x
- F<sub>MA</sub>** = Força de mucoadesão
- ID** = Intestino delgado
- M1** = Método 1 de retrogradação do amido
- M2** = Método 2 de retrogradação do amido
- Qq** = Quantidade quantificada de fármaco
- Qt** = Quantidade total de fármaco adicionada
- r** = Coeficiente de correlação linear
- r<sup>2</sup>** = Coeficiente de determinação
- RI** = Reticulação iônica/ Reticuladas ionicamente
- TGI** = Trato gastrointestinal
- T<sub>MA</sub>** = Trabalho de mucoadesão
- TPA** = (*Texture profile analysis*) Análise de perfil de textura
- UFC** = Unidades formadoras de colônia
- UV-Vis** = Ultravioleta – visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

$G'$  = módulo de armazenamento

$G''$  = módulo de perda

$\gamma$  = taxa de cisalhamento

$\eta^*$  = viscosidade complexa

$\tau$  = tensão de cisalhamento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>28</b>
2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CÓLON-ESPECÍFICA DE FÁRMACOS.....	28
2.2 SISTEMAS MUCOADESIVOS.....	29
2.3 TRATO GASTROINTESTINAL (TGI).....	32
2.4 CÓLON.....	34
2.5 HIDROGÉIS POLIMÉRICOS.....	35
2.6 MÉTODOS DE MICROENCAPSULAÇÃO.....	37
2.6.1 Geleificação ionotrópica e dupla reticulação.....	39
2.7 POLISSACARÍDEOS.....	42
2.7.1 Amido.....	43
2.7.1.1 Amido Resistente.....	45
2.7.2 Goma Gelana.....	46
2.8 Cetoprofeno.....	50
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>52</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
4.1 MATERIAL.....	53
4.1.1. Principais matérias-primas e reagentes.....	53
4.1.2. Principais Equipamentos.....	53
4.2 MÉTODOS.....	54
4.2.1 Retrogradação do amido.....	54
4.2.2 Obtenção dos hidrogéis poliméricos.....	54
4.2.2.1 Preparo das dispersões de goma gelana/amido retrogradado.....	54
4.2.2.2 Preparo dos hidrogéis reticulados ionicamente.....	55
4.2.2.3 Preparo dos hidrogéis duplamente reticulados.....	55

4.2.2.4	Preparo dos hidrogéis de goma gelana .....	55
4.2.3	<i>Caracterização dos hidrogéis poliméricos</i> .....	58
4.2.3.1	Análise das propriedades mecânicas dos hidrogéis RI e DR.....	58
4.2.3.2	Análise das propriedades reológicas das dispersões poliméricas .....	58
4.2.3.2.1	Determinação da faixa de viscoelasticidade linear das dispersões.....	59
4.2.3.2.2	Determinação dos espectros mecânicos dos hidrogéis .....	59
4.2.3.3	Análise de morfologia da estrutura interna dos hidrogéis .....	60
4.2.3.4	Difração de raios-x .....	60
4.2.4	<i>Obtenção das micropartículas</i> .....	60
4.2.5	<i>Caracterização das micropartículas</i> .....	61
4.2.5.1	Análise de tamanho e forma das micropartículas.....	61
4.2.5.2	Teste de digestão enzimática dos micropartículas.....	62
4.2.5.3	Rendimento.....	63
4.2.5.4	Teor de umidade .....	63
4.2.5.5	Avaliação do teor e da eficiência de encapsulação das micropartículas .....	63
4.2.5.6	Especificidade/Seletividade.....	65
4.2.5.7	Análise térmica .....	65
4.2.5.7.1	DSC .....	65
4.2.5.7.2	TG/DTG .....	65
4.2.5.8	Teste “ <i>ex vivo</i> ” de mucoadesão .....	66
4.2.5.9	Análise de intumescimento.....	68
4.2.5.11	Análise dos mecanismos de liberação do fármaco .....	69
4.2.5.12	Análise de morfologia de superfície e estrutura interna das micropartículas .....	69
4.2.5.13	Análise estatística .....	70
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>71</b>
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS .....	71

5.1.1	<i>Análise das propriedades mecânicas dos hidrogéis</i> .....	71
5.1.2	<i>Análise das propriedades reológicas dos hidrogéis poliméricos</i> .....	79
5.1.3	<i>Análise de morfologia de superfície e estrutura interna dos hidrogéis</i> .....	96
5.1.4	<i>Difração de raios-x</i> .....	101
5.2	<b>OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS</b> .....	112
5.3	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS</b> .....	115
5.3.1	<i>Análise de tamanho e forma das micropartículas</i> .....	115
5.3.2	<i>Teste de digestão enzimática</i> .....	122
5.3.3	<i>Rendimento</i> .....	126
5.3.4	<i>Teor de umidade</i> .....	126
5.3.5	<i>Avaliação do teor e da eficiência de encapsulação (%EE)</i> .....	128
5.3.6	<i>Especificidade/Seletividade</i> .....	130
5.3.7	<i>Análises Térmicas</i> .....	133
5.3.7.1	<i>TG/DTG</i> .....	133
5.3.7.2	<i>DSC</i> .....	141
5.3.8	<i>Teste “ex vivo” de mucoadesão</i> .....	148
5.3.9	<i>Análise de Intumescimento</i> .....	152
5.3.10	<i>Determinação do perfil de liberação in vitro do CP</i> .....	159
5.3.11	<i>Análise dos mecanismos de liberação in vitro do cetoprofeno</i> .....	163
5.3.12	<i>Análise de morfologia de superfície e estrutura interna</i> .....	171
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>173</b>
6.1	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>174</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>175</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A vetorização de fármacos para o cólon constitui um importante objeto de estudo, pois possibilita a utilização da via oral para a administração de fármacos, principalmente daqueles que podem ser degradados nas porções superiores do trato gastrointestinal, seja pelo ambiente ácido do estômago ou pelas enzimas pancreáticas (FREIRE, 2006; MENNINI et al., 2012; PERERA; MEDA; TYLER, 2010).

Além disso, sistemas destinados à liberação sítio-específica de fármacos apresentam certas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, por exemplo, menor alteração dos níveis plasmáticos, maximizando a resposta terapêutica e minimizando os efeitos adversos, além da redução na frequência de administração, e, portanto, melhor adesão do paciente ao tratamento (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; FREIRE, 2006; LYRA et al., 2007).

O crescente interesse no cólon como sítio para liberação de fármacos, quer de ação local ou sistêmica, baseia-se nas características particulares desse órgão, que apresenta elevada capacidade de absorção, pH mais próximo da neutralidade, tempo de trânsito longo e atividade enzimática reduzida (FREIRE, 2006; MENNINI et al., 2012; PERERA; MEDA; TYLER, 2010).

Considerando a grande variabilidade inter e intra-individual do tempo de trânsito e pH ao longo do trato gastrointestinal (TGI), bem como a atividade enzimática específica do meio colônico, o delineamento de sistemas de liberação controlada cólon-específica fundamenta-se em diferentes estratégias que possibilitem a liberação do fármaco em função do tempo, do pH, da ação de enzimas produzidas pela microbiota colônica ou da pressão intra-luminal (BARATA et al., 2007; BASIT, 2005; MAIOR et al., 2008; WILSON; BASIT, 2005; WILSON, 2010).

A capacidade mucoadesiva pode agregar importantes vantagens aos sistemas de liberação controlada de fármacos, pois podem prolongar o tempo de residência e promover o contato mais íntimo com a membrana mucosa, além de melhorar a permeabilidade e absorção por aumentar o gradiente de concentração local (HÄGERSTRÖM, 2003; HAGESAETHER; HIORTH; SANDE, 2009; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010).

A utilização de polissacarídeos naturais bioadesivos na obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos é de grande interesse em razão da atoxicidade, baixo custo, ampla biodisponibilidade e biodegradabilidade desses materiais (BHARDWAJ et al., 2000, KULKARNI et al., 2011). No entanto, os polissacarídeos naturais podem apresentar algumas

desvantagens, por exemplo, com relação à capacidade de intumescimento e viscosidade, as quais podem ser corrigidas através da associação de polímeros, bem como pela modificação química desses materiais por reações de reticulação, permitindo a obtenção de um novo material com propriedades moduladas de acordo com necessidades específicas.

O amido resistente pode ser obtido através do tratamento hidrotérmico do amido, em que o amido gelatinizado, que se encontra no estado amorfo, após o armazenamento, assume um estado mais cristalino ou ordenado, através de interações como pontes de hidrogênio e forças de van der Waals inter e intramoleculares, como um processo espontâneo, no intuito de se alcançar uma forma metaestável de mais baixa energia livre (CHUNG; LIM; LIM, 2006; LIU et al., 2007; TAKO, 1996; THOMPSON, 2000; YUAN; THOMPSON; BOYER, 1993). Essa forma metaestável é menos susceptível à hidrólise, o que resulta no aumento de sua resistência à ação enzimática (THOMPSON, 2000).

A alta amilose (AA), um amido modificado, tem sido considerada o material preferencial para obtenção de elevados teores de amido resistente, pois após a retrogradação origina uma matriz amorfa em que os cristalitos formados ficam embebidos e protegidos da exposição às enzimas (DIMANTOV et al., 2003; DIMANTOV; KESSELMAN; SHIMONI, 2004; HTOON et al., 2009).

A goma gelana (comercialmente disponível como Gelrite<sup>®</sup> ou Kelcogel<sup>®</sup>) é um exopolissacarídeo hidrofílico linear aniônico obtido pelo processo de fermentação aeróbia pelo microrganismo *Sphingomonas elodea* (GIAVASIS; HARVEY; MCNEIL, 2000). Por ser um polímero de característica aniônica, apresenta importantes propriedades mucoadesivas (LEE; PARK; ROBINSON, 2000; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANGL; JOHNSTON, 2005) e tem sido empregada na obtenção de sistemas de liberação controlada de diferentes fármacos, devido a sua habilidade em formar micropartículas de hidrogéis, caracterizadas pela presença de redes tridimensionais hidrofílicas capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos na presença de cátions divalentes, particularmente  $\text{Ca}^{2+}$  (AGNIHOTRI; JAWALKAR; AMINABHAVI, 2006; BABU et al., 2010; PATIL et al., 2006; RAJINIKANTH; MISHRA, 2007).

A obtenção de micropartículas por geleificação ionotrópica trata-se de um método simples e rápido, que explora condições reacionais amenas, dispensando o uso de solventes orgânicos. Por outro lado, a reticulação através da introdução de ligações covalentes intercadeias, por reação dos grupamentos funcionais de vários polímeros naturais ou sintéticos

com agentes reticulantes, como o glutaraldeído, vem sendo bastante utilizada para se modificar/adequar suas propriedades a diferentes aplicações (CHOURASIA et al., 2006; DAS; WADHWA; SRIVASTAVA, 2006; GEORGE; ABRAHAM, 2007; SOPPIMATH; KULKARNI; AMINABHAVI, 2000).

Em estudo com micropartículas de gelatina e albumina, a dupla reticulação, iônica e covalente, através da reação com íons  $\text{Ca}^{2+}$  e glutaraldeído, respectivamente, permitiu um controle mais efetivo das taxas de liberação do fármaco do que aquele promovido pela reticulação iônica isoladamente (KULKARNI et al., 2011).

Em recente estudo, MAITI e colaboradores (2011) demonstraram a possibilidade de formação de microcápsulas por reticulação da gelatina com  $\text{Al}^{3+}$ , no entanto, as microcápsulas obtidas permitiram a liberação de aproximadamente 40% do fármaco encapsulado, glipizida, em apenas 2 horas em meio entérico.

O cetoprofeno (CP) é um anti-inflamatório não-esteroidal pouco solúvel em água, amplamente utilizado para o tratamento de artrites reumatoide e crônica, sendo que a baixa solubilidade é o fator limitante para a absorção (LÖBENBERG; AMIDON, 2000). Sua conhecida gastro-toxicidade e seu curto tempo de meia-vida, o torna potencial candidato para incorporação em sistemas de liberação cólon-específica de fármacos (MAESTRELLI et al., 2008).

Com base nos fatos expostos, a associação do amido resistente à gelatina, bem como a modificação desses polímeros através da reticulação iônica e iônica/covalente representam uma estratégia promissora para modular suas propriedades. Dessa forma a proposta deste trabalho foi delinear sistemas a base de polissacarídeos naturais modificados, gelatina e amido retrogradado, destinados à vetorização e liberação cólon específica de fármacos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Sistemas de liberação cólon-específica de fármacos

Dentre as diversas vias de administração de medicamentos, a via oral é a mais comumente utilizada na terapêutica, sendo considerada a mais conveniente, não invasiva e popular por inúmeras razões, dentre elas a facilidade de administração e flexibilidade de dosagem (ISHA et al., 2012; LAM; GAMBARI, 2014; PINTO, 2010; VARUM; HATTON; BASIT, 2013).

Considerando a variabilidade das porções superiores do TGI (estômago, duodeno e início do jejuno) em relação ao pH, tempo de trânsito e a atividade proteolítica, fatores que podem levar a baixa biodisponibilidade do fármaco, diversas estratégias vem sendo exploradas no sentido de melhorar as propriedades de sistemas sólidos administrados por via oral (MRSNY, 2012; LAM; GAMBARI, 2014).

A liberação controlada de fármacos tem como objetivo principal o controle, *in vivo*, do tempo e do local de liberação do fármaco com máximo resultado terapêutico e mínimos efeitos adversos (COIMBRA, 2010). Os sistemas de liberação controlada (SLC) são obtidos através da associação química ou física de fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas capazes de modular a liberação do fármaco, mantendo os níveis plasmáticos dentro da faixa terapêutica pelo período de tempo desejado, ao contrário das formas farmacêuticas convencionais ou de liberação imediata que são destinadas a liberar o fármaco logo após sua desintegração e dissolução (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; BASIT, 2005; LYRA et al., 2007; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

O crescente interesse no cólon como sítio para liberação de fármacos, baseia-se nas características particulares desse órgão, como pH mais próximo da neutralidade, que representa um ambiente menos hostil, principalmente para formulações orais de proteínas e peptídeos; tempo de trânsito longo, o qual favorece o tempo de residência das formas farmacêuticas contribuindo para a absorção do fármaco, atividade proteolítica reduzida em relação ao estômago e intestino delgado (ID) (FREIRE et al., 2006) e a pressão intraluminal, gerada por contrações musculares que ocorrem na parede intestinal para triturar e impulsionar o conteúdo luminal para fora e esta propriedade varia em intensidade e duração ao longo do TGI (FRIEND, 2005).

Entretanto, esses parâmetros são variáveis em cada indivíduo e também podem ser afetados por estados patológicos do sistema digestório (BASIT, 2005). Assim, a vetorização do sistema para o cólon requer a proteção do fármaco contra a degradação nas porções superiores do TGI, de modo que esse sistema responda somente as condições fisiológicas particulares do cólon (BASIT, 2005; PINTO, 2010; YANG; CHU; FIX, 2002).

As estratégias que podem ser utilizadas com a finalidade de direcionamento do fármaco para cólon estão apresentadas de forma resumida na Quadro 1.

**Quadro 1:** Estratégias empregadas na obtenção de SLC cólon-específica com base nas características fisiológicas do TGI.

<b>Estratégia</b>	<b>Liberação do fármaco</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Referência</b>
<b>Pró-fármacos</b>	Após clivagem das ligações com polímeros ou através da ação metabólica da microflora bacteriana	Sulfasalazina (sofre azorredução)	SINHA; KUMRIA, 2003
<b>Sistemas revestidos com polímeros biodegradáveis ou sistemas ativados pela microflora colônica</b>	Após a degradação de polímeros especificamente pela microbiota colônica	Sistemas baseados em polímeros naturais: goma guar, xantana, gelana	FREIRE et al., 2006; PINTO, 2010
<b>Sistemas pH-dependentes</b>	Após a dissolução de polímeros com solubilidade dependente do pH	Capsulas revestidas com Eudragit <sup>®</sup>	YANG; CHU; FIX, 2002
<b>Sistemas tempo-dependentes</b>	Após degradação ou dissolução dos polímeros após determinado tempo de residência no órgão	Sistemas <i>Time clock</i> <sup>®</sup>	YANG; CHU; FIX, 2002
<b>Sistemas dependentes da pressão intraluminal</b>	A liberação ocorre quando o material é degradado devido ao aumento da pressão intraluminal	Cápsulas de polietilenoglicóis revestidos com etilcelulose (PCDCs)	FREIRE et al., 2006

## 2.2 Sistemas mucoadesivos

Sistemas mucoadesivos têm sido amplamente utilizados no direcionamento de fármacos para um órgão alvo, devido a sua habilidade em prolongar o tempo de residência no

sítio de ação/liberação e promover o contato íntimo entre a formulação e a membrana mucosa, fatores que devem contribuir para o aumento da permeabilidade/biodisponibilidade de vários fármacos (HÄGERSTRÖM, 2003; HAGESAETHER; HIORTH; SANDE, 2009; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010 ).

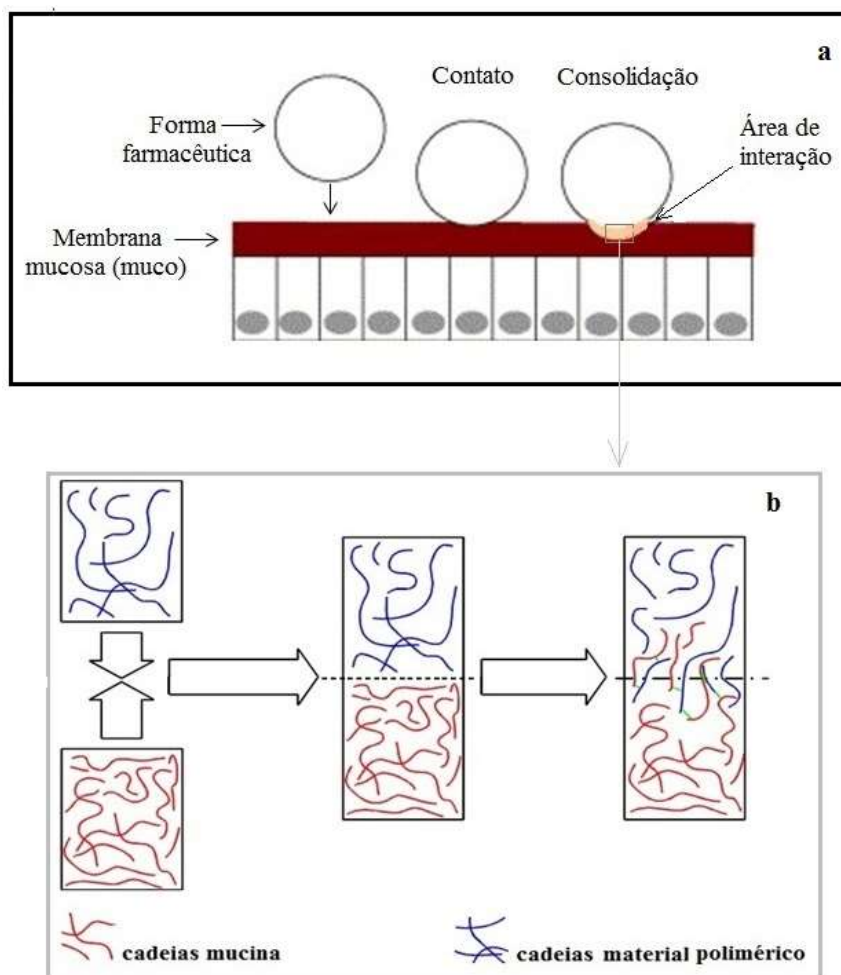
O processo de bioadesão pode ser denominado como estado em que dois materiais, uma macromolécula (natural ou sintética) e o tecido biológico, são mantidos unidos por prolongados períodos de tempo através de forças interfaciais. Quando a região de adesão é o muco ou mesmo uma membrana mucosa, esse processo é denominado mucoadesão (LYRA et al., 2007), que é caracterizado pela ligação do sistema carreador do fármaco a um substrato biológico, que no caso será o muco existente na superfície do tecido (FIGUEIRAS; CARVALHO; VEIGA, 2007).

O principal componente do muco é a mucina, uma glicoproteína que possui elevado peso molecular que exhibe importantes propriedades viscoelásticas e apresenta-se carregada negativamente em pH fisiológico, devido aos resíduos de ácido siálico nas unidades de oligossacarídeos que estão ligados covalentemente à cadeia polipeptídica (HÄGERSTRÖM, 2003; SMART, 2005).

O muco ao longo do TGI é caracterizado por um hidrogel complexo composto de glicoproteínas, carboidratos, lipídeos, sais, anticorpos, bactérias e é responsável pela proteção e lubrificação do TGI, atuando também como barreira de difusão entre o lúmen e o epitélio. A espessura do muco é maior no estômago (40-450  $\mu\text{m}$ ) e no cólon (110-160  $\mu\text{m}$ ) devido a maior necessidade em promover a proteção contra o ácido do estômago e das bactérias colônicas. No ID, a espessura é bem variável e dependente da dieta (ENSIGN; RICHARD; JUSTIN, 2012).

Dessa forma, para o desenvolvimento de um sistema mucoadesivo ideal é importante conhecer as propriedades do muco ao longo do TGI e compreender as forças responsáveis pela formação das ligações bioadesivas, que compreende três etapas (Figura 1). A primeira etapa envolve um contato íntimo entre o sistema mucoadesivo e a camada de muco. Em seguida, o contato com o muco leva ao processo de intumescimento do sistema acompanhado pelo relaxamento e interpenetração das cadeias poliméricas no interior da rede glicoproteica do muco. Finalmente, ocorrem interações físicas ou químicas e, conseqüentemente, um contato mais íntimo é estabelecido entre o material e o muco (FIGUEIRAS; CARVALHO; VEIGA, 2007; HÄGERSTRÖM, 2003; LYRA et al., 2007; SMART, 2005).

**Figura 1:** Etapas da mucoadesão: (a) contato e interpenetração das cadeias poliméricas, (b) detalhes da interpenetração das cadeias poliméricas com as cadeias de mucina.



Fonte: adaptado de SMART, 2005.

Existem seis teorias gerais da adesão desenvolvidas na tentativa de explicar o fenômeno da mucoadesão. Estas são classificadas como teoria eletrônica, da umidade, da adsorção, de difusão, mecânica e de fratura. Entretanto, devido à sua complexidade, não há uma teoria individual que seja aceita universalmente para explicar esse fenômeno. Portanto, é provável que o processo de mucoadesão envolva mais de uma destas teorias (FIGUEIRAS; CARVALHO; VEIGA, 2007; LYRA et al., 2007).

Atualmente, existe uma diversidade de polímeros sintéticos (derivados de celulose, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico e polidroxietil metilacrilato) e naturais (alginato de sódio, goma de guar, gelatina, quitosano, goma gelana, amido) conhecidos e utilizados por suas propriedades mucoadesivas, capazes de aderir ao tecido da mucosa e promover as interações químicas fracas e de baixa energia (WOERTZ et al., 2013), já que ligações fortes

do tipo covalente, poderiam prejudicar o caráter transitório que estes produtos necessariamente devem possuir (LYRA et al., 2007).

### **2.3 Trato Gastrointestinal (TGI)**

Para o sucesso na obtenção e vetorização de um sistema para o cólon e, que seja capaz de promover a liberação controlada do fármaco nessa região, é importante o conhecimento anatomofisiológico do TGI e de algumas características particulares do cólon.

Os órgãos que constituem o sistema digestório (Figura 2) estão relacionados com as funções de ingestão, mastigação, deglutição, digestão dos alimentos, absorção dos nutrientes e a eliminação de alimentos não absorvíveis (CIDRE, 2011; FADDA; BASIT, 2005;). Essas funções são reguladas por hormônios e pelo sistema nervoso, e cada porção do TGI é responsável por uma função (REED; WICKHAM, 2009; RUSSO; TURNER, 2004).

O TGI é constituído por um tubo muscular que compreende a boca, o esôfago, o estômago, o intestino delgado (ID), o intestino grosso (cólon) e o canal anal (Figura 2). O esôfago é um órgão localizado em sua maior parte no mediastino, com aproximadamente 25 cm de comprimento, pH na faixa de 5-6, e é responsável pela conexão entre a faringe e extremidade superior do estômago e pelo transporte de substâncias da cavidade oral até o estômago (AMERONGEN, 2010; REED; WICKHAM, 2009).

O estômago, apresenta pH abaixo de 3 e um tempo de esvaziamento gástrico de até 2 horas em condições normais, podendo ocorrer variações em condições patológicas ou na presença de alimentos (FREIRE et al., 2006; PINTO, 2010; REDDY; SINHA; REDDY, 1999). Este órgão tem a função de reservatório temporário de substâncias e transformação do alimento em quimo através de processos mecânicos, que correspondem à mistura dos alimentos com as enzimas para a efetivação da digestão através de reações químicas. Este será posteriormente direcionado ao ID através dos movimentos peristálticos (RUSSO; TURNER, 2004, SAKAMOTO, 2010; SINHA; KUMRIA, 2003). O tempo de permanência de medicamentos e alimentos no estômago é variável de indivíduo para indivíduo e a ingestão de alimento gordurosos, podem tornar o tempo de esvaziamento gástrico mais lento e provocar variações no pH (FREIRE et al., 2006; PINTO, 2010; REDDY; SINHA; REDDY, 1999).

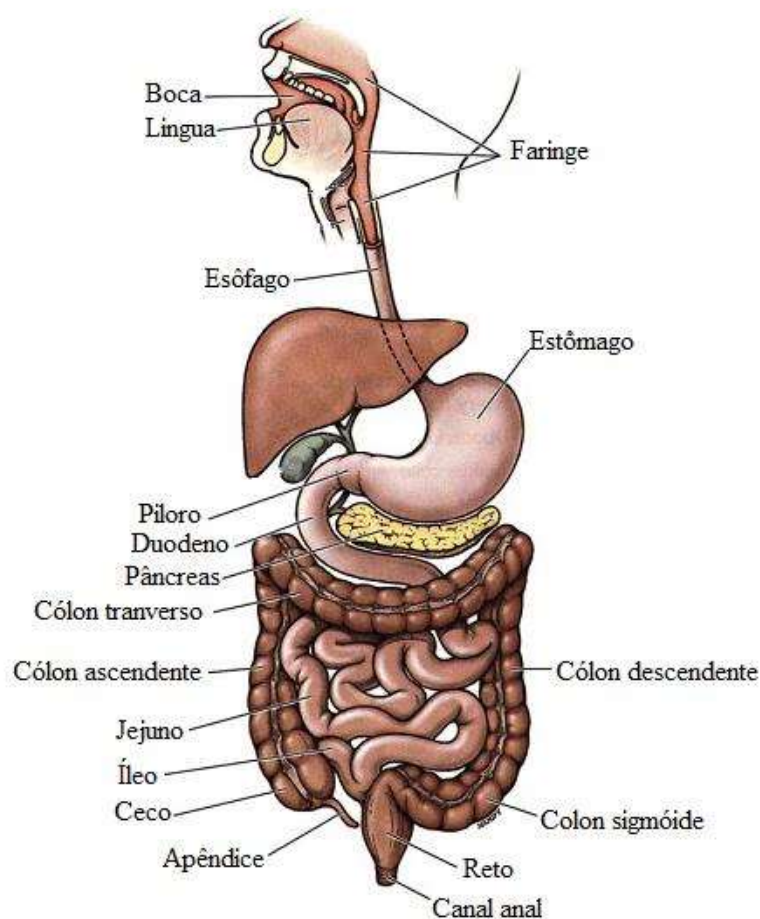
O ID, com um comprimento de aproximadamente 7 metros subdivididos em duodeno, jejuno e íleo, apresenta pH de aproximadamente 7,4 e tempo de trânsito de 3-4 horas, sendo responsável por receber o conteúdo estomacal e pela decomposição química final dos



alimentos pelas enzimas digestivas, além da absorção de nutrientes, água e eletrólitos (AMERONGEN, 2010; REDDY; SINHA; REDDY, 1999; RUSSO; TURNER, 2004; SAKAMOTO, 2010).

O cólon apresenta uma extensão de aproximadamente 1,5 m, e está compreendido entre a junção ileocecal e o ânus. O pH deste segmento está entre 5-8 e tempo de trânsito é longo podendo atingir até 144 horas, entretanto, pode variar entres homens e mulheres (FREIRE et al., 2006). É subdividido em ceco, apêndice, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e canal anal (Figura 2) (FADDA; BASIT, 2005; FREIRE et al., 2006; RUSSO; TURNER, 2004).

**Figura 2:** Localização dos órgãos do TGI.



Fonte: adaptado de AMERONGEN, 2010.

A parede do TGI é recoberta por muco, que se caracteriza como um hidrogel complexo constituído de glicoproteínas (sendo a principal delas a mucina), lipídeos, sais

minerais, DNA, enzimas e detritos celulares. A função do muco é atuar como uma barreira à penetração de moléculas estranhas, que depende de propriedades físico-químicas do fármaco e da glicoproteína. No caso do fármaco, a solubilidade e lipofilia são fatores fundamentais para permitir a absorção do fármaco, já que este deve ser solúvel no local de absorção, porém deve apresentar lipofilia suficiente para permear a membrana biológica (SIGURDSSON; KIRCH; LEHR, 2013).

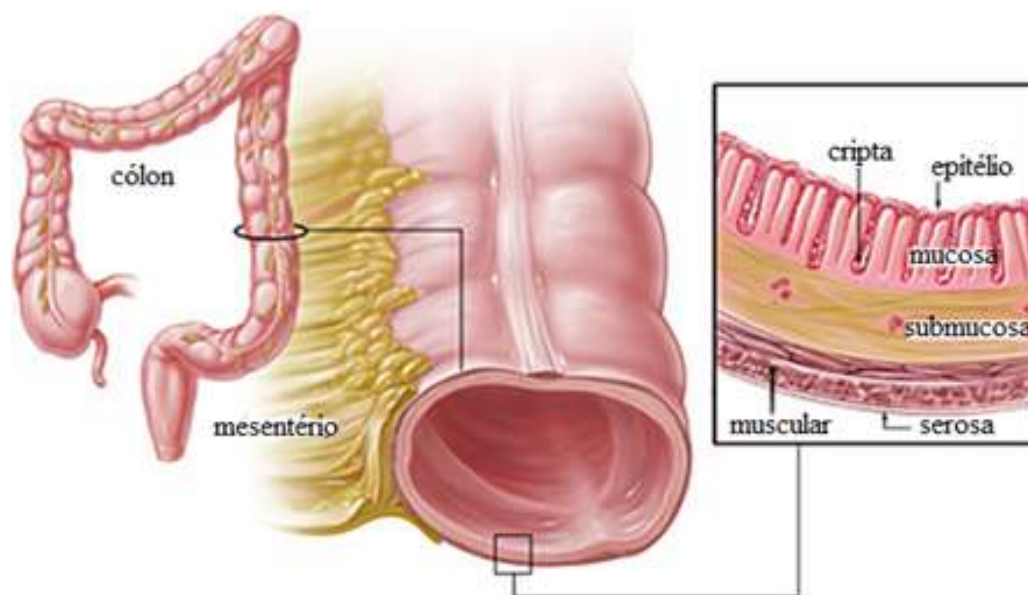
## **2.4 Cólon**

A parede do cólon é constituída de um epitélio cilíndrico simples, desprovido de vilosidades (Figura 3), porém possui muitas glândulas e a mucosa consiste de criptas contendo células caliciformes e enterócitos que são absorventes (RUSSO; TURNER, 2004) e favorecem o contato com sistemas poliméricos bioadesivos.

Responsável pela fermentação de polissacarídeos e proteínas (BASIT, 2005), o cólon promove a completa absorção de nutrientes, água e eletrólitos, e formação da massa fecal (FREIRE et al., 2006; REED; WICKHAM, 2009; RUSSO; TURNER, 2004).

O cólon apresenta uma microflora com mais de 400 espécies diferentes de bactérias aeróbicas, que representa uma população em torno de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  UFC, sendo estas responsáveis pela produção de um amplo espectro de enzimas com atividades redutoras e hidrolíticas envolvidas nos processos bioquímicos de fermentação de carboidratos e proteínas que não foram hidrolisadas no estômago e ID (FREIRE et al., 2006; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; SINHA; KUMRIA, 2003; YANG, 2008).

O cólon proximal ou ascendente é considerado um local ideal para absorção de fármacos. A vetorização bem sucedida requer a exploração de características únicas do ambiente colônico (PINTO, 2010), já citadas anteriormente. Entretanto, é importante levar em consideração as mudanças fisiológicas que podem ocorrer em algumas situações particulares, como a presença de patologias, por exemplo, diarreia ou constipação que provocam alterações no tempo de trânsito; o uso de medicamentos que possam prejudicar a absorção no cólon devido alguma reação do próprio medicamento; ou em dietas ricas em fibras, que podem acelerar o tempo de trânsito no cólon possivelmente por um mecanismo de distensão da parede provocado por algumas fibras com elevada capacidade de retenção de água (FREIRE et al., 2006).

**Figura 3:** Ilustração histológica do intestino grosso.

Fonte: Site Johns Hopkins Medicine – Gastroenterology & Hepatology.

## 2.5 Hidrogéis poliméricos

Os hidrogéis poliméricos podem ser definidos por estruturas tridimensionais constituídas por cadeias de macromoléculas interligadas através de ligações covalentes ou interações físicas. São altamente hidrofílicos e apresentam como característica principal a elevada capacidade de absorção de água ou fluidos biológicos (ALMEIDA, 2010; ALVES, 2011; DRAGAN, 2014; PEPPAS et al., 2000). Essa hidrofília pode ser controlada pela natureza dos grupos funcionais presentes em suas cadeias, tais como: -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H (DRAGAN, 2014).

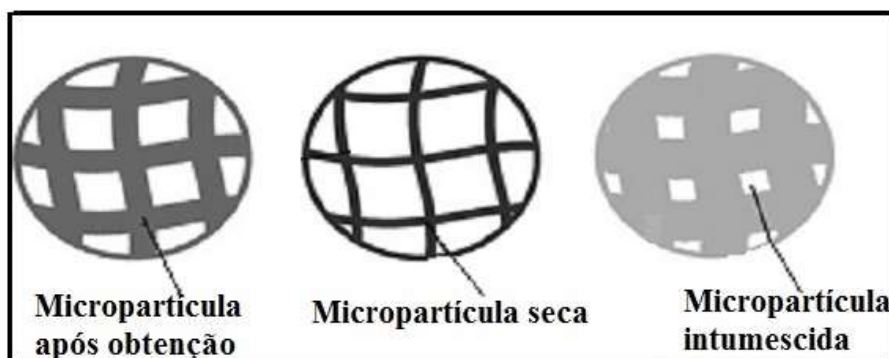
Hidrogéis físicos são aqueles obtidos através de interações físicas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, enquanto os hidrogéis químicos são formados através de ligações covalentes (AOUADA, 2009; HOFFMAN, 2002). Ambos não são estruturas homogêneas, pois normalmente apresentam regiões de baixa absorção de água e elevada densidade de reticulação, também chamada de aglomerados, que estão dispersos em regiões de grande absorção de água em que a densidade de reticulação é baixa (PATIL; DORDICK; RETHWISCH, 1999).

Durante a formação dos hidrogéis a quantidade de água irá determinar a taxa de difusão do líquido penetrante e do fármaco através dos poros ou microporos da rede

polimérica, que podem ser formados durante a síntese do gel ou estar presentes na própria rede do polímero (HOFFMAN, 2002; SILVA, 2006).

Quando os sistemas constituídos por hidrogéis são colocados em contato com meio aquoso, suas cadeias poliméricas sofrem hidratação e se expandem (Figura 4). As ligações primárias com a água ocorrem quando as primeiras moléculas de água hidratam os grupos polares e hidrofílicos das redes poliméricas. Em seguida, essas cadeias expõem os grupos hidrofóbicos que também irão interagir com as moléculas de água, formando assim as ligações secundárias. Após esse processo, a rede polimérica absorve grande quantidade de água adicional devido a uma força osmótica exercida pela rede, que se expande. Entretanto, essa expansão é restringida pelas ligações cruzadas, levando a uma força de retenção elástica da cadeia, em que o hidrogel atinge o equilíbrio de expansão. Essa água adicional, também chamada de água livre preenche os espaços vazios da rede polimérica (HOFFMAN, 2002).

**Figura 4:** Esquema ilustrativo de intumescimento em micropartículas constituídas por hidrogéis poliméricos.



Fonte: ALVES, 2011.

Portanto, durante a formação do hidrogel, o fármaco fica aprisionado na sua estrutura tridimensional, podendo estar disperso ou dissolvido na matriz polimérica. Dessa forma o grau de reticulação, a estrutura do hidrogel e a capacidade de absorção de água são fatores importantes que irão influenciar no processo de liberação do fármaco (COIMBRA, 2010).

Os hidrogéis podem se apresentar em diferentes formas físicas, dependendo de sua aplicação, por exemplo, a forma sólida moldada (lentes de contato); matrizes compactadas (comprimidos e cápsulas para administração oral); micropartículas; filmes de revestimento (para liberação transdérmica de fármacos) e na forma de géis (HOFFMAN, 2002). Além disso, os hidrogéis podem ser utilizados em sistemas de liberação específica de fármacos para cavidade oral, retal, ocular, transdérmica, subcutânea e colônica (PEPPAS et al., 2000).

## **2.6 Métodos de Microencapsulação**

A microencapsulação compreende um conjunto de técnicas através dos quais o fármaco é aprisionado em um agente encapsulante, permitindo a obtenção de sistemas multiparticulados, que ofereçam uma série de vantagens como proteção do material encapsulado; capacidade de minimizar efeitos adversos; possibilidade de mascarar características organolépticas desagradáveis e a capacidade de modular as taxas de liberação do fármaco (BRASILEIRO, 2012; JYOTHI et al., 2010; SUAVE et al., 2006).

As substâncias encapsuladas são totalmente envolvidas em um material de revestimento, ou incorporado em uma matriz homogênea ou heterogênea, a fim de formar partículas com diâmetros compreendidos entre alguns micrômetros ou milímetros (ESTEVINHO et al., 2013).

O método de encapsulação deve ser simples, reprodutível, rápido e fácil de transpor para escala industrial (YEO; BAEK; PARK, 2001). Existem algumas diferenças básicas entre técnicas de encapsulação, pois o processo de formação e o aprisionamento do fármaco pelo material encapsulante podem ser de natureza física, química e físico-química (BRASILEIRO, 2012; LAM; GAMBARI, 2014; SILVA et al., 2003; SUAVE et al., 2006). Os diferentes métodos de encapsulação são apresentados na Quadro 2:

**Quadro 2:** Técnicas de microencapsulação

<b>Categorias</b>	<b>Métodos de Microencapsulação</b>	<b>Obtenção</b>
<b>Química</b>	Polimerização Interfacial	Ocorre a formação de uma membrana polimérica na interface entre duas fases líquidas, dando origem a parede da microcápsula pela polimerização do monômero reativo.
	Polimerização por radicais livres	As micropartículas são formadas através do crescimento de cadeias de polímero como resultado da transferência eletrônica entre os monômeros reativos. A incorporação do fármaco nas micropartículas é realizada embebendo-as secas na solução contendo fármaco.
<b>Físico-química</b>	Coacervação (separação de fases)	Primeiro o fármaco é disperso no material polimérico encapsulante, o qual é adicionado outra solução polimérica imiscível. Ambas soluções apresentam cargas negativas. Em seguida é adicionado uma substância que irá alterar o pH e os polímeros adquirem cargas opostas entre eles que interagem formando gotículas que se depositam em torno do fármaco e coalescem. Esse revestimento sofre solidificação através da reticulação dando origem as microcápsulas.
	Geleificação Ionotrópica	As micropartículas são obtidas através da interação entre íons de cargas opostas. O fármaco é incorporado a uma solução polimérica que é adicionada por extrusão a uma solução aquosa reticulante. A difusão dos ânions ou cátions através das gotas poliméricas conduz a reticulação, dando origem a uma estrutura tridimensional ionicamente reticulada.
<b>Física</b>	Leito fluidizado	Partículas do fármacos são suspensas em uma corrente de ar quente ascendente formando um leito fluidizado, seguida pela nebulização de uma solução polimérica. Em seguida, as micropartículas são obtidas por meio de evaporação do solvente.
	<i>Spray drying</i>	Uma solução polimérica contendo o fármaco é pulverizada dentro de uma câmara de ar quente que promove a secagem do material e conseqüente formação das micropartículas.

Fonte: LAM; GAMBARI, 2014.

### 2.6.1 Geleificação ionotrópica e dupla reticulação

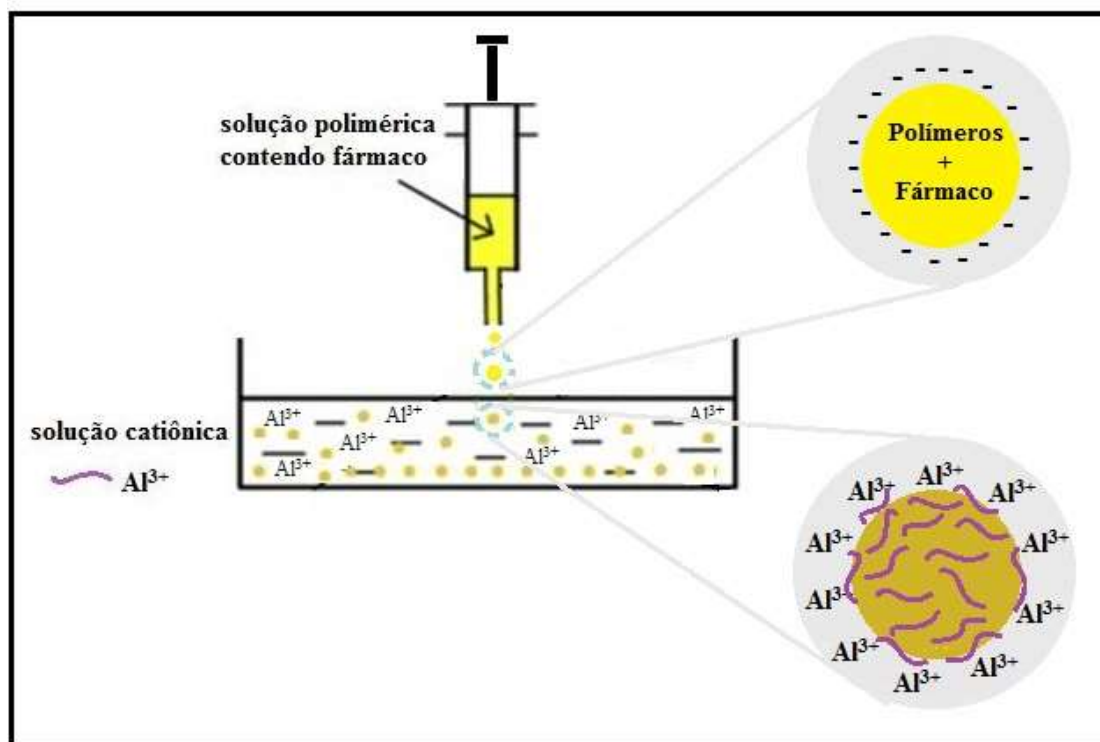
A geleificação ionotrópica baseia-se na capacidade de polieletrólitos serem reticulados na presença de íons para formar hidrogéis.

Uma das vantagens da geleificação ionotrópica é a possibilidade de obter micropartículas em condições amenas, evitando o uso de solventes orgânicos ou temperaturas elevadas, o que permite a encapsulação de diversos materiais como células, enzimas (YEO; BAEK; PARK, 2001), proteínas (MA; LIU, 2010) e outros fármacos.

Os polissacarídeos naturais têm sido amplamente utilizados na obtenção de micropartículas pelo método de geleificação ionotrópica, pois estes materiais apresentam uma boa propriedade de revestimento sobre o núcleo do fármaco, a qual pode atuar como controladora da taxa de liberação, além de apresentarem ânions na sua estrutura química, que permitem a ligação com os cátions polivalentes dos agentes reticulantes e induzem a gelificação através de ligações iônicas (PATIL et al., 2010; PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012).

Essa reticulação baseia-se na interação entre os ânions dos polieletrólitos e os íons de cargas contrárias do agente reticulante. As micropartículas são obtidas pela extrusão da dispersão polimérica, contendo o fármaco, com auxílio de seringa e agulha, que ocorre gota a gota seguida pelo enrijecimento do material quando este entra em contato com a solução reticulante (SILVA et al., 2003; YEO; BAEK; PARK, 2001). Nesse processo, os cátions se difundem através das gotas poliméricas e ocorre a formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares, dando origem a redes tridimensionais hidrofílicas capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos, denominadas hidrogéis (PATIL et al., 2010).

A Figura 5 apresenta um esquema do método de obtenção de micropartículas através da geleificação ionotrópica, evidenciando a reticulação dos polímeros aniônicos com os cátions do agente reticulante.

**Figura 5:** Representação esquemática da geleificação ionotrópica.

Fonte: adaptado de MA; LIU, 2010.

A reticulação iônica (RI) promove, através de ligações reversíveis, a formação dos chamados hidrogéis físicos, enquanto os hidrogéis químicos são formados por ligações covalentes que podem ser irreversíveis. Assim, as propriedades dos hidrogéis dependem da natureza dos agentes reticulantes, bem como suas concentrações, já que quanto maior a concentração do reticulante maior deve ser a densidade de reticulação (BERGER et al., 2004).

A dupla reticulação (DR), iônica e covalente, é considerada uma estratégia racional que vem sendo explorada (HOU; DI VONA; KNAUTH, 2012) para adequar as propriedades mecânicas dos sistemas de acordo com usos específicos, além de permitir um controle mais efetivo das taxas de liberação do fármaco (KULKARNI et al., 2011).

Dentre os diversos reagentes já utilizados para a reticulação covalente de polímeros, está o glutaraldeído ou 1,5-pentanodial ( $\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COH}$ ) (Figura 6), que foi utilizado pela primeira vez em 1960 na fixação de tecidos, desde então tem sido utilizado para muitas outras aplicações.

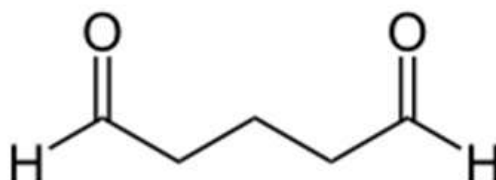
Beppu e colaboradores (2007) verificaram que a reticulação de filmes de quitosana com glutaraldeído alterava suas propriedades mecânicas e produzia estruturas de característica mais hidrofóbica. Biggi e colaboradores (2001) também demonstraram a eficiência do glutaraldeído em promover mudanças nas propriedades físico-químicas de filmes de gelatina, e Phromsopha e Baimark (2014) demonstraram que micropartículas de amido/gelatina



duplamente reticuladas utilizando glutaraldeído controlavam de maneira eficiente a liberação do fármaco.

Além disso, existem vários outros estudos de sistemas desenvolvidos a partir da DR como filmes de gelatina e álcool polivinílico (ALVES et al., 2011), nanopartículas de quitosana/gelatina (JĀTARIU et al., 2012), filmes de hidrogéis de carboximetilcelulose e quitosana para liberação tópica (BAO et al., 2014), partículas de quitosana/gelatina para aplicação oftálmica (PEPTU et al., 2010), hidrogéis de gelatina/quitosana para veiculação de fármacos para diversas aplicações biomédicas (JĀTARIU et al., 2011), micropartículas de goma arábica e gelatina (CĒLIS, 2009), micropartículas de gelatina/albumina (KULKARNI et al., 2011), hidrogéis de goma guar reticulados (DAS; WADHWA; SRIVASTAVA, 2006; GEORGE; ABRAHAM, 2007), filmes de gelatina (ALVES et al., 2011; BIGI et al., 2001), sistemas contendo quitosana (BEPPU et al., 2007; BERGER et al., 2004; MONTEIRO JR; AIROLDI, 1999) e microesferas de goma guar (CHOURASIA et al., 2006; SOPPIMATH; KULKARNI; AMINABHAVI, 2000).

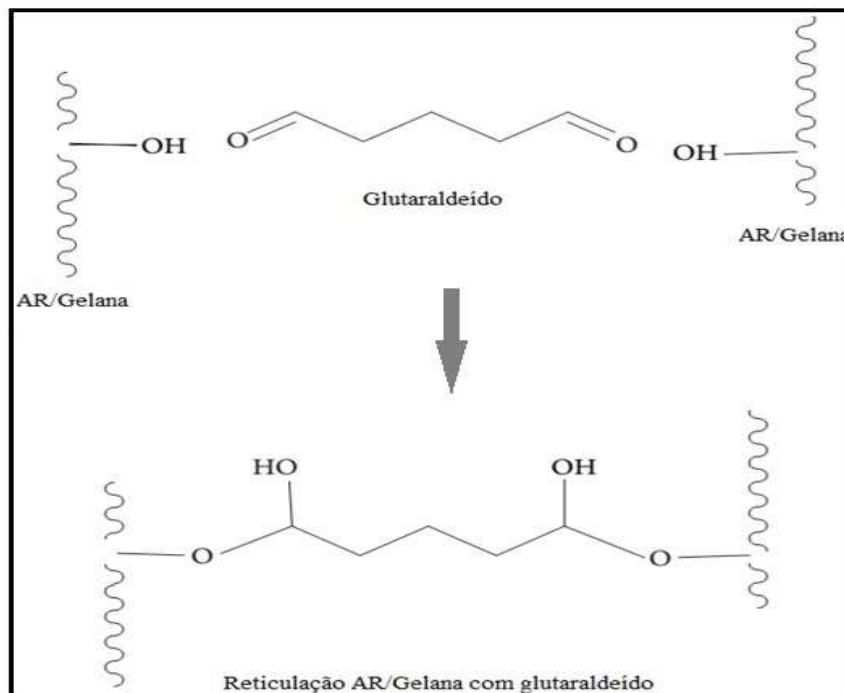
**Figura 6:** Fórmula estrutural do glutaraldeído



Fonte: adaptado de PHROMSOPHA; BAIMARK, 2014

A Figura 7 apresenta uma representação esquemática da ligação covalente entre os grupos hidroxila de polissacarídeos aniônicos e os grupos aldeído de glutaraldeído (PHROMSOPHA; BAIMARK, 2014).

**Figura 7:** Representação esquemática da formação da ligação covalente entre as cadeias de amido retrogradado (AR), gelana e glutaraldeído.



Fonte: adaptado de PHOMSOPHA; BAIMARK, 2014.

Neste trabalho, a DR foi explorada para modificar as propriedades dos hidrogéis e das micropartículas, com objetivo de obter sistemas com maior capacidade de incorporação do fármaco e o mais efetivo controle das taxas de liberação.

## 2.7 Polissacarídeos

A utilização de polissacarídeos naturais tem atraído muito a atenção de pesquisadores e da indústria farmacêutica, principalmente para o desenvolvimento de SLC de fármacos, devido às diversas vantagens que estes materiais apresentam em relação aos sintéticos, como serem obtidos através de fontes ou recursos renováveis em abundância, atóxicos, de baixo custo e aprovados para o consumo humano (ALVAREZ-LORENZO, 2013; KULKARNI et al., 2011; SINHA; KUMRIA, 2001).

A degradação cólon-específica de alguns polímeros hidrofílicos naturais baseia-se no fato de que as enzimas presentes no cólon são capazes de reconhecer esses diferentes substratos e degradá-los (SHUKLA; TIWARI, 2012).

Entretanto, uma desvantagem da utilização dos polissacarídeos é a elevada solubilidade em água, sendo, portanto, necessária à modificação da solubilidade, porém

mantendo a biodegradabilidade (SINHA; KUMRIA, 2001). Polímero biodegradável é aquele que sofre degradação, *in vivo*, através de hidrólise ou ação enzimática, e dá origem a produtos não tóxicos, biocompatíveis com o tecido biológico e capazes de serem metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas (COIMBRA, 2010).

Atualmente, a associação de dois ou mais materiais poliméricos tem permitido grandes avanços na obtenção de sistemas de liberação sítio-específica (SUKLA; TIWARI, 2012). Neste sentido, o uso de misturas de polímeros representa uma abordagem racional para se obter materiais com propriedades biofarmacêuticas adequadas que os habilitem a serem utilizados com propósitos terapêuticos específicos, evitando os elevados custos envolvidos na síntese e caracterização de novos materiais (CARBINATTO et al., 2012; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014; PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014).

Os polímeros hidrofílicos utilizados neste trabalho foram a goma gelana e o amido retrogradado (AR). A gelana, sob aquecimento, apresenta-se em estado desordenado (cadeias simples e enoveladas) e, sob resfriamento, se ordena na forma de duplas hélices. Quando submetida à reticulação ocorre formação de agregados devido à disposição dos cátions entre as duplas hélices (NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; YAMAMOTO, 2006).

O amido, durante o processo de retrogradação sofre a reassociação das cadeias poliméricas dando origem a uma estrutura mais forte e cristalina, também formada por duplas hélices (HARALAMPU, 2000). Dessa forma, acredita-se que a associação desses polímeros e a utilização da reticulação sejam capazes de promover a formação de estrutura mais fortes e organizadas.

### 2.7.1 Amido

O amido é considerado a principal fonte de carboidratos na dieta humana, um polissacarídeo encontrado em abundância nos grãos de cereais, incluindo arroz, trigo, milho, cevada, bem como nos tubérculos. É de grande aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica, pois é capaz de promover textura em alimentos, atuar como espessante, estabilizante de coloides, agente geleificante, adesivo, dentre outras aplicações (DENARDIN; SILVA, 2009; DONA et al., 2010; KULKARNI et al., 2011; PARAGINSKI et al., 2014; SINGH et al., 2003).

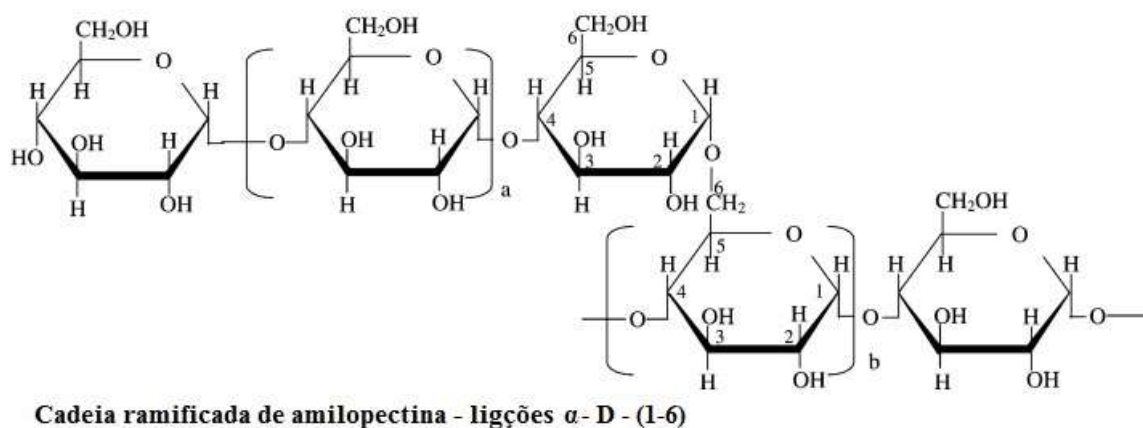
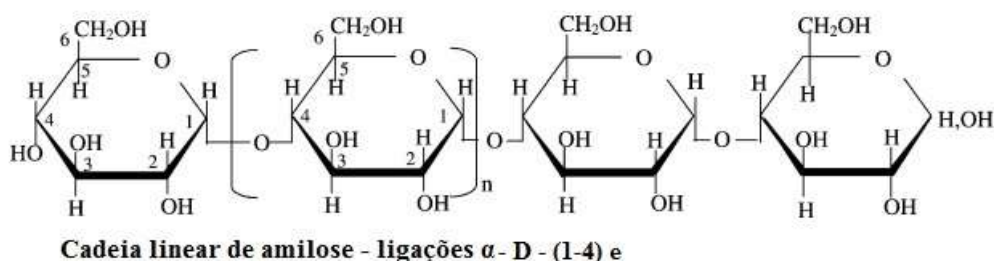
Existe uma variedade de tipos de amido que diferem em conteúdos de amilose, amilopectina, proteínas e lipídios de acordo com a fonte obtida, e que apresentam diferentes

formas e tamanhos (esferas, polígonos, plaquetas, túbulos irregulares) (HARALAMPU, 2000) com dimensões que variam de 0,1 a 200  $\mu\text{m}$  (BEMILLER; WHISTLER, 2009; BEMILLER, 2011).

Em relação à estrutura (Figura 8), o amido nativo é classificado como homopolissacarídeo semicristalino constituído por amilose e amilopectina, ligados através de ligações glicosídicas  $\alpha\text{-D-(1-4)}$  e/ou  $\alpha\text{-D-(1-6)}$ , respectivamente. As regiões amorfas são constituídas principalmente de amilose e parte considerável de amilopectina, e as regiões cristalinas principalmente de amilopectina.

A amilose é um polímero essencialmente de cadeia linear, com baixo grau de ramificação, composta por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha\text{-D-(1-4)}$ , possuem peso molecular de aproximadamente 105-106 g/mol e grau de polimerização de 6000. A amilopectina é constituída de ligações glicosídicas  $\alpha\text{-D-(1,4)}$  e  $\alpha\text{-D-(1,6)}$ , altamente ramificada, com peso molecular de 107-109 g/mol e elevado grau de polimerização (2 milhões) (FREIRE et al., 2009; HARALAMPU, 2000; RODRIGUES; EMEJE, 2012).

**Figura 8:** Estrutura de amilose e amilopectina.



Fonte: adaptado de TESTER; KARKALAS; QI, 2004

O amido nativo, muitas vezes, não apresenta propriedades físicas e químicas adequadas para aplicações específicas e, por isso, pode ser modificado por processos físicos ou químicos (ZAVAREZE; DIAS, 2011), que o torne mais resistentes à degradação enzimática.

#### 2.7.1.1 Amido Resistente

O amido resistente é definido como a fração do amido que escapa da digestão no ID sendo seletivamente degradado pelas bactérias colônicas (HARALAMPU, 2000; HTOON et al., 2010). Além disso, o amido resistente à semelhança das fibras alimentares tem efeitos prébióticos na microflora do cólon alterando o metabolismo lipídico, melhorando o metabolismo de colesterol e reduzindo o risco de colite ulcerativa e câncer de cólon (SHAMAI; BIANCO-PELED; SHIMONI, 2003).

De acordo com a sua natureza, o amido resistente pode ser dividido em quatro categorias: tipo 1 - fisicamente inacessível à digestão devido ao seu aprisionamento em uma matriz não digerível; tipo 2 - amido granular nativo, exibe lenta digestibilidade e é mais resistente a ação das enzimas; tipo 3 - amido retrogradado e tipo 4 - amido quimicamente modificado. O amido resistente tipo 3 é preferencialmente utilizado na obtenção de sistemas de liberação cólon-específica devido à sua estabilidade térmica e baixa solubilidade (CHUNG; LIM; LIM, 2006; HARALAMPU, 2000; THOMPSON, 2000).

A alta amilose (AA) é considerada um material promissor para a obtenção de produtos com elevado teor de amido resistente, após o tratamento hidrotérmico, no processo de retrogradação (DIMANTOV et al., 2003; HTOON et al., 2009; SHAMAI; BIANCO-PELED; SHIMONI, 2003 ).

Na retrogradação, após a gelatinização do amido, os grânulos são rompidos e a amilose é lixiviada do grânulo como estruturas enoveladas. Após o resfriamento e armazenamento, as moléculas começam a se reassociar e ocorre a recristalização lenta e contínua através de interações como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (DONA et al., 2010; HARALAMPU, 2000; LIU et al., 2007; ZHANG et al., 2011).

Durante o processo de retrogradação, recristalização pode ser dividida em três fases: a nucleação quando há a formação dos núcleos críticos dos cristais; a propagação, em que há o crescimento dos cristais dos núcleos formados e a maturação, caracterizada pelo aumento lento e contínuo do grau de cristalização. Esse grau de cristalização depende principalmente

da nucleação e da taxa de propagação. A temperatura próxima da  $T_g$  (Temperatura de transição vítrea) (aproximadamente 6 °C) favorece a nucleação, e uma temperatura mais elevada (entre 30-40 °C) favorece propagação. Dessa forma, quando a temperatura, durante o armazenamento de amido gelatinizado, for alternada entre a temperatura de nucleação e a temperatura para propagação, a velocidade da retrogradação é acelerada e ocorre a formação de cristalitos perfeitos (PARK, BAIK, LIM, 2009; SILVERIO et al., 2000; ZHOU; DI VONA; KNAUTH, 2010). Portanto, o tempo de armazenamento e a temperatura, bem como a concentração inicial do amido podem afetar o grau de retrogradação do amido e as propriedades dos cristalitos formados (ZHOU; DI VONA; KNAUTH, 2010).

Em relação à cristalinidade do amido, diferentes estruturas cristalinas podem ser observadas e são denominadas como estruturas do tipo A, B, C e V. Os padrões A e B são constituídos de estruturas cristalinas em duplas hélices, sendo que no tipo A essa estrutura é formada pela amilopectina com cadeias laterais curtas, densa ramificação, empacotamento compacto das duplas hélices e baixo teor de água. A estrutura cristalina do tipo B é formada por cadeias laterais de amilopectina com comprimentos mais longos, ou seja, apresentam uma estrutura menos densa, menos empacotada e maior teor de água. O amido tipo C é uma mistura das estruturas cristalinas de tipo A e B (CAI et al., 2014). O padrão tipo V ocorre em amidos de cereais contendo lipídeos, apresenta regiões de elevada cristalinidade (KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000).

### 2.7.2 Goma Gelana

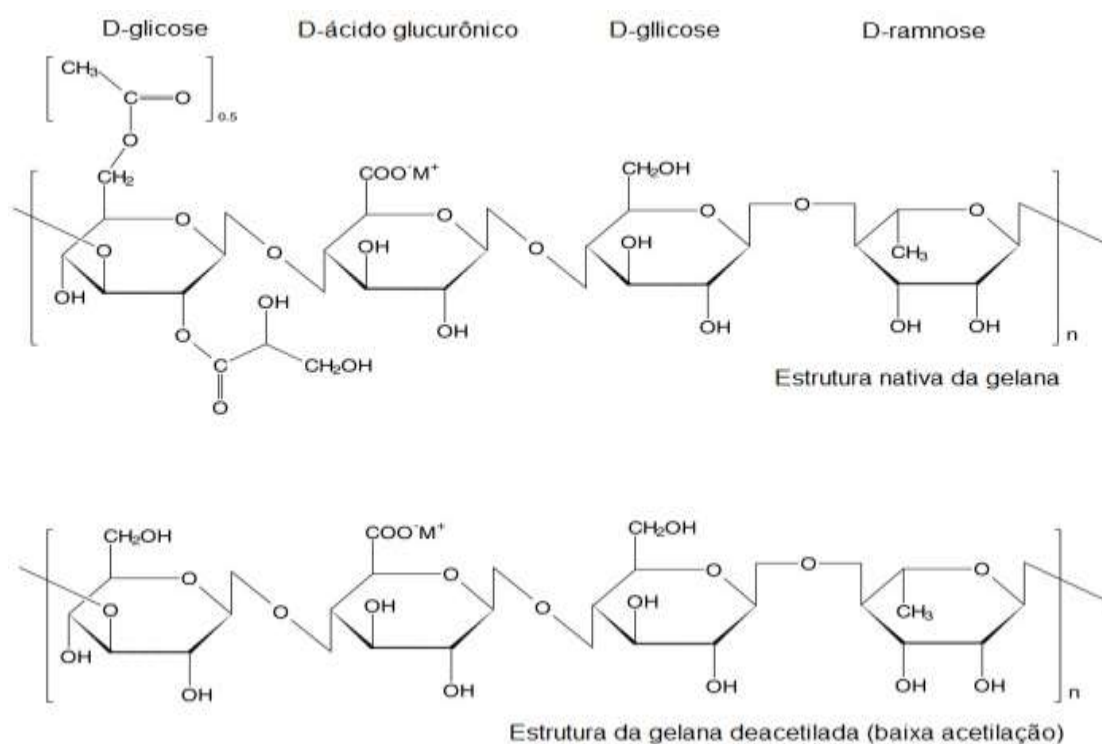
Desenvolvida pela empresa Kelco em 1978, a gelana é um polissacarídeo produzido pela bactéria *Sphingomonas elodea* (MORRIS; NISHINARI; RINAUDO, 2012; PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012). Aprovada para uso alimentar em 1988 no Japão, a gelana despertou o interesse de empresas e pesquisadores japoneses, pertencentes a um grupo de pesquisa filiado a *Society of Polymer Science* no Japão, que se reuniram para a formação de um grupo de pesquisa cujos estudos eram direcionados especificamente a conformação estrutural, processos de gelificação e aplicações industriais da gelana (MORRIS; NISHINARI; RINAUDO, 2012).

Desde então, o interesse na utilização de gelana é crescente não só na indústria de alimentos como na farmacêutica, sendo utilizada em vários produtos farmacêuticos, já que possui propriedades geleificantes específicas em diferentes meios, o que permite o

desenvolvimento de diversos SLC (OSMALEK; FROELICH; SYLWIA, 2014). A gelana é um polissacarídeo multifuncional de origem natural que apresenta a biodegradabilidade, atoxicidade, rápida gelificação na presença de cátions, alta capacidade de retenção de água e importantes propriedades mucoadesivas. Essas características tornam a gelana um material bastante promissor com uma ampla aplicabilidade em sistemas de administração oftálmica, nasal e principalmente oral (OSMALEK; FROELICH; SYLWIA, 2014).

A gelana é um exopolissacarídeo de cadeia linear que apresenta unidades repetidas de  $\alpha$ -L-ramnose,  $\beta$ -D-glicose e  $\beta$ -D-ácido glucurônico (ALVAREZ-LORENZO et al., 2013) nas proporções 1:2:1. Na forma nativa, a gelana contém dois tipos de substituintes acila: L-gliceril na posição 6 e L-acetil na posição 2 (Figura 9) que podem ser removidos por hidrólise alcalina para gerar a gelana desacetilada (ou de baixa acetilação) e a de alta acetilação (KIRCHMAJER et al., 2014; OSMALEK; FROELICH; SYLWIA, 2014, PRAJAPATI et al., 2013).

**Figura 9:** Estrutura da gelana nativa e desacetilada.



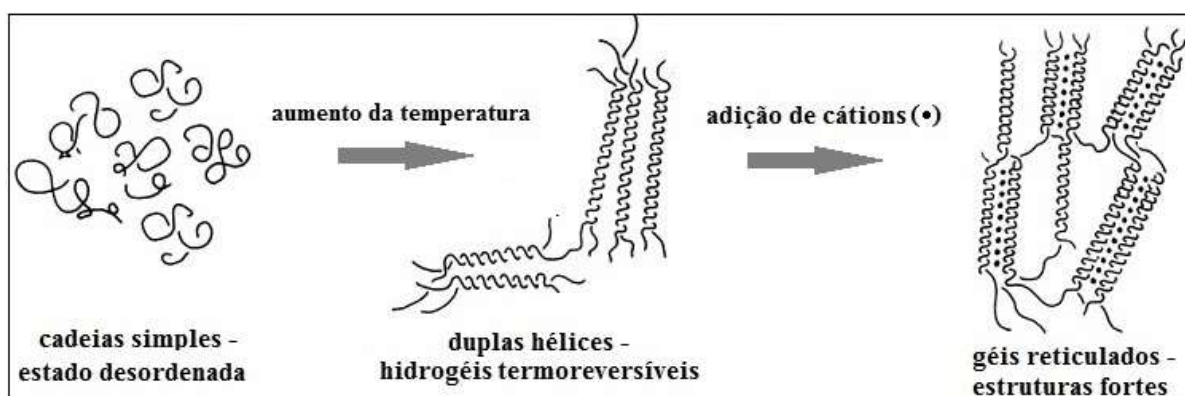
Fonte: adaptado de MAO; TANG; SWANSON, 2000.

Tanto a gelana nativa como a de baixa acetilação são capazes de formar hidrogéis na presença de cátions mono, di ou trivalentes, sendo o processo de formação do gel dependente da temperatura. A gelana nativa origina géis menos viscosos, facilmente deformáveis, já a gelana desacetilada forma estruturas rígidas e géis mais frágeis ou quebradiços (OSMALEK;

FROELICH; SYLWIA, 2014). Além disso, a gelana desacetilada apresenta baixa cristalinidade sendo considerada um material tipicamente amorfo (AHUJA; SINGH; KUMAR, 2013; YANG et al., 2013) e que após a adição de cátions, durante a geleificação, se organiza em zonas de junções cristalinas, ou seja, em estruturas mais permanentes (CHANDRASEKARAN et al., 1998).

A formação de géis de gelana ocorre sob elevadas temperaturas na presença de cadeias simples e enoveladas que estão em estado desordenado (Figura 10). Entretanto, ao serem resfriadas essas cadeias sofrem uma transição conformacional ordenando-se em duplas hélices que se agregam formando zonas de junção, dando origem a hidrogéis termorreversíveis. Além disso, ao se complexarem com cátions em solução através de ligações de hidrogênio são capazes de formar uma rede de gel tridimensional (Figura 10) (KIRCHMAJER et al., 2014; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010; PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012).

**Figura 10:** Representação esquemática do mecanismo de formação do gel de gelana.



Fonte: adaptado de adaptado de MIYOSHI et al., 1995.

Essa crescente utilização da gelana pode ser exemplificada pelos diversos sistemas de liberação de fármacos, por exemplo, microesferas contendo metformina para tratamento de diabetes (AHUJA; SINGH; KUMAR, 2013), microesferas de cefalexina (AGNIHOTRI; JAWALKAR; AMINABHAVI, 2006), microesferas de amoxicilina (BABU et al., 2010; NARKAR, 2010), microcápsulas de complexo diltiazem-resina para tratamento da hipertensão (KULKARNI et al., 2011), microesferas de glipizida reticuladas com glutaraldeído para tratamento de diabetes mellitus (tipo 2) (MAITI et al., 2011) e esferas flutuantes utilizadas no tratamento de *H. pylori* (RAJINIKANTH; MISHRA, 2007).

Em nosso grupo de pesquisa, Prezotti (2013) desenvolveu microesferas de gelana/pectina através da geleificação ionotrópica, e verificou um efetivo controle das taxas



de liberação do cetoprofeno em meio ácido e entérico, caracterizando um sistema novo e bastante promissor para a liberação controlada de fármacos.

Misturas de polissacarídeos/polímeros, bem como a associação desses materiais modificados representam estratégias promissoras para a obtenção de sistemas inovadores para controlar a liberação de fármacos (BAJPAI et al., 2008), que vem sendo exploradas por nosso grupo de pesquisa.

Os estudos iniciaram com a avaliação da influência do grau de reticulação nas propriedades físico-químicas e de liberação de sistemas não compactados da AA modificada através da reticulação com trimetafosfato de sódio e o efetivo controle das taxas de liberação do fármaco foi alcançado (CURY et al., 2008; CURY et al., 2009 a,b).

Estudo análogo foi realizado com misturas de AA e pectina submetidas ao mesmo processo de reticulação, e os dados de caracterização físico-química também evidenciaram importantes modificações estruturais e aumento dos índices de intumescimento dessas amostras, bem como a redução das taxas de liberação em meio ácido (CARBINATTO et al., 2012; CARBINATTO, 2014). A incorporação do fármaco por imersão a essas matrizes permitiu reduzidos percentuais de liberação em meio ácido (<10%) (SOARES et al., 2013, SOARES, 2011).

As propriedades de filmes livres de amido resistente, obtido por processo de retrogradação em ciclos alternados de temperatura, foram avaliadas em recente estudo e as propriedades de intumescimento, degradação enzimática e mucoadesão exibiram comportamento semelhante aos filmes reticulados. Além disso, esses filmes apresentaram reduzida permeabilidade ao fármaco em meio ácido (MENEGUIN, 2012; MENEGUIN; CURY; EVANGELISTA, 2014).

Comprimidos matriciais hidrofílicos de amido retrogradado e pectina também permitiram diferentes graus de controle das taxas de liberação, comprovando a aplicabilidade desses materiais na obtenção de SLC de fármacos (RECIFE, 2013).

Dessa forma, os resultados de pesquisa alcançados pelo grupo tem mostrado que a associação e modificação de polissacarídeos naturais pode ser uma estratégia bastante promissora para tecnologia de sistemas de liberação cólon específica.

A aplicação de novas estratégias físico-químicas, como a reticulação iônica e iônica/covalente, bem como a combinação de diferentes materiais poliméricos, como AR e gelana, para obtenção de hidrogéis e consequentemente utilizá-los no delineamento de sistemas multiparticulados, foram objetos deste estudo cujo objetivo foi obter sistemas

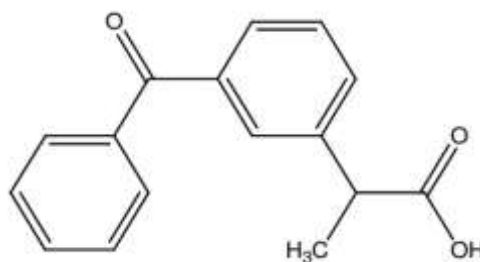
capazes de modular as taxas de liberação do fármaco ao longo do TGI. A figura 11 mostra uma representação esquemática da estrutura desses sistemas.

## 2.8 Cetoprofeno

O cetoprofeno (CP) (ácido 3-benzoil-2-metilbenzenoacético) apresenta fórmula química  $C_{16}H_{14}O_3$  (Figura 12), e trata-se de um ácido fraco, pois apresenta um pKa de aproximadamente 4,45 na temperatura de 25 °C. Pertencente à classe II dos Sistemas de Classificação Biofarmacêutica (BCS), e é caracterizado por ser praticamente insolúvel em água, livremente solúvel em éter, acetona, etil acetato, clorofórmio e em etanol e cloreto de metileno, além de apresentar elevada permeabilidade (SHOHIN et al., 2011; THE MERCK INDEX, 2006). Apresenta-se sob a forma de um pó cristalino, branco ou quase branco, com peso molecular de 254,28 g/mol e faixa de fusão de 94-97 °C (MARTINDALE, 2011; THE MERCK INDEX, 2006).

O CP é rapidamente absorvido no TGI, atinge o pico de concentração plasmática entre 0,5 e 2 horas após a administração via oral, possui meia vida curta (1,5 - 4 horas) e alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas (99%). É metabolizado principalmente pela conjugação com ácido glucurônico e excretado por filtração glomerular e por secreção tubular, além de ser capaz de se acumular nos locais da inflamação, em que o pH é mais baixo (GILMAN; GOODMAN; BRUNTON, 2012; MARTINDALE, 2011).

Esse anti-inflamatório não esteroide (AINE), é derivado do ácido propiônico, possui atividade antiálgica, anti-inflamatória e antipirética e seu mecanismo de ação ocorre através da inibição da síntese de prostaglandinas, além de possuir atividade inibitória plaquetária. Utilizado no tratamento de doenças reumáticas, artrite reumatoide crônica e na dor leve e moderada (TOPALOĞLU; GÜLGÜN; ÜMIT, 1999), o CP pode provoca efeitos colaterais gastrointestinais leves em cerca de 30% dos pacientes (GILMAN; GOODMAN; BRUNTON, 2012).

**Figura 11:** Estrutura do cetoprofeno

Fonte: USP 30, 2007.

A solubilidade do CP aumenta gradativamente com o aumento do pH. É um fármaco que possui baixa solubilidade em água, sendo solúvel em éter, etanol, acetona, clorofórmio, dimetilformamida e acetato de etila (BUDAVARI *et al.*, 1996). Segundo o sistema de classificação biofarmacêutica, é considerado um fármaco de classe II, devido a sua baixa solubilidade em água e elevada permeabilidade (SHOHIN *et al.*, 2011).

A baixa solubilidade do cetoprofeno e sua conhecida gastrotoxicidade são fatores limitantes para a sua absorção e biodisponibilidade (MAESTRELI *et al.*, 2008). Dessa forma, para minimizar essas desvantagens, SLC podem ser desenvolvidos com a finalidade de diminuição na frequência das doses e redução dos efeitos adversos gastrointestinais, como por exemplo, microesferas (ARIDA; AL-TABAKHA, 2007; PREZOTTI, 2013) ou microcápsulas (PALMIERI *et al.*, 2002;), ciclodextrinas (MAESTRELLI *et al.*, 2008), hidrogéis de liberação cólon-específica (ALI; ALARIFI, 2009), micropartículas de liberação sustentada (YAMADA; ONISHI, MACHIDA, 2001).

### **3 OBJETIVO**

Obter e caracterizar hidrogéis poliméricos de amido resistente e goma gelana reticuladas ionicamemente e ionicamemente/covalentemente e suas respectivas micropartículas, e avaliar o seu desempenho como sistemas de liberação controlada de fármacos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1. Principais matérias-primas e reagentes

- Ácido clorídrico (Quimis);
- Água purificada (Milli Q);
- Alta amilose (HYLON VII<sup>®</sup> – National Starch);
- Cetoprofeno (Henrifarma);
- Cloreto de alumínio (Vetec);
- Cloreto de sódio (NaCl) (Synth<sup>®</sup>);
- DNS - 3,5-ácido dinitrosalicílico (Sigma);
- Fosfato de potássio monobásico (Vetec);
- Fosfato de sódio tribásico 12H<sub>2</sub>O (Henrifarma);
- Glutaraldeído (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Goma gelana (Kelcogel<sup>®</sup> CG-LA - CP Kelco);
- Hidróxido de sódio (Grupo Química);
- Laurilsulfato de sódio (Vetec).
- Pancreatina (Vetec);
- Sílica gel (Merck);

#### 4.1.2. Principais Equipamentos

- Agitador magnético (Fisatom<sup>®</sup>);
- Agitador mecânico (Fabbe<sup>®</sup>);
- Analisador de textura TA.XT *plus*<sup>®</sup> (Stable Micro Systems, UK);
- Analisador de umidade por infravermelho (IV2000-GEHAKA);
- Analisador termogravimétrico, SDT Q600 (TA Instruments);
- Balança analítica (Owa labor);
- Bomba a vácuo (TE- 058 Tecnal);

- Calorímetro exploratório diferencial DSC 1 Star System (Mettler Toledo);
- Centrífuga (Sorvall TC);
- Difratorômetro de raios X, modelo D5000 (Siemens<sup>®</sup>);
- Dissolutor (Hanson Station SR8- PLUS);
- Espectrofotômetro UV-Visível (Hewlett Packard-Kayak XA);
- Estufa com circulação forçada de ar (Fabbe);
- Homogeneizador ultra-turrax (IKA);
- Microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7500F);
- Microscópio-estereoscópio com dispositivo de captura e análise de imagens (Leica MZAPO);
- Peagômetro (Micronal<sup>®</sup>);
- Porosímetro ASAP 2010 (Micrometrics<sup>®</sup>);
- Reômetro *Rotational Rheometer AR2000ex*.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Retrogradação do amido

Seguindo o método proposto por Park, Baik e Lim (2009) para retrogradação do amido, dispersões aquosas de AA (5 e 10%) foram obtidas a partir da dispersão do polissacarídeo em água purificada previamente aquecida a 80 °C, sob agitação mecânica por 30 minutos. Em seguida, essas dispersões foram submetidas à autoclavação (121 °C; 15 min) para pré-gelatinização do amido e resfriadas naturalmente em temperatura ambiente. Para a retrogradação, a AA gelatinizada foi submetida a dois diferentes métodos: **Método 1 (M1)** - resfriamento isotérmico (4 °C) durante 8 dias consecutivos e foram denominados AR-M1. **Método 2 (M2)** - ciclos alternados de temperatura (4/30 °C, 2 dias em cada temperatura) por 16 dias, denominado de AR-M2.

### 4.2.2 Obtenção dos hidrogéis poliméricos

#### 4.2.2.1 Preparo das dispersões de goma gelana/amido retrogradado

Foram preparadas dispersões aquosas de goma gelana (1 ou 2%) em água purificada a 80 °C, sob agitação mecânica durante 20 minutos. O AR (5 ou 10%), obtido de acordo com o item 4.2.1 foi mantido sob agitação mecânica (20 minutos), em temperatura ambiente, para completa homogeneização. Em seguida, a dispersão de AR foi misturada às dispersões de gelana (1:1 v/v), sob agitação mecânica, por mais 20 minutos adicionais, em temperatura de 60 °C.

#### 4.2.2.2 Preparo dos hidrogéis reticulados ionicamente

As dispersões obtidas de acordo com item 4.2.2.1 foram adicionadas de solução de cloreto de alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) (3 ou 5% da massa de polímeros secos) e mantidos sob agitação mecânica por 20 minutos, em temperatura ambiente (Figura 13).

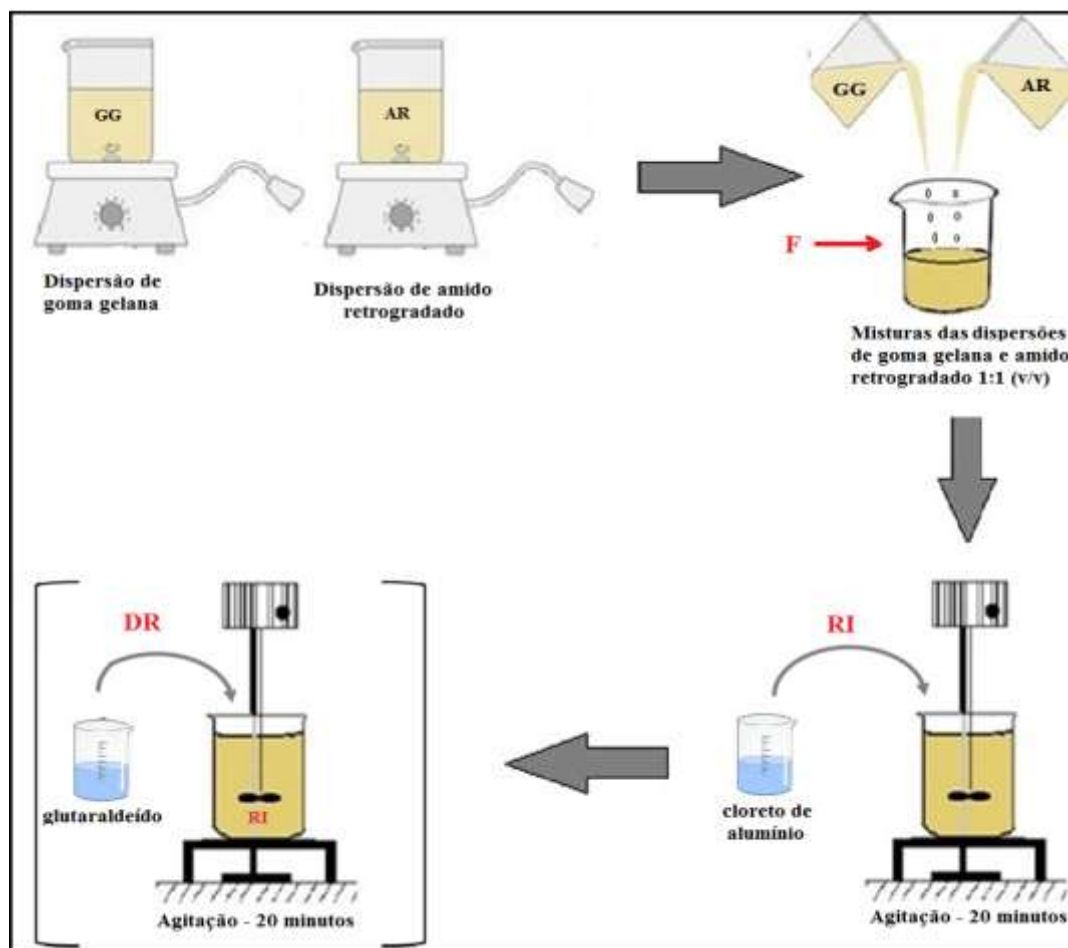
#### 4.2.2.3 Preparo dos hidrogéis duplamente reticulados

Os hidrogéis reticulados ionicamente (RI) (item 4.2.2.2) foram adicionados de solução de glutaraldeído (1, 3 ou 5% da massa total de polímeros secos) e mantidas sob agitação mecânica por 20 minutos adicionais, em temperatura ambiente (Figura 13).

#### 4.2.2.4 Preparo dos hidrogéis de goma gelana

Para uma análise comparativa dos resultados da análise de perfil de textura *Texture Profile Analysis* (TPA) das amostras reticuladas, hidrogéis de gelana reticulados ionicamente (HG-RI) e duplamente reticulados (HG-DR) foram obtidos através do preparo de dispersões aquosas de goma gelana (1 ou 2%) em água purificada a 80 °C, sob agitação mecânica durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionadas as soluções dos agentes reticulantes seguindo mesmo procedimento descrito nos itens 4.2.2.2 e 4.2.2.3, para RI e DR, respectivamente.

**Figura 12:** Representação esquemática da obtenção dos hidrogéis de gelana e amido retrogradado pelos métodos 1 e 2 (AR-M1 e AR-M2) reticulados ionicamente e duplamente reticulados.



Fonte: autoria própria

Os hidrogéis reticulados foram denominados conforme a concentração dos polímeros (gelana e AR) e agentes reticulantes ( $\text{Al}^{3+}$  e glutaraldeído). Foram adicionados o prefixo H (hidrogéis) e os sufixos RI e DR para reticulação iônica e dupla reticulação (iônica/covalente), respectivamente. A composição e denominações das misturas e dos hidrogéis estão apresentados na Tabela 3.



**Quadro 3:** Denominação e composição dos hidrogéis de gelana e AR-M1 ou AR-M2 reticulados ionicamente e duplamente reticulados.

Grupo	Concentração Gelana (%)	Concentração AR (%)	Concentração		Nomenclatura
			Al <sup>3+</sup>	Glu	
HG-RI	1	-	3	-	HG13-RI
		-	5	-	HG15-RI
	2	-	3	-	HG23-RI
		-	5	-	HG25-RI
HG-DR	1	-	3	1	HG131-DR
		-		3	HG133-DR
		-		5	HG135-DR
		-	5	1	HG151-DR
		-		3	HG153-DR
		-		5	HG155-DR
	2	-	3	1	HG231-DR
		-		3	HG233-DR
		-		5	HG235-DR
		-	5	1	HG251-DR
		-		3	HG253-DR
		-		5	HG255-DR
RI	1	5	3	-	H153-RI
			5	-	H155-RI
		10	3	-	H1103-RI
			5	-	H1105-RI
	2	5	3	-	H253-RI
			5	-	H255-RI
		10	3	-	H2103-RI
			5	-	H2105-RI
DR	1	5	3	1	H1531-DR
				3	H1533-DR
				5	H1535-DR
			5	1	H1551-DR
				3	H1553-DR
				5	H1555-DR
		10	3	1	H11031-DR
				3	H11033-DR
				5	H11035-DR
			5	1	H11051-DR
				3	H11053-DR
				5	H11055-DR
	2	5	3	1	H2531-DR
				3	H2533-DR
				5	H2535-DR
			5	1	H2551-DR
				3	H2553-DR
				5	H2555-DR
		10	3	1	H21031-DR
				3	H21033-DR
				5	H21035-DR
			5	1	H21051-DR
				3	H21053-DR
				5	H21055-DR

### 4.2.3 Caracterização dos hidrogéis poliméricos

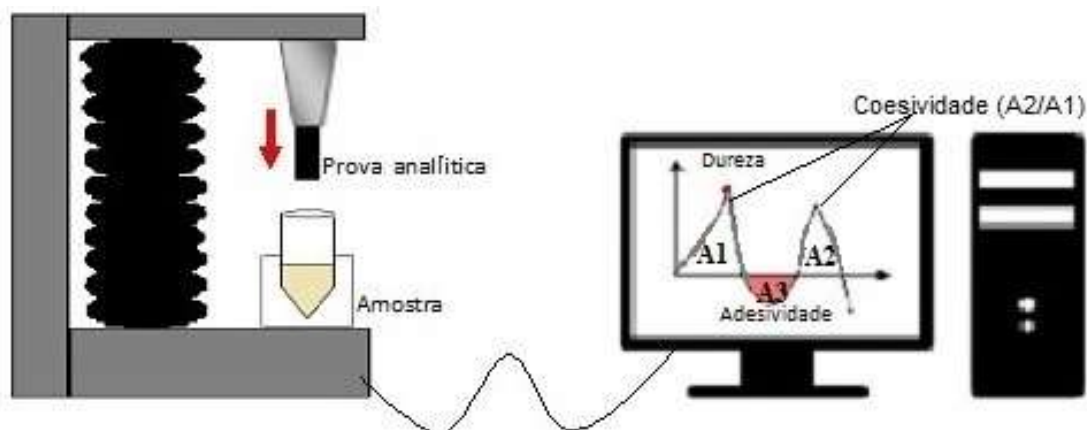
#### 4.2.3.1 Análise das propriedades mecânicas dos hidrogéis RI e DR.

OS hidrogéis obtidos de acordo com os itens 4.2.2.2 e 4.2.2.3 foram centrifugados (1500 rpm; 2 min) e, em seguida, mantidos em repouso durante 24 horas. As propriedades mecânicas foram determinadas em analisador de textura *TA-XT plus (Stable Micro Systems)*, operando no modo TPA (*Texture profile analysis*). As amostras foram comprimidas duas vezes pela prova analítica cilíndrica (10 mm), que penetrou a uma profundidade de 10 mm na amostra, em velocidade de  $0,5 \text{ mm/s}^{-1}$ , com um intervalo de 5 s entre as compressões.

A partir dos dados das curvas força *versus* tempo, geradas pelo software *Texture Exponent Lite* durante os dois ciclos de compressão da amostra, foram obtidos os valores de dureza, adesividade e coesividade (Figura 14).

As análises foram realizadas em quintuplicata.

**Figura 13:** Representação esquemática do teste TPA (*Texture Profile Analysis*).



Fonte: autoria própria

#### 4.2.3.2 Análise das propriedades reológicas das dispersões poliméricas

O comportamento viscoelástico das amostras (37 °C) foi avaliado através de ensaios oscilatórios dinâmicos, em reômetro AR2000EX Rotational Rheometer equipado com sensor de placas paralelas (40 mm; gap 100  $\mu\text{m}$ ), acoplado ao programa *Rheology Advantage Data Analysis* (versão V 5.7.1).

Foram analisados hidrogéis RI e DR selecionados com base nos resultados das propriedades mecânicas obtidos previamente na análise de perfil de textura (Tabela 1). A nomenclatura dos hidrogéis contendo fármaco foi estabelecida pela adição do sufixo CP (cetoprofeno) a cada denominação.

Para estabelecer uma análise comparativa com os hidrogéis estudados, dispersões não-reticuladas de gelana/AR (Quadro 4), preparadas conforme item 4.2.2.1, também foram submetidas aos testes reológicos. Estas dispersões foram denominadas pelas concentrações de polímeros e adicionadas do prefixo D (dispersões) e sufixo CP quando incorporado cetoprofeno.

**Quadro 4:** Denominação e composição das dispersões não reticulados submetidas à análise reológica.

Grupo	Concentração Gelana (%)	Concentração AR (%)	Nomenclatura	
			Sem fármaco	Com fármaco
D	1	5	D15	D15-CP
		10	D110	D110-CP
	2	5	D25	D25-CP
		10	D210	D210-CP

#### 4.2.3.2.1 Determinação da faixa de viscoelasticidade linear das dispersões

Foi realizada a varredura de tensão de 0 a 100 Pa com frequência fixa de 1 Hz, para determinação da faixa de viscoelasticidade linear e seleção da tensão a ser utilizada nas análises de varredura de frequência.

#### 4.2.3.2.2 Determinação dos espectros mecânicos dos hidrogéis

Os espectros mecânicos foram obtidos variando-se a frequência oscilatória na faixa de 0,6 a 623 rad s<sup>-1</sup>, sob tensão constante (5 Pa). Os parâmetros determinados foram G', G'' e η\* e antes da realização das medidas, as amostras foram mantidas em repouso sobre a placa do reômetro, durante um minuto.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.3.3 Análise de morfologia da estrutura interna dos hidrogéis

A estrutura interna dos hidrogéis foi analisada em microscopia eletrônica de varredura de campo ampliado de alta resolução (MEV-FEG) *JEOL JSM-7500F*. As dispersões foram preparadas conforme item 4.2.2.1, adicionados ou não de cetoprofeno e imediatamente congeladas com nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram liofilizadas, fragmentadas e fixadas em fita de carbono dupla face. As fotomicrografias foram obtidas em diferentes aumentos.

#### 4.2.3.4 Difração de raios-x

A identificação da estrutura cristalina e/ou amorfa do fármaco, do pó de gelana, das dispersões de AR liofilizadas (5 e 10%) (obtidos conforme item 4.2.1) e dos hidrogéis RI e DR, (preparados conforme os itens 4.2.2.2 e 4.2.2.3, respectivamente) liofilizados, foi realizada a partir dos difratogramas obtidos em difratômetro de raios-X Siemens, modelo D5000, com velocidade do goniômetro de  $0,05^\circ \text{ s}^{-1}$ , sob radiação de Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1,5406\text{\AA}$ ) e com varredura de raios X de ângulo aberto  $2\theta$  entre  $4^\circ$  e  $70^\circ$ .

As dispersões de AR e os hidrogéis RI e DR foram liofilizados durante 24 horas antes da realização do ensaio.

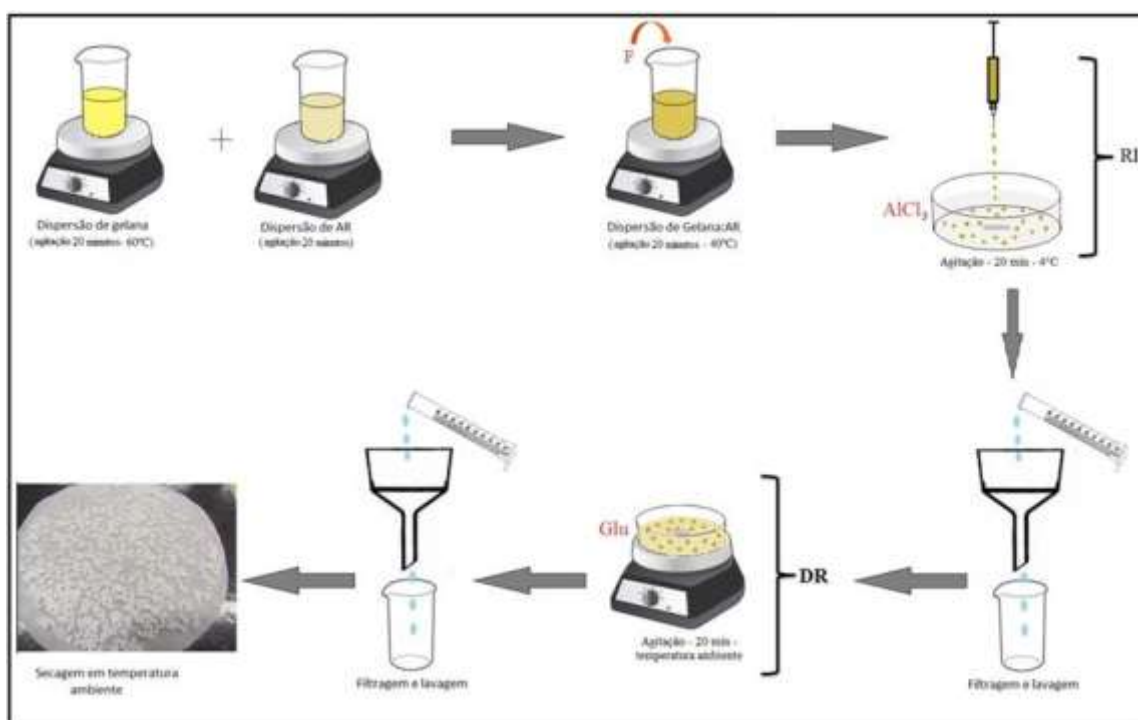
#### 4.2.4 Obtenção das micropartículas

Dispersões aquosas de gelana e AR, obtidas de acordo com o item 4.2.2.1 (proporção 1:1 v/v), foram adicionadas de 0,5% de fármaco (cetoprofeno) e mantidas, a  $60^\circ\text{C}$ , sob agitação magnética até a completa dispersão. As dispersões foram gotejadas manualmente, com auxílio de seringa e agulha nº 21 (25x8), sobre uma solução de cloreto de alumínio (3 e 5% m/v), previamente resfriada em banho de gelo ( $4^\circ\text{C}$ ). As micropartículas RI obtidas foram mantidas sob agitação por 20 minutos, para completa reação de reticulação, em seguida foram separadas por filtração, lavadas com água purificada (150 mL) e secas em temperatura ambiente por 48 horas. Ao final desse processo foram armazenadas em dessecador para redução do teor de umidade até atingir peso constante.

Para as amostras DR, as micropartículas RI foram adicionadas em solução de glutaraldeído (1, 3 e 5% v/v) e mantidas sob agitação magnética por mais 20 minutos adicionais, em temperatura ambiente. Em seguida, foram filtradas, lavadas com água purificada (500 mL) por 5 vezes e secas em temperatura ambiente, por tempo adequado (48 horas) até atingir peso constante.

O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção de micropartículas sem fármaco, utilizadas como controle. O método de obtenção está representado pela Figura 15:

**Figura 14:** Representação esquemática do processo de obtenção de micropartículas de goma gelana e amido através da geleificação ionotrópica e dupla reticulação.



Fonte: autoria própria

## 4.2.5 Caracterização das micropartículas

### 4.2.5.1 Análise de tamanho e forma das micropartículas

As análises de distribuição granulométrica e forma foram realizadas em estereoscópio Leica MZ APO<sup>TM</sup>, em aumento de 10 vezes. As micropartículas, previamente secas até peso constante, foram dispostas em placas de Petri e as imagens capturadas com auxílio do programa *Motic Images Advance 2.0*. Foram mensurados o diâmetro do círculo equivalente e a

circularidade de uma população de 100 micropartículas, a partir da digitalização das imagens em computador utilizando o programa analisador de imagem *Motic Images Advance 3.2*.

A média e o desvio padrão dos resultados obtidos foram calculados e para uma análise quantitativa da distribuição granulométrica das amostras. O índice de Span, o qual representa a polidispersidade da amostra, foi determinado a partir da Equação 1 (HOSSEINI et al., 2014), em que, os diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) foram determinados para os percentis 90, 10 e 50, respectivamente (ABASHZADEH et al., 2011; HOSSEINI et al., 2014).

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:  $D_{90}$ ,  $D_{10}$  e  $D_{50}$  são os diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) determinados para os percentis 90, 10 e 50, respectivamente (ABASHZADEH et al., 2011).

Análise estatística (ANOVA) das amostras foi realizada para verificar diferenças significativas entre elas.

#### 4.2.5.2 Teste de digestão enzimática dos micropartículas

A digestão enzimática *in vitro* das micropartículas e o teor de amido resistente foram determinados pelo método descrito por Englyst, Kingsman e Cummings (1992).

As micropartículas foram incubadas em tampão fosfato (0,1M, pH 7,1) a 100 °C (para excluir as outras frações do amido, já que o amido resistente tipo 3 (AR 3) é a única fração termodinamicamente estável), durante 30 minutos. Após o resfriamento do sistema (37 °C), foi adicionado 0,5 mL de uma solução enzimática de pancreatina (0,15 g/mL) e a incubação foi mantida durante todo o teste a 37 °C. Durante a incubação, alíquotas (0,1 mL) foram retiradas em intervalos pré-determinados (20, 60, 120, 150 e 180 min) e acrescidas de 1 mL de etanol 80% (v/v) para cessar a atividade enzimática.

O amido que é hidrolisado em glicose foi quantificado espectrofotometricamente (540 nm) utilizando-se a curva padrão de glicose, obtida por Meneguim e colaboradores (2014), após a adição do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), que reage com a glicose formando um composto avermelhado. O amido rapidamente digerível (ARD) foi definido como total de amido digerido nos primeiros 20 minutos e o amido lentamente digerível (ALD) aquele digerido entre 20 e 120 minutos (ENGLYST; KINGSMAN; CUMMINGS, 1992).

O conteúdo de AR foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$\text{AR (\%)} = \frac{(\text{Amido total} - \text{ARD} - \text{ALD})}{\text{Amido total}} \times 100\% \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: AR = amido resistente; ARD = amido digerido dentro dos primeiros 20 min; ALD = amido digerido entre 20 e 120 min (ENGLYST; KINGSMAN; CUMMINGS, 1992).

#### 4.2.5.3 Rendimento

Após a secagem das micropartículas em dessecador, sob vácuo até peso constante, o rendimento foi calculado através da Equação 3.

$$\% \text{Rendimento} = \left( \frac{\text{massa de micropartículas secas}}{\text{massa de polímeros} + \text{massa de fármaco}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

#### 4.2.5.4 Teor de umidade

O teor de umidade das amostras foi avaliado por gravimetria, em balança com sistema de aquecimento por infravermelho (IV- 2000 GEHAKA<sup>®</sup>), a partir de uma massa conhecida de micropartículas, a qual foi uniformemente disposta no prato de alumínio previamente dessecado e tarado, e submetida ao aquecimento durante até peso constante. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.2.5.5 Avaliação do teor e da eficiência de encapsulação das micropartículas

O teor de incorporação do fármaco corresponde ao percentual que este representa na micropartícula. Para determinação do teor de encapsulação das micropartículas, que representa a porcentagem de fármaco incorporado na partícula, uma massa de micropartículas (aproximadamente 0,01g) foi precisamente pesada e, em seguida, incubada em 10 mL de tampão fosfato pH 7,4 por 24 horas para intumescimento. As micropartículas intumescidas foram trituradas em ultra-turrax (IKA) a 18.000 rpm durante 1 minuto, para a completa extração do fármaco. Após esse processo, a dispersão foi centrifugada a 5000 rpm (10 minutos)

e o fármaco presente no sobrenadante foi quantificado utilizando espectrofotômetro UV-VIS em 260 nm (pico máximo de absorção do cetoprofeno em tampão pH=7,4). O mesmo processo foi feito com as micropartículas sem fármaco utilizadas como controle.

O teste foi realizado em triplicata e o teor de encapsulação foi calculado através Equação 4 (LUCINDA-SILVA; SALGADO; EVANGELISTA, 2010).

$$TE\% = \frac{m_{CP}}{m_{am}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:  $TE\%$  é o teor de encapsulação (%);  $m_{CP}$  é a massa de cetoprofeno quantificada na amostra;  $m_{am}$  é a quantidade total de fármaco adicionada.

A eficiência de encapsulação (%EE) foi calculada a partir do teor e do rendimento em massa do lote preparado das micropartículas analisadas (Equação 5) (LUCINDA-SILVA; SALGADO; EVANGELISTA, 2010).

$$EE\% = \left( \frac{TE \cdot R}{m_{CTtotal}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: %EE = eficiência de encapsulação; TE = teor de encapsulação; R = rendimento em massa do lote analisado;  $M_{CPtotal}$  = massa total de cetoprofeno usado na preparação do lote analisado.

#### Quantificação do CP:

A quantificação do CP foi realizada por espectrofotometria UV-Vis. A metodologia de quantificação nos meios HCl 0,1 N, pH 1,2 (com 0,75% de laurilsulfato de sódio), tampão fosfato pH 6,0 e tampão fosfato pH 7,4, foi previamente validada por Prezotti (2013), com base nos parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) conforme preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011b).

Devido à utilização de polímeros diferentes daqueles avaliados no sistema desenvolvido por Prezotti (2013) foi realizado o teste de especificidade/seletividade com os polímeros gelana e AR.



#### 4.2.5.6 Especificidade/Seletividade

Inicialmente, foi determinado o comprimento de onda de máxima absorção do cetoprofeno na região do ultravioleta, em que soluções com concentração de 20 µg/mL de cetoprofeno em HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; em tampão fosfato pH 6,0 e em tampão fosfato pH 7,4 foram submetidas a varredura entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis. Em seguida, a interferência da goma gelana e do AR na quantificação do cetoprofeno encapsulado nas micropartículas, bem como alterações nos resultados do teste devido à presença desses polímeros, foram avaliados a partir da especificidade/seletividade determinada através da obtenção dos espectros de absorção dos polímeros entre 200 e 400 nm. Soluções contendo 100µg/mL de misturas de gelana:amido resistente (proporção 1:1 (v/v)) nos diferentes meios testados foram submetidas a varreduras no UV.

#### 4.2.5.7 Análise térmica

##### 4.2.5.7.1 DSC

As curvas de DSC das micropartículas RI e DR foram obtidas utilizando-se calorímetro exploratório diferencial, modelo *DSC 1 Star System (Mettler Toledo®)* a uma razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera inerte de gás nitrogênio (50 mL/min), na faixa de aquecimento de 25 a 200 °C para o fármaco, 25 a 400 °C para os polímeros e 20 a 200 °C para as micropartículas. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se cadinho de alumínio com tampa perfurada contendo aproximadamente 5 mg de amostra e como referência foi utilizado um cadinho de alumínio vazio.

##### 4.2.5.7.2 TG/DTG

As curvas de TG/DTG das amostras RI e DR foram registradas em equipamento *TA Instruments SDT Q600*, em razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera inerte de gás nitrogênio (100 mL/min), na faixa de aquecimento de 25 a 500 °C. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se cadinho de alumínio contendo aproximadamente 5 mg de amostra.

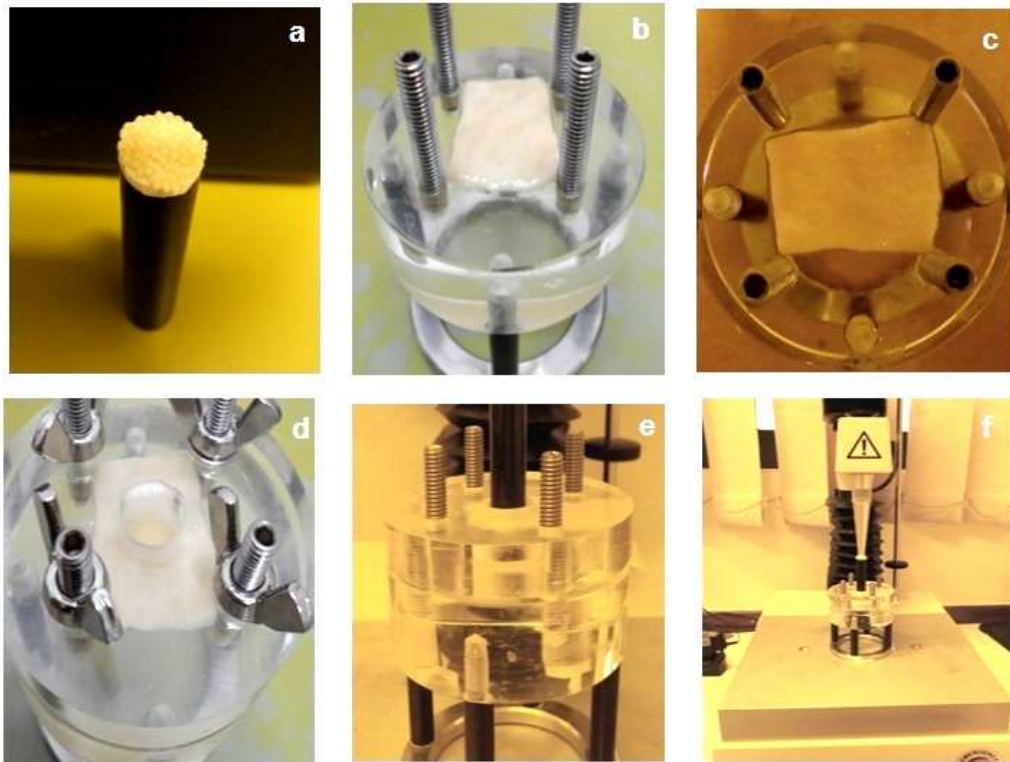
#### 4.2.5.8 Teste “*ex vivo*” de mucoadesão

A mucoadesão foi avaliada usando Analisador Universal de Textura (*TA-XT2 Texture Analyser - Stable Micro Systems*) no modo “*compression*” (Figura 16). Antes da realização do ensaio, o tecido intestinal do porco previamente congelado a 4 °C, foi mantido em temperatura ambiente para o processo de descongelamento lento e, em seguida, incubado em solução salina a 37 °C, a fim de garantir a qualidade e integridade da camada de muco (VARUM et al., 2010). Secções de mucosa gastrintestinal de porco (aproximadamente 4 cm<sup>2</sup>) foram colocadas sobre um suporte acrílico (Figura 16 b, c e d) para teste de mucoadesão, e as microcápsulas foram cuidadosamente fixadas a uma sonda cilíndrica metálica de 10 mm com auxílio de fita dupla-face, de modo a formar uma única camada de micropartículas (Figura 16 a).

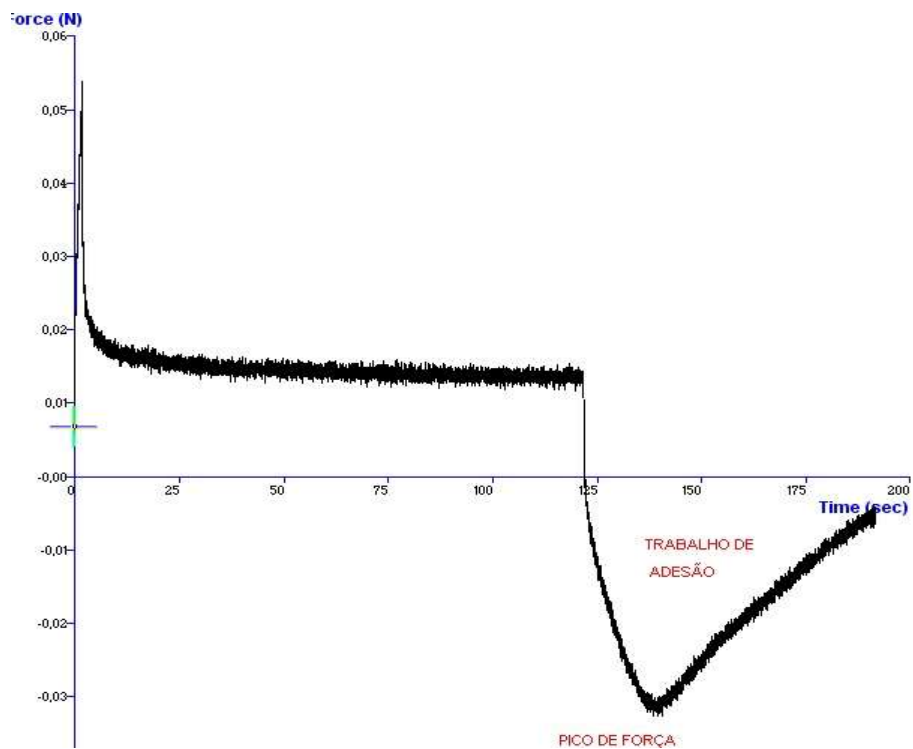
Para realização do teste, a sonda metálica contendo a amostra foi movida perpendicularmente em direção à mucosa com velocidade constante de 10 mm min<sup>-1</sup>, sob uma força de compressão pré-determinada de 0,5 N e, introduzida a 1 mm de profundidade, a partir da superfície da mucosa. O tempo de contato foi de 60 segundos, sem a aplicação de força durante esta fase (Figura 16 e).

Em seguida, a sonda foi removida com velocidade de 20 mm min<sup>-1</sup> e foram determinados para cada amostra: a força de mucoadesão ( $F_{MA}$ ), correspondente à força de destacamento máxima (N) e o trabalho da mucoadesão ( $T_{MA}$ ) (N.s), dados pela área sob a curva força *versus* tempo (Figura 17). As análises foram realizadas com as micropartículas pré-hidratadas por 5 minutos, em tampão fosfato pH 6,0 a 37 °C.

**Figura 15:** Esquema ilustrativo do metodologia utilizada no teste de mucoadesão *ex vivo*.



**Figura 16:** Gráfico da  $F_{MA}$  (N) e do  $T_{MA}$  (N.s), dados pela pico de força e área sob a curva força *versus* tempo, respectivamente.



#### 4.2.5.9 Análise de intumescimento

O intumescimento das micropartículas foi avaliado em meios com diferentes valores de pH a fim de simular os ambientes do trato gastrointestinal: sendo meio ácido (HCl 0,1 N, pH=1,2), tampão fosfato, pH=7,4 e pH=6,0. A capacidade de intumescimento das amostras foi determinada através da avaliação do aumento do diâmetro das partículas nos diferentes meios (ALMEIDA; ALMEIDA, 2004), em diferentes intervalos de tempo de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. O diâmetro do círculo equivalente foi determinado utilizando-se estereoscópio Leica MZ APO e as imagens foram capturadas com auxílio do programa Motic Images Advance 2.0 e digitalizadas utilizando o programa analisador de imagem Motic Images Advance 3.2. O índice de intumescimento (%) foi calculado utilizando-se a Equação 7.

$$I(\%) = \frac{d_t - d_0}{d_0} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Em que: I(%) = porcentagem de intumescimento;  $d_t$  = tamanho da partícula no tempo t;  $d_0$  = tamanho da partícula no tempo 0.

A capacidade de intumescimento das partículas foi avaliada por análise de imagem em quintuplicata.

#### 4.2.5.10 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do cetoprofeno

Os ensaios de dissolução para a determinação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das amostras RI e DR, foram realizados utilizando-se uma massa precisamente pesada de micropartículas contendo 100 mg de fármaco. Utilizou-se aparato 1 (cesto), sob velocidade de 50 rpm e temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ .

O teste foi realizado utilizando-se, como meios de dissolução, soluções com diferentes valores de pH, a fim de mimetizar a variação de pH ao longo de todo TGI. Inicialmente, o ensaio foi realizado em meio ácido (900 mL de HCl 0,1N - pH=1,2), durante 2 horas. Laurilsulfato de sódio (0,75%) foi adicionado como tensoativo devido à escassa solubilidade do fármaco neste meio, a fim de atender as condições *sink*. Em seguida, foi conduzida a segunda etapa do ensaio em tampão fosfato pH 7,4 (900 mL) durante 4 horas baseado no procedimento

proposto na USP 34, capítulo 711, em ensaio de dissolução para sistemas de liberação retardada (Método B) (USP, 2011a).

Para a última etapa do ensaio foi adicionado HCl 2 N, para promover a redução do pH para 6,0, a fim de simular o pH do meio colônico. Os meios foram preparados conforme preconizado pela USP 34, na seção de reagentes (USP, 2011c).

As alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e filtradas em membrana de acetato (0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore<sup>®</sup>). A reposição imediata de meio à mesma temperatura foi realizada. A análise quantitativa do fármaco liberado foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (258 nm em meio ácido e 260 nm tampão fosfato pH 7,4 e pH 6) e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.2.5.11 Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

Para avaliação dos mecanismos envolvidos na liberação do fármaco a partir das micropartículas, diferentes modelos matemáticos foram aplicados aos dados de liberação *in vitro* (primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas e Weibull), utilizando programa Sigmaplot 10.0. Todos os modelos foram aplicados à curva completa, com exceção da equação de Peppas e Weibull, para os quais foram utilizados os dados de aproximadamente 60% de liberação. O modelo mais adequado para descrever a cinética de dissolução do fármaco para cada formulação foi selecionado com base nos valores de  $r^2$ .

#### 4.2.5.12 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna das micropartículas

A morfologia de superfície e a estrutura interna das micropartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura de campo ampliado de alta resolução (MEV-FEG) JEOL JSM-7500F. As amostras foram preparadas conforme item 4.2.4, adicionadas ou não de CP. Para avaliar a estrutura interna, as micropartículas foram submetidas à criofratura, em que são fraturadas após o congelamento em nitrogênio líquido, em seguida, fixadas em fita de carbono dupla face.

#### 4.2.5.13 Análise estatística

As diferenças significativas entre os valores obtidos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey ( $p < 0,05$ ), com auxílio do software Origin 9.0, Statistica 10.0, GraphPad Prism 5 e Sigma Plot 10.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e caracterização dos hidrogéis

A reticulação, bem como a associação de polissacarídeos naturais, tem sido uma ferramenta importante para melhorar as propriedades mecânicas de hidrogéis, já que possibilitam a formação de redes estruturais mais fortes (CARBINATTO et al., 2012; CARBINATTO et al., 2014; CURY et al., 2009a; CURY et al., 2009b; MENEGUIM; CURY; EVANGELISTA, 2014; OLIVEIRA et al., 2010; PEPPAS et al., 2000, PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014; SOARES, 2011; SOARES et al., 2013). As propriedades mecânicas dessas estruturas podem ser avaliadas a fim de investigar/avaliar as possíveis mudanças que podem ocorrer na textura dos sistemas quando submetidos às tensões quando em condições fisiológicas.

#### 5.1.1 Análise das propriedades mecânicas dos hidrogéis

A TPA é amplamente utilizada na indústria alimentícia para a caracterização mecânica de alimentos e, atualmente, tem sido muito útil na área farmacêutica para estudo das propriedades mecânicas de hidrogéis, tais como adesividade, dureza e coesividade (CARVALHO, 2012; MENEGUIM et al., 2012, PEREIRA, 2011)

A dureza, propriedade característica de um material sólido, expressa a resistência a deformações e os valores desse parâmetro são obtidos a partir do pico da força máxima exercida pela *probe* durante a primeira compressão, ou seja, representa a força máxima requerida para que ocorra a deformação da amostra (Figura 14) (EXPONENT LITE, 2009).

A adesividade, que expressa a capacidade de um material aderir a outro, é dada pela primeira área negativa (A3 da Figura 14) e representa o trabalho necessário para vencer a atração existente entre a amostra e a prova analítica, ou seja, a força total necessária para separar a *probe* da amostra (EXPONENT LITE, 2009).

A coesividade, caracterizada pela medida do grau de dificuldade em romper a estrutura interna de um gel (LAU; TANG; PAULSON, 2000), é dada pela razão entre a área positiva obtida durante a segunda compressão (A2 da Figura 14) e a obtida durante a primeira compressão (A1 da Figura 14), e expressa a extensão que um material se rompe sob uma ação mecânica (EXPONENT LITE, 2009; MORRIS; NISHINARI; RINAUDO, 2012).

A TPA das dispersões de gelana/AR não reticuladas, dos hidrogéis de gelana (HG) e dos hidrogéis RI e DR foi realizada a fim de avaliar a influência dos métodos de retrogradação (AR-M1 e AR-M2), bem como da concentração de polímeros e agente reticulante nas propriedades de textura dos hidrogéis.

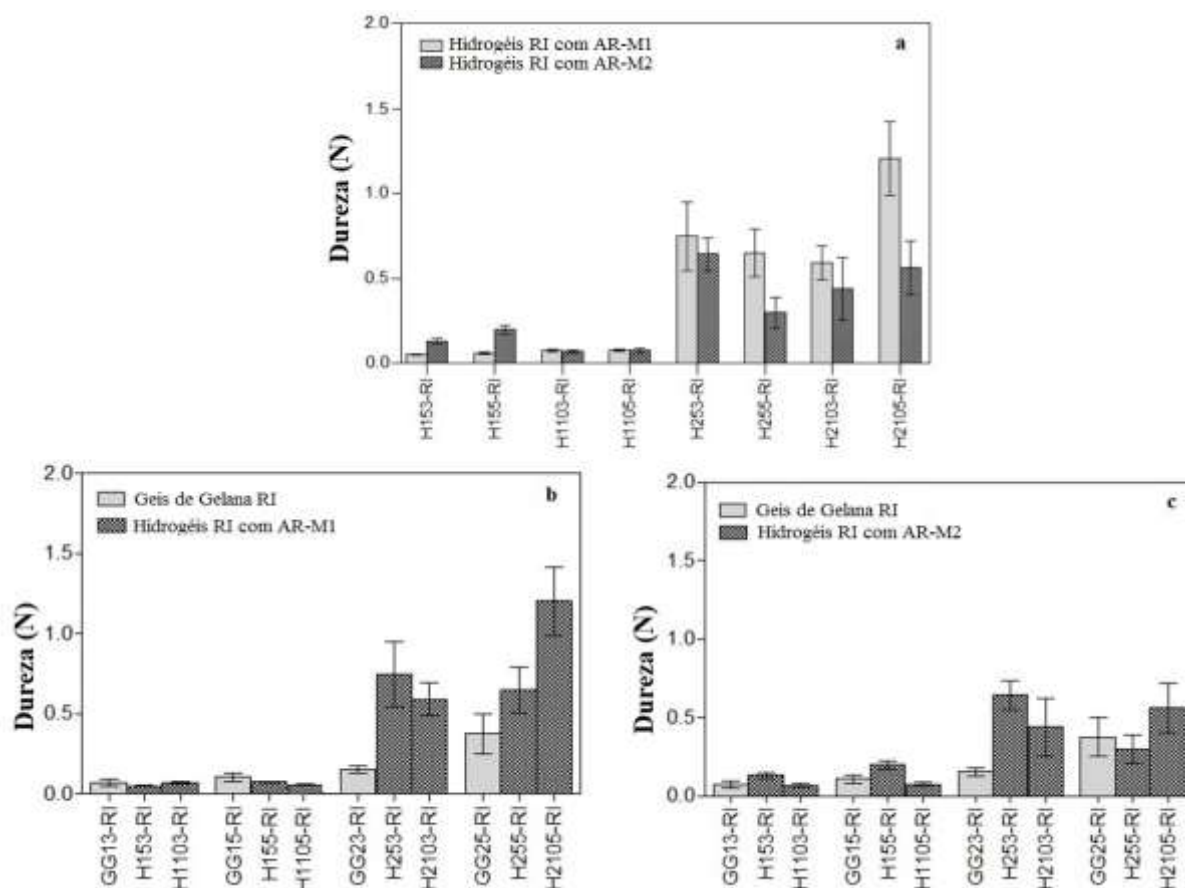
Nos hidrogéis RI, de maneira geral, os maiores valores de dureza foram exibidos pelas amostras que apresentavam maiores concentrações de gelana (2%), contendo AR-M1 ( $p < 0,05$ ) (Figura 18 a) e esses valores foram maiores que aqueles obtidos para HG-RI ( $p < 0,05$ ) (Figura 18 b e c). O mais elevado valor de dureza foi verificado para a amostra H2105-RI ( $p < 0,05$ ) (Figura 18 a) que apresentava gelana, AR-M1 e agente reticulante nas suas máximas concentrações.

A esse respeito, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a elevada concentração de polímeros que deve, naturalmente, permitir a formação de uma rede mais compacta devido à maior possibilidade de interpenetração e, conseqüentemente, maior entrelaçamento das cadeias poliméricas. Adicionalmente, a presença de cátions deve contribuir para a diminuição da repulsão, aumentando a aproximação das duplas hélices e a quantidade de zonas de junção intra e/ou intercadeias (TANG; TUNG; ZENG, 1996).

Esse conjunto de fatores deve ter favorecido a formação de uma rede mais coesa e compacta, o que justifica a maior dureza dessas amostras. Comportamento semelhante foi relatado por Huang e colaboradores (2007), que verificaram que a associação de amido de arroz à gelana promoveu o aumento da dureza dos hidrogéis.



**Figura 17:** Dureza dos hidrogéis reticulados ionicamente contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana reticulados ionicamente (b e c).



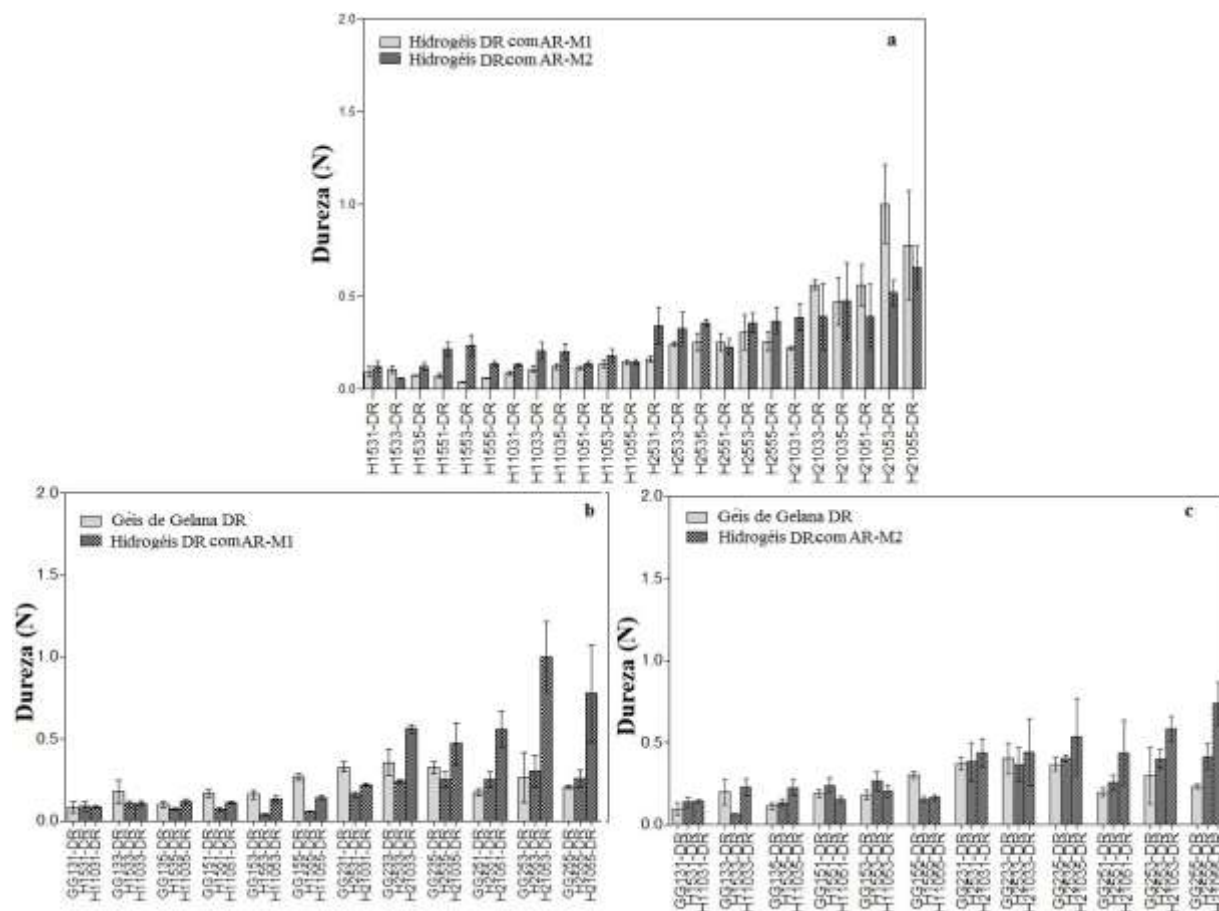
A contribuição do AR-M1 para o aumento da dureza dos hidrogéis RI indica que na retrogradação sob resfriamento isotérmico (4 °C), a mais reduzida mobilidade das cadeias deve ter permitido se alcançar um nível de organização estrutural que resultou na formação de estruturas mais fortes e estáveis do que aquelas obtidas em ciclos alternados de temperatura.

Park, Baik e Lim (2009) também observaram que a retrogradação do amido a uma temperatura constante de 4 °C durante 16 dias favoreceu o aumento da dureza quando comparado com aquele submetido à retrogradação em ciclos alternados de temperatura (4/30 °C durante 16 dias).

Para as amostras submetidas à DR, de maneira geral, maiores valores de dureza foram observados para os hidrogéis contendo máximas concentrações de ambos os polímeros e contendo AR-M1, independente da concentração dos reticulantes ( $p < 0,05$ ) (Figura 19 a). Os valores de dureza foram superiores aos dos HG-DR ( $p < 0,05$ ) (Figura 19 b e c) e a máxima dureza foi exibida pelas amostras H21053-DR e H21055-DR ( $p < 0,05$ ) (Figura 19 a).

Esses resultados indicaram novamente que a maior concentração de polímeros e a presença do AR-M1 foram determinantes para o aumento da dureza.

**Figura 18:** Dureza dos hidrogéis duplamente reticulados contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelatina duplamente reticulados (b e c).



Estabelecendo uma análise comparativa entre hidrogéis RI e DR, a maior dureza foi obtida para os hidrogéis RI contendo AR-M1 ( $p < 0,05$ ).

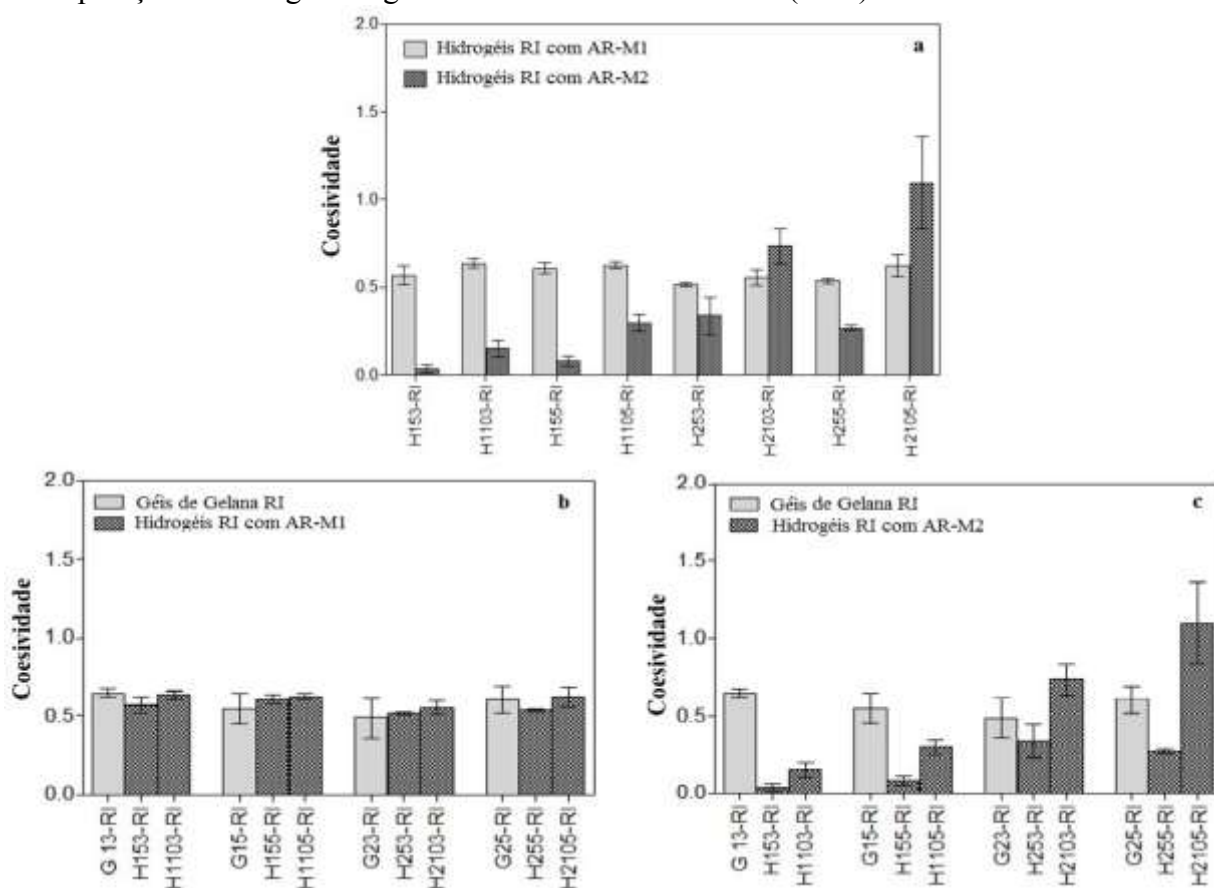
Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que na DR, a introdução de ligações covalentes pode ter contribuído para a formação de uma rede muito rígida e, conseqüentemente, quebradiça, de modo que as estruturas formadas foram mais facilmente rompidas quando submetidas a uma tensão. Ao contrário, a RI provavelmente permitiu a formação de uma rede estrutural com maior mobilidade intercadeias e suficientemente resistente, o que explica os maiores valores de dureza para essas amostras.

Os hidrogéis RI contendo AR-M1, independente das concentrações de polímeros e agente reticulante, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para os valores de coesividade ( $p < 0,05$ ) (Figura 20 a). Esse mesmo comportamento foi verificado em relação

aos HG-RI ( $p < 0,05$ ) (Figura 20 b e c). Entretanto, a coesividade das amostras contendo AR-M1 foi maior do que dos hidrogéis contendo AR-M2 ( $p < 0,05$ ).

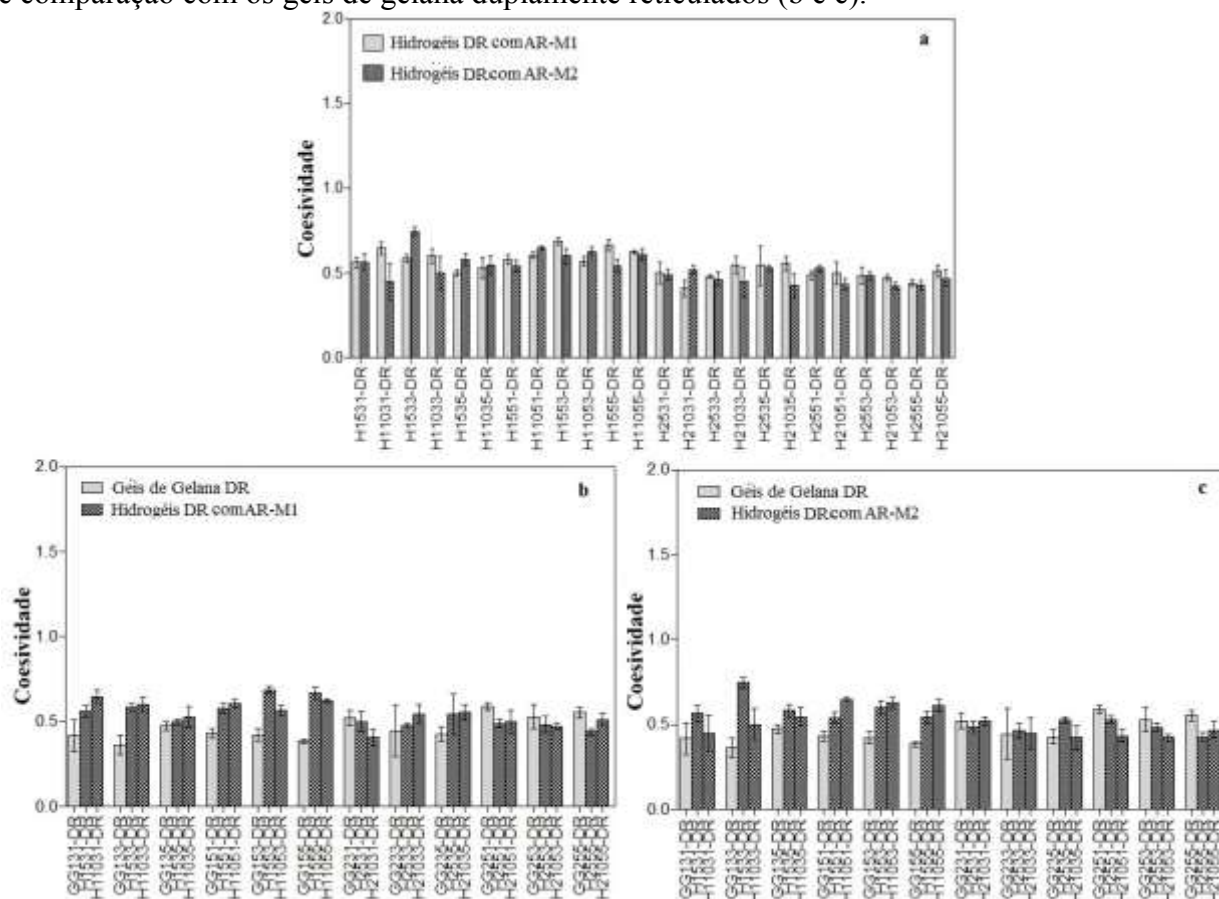
Entre os hidrogéis contendo AR-M2, o maior valor foi alcançado quando ambos os polímeros estavam nas suas máximas concentrações (H2103-RI e H2105-RI) ( $p < 0,05$ ) (Figura 20 a), sendo esses valores maiores do que aqueles obtidos nos HG23-RI e HG25-RI ( $p < 0,05$ ) (Figura 20 b). Mais uma vez, os resultados demonstram que a associação dos polímeros e o aumento da concentração contribuíram para formação de redes mais coesas.

**Figura 19:** Coesividade dos hidrogéis reticulados ionicamente contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana reticulados ionicamente (b e c).



Para os hidrogéis DR, de maneira geral, a coesividade das amostras não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes amostras ( $p < 0,05$ ) (Figura 21 a) e mesmo em relação aos HG-DR ( $p < 0,05$ ) (Figura 21 b e c).

**Figura 20:** Coesividade dos hidrogéis duplamente reticulados contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelana duplamente reticulados (b e c).

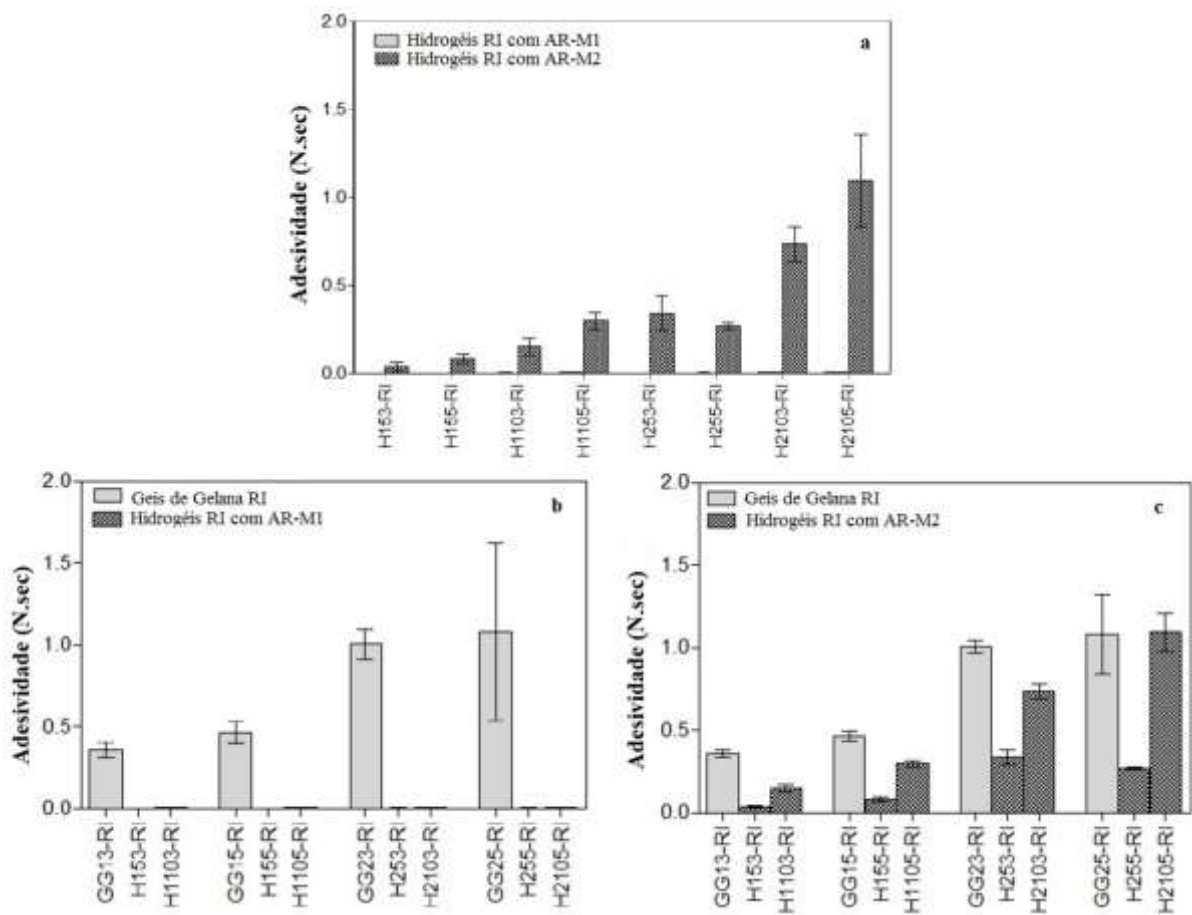


Correlacionando os resultados dos hidrogéis RI e DR, a coesividade dos hidrogéis contendo AR-M1 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre RI e DR ( $p < 0,05$ ), entretanto, nos hidrogéis contendo AR-M2 a coesividade dos hidrogéis RI foi maior do que os hidrogéis DR, somente quando ambos os polímeros estavam nas máximas concentrações ( $p < 0,05$ ) (H2103-RI e H2105-RI), independente da concentração de reticulante.

Quanto à adesividade, os hidrogéis RI apresentaram os maiores valores quando a gelana e AR-M2 estavam em suas máximas concentrações ( $p < 0,05$ ), sendo que a máxima adesividade foi exibida pelo hidrogel H2105-RI ( $p < 0,05$ ) (Figura 22 a).

No entanto, a adesividade dos hidrogéis RI contendo AR-M1 e AR-M2 foi menor do que nos HG-RI ( $p < 0,05$ ) (Figura 22 b e c), exceto para H2105-RI com AR-M2 que apresentou adesividade semelhante ao HG25-RI.

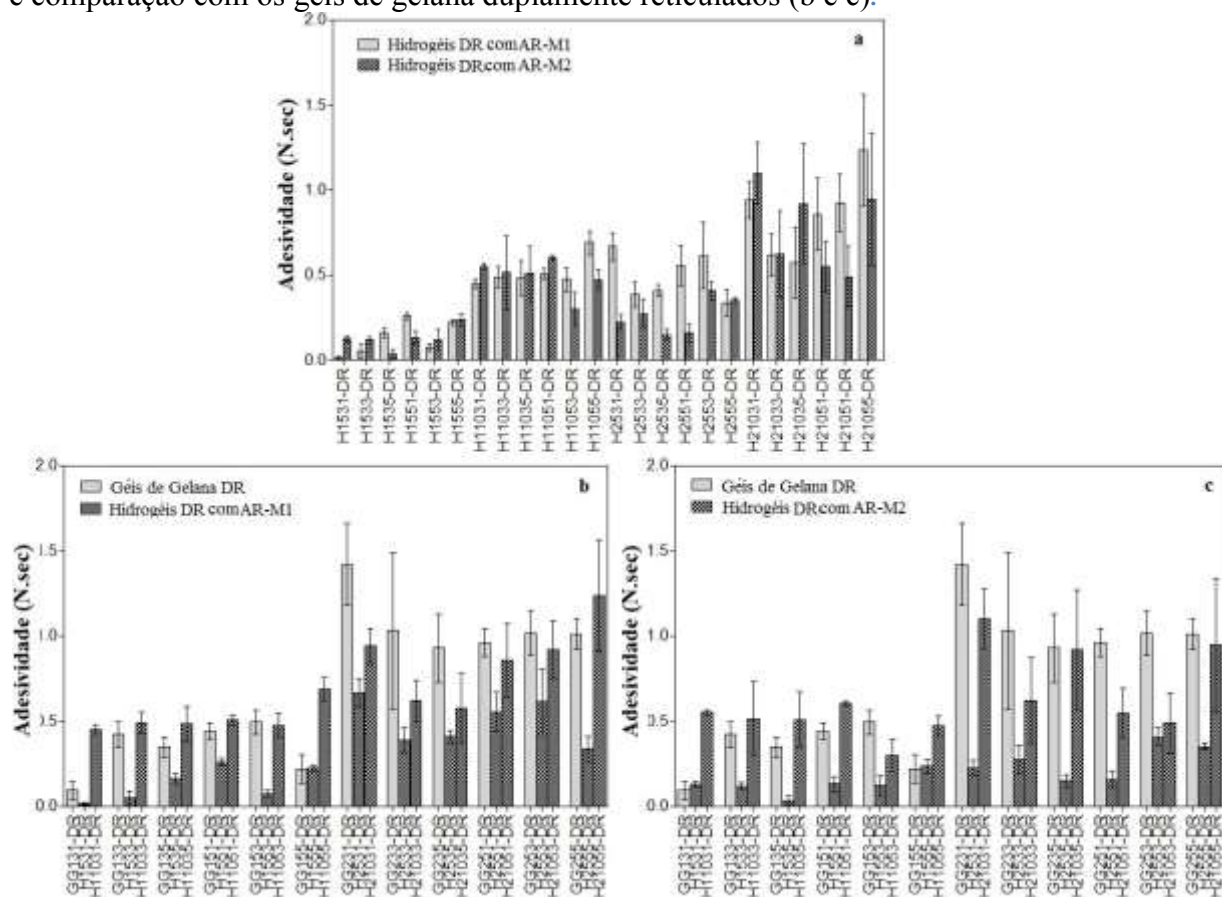
**Figura 21:** Adesividade dos hidrogéis reticulados ionicamente contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelatina reticulados ionicamente (b e c).



Para os hidrogéis DR, a adesividade foi maior nas amostras contendo AR-M1 (Figura 23 a), sendo a amostra H21055-DR a que exibiu o maior valor de adesividade ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos HG-DR, de maneira geral, os hidrogéis DR apresentaram menor adesividade ( $p < 0,05$ ) (Figura 23 b e c).

**Figura 22:** Adesividade dos hidrogéis duplamente reticulados contendo AR-M1 e AR-M2 (a) e comparação com os géis de gelatina duplamente reticulados (b e c).



Estabelecendo uma análise comparativa entre hidrogéis RI e DR, de maneira geral, a adesividade foi maior nos hidrogéis DR contendo AR-M2 ( $p < 0,05$ ).

Para seleção das amostras e continuidade do trabalho, as amostra contendo AR-M2 foram consideradas as mais promissoras por apresentarem os maiores valores de adesividade, já que essa capacidade adesiva do material deve permitir possíveis interações adesivas com substratos biológicos, propriedade fundamental para a obtenção de sistemas mucoadesivos para a liberação de fármacos.

Além disso, considerando que a RI e DR de hidrogéis favorece a formação de uma rede tridimensional cujas propriedades mecânicas podem ser modificadas, os hidrogéis que apresentaram, em particular, valores de dureza, adesividade e coesividade que poderiam ser julgados mais promissores, ou seja, mínimos e máximos valores que foram considerados desejáveis e reprodutíveis para posterior avaliação do comportamento reológico por testes oscilatórios dinâmicos estão apresentadas na Tabela 1.



**Tabela 1:** Hidrogéis de gelana/AR-M2 selecionados para a determinação do comportamento reológico.

Amostras selecionadas			
			H1535-DR
			H1553-DR
			H2553-DR
			H21031-DR
RI	H153-RI	DR	H21033-DR
	H1103-RI		H21035-DR
	H253-RI		H21051-DR
	H255-RI		H21053-DR
	H2103-RI		H21055-DR
	H2105-RI		

O conjunto de resultados obtidos mostrou que cada propriedade de textura pode ser otimizada em condições específicas e, nesse sentido, a RI mostrou-se uma ferramenta eficiente para promover o aumento dos parâmetros dureza e coesividade dos hidrogéis, enquanto a adesividade foi favorecida pela DR. Além disso, o aumento da concentração de polímeros influenciou de maneira positiva todos os parâmetros estudados.

### 5.1.2 Análise das propriedades reológicas dos hidrogéis poliméricos

O termo reologia refere-se ao estudo do fluxo de materiais e descreve o comportamento de deformação de um material quando este é submetido a uma tensão. (SCHRAMM, 2006; WHITE, 1990). Deformações viscosas e elásticas são duas possibilidades de resposta dos materiais quando submetidos a uma tensão (SCHRAMM, 2006). Um dado material pode se comportar como um sólido elástico ou como um líquido viscoso, dependendo da tensão que é aplicada durante a análise (GRASSI et al., 2006).

A análise de propriedades reológicas representa uma ferramenta eficiente para avaliar as propriedades estruturais de diferentes materiais poliméricos, a fim de promover a caracterização macroscópica, com propósito de estabelecer uma correlação entre comportamento microestrutural e as repostas reológicas particulares desses materiais (AMORIM, 2012; DINU et al., 2012; GRASSI et al., 2006; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, 2003).

A utilização de testes reológicos na caracterização de hidrogéis possibilita a obtenção de informações importantes sobre as propriedades viscoelásticas desses materiais permitindo

estabelecer uma relação entre a estrutura interna do hidrogel e o seu comportamento reológico (DINU, et al., 2012).

Através da caracterização do comportamento viscoelástico é possível determinar o módulo de armazenamento ( $G'$ ), que representa a energia de tensão temporariamente armazenada durante a análise (resposta sólida), e o módulo de perda ( $G''$ ), que diz respeito a energia dissipada para iniciar o fluxo, a qual é irreversivelmente perdida sendo transformada em calor de cisalhamento (resposta líquida) (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1996; JONES, 1999; SCHRAMM, 2006).

A análise de propriedades reológicas é uma ferramenta muito utilizada para caracterizar sistemas constituídos por um ou mais tipos de materiais poliméricos que, após a formação de ligações cruzadas devido ao processo de reticulação, apresentam mudanças de comportamento mecânico, já que este processo deve levar ao aumento da resistência mecânica (BERGER et al., 2004; KULKARNI et al., 2011) e, conseqüentemente, da elasticidade dos materiais (GRASSI et al., 2006; KHONDKAR et al., 2007; ROMANI et al., 2002).

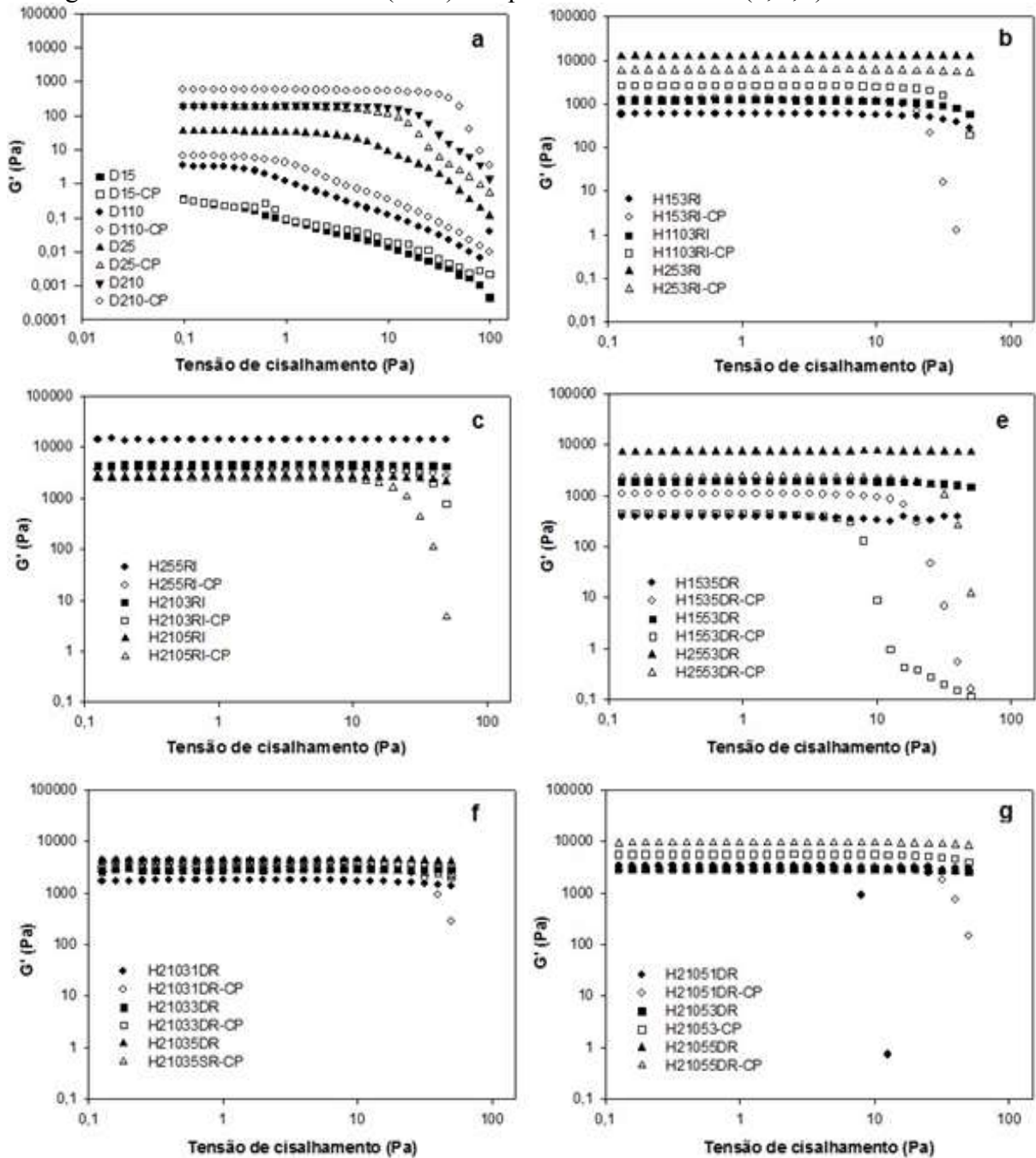
No caso de materiais poliméricos, esse comportamento viscoelástico é resultado dos domínios existentes na estrutura do polímero, em que uma região apresenta-se altamente reticulada (domínios aparentemente elásticos) e a outra não reticulada, que é predominantemente fluida (domínios aparentemente viscosos) (GRATTONI et al., 2001).

A amplitude em que se mantém a faixa de viscoelasticidade linear das amostras é determinada pela varredura de tensão, a qual é caracterizada pela deformação proporcional à tensão aplicada, em que não ocorre alteração permanente da estrutura original da amostra, ou seja, a deformação ocorrida e a tensão aplicada no material apresentam uma relação linear (SCHRAMM, 2006).

A varredura de tensão das dispersões não-reticuladas (Figura 24 a), dos hidrogéis RI (Figura 24 b e c) e DR (Figura 24 d, e, f), com e sem fármaco, para determinação da faixa de viscoelasticidade linear, estão apresentados na Figura 24. A incorporação do fármaco foi realizada através da adição de 0,5% (m/v) nos hidrogéis preparados conforme os itens 4.2.2.2 e 4.2.2.3 (Figura 13).



**Figura 23:** Espectros da varredura de tensão das dispersões não-reticuladas (a) e dos hidrogéis reticulados ionicamente (b e c) e duplamente reticulados (d, e, f).



De maneira geral, pela análise dos espectros de varredura de tensão de todas as amostras (reticuladas e não-reticuladas) (Figura 24), verificou-se que para as dispersões não reticuladas (Figura 24 a) a faixa de viscoelasticidade linear apresentou-se em regiões mais baixas (aproximadamente 1 Pa), indicando estruturas mais fracas e que são facilmente rompidas em baixas tensões. Essas amostras exibiram os menores valores de *stress* crítico, demonstrando rompimento da estrutura do sistema próximo a 1 Pa.

Para as amostras reticuladas (RI e DR), a faixa de viscoelasticidade linear estendeu-se até 6 Pa, e, dessa forma, foi selecionada a tensão de 5 Pa para a obtenção dos espectros da varredura de frequência.

No espectro mecânico das dispersões não-reticuladas (Figura 25), nas amostras D15 e D15-CP, (Figura 25 a), foi verificada a predominância de  $G''$  sobre  $G'$ , sendo  $G'$  dependente da frequência, o que determina um comportamento predominantemente viscoso, indicando a formação de um gel estruturalmente mais fraco (KHONDKAR et al., 2007).

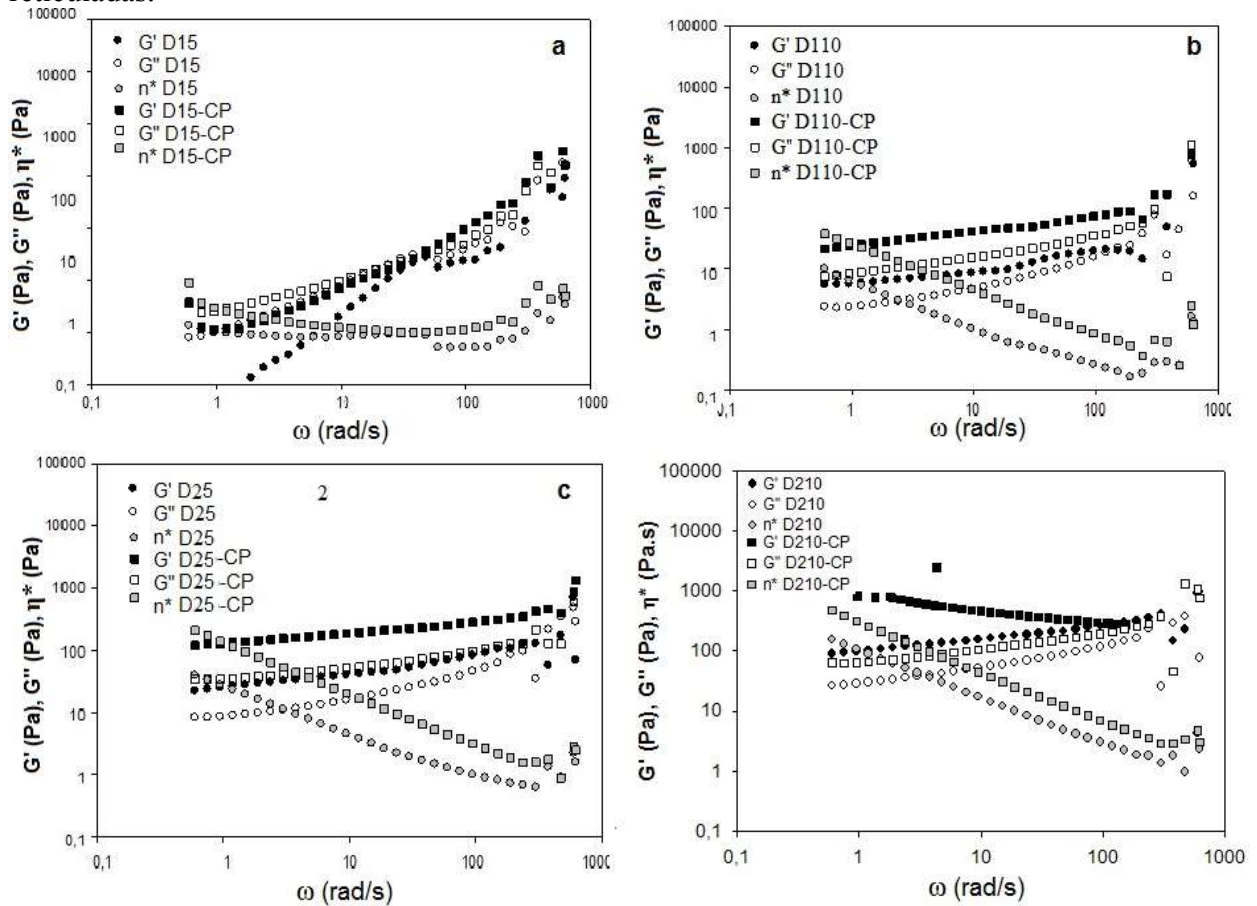
Para as demais amostras não-reticuladas (Figura 25 b, c e d),  $G'$  foi maior que  $G''$  (aproximadamente 2 vezes) e menos dependente da frequência, indicando o comportamento elástico desses amostras. Além disso, os módulos  $G'$  e  $G''$  apresentaram-se paralelos entre si, indicando a formação de uma de estrutura mais forte com relação a D15 e D15-CP e o maior valor de  $G'$  foi exibido pela amostra D210-CP ( $G'=393,5$ ) (Tabela 2).

Esse comportamento pode ser atribuído à formação de uma estrutura mais densa devido ao aumento da concentração de polímeros e presença do fármaco, pois a gelana contribui para formação de estruturas mais densas devido ao maior enovelamento e empacotamento de suas duplas hélices que intensifica as interações intercadeias (PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012), enquanto o amido, após o processo de retrogradação favorece a formação de uma rede estrutural cristalina mais densa (BILIADERIS, 2009) e, assim, provavelmente a associação desses polímeros contribuiu para formação de estruturas mais fortes.

Nos hidrogéis contendo CP, a incorporação do fármaco favoreceu a formação de estruturas mais compactas, possivelmente pela acomodação das partículas entre as cadeias poliméricas.

Os espectros da varredura de frequência das dispersões não-reticuladas, com e sem fármaco, são apresentados na Figura 25.

**Figura 24:** Espectros de varredura de frequência das dispersões de gelana/AR não-reticuladas.



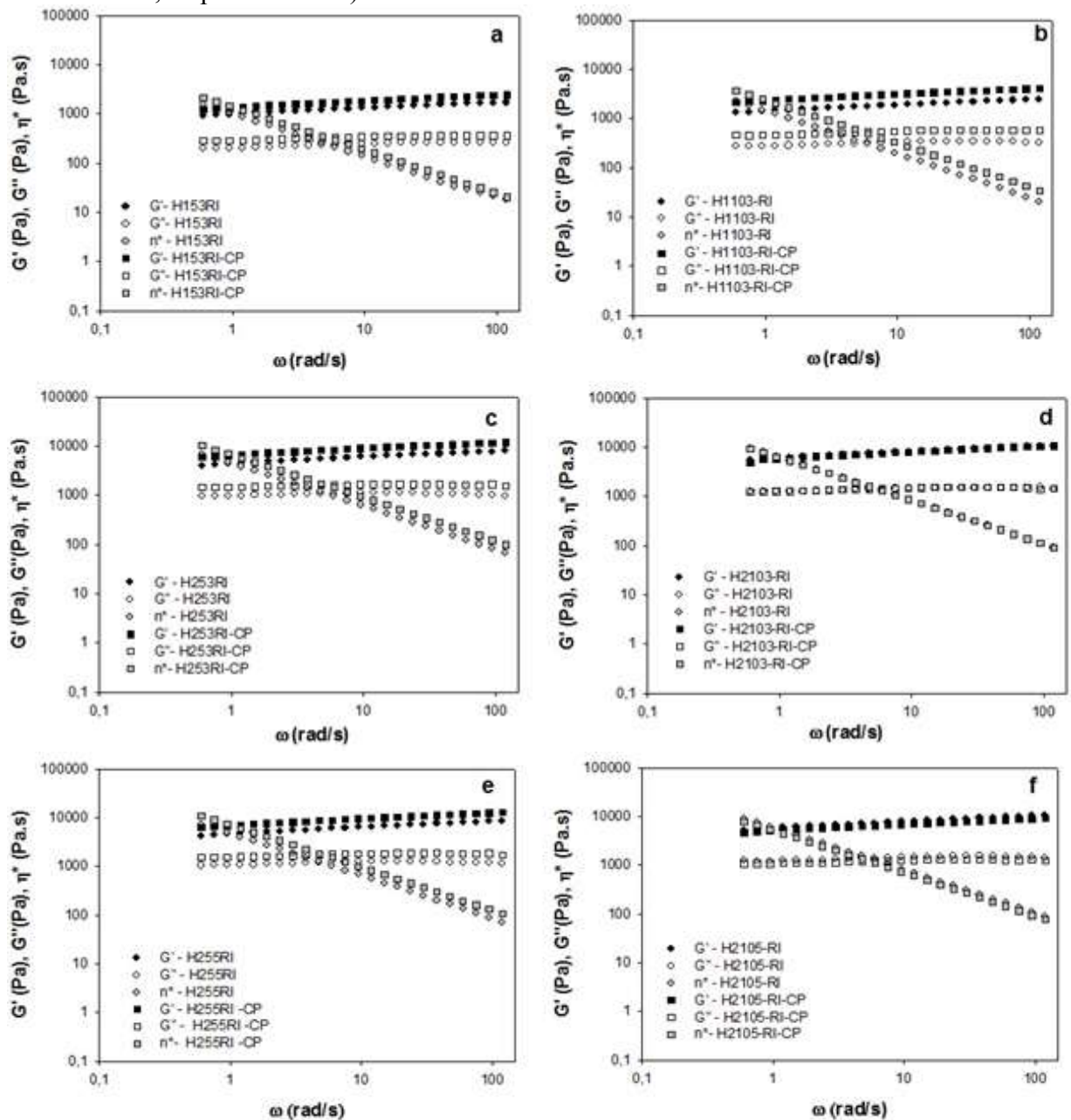
Os valores de  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta^*$  foram analisados em baixa frequência, em que o sistema deve apresentar sua configuração mais preservada. Os valores apresentados na Tabela 2 evidenciam a predominância do comportamento elástico, de modo que o aumento de  $G'$  foi verificado nas maiores concentrações de ambos os polímeros, sendo esse que mesmo comportamento foi verificado para  $\eta^*$ .

**Tabela 2:** Valores  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta^*$  do teste oscilatório para as dispersões não-reticuladas sem e com fármaco (tensão, 1 Pa e frequência, 1 Hz).

AMOSTRAS	$G'$	$G''$	$\eta^*$
D15	0,123	0,571	0,077
D15-CP	0,520	0,811	0,127
D110	8,139	4,227	1,224
D110-CP	39,177	14,247	5,521
D25	38,78	14,503	5,482
D25-CP	179,767	49,003	24,663
D210	147,2	48,34	20,513
D210-CP	393,5	99,047	53,72

Os espectros de varredura de frequência dos hidrogéis RI, com e sem fármaco, são apresentados na Figura 26 e demonstraram que  $G'$  manteve-se superior a  $G''$ , em toda faixa de frequência estudada, revelando o comportamento predominantemente elástico das amostras (SAXENA; KALOTI; BOHIDAR, 2011), atribuído à formação de um gel com elevada densidade de reticulação (SOARES et al., 2013).

**Figura 25:** Espectros de varredura de frequência dos hidrogéis reticulados ionicamente (H153-RI (a), H1103-RI (b), H253-RI (c), H2103-RI (d), H255-RI (e) e H2105-RI (f) sem e com fármaco, respectivamente).



Além disso nos espectros,  $G'$  e  $G''$  apresentaram-se paralelos entre si, sendo os valores de  $G'$  superiores aos de  $G''$  (aproximadamente 5 vezes) e independentes da  $\omega$  (Tabela 3), indicando a formação de géis fortes e estáveis. A formação dessa estrutura mais elástica pode estar relacionada às interações estáveis intra e intercadeias promovidas pelas ligações iônicas entre os cátions e as duplas hélices de ambos os polímeros levando à formação de uma estrutura mais forte.

Esse comportamento também pode ser atribuído ao elevado grau de reticulação dessas amostras, já que a elevada valência do alumínio contribui para a formação de um gel mais forte e resistente, pois cada íon é capaz de estabelecer três ligações com os grupos carboxilatos e com os átomos de oxigênio das hidroxilas presentes nos polímeros levando ao maior fortalecimento da estrutura do gel em relação aos cátions mono e divalentes, conforme relatado por Maiti e colaboradores (2011).

Portanto, no processo de RI os polímeros sofreram uma modificação química que resultou na formação de estruturas de caráter elástico e de elevada resistência, em que mesmo quando submetidas a uma tensão foram capazes de manter sua estrutura estável.

Khondkar e colaboradores (2007), em estudos para avaliar o comportamento reológico de géis de amido e pectina reticulados com trimetafosfato de sódio, também observaram que estruturas mais resistentes e de caráter elástico eram obtidas após a reticulação, demonstrando o maior grau de elasticidade e integridade estrutural.

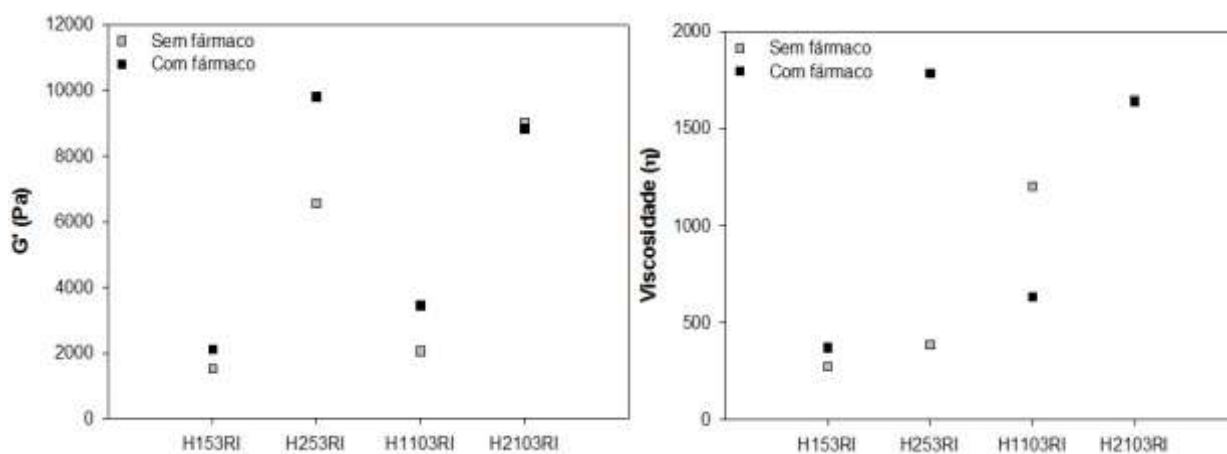
**Tabela 3:** Valores de  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta^*$  para os hidrogéis reticulados ionicamente, sem e com fármaco (tensão, 5 Pa e frequência, 1 Hz).

Amostras	$G'$	$G''$	$\eta^*$
H153RI	1290,033	242,267	173,800
H153RI-CP	1780,667	335,567	239,900
H253RI	5828,000	1100,567	785,133
H253RI-CP	8660,000	1641,667	1167,000
H255RI	6202,667	1232,000	837,200
H255RI-CP	9159,333	1776,667	1235,000
H1103RI	1830,000	326,933	246,067
H1103RI-CP	3012,333	540,767	405,167
H2103RI	7894,667	1450,667	1062,567
H2103RI-CP	7854,333	1455,333	1057,333
H2105RI	7612,667	1433,333	1025,533
H2105RI-CP	6656,333	1224,633	896,000

Os maiores valores de  $G'$  e de  $\eta^*$  foram observados para as amostras contendo 2% de gelana (Figura 27), o que pode ser atribuído à propriedade geleificante intrínseca deste polímero que, em elevadas concentrações, permite que as duplas hélices se agreguem para formar zonas de junção que, ao se complexarem com os cátions, originam uma estrutura tridimensional mais homogênea de caráter mais elástico (MAITI et al., 2011).

Essa habilidade da gelana em formar redes uniformes e de caráter sólido, quando em elevadas concentrações também foi descrita por Rodriguez-Hernandez e colaboradores (2006) em estudos sobre as propriedades viscoelásticas e estruturais de misturas de amido e gelana.

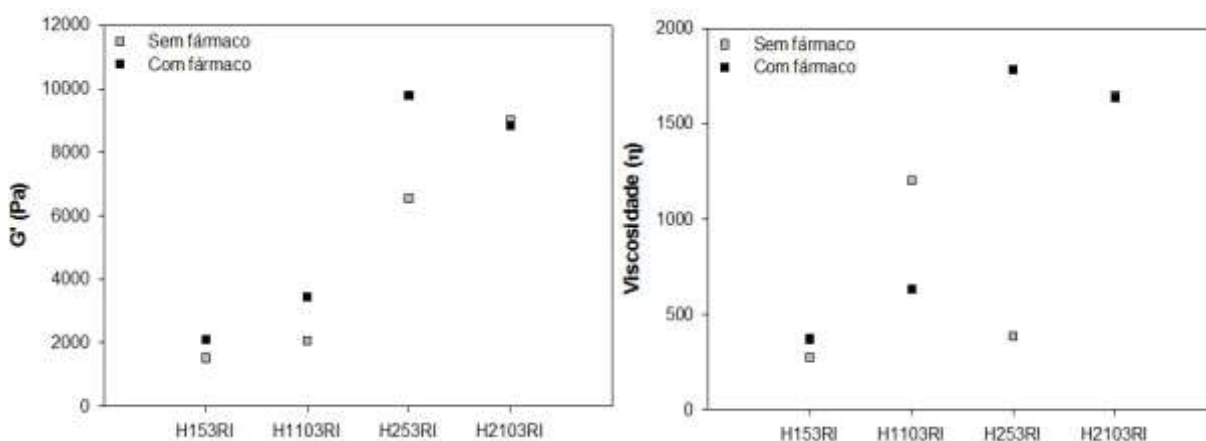
**Figura 26:** Efeito da concentração de gelana no módulo  $G'$  e na viscosidade ( $\eta^*$ ) dos hidrogéis reticulados ionicamente.



O aumento de  $G'$  e da  $\eta^*$  também foi verificado nos hidrogéis contendo elevadas concentrações de AR (Figura 28). A presença dos grânulos de amido intumescidos, presentes no AR, deve ter contribuído para o fortalecimento da rede estrutural dos hidrogéis, de modo que a distribuição desses grânulos entre as duplas hélices da gelana pode ter tornado a rede estrutural mais compacta, o que explica o comportamento sólido dessas amostras.

A capacidade do amido em contribuir com aumento da elasticidade de misturas poliméricas também foi demonstrada em estudos mesmo com amido não modificado (RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2006; KHONDKAR et al., 2007).

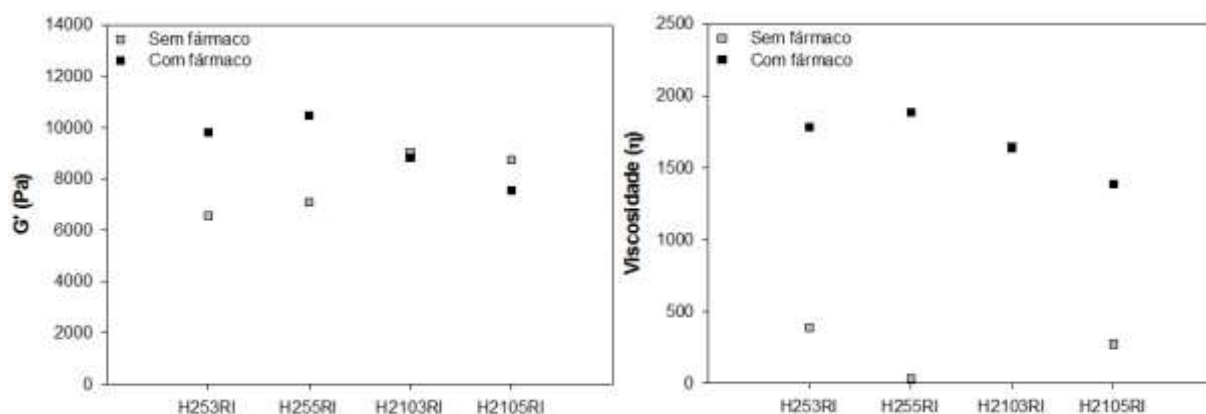
**Figura 27:** Efeito da concentração de amido retrogradado no módulo  $G'$  e na viscosidade ( $\eta$ ) dos hidrogéis RI.



O aumento da concentração do agente reticulante entre as amostras, com e sem fármaco (Figura 29), levou ao aumento de  $G'$  e  $\eta^*$ , provavelmente devido a elevada densidade de reticulação. Provavelmente, a maior quantidade de cátions adicionados estabeleceu um maior número de ligações com os ânions das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a formação de uma rede mais forte.

Esse comportamento é coerente, pois de acordo com Berger e colaboradores (2004), o aumento da concentração de agente reticulante é um fator importante para promover um maior grau de reticulação. Entretanto, nas mais elevadas concentrações de ambos os polímeros, independente da concentração de reticulante (H2103RI-CP e H2105RI-CP), foi verificado uma diminuição do  $G'$  e  $\eta^*$ , que pode ser atribuída à formação de uma rede muito compacta e de elevada rigidez que, quando submetida à tensão de cisalhamento foi facilmente rompida, o que explica a diminuição no comportamento elástico das amostras.

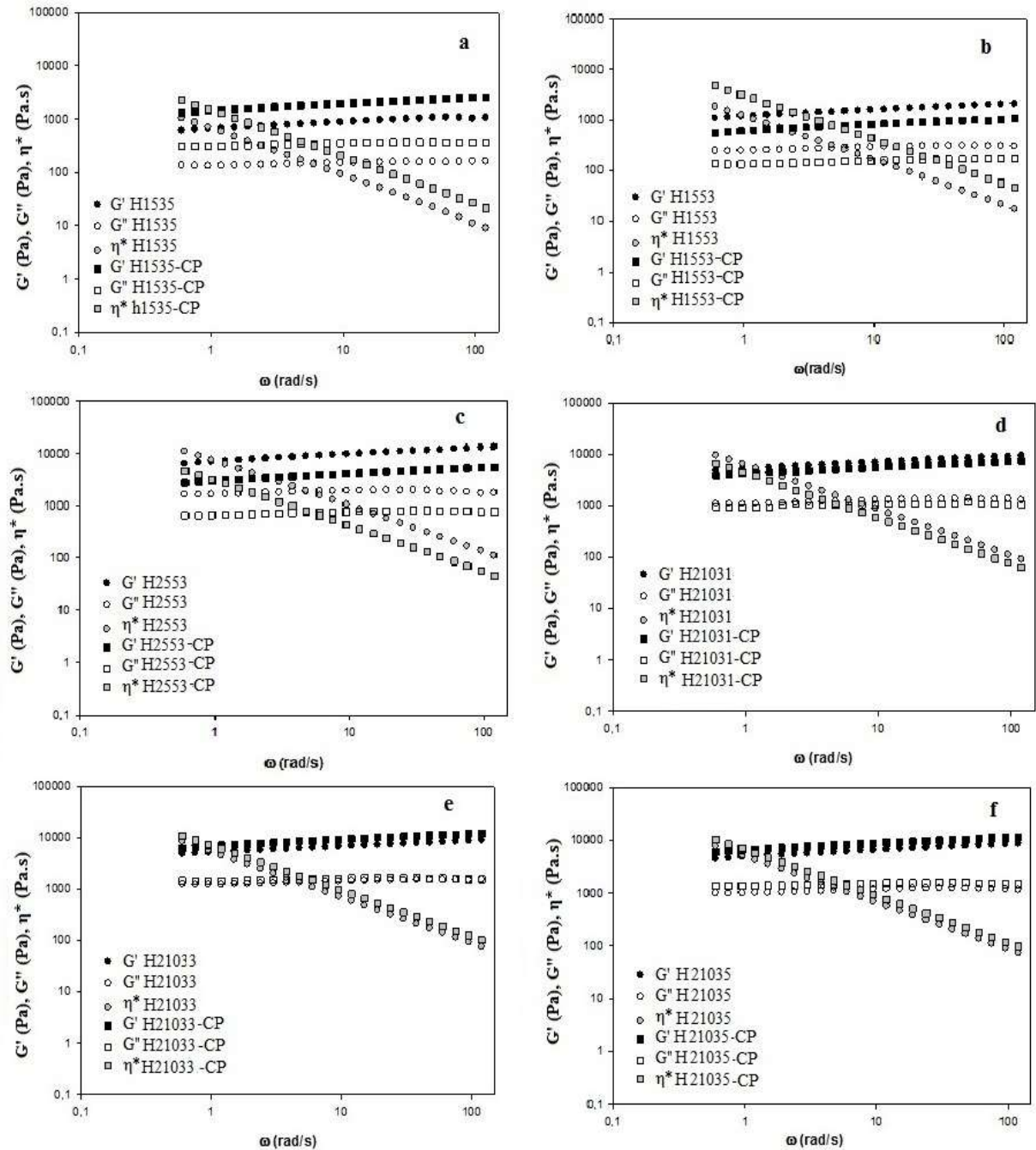
**Figura 28:** Efeito da variação da concentração de agente reticulante ( $Al^{3+}$ ) no módulo  $G'$  e na viscosidade ( $\eta^*$ ) dos hidrogéis reticulados ionicamente.



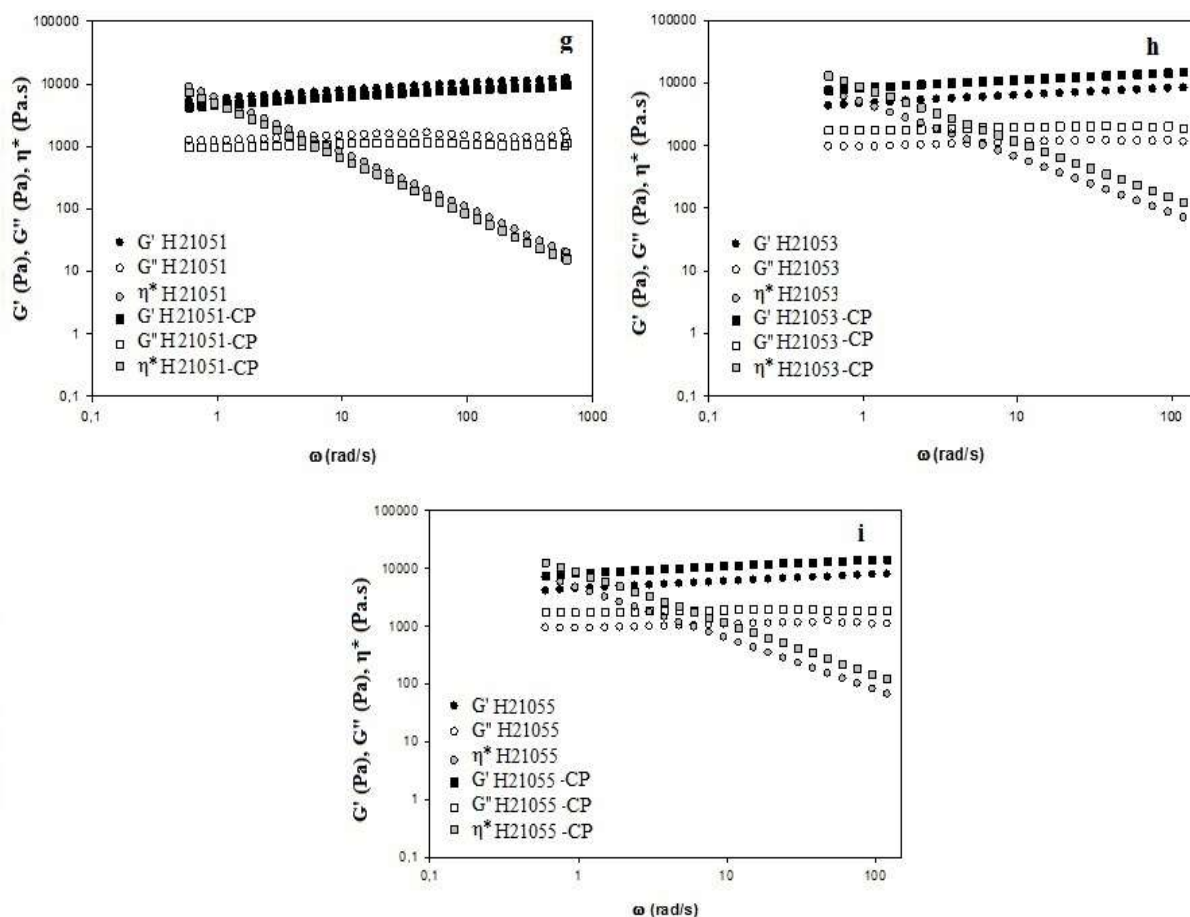


Os espectros de varredura de frequência dos hidrogéis DR, com e sem fármaco, estão apresentados na Figura 30. Para essas amostras, comportamento semelhante ao dos hidrogéis RI foi verificado, já que em todos os espectros o módulo de armazenamento ( $G'$ ) manteve-se superior ao módulo de perda ( $G''$ ) em toda faixa de frequência estudada, indicando comportamento predominantemente elástico (GRASSI et al., 2006).

Figura 29: Espectros de varredura de frequência dos hidrogéis duplamente reticulados.







De acordo com os dados da Tabela 4, os valores de  $G'$ , em baixa frequência, foram maiores que  $G''$  (aproximadamente 5 vezes), sendo  $G'$  e  $G''$  paralelos entre si e independentes da  $\omega$ , indicando a formação de um gel forte. Foi observado que nos hidrogéis contendo máximas concentrações de polímeros, independente da concentração do  $Al^{+3}$  e com a presença do fármaco, a reticulação com glutaraldeído promoveu o aumento de  $G'$ , principalmente quando o agente reticulante estava em maior concentração (3 e 5%).

Esse comportamento pode ser atribuído a possibilidade das ligações covalentes intercadeias promoverem um maior grau de reticulação da rede polimérica e a nova configuração assumida favorecer a elasticidade dos sistemas promovendo o maior fortalecimento da rede e, conseqüentemente, originando uma estrutura mais forte e estável.

Essa capacidade do glutaraldeído em promover maior grau de reticulação e, conseqüentemente, aumentar a elasticidade de materiais foi demonstrada em estudos com filmes de gelatina (BIGI et al., 2001; MARTUCCI; RUSECKAITE; VÁZQUEZ, 2006).

Os espectros das amostras H21031DR, H21031DR-CP, H21033RI, H21033DR-CP H21035DR, H21035DR-CP, H21051DR e H21051DR-CP (Figura 30 j, k, l e m) apresentaram comportamento distinto em relação aos demais, pois os valores de  $G'$  desses

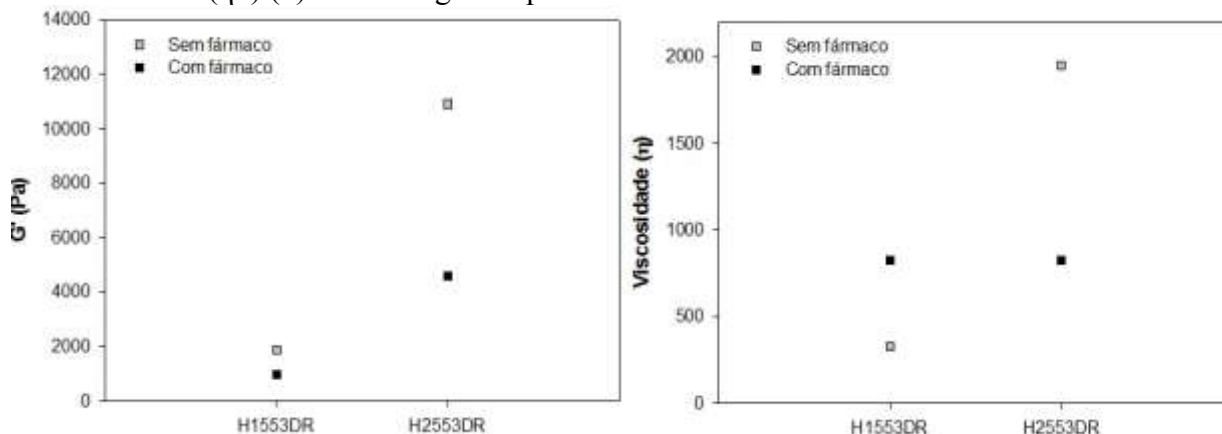
hidrogéis mantiveram-se próximos entre si, em toda faixa de frequência estudada, indicando que a incorporação do fármaco não afetou de maneira significativa as propriedades reológicas desses hidrogéis ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4:** Valores  $G'$ ,  $G''$  e  $\eta^*$  do teste oscilatório dos hidrogéis duplamente reticulados, com e sem fármaco (tensão 5 Pa e frequência 1 Hz).

AMOSTRAS	Sem Fármaco		
	$G'$	$G''$	$\eta^*$
H1535DR	853,633	148,900	114,727
H1535DR-CP	1895,333	349,267	255,133
H1553DR	1562,333	287,100	210,300
H1553DR-CP	809,867	153,000	109,123
H2553DR	9539,667	1894,000	1287,667
H2553DR-CP	3980,667	768,833	536,767
H21031DR	6826,000	1275,667	864,300
H21031DR-CP	5400,000	1040,333	728,133
H21033DR	6485,667	1383,667	879,367
H21033DR-CP	8866,000	1578,333	1192,000
H21035DR	6283,000	1142,300	845,433
H21035DR-CP	8431,333	1487,667	1133,533
H21051DR	7478,667	1447,667	1008,267
H21051DR-CP	5973,000	1075,133	803,467
H21053DR	6033,333	1096,333	811,833
H21053DR-CP	10726,000	1920,000	1442,667
H21055DR	5845,667	1071,567	786,767
H21055DR-CP	10690,000	1898,000	1437,000

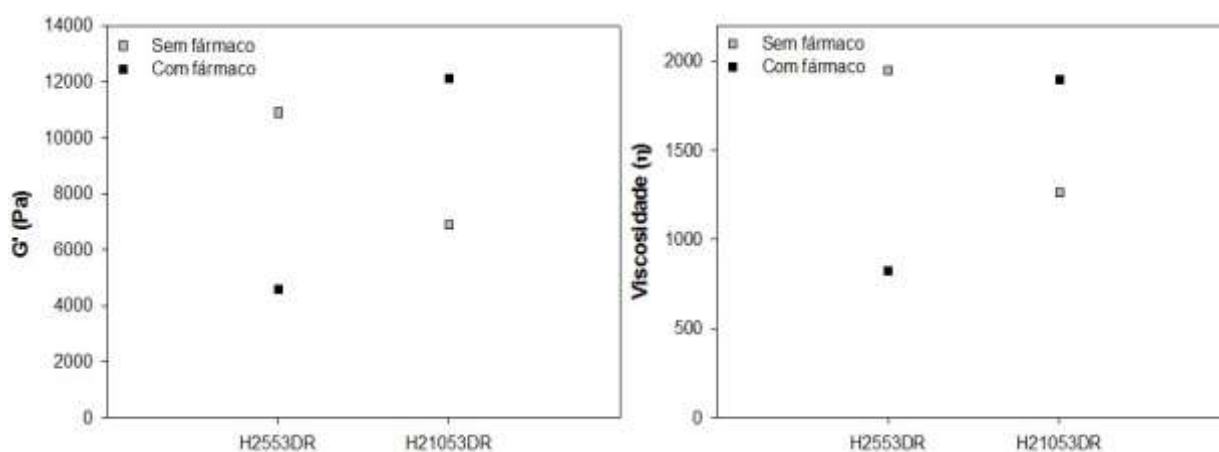
Os dados apresentados na Figura 31 demonstram que o aumento da concentração de gelana promoveu o significativo aumento da  $\eta^*$  dos hidrogéis sem fármaco o que, mais uma vez, evidencia a capacidade deste polímero em formar estruturas mais densas e viscosas. Entretanto, a viscosidade das amostras contendo CP não apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 30:** Efeito do aumento da concentração de gelana no comportamento elástico ( $G'$ ) (a) e na viscosidade ( $\eta^*$ ) (b) dos hidrogéis duplamente reticulados.



Nos hidrogéis contendo CP e 2% de gelana, a maior concentração de amido levou ao aumento do  $G'$  e da  $\eta^*$  (Figura 32), provavelmente atribuído à formação de uma rede mais densa devido à acomodação do fármaco entre as cadeias poliméricas, criando pontos de contato intercadeias, fortalecendo a estrutura do gel. Entretanto, comportamento inverso foi verificado nos hidrogéis sem fármaco, possivelmente pela formação de uma estrutura com reduzida flexibilidade e mobilidade intercadeias, o que deve minimizar o comportamento elástico dos sistemas. Tal comportamento está em concordância com os dados de TPA que indicaram a formação de estruturas mais rígidas nessas condições.

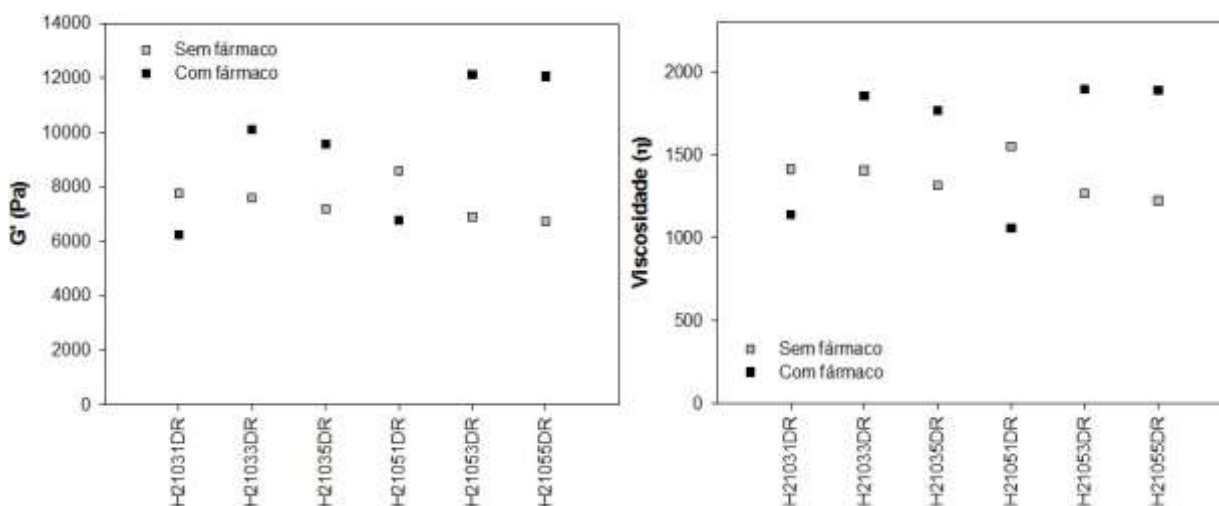
**Figura 31:** Efeito do aumento da concentração de AR no comportamento elástico ( $G'$ ) e na viscosidade ( $\eta^*$ ) dos hidrogéis duplamente reticulados.



O aumento da concentração de glutaraldeído de 1 para 3 e 5% promoveu o aumento do  $G'$  e da  $\eta^*$  em hidrogéis contendo cetoprofeno (Figura 33), independente das concentrações

de  $Al^{+3}$ , provavelmente, por resultar em um maior número de ligações covalentes que origina uma rede com maior grau de reticulação, aumentando o caráter elástico dos hidrogéis (BERGER et al., 2004; BIGI et al., 2001; KULKARNI et al., 2011).

**Figura 32:** Efeito da variação dos agentes reticulantes no comportamento elástico ( $G'$ ) e na viscosidade ( $\eta^*$ ) dos hidrogéis duplamente reticulados.



O conjunto de resultados demonstra que, para os hidrogéis RI e DR, os maiores valores de  $G'$  foram alcançados quando ambos os polímeros estavam em suas máximas concentrações e na presença de fármaco, caracterizando a formação de estruturas mais fortes.

Uma análise quantitativa da variação de  $G'$  em função da  $\omega$  foi estabelecida através da regressão linear dos dados obtidos nos espectros mecânicos e determinação do valor de cada amostra.

Valores de  $r$  mais próximos de 1 indicam menor dependência dos valores de  $G'$  em relação a  $\omega$ , comportamento atribuído a estruturas mais resistentes à tensão aplicada e com comportamento predominantemente elástico (HAMINIUK et al., 2009).

Os valores de  $r$  das amostras estudadas são apresentados na Tabela 5, em que pode se observar o comportamento predominantemente viscoso (resposta líquida) das dispersões não-reticuladas, já que os valores de  $r$  foram notavelmente menores (0,0580 - 0,8025) que os dos hidrogéis reticulados. Esses valores mais reduzidos devido à maior dependência da  $\omega$ , são atribuídos à formação de estruturas mais fracas, confirmando os resultados obtidos nos espectros mecânicos (Figura 25). Para os hidrogéis RI e DR, com e sem fármaco, os valores de  $r$  foram mais elevados (0,9549 – 0,9937 e 0,8936 – 0,9951, respectivamente) do que

aqueles apresentados pelas dispersões não-reticuladas. A independência da  $\omega$  evidencia a formação de géis fortes e estáveis após o processo de reticulação (SCHRAMM, 2006).

No entanto, os hidrogéis H153RI, H153RI-CP, H1535DR H1535DR-CP, H1553DR e H1553DR-CP foram os que apresentaram menores valores de  $r$  e maior dependência da  $\omega$ , caracterizando a formação de estruturas mais fracas, possivelmente pela menor concentração de polímeros que levou a formação de redes mais frouxas e menos densas, com menor capacidade de entrelaçamento e empacotamento das cadeias poliméricas, além de menor densidade de reticulação nessas condições.

Saxena, Kaloti e Bohidar (2011) estabeleceram uma análise quantitativa de parâmetros ( $S$  e  $n$ ) indicativos da resistência de hidrogéis de agar e gelatina baseado na “Lei da Potência” (Equação 8), cujos termos são sensíveis à densidade de reticulação.

$$G' = S\omega^n \quad \text{Equação 8}$$

Em que:  $G'$  é o módulo de armazenamento,  $\omega$  é a frequência oscilatória e  $S$  é a resistência do gel, sendo  $n$  o expoente viscoelástico.

Segundo esses autores, os parâmetros  $S$  e  $n$  são indicativos da densidade de reticulação no interior do gel, sendo que quanto maior o valor de  $S$  e menor valor de  $n$ , maior densidade de reticulação da estrutura do hidrogel.

Estabelecendo uma análise análoga à determinada por Meneguim (2012), Saxena, Kaloti e Bohidar (2011), de acordo com os valores apresentados na Tabela 5, é possível verificar que, de maneira geral, as dispersões não-reticuladas, com e sem fármaco, foram as que apresentaram os menores valores de  $S$  (0,0000 - 244,1949) e os maiores de  $n$  (0,2246 - 55,166), novamente confirmando a formação de uma rede mais fraca com menor densidade de reticulação. Esses resultados estão em concordância com aqueles apresentados nos espectros mecânicos (Figura 25) e com os valores apresentados pela regressão linear (Tabela 5).

Os hidrogéis RI e DR, de maneira geral, apresentaram baixos valores de  $n$  (em média 0,12) e elevados valores de  $S$ , certamente devido à formação de estruturas mais fortes com elevada densidade de reticulação.

Os valores de  $S$  para os hidrogéis RI (962,6911 - 7171,0085) e DR (596,5215-8592,9496) foram maiores, principalmente na presença do fármaco e em elevadas concentrações de polímeros. Esse comportamento pode ser atribuído à distribuição das partículas do fármaco entre as cadeias originando uma rede estrutural mais entrelaçada e

compacta devido à maior concentração de polímeros presente nas amostras, que resultou na formação de hidrogéis com elevada densidade de reticulação.

Em relação à concentração dos polímeros, de maneira geral, os dados mostram que a elevadas concentrações de gelana e AR promoveram o aumento da resistência de ambos hidrogéis RI e DR (aproximadamente 5 vezes) (Tabela 5), o que mais uma vez demonstra a capacidade desse polímero em formar géis fortes e estáveis.

Para os hidrogéis RI, excepcionalmente em H2103RI-CP e H2105RI-CP, os valores de  $S$  foram menores, indicando o menor grau de reticulação dessas amostras e esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados na Figura 29. A diminuição da densidade de reticulação dessas amostras pode ser atribuída à possibilidade de formação de uma rede polimérica mais frouxa que apresentou menor resistência quando submetida à tensão de cisalhamento e, conseqüentemente, exibiu menores valores de  $S$  (5869,7645 e 5320,5985).

Nos hidrogéis DR, em H21053DR-CP e H21055DR-CP, as maiores concentrações de glutaraldeído (3 e 5%) permitiram a formação de um gel mais resistente, já que exibiram os mais elevados valores de  $S$ . Esse comportamento pode ser atribuído à capacidade do glutaraldeído formar uma estrutura fortemente interconectada, consolidada por ligações covalentes intermoleculares entre as cadeias poliméricas, originando um hidrogel químico covalente altamente estável, confirmando resultados apresentados pelos espectros mecânicos (Figura 30 h e i) e aquele apresentado na Figura 33.

**Tabela 5:** Valores da regressão linear ( $r$ ), expoente viscoelástico ( $n$ ) e da resistência do gel ( $S$ ) das dispersões não-reticuladas, hidrogéis reticulados ionicamente e duplamente reticulados, sem e com fármaco.

Amostras	$r$	$n$	$S$
D15	0,1694	23,7716	0,0000
D15-CP	0,4185	1,3947	0,0279
D110	0,0580	55,1662	0,0000
D110-CP	0,0706	0,3329	17,6550
D25	0,4345	0,7144	2,9959
D25-CP	0,8025	0,4346	47,0664
D210	0,7042	0,3808	51,3728
D210-CP	0,3809	0,2246	244,1949
H153RI	0,9549	0,1359	962,6911
H153RI-CP	0,9593	0,1428	1304,3569
H1103 RI	0,9867	0,1029	1471,9320
H1103RI-CP	0,9866	0,1140	2366,5994
H253RI	0,9809	0,1055	4638,2771
H253RI-CP	0,9860	0,1091	6846,6278
H2103RI	0,9935	0,1185	4807,9539
H2103RI-CP	0,9835	0,1150	7171,0085
H255RI	0,9913	0,1125	6226,7305
H255RI-CP	0,9909	0,1230	5869,7645
H2105RI	0,9937	0,1166	5956,4844
H2105RI-CP	0,9869	0,1066	5320,5985
H1535DR	0,8936	0,1569	596,5215
H1535DR-CP	0,9681	0,1164	1472,5798
H1553DR	0,9228	0,1563	1103,9219
H1553DR-CP	0,8291	0,1455	589,3833
H2553DR	0,9899	0,1165	7422,2804
H2553DR-CP	0,9913	0,1215	3073,9521
H21031DR	0,9928	0,1135	5335,8274
H21031DR-CP	0,9936	0,1168	4227,0039
H21033DR	0,9848	0,1253	4998,5752
H21033DR-CP	0,9943	0,1121	6982,1843
H21035DR	0,9953	0,1126	4959,5787
H21035DR-CP	0,9935	0,1096	6674,7909
H21051DR	0,9922	0,1148	5880,3215
H21051DR-CP	0,9905	0,1088	4739,1253
H21053DR	0,9928	0,1096	4795,8992
H21053DR-CP	0,9865	0,1047	8592,9496
H21055DR	0,9951	0,1173	4565,6294
H21055DR-CP	0,9889	0,1056	8528,9954

O conjunto de resultados demonstrou que o processo de reticulação, tanto iônica como iônica/covalente, bem como a elevada concentração de polímeros e a presença do fármaco, de maneira geral, favoreceu a formação de estruturas mais fortes, com comportamento predominantemente elástico, sendo que a DR permitiu a obtenção de uma estrutura mais estável, com elevado grau de reticulação e maior elasticidade.

Com base nos dados reológicos, foram selecionados os hidrogéis que apresentaram mínima, máxima e intermediária densidade de reticulação, para avaliar a influência dessa variável no controle da liberação de fármacos.

As amostras selecionadas (Tabela 6) foram também submetidas a análises de morfologia de superfície e estrutura interna, e DRX para avaliação das diferenças estruturais entre elas.

**Tabela 6:** Amostras selecionadas pelos testes reológicos para análise de morfologia de superfície e estrutura interna e DRX.

Amostras selecionadas			
RI	H153RI	DR	H1535-DR
	H253RI		H2553-DR
	H255RI		H21031-DR
			H21051-DR
	H21053-DR		
			H21055-DR

### 5.1.3 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna dos hidrogéis

Atualmente, a técnica de microscopia eletrônica de varredura de campo ampliado de alta resolução (FEG-MEV) vem sendo cada vez mais utilizada para a caracterização de sistemas farmacêuticos, tais como nano e micropartículas. Essa análise é adequada para obtenção de informações confiáveis sobre a morfologia de sistemas, e fornece imagens de alta resolução (KLANG; VALENTA; MATSKO, 2013).

Os hidrogéis selecionados pelos testes mecânicos e reológicos foram submetidos à análise por FEG-MEV e as fotomicrografias dos hidrogéis RI e DR, com e sem fármaco, foram obtidas para avaliar possíveis diferenças estruturais. A análise também foi realizada para dispersões não-reticuladas para obter um padrão comparativo.

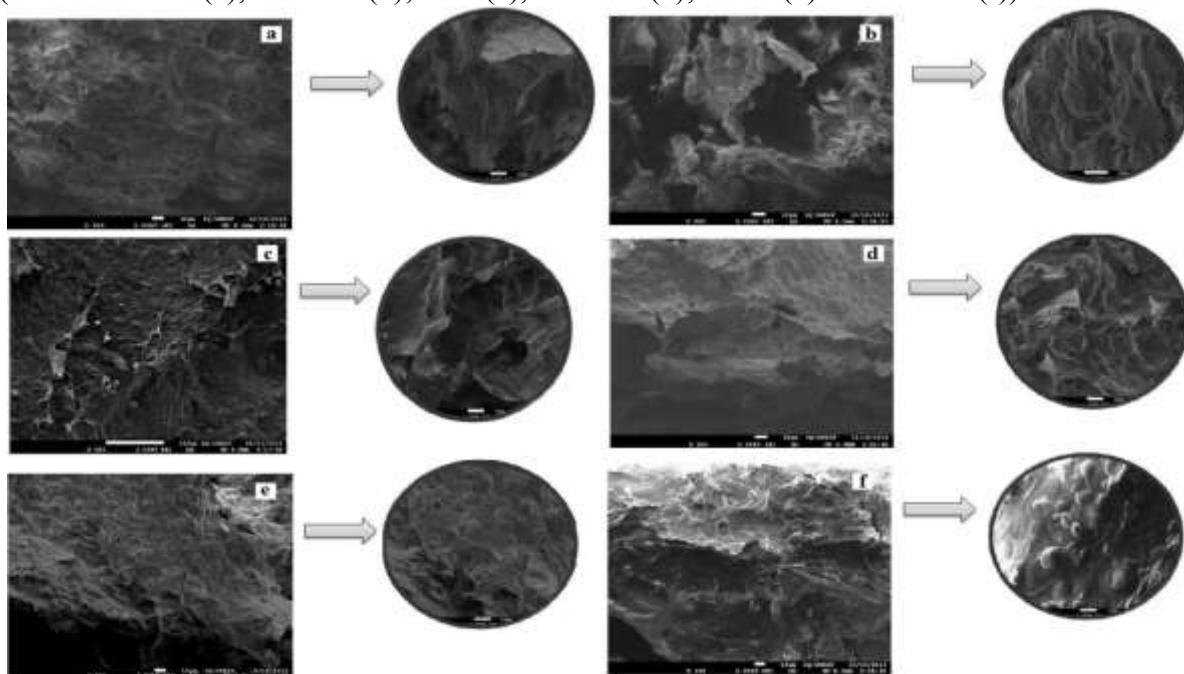


Através das fotomicrografias foi possível observar que as dispersões não-reticuladas, com e sem fármaco, (Figura 34) apresentaram-se estruturalmente mais densas, com aspecto irregular, porém com estruturas mais contínuas do que aquelas submetidas à reticulação. A adição do fármaco tornou as estruturas mais irregulares.

Essa maior densidade estrutural das amostras não reticuladas pode estar relacionada com o processo de retrogradação em ciclos alternados de temperatura. Segundo Yoon, Lee e Lim (2009), este processo influencia diretamente a estrutura das dispersões favorecendo a obtenção de um material menos poroso. Essa estrutura compacta é devido a possível propagação dos cristais induzida durante o armazenamento de 48 horas em 30 °C, tornando a matriz do gel mais densa (PARK; BAIK; LIM, 2009; SILVERIO et al., 2000; ZHOU; DI VONA; KNAUTH, 2010).

Rodríguez-Hernández e colaboradores (2003) também demonstraram que em géis de gelana, o aumento na concentração de gelana torna a rede estrutural do sistema mais contínua e densa, o que explica a maior densidade de D25 e D210 (Figura 34 c e d). Além disso, o aumento da concentração de amido em D210 também favoreceu a formação de uma estrutura mais compacta. Esse comportamento corrobora com os dados das propriedades mecânicas, confirmando a obtenção de estruturas mais compactas nas maiores concentrações de polímeros.

**Figura 33:** Fotomicrografias da estrutura interna das dispersões não-reticuladas liofilizadas dos polímeros, sem e com fármaco respectivamente, e nos aumentos 250 e/ou 500 e 1000x. (Amostras D15 (a), D15-CP (b); D25 (c), D25-CP (d); D210 (e) e D210-CP (f)).

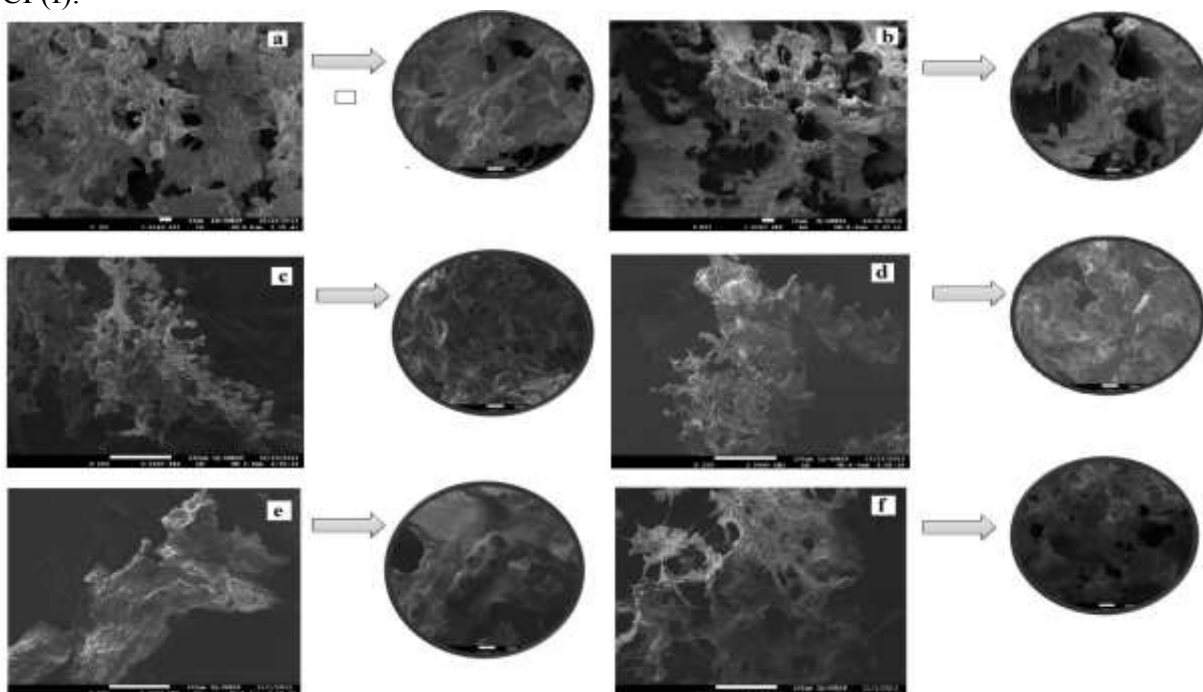


Redes estruturais mais porosas e irregulares foram observadas nos hidrogéis RI (Figuras 35). Em relação às dispersões não-reticuladas (Figura 34), entretanto, é possível notar que o aumento da concentração de gelana e do agente reticulante ( $Al^{3+}$ ) levou a formação de estruturas menos porosas e densas (Figura 35 e, f). Esse comportamento pode ser atribuído à capacidade da gelana, de caráter aniônico, em estabelecer interações fortes, ao se complexar com os cátions  $Al^{3+}$ , de modo que moléculas em dupla hélice se agregam e formam zonas de junção diminuindo a repulsão eletrostática entre as cadeias que se tornam mais próximas originando um gel mais denso e compacto (Figura 35 c).

Recentemente, Maiti e colaboradores (2011), em estudos com microcápsulas de goma gelana para a liberação prolongada de glipizida, demonstraram a eficiência da gelana e dos íon  $Al^{3+}$  na formação de um gel mais resistente e forte, em que cada íon foi capaz de estabelecer várias ligações com grupos carboxilatos e com os átomos de oxigênio dos grupos hidroxilas das cadeias de gelana levando ao maior fortalecimento da estrutura do gel.

A incorporação do fármaco parece ter favorecido a formação de estruturas mais densas (Figura 35 b, d, f), principalmente na maior concentração de gelana e agente reticulante, em que possivelmente houve a acomodação das partículas do fármaco nos espaços intra e intercadeias contribuindo para a formação de uma rede mais densa.

**Figura 34:** Fotomicrografias evidenciando a estrutura interna dos hidrogéis reticulados ionicamente liofilizados, sem e com fármaco, respectivamente, e nos aumentos 250 e/ou 500 e 1000x. H153RI (a), H153RI-CP (b); H253RI (c), H253RI-CP (d); H255-RI (e) e H255RI-CP(f).



Nos hidrogéis DR (Figura 36), de maneira geral, uma rede mais densa, com maior empacotamento das cadeias foi observada, quando comparada com as dispersões não-reticuladas e com os hidrogéis RI. Essa característica pode ter sido adquirida em consequência do maior grau de reticulação alcançado com a adição do glutaraldeído, que foi capaz de estabelecer ligações covalentes promovendo a diminuição dos espaços entre as cadeias, tornando a malha da rede mais estreita e contribuindo para formação de uma estrutura mais compacta, com zonas de junções mais permanentes e estáveis. Esse comportamento se apresenta em conformidade com dados de análise reológica, em que verificou-se que a DR contribuiu para o aumento da elasticidade dos hidrogéis e originou hidrogéis com elevado grau de reticulação.

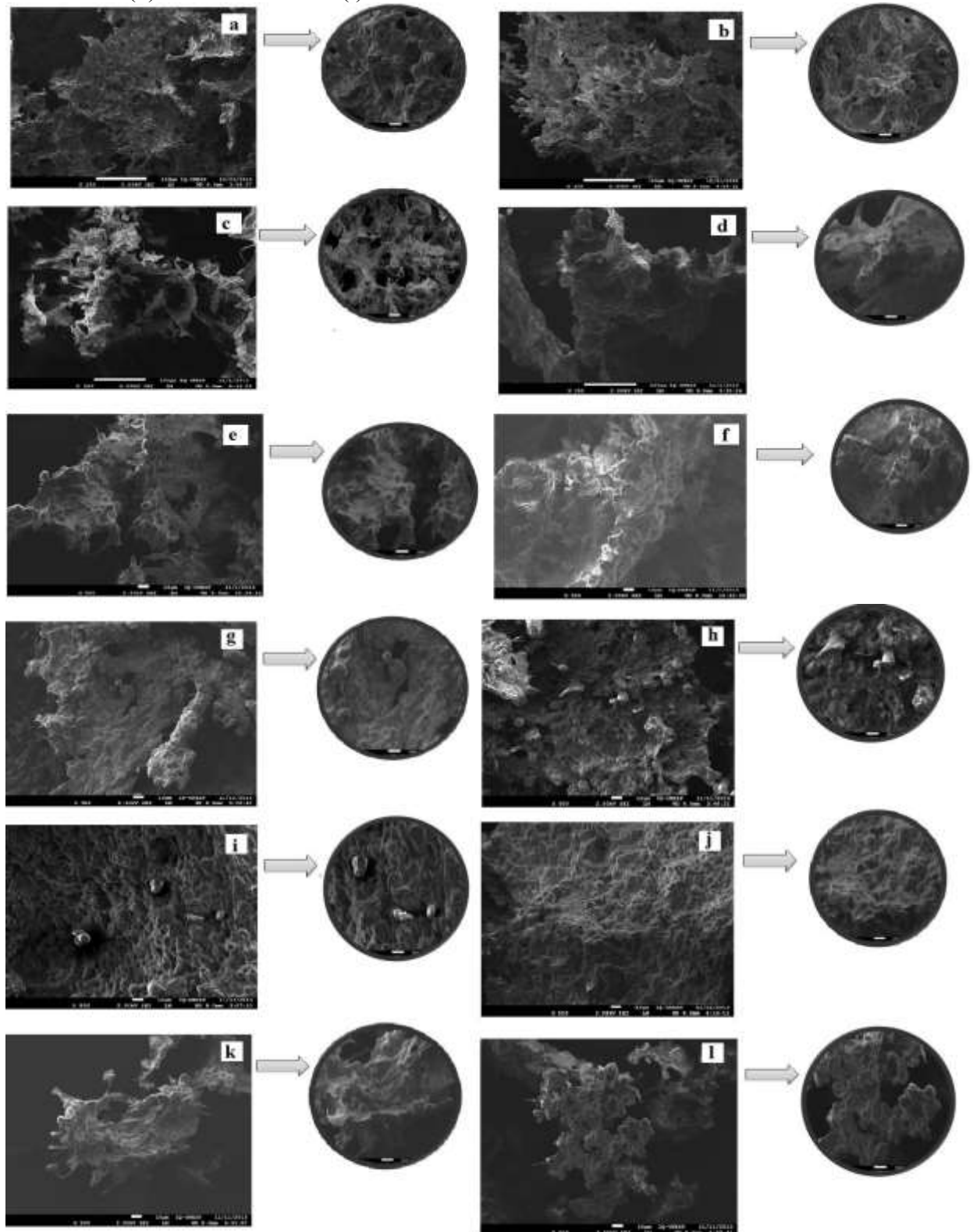
Essa capacidade do glutaraldeído em promover o fortalecimento de géis de amido/gelana também foi apresentada por Phromsopha e Baimark (2014), que demonstraram que as ligações cruzadas que ocorrem entre os grupos hidroxila das moléculas dos polímeros e os grupos aldeído de glutaraldeído dão origem a uma rede com menor mobilidade das cadeias e uma estrutura tridimensional com arranjos mais organizados.

Berger e colaboradores (2004) também observaram que, redes mais densas e compactas podem ser obtidas através de interações do tipo forças de Van Der Waals e pontes de hidrogênio, mas são especialmente alcançadas, de maneira mais rápida, pelas ligações iônicas e covalentes que ocorrem entre os polímeros e agentes reticulantes.

Elevadas concentrações de polímeros favoreceram a formação de hidrogéis mais densos, pois devem contribuir para maior densidade de reticulação, que leva ao aumento da força e densidade da estrutura do gel, ou seja, à medida que a concentração de polímeros aumentou, a rede tornou-se mais homogênea, com poros menores, e, portanto, mais densamente ligada (Figura 36 e, f, g, h, i, j, k, l, m).

A incorporação do fármaco também contribuiu na obtenção de estruturas mais densas e compactas, principalmente, quando os polímeros e agentes reticulantes estavam em suas máximas concentrações.

**Figura 35:** Fotomicrografias evidenciando estrutura interna dos hidrogéis duplamente reticulados liofilizados, sem e com fármaco respectivamente, nos aumentos 250 e/ou 500 e 1000X. H1535DR (a), H1535DR-CP (b); H2553DR (c), H2553DR-CP (d); H21031DR (e), H21031DR-CP (f); H21051DR (g), H21051DR-CP (h); H21053DR (i), H21053DR-CP (j); H21055DR (k) e H21055DR-CP (l).



De acordo com os resultados obtidos, as fotomicrografias das amostras evidenciaram que a incorporação do fármaco, elevadas concentrações de polímeros e agentes reticulantes e, principalmente, a DR contribuíram para obtenção de sistemas com estruturas mais densas e compactas, o que está em concordância com os resultados obtidos nos estudos das propriedades mecânicas.

#### **5.1.4 Difração de raios-x**

O conhecimento e a compreensão da estrutura do material utilizado na obtenção de produtos farmacêuticos são imprescindíveis, já que durante a obtenção desses produtos, mudanças estruturais e de suas propriedades físicas podem ocorrer. Sendo assim, a difração de raios-X (DRX) é uma técnica bastante utilizada, pois além de fornecer informações estruturais é um método não destrutivo (KARJALAINEN et al., 2005).

A DRX corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, que permite definir estruturas baseando-se na interação dos feixes de raios-x incidentes e os elétrons dos átomos que constituem um material (KARJALAINEN et al., 2005). Essa caracterização é constituída pela combinação de dois fenômenos diferentes: espalhamento de cada átomo individualmente e interferência entre as ondas espalhadas por estes átomos (BARROSO et al., 2002).

Cada átomo emite uma onda espalhada que é coerente com a radiação incidente e estas ondas interagem umas com as outras emitindo raios-x que são difratados a uma determinada intensidade. Esses fótons (feixes de raios-X) são emitidos e o equipamento registra a intensidade do raio em função do ângulo de espalhamento (BARROSO et al., 2002; KARJALAINEN et al., 2005). Distâncias intermoleculares e interatômicas dos materiais podem ser determinadas pela presença de picos finos característicos de materiais cristalinos, e picos mais alargados referentes a estruturas amorfas (CANEVAROLO JR, 2004; PANI et al., 2010).

Considerando dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios X dependem da diferença do caminho percorrido pelos raios-x e do comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg (Equação 9).

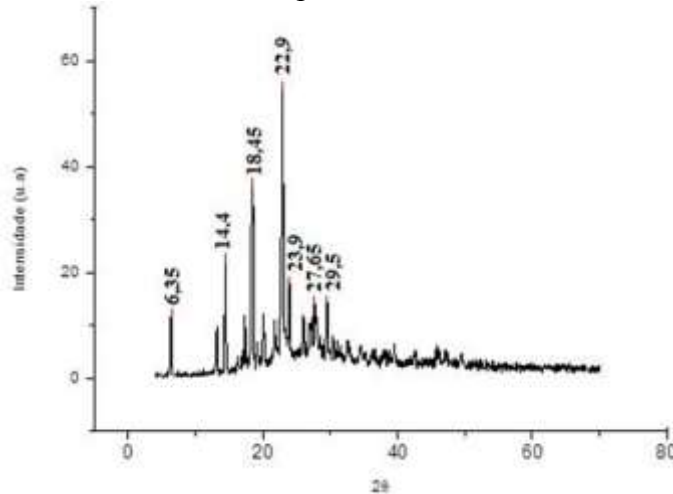
$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad (\text{Equação 9})$$

Em que:  $n$  = ordem de difração;  $d$  = distância entre os planos cristalinos;  $\lambda$  = comprimento de onda da radiação utilizada,  $\theta$  = ângulo de “Bragg” (medido entre o feixe incidente e os planos do cristal).

A análise de difração de raios-X foi realizada com fármaco livre, polímeros isolados, dispersões não reticuladas e hidrogéis RI e DR, com e sem fármaco, com a finalidade de avaliar possíveis diferenças estruturais entre as amostras estudadas. Os difratogramas dessas amostras estão apresentados nas Figuras 37 - 41.

O difratograma do CP (Figura 37) mostra vários picos intensos e bem definidos devido à própria natureza cristalina do fármaco (KIM; CHOI, 2002; MANNA et al., 2007). Vários picos são exibidos, principalmente em baixos valores de  $2\theta$ , em aproximadamente  $6,35^\circ$ ;  $14,4^\circ$ ;  $18,45^\circ$ ;  $22,9^\circ$ ;  $23,9^\circ$ ;  $27,65^\circ$  e  $29,5^\circ$  o que está em concordância com os valores relatados por Yadav e colaboradores (2013).

**Figura 36:** Difratograma de raios-x do cetoprofeno.



Os picos apresentados no difratograma da AA (HYLON VII<sup>®</sup>) (Figura 38) indicam a mistura dos polimorfos do tipo B e V, sendo os picos em  $17,02^\circ$ ,  $23^\circ$  e  $25^\circ$  ( $2\theta$ ) característicos de estruturas cristalinas tipo B, enquanto o pico em  $19,8^\circ$  é típico do polimorfo V que sugere uma estrutura cristalina bem organizada de complexos de lipídeos-amilose presentes nos grânulos de amido (CARBINATTO et al., 2012 ; FREIRE et al., 2009a; SHAMAI; BIANCO-PELED; SHIMONI, 2003; SOARES. et al., 2013).

No processo de retrogradação, inicialmente o amido é gelatinizado e se encontra no estado amorfo. Entretanto, durante o armazenamento e sob resfriamento, passa para um estado mais cristalino e ordenado, em que as cadeias poliméricas na forma de duplas hélices se reassociam em uma estrutura cristalina mais forte (SHI; GAO, 2011; HARALAMPU, 2000). Dessa forma, os grânulos de amido parcialmente cristalinos, após a retrogradação sofrem um aumento na cristalinidade e podem exibir diferentes padrões de difração evidenciando a combinação dos polimorfos A (cadeias curtas de amilopectina e densa ramificação), B (cadeias longas e menos densas de amilopectina), C (misturas das estruturas A e B) e V (complexos lipídeos-amilose) (CAI et al., 2014; CHEETHAM, TAO, 1998; KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000; PERERA; HOOVER, 1999; WANG et al., 2010; XIE et al., 2014).

No padrão de difração do AR (5 e 10%), os picos de polimorfos tipo B da AA em aproximadamente  $17^\circ$ ,  $23^\circ$ ,  $25^\circ$  ( $2\theta$ ) (Figura 45) apresentaram uma significativa redução da intensidade. No entanto, esse comportamento não necessariamente representa uma amorfização da estrutura, mas, de acordo com Mutungi e colaboradores (2012), pode ser atribuído à formação de cristalitos de reduzidas dimensões que ficam embebidos em uma matriz polimérica e que podem não reproduzir intensidades de espalhamento de raios-x suficientemente detectáveis o que, conseqüentemente, resulta em um difratograma com picos menos agudos e intensos.

Os picos em  $19,8^\circ$  ( $2\theta$ ) foram preservados no AR (5 ou 10%), evidenciando a cristalinidade tipo V, que é atribuída à cristalização das hélices simples da amilose, resultante da complexação da amilose com lipídeos, que existem junto com os polimorfos B da AA (KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000; LIU et al., 2014; SHRESTHA et al., 2010; ZHOU; DIVONA; KNAUTH, 2014).

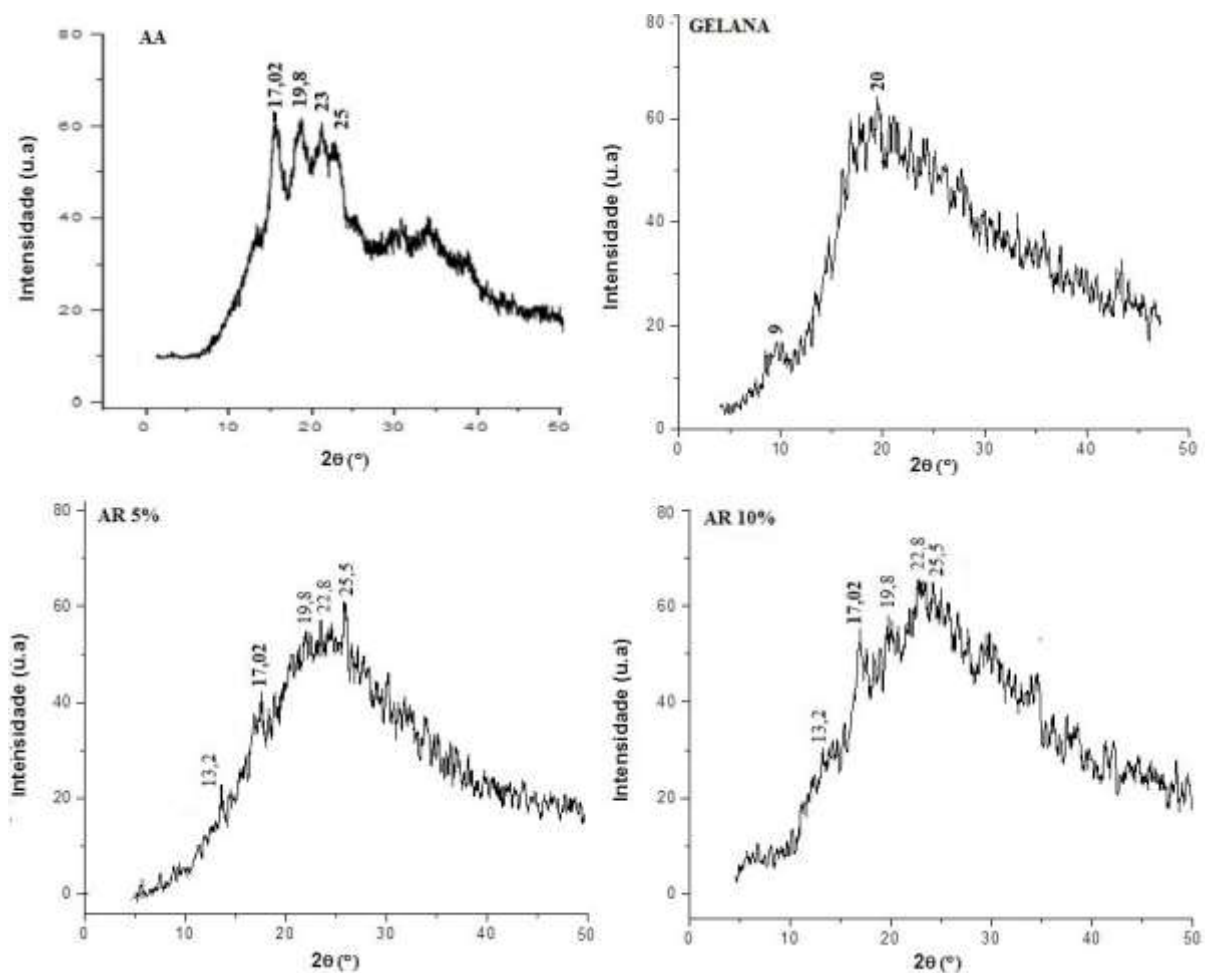
Foi verificado também o surgimento de picos em torno de  $13^\circ$  ( $2\theta$ ), típico de estrutura cristalina do tipo V o que, de acordo com Htoon e colaboradores (2010), é resultante do processo de retrogradação do amido que contribui para a modificação do polimorfo do tipo B para V.

De acordo com Cheetham e Tao (1998), o amido nativo que apresenta cerca de 65% de amilose possui uma baixa cristalinidade (em torno de 18%), que é atribuída ao empacotamento das duplas hélices da amilopectina. Assim, o padrão de difração apresentado para AA foi típico de um material semicristalino com alguns picos de cristalinidade do tipo B e V e que, após a retrogradação e a presença de elevada quantidade de AA contribuiu para o aumento do grau de cristalinidade, evidenciado pela preservação e surgimento de novos picos,

à semelhança dos resultados observados por Freire e colaboradores (2009), em estudos para avaliar a influência do tratamento térmico nas propriedades físico-químicas da AA de amido de milho.

Para a gelana, foi verificado um padrão de difração típico de materiais semicristalinos, caracterizado por um grande halo amorfo com somente dois picos mais alargados em torno de  $9^\circ$  e  $20^\circ$  ( $2\theta$ ), semelhantes aos relatados por Yang e colaboradores (2013).

**Figura 37:** Difratoogramas dos polímeros isolados: alta amilose (AA), gelana e amido retrogradado (AR).



Para as dispersões não-reticuladas (Quadro 14), com e sem fármaco (Figura 39), em todas as amostras foi verificado que os picos da gelana desapareceram, possivelmente pela sobreposição dos picos do amido nas mesmas regiões, que foram preservados.

Os picos característicos do polimorfo tipo B em aproximadamente  $17^\circ$ ,  $23^\circ$  e  $25^\circ$  ( $2\theta$ ) foram preservados em praticamente todas as amostras, porém com reduzida intensidade, assim como os picos em  $13^\circ$ ,  $19^\circ$  e  $19,8^\circ$  ( $2\theta$ ), que correspondem à presença da estrutura



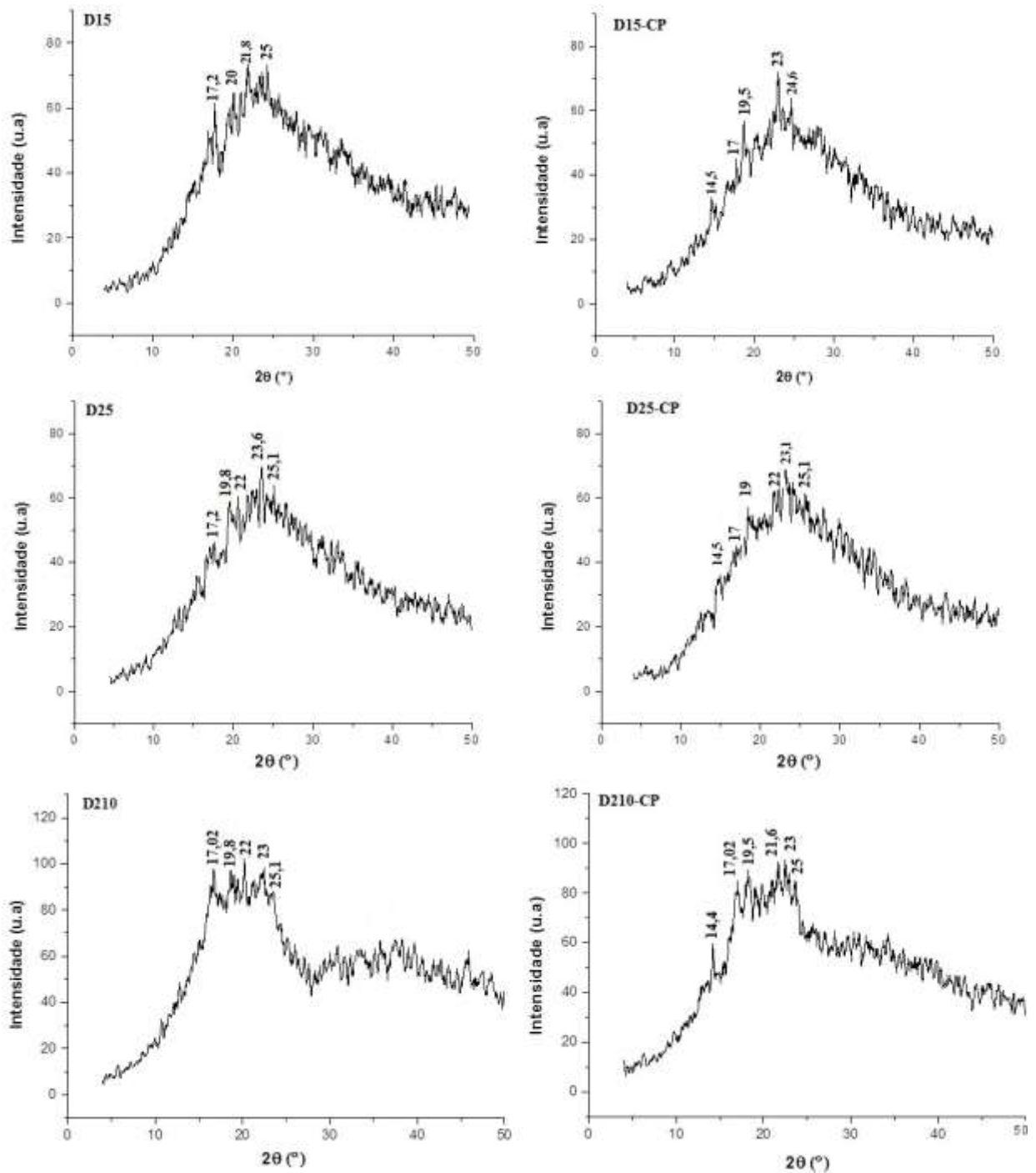
cristalina do tipo V de complexos amilose-lipídeos formados durante o processo cristalização da amilose (KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000; LIU et al., 2014; SHRESTHA et al., 2010; ZHOU; DI VONA; KNAUTH, 2014). O aparecimento de um novo pico em aproximadamente  $22^\circ$  ( $2\theta$ ) foi observado, característico de estruturas cristalinas tipo B (LIU et al., 2014; ZHOU; DI VONA; KNAUTH, 2014).

A preservação e o surgimento de novos picos evidenciam modificações estruturais que podem ser atribuídas ao aumento do grau de cristalinidade devido ao processo de retrogradação, ou mesmo à associação de polímeros que apresentam estruturas de duplas hélices em suas cadeias, o que pode ter favorecido a formação de uma estrutura mais compacta e cristalina.

Para as amostras D210 e D210-CP (Figura 39), observa-se a predominância dos picos semelhantes ao da AA (Figura 38), provavelmente devido à maior proporção de AA presente no AR (10%) utilizado.

Além disso, é possível observar que a intensidade dos picos nessas amostras foram, notavelmente, maiores em relação às demais, o que é coerente, pois segundo Freire e colaboradores (2009), a intensidade dos picos está relacionada com o grau de cristalinidade, e que, após o tratamento hidrotérmico, a maior concentração de amilose exibiu picos de maior intensidade evidenciando maior grau de cristalinidade.

Para as dispersões não reticuladas, contendo CP, o pico em  $14,5^\circ$  ( $2\theta$ ) característico do fármaco (YADAV et al., 2013) foi mantido em todas as amostras. O desaparecimento de alguns picos do CP, nos difratogramas de algumas amostras, pode ser atribuído à sobreposição de alguns picos de maior intensidade do amido, ou mesmo por um efeito de diluição do fármaco na matriz polimérica.

**Figura 38:** Difratogramas das amostras não reticuladas de gelana/AR, sem e com fármaco.

Com base os resultados apresentados, a variação da concentração de gelana parece não ter influenciado nos padrões de difração de raios-x das dispersões, porém a presença do AR levou a obtenção de estruturas com elevado grau de cristalinidade, em que observa-se a predominância da mistura de estruturas cristalinas do tipo B e V.

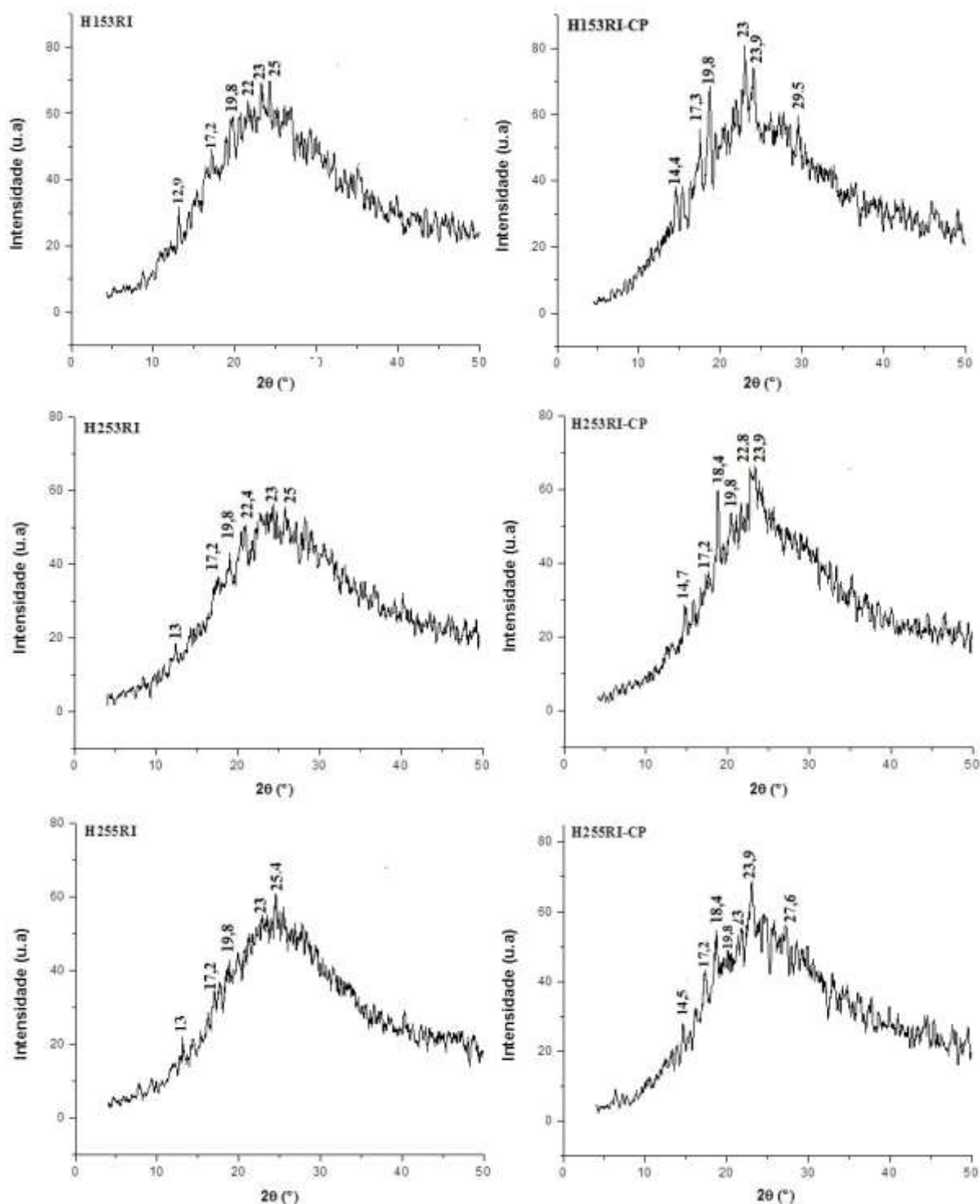
Os picos característicos da gelana não foram exibidos nos difratogramas dos hidrogéis

RI, com e sem fármaco (Figura 40), podendo ser atribuído a um possível processo de diluição da gelana ou mesmo a sobreposição dos picos mais intenso do amido ou do fármaco.

Para os hidrogéis RI sem fármaco, os picos referentes aos polimorfos B e V, característicos do AR, foram preservados em todas as amostras, porém com uma intensidade reduzida, à semelhança dos difratogramas do AR 5 e 10%. O padrão de difração exibido por esses hidrogéis não deve ser traduzido como uma amorfização das amostras, pois segundo Mutungi e co-autores (2012), esse comportamento pode ser atribuído à formação de cristalitos de menores dimensões que não apresentam padrão de difração detectável. Além disso, a formação de dobras e enovelamentos de cadeias terminais e ramificações que estão presentes no interior dos cristalitos constituem interfaces não cristalinas que alteram a distância relativa entre os átomos correspondentes, levando a perda da capacidade de dispersão dos raios-x que tornam-se difusos.

Nos hidrogéis contendo cetoprofeno, foi verificado que a estrutura cristalina do fármaco foi preservada, evidenciada pela presença de picos bem definidos em torno de 14,4°, 18,4°, 23,9°, 27,6° e 29,5° (2 $\theta$ ) (YADAV et al., 2013).

Figura 39: Difratogramas dos hidrogéis reticulados ionicamente



Os resultados obtidos com os hidrogéis RI demonstraram que os padrões de difração dos polimorfos tipo B e V do AR foram preservados em todas as amostras. Além disso, mudanças observadas nos difratogramas, como o aumento da intensidade, desaparecimento e/ou surgimento de novos picos, também podem ser atribuídas a alterações na rede

tridimensional dos materiais devido ao processo de reticulação, conforme relatado por Carbinatto e colaboradores (2012), em estudos com misturas de AA reticulada com pectina.

Para os hidrogéis DR sem fármaco (Figura 41), de maneira geral, foi verificado o desaparecimento dos picos da gelana, que mais uma vez pode ser atribuído à sobreposição dos picos mais intensos do AR, ou mesmo por um processo de diluição da gelana na matriz polimérica.

Os picos característicos dos polimorfos tipos B e V foram preservados, sendo que nos hidrogéis H2553DR e H21055DR foi verificado o surgimento de um pico em aproximadamente  $22^\circ$  ( $2\theta$ ), também característico de estruturas cristalinas tipo B.

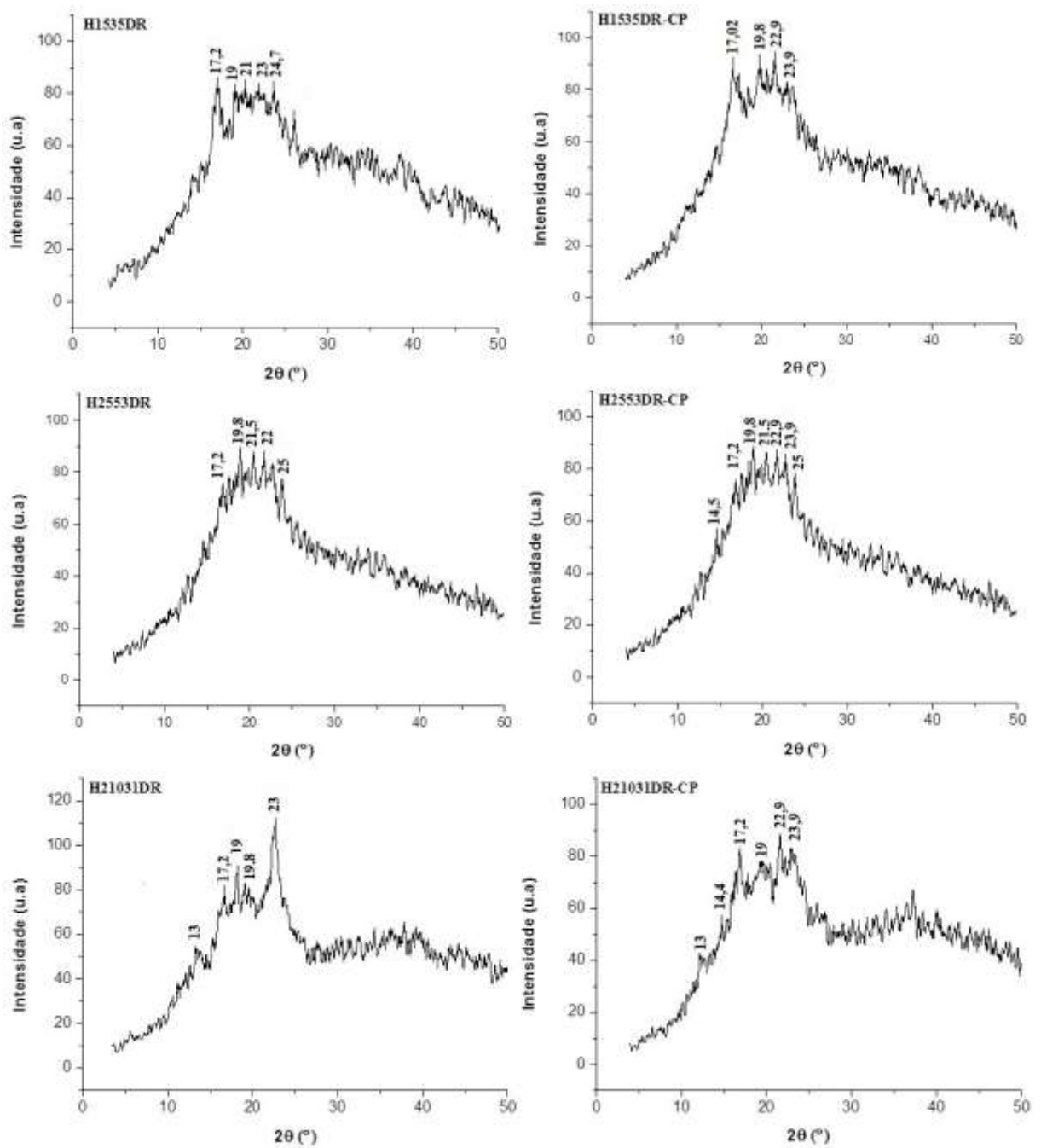
Os difratogramas dos hidrogéis contendo maiores concentração de AR (10%) exibiram picos em  $13^\circ$  ( $2\theta$ ), característico de polimorfos tipo V, sugerindo uma estrutura cristalina altamente ordenada resultante da complexação entre amilose e lipídeos (FREIRE et al., 2009; CARBINATTO, et al., 2012; SOARES, et al., 2013) e que, de acordo com Htoon e colaboradores (2010), é formada após a gelatinização do amido, seguido dos ciclos de resfriamento, em que a estrutura da AA passa de tipo B para tipo V.

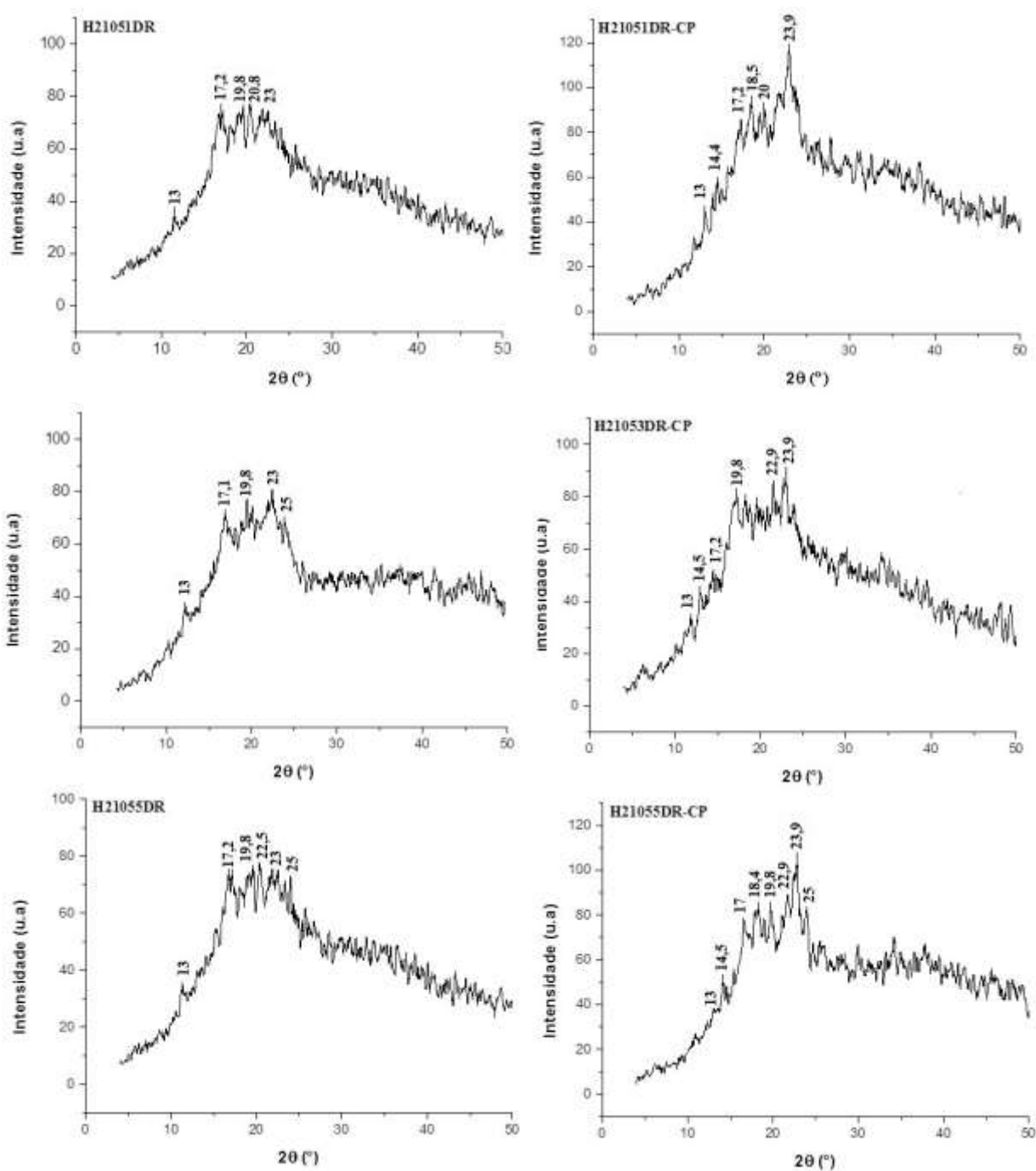
Nos hidrogéis contendo fármaco, foi verificado que a estrutura cristalina do fármaco foi preservada, evidenciada pelos picos em  $14,5^\circ$ ,  $18,4^\circ$ ,  $22,9^\circ$  e  $23,9^\circ$  ( $2\theta$ ) (YADAV et al., 2013).

Os difratogramas dos hidrogéis DR, de maneira geral, indicam um aumento da cristalinidade evidenciada pela maior intensidade dos picos (Figura 41). Esse comportamento pode ser atribuído à possibilidade da reticulação com glutaraldeído ter promovido uma maior reorganização estrutural originando estruturas mais compactas e organizadas e, consequentemente, resultando no aumento da cristalinidade.

Os dados de análise de resistência do gel (Tabela 5) indicaram a formação de hidrogéis mais resistentes para as amostras DR, o que pode estar relacionado também à formação de estruturas com maior grau de cristalinidade.

Figura 40: Difratomogramas dos hidrogéis dupla reticulação.





De acordo com os dados obtidos nas análises de DRX, foi verificado que a natureza semicristalina dos polímeros foi preservada e que o processo de retrogradação do amido, bem como a reticulação, promoveram modificações estruturais.

A maior concentração de polímeros e a DR, de maneira geral, contribuiu para o aumento das regiões cristalinas no interior dos hidrogéis, possivelmente pela estabilidade gerada pelas ligações covalentes e pela elevada quantidade de cristalitos formados ao longo da matriz polimérica. Esses resultados corroboram com aqueles apresentados na análise

reológica, em que os hidrogéis DR se apresentaram como estruturas de mais elevado grau de reticulação e de caráter predominantemente mais elástico (resposta sólida) em relação aos hidrogéis RI.

## 5.2 Obtenção das micropartículas

As micropartículas obtidas a partir de hidrogéis RI foram produzidas pelo método de geleificação ionotrópica em meio aquoso utilizando-se  $\text{AlCl}_3$  como agente reticulante. Após a reticulação iônica as micropartículas foram adicionadas em solução aquosa de glutaraldeído, obtendo-se assim as micropartículas DR.

Para obtenção das micropartículas através do gotejamento, alguns parâmetros importantes devem ser otimizados, como concentração dos polímeros e agentes reticulantes, viscosidade, diâmetro da agulha, a altura e velocidade de gotejamento (CHAN et al., 2009). Dessa forma, sendo a concentração dos polímeros um parâmetro de grande importância para obtenção das micropartículas, estudos preliminares foram realizados para verificar o efeito dessa variável na obtenção dos sistemas.

A geleificação ionotrópica baseia-se na capacidade de polieletrólitos (polímeros que apresentam grupos ionizáveis) formarem micropartículas na presença de íons. Quando uma solução polimérica, incorporada do fármaco, é adicionada gota a gota a uma solução aquosa de cátions polivalentes, os cátions se difundem em direção as gotas poliméricas e através de interações iônicas contribuem para formação de uma rede tridimensional (PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012) de hidrogel reticulada dando origem a micropartícula.

Para micropartículas RI, observou-se que a maior concentração de gelana favoreceu o aumento da viscosidade das dispersões e, conseqüentemente, as micropartículas obtidas apresentaram-se mais esféricas em relação aquelas com menores concentrações de polímeros. Entretanto, em todas as amostras, foi observada a formação de caudas e a circularidade apresentou-se em torno de 0,79, sendo 1,0 o valor do círculo perfeito (Figura 42).

A irregularidade morfológica verificada nas micropartículas RI, contendo menores concentrações de polímeros, é coerente, pois em estudo de microesferas de goma gelana e pectina, Prezotti (2013) verificou que as dispersões que apresentavam maior concentração de polímeros (2%, m/v) permitiram a obtenção de microesferas com melhores propriedades morfológicas e que, nas menores proporções, houve formação de caudas e menores valores de circularidade, devido a menor viscosidade das dispersões.

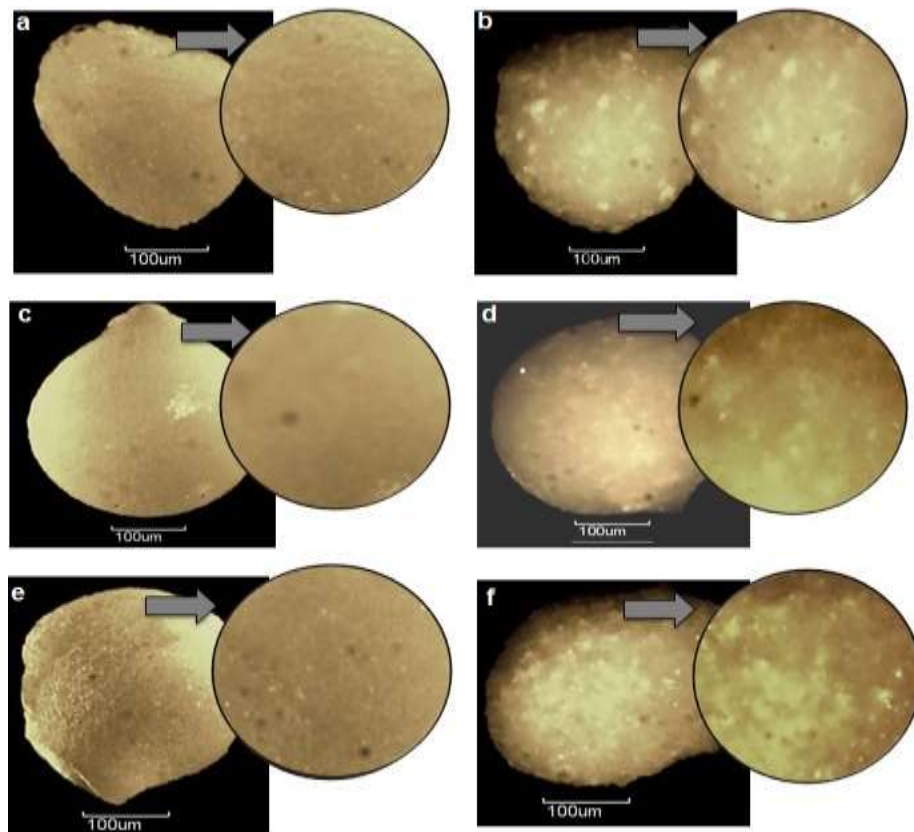


A padronização da distância entre o bisel da agulha e a superfície da solução reticulante também foi realizada e verificou-se que as menores distâncias contribuíram para formação de partículas mais esféricas.

A superfície das micropartículas contendo CP apresentou maior irregularidade, caracterizada por uma elevada rugosidade (Figura 42 b, d, f), ao contrário do que foi verificado nas micropartículas sem fármaco, que foram mais lisas e uniformes (Figura 42 a, c, e).

Essa irregularidade de superfície pode estar relacionada com a possibilidade de distribuição do fármaco na superfície da micropartícula, que ocorre durante o processo de secagem do sistema, em que a água evapora e se move para a superfície do gel carregando as partículas do fármaco que podem sofrer uma distribuição heterogênea ao longo da matriz do hidrogel, permanecendo em concentrações mais elevadas na superfície, conforme relatado por Huang e Brazel (2001).

**Figura 41:** Fotomicrografia das micropartículas reticuladas ionicamete, sem e com cetoprofeno: M153RI (a); M153RI-CP (b); M253RI (c); M253RI-CP (d); M255RI (e) E M255RI-CP (f).

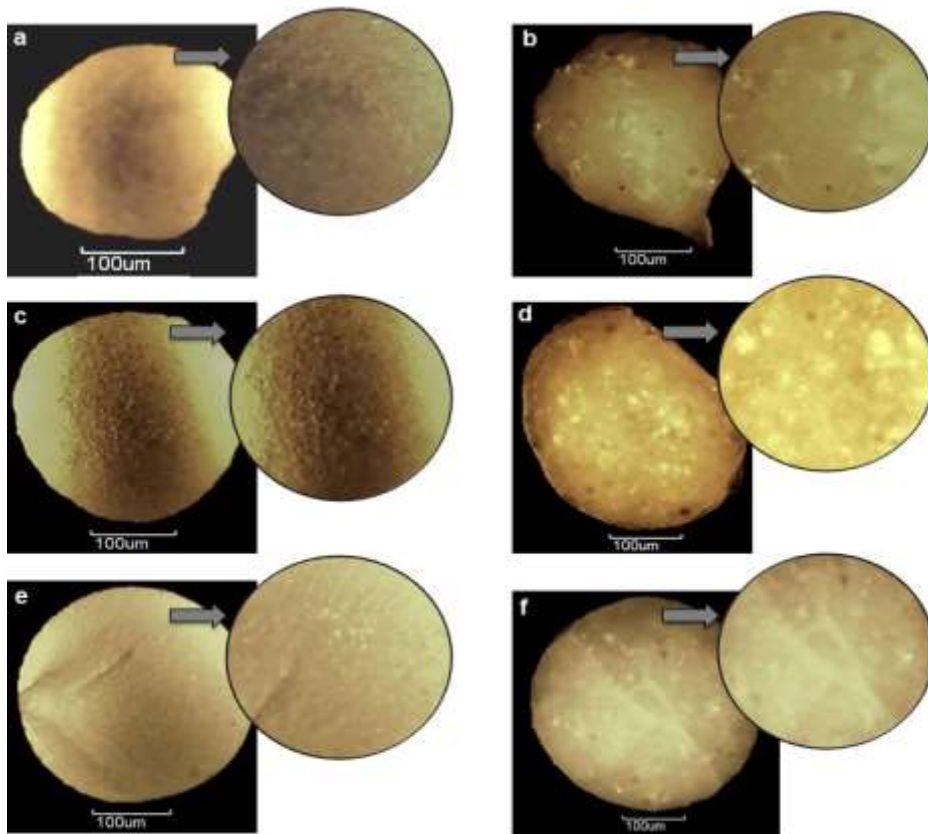


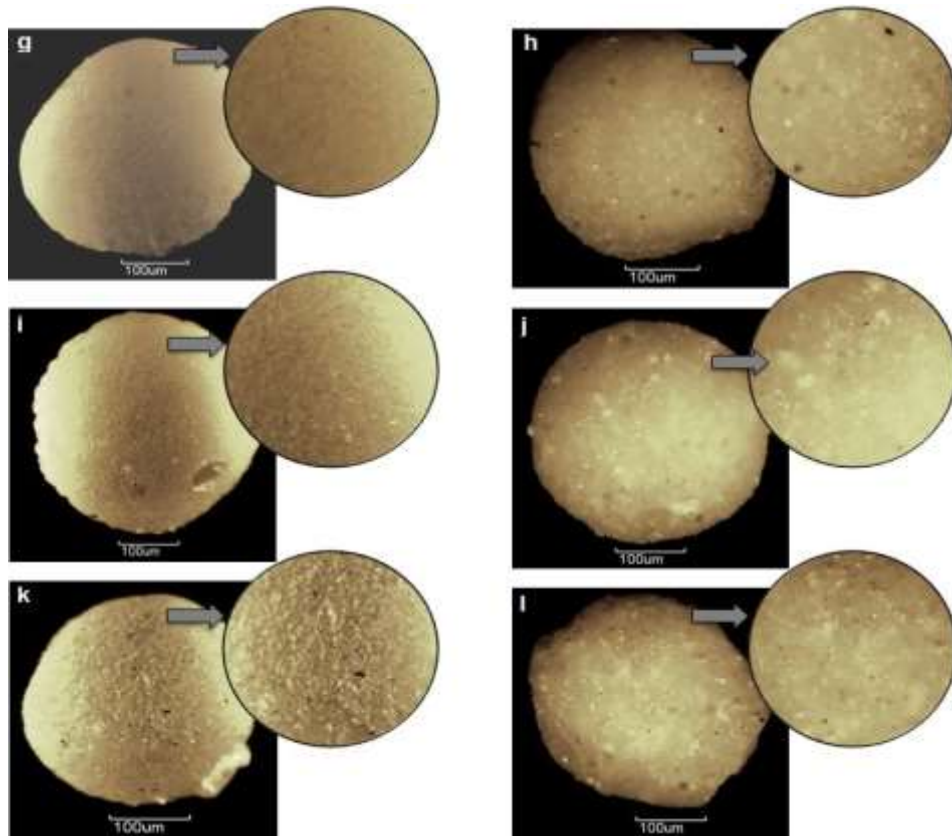
Para as micropartículas DR foi verificado que a formação de caudas e a deformação ocorreram somente quando ambos os polímeros estavam em suas menores concentrações (Figura 43 a e b), que pode ser atribuído à menor viscosidade dessas dispersões. De acordo com Chan e colaboradores (2009), quanto menor a viscosidade e a tensão superficial das gotas, maior o efeito de impacto e arraste quando entram em contato com a solução reticulante, dessa forma pode ocorrer à deformação das micropartículas.

As micropartículas contendo elevadas concentrações de ambos os polímeros, independente das concentrações dos agentes reticulantes, favoreceram o aumento da viscosidade e, conseqüentemente, partículas mais esféricas foram obtidas com uma circularidade média em torno de 0,84.

Em relação à incorporação do fármaco, assim como nas amostras RI, a parede das micropartículas DR contendo cetoprofeno se apresentou rugosa e irregular (Figura 43 b, d, f, h, j e l).

**Figura 42:** Fotomicrografia das micropartículas duplamente reticuladas, sem e com cetoprofeno: M1535DR (a); M1535DR-CP (b); M2553DR (c); M2553DR-CP (d); M21031DR (e); M21031DR-CP (f); M21051DR (g); M21051DR-CP (h); M21053DR (i); M21053DR-CP (j); M21055DR (k) e M21055DR-CP (l).





Com base nos resultados obtidos foi verificado que a maior concentração de polímeros, independente das concentrações de reticulantes, favorece a obtenção de partículas mais esféricas. Além disso, verificou-se que DR contribuiu para formação de partículas maiores, principalmente nas maiores concentrações de polímeros, provavelmente devido a maior viscosidade. A superfície irregular das amostras foi atribuída à possível distribuição do fármaco nessa região.

### 5.3 Caracterização das micropartículas

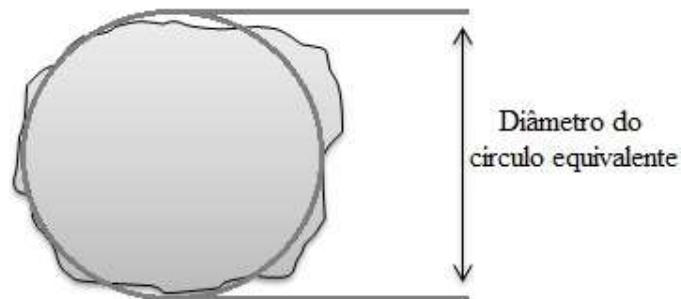
#### 5.3.1 Análise de tamanho e forma das micropartículas

O tamanho das micropartículas é um fator determinante na cinética de liberação, ou seja, o controle e a distribuição do tamanho de micropartículas apresentam implicações importantes no controle da liberação de fármacos. Assim sendo, é de extrema importância que o método de obtenção seja capaz de produzir micropartículas esféricas e com distribuição de

tamanho monodispersa para que as taxas de liberação sejam eficientemente reprodutíveis (BEKLAND; KIM; PACK, 2001; CHAN et al., 2009).

A caracterização da morfologia de micropartículas inclui uma descrição qualitativa da aparência e uma análise quantitativa através de cálculos dos diferentes fatores que influenciam a forma da partícula (MIKLI et al., 2001). Assim, para avaliar o fator forma das micropartículas foi verificado o grau de circularidade, em que os valores mais próximos de 1 indicam partículas mais próximas de um círculo perfeito (STANIFORTH, 2005), e o diâmetro do círculo equivalente, em que a medida baseia-se na forma hipoteticamente esférica da partícula e representa uma aproximação em relação à forma real dela. O diâmetro da área projetada consiste em um círculo equivalente ao da imagem dessa partícula sólida projetada (Figura 44) (AULTON, 2005).

**Figura 43:** Fator forma analisado pelo diâmetro do círculo equivalente.



Fonte: autoria própria

Neste trabalho, avaliou-se a influência das concentrações de polímeros, fármaco e agentes reticulantes sobre o tamanho e a forma das micropartículas. A distribuição de tamanho das amostras através do cálculo do índice Span, também foi avaliada.

O índice de Span representa a polidispersidade, ou seja, a amplitude da distribuição de tamanho, que pode ser classificada em monodispersa (estreita distribuição) e polidispersa (ampla distribuição) (GAUMET et al., 2008). Os valores do índice de polidispersidade (IP ou Span) podem variar em uma escala de 0 a 1. Um IP inferior a 0,1 está associado a uma elevada homogeneidade da população das micropartículas, sendo esta considerada monodispersa. Valores de IP acima de 0,1, igual ou inferior a 1 indicam populações de micropartículas polidispersas (ABASHZADEH et al., 2011; AL-SHDEFAT et al., 2012; GAUMET et al., 2008; KAFSHGARI et al., 2010; KAWADKAR; CHAUHAN, 2012).

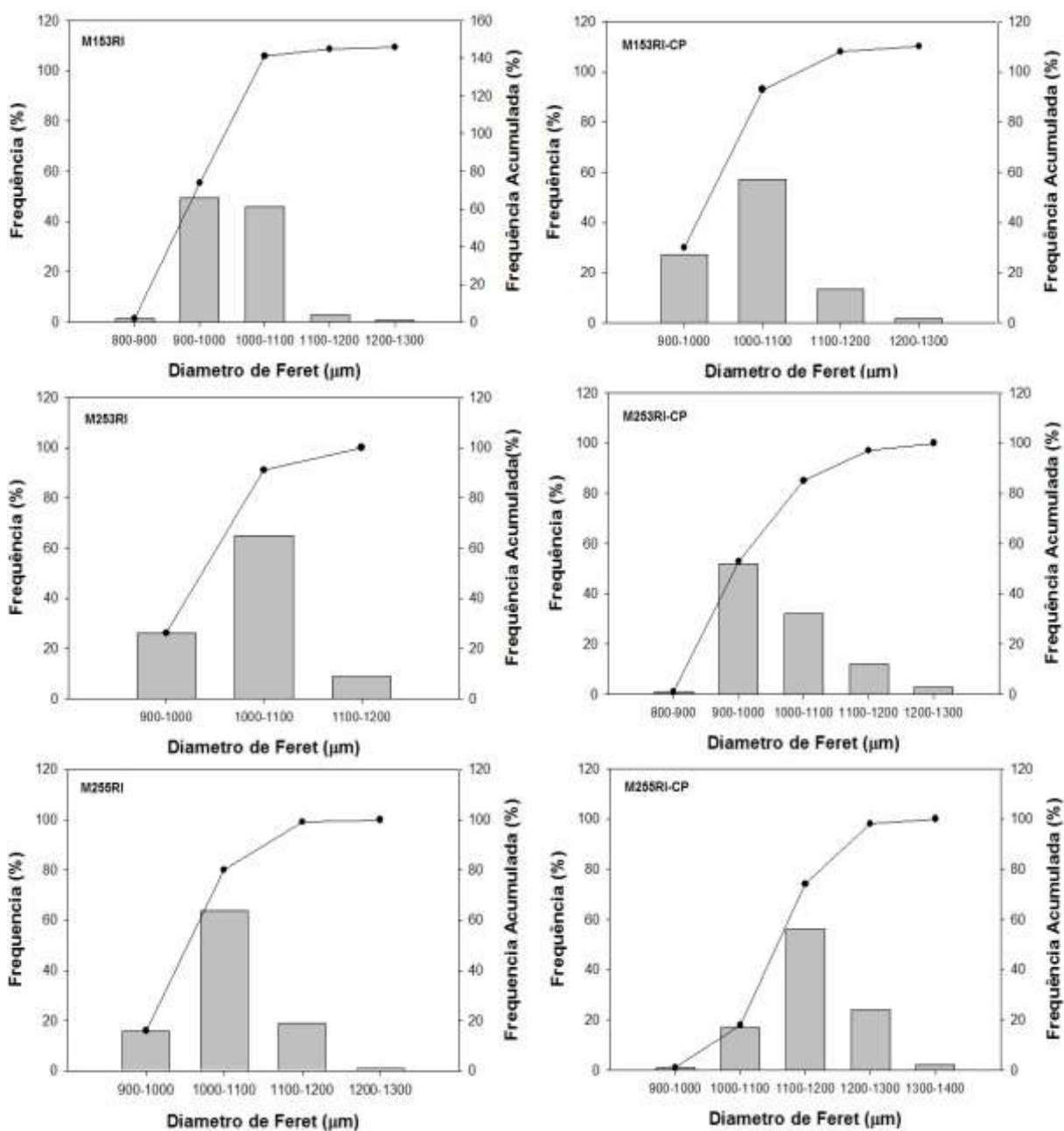
Através da análise qualitativa foi verificado que as concentrações de polímeros e do fármaco influenciaram de maneira significativa a forma das micropartículas, já que macroscopicamente é possível verificar que as maiores concentrações de ambos os polímeros levou ao aumento do tamanho das micropartículas. Por outro lado, a incorporação do fármaco promoveu maior irregularidade na superfície das micropartículas, o que pode estar relacionado à acomodação do fármaco nessa região (PREZOTTI, 2013). A faixa de tamanho das micropartículas foi de 1 - 1,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

As amostras RI (Figura 45) demonstraram distribuição de tamanho unimodal, ou seja, com valores compreendidos em um único intervalo, sendo que as amostras M153RI-CP e M253RI-CP apresentaram uma assimetria positiva, indicando uma maior concentração de partículas de menor diâmetro.

Uma análise mais detalhada da distribuição de tamanho das micropartículas foi realizada através do IP. Os valores de índice de Span das amostras RI (Tabela 7) compreendidos entre 0,12 e 0,20 indicaram a polidispersidade das micropartículas RI, já que segundo Gaumet e colaboradores (2008), para ser considerada monodispersa uma população de partículas deve apresentar valores de Span abaixo de 0,1, que indicam elevada homogeneidade.

Os perfis de distribuição de tamanho das micropartículas RI estão representados na Figura 45 e os valores do diâmetro médio, circularidade e índice Span na Tabela 7.

**Figura 44:** Distribuição de tamanho de partícula para as micropartículas reticuladas ionicamente.



As micropartículas RI, sem fármaco (Tabela 7), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o diâmetro e circularidade ( $p < 0,05$ ). As amostras incorporadas de CP também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para circularidade, entretanto o maior diâmetro foi verificado na amostra M255RI-CP ( $1155,518 \pm 68,466$ ) ( $p < 0,05$ ).

Esse aumento do diâmetro pode ser atribuído à capacidade da gelana, em elevadas concentrações, de aumentar a viscosidade do gel e, conseqüentemente, favorecer a formação

de partículas de maior diâmetro. Além disso, a elevada concentração do reticulante provavelmente contribuiu com esse comportamento, devido à formação de uma estrutura mais ramificada, originando partículas maiores.

Narkar e colaboradores (2010) também verificaram que nas maiores concentrações de gelana as partículas formadas eram maiores. Além disso, Prezotti, Cury e Evangelista (2014), em estudos com microesferas mucoadesivas de gelana/pectina para controle das taxas de liberação do fármaco, observaram que a maior concentração de  $Al^{3+}$  (5%) contribuiu de maneira significativa para o aumento do tamanho das partículas.

A presença do CP levou ao aumento do diâmetro de M255RI-CP, entretanto, de modo geral, foi verificado que a incorporação do fármaco levou à diminuição da circularidade das amostras ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7:** Circularidade, diâmetro do círculo equivalente e índice Span das micropartículas reticuladas ionicamente, sem e com cetoprofeno.

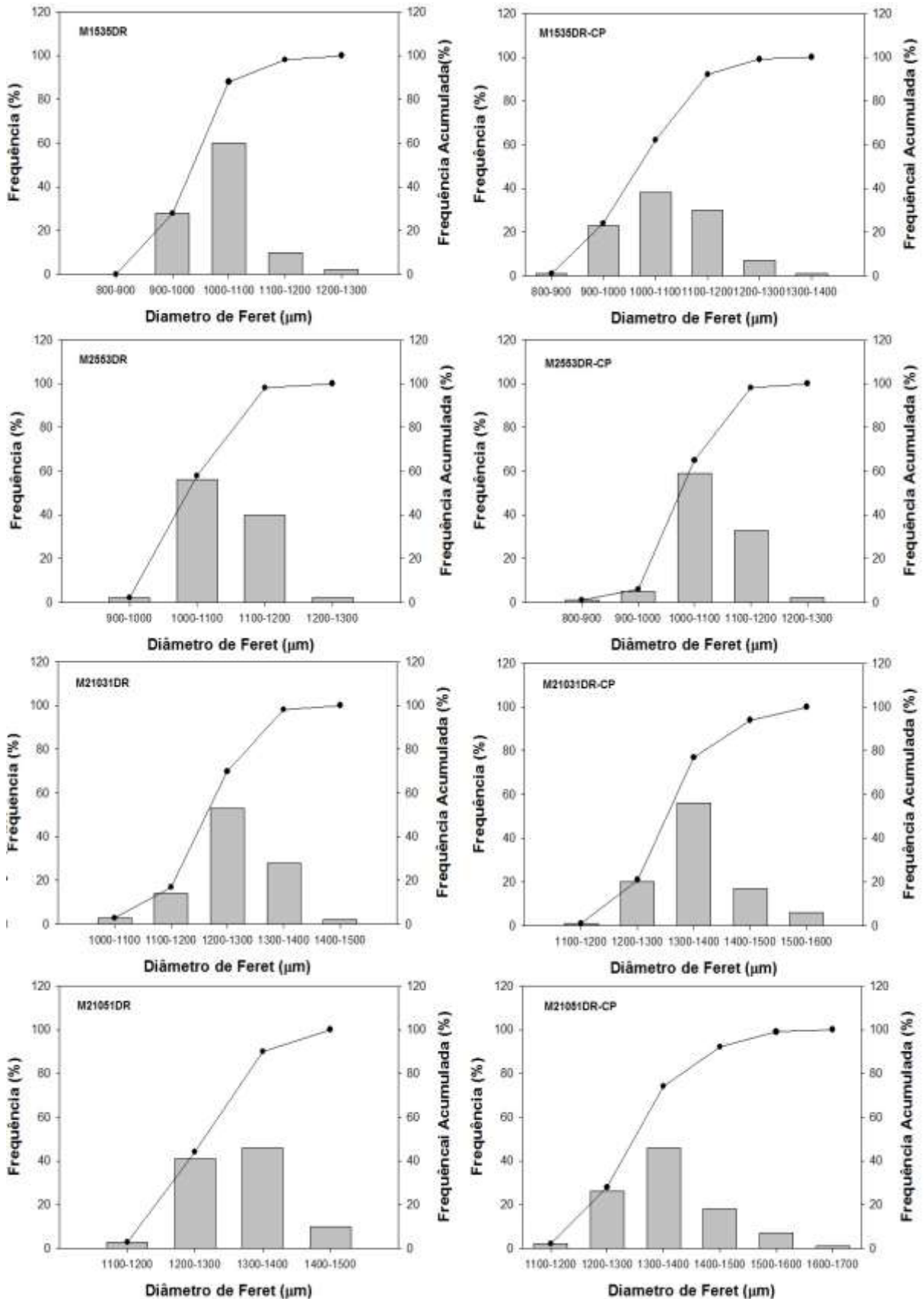
AMOSTRAS	Circularidade	Diâmetro do círculo equivalente ( $\mu m$ )	Span
M153RI	$0,814 \pm 0,037$	$1016,268 \pm 46,721$	0,12
M153RI-CP	$0,787 \pm 0,036$	$1039,065 \pm 66,784$	0,12
M253RI	$0,793 \pm 0,061$	$1036,387 \pm 45,947$	0,20
M253RI-CP	$0,771 \pm 0,045$	$1018,428 \pm 78,032$	0,15
M255RI	$0,794 \pm 0,060$	$1052,871 \pm 54,921$	0,19
M255RI-CP	$0,785 \pm 0,053$	$1155,518 \pm 68,466$	0,17

As amostras DR (Figura 46) também exibiram uma distribuição de tamanho unimodal e, de acordo com a classificação de Gaumet e colaboradores (2008), somente as amostras M21031DR, M21053DR, M21055DR, M2553DR-CP, M21031DR-CP, M21051DR-CP e M21053DR-CP podem ser consideradas monodispersas, pois estas apresentaram valor igual a 0,09 (Tabela 8).

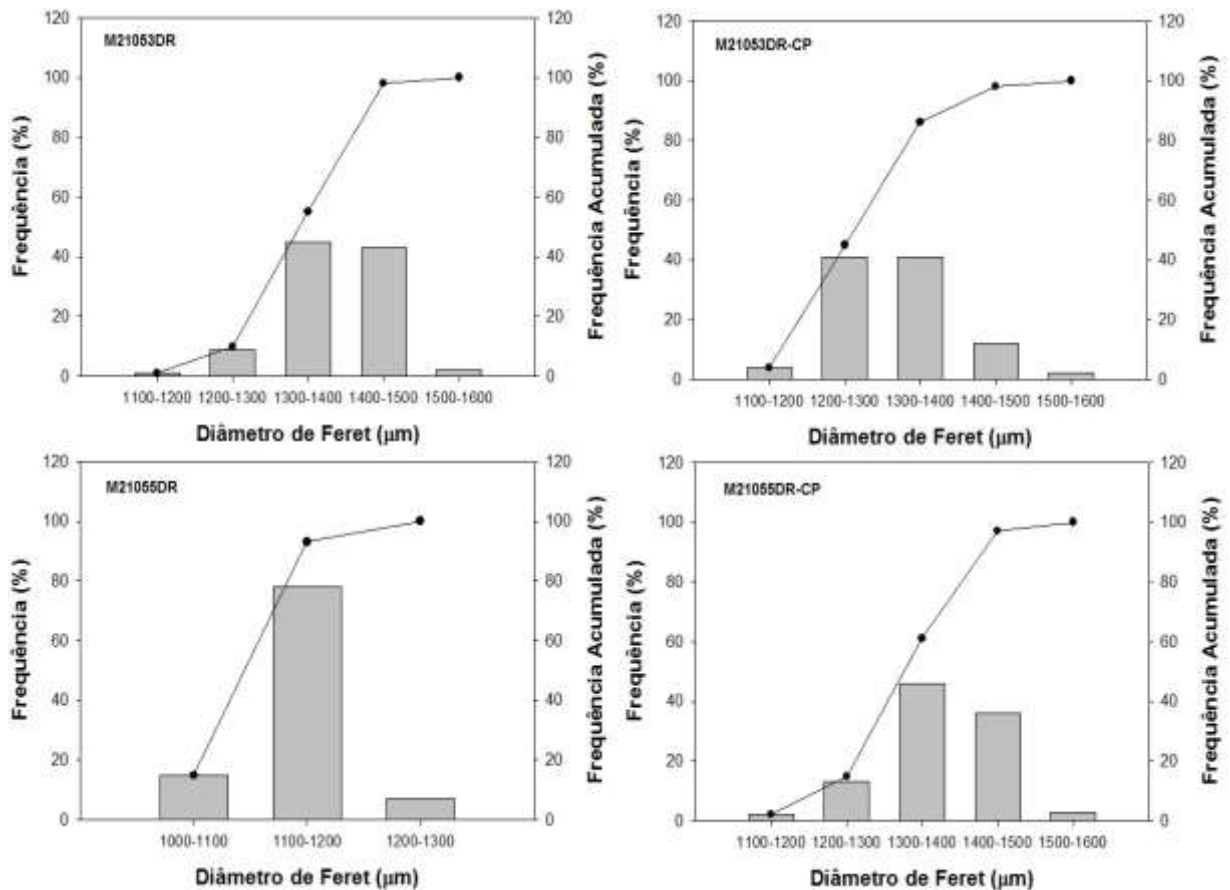
Os perfis de distribuição de tamanho das micropartículas DR estão apresentados na Figura 46 e os valores do diâmetro médio, circularidade e índice Span na Tabela 8.



**Figura 45:** Distribuição de tamanho de partícula para as micropartículas duplamente reticuladas.







Para as micropartículas DR, de maneira geral, a maior concentração de ambos os polímeros, independente das concentrações dos agentes reticulantes, e a incorporação do fármaco levou aumento do diâmetro das amostras ( $p < 0,05$ ). Esse comportamento pode ser atribuído à capacidade da maior concentração de polímeros em favorecer a formação de uma rede estrutural mais volumosa, de modo que a acomodação das partículas do fármaco nos espaços intercadeias, contribuiu para a expansão da rede e, conseqüentemente, resultou em partículas de maiores dimensões. Da mesma maneira, esse comportamento também foi relatado em estudos com microesferas de gelana/pectina (PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014), microesferas de gelana para liberação controlada (NARKAR; SHER; PAWAR, 2010) e microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído para liberação controlada (NAYAK et al., 2009).

O maior valor de diâmetro e circularidade foi observado na amostra M21053DR ( $p < 0,05$ ), novamente demonstrando que a maior concentração de polímeros contribui com o aumento desses parâmetros.

**Tabela 8:** Circularidade, diâmetro do círculo equivalente e índice Span das micropartículas duplamente reticuladas, sem e com cetoprofeno.

AMOSTRAS	Circularidade	Diâmetro do círculo equivalente ( $\mu\text{m}$ )	Span
M1535DR	0,795 $\pm$ 0,048	1033,377 $\pm$ 60,934	0,15
M1535DR-CP	0,804 $\pm$ 0,045	1073,148 $\pm$ 86,814	0,14
M2553DR	0,843 $\pm$ 0,033	1097,338 $\pm$ 44,587	0,10
M2553DR-CP	0,836 $\pm$ 0,030	1075,381 $\pm$ 60,275	0,09
M21031DR	0,848 $\pm$ 0,029	1256,472 $\pm$ 71,825	0,09
M21031DR-CP	0,841 $\pm$ 0,030	1358,130 $\pm$ 80,787	0,09
M21051DR	0,834 $\pm$ 0,037	1314,956 $\pm$ 67,557	0,11
M21051DR-CP	0,833 $\pm$ 0,028	1349,179 $\pm$ 91,114	0,09
M21053DR	0,850 $\pm$ 0,029	1383,990 $\pm$ 70,206	0,09
M21053DR-CP	0,828 $\pm$ 0,030	1318,791 $\pm$ 77,466	0,09
M21055DR	0,837 $\pm$ 0,030	1144,157 $\pm$ 39,771	0,09
M21055DR-CP	0,811 $\pm$ 0,034	1371,813 $\pm$ 75,211	0,11

Com base nos dados obtidos, de maneira geral, o aumento da concentração de polímeros aumentou o diâmetro e a circularidade das micropartículas. A incorporação do fármaco levou ao aumento do diâmetro, que pode ser atribuído a acomodação de maior quantidade do CP nos espaços intersticiais das cadeias poliméricas levando a expansão da estrutura e, portanto, partículas de maiores tamanhos, conforme relatado por Kulkarni e colaboradores (2011) em estudos com micropartículas de gelatina/albumina, entretanto a presença do fármaco provocou a diminuição da circularidade.

Entre a RI e DR, a análise estatística demonstrou que, tanto a circularidade como o diâmetro das micropartículas foi maior na DR ( $p < 0,05$ ), provavelmente devido ao elevado grau de reticulação que deve ter permitido maior resistência mecânica das microesferas, originando partículas maiores e mais esféricas ao final do processo.

### 5.3.2 Teste de digestão enzimática

Baseado na susceptibilidade do amido à digestão enzimática, no tempo de conversão, na taxa de liberação da glicose e sua absorção no TGI, o amido pode ser classificado em: rapidamente digerível (ARD), determinado como o total de amido digerido nos primeiros 20

minutos; lentamente digerível (ALD), digerido entre 20 e 120 minutos e amido resistente (AR) (JANASWAMY, 2014; PARK; BAIK; LIM, 2009; SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006; ZHANG; WANG, 2009), o qual é fermentado e desintegrado somente pela microflora colônica (HARALAMPU, 2000).

O amido é hidrolisado pela ptialina e pancreatina, enzimas secretadas nos fluidos das porções superiores do TGI, originando oligossacarídeos e glicose que será transportada para corrente sanguínea, enquanto a porção resistente do amido segue para o cólon. Assim, para estabelecer uma análise quantitativa da digestão do amido presente nas micropartículas foi utilizada a pancreatina, que é uma enzima complexa, composta por amilase, lipase e protease (FREIRE et al., 2009b; TOMASIK; HORTON, 2012).

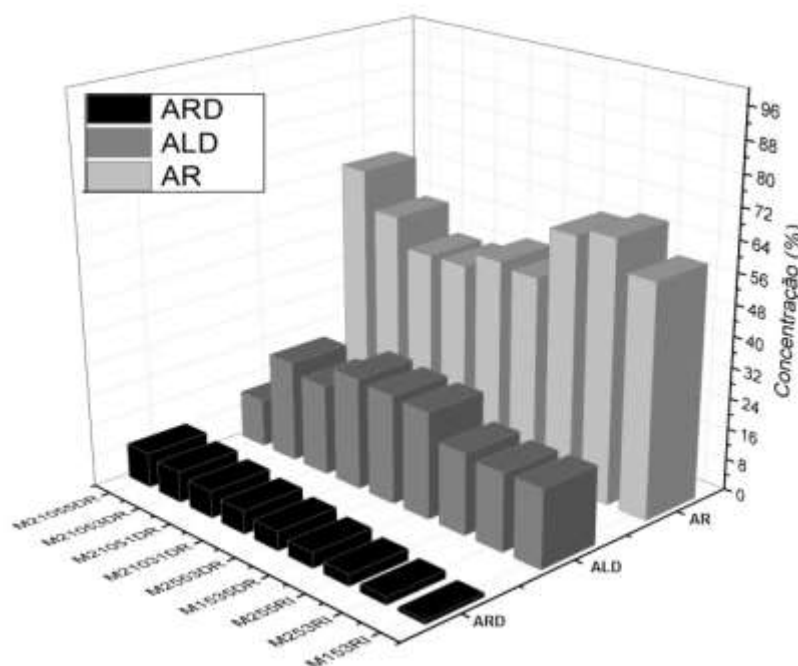
Os resultados do teste de digestão enzimática das micropartículas (Tabela 9) demonstraram que dentre todas as amostras, as que apresentaram maior quantidade de AR e, portanto, menor grau de digestão foram a M253RI ( $67,41 \pm 1,44$ ) e a M21055DR ( $65,70 \pm 7,05$ ).

**Tabela 9:** Digestão enzimática (%) das amostras reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas sem fármaco (n=3).

AMOSTRAS	ARD	ALD	AR
M153RI	$19,88 \pm 0,15$	$20,21 \pm 5,35$	$59,91 \pm 5,35$
M253RI	$12,50 \pm 0,74$	$20,09 \pm 2,17$	$67,41 \pm 1,44$
M255RI	$13,75 \pm 0,39$	$21,05 \pm 8,57$	$65,21 \pm 8,73$
M1535DR	$20,69 \pm 1,85$	$27,57 \pm 3,49$	$51,74 \pm 4,96$
M2553DR	$18,99 \pm 1,52$	$28,16 \pm 0,10$	$52,85 \pm 1,61$
M21031DR	$22,28 \pm 0,87$	$28,92 \pm 1,82$	$48,80 \pm 1,25$
M21051DR	$27,87 \pm 3,36$	$23,49 \pm 0,38$	$48,64 \pm 3,72$
M21053DR	$17,79 \pm 2,67$	$26,16 \pm 1,01$	$56,05 \pm 2,74$
M21055DR	$21,86 \pm 3,67$	$12,44 \pm 3,50$	$65,70 \pm 7,05$

Os valores apresentados na Tabela 9 evidenciaram que a média do conteúdo de ARD, ALD e AR das amostras foram de 19,51%, 21,12% e 57,38%, respectivamente, demonstrando que a retrogradação do amido reduziu significativamente a digestibilidade (Figura 47), conforme relatado por Chung, Lim e Lim (2006).

**Figura 46:** Proporções de amido rapidamente digerível (ARD), lentamente digerível (ALD) e amido resistente (AR) das micropartículas RI e DR.



A diminuição na proporção de ARD e o aumento de ALD e de AR observados, provavelmente, é resultante do método de retrogradação utilizado, devido ao maior empacotamento das duplas hélices da amilose e o aumento das forças de interações intercadeias que originou uma estrutura com elevado grau de cristalinidade e que, conseqüentemente, restringiu o acesso das enzimas dificultando ou mesmo impedindo a digestibilidade do amido.

Essa correlação do rendimento de AR com o método de retrogradação também foi relatado por Park, Baik e Lim (2009), em estudos sobre digestibilidade de géis de amido, em que a obtenção de maiores quantidades de AR ocorreu quando o amido foi submetido à retrogradação em ciclos alternados de temperatura durante 16 dias, o mesmo empregado neste trabalho.

Os dados de DRX estão em concordância com os resultados do teste de digestão enzimática, pois demonstraram a elevada cristalinidade dos sistemas, em que as estruturas formadas apresentaram uma mistura dos polimorfos do tipo B e V, o que é coerente, pois segundo Jane, Wong e Mcpherson (1997), os padrões tipo B apresentam elevada resistência à hidrólise enzimática, assim como a estrutura cristalina do tipo-V, relacionado ao complexo amilose-lípido, é capaz de reduzir o intumescimento dos grânulos de amido tornando-os mais resistentes à digestão enzimática (CUI; OATES, 1999).

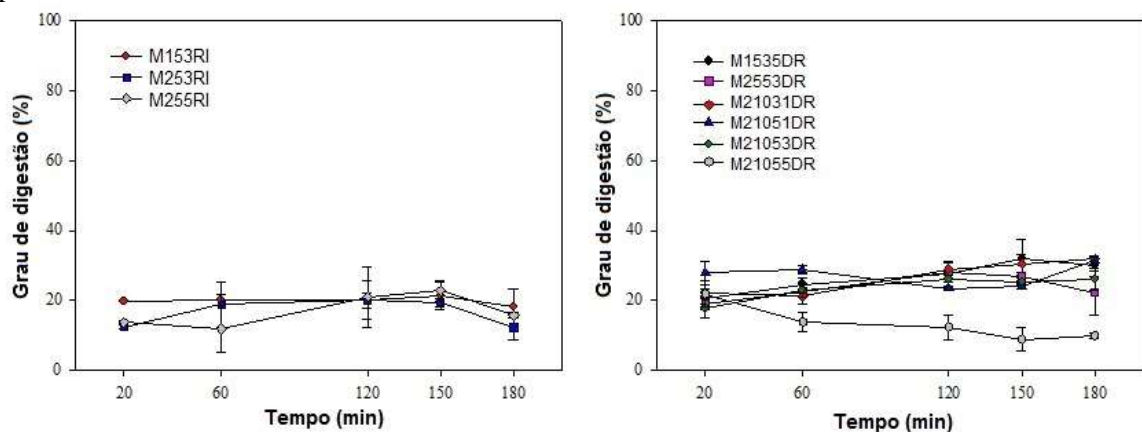
A AA é considerada um material promissor para a obtenção de elevados teores de amido resistente, pois os cristalitos formados ficam embebidos em uma matriz amorfa que dificulta o acesso das enzimas (DIMANTOV et al., 2003; HTOON et al., 2009). Dessa forma, a formação do padrão tipo B também pode ter sido favorecida pela elevada concentração de amilose do material utilizado (70%) (HYLON VII<sup>®</sup>).

Segundo Park, Baik e Lim (2009), a susceptibilidade do gel de amido à digestão enzimática depende tanto da estrutura amorfa como da estrutura cristalina do gel e que, portanto, o conteúdo de AR está, essencialmente, relacionado com a intensidade da matriz cristalina do gel, enquanto que a proporção de ALD depende principalmente da rigidez das regiões amorfas do gel de AR (CHUNG; LIM; LIM, 2006; RECIFE, 2013).

Através da análise estatística dos dados, foi verificado que entre o grupo de micropartículas RI não houve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), enquanto, para o grupo de amostras DR a maior quantidade de AR foi verificado em M21055DR, o qual apresenta máximas concentrações de ambos os polímeros e agentes reticulantes, o que provavelmente deve ter dificultado o acesso das enzimas digestivas devido à formação de uma estrutura mais compacta e com elevado grau de reticulação.

Os perfis de digestão enzimática das micropartículas estudados (Figura 48) demonstram que, de maneira geral, a maior concentração de polímeros, independente da concentração de agentes reticulantes, e a DR contribuiu para reduzidas taxas de digestão, as quais se mantiveram praticamente constantes durante todo período de tempo, evidenciando a formação de uma estrutura mais resistente e estável.

**Figura 47:** Perfil de digestão do amido nas micropartículas reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas



### 5.3.3 Rendimento

O rendimento das amostras foi elevado (acima de 78%) (Tabela 10), demonstrando que a técnica de obtenção de micropartículas pelo método de geleificação ionotrópica e a dupla reticulação foi eficiente, apresentando como rendimento médio entre todas as amostras o valor de 87,96%.

**Tabela 10:** Rendimento (%) do processo de obtenção das micropartículas com fármaco pela RI e DR.

AMOSTRAS	RENDIMENTOS (%)
M153RI-CP	93,95
M253RI-CP	89,14
M255RI-CP	90,38
M1535DR-CP	91,86
M2553DR-CP	90,10
M21031DR-CP	89,37
M21051DR-CP	88,88
M21053DR-CP	79,88
M21055DR-CP	78,08

### 5.3.4 Teor de umidade

Sistemas contendo polímeros hidrofílicos são naturalmente capazes de absorver e reter umidade. A determinação do teor de umidade de sistemas poliméricos é muito importante, uma vez que o comportamento mecânico desses sistemas pode ser significativamente afetado pela absorção de umidade que leva à plastificação do material. Essa plastificação está associada capacidade da água em reduzir as forças intermoleculares das cadeias poliméricas e levar a eventos como redução da temperatura de transição vítrea (FAN; LEE; HAN, 2009) e aumento da mobilidade das cadeias do polímero e da elasticidade (STEENDAM; FRIJILINK; LERK, 2001).

A umidade também pode influenciar a porosidade e o processo de compactação de comprimidos (NOKHODCHI et al., 1995), a dissolução e liberação do fármaco, além de

causar alterações nas propriedades adesivas (BRAVO-OSUNA; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, 2008; REPKA; MCGINITY, 2000; STEENDAM et al., 2000).

A goma gelana desacetilada é um polímero que apresenta um conteúdo de umidade ligeiramente maior que a gelana de alta acetilação, o que pode ser atribuído a diferenças no número de grupos hidroxilas disponíveis para ligações de hidrogênio com as moléculas de água (ABRAMOVIC ; KLOFUTAR, 2006).

O amido é um material higroscópico que também apresenta elevada capacidade de absorver água (DIXIT et al., 2012).

Os valores de teor de umidade das amostras RI e DR são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Teor de umidade (%) das micropartículas reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas contendo cetoprofeno.

AMOSTRAS	TEOR DE UMIDADE %
M153RI-CP	12,3 ± 0,10
M253RI-CP	9,9 ± 0,11
M255RI-CP	7,5 ± 0,10
M1535DR-CP	5,57 ± 0,15
M2553DR-CP	4,80 ± 0,10
M21031DR-CP	3,37 ± 0,06
M21051DR-CP	4,57 ± 0,15
M21053DR-CP	4,70 ± 0,10
M21055DR-CP	5,00 ± 0,10

A quantidade de água residual nos produtos farmacêuticos pode favorecer a contaminação microbiana e prejudicar a estabilidade física do material e, por isso, a análise do teor de umidade é considerada de extrema importância para prever possíveis alterações que possam ocorrer nos materiais elaborados. Assim, de acordo com os dados de teor de umidade das micropartículas RI e DR (Tabela 11), foi verificado que o percentual de umidade não oferece risco à estabilidade das amostras, pois os valores foram menores do que aqueles informados pelas especificações dos laudos de análise dos fornecedores dos polímeros, que preconizam máximo 15% de umidade.

### 5.3.5 Avaliação do teor e da eficiência de encapsulação (%EE)

O encapsulamento é um processo baseado no aprisionamento de compostos ativos no interior de uma matriz. A porcentagem de fármaco encapsulado em relação à quantidade total adicionado ao sistema é representada pela eficiência de encapsulação (%EE) (AHUJA; YADAV; KUMAR, 2010; CHAN, 2011). Portanto, maiores valores de %EE representam sistemas com maior capacidade de aprisionamento do fármaco.

A %EE das micropartículas RI e DR variou em um intervalo de 25,45 a 72,48% e os valores de teor foram de 3,12 a 9,47% (Tabela 12).

**Tabela 12:** Valores do teor e eficiência de encapsulação (%) do fármaco das micropartículas reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas (média  $\pm$  DP).

AMOSTRAS	Eficiência de encapsulação (%)	Teor de fármaco (%)
M153RI-CP	70,50 $\pm$ 5,25	9,47
M253RI-CP	25,45 $\pm$ 2,08	3,17
M255RI-CP	27,25 $\pm$ 2,10	3,12
M1535DR-CP	58,66 $\pm$ 3,15	7,50
M2553DR-CP	62,58 $\pm$ 4,51	6,78
M21031DR-CP	72,48 $\pm$ 1,14	5,07
M21051DR-CP	58,47 $\pm$ 0,62	4,20
M21053DR-CP	42,28 $\pm$ 1,02	3,81
M21055DR-CP	66,19 $\pm$ 2,24	4,33

Entre as micropartículas RI, a maior %EE (70,50%) e maior teor (9,47%) foram exibidos pela amostra M153RI-CP ( $p > 0,05$ ). A %EE e o teor foram menores em M253RI-CP e M255RI-CP, sendo que entre elas não houve diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). A concentração de amido não variou nesse grupo de amostras, portanto, conclui-se que a maior concentração de gelana influenciou de maneira negativa nos resultados, pois levou a menor %EE ( $p > 0,05$ ).

Esse comportamento pode estar relacionado com o aumento da viscosidade promovido pela elevada concentração de gelana, que originou uma rede estrutural mais densa e compacta, com a presença de interações mais coesivas entre seus monômeros que, provavelmente, podem ter reduzido os espaços intercadeias para acomodação das partículas do fármaco,



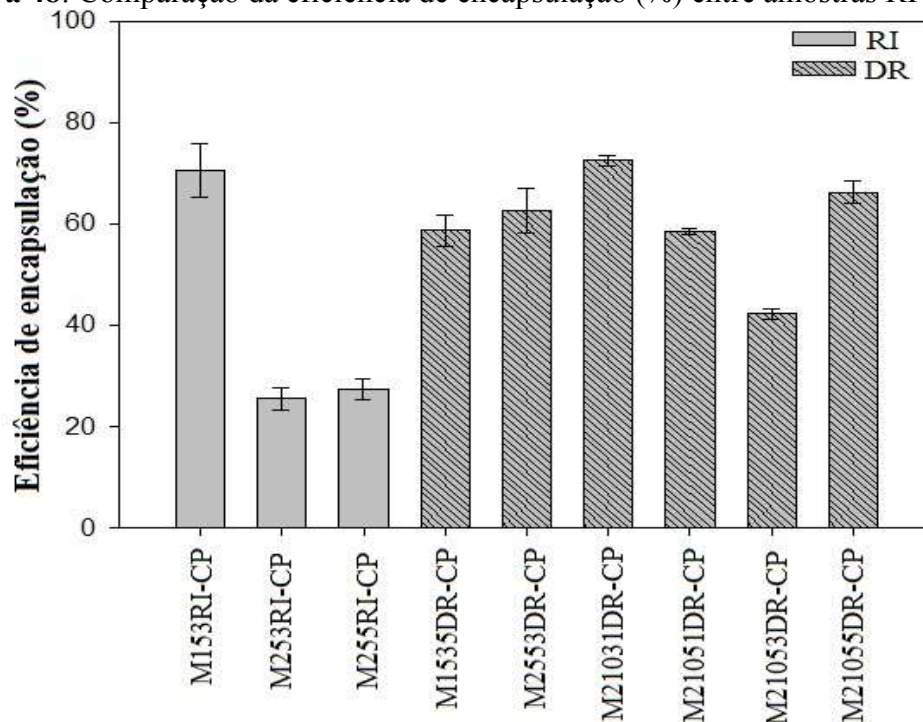
resultando em uma menor encapsulação. Comportamento semelhante foi relatado por Narkar e colaboradores (2010), em estudos com microesferas de gelana submetidas à geleificação ionotrópica para liberação controlada da amoxicilina.

A menor concentração de  $Al^{3+}$  da amostra M153RI-CP também pode ter favorecido a maior %EE, devido ao menor grau de reticulação, pois segundo Maiti e colaboradores (2011), em estudos com micropartículas de goma gelana contendo glipizida reticuladas com cátions trivalentes ( $Al^{3+}$ ), a formação das ligações cruzadas promovem a lixiviação das moléculas de água que, conseqüentemente, arrastam as partículas do fármaco. Portanto, quanto maior o grau de reticulação maior seria a perda de água e menor a %EE.

Entre as amostras DR, o maior valor de %EE foi verificado em M21031DR-CP ( $p>0,05$ ), indicando que o menor grau de reticulação atribuído às menores concentrações de reticulantes utilizadas resultaram, novamente, em uma elevada capacidade de aprisionamento do fármaco entre os espaços intersticiais das cadeias poliméricas. Esse comportamento também explica a menor %EE, verificada em M21053DR-CP ( $p>0,05$ ), que apresenta maiores concentrações de reticulantes e, provavelmente, o elevado grau de reticulação reduziu os espaços onde as partículas do fármaco ficariam acomodadas.

O teor de fármaco incorporado foi maior nas amostras contendo menores concentrações de gelana, sendo M153RI-CP com 9,47% e M1535DR-CP com 7,50%, o que pode ser atribuído a maior flexibilidade e quantidade de espaços intercadeias nas estruturas dessas amostras, permitindo uma maior e mais homogênea distribuição do fármaco.

De maneira geral, as menores concentrações de agentes reticulantes e a DR resultaram em maiores porcentagens de encapsulação ( $p>0,05$ ) (Figura 49).

**Figura 48:** Comparação da eficiência de encapsulação (%) entre amostras RI e DR.:

Os resultados obtidos demonstraram que a menor densidade de reticulação contribuiu para formação de estruturas com maior capacidade de aprisionamento do fármaco.

### 5.3.6 Especificidade/Seletividade

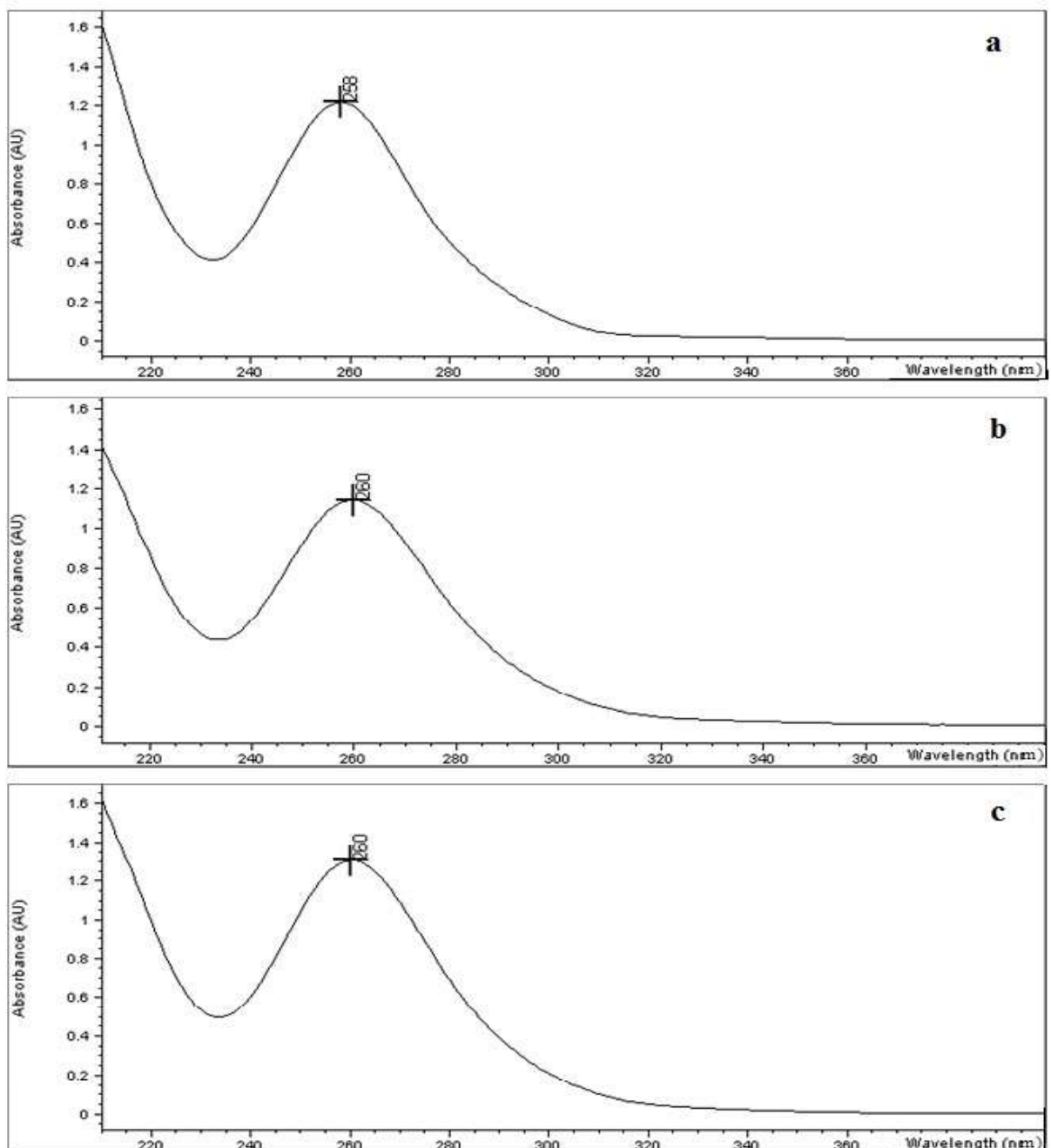
A especificidade/seletividade é a capacidade de avaliar uma substância na presença de componentes que podem estar presentes, incluindo impurezas, produtos de degradação e excipientes (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Um método é seletivo quando existe grande probabilidade de ser a substância pesquisada e é específico quando este método consegue definir uma função química específica ou ainda uma única espécie distinta em um único sinal. A avaliação da seletividade/especificidade pode ser realizada pela análise de amostras contendo os possíveis interferentes que compõem o sistema por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais (INMETRO, 2011).

Esses interferentes podem alterar o desempenho das medidas aumentando ou reduzindo a magnitude do sinal. Os testes para avaliação da seletividade descritos na literatura sobre validação de métodos analíticos envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o fármaco, além da avaliação da capacidade de identificação da substância de interesse na presença de interferentes. Portanto, a especificidade/seletividade

deve ser assegurada, caso contrário poderá comprometer a linearidade, a tendência e a precisão (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP, 2007).

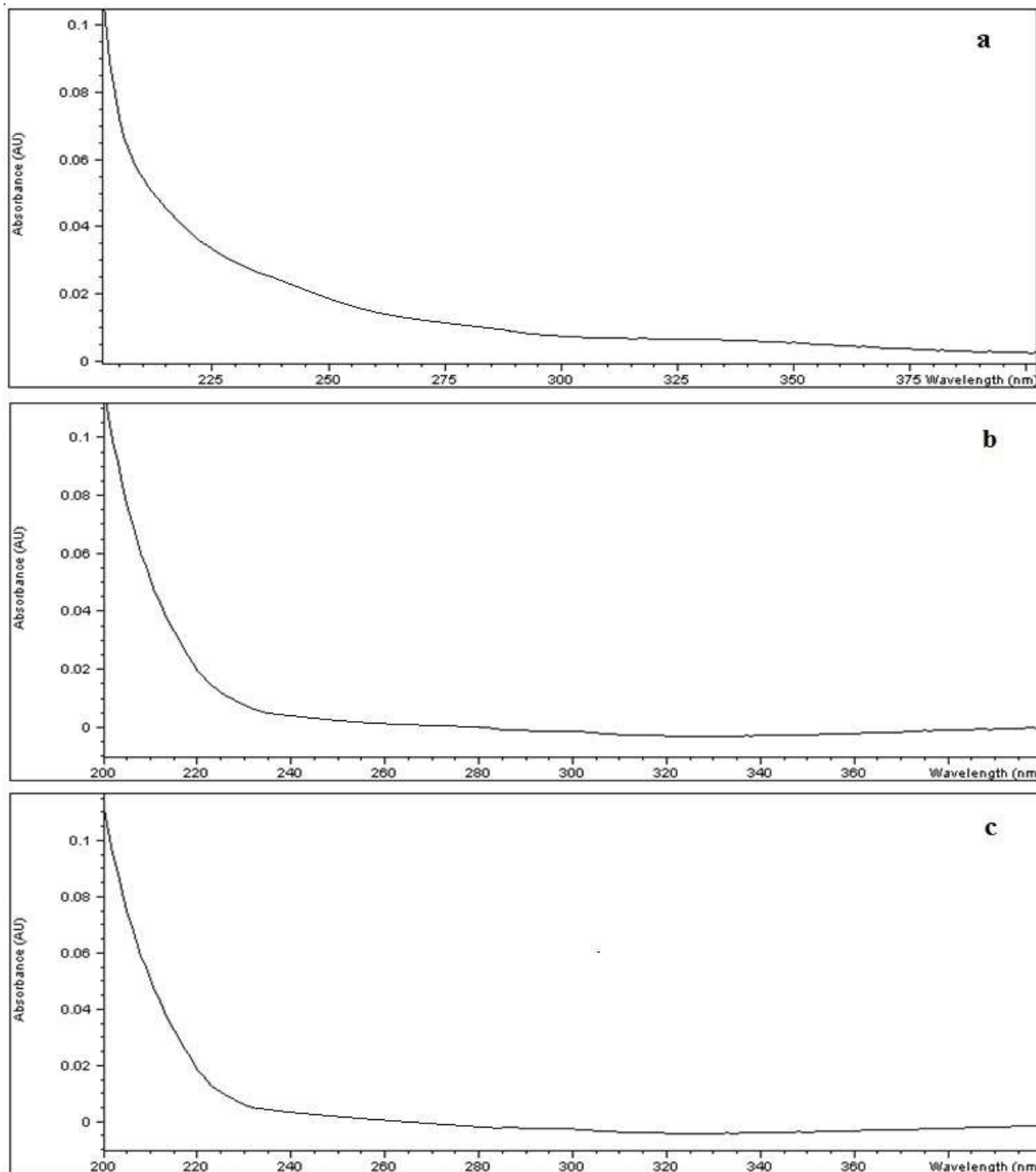
A Figura 50 mostra os espectros de absorção na região do ultravioleta do CP obtidos nos meios HCl 0,1 N com 0,75% de tensoativo laurilsulfato de sódio e pH 1,2; tampão fosfato pH 6,0 e tampão fosfato pH 7,4, apresentando picos de máxima absorção em 258 nm em meio ácido, 260 nm no tampão fosfato.

**Figura 49:** Espectros de absorção na região do ultravioleta de cetoprofeno em (a) HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; (b) tampão fosfato pH 6,0 e (c) tampão fosfato pH 7,4.



De acordo com os espectros (Figura 51), os polímeros não apresentaram picos de absorção na região do UV, o que comprova que as absorbâncias mensuradas (Figura 50) referem-se somente ao fármaco e que os métodos desenvolvidos são seletivos e específicos.

**Figura 50:** Espectro de absorção na região do UV de misturas de gelana e amido retrogradado (1:1 (v/v)) em (a) HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; (b) tampão fosfato pH 6,0 e (c) tampão fosfato pH 7,4.



### 5.3.7 Análises Térmicas

#### 5.3.7.1 TG/DTG

A termogravimetria (TG) é uma técnica termoanalítica em que a amostra é submetida ao aquecimento programado e a variação de massa das amostras (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura ou tempo. A análise possibilita verificar possíveis alterações de massa, determinar a faixa de temperatura em que os materiais se decompõem (estabilidade térmica), acompanhar reações de decomposição, desidratação, oxidação, combustão e interações fármaco/excipientes (GALWEY; CRAIG, 2007; STORPIRTIS et al., 2009).

A Termogravimetria Derivada (DTG), como próprio nome diz, é a derivada da curva TG. Os declínios, relacionados à perda de massa, observados na TG são apresentados como picos na DTG que delimitam áreas proporcionais às variações de massa (STORPIRTIS et al., 2009).

As análises foram realizadas para o fármaco e polímeros isolados, micropartículas RI e DR e estão apresentadas nas Figuras 52 – 54 e Tabelas 14 – 16.

A curva de TG/DTG do CP (Figura 52) apresentou uma única etapa de perda de massa, que pode ser atribuída à decomposição térmica do fármaco que ocorre entre 200 °C e 310 °C, muito próximo aos valores relatados por Tiça e colaboradores (2011) e por Prezotti e colaboradores (2014). O pico máximo da curva DTG ocorre em 300 °C e ao final do processo há uma perda de massa de 98,76% (Tabela 13).

As curvas de TG/DTG dos polímeros (Figura 52) apresentaram um primeiro evento entre de 30 °C a 100 °C, com perda de massa de aproximadamente 7% e 8%, para gelana e AR 5 e 10%, respectivamente, referente ao processo de desidratação. De acordo com Storpirtis e colaboradores (2009), a perda de umidade ou de água superficial ocorre gradativamente desde a temperatura ambiente até próximo de 100 °C.

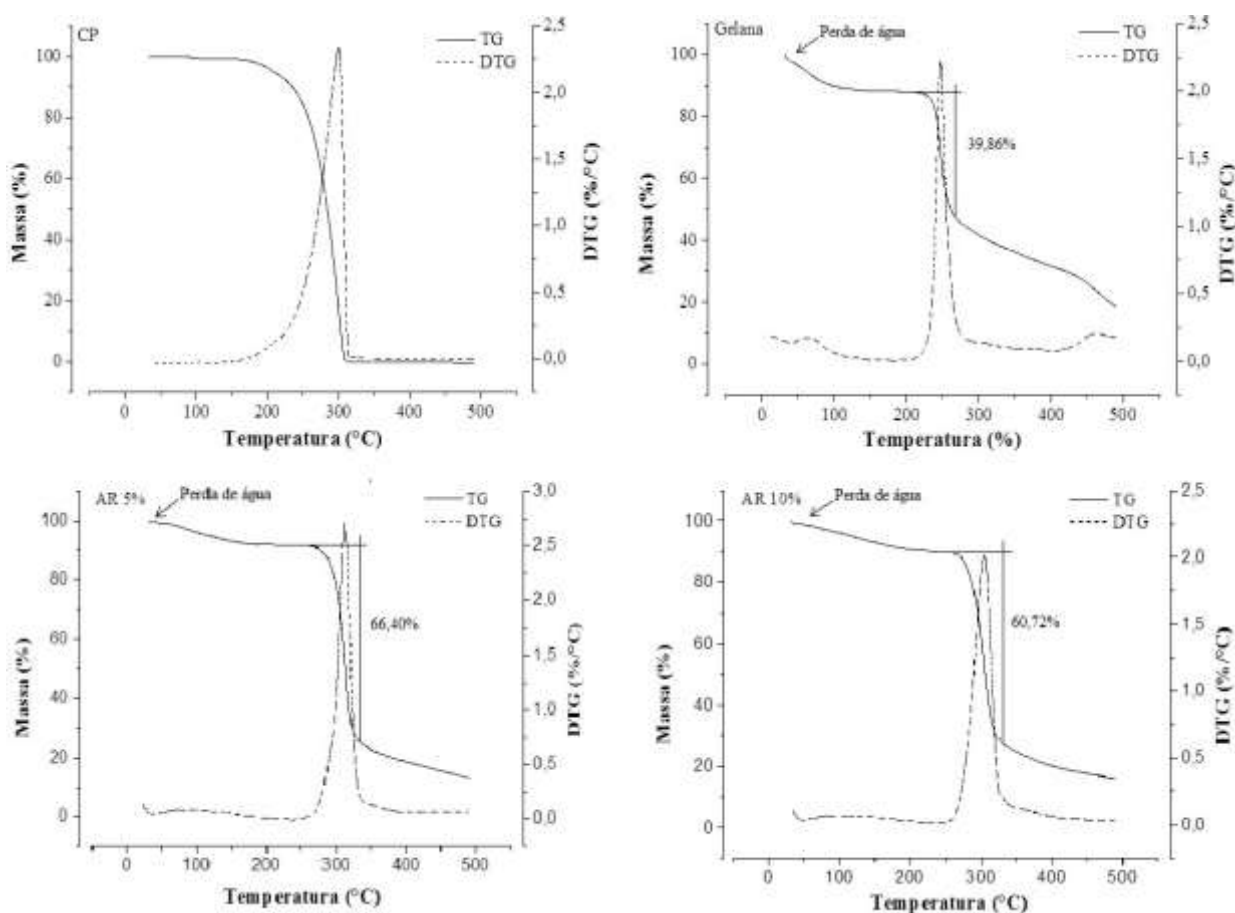
Os polímeros apresentaram um segundo e principal evento de perda de massa (Tabela 13). No caso da gelana esse segundo estágio apresentou uma perda de massa de 39,86%, no intervalo entre 224 °C e 270 °C, indicando a degradação do polímero. Esses valores foram próximos aos relatados por Noor e colaboradores (2012) em estudos com filmes de gelana.

Para o AR 5 e 10%, as curvas de TG/DTG exibiram uma perda de massa de 66,40% e 60,72%, respectivamente, referente à decomposição térmica do material, sendo que esse

evento ocorreu em uma faixa de 260 °C a 330 °C, com pico máximo em 300 °C. Tais valores foram muito próximos aos relatados na literatura por Varma, Panpalia e Jayaram (2014), Tita e colaboradores (2011) em estudos com sistemas sólidos contendo amido.

Após o processo de retrogradação, o AR apresenta um significativo aumento da cristalinidade, evidenciado nas curvas de TG/DTG do AR 5 e 10%, que exibiram um pico máximo em 300 °C, 38 °C acima do valor do pico da AA, observado por Massicotte, Baile e Mateescu (2008), em estudos com excipientes a base de amido que exibiu um pico máximo de perda de massa em 262 °C. Dessa forma, os dados demonstram que processo de retrogradação favorece o aumento da cristalinidade e, conseqüentemente, a estabilidade térmica do material, o que está em concordância com resultados demonstrados pela análise DRX.

**Figura 51:** Curvas TG/DTG do cetoprofeno e polímeros isolados (gelana e amido retrogradado - 5 e 10%).



**Tabela 13:** Percentual de perda de massa do cetoprofeno e polímeros isolados (gelana e amido retrogradado - 5 e 10%) (200-400 °C).

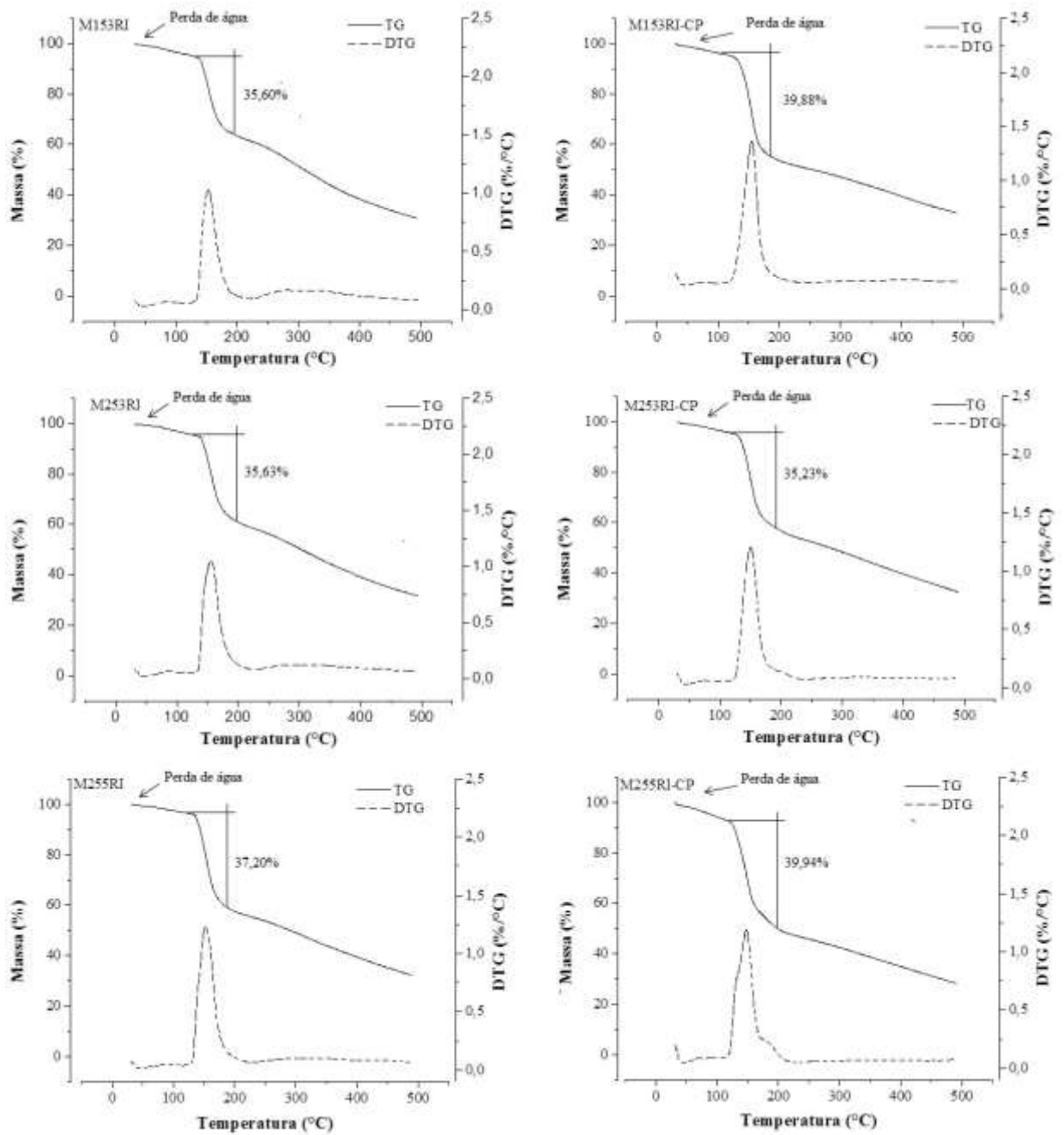
AMOSTRAS	Perda de massa (%)
CP	98,76
Gelana	39,86
AR 5%	66,40
AR 10%	60,72

Ao analisar as curvas TG das micropartículas RI (Tabela 14), foi possível verificar que as amostras exibiram dois eventos térmicos (Figura 53), em que o primeiro apresentou uma discreta perda de massa em torno de 6%, em um intervalo de 30 °C até aproximadamente 100 °C, indicando a perda de umidade por evaporação durante o processo de aquecimento (PREZOTTI; CURY; EVANGELISTA, 2014; SOARES et al., 2013; STORPIRTIS et al., 2009).

O segundo e principal estágio de degradação foi observado no intervalo de 120 °C a 200 °C, com perda de massa entre 35,23% e 39,94%. As amostras exibiram um pico máximo de DTG em torno de 150 °C, o que mostra uma redução de aproximadamente 150 °C na temperatura de degradação, em relação ao fármaco e polímeros, em que o pico máximo foi em 300 °C. Entretanto, apesar da perda de massa das amostras ocorrerem em temperaturas mais baixas, deve-se levar em consideração que a porcentagem de perda foi reduzida significativamente em relação aos polímeros isolados.

Esse deslocamento do pico de degradação, das amostras RI, para temperaturas mais baixas pode ser atribuída à ocorrência de interações químicas entre fármaco e polímeros em razão do aquecimento a 150 °C, conforme relatado por Tita e colaboradores (2011), em estudos para avaliar a compatibilidade do CP com diferentes excipientes. Outra possibilidade para esse comportamento seria a formação de uma nova estrutura que apresenta menor grau de cristalinidade devido à ruptura das estruturas cristalinas durante o processo de geleificação ionotrópica com os íons  $Al^{3+}$ , conforme relatado por Liu e colaboradores (2013), o que está em concordância com os dados de DRX que demonstraram que a cristalinidade das amostras RI foi menor. Além disso, segundo esses autores, o fármaco aprisionado nos espaços intercadeias pode ter exercido um efeito plastificante, contribuindo para formação de uma estrutura mais fraca e flexível, o que justifica a degradação em temperaturas mais baixas.

Figura 52: Curvas de TG/DTG das micropartículas reticuladas ionicamente.





**Tabela 14:** Percentual de perda de massa degradada das amostras reticuladas ionicamente (200-400 °C).

AMOSTRAS	Perda de massa (%)
M153RI	35,60
M153RI-CP	39,88
M253RI	35,63
M253RI-CP	35,23
M255RI	37,20
M255RI-CP	39,94

Para as micropartículas DR (Figura 54), de maneira geral, foram verificados três eventos de perda de massa, evidenciando a diferença estrutural em relação às micropartículas RI.

A modificação da intensidade dos picos pode ser atribuída às diferenças nas forças das ligações de hidrogênio formadas ao longo da rede estrutural em que quanto maior a força dessas ligações mais energia necessária para rompê-las, conforme relatado por Huo e colaboradores (2014). Além disso, a DR pode originar uma rede estrutural, constituída por domínios que apresentem maior ou menor grau de reticulação, na qual a degradação ocorre em temperaturas diferentes originando vários picos (WILSON; PRATT; KOZINSKI, 2013).

A primeira e discreta perda de massa, de aproximadamente 8%, das amostras DR ocorreu no intervalo de 30 °C a 100 °C, novamente indicando a perda de umidade por evaporação devido ao processo de aquecimento, conforme relatado por Soares e colaboradores (2013) e por Storpirtis e colaboradores (2009).

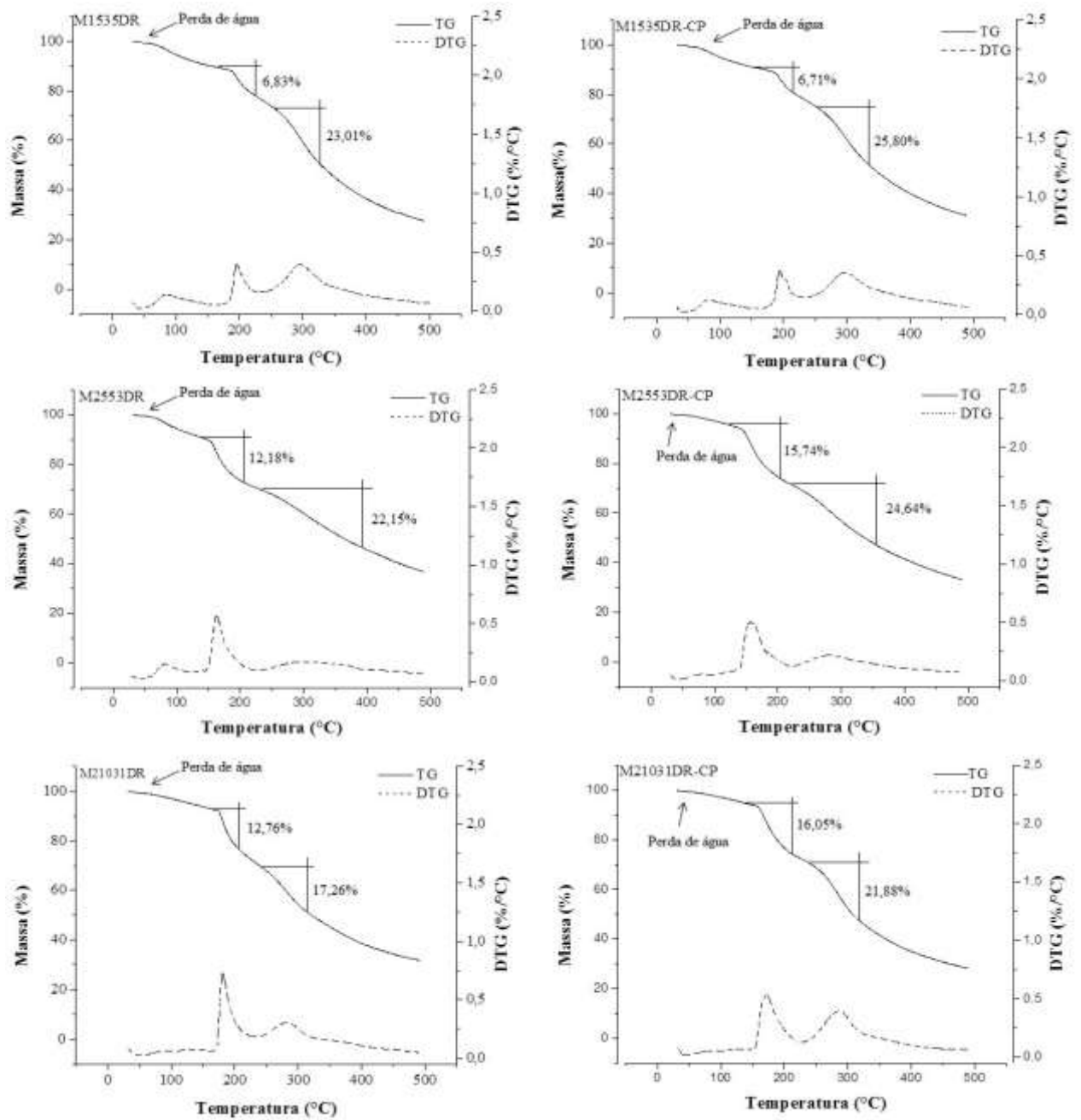
O segundo evento de perda de massa das amostras DR, significativamente reduzido em relação ao fármaco e polímeros isolados, ocorreu no intervalo entre 150 °C e 220 °C (Tabela 15). O valor do pico de DTG das amostras, de maneira geral, apresentou-se em torno de 180 °C, uma redução de aproximadamente 120 °C na temperatura de degradação em relação ao fármaco e polímeros, porém foi maior do que o valor do pico verificado para as amostras RI.

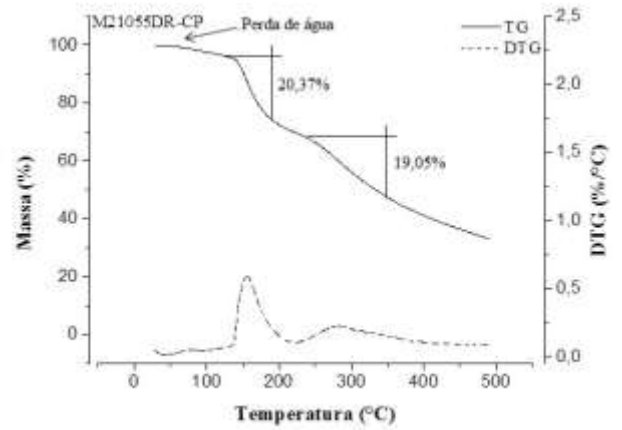
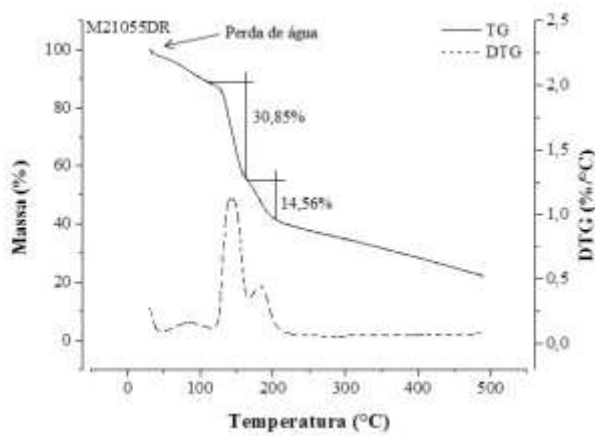
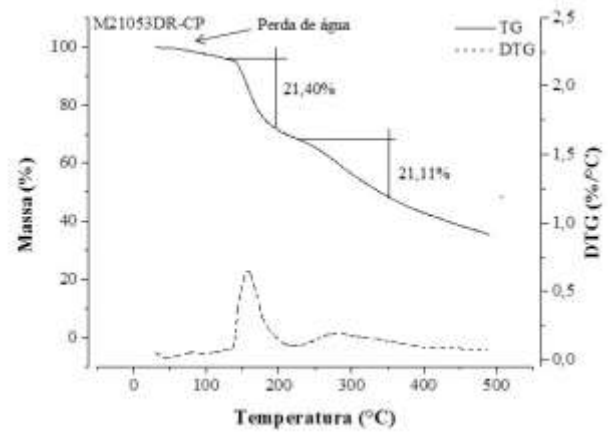
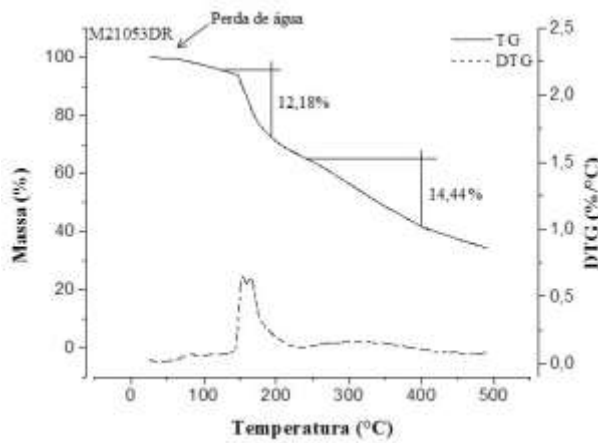
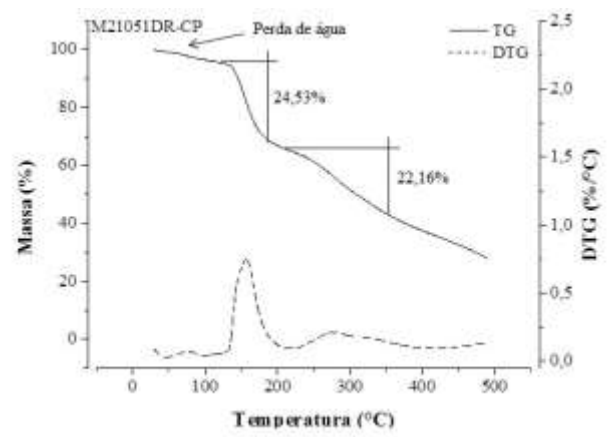
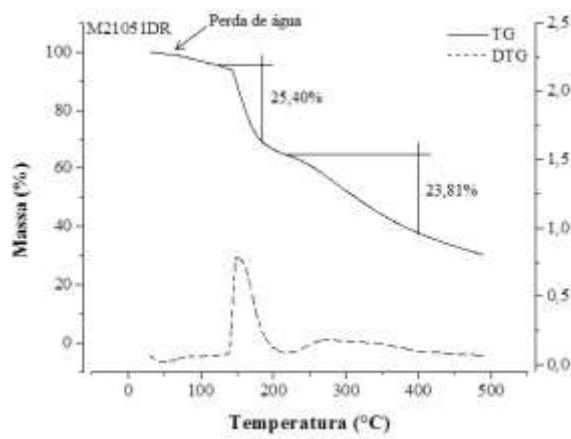
Esse comportamento pode ser atribuído à possibilidade de redução da cristalinidade dos polímeros e das forças de interações entre as cadeias poliméricas em razão do aquecimento acima de 150 °C. Além disso, Wilson e Xue (2013), em estudos com complexos de quitosana reticulados com glutaraldeído, constataram uma redução da temperatura de

degradação, que foi atribuída a alterações provocadas nas ligações de hidrogênio das cadeias poliméricas após a reticulação.

O terceiro evento de perda de massa foi de 14% a 25% (Tabela 15), entre 250 °C e 350 °C, caracterizado pelo aparecimento de um “ombro”, ou seja, um pico mais alargado e de baixa intensidade, que pode ser atribuído à decomposição de domínios altamente reticulados e compactos, em que os grupos hidroxila ficaram protegidos no interior da estrutura impedindo a formação de ligações de hidrogênio com a água, conforme relatado por Huo e colaboradores (2014) em estudos com microcápsulas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.

Figura 53: Curvas de TG/DTG das micropartículas duplamente reticuladas.





**Tabela 15:** Percentual de perda de massa degradada das amostras duplamente reticuladas (200-400 °C) (dois eventos principais).

AMOSTRAS	Perda de massa (%) 2° Evento	Perda de massa (%) 3° Evento
M1535DR	6,83	23,01
M1535DR-CP	6,71	25,80
M2553DR	12,18	31,54
M2553DR-CP	15,74	26,46
M21031DR	12,76	17,26
M21031DR-CP	16,05	21,88
M21051DR	25,40	23,84
M21051DR-CP	24,53	21,80
M2105	12,18	21,47
M21053DR-CP	21,40	18,79
M21055DR	30,85	14,56
M21055DR-CP	20,37	19,05

O conjunto de dados, de maneira geral, evidenciou a diminuição da estabilidade térmica das micropartículas RI e DR em relação aos componentes isolados, quando submetidos a elevadas temperaturas durante a análise. Entretanto, as micropartículas DR foram termicamente mais estáveis que as amostras RI, provavelmente devido à formação de uma estrutura mais forte e termicamente mais estável, consolidada pelas ligações covalentes. No entanto, deve-se levar em consideração que as técnicas termoanalíticas requerem um aumento significativo da temperatura que pode induzir a ocorrência de reações que não ocorreriam em temperatura ambiente ou em condições de armazenamento (STORPIRTIS et al., 2009).

Portanto, os resultados de análise térmica foram satisfatórios e demonstram que as condições do processo de obtenção das micropartículas não promovem a degradação do fármaco ou dos polímeros.

#### 5.3.7.2 DSC

A DSC é uma das técnicas de análises térmicas mais precisa e exata, capaz de fornecer informações detalhadas sobre propriedades físico-químicas de uma substância (BOND et al.,

2002; CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999). A técnica envolve a aplicação de um aquecimento linear ou de resfriamento sob uma amostra e a subsequente medida da temperatura e da energia associada a uma variedade de eventos térmicos incluindo fusão, cristalização, transição vítrea e as reações de decomposição (READING; CRAIG; 2007).

Os eventos térmicos registrados com DSC envolvem a temperatura de fusão endotérmica que corresponde à temperatura em que se inicia a fusão dos cristais (*Tonset*); a temperatura de pico (*Tpeak*), o qual corresponde ao ponto de fusão da maioria dos cristais; a temperatura de conclusão (*Tendset*) que indica a fusão dos cristalitos mais perfeitos e a entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) que corresponde à área de transição endotérmica (CLAS; DALTON; HANCOCK, 1999; READING; CRAIG; 2007; ZHOU; DI VONA; KNAUTH, 2010). A área sob o pico é diretamente proporcional à variação de entalpia e a sua direção indica se o evento térmico é endotérmico ou exotérmico (KARIM; NORZIAH; SEOW, 2000).

A avaliação da compatibilidade entre fármaco e excipientes, bem como as possíveis alterações físico-químicas é realizada por intermédio da comparação entre as curvas termoanalíticas das substâncias puras com aquelas obtidas para as formulações (STORPIRTIS et al., 2009). Dessa forma, as curvas DSC obtidas para o fármaco e polímeros isolados, micropartículas RI e DR foram determinadas e estão apresentadas nas Figuras 60 – 62 e Tabelas 17 - 19.

A curva de DSC do CP puro (Figura 55) apresentou um único pico endotérmico intenso (*Tpeak*) em 95,89 °C, correspondente ao ponto de fusão do fármaco (MURA et al., 1995; MURA et al., 1999) e típico de uma estrutura anidra cristalina (RICCI et al., 2005; VUEBA et al., 2004). OS valores de *Tonset* (87,04 °C), *Tendset* (102,2 °C) e  $\Delta H$  (95,53 °C) apresentaram-se muito próximos aos valores relatados na literatura por Mura e colaboradores (1998) e por Cirri e colaboradores (2012).

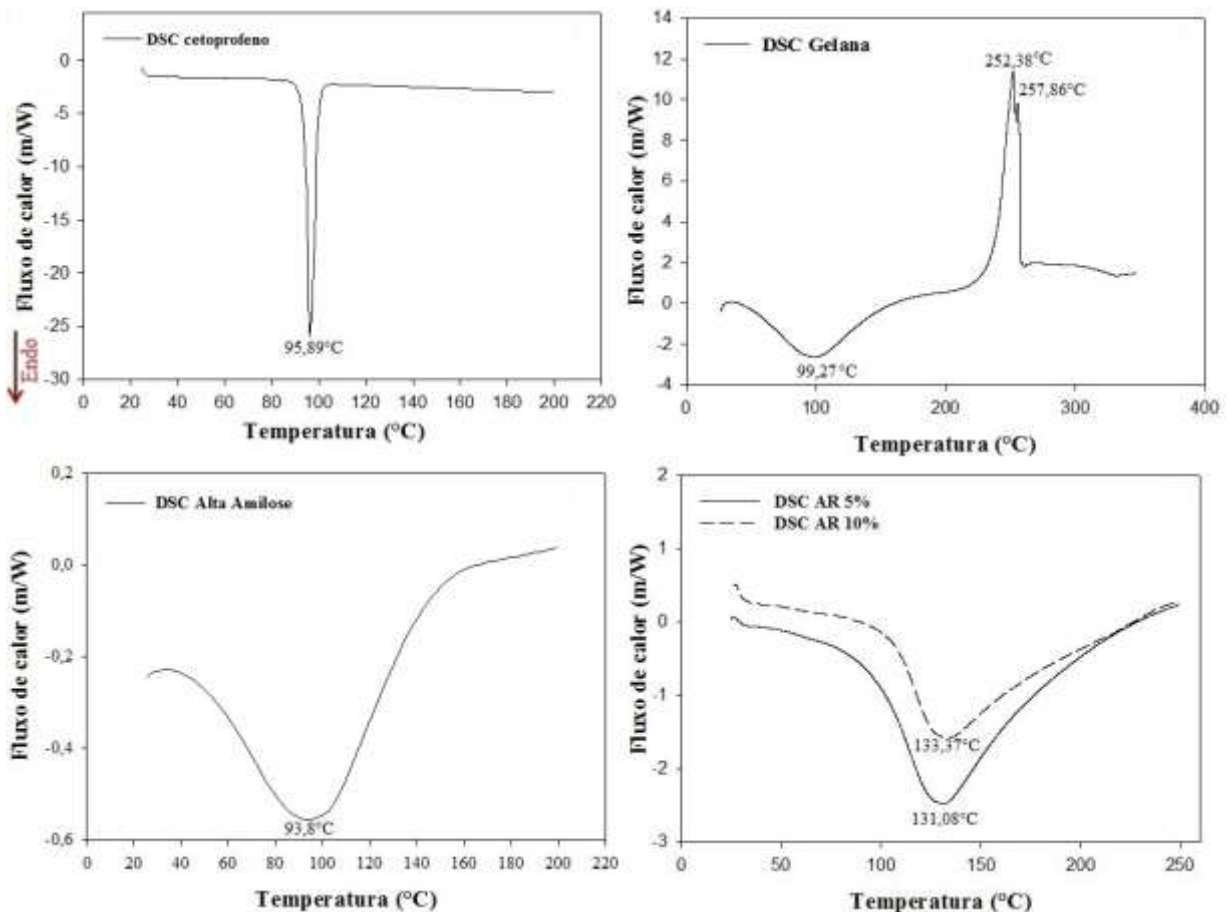
No caso da gelana, a curva de DSC (Figura 55) apresentou um pico endotérmico alargado em 99,21 °C, o qual pode ser atribuído ao processo de desidratação (YANG et al., 2013) e dois picos exotérmicos em 252,38 °C e 257,86 °C, ambos muito próximos aos observados na literatura por Ahuja, Yadav e Kumar (2013), correspondentes a temperatura de degradação da gelana (YANG et al., 2013), o que está em concordância com os dados de TG/DTG. O valor de *Tonset* foi de aproximadamente 51,57 °C, *Tendset* 151,37 °C e  $\Delta H$  151,39J/g.

A AA apresentou um amplo pico endotérmico em 93,8 °C (Figura 55), característico de polímeros semicristalinos e que indica uma elevada heterogeneidade dos cristalitos

(BHOSALE; ZIEGLER, 2010; KARKALAS; MORRISON; PETHRICK, 2005), com um valor de Tonset de 45,34 °C, Tendset de aproximadamente 157,8 °C e  $\Delta H$  de 24,78J/g.

Os maiores valores de temperatura e entalpia dos eventos endotérmicos verificados nas curvas de DSC do AR 5% (Tonset 94,64 °C; Tpeak 131,08 °C; Tendset 212,55 °C e  $\Delta H$  172,6J/g) e AR 10% (Tonset 105,86 °C; Tpeak 133,37 °C; Tendset 222,90 °C e  $\Delta H$  118,3J/g) (Figura 55) (Tabela 16) evidenciaram a ocorrência de importantes modificações estruturais da AA após a retrogradação, provavelmente devido à formação de maior quantidade de domínios cristalinos e de cristalitos mais estáveis. O aumento dos valores de temperatura e da  $\Delta H$  pode ser atribuído ao aumento da estabilidade e do arranjo das duplas hélices através das ligações de hidrogênio e interações intermoleculares, favorecendo o aumento do grau de cristalinidade das estruturas formadas, conforme relatado por Shi e Gao (2011) e por Shi e colaboradores (2013), em estudos com amido resistente.

**Figura 54:** Curvas DSC do cetoprofeno e polímeros isolados (gelana, alta amilose e amido retrogradado (5 e 10%)).



**Tabela 16:** Valores de temperatura e entalpia dos eventos endotérmicos do cetoprofeno e polímeros isolados (alta amilose (AA), gelana e amido retrogradado (AR) 5 e 10%).

	<b>Tonset ( °C)</b>	<b>Tpeak ( °C)</b>	<b>Tendset ( °C)</b>	<b><math>\Delta H</math> (J/g)</b>
AA	35,76	93,8	157,8	24,78
CP	88,5	95,89	102,2	95,25
AR 5%	94,64	131,08	212,55	172,6
AR 10%	105,86	133,37	222,90	118,3
Goma gelana	51,57	99,27	151,37	151,39

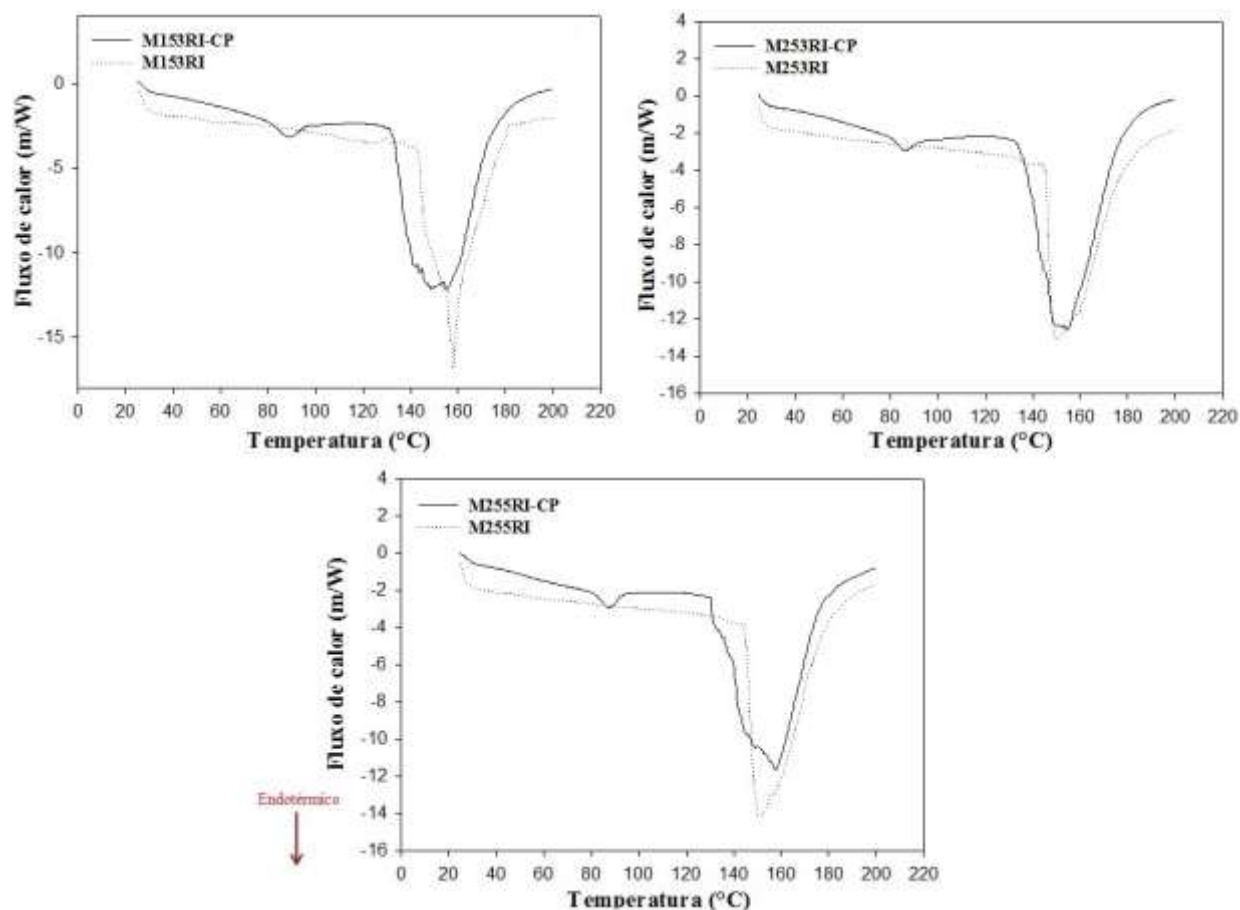
As curvas de DSC das amostras RI, contendo CP (Figura 56), apresentaram um discreto evento endotérmico, entre 80 e 100 °C, com *Tpeak* em torno de 88 °C, possivelmente devido à redução do pico de fusão do fármaco que pode estar disperso molecularmente na matriz polimérica, conforme relatado por Narkar e colaboradores (2010), em estudos com microesferas de gelana. Esse comportamento também pode ser atribuído à presença de uma pequena fração cristalina do fármaco que devido à elevada temperatura pode ter estabelecido algum tipo de interação química com o polímero ou, ainda, devido a possibilidade da água presente nos polímeros terem promovido a dissolução do CP quando submetidos ao aquecimento.

Os picos referentes ao segundo evento endotérmico das amostras RI (Figura 56), apresentaram um deslocamento para temperaturas mais elevadas, em relação aos materiais isolados, entre 140 e 160 °C e um *Tpeak* em aproximadamente 155 °C, que pode indicar um aumento da estabilidade térmica.

Os elevados valores de  $\Delta H$  do segundo evento endotérmico das amostras RI contendo CP (Tabela 17) podem ser atribuídos ao aumento da cristalinidade dessas amostras, devido a uma maior ordenação e maior estabilidade das estruturas dupla hélices através forças intermoleculares e ligações de hidrogênio (SHI et al., 2013) da matriz polimérica, em que os cristais do fármaco ficam embebidos favorecendo a formação de uma estrutura altamente organizada.



**Figura 55:** Curvas DSC das micropartículas reticuladas ionicamente, com e sem fármaco.



**Tabela 17:** Valores de temperatura e entalpia dos eventos endotérmicos das amostras reticuladas ionicamente.

Amostras	$T_{onset}$ (°C) <sup>1</sup>	$T_{onset}$ (°C)	$T_{peak}$ (°C) <sup>1</sup>	$T_{peak}$ (°C)	$T_{endset}$ (°C) <sup>1</sup>	$T_{endset}$ (°C)	$\Delta H$ (J/g) <sup>1</sup>	$\Delta H$ (J/g)
M153RI	-	151,80	-	157,22	-	164,19	-	252,58
M153RI-CP	80,83	135,94	89,06	155,30	96,06	173,45	9,26	316,59
M253RI	-	145,33	-	149,40	-	174,66	-	213,47
M253RI-CP	80,92	154,48	86,07	154,78	91,97	174,97	3,99	316,99
M255RI	-	144,78	-	150,19	-	179,03	-	275,94
M255RI-CP	81,03	132,28	87,73	157,98	92,85	176,51	7,69	343,88

<sup>1</sup> = parâmetro térmico referente ao primeiro evento endotérmico (menor intensidade).

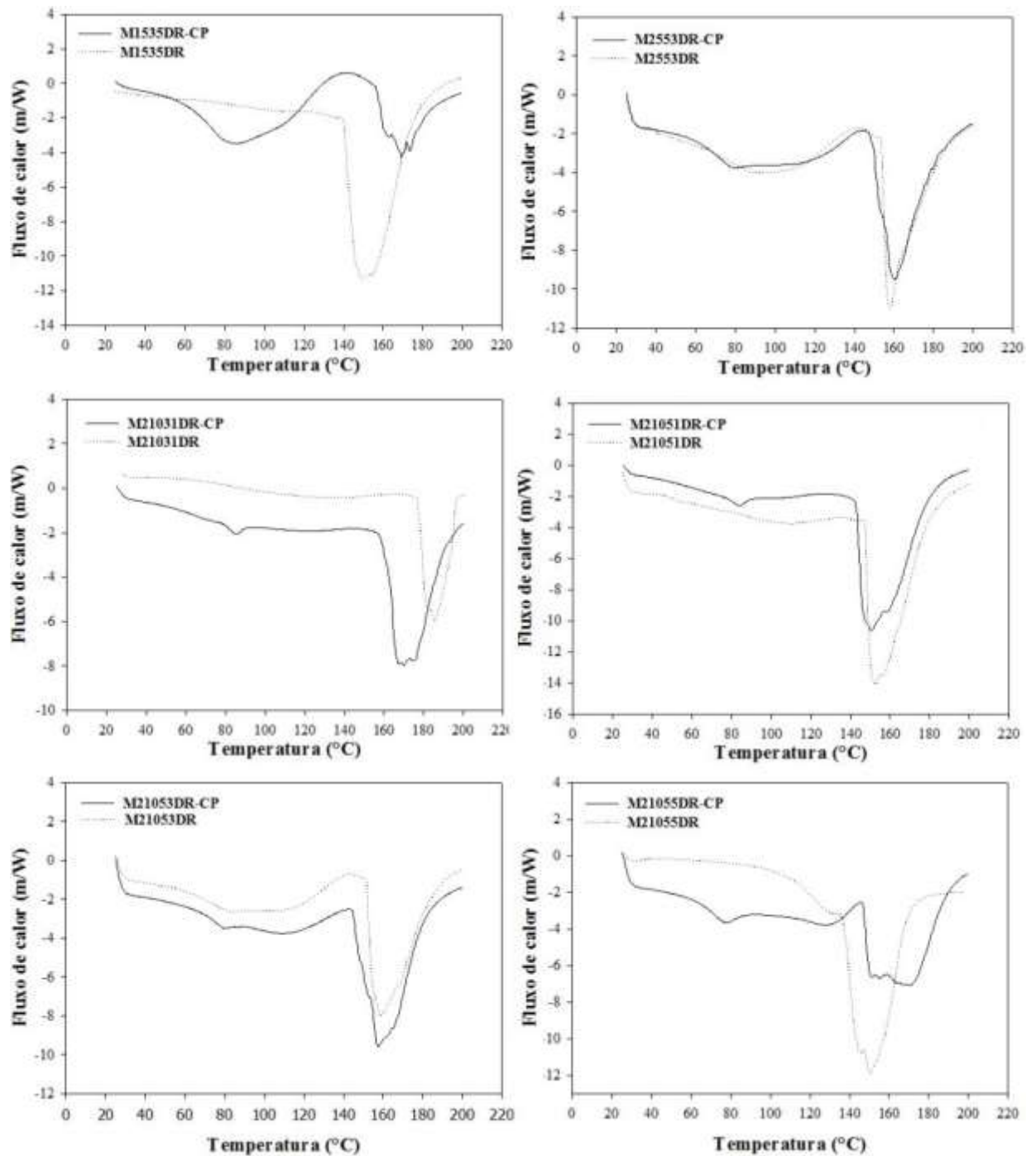
As curvas da DSC das amostras DR, contendo CP (Figura 57, Tabela 18), apresentaram um reduzido evento endotérmico com picos mais alargados, em aproximadamente 80 e 100 °C, com  $T_{peak}$  em torno de 82 °C (Figura 57), que pode ser atribuído à redução do pico de fusão do fármaco nessa região novamente pode ser devido à

possibilidade de o CP estar disperso molecularmente na matriz polimérica e a pequena fração na forma cristalina exibe um pico de reduzida intensidade. Esse comportamento pode ter ocorrido em consequência do aquecimento durante o teste.

Os picos referentes ao segundo evento endotérmico das amostras DR (Figura 57) também apresentaram um deslocamento para temperaturas mais altas (aproximadamente 140-190 °C), em relação aos materiais isolados e as amostras RI, que pode estar relacionado com um aumento da estabilidade dessas amostras devido ao processo de DR, que originou sistemas com elevado nível de organização estrutural.

Esse comportamento pode ser atribuído à formação de ligações covalentes que promovem interações fortes entre as cadeias poliméricas diminuindo a mobilidade intercadeias, conforme relatado por Nishat e Malik (2012). Portanto, o elevado  $T_{peak}$  (160 °C) das amostras pode ser atribuído à maior energia térmica necessária para romper essas ligações e, conseqüentemente, promover a fusão das substâncias.

Figura 56: Curvas DSC das micropartículas duplamente reticuladas, com e sem fármaco.



**Tabela 18:** Valores de temperatura e entalpia dos eventos endotérmicos das amostras duplamente reticuladas.

Amostras	Tonset (°C) <sup>1</sup>	Tonset (°C)	Tpico (°C) <sup>1</sup>	Tpico (°C)	Tendset (°C) <sup>1</sup>	Tendset (°C)	ΔH (J/g) <sup>1</sup>	ΔH (J/g)
M1535DR	-	140,10	-	149,49	-	150,50	-	283,38
M1535DR-CP	64,43	158,85	88,05	169,30	130,95	176,47	117,6	94,74
M2553DR	-	153,74	-	157,49	-	170,64	-	158,69
M2553DR-CP	66,62	149,25	78,38	160,08	89,26	177,33	7,00	177,59
M21031DR	-	172,70	-	175,37	-	198,28	-	81,60
M21031DR-CP	78,96	165,19	85,26	167,14	90,41	188,36	3,53	136,21
M21051DR	-	147,23	-	151,85	-	186,47	-	243,86
M21051DR-CP	76,30	142,91	83,91	150,04	89,50	185,70	4,95	235,18
M21053DR	-	151,73	-	158,30	-	182,00	-	168,39
M21053DR-CP	71,66	150,94	79,55	157,24	86,59	178,79	3,56	165,25
M21055DR	-	137,95	-	150,47	-	186,48	-	251,70
M21055DR-CP	67,40	146,82	77,05	170,34	86,12	187,59	7,11	143,41

<sup>1</sup> = parâmetro térmico referente ao primeiro evento endotérmico (menor intensidade).

O conjunto de dados evidencia as diferenças estruturais entre as micropartículas e os materiais isolados, sendo que as amostras DR exibiram resultados que demonstram a formação de uma estrutura mais forte consolidada por ligações fortes, em que a energia térmica necessária para promover a fusão dos materiais foi maior.

### 5.3.8 Teste “*ex vivo*” de mucoadesão

A capacidade mucoadesiva de sistemas de liberação pode contribuir significativamente para o aumento da permeabilidade e/ou absorção de vários fármacos por aumentar o tempo de retenção, gradiente de concentração local e contato com o epitélio.

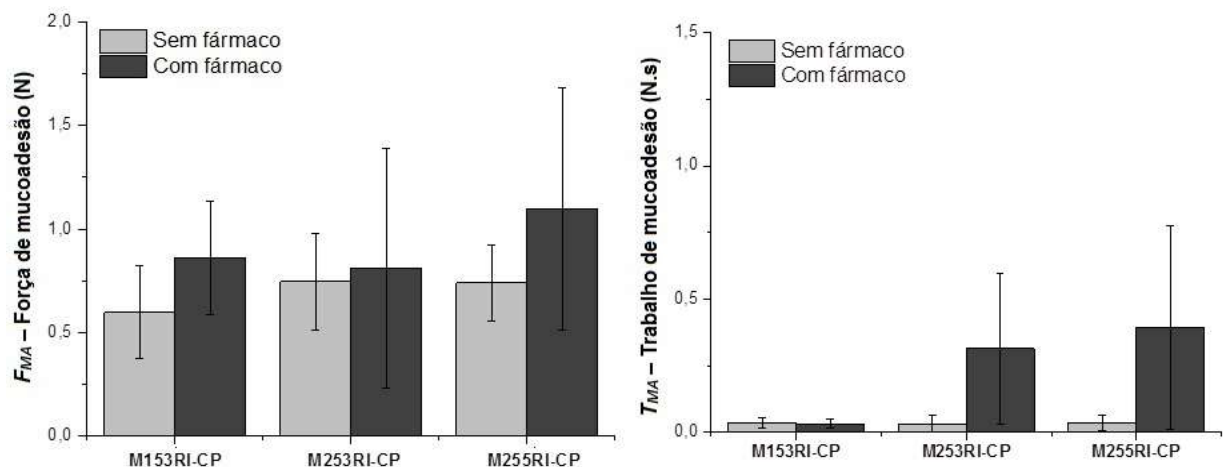
Polímeros bioadesivos considerados ideais para promover a mucoadesão devem apresentar algumas características importantes, como hidrofília, ser de natureza aniônica com grupos formadores de ligações de hidrogênio, apresentar capacidade de intumescimento e apresentar flexibilidade das cadeias para favorecer a interpenetração na camada do muco (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; FIGUEIRAS; CARVALHO; VEIGA, 2007).

Modelos animais têm sido muito utilizados para avaliação da absorção gastrointestinal de fármacos e do desempenho de novos sistemas. A utilização do porco, atualmente, é considerada a mais adequada em estudos para avaliar uma variedade de produtos farmacêuticos, já que a anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal desse animal demonstrou ser semelhante ao do homem, particularmente em relação à mucina, trânsito intestinal e absorção de fármacos (DAVIS; ILLUM; HINCHCLIFFE, 2000; KARARLI, 1995; VARUM et al., 2010). Além disso, de acordo com Kararli (1995), a morfologia do cólon do porco é muito semelhante à de humanos.

O ensaio de mucoadesão “*ex vivo*” foi realizado nas micropartículas RI e DR, com e sem fármaco, para avaliar a influência da incorporação do CP na capacidade de mucoadesão dos sistemas.

A presença do fármaco na matriz polimérica das micropartículas RI não influenciou de maneira significativa nas propriedades mucoadesivas ( $p < 0,05$ ). Além disso, os resultados, apresentados na Tabela 19, demonstram que de acordo com valores de força de mucoadesão ( $F_{MA}$ ) e trabalho de mucoadesão ( $T_{MA}$ ), não houve diferenças estatisticamente significativas para as amostras RI ( $p < 0,05$ ) (Figura 58).

**Figura 57:** Gráfico comparativo dos parâmetro força de mucoadesão -  $F_{MA}$  (N) e trabalho de mucoadesão -  $T_{MA}$  (N.s) para micropartículas RI, sem e com fármaco.



**Tabela 19:** Força de mucoadesão -  $F_{MA}$  (N) e trabalho de mucoadesão -  $T_{MA}$  (N.s) das micropartículas reticuladas ionicamente ( $n = 5$ ).

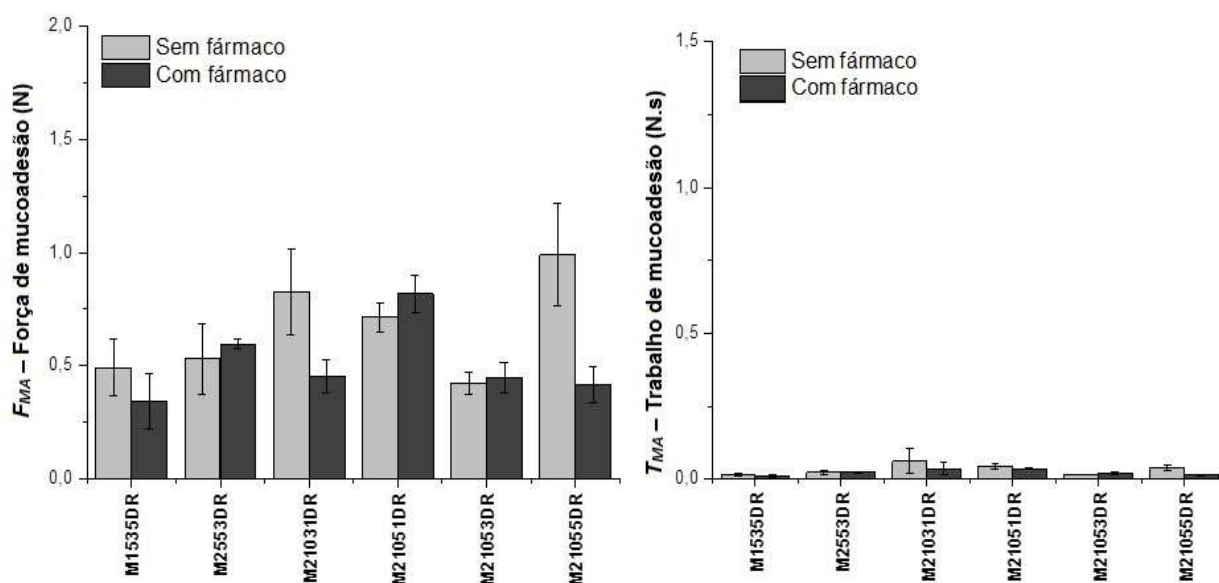
Amostras RI	Força máxima de mucoadesão (N)	Trabalho de mucoadesão (N.s)
M153RI	$0,597 \pm 0,225$	$0,036 \pm 0,018$
M153RI-C	$0,859 \pm 0,275$	$0,033 \pm 0,016$
M253RI	$0,747 \pm 0,233$	$0,033 \pm 0,034$
M253RI-CP	$0,811 \pm 0,580$	$0,315 \pm 0,282$
M255RI	$0,739 \pm 0,181$	$0,038 \pm 0,029$
M255RI-CP	$1,099 \pm 0,586$	$0,394 \pm 0,380$

Nas micropartículas DR, de modo geral, a incorporação do CP não influenciou de maneira significativa os resultados do  $T_{MA}$  e  $F_{MA}$  ( $p < 0,05$ ), exceto para nas amostras M21031DR-CP e M21055DR-CP, em que a incorporação do fármaco contribuiu para redução dos valores desses parâmetros ( $p < 0,05$ ) (Figura 59) (Tabela 20).

Esse comportamento pode ser atribuído a formação de uma estrutura mais coesa e compacta devido à elevada concentração de polímeros e presença do fármaco nos espaços intersticiais das cadeias poliméricas. O possível aumento da intensidade e quantidade de interações intercadeias promoveu a diminuição da flexibilidade que, de acordo com Figueiras e colaboradores (2007), contribui para diminuição do comprimento efetivo das cadeias poliméricas que penetrariam o muco e, conseqüentemente, reduz a força mucoadesiva. Segundo esses autores, para que ocorra o fenômeno da mucoadesão, a flexibilidade das cadeias poliméricas é um parâmetro fundamental no mecanismo de interpenetração e de enovelamento das cadeias dos polímeros com as da mucina presente no muco.

**Tabela 20:** Força de mucoadesão -  $F_{MA}$  (N) e trabalho de mucoadesão -  $T_{MA}$  (N.s) das micropartículas duplamente reticuladas ( $n = 5$ ).

Amostras RI	Força máxima de mucoadesão (N)	Trabalho de mucoadesão (N.s)
M1535DR	$0,491 \pm 0,125$	$0,018 \pm 0,004$
M1535DR-CP	$0,343 \pm 0,122$	$0,012 \pm 0,005$
M2553DR	$0,529 \pm 0,157$	$0,025 \pm 0,007$
M2553DR-CP	$0,595 \pm 0,020$	$0,023 \pm 0,002$
M21031DR	$0,828 \pm 0,191$	$0,063 \pm 0,042$
M21031DR-CP	$0,453 \pm 0,074$	$0,036 \pm 0,022$
M21051DR	$0,714 \pm 0,066$	$0,044 \pm 0,009$
M21051DR-CP	$0,818 \pm 0,082$	$0,036 \pm 0,004$
M21053DR	$0,422 \pm 0,048$	$0,016 \pm 0,001$
M21053DR-CP	$0,447 \pm 0,067$	$0,021 \pm 0,005$
M21055DR	$0,990 \pm 0,227$	$0,040 \pm 0,007$
M21055DR-CP	$0,414 \pm 0,079$	$0,015 \pm 0,003$

**Figura 58:** Gráfico comparativo dos parâmetro Força de mucoadesão -  $F_{MA}$  (N) e trabalho de mucoadesão -  $T_{MA}$  (N.s) para micropartículas duplamente reticuladas, sem e com fármaco.

A característica aniônica dos polímeros utilizados deve contribuir para que os sistemas apresentem características mucoadesivas, pois as estruturas devem permanecer carregadas negativamente em pH 7,4, devido à ionização dos grupos carboxílicos, permitindo que

interações hidrofóbicas e/ou ligações hidrogênio fossem estabelecidas, conforme relatado por Sriamornsak, Wattanakorn e Takeuchi (2010) em estudos sobre as propriedades mucoadesivas de misturas de pectina e mucina.

A gelana, que apresenta reconhecidas propriedades mucoadesivas (LEE; PARK; ROBINSON, 2000; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANGL; JOHNSTON, 2005; NARKAR; SHER; PAWAR, 2010), provavelmente contribuiu de maneira significativa para melhorar as propriedades adesivas das micropartículas.

Panchal e colaboradores (2012), em estudos com comprimidos mucoadesivos utilizando diferentes polímeros naturais bioadesivos, verificaram que as características mucoadesivas das formulações dependiam do tipo e concentração dos polímeros utilizados e que o mais alto valor de força mucoadesiva foi verificado para a gelana.

De acordo com os dados obtidos, verificou-se que a variação da concentração dos agentes reticulantes não influenciou de maneira significativa as propriedades mucoadesivas das micropartículas RI e DR ( $p < 0,05$ ). A diminuição dos valores do  $T_{MA}$  e  $F_{MA}$  quando CP foi incorporado nas amostras DR, pode ser atribuída à formação de uma estrutura muito compacta que dificultou a interação das cadeias poliméricas com as cadeias da mucina, diminuindo a capacidade mucoadesiva dos sistemas.

Os valores de  $T_{MA}$  e  $F_{MA}$  (Tabela 20 e 21) demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras RI e DR ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.9 Análise de Intumescimento

A liberação do fármaco a partir de uma matriz polimérica pode ser controlada de acordo com o grau de intumescimento da rede polimérica (BHATTACHARYA et al., 2012).

A concentração dos grupos ionizáveis no interior da rede polimérica, o grau de ionização, pH e força iônica do meio, a valência do íons, grau de reticulação, equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico são fatores que influenciam diretamente a capacidade de intumescimento dos sistemas (PEPPAS; KHARE, 1993).

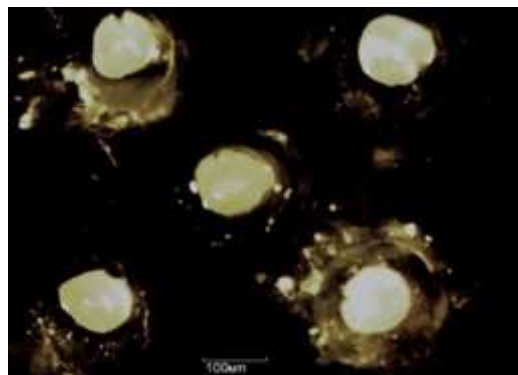
A análise foi realizada com micropartículas com e sem CP, a fim de verificar a influência do fármaco na capacidade de intumescimento das micropartículas. Foi verificado que, de maneira geral, a incorporação do fármaco não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos valores de intumescimento das amostras RI ( $p < 0,05$ ).



Os resultados obtidos para as micropartículas RI (Tabela 21), com e sem fármaco, de maneira geral, demonstraram baixas taxas de intumescimento em meio ácido (pH 1,2) (Figura 60), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ). Esse comportamento deve ser atribuído ao fato dos grupos hidroxilas, presentes nos polímeros, permanecerem na forma não dissociada em pH ácido, exercendo uma força de repulsão eletrostática insignificante que mantém as cadeias unidas impedindo a entrada de líquido, levando a um menor grau de intumescimento. Esse comportamento também foi relatado por Bhattacharya e colaboradores (2012) em estudos com microesferas de carboximetilcelulose reticuladas com  $Al^{3+}$ .

Em pH 7,4 e pH 6,0 (Figura 61 e 62), a amostra M153RI, sem fármaco, erodiu a partir dos 30 e 60 minutos, respectivamente, provavelmente devido à menor concentração de polímeros e agente reticulante que levou à formação de uma estrutura mais fraca, conforme foi demonstrado pelos resultados dos testes reológicos dessa amostra. Considerando que o intumescimento em hidrogéis é inversamente proporcional ao módulo de armazenamento ( $G'$ ) (LACK et al., 2004), essa estrutura mais fraca, mais flexível e com um maior volume hidrodinâmico livre permitiu a entrada de maior quantidade de líquido que, conseqüentemente, resultou na erosão, demonstrada na Figura 60. Em consequência disso, não foi possível dar continuidade a análise dessa amostra.

**Figura 59:** Fotomicrografia da amostra M153RI-CP.



Na amostra M153RI-CP, a incorporação do fármaco parece ter impedido a erosão, provavelmente devido à formação de uma estrutura cujas interações físicas entre o fármaco e polímeros contribuíram para diminuição da mobilidade intercadeias e maior resistência hidrodinâmica do gel, que diminuiu a entrada de líquido. Segundo Peppas e Khare (1993), tais interações presentes na rede estrutural dos hidrogéis físicos impedem a dissolução ou

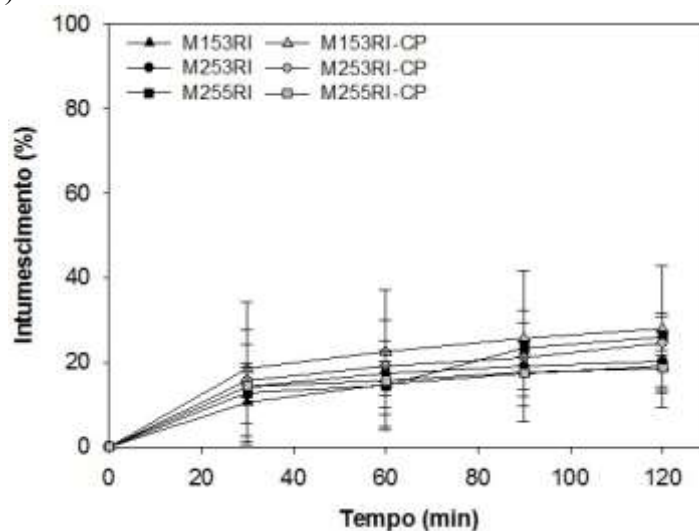
desintegração do gel.

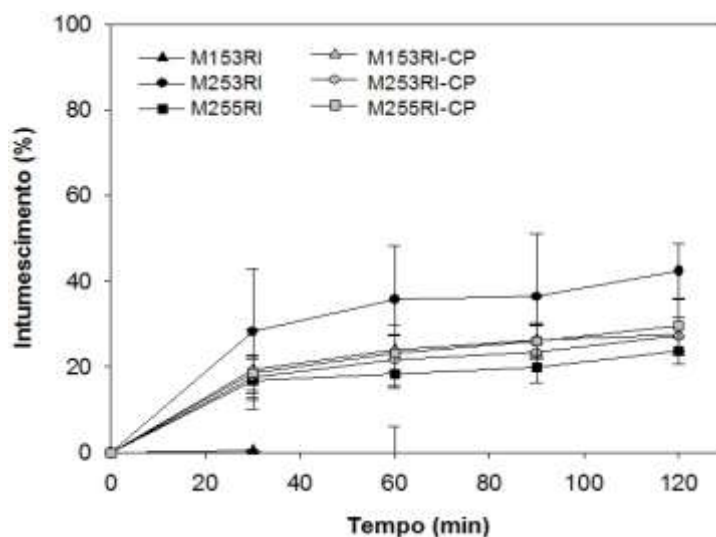
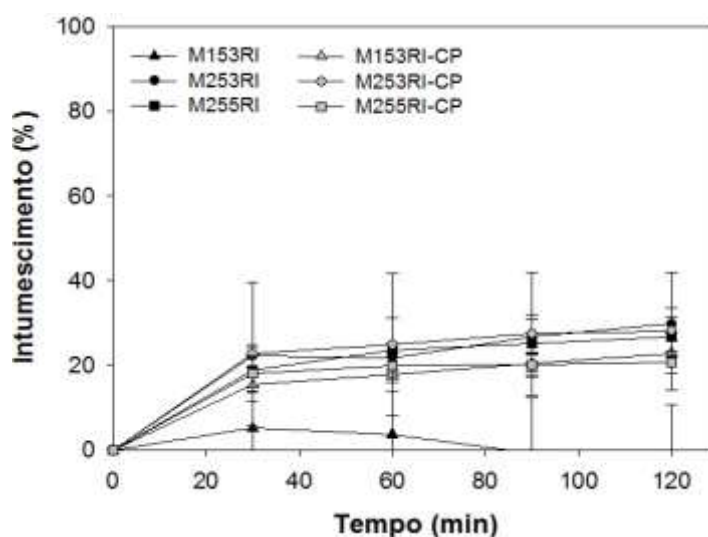
Para as demais amostras RI (Tabela 21), o maior grau de intumescimento, em tampão pH 7,4 e pH 6, foi exibido pela amostra M253RI (sem fármaco) ( $p < 0,05$ ). Esse comportamento pode estar relacionado à elevada quantidade de grupamentos carboxílicos presentes nas cadeias de gelatina (2%) que permanecem ionizados em valores de pH mais elevados, promovendo a expansão da rede polimérica por repulsão eletrostática que, conseqüentemente, permite a entrada de maior quantidade de líquido. Portanto, esse resultado evidenciou o comportamento de intumescimento pH dependente dessa amostra, em que a capacidade de absorção de líquido em pH 7,4 foi maior do que no pH 1,2 (Tabela 21).

Além disso, a formação de uma rede com menor densidade de reticulação, devido à menor concentração de  $Al^{3+}$  da amostra, contribuiu para maior capacidade de intumescimento dessa amostra. Segundo Bhattacharya e colaboradores (2012), o aumento da concentração de  $Al^{3+}$  contribui para formação de uma rede com menor quantidade de poros e, conseqüente, a estrutura apresenta menor capacidade de intumescimento.

Os perfis de intumescimento das micropartículas RI com e sem fármaco estão apresentadas nas Figuras 61 - 63 e os valores na Tabela 21.

**Figura 60:** Perfil de intumescimento (%) das micropartículas reticuladas ionicamente em meio ácido (pH 1,2)



**Figura 61:** Perfil de intumescimento (%) das micropartículas reticuladas ionicamente em pH 7,4.**Figura 62:** Perfil de intumescimento (%) das micropartículas reticuladas ionicamente em pH 6**Tabela 21:** Intumescimento (%) das micropartículas reticuladas ionicamente no equilíbrio (120 min) em diferentes meios.

Amostras	INTUMESCIMENTO (%)		
	Meio Ácido (HCl 0,1N, pH 2,0).	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão fosfato pH 6,0
M153RI	18,92 ± 5,69	-	-
M153RI-CP	27,95 ± 15,06	27,44 ± 4,07	22,87 ± 4,75
M253RI	20,06 ± 10,82	42,39 ± 6,39	29,82 ± 3,80
M253RI-CP	24,45 ± 2,91	27,18 ± 4,53	28,18 ± 13,93
M255RI	25,85 ± 5,76	23,67 ± 3,00	26,85 ± 4,72
M255RI-CP	18,54 ± 4,29	29,61 ± 6,01	20,68 ± 2,63

Nas amostras DR, os resultados (Tabela 22) também demonstraram baixo grau de intumescimento. Provavelmente, as ligações químicas covalentes contribuíram para a formação de estruturas fortemente interconectadas e compactas que apresentaram menor mobilidade das cadeias poliméricas e, portanto, foram mais resistentes ao intumescimento.

Em pH 1,2 (Figura 64), nas amostras DR sem fármaco, o maior grau de intumescimento foi exibido pela amostra M21031DR ( $p < 0,05$ ). Como a maior densidade de reticulação resulta na maior resistência do sistema e menor capacidade de intumescimento (RANI; AGARWAL; NEGI, 2011), a menor densidade de reticulação dessa amostra devido às menores concentrações de reticulantes, explica o maior percentual de intumescimento. Estudos recentes demonstraram que a reticulação de microesferas com menores concentrações de  $Al^{3+}$  (MAITI et al., 2011) e glutaraldeído (RANI; AGARWAL; NEGI, 2011) são mais eficientes quando o objetivo é aumentar a capacidade de intumescimento.

Nas amostras contendo CP, a taxa de intumescimento foi maior em M21051DR-CP e M21053DR-CP ( $p < 0,05$ ), o que pode ser atribuído à utilização de menores concentrações de glutaraldeído (1 e 3%) que contribuiu para o aumento da hidrofília dessa amostras. Esse comportamento é coerente, pois Yu e colaboradores (2011), em estudos com filmes de quitosana/álcool polivinílico reticulado com glutaraldeído, observaram que o aumento da concentração de glutaraldeído promovia a reticulação de maior quantidade de grupos hidroxila e amino diminuindo a capacidade de hidratação dos sistemas.

A amostra M21055DR-CP exibiu menores taxas de intumescimento em todos os meios estudados ( $p < 0,05$ ). Essa menor capacidade de intumescimento deve ser atribuída à formação de uma estrutura tridimensional altamente estável e resistente, devido à elevada concentração de polímeros e reticulantes dessa amostra, bem como a presença do fármaco, em que essa rede com malhas de menores dimensões apresentou reduzidos espaços intercadeias que impediu a entrada de líquido.

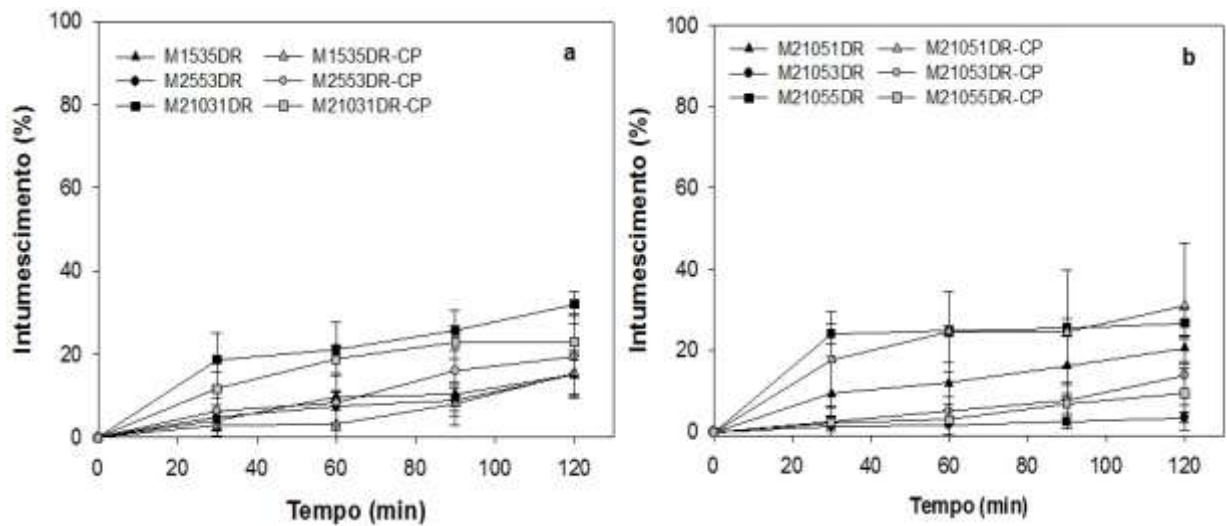
O elevado grau de reticulação limita a entrada de líquido e as ligações intercadeias restringem o movimento das moléculas de água, conseqüentemente, o teor de líquido presente na malha, a capacidade de absorção de água e o tamanho das cadeias diminuem, levando ao menor intumescimento (BERGER et al., 2004; BIGI et al., 2001; CARBINATTO et al., 2014).

Em pH 6,0 e 7,4 (Figura 65 e 66), para as micropartículas DR sem fármaco, as maiores taxas de intumescimento foram exibidas pelas amostras contendo maiores concentrações de ambos os polímeros, independente da concentração dos reticulantes, exceto a amostra

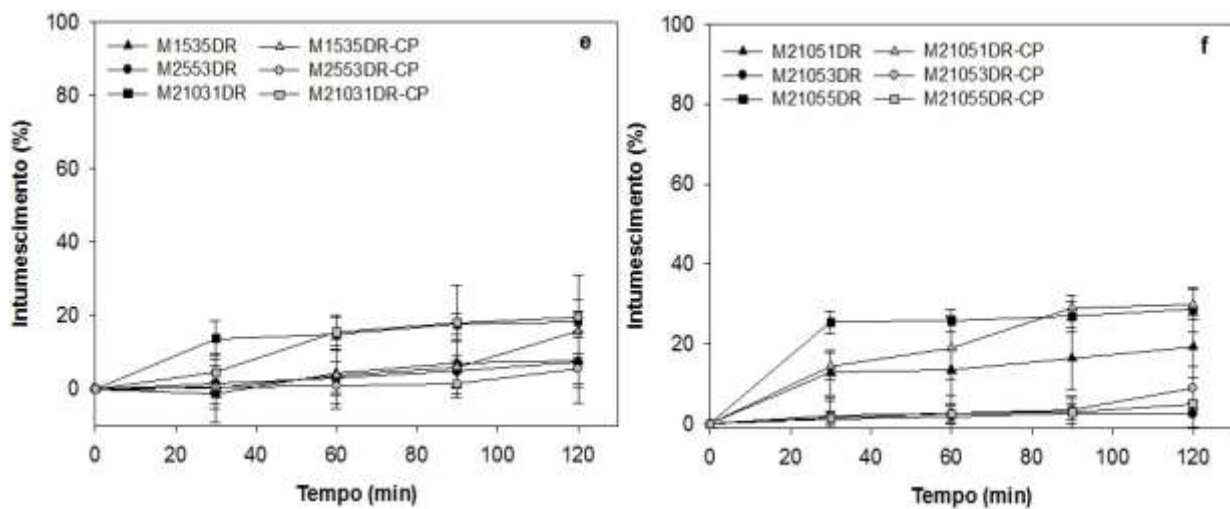
M21053DR ( $p < 0,05$ ). O mesmo comportamento foi verificado para amostras DR contendo CP, exceto em M21055DR-CP ( $p < 0,05$ ).

O perfil de intumescimento das micropartículas DR com e sem fármaco estão apresentadas nas Figuras 64 - 66 e os valores na Tabela 22.

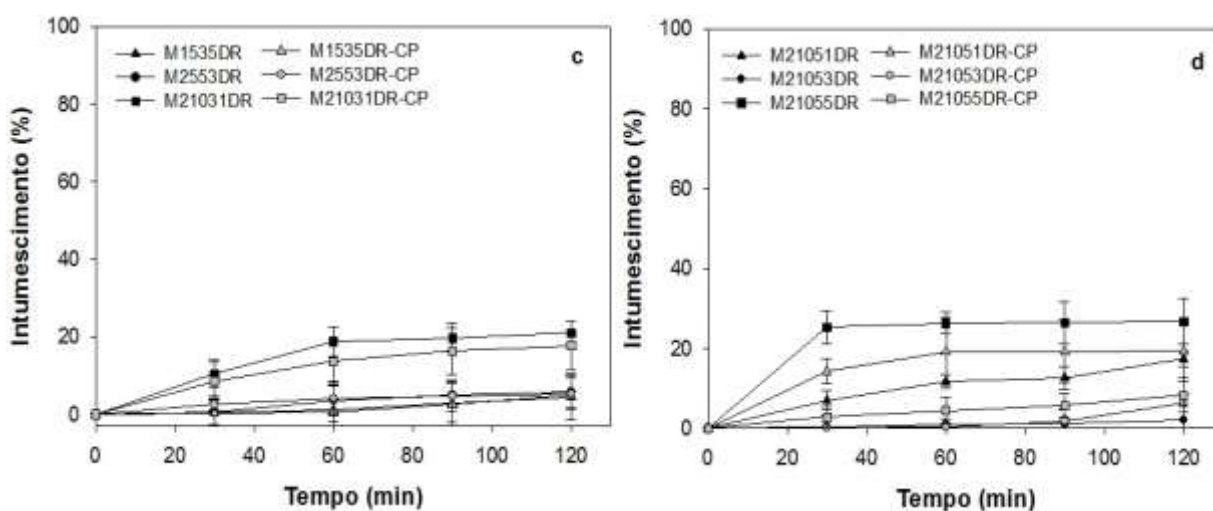
**Figura 63:** Perfil de intumescimento (%) das micropartículas duplamente reticuladas em ácido (pH 1,2).



**Figura 64:** Perfil de intumescimento (%) das micropartículas duplamente reticuladas em pH 7,4.



**Figura 65:** Perfil de intumescimento (%) das micropartículas duplamente reticuladas em pH 6.



**Tabela 22:** Intumescimento (%) das micropartículas duplamente reticuladas no equilíbrio (120 min), em diferentes meios.

Amostras	INTUMESCIMENTO (%)		
	Meio Ácido (HCl 0,1N, pH 1,2).	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão fosfato pH 6,0
M1535DR	15,12 ± 4,75	7,63 ± 11,48	4,47 ± 5,96
M1535DR-CP	15,47 ± 5,28	4,91 ± 1,07	15,76 ± 8,50
M2553DR	15,21 ± 4,96	7,24 ± 6,63	5,86 ± 4,11
M2553DR-CP	19,49 ± 10,05	5,28 ± 4,01	5,43 ± 4,08
M21031DR	32,08 ± 2,85	18,36 ± 2,57	21,05 ± 2,91
M21031DR-CP	22,90 ± 4,37	17,74 ± 6,32	19,63 ± 11,40
M21051DR	20,55 ± 3,31	19,27 ± 7,68	17,40 ± 2,11
M21051DR-CP	31,00 ± 15,54	19,32 ± 7,55	29,82 ± 3,65
M21053DR	3,48 ± 2,93	2,55 ± 3,20	12,20 ± 3,35
M21053DR-CP	33,94 ± 8,99	26,31 ± 2,33	28,93 ± 5,41
M21055DR	24,74 ± 1,31	28,56 ± 5,56	26,78 ± 5,73
M21055DR-CP	9,50 ± 7,32	8,25 ± 4,29	5,01 ± 0,81

Com base nos dados obtidos, de maneira geral, foi verificado que ambas as técnicas de reticulação, a utilização de polímeros aniônicos, bem como a elevada concentração de polímeros contribuíram para obtenção de sistemas que apresentaram baixo grau de intumescimento. Entretanto, as amostras RI apresentaram maior capacidade de

intumescimento em relação as amostras DR, provavelmente devido à formação de uma rede polimérica mais flexível e com malhas de maiores dimensões, o que contribui para a entrada de líquido mais facilmente do que as estruturas DR. Os resultados foram satisfatórios, pois acredita-se que a restrição do intumescimento contribui para o maior controle das taxas de liberação do fármaco.

### 5.3.10 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do CP

O processo de dissolução baseia-se na capacidade de uma substância sólida se dissolver, sendo esta uma propriedade de extrema importância, pois apresenta considerável influência na velocidade e extensão da liberação do fármaco *in vitro* e fornece informações importantes utilizadas para assegurar a qualidade do produto e a biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS et al., 2009).

O fenômeno de dissolução é um fator limitante para a biodisponibilidade do fármaco no organismo humano. Quando um sistema é submetido ao processo de dissolução, as partículas mais externas são as primeiras a serem dissolvidas, criando uma camada de saturação do fármaco denominada camada de difusão. É a partir desta camada, que as moléculas são dissolvidas e entram em contato com os fluidos e membranas biológicas e em seguida podem ser absorvidas para a corrente sanguínea (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; SANTOS, 2012).

Dessa forma, o ensaio de dissolução apresenta um papel importante no controle de qualidade e no desenvolvimento e otimização de novos sistemas de liberação de fármacos, pois os ensaios são desenvolvidos através de métodos que ofereçam informações para prever o comportamento *in vivo* de liberação do fármaco, ou seja, tem objetivo de estabelecer uma correlação de dissolução *in vivo-in vitro* (SANTOS, 2012; STORPIRTIS et al., 2009).

Os perfis de liberação das micropartículas RI e DR estão apresentados nas Figuras 67 e 68.

Para realização do ensaio em meio ácido, a concentração de tensoativo (0,75%) utilizado foi baseado nos estudos de solubilidade do CP realizados por Prezotti (2013), que verificou que essa concentração aumentou a solubilidade do CP em 11,25 vezes e foi considerada suficiente para manter as condições *sink* durante todo ensaio.

Durante o ensaio de dissolução, nas primeiras duas horas em pH 1,2, as amostras RI M153RI-CP, M253RI-CP e M255RI-CP (Figura 67), liberaram aproximadamente 26,38%,

16,86% e 14,27% do fármaco, respectivamente, demonstrando reduzidas taxas de liberação, em comparação com pH 7,4 e pH 6,0. O aumento das taxas de liberação em pH 1,2 observado para a amostra M153RI-CP, em relação as demais, pode ser atribuído à formação de uma rede estrutural mais frouxa e flexível, já que esta amostra apresenta menores concentração de gelana e  $Al^{3+}$ , que durante a secagem pode ter ocasionado a migração de uma maior fração do fármaco para superfície e, da mesma forma, aumentou a capacidade de difusão do fármaco para o meio de diluição no processo de dissolução. Ao contrário, o perfil de liberação das amostras M253RI-CP e M255RI-CP (Figura 67) exibiu uma menor e constante taxa de liberação durante todo o ensaio em meio ácido.

Em tampão fosfato pH 7,4, a amostra M153RI-CP, apresentou um percentual de liberação de 85,32% em duas horas de ensaio. Essa aceleração das taxas de liberação do fármaco observada, novamente pode ser atribuída à formação de uma estrutura mais frouxa e flexível, em que o aumento da pressão hidrostática gerada pela entrada de líquido no sistema provocou a erosão conforme verificado durante o teste.

Para as amostras M253RI-CP e M255RI-CP, as taxas de liberação mantiveram-se constantes, atingindo 37% e 41%, respectivamente, durante todo o ensaio em tampão pH 7,4, o que pode ser atribuído à formação de uma estrutura mais compacta e de elevada densidade de reticulação que deve restringir a entrada de líquido e, conseqüentemente, reduzir a capacidade de difusão do fármaco para o meio de dissolução, promovendo maior controle da liberação. Esse comportamento está em concordância com os dados reológicos que demonstraram que amostras contendo elevadas concentrações de gelana (2%) exibiram o aumento do caráter sólido do sistema, que foi atribuído à formação de uma estrutura mais forte e compacta, conforme evidenciada pela FEG/MEV das micropartículas.

A liberação do fármaco na amostra M153RI-CP apresentou comportamento pH dependente, com baixas taxas de liberação em pH 1,2 e aceleração da liberação com o aumento para pH 7,4. Essa amostra apresentou um efeito *burst* durante as primeiras 2 horas de ensaio, nesse meio, atingindo a liberação de aproximadamente 88% (Figura 67), provavelmente devido às suas características estruturais, anteriormente apresentadas. Esse comportamento está em concordância com os dados de intumescimento dessa amostra (Figura 62, Tabela 23).

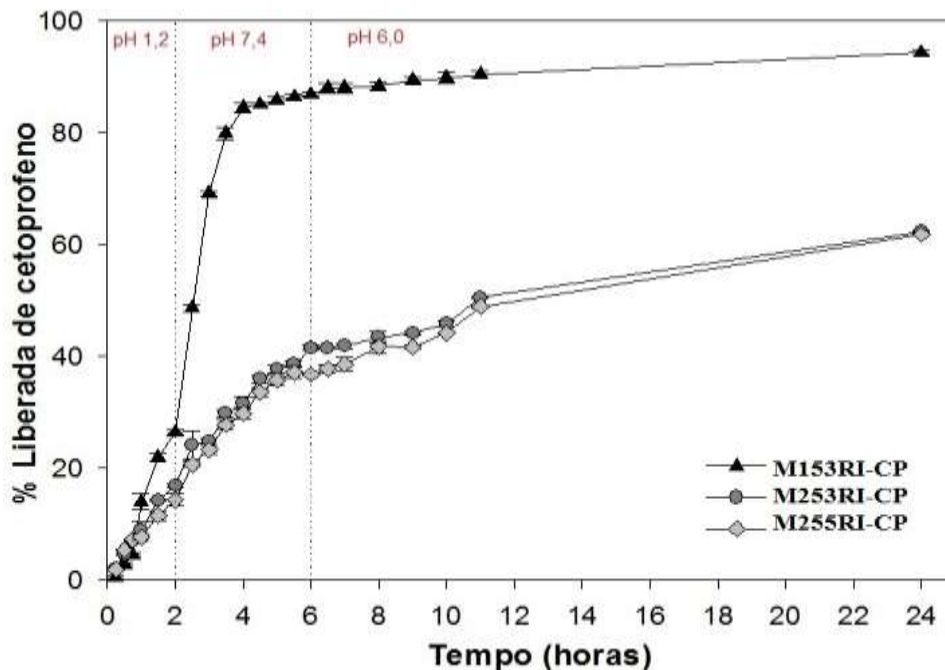
Dessa forma, nas partículas RI, após 24 horas de ensaio nos diferentes meios, a amostra M153RI-CP foi a que apresentou a maior taxa de liberação ( $p < 0,05$ ), liberando aproximadamente 100% do fármaco. Para as amostras M253RI-CP e M255RI-CP as taxas de



liberação foram menores, sendo que elas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ), e atingiram aproximadamente 65% de liberação ao final do teste.

A concentração do agente reticulante nas amostras RI não influenciou nas taxas de liberação do fármaco ( $p < 0,05$ ).

**Figura 66:** Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas reticuladas ionicamente em meios com diferentes valores de pH.



Para as amostras DR (Figura 68), de maneira geral, a liberação foi de aproximadamente 18% em pH 1,2, que demonstra o maior controle das taxas de liberação em relação as amostras RI. Esse comportamento pode ser atribuído à formação de uma rede estrutural mais densa e resistente, que provavelmente manteve sua conformação mais preservada durante o teste, restringindo a entrada de líquido e permitindo o maior controle das taxas de liberação do fármaco.

Em pH 7,4, exceto para M21051DR-CP e M21055-CP, as amostras apresentaram um significativo efeito *burst* liberando aproximadamente 80% em 2 horas de ensaio nesse meio. Esse comportamento pode ser atribuído à maior solubilidade do CP nesse meio, que contribui para o aumento da quantidade de fármaco dissolvido na interface, em relação ao fármaco disperso, levando a uma liberação mais rápida, conforme relatado por Narasimhan e Langer (1997) em estudos sobre o efeito *burst* em sistemas poliméricos.

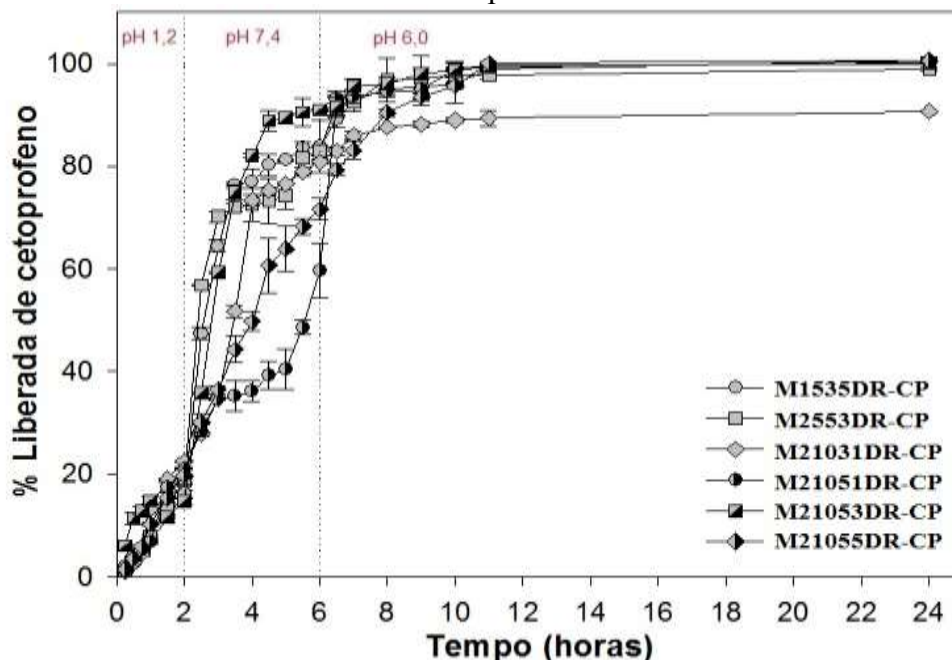
Em pH 6, a liberação se completou para as amostras M1535DR-CP, M2553DR-CP, M21051DR-CP, M21053DR-CP e M21055DR-CP em 10 horas e a liberação manteve-se em aproximadamente 99% mesmo em 24 horas de teste.

A amostras M21051DR-CP e M21055DR-CP apresentaram um perfil de liberação mais controlado do fármaco, exibindo um percentual de liberação de 60% e 70%, respectivamente, ao final das 4 horas de ensaio em pH 7,4. Esse comportamento pode ser atribuído à formação de uma estrutura mais resistente e compacta com malhas de menores dimensões que dificultou a entrada de líquido, o que está em concordância com os dados de intumescimento das amostras, em que M21051DR-CP exibiu um aumento do intumescimento nos primeiros 90 minutos do teste, nesse meio que, em seguida, mantém-se constante. A amostra M21055DR-CP apresentou baixas taxas de intumescimento em todos os meios. Além disso, os dados reológicos demonstraram que a amostra M21055DR-CP apresenta uma estrutura altamente resistente e elástica, o que provavelmente deve ter contribuído para maior controle da liberação do fármaco.

A liberação do fármaco nas amostras DR exibiu um comportamento pH dependente, com baixas taxas de liberação em pH 1,2 e aceleração da liberação com a passagem para o pH 7,4 e pH 6, exceto para M21051DR-CP e M21055DR-CP.

A variação nas concentrações dos reticulantes não influenciou nas taxas de liberação do fármaco das amostras DR ( $p < 0,05$ ).

**Figura 67:** Perfis de liberação do cetoprofeno a partir das micropartículas duplamente reticuladas em meios com diferentes valores de pH.



De acordo com a Tabela 23, pode-se observar que as amostras M253RI-CP, M255RI-CP e M21053DR-CP apresentaram as menores taxas de liberação em relação às demais amostras. Tal comportamento pode ser atribuído à elevada concentração de gelana comum a todas as amostras, que contribuiu para a formação de uma estrutura tridimensional mais compacta e resistente, que possivelmente pode ter promovido um aprisionamento mais efetivo do fármaco ao longo da matriz levando a uma liberação mais lenta e gradual.

Esse resultado está em concordância com os dados da análise reológica, em que essas estruturas apresentaram um maior caráter elástico, exibindo os maiores valores de  $G'$  (Tabela 3 e 4).

**Tabela 23:**  $t_{80\%}$  de liberação do cetoprofeno nas amostras reticuladas ionicamente e duplamente reticuladas.

AMOSTRAS	$t_{80\%}$ de liberação do CP (h)
M153RI-CP	3,5
M253RI-CP	-
M255RI-CP	-
M1535DR-CP	4,5
M2553DR-CP	5,5
M21031DR-CP	6
M21051DR-CP	6,5
M21053DR-CP	4
M21055DR-CP	7

As amostras M253RI-CP, M255RI-CP e M21053DR-CP, de acordo com os resultados da Tabela 23, demonstraram a possibilidade de maior controle das taxas de liberação do fármaco, sendo essas amostras consideradas as mais promissoras como SLC.

### 5.3.11 Análise dos mecanismos de liberação in vitro do cetoprofeno

Apesar da complexidade dos fenômenos envolvidos na liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais hidrofílicos, a modelagem matemática do estudo de perfil de liberação fornece dados relacionados aos processos físico-químicos e traduzem matematicamente a

curva de dissolução permitindo melhor entendimento do mecanismo de liberação (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Na classificação dos sistemas de liberação controlada, os mecanismos pelo quais o fármaco é liberado podem ser atribuídos a diferentes processos físico-químicos, em que a liberação pode ser controlada por difusão, intumescimento e/ou erosão (PEPPAS; NARASHIMAN, 2014).

O modelo Weibull (1951) (Equação 10) pode ser utilizado em quase todos os tipos de liberação e é considerado o mais versátil, pois permite um melhor ajuste aos diferentes tipos de perfis de dissolução (COSTA; LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b) \quad \text{Equação 10}$$

Em que:  $M_t/M_\infty$  é a quantidade cumulativa de fármaco liberado no tempo  $t$  e no tempo infinito, respectivamente;  $a$  é o parâmetro de escala e  $b$  é o parâmetro de forma, sendo que de acordo com o valor numérico, caracteriza a curva de liberação como exponencial ( $b = 1$ ), sigmóide ( $b > 1$ ) e parabólica ( $b < 1$ ) (COSTA; SOUZA, 2001).

O valor de  $b$  está relacionado com o mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica (PAPADOPOULOU et al., 2006). Desta forma, valores de  $b \leq 0,75$  indicam liberação através de difusão Fickiana (Caso I);  $0,75 < b < 1$  corresponde a uma difusão Fickiana associada ao Caso-II e  $b > 1$  a um mecanismo de liberação complexo (PAPADOPOULOU et al., 2006).

O modelo de Korsmeyer-Peppas (1983) é aplicado a sistemas contendo polímeros hidrofílicos e descreve a difusão do solvente e do fármaco através da rede polimérica intumescível. O modelo se baseia na Lei das Potências e relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo (Equação 11), sendo que deve ser aplicado aos dados dos primeiros 60% de liberação do fármaco (KORSMEYER; PEPPAS, 1983; PAPADOPOULOU et al., 2006; SIEPMANN; PEPPAS et AL., 2000).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad \text{Equação 11}$$

Em que:  $M_t$  é a quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo  $t$ ;  $M_\infty$  a quantidade total de fármaco liberado no tempo infinito;  $K$  é uma constante cinética e  $n$  é o expoente de liberação

(KORSMEYER; PEPPAS, 1983; PAPADOPOULOU et al., 2006; SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

O valor numérico do expoente de liberação ( $n$ ) determina o comportamento de liberação, pois de acordo com o valor numérico de  $n$  é possível caracterizar o mecanismo de liberação do fármaco. Assim, para sistemas esféricos, se  $n$  for igual a 0,43 indica difusão Fickiana (Caso I), em que há a difusão do solvente através da rede polimérica, seguida da difusão do fármaco para o meio;  $0,43 < n < 0,85$  indica transporte anômalo ou não-Fickiano, que associa difusão e intumescimento;  $n \geq 0,85$  o mecanismo de liberação é classificado como transporte Caso II, sendo que a liberação do fármaco ocorre pelo relaxamento das cadeias poliméricas e intumescimento (COSTA; LOBO, 2001; KORSMEYER ; PEPPAS, 1983; RITGER; PEPPAS, 1987; SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

O modelo de Hixson-Crowell é utilizado para sistemas em que a dissolução ocorre em planos paralelos à superfície do fármaco de modo que as dimensões do sistema diminuam proporcionalmente, porém mantendo a forma geométrica inicial que se mantém constante durante todo o processo (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). A quantidade e velocidade de fármaco liberado são proporcionais à taxa de dissolução das partículas do fármaco (Equação 13) (COSTA; LOBO, 2001).

$$(1 - f_t)^{1/3} = 1 - K_\beta t \quad \text{Equação 13}$$

Em que:  $f_t$  representa a fração do fármaco dissolvido no tempo  $t$  e  $K$  é a constante de liberação (COSTA; LOBO, 2001).

O modelo de Higuchi (1961) foi desenvolvido para o estudo da liberação de fármacos solúveis e pouco solúveis em água incorporados em sistemas sólidos e semissólidos. A Equação 14 descreve a liberação do fármaco através do processo de difusão, com base na lei de Fick, a partir de um sistema matricial (COSTA; LOBO, 2001; SANTOS, 2012).

$$f_t = K_H t^{1/2} \quad \text{Equação 14}$$

Em que:  $f_t$  é a quantidade acumulada de fármaco dissolvido no tempo  $t$  e  $K_h$  a constante de Higuchi (COSTA; LOBO, 2001; SANTOS, 2012).

O modelo de Baker e Lonsdale (1974), representado pela Equação 15, descreve a liberação controlada de fármacos em matrizes esféricas, sendo muito utilizado para descrever liberação em microcápsulas e microesferas. A escolha do melhor modelo baseia-se nos valores do coeficiente de correlação ajustado (COSTA; LOBO, 2001).

$$\frac{3}{2} \left[ 1 - \left( 1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right)^{2/3} \right] - \frac{Mt}{M_{\infty}} = Kt \quad \text{Equação 15}$$

Em que:  $\frac{Mt}{M_{\infty}}$  é a fração de massa liberada e  $K$  a constante de liberação.

Com base nos maiores valores de  $r^2$  ajustado (Tabelas 24 – 26), verificou-se que, em todos os meios estudados, o modelo que melhor se correlacionou com a liberação do CP foi o de Weibull, exceto para amostra M21051DR-CP em que o perfil de liberação, em pH 7,4, se correlacionou melhor com o modelo de Hixson-Crowell.

A correlação com modelo de Weibull apontou diferentes mecanismo de liberação para as amostras nos diferentes meios estudados. Em meio ácido (pH 1,2), as amostras M153RI-CP, M255RI-CP e M21031DR-CP exibiram valores de  $b < 0,75$ , o que indica que o mecanismo de liberação ocorreu através da difusão Fickiana clássica, devido a um gradiente de concentração.

Na amostra M21053DR-CP ( $b = 0,8691$ ), o mecanismo de liberação ocorreu através da difusão Fickiana associada ao transporte caso II, caracterizada pela difusão do fármaco devido ao gradiente de concentração e ao relaxamento das cadeias poliméricas. As demais amostras exibiram valores de  $b > 1$ , indicando mecanismo complexo de liberação que inclui vários processos, como difusão, intumescimento e erosão, que podem ocorrer simultaneamente (PAPADOPOULOU et al., 2006).

Em pH 7,4 somente M2553DR-CP exibiu mecanismo de liberação através da difusão Fickiana, enquanto para M253RI-CP e M1535DR-CP, a liberação ocorreu pela difusão Fickiana associada ao transporte caso II. As demais amostras, exceto M21051DR-CP, apresentaram mecanismo complexo de liberação que pode ser caracterizada por vários processos, que ocorrem simultaneamente, como relaxamento das cadeias poliméricas, intumescimento e/ou erosão das cadeias poliméricas.

O perfil de liberação do fármaco na amostra M21051DR-CP, em pH 7,4, adequou-se melhor ao modelo de Hixson-Crowell ( $r^2 = 0,8767$ ), o que indica que a taxa de liberação do fármaco é limitada pela taxa de dissolução das partículas do fármaco, ou seja, a liberação é

proporcional à quantidade que ainda falta dissolver. Assim, a redução na liberação do fármaco ocorre à medida que diminui também a quantidade de fármaco ainda presente no sistema para dissolução (SANTOS, 2012).

Finalmente, em pH 6 as amostras RI exibiram um mecanismo complexo de liberação, evidenciado por  $b > 1$  (Tabela 26) e as amostras DR exibiram valores de  $b < 0,75$ , indicando que a liberação foi controlada pela difusão Fickiana (Caso I), em que a extensão e a velocidade de liberação resultam da difusão das moléculas do fármaco através da rede estrutural, que é provocada pelo gradiente de concentração (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

**Tabela 24:** Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos ( $r^2$  = coeficiente de determinação) em meio ácido (HCl 0,1 N, pH 1,2).

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS								
		M153RI-CP	M253RI-CP	M255RI-CP	M1535DR-CP	M2553DR-CP	M21031DR-CP	M21051DR-CP	M21053DR-CP	M21055DR-CP
<b>Baker-Lonsdale</b>	<b>k</b>	5,786.10 <sup>-005</sup>	2,932.10 <sup>-005</sup>	2,251.10 <sup>-005</sup>	1,977.10 <sup>-005</sup>	2,764.10 <sup>-005</sup>	4,548.10 <sup>-005</sup>	3,500.10 <sup>-005</sup>	4,391.10 <sup>-005</sup>	3,438.10 <sup>-005</sup>
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,6770	0,8547	0,9101	0,7406	0,7510	0,7102	0,7019	0,9201	0,7773
<b>Higuchi</b>	<b>k</b>	1,8093	1,2959	1,1378	1,0701	1,2609	1,6082	1,4157	1,5690	1,4022
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,6895	0,8622	0,9153	0,7479	0,7596	0,7208	0,7116	0,9116	0,7866
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	<b>k</b>	0,0453	0,1799	0,3143	0,0318	0,0442	0,0662	0,0330	3,1679	0,0815
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,9545	0,9932	0,9861	0,9989	0,9984	0,9482	0,9627	0,9541	0,9881
	<b>n</b>	1,3436	0,9556	0,7981	1,3039	1,2662	1,2316	1,3572	0,3348	1,1531
<b>Primeira ordem</b>	<b>k</b>	0,0024	0,0016	0,0014	0,0013	0,0016	0,0021	0,0018	0,0018	0,0018
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,9037	0,9942	0,9719	0,9626	0,9664	0,9203	0,9206	0,4659	0,9745
<b>Hixson - Crowell</b>	<b>k</b>	0,0008	0,0005	0,0004	0,0004	0,0005	0,0007	0,0006	0,4404	0,0009
	<b>r<sup>2</sup></b>	0,9099	0,9939	0,9691	0,9659	0,9701	0,9243	0,9257	0,0006	0,9307
<b>Weibull</b>	<b>k</b>	0,3571	0,2528	0,2037	0,1861	0,1966	0,3542	0,2312	0,2108	0,1629
	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>0,9939</b>	<b>0,9978</b>	<b>0,9904</b>	<b>0,9998</b>	<b>0,9998</b>	<b>0,9926</b>	<b>0,9792</b>	<b>0,9588</b>	<b>0,9954</b>
	<b>b</b>	<b>0,5831</b>	<b>1,4429</b>	<b>0,6331</b>	<b>1,5506</b>	<b>10103,3150</b>	<b>0,3816</b>	<b>1168000</b>	<b>0,8691</b>	<b>1,9651</b>



Tabela 25: Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos ( $r^2$  = coeficiente de determinação) em pH 7,4.

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS								
		M153RI-CP	M253RI-CP	M255RI-CP	M1535DR-CP	M2553DR-CP	M21031DR-CP	M21051DR-CP	M21053DR-CP	M21055DR-CP
Baker-Lonsdale	$k$	0,0007	$8,392 \cdot 10^{-005}$	$7,065 \cdot 10^{-005}$	0,0005	0,0005	0,0004	0,0001	0,0006	0,0002
	$r^2$	0,5951	0,8553	0,8224	0,5687	0,5797	0,5582	0,7269	0,5282	0,6612
Higuchi	$k$	4,9184	2,0667	1,9102	4,5235	4,4242	3,9231	2,5324	4,6903	3,3283
	$r^2$	0,6967	0,8895	0,8536	0,6542	0,6426	0,6469	0,7744	0,6390	0,7388
Korsmeyer-Peppas	$k$	1,6279	0,6037	0,4572	1,0870	2,0413	0,1566	0,4673	0,3728	0,1662
	$r^2$	0,7523	0,9725	0,9535	0,7307	0,6715	0,8779	0,8725	0,7788	0,9741
	$n$	0,6995	0,7219	0,7578	0,7571	0,6396	1,0794	0,8045	0,9560	1,0391
Primeira ordem	$k$	0,0060	0,0016	0,0014	0,0051	0,0049	0,0039	0,0021	0,0053	0,0030
	$r^2$	0,7353	0,9615	0,9539	0,7219	0,7066	0,7509	0,8754	0,6832	0,8889
Hixson-Crowell	$k$	0,0016	0,0005	0,0004	0,0014	0,0014	0,0011	<b>0,0006</b>	0,0015	0,0009
	$r^2$	0,7993	0,9395	0,9375	0,7663	0,7172	0,8077	<b>0,8767</b>	0,7571	0,9307
Weibull	$k$	0,2572	0,1012	0,2048	0,1869	0,1562	0,1095	0,2778	0,2772	0,3028
	$r^2$	<b>0,9987</b>	<b>0,9851</b>	<b>0,9920</b>	<b>0,9980</b>	<b>0,9826</b>	<b>0,9953</b>	0,4369	<b>0,9990</b>	<b>0,9922</b>
	$b$	<b>2,8157</b>	<b>0,8996</b>	<b>1,9189</b>	<b>0,9047</b>	<b>0,2704</b>	<b>110804</b>	0,3220	<b>1,3016</b>	<b>2,2207</b>

**Tabela 26:** Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos ( $r^2$  = coeficiente de determinação) em pH 6.

MODELOS DE LIBERAÇÃO		AMOSTRAS								
		M153RI-CP	M253RI-CP	M255RI-CP	M1535DR-CP	M2553DR-CP	M21031DR-CP	M21051DR-CP	M21053DR-CP	M21055DR-CP
<b>Baker-Lonsdale</b>	<i>k</i>	0,0006	7,917.10 <sup>-005</sup>	7,147.10 <sup>-005</sup>	0,0005	0,0005	0,0005	0,0006	0,0007	0,0005
	<i>r</i> <sup>2</sup>	0,0000	0,7649	0,9662	0,0000	0,0000	0,0000	0,4364	0,0000	0,8606
<b>Higuchi</b>	<i>k</i>	3,5589	1,8813	1,8074	3,7421	3,7674	3,4467	3,6980	3,8433	3,6669
	<i>r</i> <sup>2</sup>	0,0000	0,3980	0,8495	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	<i>k</i>	69,0310	7,0986	4,0681	51,0175	57,3790	57,0307	32,0169	63,9342	18,7022
	<i>r</i> <sup>2</sup>	0,9716	0,9645	0,9824	0,6237	0,4199	0,6603	0,1628	0,5679	0,7571
	<i>n</i>	0,0408	0,2953	0,3751	0,0959	0,0786	0,0657	0,1666	0,0649	0,2486
<b>Primeira ordem</b>	<i>k</i>	0,0049	0,0011	0,0010	0,0056	0,0059	0,0042	0,0048	0,0068	0,0043
	<i>r</i> <sup>2</sup>	0,0000	0,0000	0,2922	0,9063	0,7775	0,0000	0,4416	0,9453	0,8046
<b>Hixson-Crowell</b>	<i>k</i>	0,0000	0,0003	0,0003	0,0011	0,0011	0,0010	0,0011	0,0011	0,0010
	<i>r</i> <sup>2</sup>	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4079	0,0000	0,9598
<b>Weibull</b>	<i>k</i>	0,1617	0,1697	0,2572	0,2558	0,2073	0,2531	0,1457	0,2332	0,1712
	<i>r</i> <sup>2</sup>	<b>0,9940</b>	<b>0,9959</b>	<b>0,9921</b>	<b>0,9777</b>	<b>0,9825</b>	<b>0,9995</b>	<b>0,9830</b>	<b>0,9620</b>	<b>0,9939</b>
	<i>b</i>	<b>11845,59</b>	<b>1570397,19</b>	<b>15181,55</b>	<b>0,3838</b>	<b>0,2625</b>	<b>0,2292</b>	<b>0,0610</b>	<b>0,5490</b>	<b>0,3922</b>

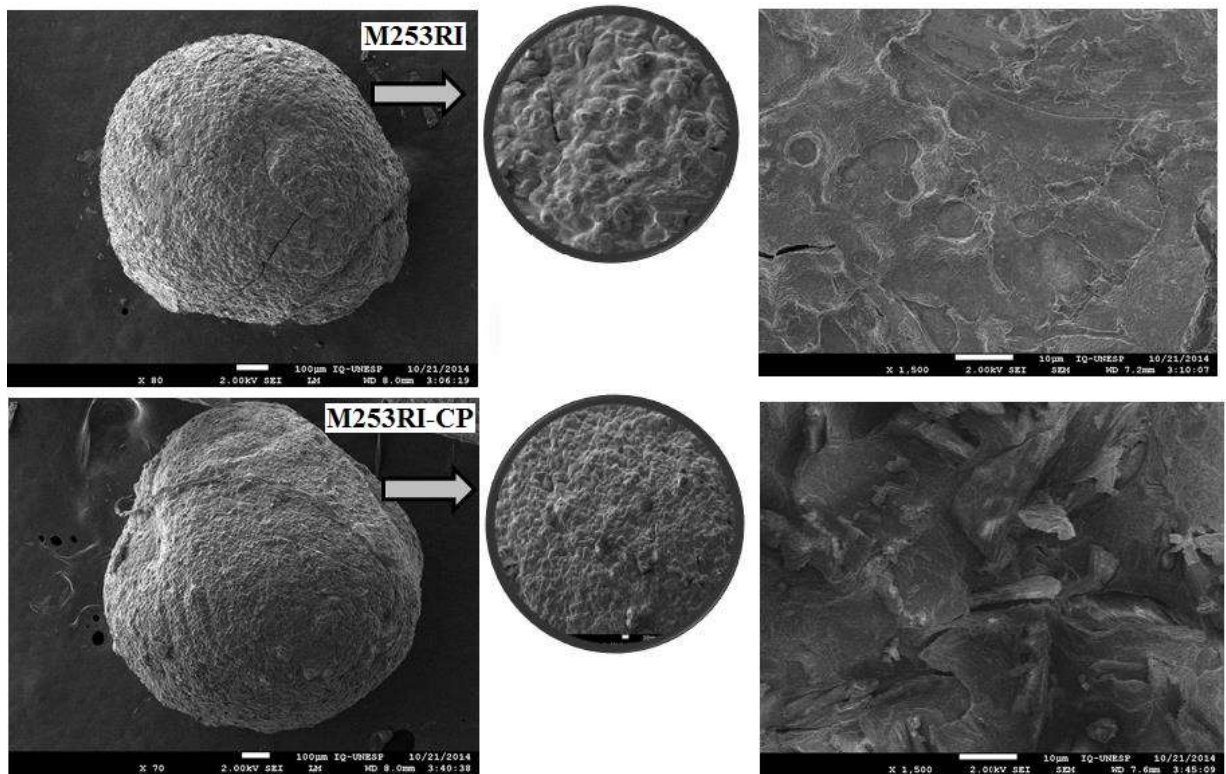
### 5.3.12 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna

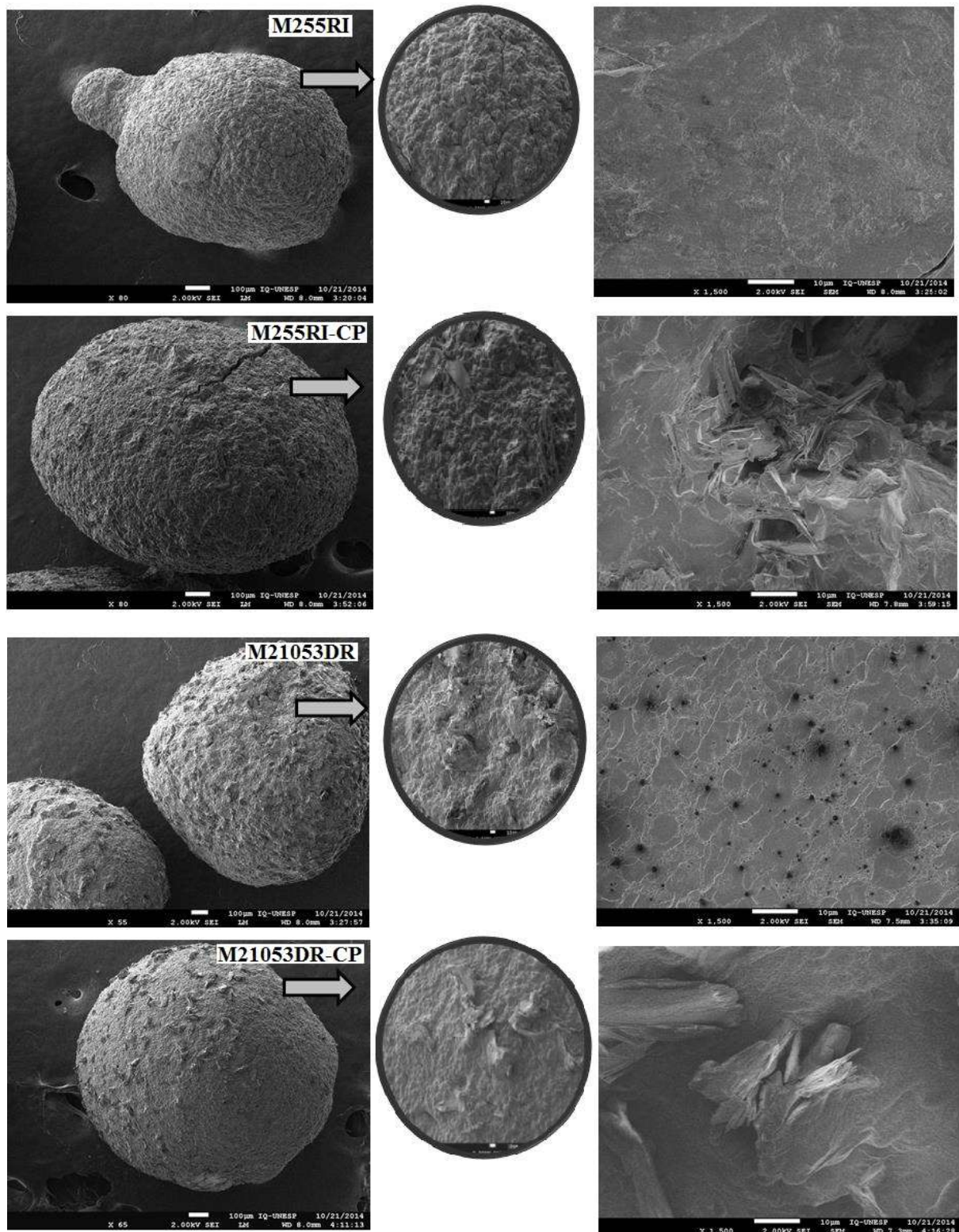
As fotomicrografias de superfície e estrutura interna das micropartículas (Figura 69) evidenciaram uma superfície irregular e rugosa, que pode ser atribuída a distribuição do fármaco nessa região, conforme já relatado pela análise de tamanho e forma das micropartículas. Esse comportamento também foi observado por Maiti e colaboradores (2011), em estudos com microesferas de goma gelana, contendo glipizida, reticuladas com alumínio.

Na análise da estrutura interna das amostras RI com e sem fármaco (M253RI, M253RI-CP, M255RI e M255RI-CP) foi possível verificar que houve a formação de uma matriz polimérica homogênea e compacta.

A estrutura interna da amostra M21053DR (sem fármaco) exibiu uma matriz homogênea, com alguns poros. Na presença do fármaco (M21053DR-CP), verificou-se a formação de uma estrutura compacta, de elevada homogeneidade e a ausência dos poros, indicando a possibilidade de preenchimento desses poros pelas partículas do fármaco.

**Figura 68:** Fotomicrografias da superfície (aumentos de 70 e 300x) e estrutura interna (aumento de 1500x) das micropartículas reticulados ionicamente e duplamente reticulados.





As fotomicrografias dos cortes transversais demonstraram a distribuição das partículas do fármaco nos espaços intercadeias, evidenciando a formação de sistemas matriciais multiparticulados, constituídos por redes tridimensionais que apresentam fármaco disperso na matriz.

## 6 CONCLUSÕES

O processo de retrogradação da AA mostrou-se eficiente, pois permitiu a obtenção de elevados teores de amido resistente.

A utilização de elevadas concentrações de polissacarídeos naturais modificados e a utilização das técnicas de geleificação ionotrópica e dupla reticulação mostraram-se eficientes para obtenção de hidrogéis com elevado grau de reticulação.

Os dados de TPA demonstraram que, de maneira geral, a maior concentração de polímeros favoreceu o aumento dos parâmetros dureza, adesividade e coesividade. A RI contribuiu para maior dureza e coesividade e a DR favoreceu o aumento da adesividade.

Os dados reológicos indicaram que a reticulação através da geleificação ionotrópica e da DR, a elevada concentração de polímeros e a presença do fármaco, de maneira geral, contribuíram para a formação de estruturas mais fortes, de caráter elástico, sendo que a DR originou estruturas mais estáveis, com elevado grau de reticulação e maior elasticidade.

As análises de FEG-MEV evidenciaram que elevadas concentrações de polímeros e agentes reticulantes, a incorporação do fármaco e, principalmente, a DR promoveram a formação de estruturas mais densas e compactas.

A DRX demonstrou que a natureza semicristalina dos polímeros foi preservada, sendo que a maior concentração de polímeros e a DR aumentaram a cristalinidade dos hidrogéis.

A obtenção das micropartículas por geleificação ionotrópica e DR mostrou-se eficiente, pois permitiu elevados valores de rendimento e teores de encapsulação, com a formação de micropartículas esféricas e com distribuição de tamanho homogêneo. Além disso, a FEG-MEV das micropartículas evidenciou a formação de sistemas matriciais multiparticulados, constituídos por redes tridimensionais com fármaco disperso na matriz.

As micropartículas apresentaram importantes propriedades mucoadesivas, principalmente nas mais elevadas concentrações de gelatina e os perfis de liberação *in vitro* das amostras demonstraram o efetivo controle da liberação em meio ácido. As amostras M253RI-CP, 255RI-CP e M21053DR-CP, mostraram-se as mais promissoras para o controle das taxas de liberação do fármaco em pH 7,4. O mecanismo de liberação do cetoprofeno a partir dessas micropartículas mostrou-se independente do pH do meio e foi controlada pela difusão Fickiana associada ao transporte caso II.

## 6.1 CONCLUSÃO GERAL

A associação dos polissacarídeos goma gelana e amido e a modificação através da reticulação iônica e/ou covalente permitiu a obtenção de hidrogéis poliméricos com uma ampla faixa de propriedades físicas e estruturais que possibilitam a sua aplicação no delineamento de sistemas de liberação controlada de fármacos que atendam à diferentes necessidades terapêuticas.

O método de geleificação ionotrópica mostrou-se eficiente na obtenção de micropartículas de hidrogéis e o potencial das micropartículas no controle de liberação do fármaco foi evidenciado pela reduzidas taxas de liberação em meio ácido e manutenção do controle em pH 7,4.

O conjunto de dados gerados nesse trabalho a respeito das propriedades dos hidrogéis constituirá uma importante base de dados a ser explorada no delineamento de novos sistemas de liberação em nosso grupo de pesquisa, bem como na aplicação desses materiais em diferentes áreas, já que suas propriedades podem ser moduladas de acordo com as necessidades específicas.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASHZADEH, S.; DINARVAND, R.; SHARIFZADEH, M.; HASSANZADEH, G.; AMINI, M.; ATYABI, F. Formulation and evaluation of an in situ gel forming system for controlled delivery of triptorelin acetate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 514-521, 2011.

ABRAMOVIC, H.; KLOFUTAR, C. Water adsorption isotherms of some gellan gum samples. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 514-520, 2006.

ADAMS, E.; COOMANS, D.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L. Non-linear mixed effects models for the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 240, n. 1 – 2, p. 37-53, 2002.

AGNIHOTRI, S. A.; JAWALKAR, S. S.; AMINABHAVI, T. M. Controlled release of cephalixin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.63,n. 3, p.249-261, 2006.

AHUJA, M.; SINGH S.; KUMAR, A. Evaluation of carboxymethyl gellan gum as a mucoadhesive polymer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 53, p. 114-121, 2013.

AHUJA, M.; YADAV, M.; KUMAR, S. Application of response surface methodology to formulation of ionotropically gelled gum cordia/gellan beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 161-167, 2010.

ALI, A. .; ALARIFI, A. Characterization and in vitro evaluation of starch based hydrogels as carriers for colon specific drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 725-730, 2009.

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Delineamento e Formas Farmacêuticas: Considerações Biofarmacêuticas e Farmacocinéticas**. In: Allen, L. V., Popovich, N. G., Ansel, H.C. (Ed). *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8ªed. Artmed, p. 158-179, 2007.

ALMEIDA, J. F. S. L. **Preparação e caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas**. 2010. 272f. Tese (Doutorado em Engenharia Química, especialidade Processos Químicos) Universidade de Coimbra da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra, 2010.

ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, A.J. Cross-linked alginate - gelatin beads: a new matrix for controlled release of pindolol. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p. 431-439, 2004.

AL-SHDEFAT, R.; YASSIN, A. E. B.; ANWER, K.; ALSARRA, I. Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded chitosan microparticles. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n.3, p. 1139-1147, 2012.

ALVAREZ-LORENZO C.; BLANCO-FERNANDEZ B.; PUGA A. M.; CONCHEIRO A. Cross-linked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1148-1171, 2013.

ALVES, P. M. A.; CARVALHO, R. A.; MORAES, I. C. F.; LUCIANO, C. G.; BITTANTE A. M. Q. B.; SOBRAL, P. J. A. Development of films based on blends of gelatin and poly(vinyl alcohol) cross linked with glutaraldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 7, p. 1751-1757, 2011.

ALVES, T. V. G. **Obtenção e caracterização de hidrogéis de Poliacrilamida-cometilcelulose como sistemas carreadores de cloridrato de propranolol**. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pará - Faculdade de Farmácia, Belém, 2011.

AMERONGEN H.M., 10.02 - **Anatomy and Histology of the Digestive Tract**, In *Comprehensive Toxicology*. 2ª Ed. Edited by Charlene A. McQueen, p. 3-15, 2010.

AMORIM, A. A. P. O. **Caracterização reológica da mistura de Carboximetilcelulose com amido de milho e Avaliação da microestrutura para estudo de viabilidade em aplicações tecnológicas**. 2012. 55f. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia de Polímeros) Centro Universitário da Zona Oeste – UEZO, Rio de Janeiro, 2012.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2008.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, Jr. L.V. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas; sistemas de liberação de fármacos**. 6ªEd. São Paulo: Ed. Premier, 2000. 548p.

AOUADA, F. A. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose para liberação controlada de pesticidas**. 2009. 124f. Tese (Doutorado em ciências, área de concentração físico-química) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

ARIDA, A. I.; AL-TABAKHA, M. M. Encapsulation of ketoprofen for controlled drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 1, p. 48-54, 2007.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª Ed., Porto Alegre, Ed. Artmed, 2005, 677 p.

BABU, R.J.; SATHIGARI, S.; KUMAR, M.T.; PANDIT, J.K. Formulation of controlled release gellan gum macro beads of amoxicillin. **Current Drug Delivery**, v. 7, n. 1, p.36-43, 2010.

BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress Polymer Science**, v. 33, p. 1088-1118, 2008.



BAKER, R.W.; LONSDALE, H.S. Controlled release: mechanisms and rates. In: Taquary, A.C., Lacey, R.E. (Eds.). **Controlled Release of Biologically Active Agents**. Plenum Press, New York, p. 15–71, 1974.

BANERJEE, S.; SIDDIQUI, L.; BHATTACHARYA, S. S.; KAITY, S.; GHOSH, A.; CHATTOPADHYAY, P.; PANDEY, A.; SINGH, L. Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 198-206, 2012.

BAO, D.; CHEN, M.; WANG, H.; WANG, J.; LIU, C.; SUN, R. Preparation and characterization of double cross-linked hydrogel films from carboxymethylchitosan and carboxymethylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v.110, p. 113-120, 2014.

BARATA, P.; OLIVEIRA, R.; SANTOS D.; STRUSI O.; VEIGA F. Veiculação de fármacos para o cólon. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v.4, p.134-143, 2007.

BARNES, H. A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. Amsterdam: Elsevier, 1996, 199p.

BARROSO, R.C.; ANJOS, M.J.; LOPES, R.T.; JESUS, E.F.O.; BRAZ, D.; CASTRO, C.R.F.; UHL, A. Analysis of matrix characterization by X-ray diffraction and synchrotron radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 65, n. 4 – 5, p. 501-505, 2002.

BASIT, A. W. Advances in colonic drug delivery. **Drugs**, v. 65, n. 14, p. 1991-2007, 2005.

BEKLAND, C.; KIM, K.; PACK, D. Fabrication of PLG microspheres with precisely controlled and monodisperse size distributions. **Journal of Controlled Release**, v. 73, p. 59-74, 2001.

BEMILLER, J. N. Pasting, paste, and gel properties of starch–hydrocolloid combinations, **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 386-423, 2011.

BEMILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. (Ed.). **Starch – Chemistry and Technology**. Academic Press, 2009, 894p.

BEPPU, M. M.; VIEIRA, R. S.; AIMOLI, C. G.; SANTANA C.C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, n. 1 – 2, p. 126-130, 2007.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M., FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19-34, 2004.

BHARDWAJ, T. R.; KANWAR, M.; LAL, R.; GUPTA, A. Natural Gums and Modified Natural Gums as Sustained-Release Carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 10, p. 1025-1038, 2000.

BHATTACHARYA, S. S.; GHOSH, A. K.; BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAY, P.; GHOSH, A. Al<sup>3+</sup> ion cross-linked interpenetrating polymeric network microbeads from tailored natural polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1173-1184, 2012.

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 763-768, 2001.

BILIADERIS, C. G. Starch: Chemistry and Technology – 3<sup>a</sup>ed. United States of America: James BeMiller and Roy Whistler. **Chapter 8 - Structural Transitions and Related Physical Properties of Starch**. Food Science and Technology, San Diego, p. 293-372, 2009.

BOND, L.; ALLEN, S.; DAVIES, M. C.; ROBERTS, C. J.; SHIVJI, A. P.; TENDLER S. J.; WILLIAMS, P. M.; ZHANG, J. Differential scanning calorimetry and scanning thermal microscopy analysis of pharmaceutical materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, n. 1 - 2, p. 71-82, 2002.

BHOSALE, R. G.; ZIEGLER, G. R. Preparation of spherulites from amylose–palmitic acid complexes. **Carbohydrate. Polymers**, v. 80, p. 53-64, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 2003.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação dos compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde Porto, 2012.

BRAVO-OSUNA, F. C.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M. R. Drug release behavior from methyl methacrylate-starch matrix tablets: Effect of polymer moisture content. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 285–293, 2008.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; KINNEARY, J. F. **The**

**MERCK INDEX: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 12. ed. White House Station, NJ: Merck & CO., Inc. p. 905. 1996.

CAI, J.; CAI, C.; MAN, J.; YANG, Y.; ZHANG, F.; WEI, C. Crystalline and structural properties of acid-modified lotus rhizome C-type starch. **Carbohydrate Polymers**, v.102, p. 799-807, 2014.

CANEVAROLO Jr, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004.

CARBINATTO, F. M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2010.

CARBINATTO, F. M. **Complexos de inclusão com amilose: obtenção, caracterização e avaliação como sistemas de liberação controlada de fármacos**. 2014. 152f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2014.

CARBINATTO, F. M.; CASTRO, A. D.; EVANGELISTA, R. C.; CURY, B. S.F. Insights into the swelling process and drug release mechanisms from cross-linked pectin/high amylose starch matrices. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 27-34, 2014.

CARBINATTO, F.M.; CASTRO, A.D.; CURY, B.S.F.; MAGALHÃES, A.; EVANGELISTA, R.C. Physical properties of pectin–high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 281–288, 2012.

CARVALHO, F. C. **Sistemas nanoestruturados mucoadesivos para administração nasal de zidovudina**. 2012. 163f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2012.

CÉLIS, F. T. **Efeito da reticulação induzida pela transglutaminase e o Glutaraldeído sobre as propriedades das micropartículas obtidas por coacervação complexa**. 2009. 126f. Tese (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

CHAN, E. S. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1267-1275, 2011.

CHAN, E. S.; LEE, B. B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 1, p. 63-72, 2009.

CHANDRASEKARAN, R.; MILLANE, R. P.; ARNOTT, S.; ATKINS, E. D. T. The crystal structure of gellan. **Carbohydrate Research**, v. 175, n. 1, p. 1-15, 1988.

CHEETHAM N. W. H.; TAO L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 4, p. 277-284, 1998.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, N. K.; JAIN, A.; SONI, V.; GUPTA, Y.; JAIN, S.K. Cross-linked guar gum microspheres: a viable approach for improved delivery of anticancer drugs for the treatment of colorectal cancer. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 7, n. 3, p. E143–E151, 2006.

CHUNG, H. J.; LIM, H. S.; LIM, S. T. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. **Journal of Cereal Science.**, v. 43, n. 3, p. 353–359, 2006.

CIDRE, D. C. M. **Análise computacional de imagens de focos de criptas aberrantes.** 2011. 67f. Relatório realizado no âmbito da Unidade Curricular de Monografia Curso de Mestrado em Engenharia Biomédica Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2011.

CIRRI, M.; BRAGAGNI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 46-53, 2012.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science ; Technology Today**, v. 2, n. 8, p. 311-320, 1999.

COIMBRA, P. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural.** 2010. 242f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Science.** v. 13, n. 2, p. 23 – 133, 2001.

CUI, R.; OATES, C.G. The effect of amylose–lipid complex formation on enzyme susceptibility of sago starch. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 417-425, 1999.

CURY, B. S. F.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Influence of phosphated cross-linked high amylose on in vitro release of different drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 789–793, 2009a.

CURY, B. S. F. **Reticulação da Alta Amilose: Processo de Obtenção, Caracterização e Avaliação do Desempenho em Sistemas de Liberação Prolongada de Fármacos.** 2005. 124f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara. 2005.

CURY, B. S. F.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1-2, p. 8–15, 2009b.

DAS, A.; WADHWA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Cross-linked guar gum hydrogel discs for colon-specific delivery of Ibuprofen: Formulation and in vitro evaluation. **Drug Delivery**, v. 13, n. 3, p. 139–142, 2006.

DAVIS, S. S.; ILLUM, L.; HINCHCLIFFE, M. Gastrointestinal transit of dosage forms in the pig. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 33-39, 2001.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

DIMANTOV, A.; GREEBERG, M.; KESSELMAN E.; SHIMONI, E. Study of high amylase corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 1, p. 93-100, 2003.

DIMANTOV, A.; KESSELMAN, E.; SHIMONI, E. Surface characterization and dissolution properties of high amylose corn starch-pectin coatings. **Food Hydrocolloids.**, v. 18, n. 1, p. 29-37, 2004.

DINU, M. V.; SCHWARZ, S.; DINU, I. A.; DRAGAN, E. S. Comparative rheological study of ionic semi-IPN composite hydrogels based on polyacrylamide and dextran sulphate and of polyacrylamide hydrogels. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 16, p. 1647 – 1657, 2012.

DIXIT, O.; TREPPE, K.; ALEKSANDRA, K.; NORBERT, M. Experimental investigation and theoretical modelling of absolute convective drying of starch. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 14-20, 2012.

DONA, A. C.; PAGES, G.; GILBERT, R. G.; KUCHEL, P. W. Digestion of starch: In vivo and in vitro kinetic models used to characterize oligosaccharide or glucose release, **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 599-617, 2010.

DRAGAN, E. S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels- A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 572-590, 2014.

ENGLYST, H. N.; KINGSMAN, S. M; CUMMINGS, J. H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 33S – 50S, 1992.

ENSIGN, L. M.; RICHARD, C.; JUSTIN, H. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 557-570, 2012.

ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. **Trends in Food Science ; Technology**, v. 31, n. 2, p. 138-155, 2013.

EVANGELISTA, R. C. **Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos**. 485 f. Tese de Livre-Docência em Farmacotécnica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2006.

EXPONENT LITE Software: introduction to texture analysis. Version 4,5 [SI]: TA-XT Plus, Stable Micro Systems, 2009, 1 CD-ROM.

FADDA, H. M.; BASIT, A. W. Gastrointestinal tract: obstacles or opportunities in drug targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 1, p. 52-59, 2005.

FAN, X. J.; LEE, S. W. R.; HAN, Q. Experimental investigations and model study of moisture behaviors in polymeric materials. **Microelectronics Reliability**, v. 49, n. 8, p. 861-871, 2009.

FIGUEIRAS, A.; CARVALHO, R.; VEIGA, F. Sistemas mucoadesivos de administração de fármacos na cavidade oral: Mecanismo de mucoadesão e Polímeros mucoadesivos/Mucoadhesive drug delivery systems in the oral cavity: Mucoadhesive mechanism and mucoadhesive polymers. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v. 4, n. 2, p. 216-233, 2007.

FREIRE, A. C.; FERTIG, C. C.; PODCZECK, F.; VEIGA, F.; SOUSA, J. Starch-based coatings for colon-specific drug delivery. Part I: The influence of heat treatment on the physico-chemical properties of high amylose maize starches. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 574-586, 2009a.

FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; VEIGA, F.; SOUSA, J. Starch-based coatings for colon-specific delivery. Part II: Physicochemical properties and in vitro drug release from high amylose maize starch films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 3, p. 587-594, 2009b.

FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I - O cólon como local de liberação de fármacos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 337-355, 2006.

FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 2, p. 247-265, 2005.

FUENTES-ZAGAROSA, E.; RIQUELME-NAVARRETE, M. J.; SANCHEZ-ZAPATA, E.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Resistant starch as functional ingredient: A review. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 931-942, 2010.

GALWEY, A. K.; CRAIG, D. Q. M. Thermogravimetric Analysis: Basic Principles - **Chapter 5: Thermal Analysis of Pharmaceutics**, Taylor ; Francis Group, LLC, 2007, 53 p.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 335, n. 1-2, p. 123-129, 2007.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. Gellan Gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 177-211, 2000.

GILMAN, A.; GOODMAN, L. S.; BRUNTON, L. L. **Goodman ; Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 12 ed., Rio de Janeiro, Mc Graw-Hill, 2012, p. 962-989.

GRASSI, M.; LAPASIN, R.; GRASSI, M; COLOMBO, I. Understanding Drug Release and Absorption Mechanisms: A Physical and Mathematical Approach – **Chapter 3: Rheology**, Taylor ; Francis Group, LLC, 2006, 88 p.

GRATTONI, C. A.; AL-SHARJI, H. H.; YANG, C.; MUGGERIDGE, A.; ZIMMERMANN, R. W. Rheology and permeability of cross-linked polyacrylamide gel. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 240, n. 2, p. 601-607, 2001.

HÄGERSTRÖM, H. **Polymer Gels as Pharmaceutical Dosage Forms: Rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery**, Upsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003, n. 293, 76p. (Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy).

HAGESAETHER, E.; HIORTH, M.; SANDE, S. A. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 325-331, 2009.

HAMINIUK, C. W. I.; SIERAKOWSKI, M. R; IZIDORO, D. R.; MACIEL, G. M.; SCHEER, A. P; MASSON, M. L. Comportamento reológico de sistemas pécticos de polpas de frutas vermelhas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 225-231, 2009.

HARALAMPU, S. G. Resistant starch - a review of the physical properties and biological impact of RS3. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 3, p. 285-292, 2000.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 3-12, 2002.

HOSSEINI, S. M.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; GERMAN, J. B.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMADI, A.; KHOSRAVI-DARANI, K.; SHOJAEE-ALIABADI, S.; KHAKSAR, R. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 15, p. 573-580, 2014.

HOU H.; DI VONA, M. L.; KNAUTH, P. Building bridges: Crosslinking of sulfonated aromatic polymers - A review. **Journal of Membrane Science**, v. 423-424, p. 113-127, 2012.

HTOON, A. K.; SHRESTHA, A. K.; FLANAGAN, B. M.; LOPEZ-RUBIO, A.; BIRD, A. R.; GILBERT, E.P.; GIDLEY, M.J. Effects of processing high amylose maize starches under controlled conditions on structural organization and amylase digestibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 236-245, 2009.

HTOON, A. K.; UTHAYAKUMARAN, S.; PIYASIRI, U.; APPELQVIST, A. M.; LÓPEZ-RUBIO, A.; GILBERT, E.P.; MULDER, R. J. The effect of acid dextrinisation on enzyme-resistant starch content in extruded maize starch. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 140-149, 2010.

HUANG M.; KENNEDY J. F.; LI B.; XU X.; XIE B. J. Characters of rice starch gel modified by gellan, carrageenan, and glucomannan: A texture profile analysis study. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 411-418, 2007.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 121-136, 2001.

HUO, W.; ZHANG, W.; WANG, W.; ZHOU, X. Physicochemical properties and drug release behavior of biguanidino and O-carboxymethyl chitosan microcapsules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 70, p. 257-265, 2014.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 - revisão 04**, 2011.

ISHA, C.; NIMRATA, S.; RANA, A. C.; SURBHI, G. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.

JANASWAMY, S. Encapsulation altered starch digestion: Toward developing starch-based delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 600-605, 2014.

JANE, J.; WONG, K.; MCPHERSON, A. E. Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 300, n. 3, p. 219-227, 1997.

JĂTĂRIU, A. N. C.; HOLBAN, M.; PEPTU C. A.; SAVA A.; COSTULEANU M.; POPA, M. Double crosslinked interpenetrated network in nanoparticle form for drug targeting - Preparation, characterization and biodistribution studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1-2, p. 66-74, 2012.



JĂTARIU, A. N. C.; POPA, A.N.; CURTEANU, M.; PEPTU, S. C. A. Covalent and ionic co-cross-linking - an original way to prepare chitosan–gelatin hydrogels for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials**, v. 98, n. 3, p. 342–350, 2011.

JONES D. S. Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 179, n.2, p. 167-178, 1999.

JYOTHI, N. V.; PRASANNA, M.; PRABHA, S.; RAMAIAH, P. S.; SRAWAN, G.; SAKARKAR, S. N. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency: A review. **Journal of Nanotechnology**, v. 27, n. 3, p. 187-197, 2010.

KAFSHGARI, M. H.; KHORRAM, M.; KHODADOOST, M.; KHAVARI, S. Reinforcement of chitosan nanoparticles obtained by an ionic cross-linking process. **Iranian Polymer Journal**, v. 20, n. 5, p. 445-456, 2010.

KARARLI T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals – Review. **Biopharmaceutics ; Drug Disposition**, v. 16, n. 5, p. 351-380, 1995.

KARIM, A. A. B. D.; NORZIAH, M. H.; SEOW, C. C. Methods for the study of starch retrogradation. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 9-36, 2000.

KARJALAINEN, M.; AIRAKSINEN, S.; RATANEN, J.; AATONEN, J.; YLIRRUSI, J. Characterization of polymorphic solid-state changes using variable temperature X-ray powder diffraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1-2, p. 27-32, 2005.

KARKALAS, J., MA, S., MORRISON, W., PETHRICK, R. A. Some factors determining the thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids. **Carbohydrate Research**, v. 268, p. 233–247, 2005.

KAWADKAR, J.; CHAUHAN, M. K. Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 563-572, 2012.

KHONDKAR, D.; TESTER, R.F.; HUDSON, N.; KARKALAS, J., MORROW, J. Rheological behavior of uncross-linked and cross-linked gelatinized waxy maize starch with pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1296-1301, 2007.

KIM, J-H.; CHOI, H-K. Effects of additives on the crystallization and the permeation of ketoprofen from adhesive matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 236, n. 1-2, p. 81-85, 2002.

KIRCHMAJER, D. M.; STEINHOFF, B.; WARREN, H.; CLARK, R.; PANHUIS M. H. Enhanced gelation properties of purified gellan gum. **Carbohydrate Research**, v. 388, p. 125-129, 2014.

KLANG, V.; VALENTA, C.; MATSKO, N. B. Electron microscopy of pharmaceutical systems. **Micron**, v. 44, p. 45-74, 2013.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KULKARNI, R.V.; MANGONDA B. S.; MUTALIKB S.; SA, B. Interpenetrating polymer network microcapsules of gellan gum and egg albumin entrapped with diltiazem–resin complex for controlled release application. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 1001–1007, 2011.

LACK, S.; DULONG, V.; LE CERF, D.; PICTON, L.; ARGILLIER, J. F.; MULLER, G. Hydrogels based on Pullulan crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study. **Polymer Bulletin**, v. 52, n.6, p. 429-436, 2004.

LAM, P. L.; GAMBARI R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. **Journal of Controlled Release**, v. 178, p. 25-45, 2014.

LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International**, v. 33, n. 8, p. 665-671, 2000.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.

LIU, H.; YU, L.; CHEN, L.; LI, L. Retrogradation of corn starch after thermal treatment at different temperatures. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 4, p. 756-762, 2007.

LIU, J.; LIU, C.; LIU, Y.; CHEN, .; HU, Y.; YANG, Z. Study on the grafting of chitosan–gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 103-108, 2013.

LIU, L.; WANG, D.; LIAN X.; WU, H. Retrograded maize starch used as a medium to enrich *Monascus* from the air in winter. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 201-204, 2014.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 3-12, 2000.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143 - 154, 2005.

LUCINDA-SILVA, R. M.; SALGADO, H. R. N.; EVANGELISTA, R. C. Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 260-268, 2010.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-793, 2007.

MA, L.; LIU C. Preparation of chitosan microspheres by ionotropic gelation under a high voltage electrostatic field for protein delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 2, p. 448 – 453, 2010.

MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2008.

MAIOR, J.; REIS, A. V.; MUNIZ, E. C.; CAVALCANTI, A. O. Reaction of pectil and glycidyl methacrilate and ulterior formation of free films by reticulation. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 355, n. 1-2, p. 184–194, 2008.

MAITI, S.; RANJIT, S.; MONDOL, R.; RAY, S.; SA, B. Al<sup>3+</sup> ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164-172, 2011.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro da previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375 – 399, 2002.

MANNA, L.; BANCHERO, M.; SOLA, D.; FERRI, A.; RONCHETTI, S.; SICARDI, S. Impregnation of PVP microparticles with ketoprofen in the presence of supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 42, n. 3, p. 378-384, 2007.

MAO R.; TANG J.; SWANSON B. G. Texture properties of high and low acyl mixed gellan gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 4, p. 331-338, 2000.

**MARTINDALE-THE EXTRA PHARMACOPEIA**. 37 ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 2739p, 2011.

MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R. A.; VÁZQUEZ A. Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films. **Materials Science and Engineering: A**, v. 435-436, p. 681-686, 2006.

MASSICOTTE, L. P.; BAILE, W. E.; MATEESCU, M. A. Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients Structural insights and formulation of pancreatic enzymes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1 – 2, p. 212-223, 2008.

MENEGUIN, A. B.; CURY B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 2, p. 140-149, 2014.

MENEGUIN, A.B. **Obtenção e caracterização de filmes de misturas de amido resistente e pectina como estratégia para liberação cólon específica de fármacos**. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2012.

MENNINI, N.; FURLANETTO, S.; CIRRI, M.; MURA, P. Quality by design approach for developing chitosan-Ca-alginate microspheres for colon delivery of celecoxib-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin-PVP complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 1, p. 67-75, 2012.

MIKLI, V.; KAERDI, H.; KULU, P.; BESTERCI, M. Characterization of powder particle morphology. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Engineering**, v. 7, n. 1, p. 22-34, 2001.

MONTEIRO JR, O. A. C, AIROLDI C. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 2-3, p. 119-128, 1999.

MORRIS, E. R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. Gelation of gellan – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 373-411, 2012.

MRSNY, R. J. Oral drug delivery research in Europe. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 247-253, 2012.

MURA, P. A.; BRAMANTI, M. G.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Utilization of differential scanning calorimetry as a screening technique to determine the compatibility of ketoprofen with excipients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 119, n. 1, p. 71-79, 1995.

MURA, P.; BETTINETTI, G.P.; MANDERIOLI, A.; FAUCCI, M. T.; BRAMANTI, G.; SORRENTI, M. Interactions of ketoprofen and ibuprofen with  $\beta$ -cyclodextrins in solution and in the solid state. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 2, p. 189-203, 1998.

MURA, P.; FAUCCI, M. T.; PARRINI, P. L.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen–cyclodextrin binary systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, n. 1, p. 117-128, 1999.

MUTUNGI, C.; PASSAUER, L.; ONYANGO, C.; JAROS, D.; ROHM, H. Debranched cassava starch crystallinity determination by Raman spectroscopy: Correlation of features in Raman spectra with X-ray diffraction and  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 598–606, 2012.

NARASIMHAN, B.; LANGER, R. Zero-order release of micro- and macromolecules from polymeric devices: the role of the burst effect. **Journal of Controlled Release**, v. 47, n. 1, p. 13-20, 1997.

NARKAR M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Ionotropic Gelation Method. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 11, n. 1, p. 267-277, 2010.

NAYAK, U. Y.; GOPAL, S.; MUTALIK, S.; RANJITH, A. K.; REDDY, M. S.; GUPTA, P.; UDUPA, N. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of zidovudine. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 3, p. 214 – 222, 2009.

NISHAT, N.; MALIK, A. Biodegradable coordination polymer: Polycondensation of glutaraldehyde and starch in complex formation with transition metals Mn (II), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II). **Arabian Journal of Chemistry**, Available online 29 May 2012, ISSN 1878-5352, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.05.002>.

NOKHODCHI, A.; RUBINSTEIN, M. H.; LARHRIB, H.; GUYOT J. C. The effect of moisture on the properties of ibuprofen tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 118, n. 2, p. 191-197, 1995.

NOOR, I. S. M.; MAJID, S. R.; AROF, A. K.; DJURADO, D.; CLARO NETO, S.; PAWLICKA, A. Characteristics of gellan gum–LiCF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub> polymer electrolytes. **Solid State Ionics**, v. 225, p. 649-653, 2012.

OLIVEIRA, G. F.; FERRARI, P. C.; CARVALHO, L. Q.; EVANGELISTA, R. C. Chitosan–pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 1004-1009, 2010.

OSMALEK, T.; FROELICH, A.; SYLWIA, T. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1-2, p. 328-340, 2014.

PALMIERI, G.; BONACUCINA, G.; MARTINO, P. D.; MARTELLI, S. Microencapsulation of semisolid ketoprofen/polymer microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1–2, p. 175-178, 2002.

PANCHAL, A. V.; MEHTA, M.; SHAH, V. H.; UPADHYAY, U. Formulation and in vitro evaluation mucoadhesive bilayered buccal tablets of rosuvastatin calcium. **International journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 8, p. 2733 – 2740, 2012.

PANI, S.; COOK, E. J.; HORROCKS, J. A.; JONES, J. L.; SPELLER, R. D. Characterization of breast tissue using energy-dispersive X-ray diffraction computed tomography. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 68, n. 10, p. 1980-1987, 2010.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MASCHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 44-50, 2006.

PARAGINSKI, R. T.; VANIER, N. L.; MOOMAND, K.; OLIVEIRA, M.; ZAVAREZE, E. R.; SILVA, R. M.; FERREIRA, C. D.; ELIAS, M. C. Characteristics of starch isolated from maize as a function of grain storage temperature. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 88-94, 2014.

PARK, E.Y.; BAIK, B.K.; LIM, S.T. Influences of temperature-cycled storage on retrogradation and in vitro digestibility of waxy maize starch gel. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 1, p. 43-48, 2009.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Iontropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: The Novel Techniques to Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.

PATIL, N. S.; DORDICK, J. S.; RETHWISCH, D. G. Macroporous poly(sucrose acrylate) hydrogel for controlled release of macromolecule. **Biomaterials**, v. 17, n. 24, p. 2343-2350, 1996.

PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH, M. A Review on Iontropic Gelation Method: Novel Approach for Controlled Gastroretentive Gelspheres. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 27-32, 2012.

PATIL, S.; SHARMA, S.; NIMBALKAR, A.; PAWAR, A. Study of formulation variables on properties of drug-gellan beads by factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 3, p. 315-326, 2006.

PEPPAS N. A.; NARASIMHAN B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.

PEPPAS, N. A.; KHARE, A. R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, n. 1-2, p. 1-35, 1993.

PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27-46, 2000.

PEPTU, C. A.; BUHUS, G.; POPA, M.; PERICHAUD, A.; COSTIN, D. Double crosslinked chitosan–gelatin particulate systems for ophthalmic applications. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 25, n. 1, p. 98-116, 2010.

PEREIRA, R. R. A. **Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivo termossensível contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal**. 2011. 171f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

PERERA, A.; MEDA, V.; TYLER, R.T. Resistant starch: A review of analytical protocols for determining resistant starch and of factors affecting the resistant starch content of foods. **Food Research International**, v. 43, n. 8, p. 1959-1974, 2010.

PERERA, C.; HOOVER, R. Influence of hydroxypropylation on retrogradation properties of native, defatted and heat-moisture treated potato starches. **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 361-375, 1999.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. A; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PHROMSOPHA, T.; BAIMARK, Y. Preparation of Starch/Gelatin Blend Microparticles by a Water-in-Oil Emulsion Method for Controlled Release Drug Delivery. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 44-52, 2010.

Portal Johns Hopkins Medicine – Gastroenterology & Hepatology. Disponível em website: <<http://www.hopkins-gi.org/>> Acesso em 3 de maio de 2014.

PRAJAPATI, V. D.; JANI G. K.; ZALA B. S.; KHUTLIWALA, T. A. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer, **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 670-678, 2013.

PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2013.

PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286-295, 2014.

RAJINIKANTH, P. S.; MISHRA, B. Preparation and *in vitro* characterization of gellan based floating beads of acetohydroxamic acid for eradication of H. pylori. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, n. 4, p.413-427, 2007.

RANI, M.; AGARWAL, A.; NEGI, Y. S. Characterization and biodegradation studies for interpenetrating polymeric network (IPN) of chitosan – starch acid beads. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 71 – 84, 2011.

READING, M.; CRAIG, D. Q. M. Principles of Differential Scanning Calorimetry – **Chapter 1: Thermal Analysis of Pharmaceuticals**, Taylor ; Francis Group, LLC, 2007, 21p.

RECIFE, A.C.D. **Amido retrogradado como excipiente de comprimidos para liberação controlada de fármacos: obtenção e caracterização**. 115f. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

REDDY S.M., SINHA V.R., REDDY D.S. Novel oral colon-specific drug delivery systems for pharmacotherapy of peptide and nonpeptide drugs. **Drugs Today**, v. 35 , n. 7, p.537 – 580, 1999.

REED, K. K.; WICKHAM, R. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 25, n. 1, p. 3-14, 2009.

REPKA, M. A.; MICGINITY, J. W. Physycal-mechanical, moisture absorption and bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose hot-mel extruded films. **Biomaterials**, v. 21, n. 14, p. 1509-1517, 2000.

RICCI, M.; BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C.; MACCHIARULO, G.; LUCA, G.; BASTA, G.; CALAFIORE, R. Ketoprofen controlled release from composite microcapsules for cell encapsulation: Effect on post-transplant acute inflammation. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 3, p. 395-407, 2005.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 1987.

RODRIGUES, A.; EMEJE, M. Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 987-994, 2012.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I.; DURAND, S.; GARNIER, C.; TECANTE, A.; DOUBLIER, J. L. Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 5, p. 621-628, 2003.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I.; DURAND, S.; GARNIER, C.; TECANTE, A. J. L.; DOUBLIER, J.L. Rheology-structure properties of waxy maize starch–gellan mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 8, p. 1223-1230, 2006.

ROMANI, F.; CORRIERI, R.; BRAGA, V.; CIARDELLI, F. Monitoring the chemical crosslinking of propylene polymers through rheology. **Polymers**, v. 43, n. 4, p. 1115-1131, 2002.



RUSSO, J. M.; TURNER. **Gastrointestinal tract anatomy, overview:** In Encyclopedia of Gastroenterology, edited by JOHNSON, New York, p. 223-227, 2004.

SAJILATA, M.G.; SINGHAL, R.S.; KULKARNI, P.R. Resistant starch – A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2006.

SAKAMOTO, K. **Pathologic Response of the Gastrointestinal Tract to Toxicants:** In Comprehensive Toxicology. 3<sup>rd</sup>Ed., edited by Charlene A. McQueen, p. 93-115, 2010.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANGL, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p.1666-1691, 2005.

SANTOS, G. J. F. L. **Ensaio de Dissolução das Formas Farmacêuticas: Aplicações na Investigação Científica e na Indústria Farmacêutica.** 2012. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2012.

SAXENA, A.; KALOTI, M.; BOHIDAR, H. B. Rheological properties of binary and ternary protein–polysaccharide co-hydrogels and comparative release kinetics of salbutamol sulphate from their matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 2, p. 263-270, 2011.

SCRHAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos.** São Paulo: Artliber, 2006. 232p.

SHAMAI, K.; BIANCO-PELED H.; SHIMONI, E. Polymorphism of resistant starch type III, **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 3, p. 363-369, 2003.

SHI, M-M.; CHEN, Y.; YU, S.; GAO, Q-Y. Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 19-25, 2013.

SHI, M-M.; GAO, Q-Y. Physicochemical properties, structure and in vitro digestion of resistant starch from waxy rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1151-1157, 2011.

SHOHIN, I. E.; KULINICH, J. I.; RAMENSKAYA, G. V.; VASILENKO, G. F. Evaluation of In Vitro Equivalence for Drugs Containing BCS Class II Compound Ketoprofen. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 1, p. 26-29, 2011.

SHRESTHA, A. K.; NG, C. S.; LÓPEZ-RUBIO, A.; BLAZEK, J.; GILBERT, E. P.; GIDLEY, M.J. Enzyme resistance and structural organization in extruded high amylase maize starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 699-710, 2010.

SHUKLA, R. K.; TIWARI, A. Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 399-416, 2012.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Review**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SIGURDSSON; KIRCH; LEHR, H. H.; KIRCH, J.; LEHR, C. M. Mucus as a barrier to lipophilic drugs, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 56-64, 2013.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.

SILVA, F. P. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poli[(n-isopropilacrilamida)-co-(ácido Metacrílico)] e sua aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos**. 2006. 153f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

SILVERIO, J.; FREDRIKSSON, H.; ANDERSSON, R.; ELIASSON, A. C.; ÅMAN, P. The effect of temperature cycling on the amylopectin retrogradation of starches with different amylopectin unit-chain length distribution, **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 2, p. 175-184, 2000.

SINGH N.; SINGH J.; KAUR L.; SODHI N. S.; GILL B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, n.2, p. 219-231, 2003.

SINHA, V.R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 19-38, 2001.

SINHA, V.R.; KUMRIA, R. Review: Microbially triggered drug delivery to the colon. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 1 p. 3-18, 2003.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanism of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SOARES, G. A. **Estudos dos mecanismos de liberação do diclofenaco de sódio incorporado em matrizes de alta amilose/pectina reticuladas**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2011.

SOARES, G. A.; CASTRO, A. D. D.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Blends of crosslinked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.

SOPPIMATH, K. S.; KULKARNI, A. R.; AMINABHAVI, T. M. Controlled release of antihypertensive drug from the interpenetrating network poly(vinyl alcohol) - guar gum hydrogel microspheres. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 11, n. 1, p. 27- 43, 2000.

SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 54-59, 2010.

STANIFORTH, J. Análise do tamanho de partícula. In: AUTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, p.163-176, 2005

STEENDAM, R.; EISSENS, A. C. E.; FRIJLINK, H. W.; LERK, C. F. Plasticization of amyloextrin by moisture. Consequences for drug release from tablets. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 204, p. 23–33, 2000.

STEENDAM, R.; FRIJLINK, H. W.; LERK, C. F. Plasticization of amyloextrin by moisture. Consequences for compaction behavior and tablet properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 3, p. 245-254, 2001.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, v. 1, 2009. 352p.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

TAKO, M. Molecular Origin for the Thermal Stability of Waxy-rice (Kogane) Starch. **Starch-Starke**, v. 48, n. 11-12, p. 414–416, 1996.

TANG, J.; TUNG, M. A.; ZENG, Y. Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono- and divalent cations. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 1, p. 11-16, 1996.

TESTER, R. F.; KARKALAS; J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture, **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.

**THE MERCK INDEX**. 14<sup>a</sup>Ed. New Jersey: Merck ; Co, p. 522, 2006.

THOMPSON, D. B. Strategies for the manufacture of resistant starch. **Trends In Food Science ; Technology**, v. 11, n. 7, p. 245-253, 2000.

TIȚA, B.; FULIAȘ, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TIȚA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 221-227, 2011.

TOMASIK, P.; HORTON, D. **Chapter 2 - Enzymatic conversions of starch**, In: Derek Horton, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Ed. Academic Press, v. 68, p. 59-436, 2012.

TOPALOĞLU, Y.; GÜLGÜN, Y.; ÜMIT, G. Inclusion of ketoprofen with skimmed milk by freeze-drying. **Farmaco**, v. 54, n. 10, p. 648-652, 1999.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 30<sup>th</sup> ed. Rockville: United State Pharmacopeia Convention, 2007.

USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) **Chapter <711> Dissolution**, 2011a.

USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) **Chapter <1225> Validation of compendial procedures**, 2011b.

USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29). **Reagents section**, 2011c.

VARMA A. K. C.; PANPALIA S.G.; JAYARAM, K. K. Physicochemical and release kinetics of natural and retrograded starch of Indian palmyrah shoots. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, n., p. 33-39, 2014.

VARUM, F. J.; VEIGA, F.; SOUSA, J. S.; BASIT, A. W. An investigation into the role of mucusthickness on mucoadhesion in the gastrointestinal tract of pig. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 335-341, 2010.

VARUM, F. J. O.; HATTON, G. B.; BASIT, A. W. Food, physiology and drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 2, 5 p. 446-460, 2013.

VUEBA, M. L.; CARVALHO, L. A. E. B.; VEIGA, F.; SOUSA, J. J.; PINA, M. E. Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 51-59, 2004.

WANG, Q.; HU, X.; DU, Y.; KENNEDY, J. F. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 842-847, 2010.

WEIBULL, W. A statistical distribution function of wide applicability. **Journal of Applied Mechanics American Society Of Mechanical Engineers – ASME**, v. 18, n.3, p. 293 – 297, 1951.

WHITE, J. L. **Principles of Polymer Engineering Rheology**. New York: Wiley, 1990. 336p.

WILSON, C. G. The transit of dosage forms through the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1-2, p. 17-25, 2010.

WILSON, L. D.; PRATT, D. Y.; KOZINSKI, J. A. Preparation and sorption studies of  $\beta$ -cyclodextrin–chitosan–glutaraldehyde terpolymers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 393, p. 271-277, 2013.

WILSON, L. D.; XUE, C. Macromolecular sorbent materials for urea capture. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 1, p. 667–675, 2013.

WILSON, P. J.; BASIT, A.W. Exploiting gastrointestinal bacteria to target drugs to the colon: An in vitro study using amylose coated tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 300, n. 1-2, p. 89-94, 2005.

WOERTZ, C.; PREIS, M.; BREITKREUTZ, J.; KLEINEBUDDE, P. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview - Part B. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 843-853, 2013.

XIE, Y. Y.; HU, X. P.; JIN, Z. Y.; XU, X. M., CHEN, H. Q. Effect of repeated retrogradation on structural characteristics and in vitro digestibility of waxy potato starch. **Food Chemistry**, v. 163, n. 3, p. 219-225, 2014.

YADAV, P. S.; KUMAR, V.; SINGH, U. P.; BHAT, H. R.; MAZUMDER, B. Physicochemical characterization and in vitro dissolution studies of solid dispersions of ketoprofen with PVP K30 and D-mannitol. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 77-84, 2013.

YAMADA, T.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Sustained release ketoprofen microparticles with ethylcellulose and carboxymethylethylcellulose. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, p. 271-282, 2001.

YAMAMOTO, F. **Reologia e microestrutura de géis ácidos de gelana**. 2006. 126f (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

YANG, F.; XIA, S.; TAN, C.; ZHANG, X. Preparation and evaluation of chitosan-calcium-gellan gums beads for controlled release of protein. **European Food Research And Technology**, v. 237, n. 4, p. 467-479, 2013.

YANG, L. Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 2, p. 77-86, 2008.

YANG, L.; CHU, J. S.; FIX, J. A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, n. 1-2, p. 1-15, 2002.

YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 4, p. 213-230, 2001.

YOON, H. S.; LEE, J. H.; LIM, S. T. Utilization of retrograded waxy maize starch gels as tablet matrix for controlled release of theophylline. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 449–453, 2009.

YU, Q.; SONG, Y.; SHI X.; XU, C.; BIN, Y. Preparation and properties of chitosan derivative/poly(vinyl alcohol) blend film crosslinked with glutaraldehyde. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1-11, p. 465 - 470, 2011.

YUAN, R. C.; THOMPSON, D. B.; BOYER, C. D. Fine-structure of amylopectin in relation to gelatinization and retrogradation behavior of maize starches from 3 wx-containing genotypes in 2 inbred lines. **Cereal Chemistry**, v. 70, p. 81–89, 1993.

ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 317–328, 2011.

ZHANG, J.; WANG, Z. U. Optimization of reaction conditions for resistant *Canna edulis* Ker starch phosphorylation and its structural characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 1, p. 105–113, 2009.

ZHANG, L.; HU, X.; XU, X.; JIN, Z.; TIAN, Y. Slowly digestible starch repared from rice starches by temperature-cycled retrogradation. **Carbohydrate Polymers**, v.84, n. 3, p. 970-974, 2011.

ZHANG, W.; BI J.; YAN, X.; WANG, H.; ZHU, C.; WANG, J.; WAN, J. In vitro measurement of resistant starch of cooked milled rice and physico-chemical characteristics affecting its formation. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 462-468, 2007.

ZHOU, X.; BAIK, B.K.; WANG, R.; LIM S. T. Retrogradation of waxy and normal corn starch gels by temperature cycling. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 1, p. 57-65, 2010.

ZHOU, Y.; MENG, S.; CHEN, D.; ZHU, X.; YUAN, H. Structure characterization and hypoglycemic effects of dual modified resistant starch from indica rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 81-86, 2014.