



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**



**Micropartículas de Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose ou Eudragit[®]
RS100 contendo Budesonida obtidas por Emulsificação e Evaporação de
solvente e por *Spray-drying***

Araraquara

2015

RAPHAELA REGINA DE ARAÚJO PEREIRA

**Micropartículas de Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose ou Eudragit[®]
RS100 contendo Budesonida por Emulsificação e evaporação de solvente
e por *Spray-drying***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientada: Raphaela Regina de Araujo Pereira

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Palmira Daflon Gremião

Co-orientador: Prof^a Dr. Marcos Luciano Bruschi (UEM-PR)

Co-orientadora estrangeira: Prof^a Dra. Rita Cortesi (UNIFE-Itália)

Araraquara

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESTE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

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

P436m Pereira, Raphaela Regina de Araujo
Micropartículas de Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose ou Eudragit[®] RS100 contendo Budesonida obtidas por emulsificação e evaporação do solvente e por Spray-Drying / Raphaela Regina de Araujo Pereira – Araraquara, 2015
118 f.

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

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião
Coorientador: Marcos Luciano Bruschi

1. Micropartículas. 2. Budesonida. 3. Doença Inflamatória Intestinal. 4. Doença de Crohn. 6. Cólon. I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Bruschi, Marcos Luciano, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

Raphaela Regina De Araújo Pereira

Micropartículas de Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose ou Eudragit® RS100 contendo Budesonida por Emulsificação e Evaporação de solvente e por *Spray-drying*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em: 23/10/2015

Banca Examinadora:

Prof.º Dra. : **Maria Palmira Daflon Gremião**

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof.ª Dra. : **Valquiria Miwa Hanai Yoshida**

Instituição: Universidade de Sorocaba

Prof.ª Dr. : **Hernane da Silva Barud**

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof.ª Dr. : **Clóvis Augusto Ribeiro**

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof.ª Dr. : **Marlus Chorilli**

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

“O que realmente conta na vida não é apenas o fato de termos vivido; é a diferença que fizemos nas vidas dos outros que determina importância da nossa própria vida.”

Nelson Mandela

AGRADEDIMENTOS

Aos meus pais, Vâmia e Luís, por todo amor, apoio e carinho e por sempre acreditarem na minha capacidade.

Ao meu irmão Rodolpho pelo amor, amizade, sinceridade e companheirismo.

À minha família pelo apoio e carinho.

À minha orientadora professora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião pela orientação na execução do trabalho, pelo exemplo transmitido ao longo destes anos, pela amizade e dedicação.

Ao meu co-orientador professor Dr. Marcos Luciano Bruschi pela sua gentileza e sabedoria transmitida ao longo destes anos, e pela contribuição para a realização deste trabalho.

À querida professora Dra. Rita Cortesi por ter me dado a oportunidade de desenvolver parte do meu doutorado na Itália, pela contribuição para a realização deste trabalho e pela sua amizade, dedicação, apoio, confiança e carinho!

Aos professores Dra. Valquíria Miwa Hanai Yoshida, Dr. Hernane da Silva Barud, Dr. Clovis Augusto Ribeiro e Dr. Marlus Chorilli pela contribuição na discussão da tese.

As professoras Dra. Selma Lucy Franco, Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, Dra. Elza Kimura, Dra. Andréa Diniz, Dra. Gisely Lopes e Dra. Miriam Souza Lima pelo carinho, estímulo e bem querer.

As minhas amigas, Lizziane, Marcela e Jaqueline, fiéis companheiras para todas as horas principalmente as mais difíceis, que eu tive a felicidade e alegria de conhecer e que irei levar para toda minha vida!

A “miei amici brasiliani” Carolina, Flávia, Líndio, Fábio, Tais, Manuela, Mabel e Augusto, e “mia amica di Belgio” Justine fundamentais em minha estadia na Itália, que tive a alegria de conhecer na Itália e levarei para toda a vida!

A “miei amici italiani” Federico, Riccardo, Elisa, Maddalena, Angela meus amigos de laboratório por toda a ajuda, carinho, apoio e amizade!

À Patrícia, que se fez uma grande amiga, sempre tão dedicada e preocupada comigo. Com certeza, sem essa cumplicidade e carinho tudo teria sido muito mais difícil. Sou eternamente grata à sua amizade!!!

Aos meus grandes e eternos amigos Eliane, Vanessa, Paulo, Maureen, Sabrina, Érica, Danielle, Robson, Maju, Bruna, Laertez pelo apoio incondicional!

Aos meus amigos da UEM que sempre me ajudaram muito e contribuíram para a alegria mesmo nos momentos mais difíceis Priscila, Adriana, Janine, Patrícia, Sabrina, Mariana, Fernanda, Jéssica, Kariman, Rafaela, e em especial a Hélen, Lucas e Mônica pelo carinho e compreensão!

Ao grupo do Laboratório de Farmacotécnica da FCFAr/UNESP, por toda a cooperação, união e pela amizade Lílíane, Flávia Chíva, Roberta, Jessica, Maira, Fabíola, Márcia, Valéria, Aline, Karisa, Charlene, Natália, Leonardo, e em especial a Fernanda e Ana Luíza.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, pelo carinho e amizade, em especial à Natália.

Às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo apoio e dedicação, em especial à Cláudia, pela paciência e auxílio com toda documentação necessária para a bolsa PDSE.

À Università degli studi di Ferrara (UNIFE), em especial a Dra. Elisabetta Esposito pelo carinho e atenção.

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A doença inflamatória intestinal é uma inflamação crônica de etiologia e patogenia ainda desconhecidas, abrange a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa idiopática. O tratamento nos últimos anos vem sendo realizado por meio da administração oral do corticosteróide budesonida, destacando-se por promover um tratamento potencialmente eficaz e seguro, por ser pouco absorvido sistemicamente e ter ação anti-inflamatória tópica. Entretanto, as formulações encontradas comercialmente apresentam desvantagens como o controle ineficiente da liberação do fármaco ou a incapacidade de alcançar e permanecer nas áreas inflamadas, em consequência a eficácia do tratamento é reduzida. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar micropartículas produzidas pelos métodos de emulsificação e evaporação de solvente e *spray-drying* utilizando polímeros mucoadesivos para tratamento de doenças inflamatórias intestinais. Desenvolveu-se e caracterizou-se micropartículas poliméricas, compostas por ftalato de hidroxipropilmetilcelulose ou Eudragit[®] RS100, contendo budesonida. As micropartículas foram avaliadas quanto ao teor e eficiência de encapsulação, tipo e cinética de liberação de budesonida. A caracterização do estado sólido utilizou as análises de difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FITR) e calorimetria diferencial exploratória (DSC). Validou-se metodologia analítica por CLAE para a detecção e quantificação de budesonida, a qual foi considerada específica, seletiva, exata e precisa nas condições analisadas. Utilizando-se as técnicas de emulsificação e evaporação de solvente e *spray-drying*, foi possível a obtenção de sistemas microparticulados. As partículas por emulsificação e evaporação de solvente apresentaram eficiência de encapsulação (EE%) de budesonida, entre $40,76 \pm 1,26\%$ a $68,34 \pm 1,48\%$, sendo que a formulação com a proporção fármaco/polímero 1/25 (MHEB-1) foi a que obteve a melhor EE% de budesonida. Enquanto, as micropartículas por *spray-drying* apresentaram alta eficiência de encapsulação (EE%) de budesonida, entre $81,66 \pm 0,05\%$ a $103,31 \pm 0,83\%$, sendo que a formulação com a proporção fármaco/polímero 1/4 (MESB-1) foi a que obteve a melhor EE% de budesonida. As micropartículas com e sem budesonida foram caracterizadas por difração de raios-X, DSC e FTIR mostrando que houve uma possível interação entre o fármaco e os polímeros. O perfil de liberação da budesonida nas micropartículas foi mais lento em comparação ao fármaco livre, sendo que o modelo matemático mais adequado foi o de segunda ordem para todas as micropartículas produzidas por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray-drying*. Já o mecanismo de liberação da budesonida para as micropartículas produzidas por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray-drying*, foi por transporte anômalo, governada pelos fenômenos de difusão e intumescimento das cadeias poliméricas. Portanto, as metodologias aplicadas demonstraram-se promissoras para a obtenção de micropartículas de budesonida, principalmente pelo método por *spray-drying* um processo rápido, contínuo, reprodutível e escalonável, as quais puderam proporcionar a liberação modificada da budesonida.

Palavras-chave: Micropartículas, Budesonida, Doença Inflamatória Intestinal, Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa idiopática, Cólon, Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, Eudragit[®], Emulsificação e evaporação de solvente, *spray-drying*.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease is a chronic inflammation of unknown etiology and pathogenesis, includes Crohn's disease and ulcerative rectocolitis idiopathic. The treatment has been carried out in recent years by oral administration of the corticosteroid budesonide, notably by promoting a potentially effective and safe treatment for being systemically absorbed and have topical anti-inflammatory action. However, the formulations found commercially present disadvantages as inefficient control of drug release or the inability to achieve and remain inflamed areas, the effectiveness of treatment is reduced. Thus, the present work had as objective to develop and characterize micro-particles produced by methods of emulsification and solvent evaporation and spray-drying using mucoadhesive polymers for treatment of inflammatory bowel disease. Developed and has polymeric microparticles, composed of Eudragit[®] RS100 or hydroxypropylmethylcellulose phthalate, containing budesonide. The microparticles were evaluated encapsulation efficiency content, type and release kinetics of budesonide. The solid-state characterization used the x-ray scattering analysis (XRD), scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy with Fourier transform (FITR) and differential scanning calorimetry (DSC). Validated HPLC analytical methodology for the detection and quantification of budesonide, which was considered, selective, exact and specific needs under the conditions tested. Using the technique of emulsification and solvent evaporation and spray drying, it was possible to obtain microparticulate systems. The particles by emulsification and solvent evaporation presented encapsulation efficiency (EE%) of budesonide, between $40.76 \pm 1.26\%$ to $68.34 \pm 1.48\%$, where the formulation with the drug/polymer ratio 1/25 (MHEB-1) was the one that got the best EE% of budesonide. While, the micro-particles by spray drying showed high efficiency of encapsulation (EE%) of budesonide, between $81.66 \pm 0.05\%$ to $103.31 \pm 0.83\%$, where the formulation with the drug/polymer ratio 1/4 (MESB-1) was the one that got the best EE% of budesonide. The microparticles with or without budesonide were characterized by x-ray diffraction, DSC and FTIR showing that there was a possible interaction between the drug and polymers. The release profile of budesonide in microparticles was slower compared to drug free, being that the most suitable mathematical model was the second order for all particles produced by emulsification and evaporation of solvent and spray drying. Already the release mechanism of budesonide for the microparticles produced by emulsification and solvent evaporation and spray drying, for anomalous transport, governed by the diffusion phenomena and swelling of the polymer chains. Therefore, the applied methodologies demonstrated promising to obtain microparticles of budesonide, mainly by spray-drying method a fast process,

solid, reproducible and scalable, which might provide the modified release budesonide.

Keywords: Microparticles, Budesonide, Inflammatory Bowel Disease, Crohn's Disease, Idiopathic Ulcerative Rectocolitis, Colon, Hydroxypropylmethylcellulose phthalate, Eudragit[®], Emulsification and solvent evaporation, spray-drying.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Áreas afetadas (em vermelho) pela Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa Idiopática.....	16
Figura 2.	Estrutura química da budesonida	20
Figura 3.	As etapas do processo de mucoadesão	31
Figura 4.	Estrutura química do Eudragit® RS100.....	35
Figura 5.	Estrutura química da HPMCF.	36
Figura 6.	Concentrações de budesonida analisadas utilizadas para obtenção das curvas de análise.....	41
Figura 7.	Célula de difusão de Franz modificada: 1) compartimento contendo o meio de liberação; 2) abertura de coleta de amostras; 3) banho termostaticado; seta vermelha: barra magnética para manter o sistema sob agitação	51
Figura 8.	Curva de análise da budesonida obtida por CLAE em 242 nm – Equipamento Agilent® (n=6)	52
Figura 9.	Cromatograma da budesonida em 242 nm - Equipamento Agilent®	54
Figura 10.	Curva de análise da budesonida obtida por CLAE em 245 nm – Equipamento Waters® (n = 6).	56
Figura 11.	Cromatograma da budesonida em 245 nm - Equipamento Waters®	59
Figura 12.	Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação do solvente: (a) MEEB-1 (1490x); (b) MEE-1 (1370x); (c) MEEB-2 (1610x); (d) MEEB-2 (1110x).....	63
Figura 13.	Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação do solvente: (a) MHEB-1 (400x); (b) MHE-1 (400x); (c) MHEB-2 (2100x); (d) MHEB-2 (2100x).....	64
Figura 14.	Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas por <i>spray-drying</i> : (a) MHSB-1(1500x); (b) MHS-1(1500x); (c) MHSB-2(1500x); (d) MHSB-2 (1500x)...	66
Figura 15.	Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas por <i>spray-drying</i> : (a) MESB-1(1500x); (b) MES-1(1500x); (c) MESB-2(1500x); (d) MESB-2 (1500x).	67
Figura 16.	Difratograma de raios X das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: (a) BUD; (b) ERS; (c) MEEB-1; (d) MEE-1.....	74
Figura 17.	Difratograma de raios X das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: (a) BUD; (b) HPMCF; (c) MHEB-1; (d) MHE-1.....	74

Figura 18.	Difratograma de raios X das micropartículas obtidas por <i>spray-drying</i> : (a) MESB-1; (b) MES-1; (c) MESB-2; (d) MES-2.	76
Figura 19.	Difratograma de raios X das micropartículas obtidas por <i>spray-drying</i> : (a) MHSB-1; (b) MHS-1; (c) MHSB-2; (d) MHS-2.	76
Figura 20.	Curva TG das substâncias puras budesonida (BUD) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente MHEB-1 e MHE-1.....	78
Figura 21.	Curva TG das substâncias puras budesonida (BUD) e Eudragit® RS100 (ERS), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente MEEB-1 e MEE-1.....	78
Figura 22.	Curvas DSC das substâncias puras budesonida (BUD) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf) e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: MHE-1 e MHEB-1.....	80
Figura 23.	Curvas DSC das substâncias puras budesonida (BUD), e Eudragit® RS100 (ERS), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: MEE-1 e MEEB-1....	80
Figura 24.	Curvas DSC das micropartículas obtidas por <i>spray-drying</i> : MHS-1, MHSB-1, MHS-2 e MHSB-2.....	82
Figura 25.	Curvas DSC das micropartículas obtidas por <i>spray-drying</i> : MES-1, MESB-1, MES-2, MESB-2.....	82
Figura 26.	Infravermelho com transformada de Fourier para a budesonida.....	83
Figura 27.	Infravermelho com transformada de Fourier das substâncias puras budesonida (BUD) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: MHEB-1 e MHE-1.....	84
Figura 28.	Infravermelho com transformada de Fourier das substâncias puras budesonida (BUD) e Eudragit RS100 (ERS), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: MEEB-1 e MEE-1.....	85
Figura 29.	Infravermelho com transformada de Fourier das substâncias puras budesonida (BUD) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf), e das misturas físicas 25:1, 50:1 e 1:1 de HPMCf:BUD.....	86
Figura 30.	Infravermelho com transformada de Fourier das substâncias puras budesonida (BUD) e Eudragit RS100 (ERS), e das misturas físicas 25:1, 50:1 e 1:1 de ERS:BUD.....	87

Figura 31. Infravermelho com transformada de Fourier para as micropartículas por <i>spray-drying</i> com HPMCF: MHS-1, MHSB-1, MHS-2, MHSB-2.....	88
Figura 32. Infravermelho com transformada de Fourier para as micropartículas por <i>spray-drying</i> com ERS: MES-1, MESB-1, MES-2, MESB-2.....	89
Figura 33. Perfil de liberação <i>in vitro</i> da budesonida (BUD) dispersa em água purificada e nas micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente e por <i>spray drying</i> (n = 3).....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Condições do sistema cromatográfico para quantificação de budesonida - Equipamento Agilent®.....	42
Tabela 2.	Condições do sistema cromatográfico para quantificação de budesonida - Equipamento Waters®.....	42
Tabela 3.	Composição das formulações para o preparo das micropartículas com e sem budesonida pelo método de emulsificação e evaporação de solvente.....	45
Tabela 4.	Composição das formulações para o preparo das micropartículas com e sem budesonida pelo método de <i>spray-drying</i>	46
Tabela 5.	Parâmetros de linearidade para curva de análise da budesonida - Equipamento Agilent®.....	53
Tabela 6.	Regressão linear da curva de análise da budesonida - Equipamento Agilent®.....	53
Tabela 7.	Análise da falta de ajuste da curva de análise da budesonida - Equipamento Agilent®.....	54
Tabela 8.	Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de budesonida analisadas - Equipamento Agilent®.....	55
Tabela 9.	Precisão do método de quantificação de budesonida - Equipamento Agilent®.....	55
Tabela 10.	Recuperação para método de quantificação de budesonida - Equipamento Agilent®.....	56
Tabela 11.	Parâmetros de linearidade para curva de análise da budesonida - Equipamento Waters®.....	57
Tabela 12.	Regressão linear da curva de análise da budesonida - Equipamento Waters®.....	58
Tabela 13.	Análise da falta de ajuste da curva de análise da budesonida - Equipamento Waters®.....	58
Tabela 14.	Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de budesonida analisadas - Equipamento Waters®.....	59
Tabela 15.	Precisão do método de quantificação de budesonida - Equipamento Waters®.....	60
Tabela 16.	Recuperação para método de quantificação de budesonida - Equipamento Waters®.....	60
Tabela 17.	Solubilidade da budesonida nos diferentes meios.....	61
Tabela 18.	Diamêtro médio e índice de polidispersão das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente.....	68

Tabela 19.	Diamêtro médio e índice de polidispersão das micropartículas obtidas por <i>spray-drying</i>	70
Tabela 20.	Rendimento do processo por <i>spray-drying</i>	71
Tabela 21.	Teor de budesonida nas micropartículas.....	72
Tabela 22.	Eficiência de encapsulação de budesonida nas micropartículas.....	73
Tabela 23.	Equações e coeficientes de correlação linear (R) para avaliação da cinética de liberação da budesonida a partir das micropartículas MEEB-1 e MHEB-1 (n = 3)	92
Tabela 24.	Equações e coeficientes de correlação linear (R) para avaliação da cinética de liberação da budesonida a partir das micropartículas MESB-1 e MHSB-1 (n = 3).....	93
Tabela 25.	Análise dos dados obtidos com o ensaio de liberação <i>in vitro</i> a partir das micropartículas.....	93

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1.	Incidência e prevalência anual estimada da DC e RCUI no mundo (em relação a cada 100 mil habitantes).....	14
Quadro 2.	Formulações comerciais com budesonida para tratamento das DII.....	21
Quadro 3.	Polímeros utilizados em sistemas microestruturados com budesonida encontrados na literatura.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
n	índice de fluxo
p	significância do teste estatístico
r^2	coeficiente de correlação linear
s	desvio padrão
S	inclinação da curva de análise
ANOVA	Análise de variância
BUD	Budesonida
CLAE	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DII	Doenças inflamatória intestinal
DC	Doença de Crohn
EE%	Eficiência de encapsulação
ERS	Eudragit [®] RS100
HPMCf	Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose
ICH	<i>International Conference on the Harmonization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPs	Micropartículas
PVA	Álcool Polivinílico Hidrolisado
RCUI	Retocolite Ulcerativa Idiopática
TFA	Ácido Trifluoroacético
TGI	Trato gastrintestinal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBIOGRÁFICA	13
2.1. Doenças inflamatórias intestinais.....	13
2.2. Budesonida.....	19
2.3. Sistemas de liberação modificada de fármacos.....	23
2.3.1. Microencapsulação.....	25
2.3.1.1. Métodos de microencapsulação.....	26
2.3.1.2. Polímeros empregados na obtenção de micropartículas poliméricas.....	29
2.3.1.2.1 Sistemas de liberação com polímeros mucoadesivos.....	31
3. OBJETIVO	38
3.1. Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Material.....	39
4.1.1. Reagentes, solventes, soluções e matérias-primas.....	39
4.1.2. Equipamentos.....	39
4.2. MÉTODOS	40
4.2.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação da budesonida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	40
4.2.1.1. Linearidade.....	40
4.2.1.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	43
4.2.1.3. Precisão.....	43
4.2.1.4. Exatidão.....	43
4.2.2. Estudo de solubilidade.....	44
4.2.3. Preparação do sistema mucoadesivo contendo budesonida para administração oral.....	44
4.2.3.1. Método por emulsificação e evaporação de solvente.....	44
4.2.3.2. Método por <i>spray-drying</i>	45

4.2.4. Caracterização físico-química das estruturas obtidas.....	47
4.2.4.1. Análise morfológica.....	47
4.2.4.2. Análise granulométrica e índice de polidispersão.....	47
4.2.4.3. Determinação do teor e eficiência de encapsulação de budesonida.....	47
4.2.4.4. Difratomia de raios X.....	48
4.2.4.5. Análise Termogravimétrica e Calorimetria diferencial exploratória	48
4.2.4.6. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier.....	49
4.2.4.7. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da budesonida a partir das micropartículas.....	50
4.2.5. Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. Validação de metodologia analítica para determinação da budesonida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52
5.1.1 Equipamento Agilent®.....	54
5.1.2 Equipamento Waters®	56
5.2. Estudo de solubilidade.....	60
5.3. Caracterização físico-química das micropartículas obtidas.....	62
5.3.1. Análise morfológica.....	62
5.3.2. Análise granulométrica e índice de polidispersão.....	68
5.3.3. Rendimento do processo por <i>spray-drying</i>	70
5.3.4. Determinação do teor e eficiência de encapsulação de budesonida.....	72
5.3.5. Difratomia de raios X.....	73
5.3.6. Análise termogravimétrica.....	77
5.3.7. Calorimetria diferencial exploratória.....	79
5.3.8. Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier.....	83

5.3.9. Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da budesonida a partir das microparticulas obtidas por emulsificação/evaporação de solvente e por <i>spray-drying</i>	90
6. CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. INTRODUÇÃO

A doença inflamatória intestinal (DII) refere-se ao grupo de doenças que afetam principalmente o intestino delgado e o intestino grosso, sendo caracterizada por ser uma inflamação crônica de etiopatogenia multifatorial (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000; ZALTMA, 2007; DÉO, 2009), sendo que as formas mais comuns são a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000; SOUZA et al., 2002; DÉO, 2009). A DC e a RCUI são problemas de saúde pública em diversos países (BIONDO-SIMÕES et al., 2003), observa-se que a prevalência da DII aumentou exponencialmente nos países industrializados na segunda metade do século XX (ZALTMA, 2007).

O tratamento das DII é orientado para o controle da inflamação, redução dos sintomas e substituição de qualquer perda de líquidos e/ou nutrientes através de uma dieta adequada, além do tratamento medicamentoso (FREIRE et al., 2006). Atualmente não se encontra disponível um tratamento que promova a cura para a DII, sendo o objetivo da terapêutica promover um duradouro estado de remissão e prevenção de recidivas (KLOTZ, 2000; ZALTMA, 2007). Para indução e manutenção da remissão vários fármacos são utilizados (sistemicamente ou topicamente), geralmente combinados, os quais pertencem a diferentes classes terapêuticas como aminossalicilatos, corticosteróides, imunossuppressores, além da terapia biológica com bloqueadores do fator de necrose tumoral (anti-TNF) (KLOTZ, 2000; FREIRE et al., 2006; DÉO, 2009).

Entre os corticosteróides destaca-se a budesonida, utilizada como uma das primeiras opções na terapêutica na fase moderada a grave até a remissão dos sintomas das DII (CORTESE et al., 2012). A budesonida é um glicocorticóide de ação local que apresenta alta afinidade à receptores esteróides, baixa disponibilidade sistêmica, além de apresentar uma porcentagem menor de efeitos colaterais quando comparada aos demais corticoesteróides sistêmicos utilizados no tratamento das DII (DAHLBERG et al., 1984; RODRÍGUEZ et al., 1998). A budesonida é encontrada

comercialmente na forma comprimidos revestidos de liberação modificada para administração oral, e na forma de enemas e espumas para administração retal (KOTZE; TEIXEIRA, 2013).

Sistemas de liberação modificada, como as micropartículas poliméricas são muito utilizadas por apresentar propriedades de liberação modificada, alcançar sítios específicos na ação de fármacos (FREITAS; MARCHETTI, 2005), mascarar sabores ou odores, proteger o ativo contra umidade e oxidação, reduzir a volatilidade, possibilitar a administração de fármacos incompatíveis e aumentar a solubilidade em veículos aquosos (SILVA et al., 2003; BRUSCHI et al., 2003). Existem vários métodos para o preparo das micropartículas, como coacervação, emulsificação e evaporação de solvente e *spray-drying* (FREITAS, MERKLE, GANDER, 2005; MOHAMED et al., 2011). O método de emulsificação e evaporação de solvente é uma das técnicas mais utilizadas em escala laboratorial na preparação das micropartículas e permite a incorporação de fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis. Uma vantagem desta metodologia é a sua simplicidade de execução, requerendo apenas a seleção adequada dos solventes, emulsificantes e condições de agitação (SEVERINO et al., 2011). O método de *spray-drying* permite a encapsulação de fármacos com diversas propriedades físico-químicas dentro de polímeros de diferentes origens (sintética, semi-sintética ou natural), sob condições muito suaves e com alta eficiência de encapsulação. Está entre as técnicas mais comumente utilizadas em escala industrial, em virtude de: ser um processo contínuo, apresentar um custo relativamente baixo e produzir partículas secas de qualidade (SANSONE et al., 2011).

Na expectativa de se obter micropartículas mucoadesivas para administração oral contendo budesonida foram utilizados os polímeros ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf) e Eudragit® RS 100 para a obtenção das mesmas utilizando os métodos de emulsificação e evaporação de solvente e *spray-drying*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças inflamatórias intestinais

Doenças inflamatórias intestinais (DII) são complicações inflamatórias do trato gastrointestinal, geralmente crônicas recidivantes, localizadas especialmente no intestino grosso (RAHIMI et al., 2007; ZIGRA et al., 2007), o espectro destas é amplo, e abrange diversos tipos e graus de inflamação intestinal (HANAUER ET AL., 2002). Registros desde a última metade do século XX destacam um aumento progressivo e significativo do número de doentes afetados por estas doenças pertencentes ao grupo das DII (ZALTMA, 2007; MOLODECKI et al., 2012; QUILICI; MISZPUTEN, 2013). Os Estados Unidos gastam aproximadamente 6,1 bilhões de dólares anualmente em custos diretos com cuidados em saúde relacionados a DII, sendo que os principais responsáveis por esses custos são as internações, cirurgias e medicamentos (HAZLEWOOD et al., 2015).

A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) são as duas DII idiopáticas principais, mais comuns e mais bem-conhecidas (HANAUER ET AL., 2002 ; COLLNOT et al., 2012; TALAEI et al., 2013), além disso compartilham a maioria das características epidemiológicas (LOFTUS, 2004; HANAUER ET AL., 2002).

As DII são relativamente mais comuns em países industrializados, com as maiores taxas de incidência e prevalência na América do Norte e Europa (Quadro 1), demonstrando taxas crescentes em países em desenvolvimento conforme sua industrialização (HANAUER ET AL., 2002 ; MOLODECKI et al., 2012), e menos frequentes em países cujas condições sanitárias são precárias (HANAUER ET AL., 2002). Estas observações são referentes aos casos nos períodos de 1930 a 2008 na Europa, 1950 a 2008 na Ásia e Oriente Médio, e de 1920 a 2004 na América do Norte (MOLODECKI et al., 2012).

Quadro 1. Incidência e prevalência anual estimada da DC e RCUI no mundo (em relação a cada 100 mil habitantes).

Doença de Crohn			
Regiões	Incidência	Prevalência	Referências
Europa	0,3 a 12,7	0,6 a 322,0	MOLODECKI et al., 2012
Ásia e Oriente Médio	0,04 a 5,0	0,88 a 67,9	
América do Norte	0,1 a 20,2	16,7 a 318,5	
Retocolite Ulcerativa Idiopática			
Europa	0,6 a 24,3	4,9 a 505,0	MOLODECKI et al., 2012
Ásia e Oriente Médio	0,1 a 6,3	4,9 a 168,3	
América do Norte	0,0 a 19,20	37,5 a 248,6	

No Brasil, devido às doenças parasitárias, microbianas e virais do sistema digestório serem muito frequentes, os padrões socioculturais baixos e os dados de estatística sanitária precários, a avaliação epidemiológica das DII é incongruente (VICTORIA; SASSAKI; NUNES, 2009). Porém, em países em desenvolvimento, como o Brasil, em que ocorre um aumento do progresso industrial e mudanças no estilo de vida, a literatura tem registrado um aumento significativo da incidência das DII nas últimas décadas (LOFTUS et al., 2000; BAUMGART, CARDING, 2007; ZALTMAN, 2007; BAUMGART; SANDBORN, 2012; MOLODECKI et al., 2012; BANDZAR; GUPTA; PLATT, 2013; CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014).

Estima-se que nos Estados Unidos cerca de 1,4 milhões de pessoas e na Europa 2,2 milhões sofram de DII (HANAUER ET AL., 2002 ; LAUTENSCHLÄGER et al., 2014), sendo que ambas podem atingir indivíduos de qualquer idade, embora a manifestação inicial ocorra geralmente entre a 2ª ou 3ª décadas de vida. Picos de incidência secundários, menores, ocorrem na 6ª e 7ª décadas de vida (HANAUER ET AL., 2002). Nota-se que 20% a 30% dos pacientes com RCUI e DC tem o aparecimento dos seus sintomas com idade inferior a 18, porém o diagnóstico é muitas vezes tardio (CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014).

A etiologia da DII permanece desconhecida, embora hajam muitos estudos demonstrando que apresentam múltiplas causas possivelmente desencadeadas por vários fatores ambientais, em indivíduos geneticamente predispostos e promovidos por uma resposta alterada do sistema imune (KLOTZ; SCHWAB, 2004; RAHIMI et al., 2007; HANAUER ET AL., 2002 ; COLLNOT et al., 2012; LAUTENSCHLÄGER et al., 2014; MONTELEONE; CARUSO; PALLONE, 2014). Estes distúrbios provavelmente constituem uma série de síndromes apresentando aspectos sobrepostos (XAVIER, PODOLSKY, 2007). Embora existam associações epidemiológicas com as dietas ocidentais, ainda não foi identificado nenhum fator dietético. A extrapolação a partir de modelos animais sugere que a microbiota comensal é capaz de desencadear um processo inflamatório em indivíduos geneticamente suscetíveis (STROBER; FUSS; MANNON, 2007), no entanto nenhum agente infeccioso específico foi identificado como causador de DC ou RCUI (HANAUER ET AL., 2002).

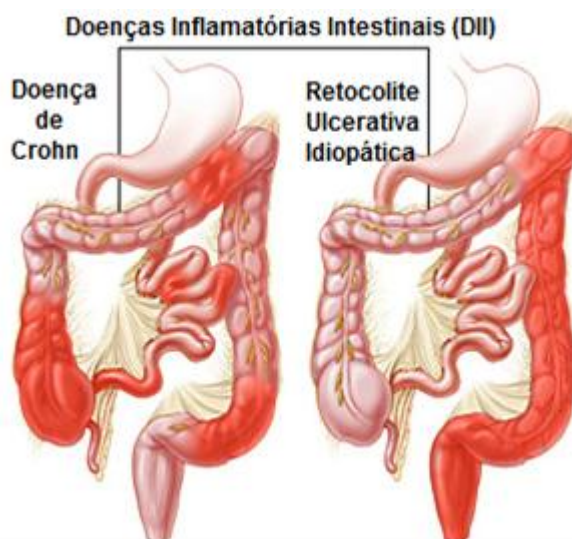
Além disso, torna-se mais evidente que, durante o decurso da doença, os danos aos tecidos são mediados por uma interação ativa entre células imunes e não imunes, e que as células T e as células apresentadoras de antígeno, monócitos/macrófagos e células dendríticas, desempenham um papel fundamental no processo patogênico (MONTELEONE; CARUSO; PALLONE, 2014).

As pesquisas nessa área vêm demonstrando que o sistema imune, alterações genéticas na função de barreira intestinal, autofagia, apoptose, podem ser os principais responsáveis por todos os fenômenos tanto agressivos como protetores da atividade da inflamação, incluindo desde os primeiros sintomas clínicos da doença até seu estágio crônico, bem como o desenvolvimento de complicações ou permitindo períodos de sua remissão (KHOR; GARDET; XAVIER, 2011; QUILICI; MISZPUTEN, 2013; LAUTENSCHLÄGER et al., 2014). Estudos apontam a associação genômica entre DC e RCUI, foram identificados 163 loci para DII, sendo que 110 deles estão associados tanto a DC quanto a RCUI (JOSTINS et al., 2012), estas regiões contêm genes candidatos para uma variedade de funções, como

autofagia, reconhecimento de microrganismo, sinalização de linfócitos, resposta ao estresse do retículo endoplasmático, a sinalização de citocinas, entre outras (JOSTINS, 2012; CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014).

A DC manifesta-se como uma inflamação descontínua (áreas sem alterações entremeadas às áreas comprometidas) e transmural, ou seja pode atingir toda a parede intestinal, às vezes acompanhada de formação de granuloma (Figura 1).

Figura 1. Áreas afetadas (em vermelho) pela Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa Idiopática.



Fonte: <https://gi.jhsps.org/>

A natureza transmural da inflamação na DC leva ao desenvolvimento de estenoses (estreitamentos) e fístulas (HANAUER ET AL., 2002). O processo inflamatório na DC quando comparado a RCUI, é mais irregular, e pode envolver qualquer segmento do trato gastrointestinal , desde a boca até o ânus (HANAUER ET AL., 2002 ; BAUMGART; SANDBORN, 2012; BANDZAR, GUPTA, PLATT, 2013), contudo afeta predominantemente a parte inferior do intestino delgado (íleo) e intestino grosso (cólon), podendo alcançar o mesentério adjacente e linfonodos (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; FRIEND, 2005; LEVESQUE; KANE, 2011; BAUMGART; SANDBORN, 2012; BANDZAR, GUPTA, PLATT, 2013). A apresentação clínica da doença varia de acordo com

a extensão, a intensidade e as complicações presentes, habitualmente causa diarreia com passagem de sangue ou muco, ou ambos, obstrução intestinal, febre, dor abdominal e emagrecimento, podendo causar estenose, fístula, má absorção e necessidade de ressecções cirúrgicas (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; BAUMGART; SANDBORN, 2012).

Como a DC pode envolver qualquer segmento do trato gastrintestinal, sua manifestação é mais heterôgenea do que a da RCUI e é determinada pela sua localização, extensão e severidade da inflamação, bem como pelo padrão inflamatório (SANDS, 2004; HANAUER ET AL., 2002). A DC produz um espectro de padrões inflamatórios, que começa pela inflamação superficial (similar àquela observada na RCUI) e passa pela formação de estreitamentos fibroestenoses, penetração da parede intestinal e, por fim, formação de fístula acompanhada de uma massa inflamatória mesentérica ou abscesso perientérico. Ao contrário da RCUI, a DC geralmente não é curável por cirurgia. A ressecção e anastomose intestinais são frequentemente seguidas de recorrência da doença (HANAUER ET AL., 2002).

Com a evolução da doença, podem surgir complicações locais, nutricionais e sistêmicas. Quando esta se agrava, as crises tornam-se mais frequentes, gerando comprometimento do estado geral e piora da qualidade de vida do indivíduo (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; HAZLEWOOD et al., 2015). Ao menos 25% de todos os novos casos na população são de indivíduos menores de 20 anos de idade, e cerca de 30 mil novos pacientes são diagnosticados anualmente (BANDZAR, GUPTA, PLATT, 2013). Embora esteja representada em todos os grupos étnicos e raciais, a sua incidência é maior em brancos, principalmente entre 20 e 30 anos, e pessoas de ascendência judaica, particularmente judeus Ashkenazi, nome dado aos judeus provenientes da Europa Central e Oriental. Existe uma incidência igual de DC em homens e mulheres, e nenhuma investigação tem mostrado conclusivamente que esta é herdada geneticamente (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; BAUMGART, CARDING, 2007; BAUMGART; SANDBORN, 2012; BANDZAR, GUPTA, PLATT, 2013).

A retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) apresenta-se como uma doença inflamatória contínua da mucosa do intestino grosso, se inicia no reto, podendo atingir todo o cólon (Figura 1) (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; FRIEND, 2005; HANAUER ET AL., 2002 ; PRANTERA; RIZZI, 2009; ORDÁS et al., 2012; CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014; LOFTUS, 2014).

Os sintomas incluem diarreia, aumento da urgência e frequência de fezes, enterorragia (hemorragia intestinal com eliminação de sangue vivo), tenesmo (sensação de constante necessidade de defecar, apesar do reto estar vazio), eliminação de muco e frequente dor abdominal (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; CONRAD, ROGGENBUCK, LAASS, 2014; LOFTUS, 2014). A doença é caracterizada por períodos de recidiva sintomática e remissões, nos quais os sintomas, em geral, permanecem por semanas ou meses. Existem manifestações extra intestinais em aproximadamente 25% dos doentes, incluindo o eritema nodoso, a epiesclerite e a artrite não-deformante oligoarticular, entre outras (BIONDO-SIMÕES et al., 2003). Pode evoluir para megacólon tóxico, displasia ou câncer colorretal (CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014; LOFTUS, 2014). Seu diagnóstico é normalmente feito por endoscopia e biópsia do cólon e/ou reto (LOFTUS, 2014).

A extensão da RCUI geralmente se mantém constante desde o início da doença, e possui uma classificação pelo grau de envolvimento do cólon (HANAUER ET AL., 2002 ; ORDÁS et al., 2012), por volta de 40 a 50% dos pacientes, apresentam RCUI restrita ao reto ou ao retossigmóide, chamada de proctite (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; PRANTERA; RIZZI, 2009), em 30 a 40% dos doentes vai além do sigmóide, estende-se até a flexura esplênica, é chamada de proctossigmoidite ou colite do lado esquerdo, e numa minoria, não mais do que 20%, estende-se para dentro do cólon transversal, sendo chamada de pancolite (BIONDO-SIMÕES et al., 2003; HANAUER ET AL., 2002 ; ORDÁS et al., 2012; CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014; LOFTUS, 2014). A extensão do envolvimento não necessariamente implica em severidade, mas está associada ao prognóstico (p. ex., risco de câncer) e a seleção do tratamento (HANAUER ET AL., 2002).

A RCUI apresenta padrão bimodal de incidência, embora diversas faixas etárias possam ser afetadas, o pico principal é observado entre 15 e 30 anos, com um segundo, embora menor pico entre 50 e 70 anos (LOFTUS; SANDBORN, 2002; CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014). Estudos epidemiológicos indicam que esta patologia apresenta uma ligeira predileção por homens (MOLODECKI et al., 2012; ORDÁS et al., 2012).

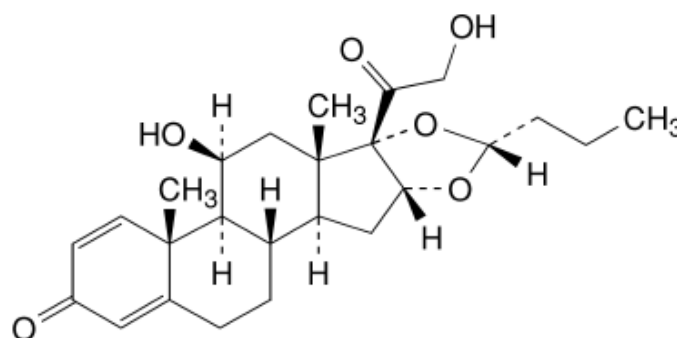
2.2 Budesonida

A budesonida (BUD) (Figura 2) é um corticosteróide potente, estruturalmente relacionado com a 16- α -hidroxiprednisolona (MARÍN-JIMÉNEZ; PEÑA, 2006; VARSHOSAZ et al., 2011), que tem sido muito utilizado no tratamento farmacológico da DII, especialmente no tratamento da retocolite ulcerativa e da doença de Crohn. A BUD é cerca de duas vezes mais ativa que o dipropionato de beclometasona, e mais de 1000 vezes mais ativa do que a hidrocortisona ou prednisolona, em induzir a vasoconstrição intracutânea (como um marcador da atividade anti-inflamatória) (YEHIA et al., 2009). Ao contrário de outros esteróides, tais como hidrocortisona, prednisolona e dexametasona (KLOTZ; SCHWAB, 2005; MARÍN-JIMÉNEZ; PEÑA, 2006).

A fórmula molecular da BUD é $C_{25}H_{34}O_6$; com uma massa molecular de 430,54 g.mol⁻¹ e seu número de CAS é 51333-22-3. É uma mistura epimérica das formas α - e β -propil de 16 α ,17 α -butilidenodioxo-11 β ,21-dihidroxipregna-1,4-dieno-3,20-diona (Figura 2) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009). Apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco, não apresenta polimorfismo e possui temperatura de fusão em torno de 250 °C, é praticamente insolúvel em água, muito solúvel em diclorometano, moderadamente solúvel em etanol (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009; VARSHOSAZ et al., 2011; BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014). Pertence a classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, é pouco solúvel em meio aquoso e possui alta permeabilidade gastrointestinal, com um log*P* de 3,2 (BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014). Originalmente foi desenvolvida para o tratamento de asma, rinite não infecciosa e para o tratamento e prevenção de

polipose nasal, mas demonstrou ser muito eficiente no tratamento de pacientes com DII. (VARSHOSAZ et al., 2011).

Figura 2. Estrutura química da budesonida.



Fonte: Farmacopéia Européia, 2009.

A BUD pertence a segunda geração de glicocorticóides, apresenta uma elevada afinidade por receptores corticosteróides (15 vezes maior que a prednisolona e 195 vezes maior do que a hidrocortisona) com um elevado grau de atividade anti-inflamatória tópica (EDSBACKER et al., 2004; MARÍN-JIMÉNEZ; PEÑA, 2006; KRISHNAMACHARI; MADAN; LIN., 2007; GROSS et al., 2010; VARSHOSAZ et al., 2011), é metabolizada pelo citocromo P450 no fígado, permitindo que apenas 10 a 15% alcance a circulação sistêmica (EDSBACKER et al., 2004; BELOQUI et al., 2013). O resultado é de uma eficácia semelhante aos corticosteróides sistêmicos, com cerca de 30% dos efeitos colaterais habitualmente observados (RUTGEERTS et al., 1994; KRISHNAMACHARI; MADAN; LIN., 2007; CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA., 2008; GROSS et al., 2010). Devido ao menor número de efeitos adversos a BUD mostra-se eficaz também no aumento da adesão do paciente em relação ao tratamento (MARÍN-JIMÉNEZ; PEÑA, 2006).

Estas características conferem a BUD um melhor perfil que os esteróides convencionais (prednisona, hidrocortisona e prednisolona) utilizados no tratamento local de DII, assim se mostrou eficiente para prolongar o período de remissão de crises em pacientes (MARÍN-JIMÉNEZ; PEÑA, 2006;

GANGURDE et al., 2013; VARSHOSAZ et al., 2011; BELOQUI et al., 2013). Muitos estudos têm sido publicados sobre os resultados benéficos do uso da budesonida via oral no tratamento da DC, mas ainda existem poucos resultados sobre sua eficácia com relação a RCUI, pois as formulações encontradas no mercado geralmente não atingem a porção final do cólon (MARÍN-JIMÉNEZ; PEÑA, 2006; LAUTENSCHLÄGER et al., 2014).

A BUD está comercialmente disponível no mercado em formulações para administração oral e retal, principalmente para o tratamento da DII (Quadro 2) (KLOTZ; SCHWAB, 2005; YEHIA et al., 2009; BELOQUI et al., 2013; LAUTENSCHLÄGER et al., 2014). Em particular, as formulações orais disponíveis comercialmente que buscam ultrapassar a porção superior do trato gastrointestinal (TGI), e liberar o fármaco no cólon (EDSBACKER et al., 2004; VARSHOSAZ et al., 2011). No entanto, o controle ineficiente da liberação do fármaco ou a incapacidade de alcançar as áreas inflamadas são algumas das desvantagens observadas que causam uma eficácia reduzida no tratamento das DII (EDSBACKER; ANDERSSON, 2004; YEHIA et al., 2009; BELOQUI et al., 2013; GANGURDE et al., 2013). Verificou-se que nestas formulações menos de 5% do fármaco foi disponibilizado além do íleo e ceco (EDSBACKER et al., 2004; YEHIA et al., 2009; VARSHOSAZ et al., 2011; GANGURDE et al., 2013).

Quadro 2. Formulações comerciais com budesonida para tratamento das DII.

Nome comercial	Forma farmacêutica	Via
Budenofalk [®]	Cápsulas com grânulos gastroresistentes	Oral
Budenofalk [®]	Espuma	Retal
Entocort [®]	Cápsulas com grânulos gastroresistentes	Oral
Entocort [®]	Enema	Retal
Entocort [®]	Espuma	Retal

Considerando a localização dessas doenças no cólon, bem como os efeitos colaterais sistêmicos do fármaco absorvido, a liberação sítio-específica

de anti-inflamatórios, como a budesonida, nas áreas do cólon inflamadas levaria a altas concentrações locais e aumento da eficácia terapêutica. Para superar problemas de absorção sistêmica e liberação em local indesejado, muitos estudos de desenvolvimento de sistemas microestruturados vêm sendo estudados (Quadro 3) (COLLNOT et al., 2012).

Quadro 3. Polímeros utilizados em sistemas microestruturados com budesonida encontrados na literatura.

Polímeros	Referências
Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e Eudragit® S	KRISHNAMACHARI; MADAN; LIN., 2007
Ácido poliláctico (PLA)	MARTIN et al., 2002
Quitosana, alginato de cálcio e e Eudragit® S	CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA., 2008
Eudragit®RS 100 e Eudragit®RL 100	CORTESI et al., 2012
Dextrana	VARSHOSAZ et al., 2011
Eudragit®S 100, Eudragit®L 100, Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), Acetato butirato de celulose, Goma guar e Pectina	YEHIA et al., 2009
Poloxamer 188	BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014

Os sistemas microestruturados incluem carreadores poliméricos ou baseados em lipídeos tais como carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) (BELOQUI et al., 2013), dispersão sólida (BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014), micropartículas poliméricas pelo método de emulsificação e evaporação de solvente (KRISHNAMACHARI; MADAN; LIN., 2007; CORTESI et al., 2012;) e pelo método *spray-drying* (CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA., 2008; VARSHOSAZ et al., 2011; CORTESI et al., 2012) . Edsbäcker e colaboradores (2002) realizaram uma comparação entre a BUD em formulação convencional e em sistema de liberação modificada, e demonstram que a segunda

formulação liberou uma maior fração do fármaco no íleo e no cólon. Portanto, é importante desenvolver sistemas que liberem a budesonida diretamente na mucosa intestinal, a fim de maximizar a concentração local no cólon inflamado (VARSHOSAZ et al., 2011).

Micropartículas mucoadesivas têm a capacidade de acumular nas regiões inflamadas do intestino, elas oferecem uma nova abordagem no tratamento das DII. Durante DII ativa, o conteúdo luminal sofre uma diminuição em seu tempo de trânsito devido a diarreia, o sintoma mais frequente de DII (COLLNOT et al., 2012; BELOQUI et al., 2013). Em experimentos de colite experimental com animais e humanos observou-se uma deposição preferencial de partículas micrométricas na mucosa colônica inflamada (BELOQUI et al., 2013). É evidente que as alterações fisiopatológicas associadas com a inflamação da mucosa, tais como (i) a mudança da barreira intestinal, devido às alterações de superfície da mucosa, criptas e úlceras, (ii) aumento da produção de muco, e (iii) a infiltração de células imune-relacionadas como macrófagos, linfócitos ou células dendríticas, proporciona um ambiente favorável para o acúmulo de micropartículas nas regiões inflamadas do cólon (LAMPRECHT et al., 2001; BELOQUI et al., 2013). Portanto, favorece o fornecimento de budesonida especificamente ao cólon, a fim de maximizar a concentração local na mucosa do cólon inflamado. (VARSHOSAZ et al., 2011; BELOQUI et al., 2013).

2.3. Sistemas de liberação modificada de fármacos

Um aspecto importante no desenvolvimento de medicamentos e obtenção de uma intervenção farmacoterapêutica bem sucedida é a capacidade do fármaco de alcançar uma concentração terapêutica e não tóxica no sítio de ação, e de mantê-la constante durante todo o período de tratamento (COLLETT; MORETON, 2005).

Nesse sentido, nas últimas décadas, uma maior atenção tem sido voltada para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e/ou prolongada de agentes biologicamente ativos, os quais são caracterizados pela

liberação gradual do fármaco, mantendo a concentração do mesmo em níveis terapêuticos por um período de tempo desejado (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007). Permitindo um aumento da eficácia terapêutica, redução ou desaparecimento de efeitos colaterais, e garantindo o suprimento adequado de fármaco por um longo período de tempo, redução dos esquemas posológicos e aumentando a adesão dos pacientes (MATSUMOTO et al., 1997; COLLETT; MORETON, 2005; CHENG et al., 2009; VENKATESAN; MANAVALAN; VALLIAPPAN, 2009; NG et al., 2010; PEREIRA, 2011).

Assim, para permitir uma modulação da velocidade de saída dos fármacos, esses sistemas fazem uso de uma “barreira” física ou química, as quais podem ser obtidas por diversas técnicas, tais como pelo uso de revestimentos, incorporação do fármaco em uma matriz polimérica, microencapsulação, ligação química a resinas de troca iônica, incorporação em uma bomba osmótica, dentre outras (COLLETT; MORETON, 2005; RAVIKUMARA et al., 2009). No entanto, a seleção do método mais adequado depende de fatores como custo, perfil de liberação desejado, propriedades do fármaco, entre outros (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; CHENG et al., 2009).

Dessa forma, nas pesquisas realizadas na área farmacêutica os sistemas de liberação particulados, sobretudo as micropartículas, têm despertado grande interesse, visto que, podem ser administrados por diferentes vias, incluindo parenteral, oral, pulmonar e tópica para exercerem ação local ou sistêmica (BRUSCHI et al., 2003; FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; KILPELÄINEN et al., 2009; JYOTHI et al., 2010). Esses sistemas permitem, ainda, alterar as propriedades organolépticas, a obtenção de formas sólidas de óleos, o controle de odor e sabor, a proteção de fármacos frente à umidade, luz, calor e oxidação, a alteração da velocidade de dissolução, a diminuição da volatilidade, a prevenção de incompatibilidades, a manipulação de materiais tóxicos, a melhora das características de fluxo e a possibilidade de uma liberação controlada e a vetorização de fármacos, entre outras (LUZZI; PALMIERI, 1985; DONBROW, 1992; BRUSCHI et al., 2003; JYOTHI et al., 2010; DE FRANCISCO; CERQUETANI; BRUSCHI, 2012).

2.3.1 Microencapsulação

Microencapsulação é o termo que descreve uma categoria de tecnologias utilizadas para encapsular sólidos, líquidos ou gases dentro de um revestimento ou de uma matriz, formando partículas com diâmetro de 1 a 1000 µm (JYOTHI et al., 2010). A primeira pesquisa que levou ao desenvolvimento da microencapsulação na área farmacêutica foi publicada por Bungen Burg de Jong e Kan, em 1931, na qual esferas de gelatina foram obtidas pelo processo de coacervação (VENKATESAN; MANAVALAN; VALLIAPPAN, 2009).

Atualmente, a microencapsulação assume um papel importante no desenvolvimento de novas formulações, pois possibilita de maneira racional e efetiva aumentar a eficiência terapêutica de substâncias já correntemente utilizadas para o tratamento de uma grande variedade de doenças (BRUSCHI et al., 2003). Vários métodos de microencapsulação são propostos para produzir sistemas microparticulados. Porém, para a escolha adequada do método a ser utilizado deve-se levar em consideração as propriedades do composto que se pretende encapsular, mais especificamente a solubilidade do fármaco, e também as propriedades do polímero (PÉREZ et al., 2000; LI; ROUAUD; PONCELET, 2008).

As partículas produzidas pelo processo de microencapsulação são denominadas genericamente de micropartículas que se dividem em dois tipos: microesferas e microcápsulas em relação à morfologia e à estrutura interna (BRUSCHI, 2002; JYOTHI et al., 2010). As esferas são sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso na matriz polimérica onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Já as cápsulas constituem sistemas reservatórios em que é possível identificar um núcleo diferenciado que contém a substância ativa sólida, líquida ou gasosa, envolvido por uma membrana polimérica, isolando o núcleo do meio externo (ANDREO FILHO, OLIVEIRA, 1999; SILVA et al., 2003).

As partículas constituem formas de depósito nas quais a liberação do fármaco depende de alguns fatores, como a natureza do polímero,

propriedades físico-químicas do fármaco e/ou fatores da formulação (BRUSCHI, 2002; HASSAN et al., 2009; CHENG et al., 2009). Assim, a liberação do fármaco do sistema passa a ser um passo limitante do processo de absorção e pode ser controlada a partir da escolha adequada dos materiais (principalmente do polímero), métodos e processos de obtenção das micropartículas (BRUSCHI, 2002; HASSAN et al., 2009).

2.3.1.1 Métodos de microencapsulação

O número de metodologias destinadas à preparação de micropartículas que permitem a incorporação de fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis é muito amplo (SEVERINO et al., 2011). Entre as técnicas utilizadas muitas são baseadas em fenômenos físicos, algumas utilizam reações químicas e outras combinam fenômenos físicos e químicos (BRUSCHI, 2002; JYOTHI et al., 2010). As principais técnicas empregadas para a veiculação dos princípios ativos incluem emulsificação e extração e/ou evaporação do solvente, coacervação e métodos físicos (SILVA et al., 2003; JYOTHI et al., 2010; SEVERINO et al., 2011). Para a escolha do método deve-se considerar a simplicidade, reprodutibilidade e a possibilidade do aumento de escala (SEVERINO et al., 2011).

Os métodos físicos são amplamente utilizados durante o processo de microencapsulação, e os mais encontrados na literatura são: *spray-drying*, *spray-congealing* e leiteo fluidizado. E entre os métodos químicos podem-se destacar a polimerização interfacial e a polimerização *in situ*. Nos métodos físico-químicos estão a coacervação, a emulsificação e evaporação de solvente e a pulverização em presença de agente formador de reticulação (SUAVE et al., 2006; CHENG et al., 2009; JYOTHI et al., 2010).

Diversas outras técnicas também têm permitido a obtenção de partículas, entre elas podem ser destacadas o *eletrospray*, no qual gotículas carregadas são pulverizadas em um campo com diferença de potencial elétrico, obtendo-se assim sistemas microestruturados (STEWART, 1999; RYANA; SMITHB; STARKA, 2012), e o fluido supercrítico, que consiste da atomização de uma solução polimérica num solvente orgânico adequado, onde o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido. O solvente orgânico é solúvel no fluido

supercrítico, sendo extraído durante o processo a pressão e temperatura constante, e o polímero insolúvel nessa fase, em consequência precipita com o fármaco incorporando, formando as micropartículas (SEVERINO et al., 2011).

Dentre esses, a microencapsulação por emulsificação e evaporação do solvente é uma das técnicas mais utilizadas em escala laboratorial para a preparação de micropartículas poliméricas. Consiste na preparação de duas fases, primeiro uma orgânica, constituída por um solvente orgânico apolar no qual são dispersos o polímero e o fármaco, e uma segunda fase aquosa, que contém um tensoativo ou um agente estabilizador para emulsões poliméricas, como, por exemplo, o álcool polivinílico (PVA) (SILVA et al., 2003; JYOTHI et al., 2010; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Submete-se à emulsificação, por agitação de ambas as fases, seguindo-se a exposição da emulsão recém-preparada a uma fonte de energia elevada, como, por exemplo, ao ultra-turrax, a ultrasson ou ao homogeneizador à alta pressão. A agitação da emulsão é a etapa determinante para a obtenção das micropartículas e deve ser realizada antes da precipitação do polímero, de modo a serem obtidas gotículas de fase interna de dimensões coloidais. Por fim, promove-se a remoção do solvente orgânico, ocorrendo a precipitação do polímero na fase externa aquosa e consequente formação das micropartículas (SILVA et al., 2003; JYOTHI et al., 2010; ESSA; RABANEL; HILDGEN, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Para obtenção de micropartículas são utilizados tensoativos na fase externa aquosa, de modo a obter dispersões estáveis. O tensoativo mais adequado é aquele que promove uma redução maior da energia livre interfacial, diminuindo a tendência à coalescência e à aglomeração das gotículas emulsificadas. Os tensoativos ou agentes estabilizadores utilizados na fase externa aquosa são, em geral, o álcool polivinílico (PVA) e a albumina. O primeiro é um dos poucos que evita a agregação das micropartículas durante a lavagem e a liofilização, embora não possa ser utilizado quando o produto se destina a administração intravenosa (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Um pré-requisito importante para a produção das micropartículas pelo método de emulsificação e evaporação de solvente, é que o fármaco e a matriz

sejam suficientemente solúveis no solvente orgânico (LLOYD; CRAIG; SMITH, 1999; RODIER et al., 2005; ALMEIDA, 2009). Porém, dependendo das propriedades de solubilidade do fármaco, o mesmo pode ser dissolvido, disperso ou emulsificado como uma solução aquosa na solução do polímero (HERRMANN; BODMEIER, 1998). Em relação aos fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, o método de emulsificação simples óleo-em-água (O/A) é o mais frequentemente utilizado em escala laboratorial (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005; SEVERINO et al., 2011).

Embora a técnica de microencapsulação por emulsificação e evaporação do solvente seja muito utilizada, este método de preparação possui desvantagens a considerar na produção em larga escala, como a escolha do solvente orgânico e a sua remoção do produto acabado (SILVA et al., 2003; FREITAS, MERKLE, GANDER, 2005; ALHNAN; KIDIA; BASIT, 2011).

O método de secagem por *spray-drying*, também denominado de nebulização ou atomização é um dos métodos mais utilizados nas indústrias farmacêutica e alimentícia (transformação de alimentos líquidos em pós). Neste método o fármaco é disperso ou dissolvido numa solução orgânica ou aquosa do polímero e o sistema é nebulizado numa corrente de ar quente. Após a evaporação do solvente, as micropartículas secas são recuperadas. É uma técnica simples, rápida, que apresenta vantagens tais como, permitir a obtenção da forma final sem ter que recorrer a lavagens para isolar as micropartículas ou eliminar resíduos de solventes, permitir uma elevada eficiência de encapsulação, apresentar baixo custo do processo, possibilitar o emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes e evitar o uso de solventes orgânicos, produzir partículas de alta qualidade, ser um processo de etapa única, ter reprodutibilidade, permitir o controle do tamanho das partículas, permitir uma produção contínua e com ótima estabilidade do produto final, a transposição para a escala industrial ser mais fácil em relação a outros métodos (JOHANSEN; MERKLE; GANDER, 2000; RAFFIN et al., 2006; SILVA et al., 2003; OLIVEIRA; FATIBELLO-FILHO, 2009; ALHNAN; KIDIA; BASIT, 2011; MOHAMED et al., 2011). Tem como inconveniente o custo do equipamento elevado; o uso de calor, capaz de afetar as propriedades de

polímeros e fármacos termossensíveis; a limitação na escolha do encapsulante, já que é preferível que apresente baixa viscosidade em concentrações elevadas; e a dificuldade em obter partículas esféricas (PALMIERI et al., 2002; SILVA et al., 2003; RAFFIN et al., 2006; OLIVEIRA; FATIBELLO-FILHO, 2009).

Os fatores de formulação que influenciam as características das micropartículas são a concentração em polímero, a temperatura e a velocidade de alimentação do sistema. A eficiência de encapsulação varia normalmente entre 70 e 85%, independentemente dos parâmetros do processo (SILVA et al., 2003). Tanto os fármacos hidrossolúveis como lipossolúveis podem ser encapsulados, contudo, enquanto que a liberação dos primeiros apresenta frequentemente um *burst effect* inicial elevado, para os segundos a liberação tem uma cinética próxima de ordem zero. É vasta a gama de polímeros utilizados poliésteres biodegradáveis, polianidridos, derivados da celulose, polímeros acrílicos, álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), albumina, ceras, siloxanos e quitosanas (SILVA et al., 2003; RAFFIN et al., 2006). Os polímeros entéricos podem ser usados para preparação de micropartículas por serem solúveis em pH superior a 6 ou 7, e serem dissolvidos em soluções alcalinas (PALMIERI et al., 2002). As vantagens desse método fazem com que seja uma alternativa atraente para o preparo de micropartículas (MOHAMED et al., 2011).

2.3.1.2 Polímeros empregados na obtenção de micropartículas poliméricas

Os polímeros são frequentemente utilizados na obtenção de micropartículas para uso cosmético e farmacêutico de liberação convencional ou modificada (CAHN, 2001; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010; HASIRCI et al., 2011). Os polímeros sintéticos podem ser obtidos por condensação ou adição polimérica, e apresentam diferentes pesos moleculares, formas estruturais e organizações monoméricas. Como existe uma diversidade nas aplicações desses materiais é preciso uma grande variedade de polímeros, os quais podem ser classificados de diversas formas: quanto a sua origem,

processo de polimerização, forma estrutural das cadeias, composição dessas cadeias (homopolímeros e heteropolímeros), estrutura, peso molecular, comportamento térmico, disposição dos monômeros, assim como pelas ligações entre as unidades de repetições (HASIRCI et al., 2011). Além disso, de acordo com a solubilidade em água, tais polímeros podem ser divididos em polímeros hidrofílicos e polímeros hidrofóbicos ou inertes (COLLETT; MORETON, 2005).

Os polímeros hidrofílicos mais utilizados são os derivados da celulose, como a metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose sódica; polímeros não celulósicos como alginato de sódio, quitosana, goma xantana e os copolímeros do ácido acrílico (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). A liberação do fármaco a partir dessas matrizes pode ocorrer pela absorção de água ou intumescimento da matriz com posterior difusão do fármaco pela camada de gel e/ou pela erosão dessa camada (HARDY et al., 2007; ESCUDERO; FERRERO; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, 2008).

Além destes, destacam-se também os poliésteres alifáticos e, dentre eles, os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) e os polihidroxicanoatos, conhecidos como PHA. São polímeros termoplásticos e constituem a classe mais antiga e a mais estudada dos polímeros biodegradáveis. Eles podem ser preparados a partir de uma variedade de monômeros pela abertura do anel e por rotas de polimerização dependendo da unidade monomérica. Os derivados dos ácidos láctico e glicólico foram empregados como material de fios de sutura na década de 1960 e, desde então, outros poliésteres alifáticos foram desenvolvidos como polímeros biodegradáveis e têm despertado bastante atenção devido a biocompatibilidade e aos perfis de degradação controláveis que apresentam (DURÁN et al., 2006).

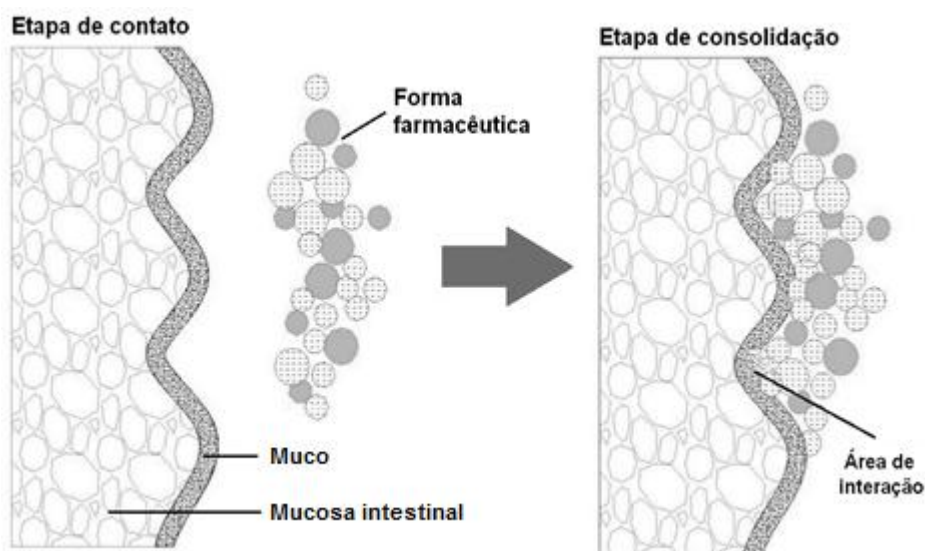
Em relação aos polímeros insolúveis ou inertes, os compostos mais empregados são a etilcelulose, acetato de etilcelulose, cloreto de polivinila, polietileno e algumas ceras, como a cera de carnaúba, cera de abelha, palmitato de cetila (DASHORA; SARAF; SARAF, 2006;

TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; MUSCHERT et al., 2009; MILANOVIC et al., 2010; ZANG et al., 2012).

2.3.1.2.1 Sistemas de liberação com polímeros mucoadesivos

A bioadesão pode ser definida como o estado em que dois materiais, dentre os quais pelo menos um é de natureza biológica, sejam mantidos juntos por um período prolongado (SMART, 2005; CARVALHO et al., 2010; PEREIRA et al., 2012). Na década de 1980 esse conceito começou a ser aplicado em sistemas de liberação de fármacos. Sistemas de liberação bioadesivos consistem na incorporação de moléculas adesivas em formas farmacêuticas em que se deseja prolongar o contato com a membrana biológica (Figura 3) (CARVALHO et al., 2010; PEREIRA; BRUSCHI, 2012).

Figura 3. As etapas do processo de mucoadesão.



Fonte: Pereira, 2011

Todos os tipos de polímeros podem apresentar propriedades bio/mucoadesivas, as quais são utilizadas com o propósito de modificar a liberação de fármacos, assim como a eficiência terapêutica dos mesmos. Para isso é importante que eles apresentem uma rápida adesão à camada de muco, ser biodegradável, porém sem produzir compostos tóxicos, e apresentarem um

custo reduzido (SERRA; DOMÉNECH; PEPPAS, 2009; ROY, 2009; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010; BIN CHOY, 2011).

Polímeros com propriedades bioadesivas como policarbofil, Carbopol[®], hidroxipropilcelulose, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, polivinilpirrolidona, pectina e goma de guar são alguns exemplos de polímeros que são comumente utilizados em sistemas de liberação (BALOGLU et al., 2002).

Muitos estudos têm explorado sistemas bio/mucoadesivos no trato gastrointestinal como forma de aumentar o tempo de residência em uma determinada área, proporcionando aumento da absorção sistêmica ou ação local (CARVALHO et al., 2010; CHAUD et al., 2013). Sistemas bioadesivos aplicados em mucosas frequentemente são definidos como mucoadesivos, mas os termos podem ser intercambiáveis. Há autores que definem sistemas mucoadesivos como aqueles que se ligam as moléculas da camada de muco, mas, na realidade, é difícil discernir se a interação ocorre na superfície celular ou entre as moléculas do material e da camada de muco. Também, para muitos materiais bioadesivos a interação acontece com as duas estruturas (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

As mucosas do organismo humano são recobertas por muco, uma camada de proteção composta por moléculas glicoproteicas, lipídeos, sais inorgânicos e mais de 95 % em massa de água, o que confere alta hidratação à sua superfície. A mucina é a principal glicoproteína que compõe o muco. A função do muco é proteger e lubrificar o epitélio, e tem funções adicionais, dependendo do tipo de epitélio que recobre. Em cada caso, as características e funções do muco são diferentes (SMART, 2005; CARVALHO et al., 2010). A mucosa mais utilizada para administração e absorção de fármacos é a gastrointestinal (JUNGINGER; THANOU; VERHOEF, 2006), mas outras vias também são estudadas, como a ocular, bucal, vaginal, retal, oral, periodontal (BRUSCHI et al., 2005; PEREIRA et al., 2013).

Neste contexto, a mucoadesão torna-se uma ótima estratégia para promover a retenção do sistema e a liberação do fármaco, melhorando assim a sua ação (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; COLLNOT; ALI; LEHR,

2012). Várias teorias são apresentadas para explicar os mecanismos envolvidos no processo de mucoadesão. Estas teorias envolvem a interposição mecânica do sistema, atração eletrostática, difusão e interpenetração das cadeias poliméricas, força de adesão da ligação mucoadesiva, processos de adsorção e molhabilidade. Estas teorias devem ser consideradas como processos complementares envolvidos em diferentes estágios da interação do muco com o substrato ou mesmo como processos que ocorrem simultaneamente (SMART, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010, PEREIRA, BRUSCHI, 2012).

Um sistema mucoadesivo pode ser projetado nas mais variadas formas farmacêuticas, uma vez que a propriedade da adesão depende das características do material utilizado para sua preparação (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). Os mecanismos de mucoadesão podem ser divididos em duas categorias: sistemas que aderem por ligações não específicas e não covalentes, mas de natureza eletrostática ou ligações de hidrogênio; sistemas que intumescem ou aumentam a viscosidade quando entram em contato com algum estímulo fisiológico e sua mucoadesão é resultado da formação de uma matriz mais reticulada (PARK; ROBINSON, 1984; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010), entretanto os mecanismos podem também ocorrer simultaneamente.

O muco que recobre a mucosa gastrintestinal é bastante complexo e pode conter componentes que exercem funções específicas dependendo da região. Além disto, a espessura e a renovação do muco, assim como a variabilidade individual, tornam o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos para o TGI um desafio. Para que o bolus alimentar seja transportado através do TGI sem danificar o epitélio, o muco apresenta duas camadas distintas, uma camada mais fortemente aderida à mucosa e uma camada mais próxima ao lúmen, que é facilmente removida por digestão enzimática, erosão ou por sucção (ENSIGN; CONE; HANES, 2012; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). Apesar da alta espessura de muco, o cólon apresenta taxa de renovação do muco mais baixa que o estômago e o intestino delgado.

Combinado com a baixa motilidade, o cólon apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de sistemas com propriedades mucoadesivas, os quais podem contribuir para aumentar o tempo de residência dos fármacos (ENSIGN; CONE; HANES, 2012).

Portanto, as vantagens em se usar sistemas terapêuticos mucoadesivos são muitas, pois estes podem manter terapeuticamente concentrações efetivas do fármaco diretamente no local de ação (CARVALHO et al., 2010; PEREIRA et al., 2013) sem o uso de uma concentração superior a necessária para se ter o efeito terapêutico no local desejado, diminuindo assim problemas de alta toxicidade e efeitos adversos, promovendo com isso uma maior adesão do paciente ao tratamento (BRUSCHI et al., 2003; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; PEREIRA; BRUSCHI, 2012). Para tanto, deve ser ressaltada a importância da formulação e da tecnologia bem equilibrada, para obter-se um sistema adesivo que cumpra seu papel, aderindo de maneira eficaz na mucosa e liberando o fármaco de modo prolongado (BRUSCHI, 2006; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010; PEREIRA; BRUSCHI, 2012; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

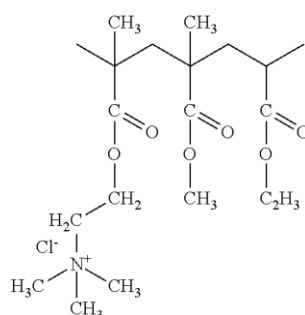
A estrutura química do polímero determina algumas propriedades importantes na mucoadesão. A presença de grupos hidroxila, carboxila ou amina podem contribuir para o estabelecimento de ligações de hidrogênio ou pontes dissulfeto no caso de presença de grupos sulfidrilo. Polímeros com grupos ionizáveis podem atuar por interação eletrostática com o muco carregado negativamente, que é dependente do valor do pH do meio. Há polímeros que intumescem ou aumentam a viscosidade quando entram em contato com algum estímulo fisiológico, sendo sua mucoadesão resultado da formação de uma matriz mais reticulada (FREIRE et al., 2006; CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014).

Os polímeros mais descritos na literatura para sistemas de liberação oral são os derivados do ácido acrílico, derivados da celulose e polivinilpirrolidona. Na liberação controlada para sistemas poliméricos gastro-resistentes tem-se usado frequentemente os ésteres de poli(ácido metacrílico) (PAA) e o polimetilmetacrilato (PMMA); estes polímeros permanecem íntegros no

estômago, porém, desintegram-se em valores de pH maior que 5, liberando o fármaco, além de melhorar a biodisponibilidade (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Os principais monômeros utilizados para a síntese destes ésteres são metacrilato de metila (MMA), metacrilato de etila (EMA), metacrilato de butila (BMA), acrilato de etila (EA), dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA) e cloridrato de trimetilaminoetil metacrilato (TAMCI) (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Dentre os polímeros utilizados neste trabalho foi escolhido um derivado do ácido metacrílico, o Eudragit[®] RS100 (ERS), um copolímero de poli(etilacrilato, metil-metacrilato e clorotrimetil-amônio etil metacrilato), que contém uma quantidade baixa de de grupos amônio quaternários, cerca de 4,5-6,8% (CORTESI, et al., 2012). A estrutura química do ERS 100 está apresentada na Figura 4.

Figura 4. Estrutura química do Eudragit[®] RS100.



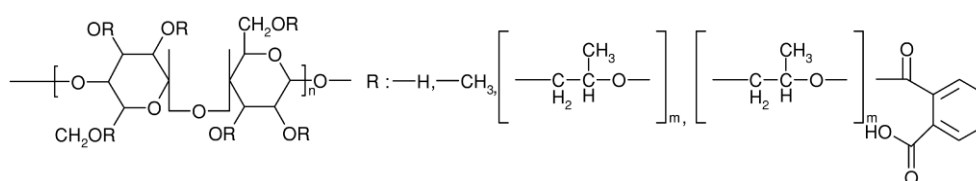
Fonte: Evonik, 2012.

O Eudragit[®] RS 100 é um polímero comumente utilizado para revestimento entérico de comprimidos e no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Apresenta como característica ser insolúvel em água e ter capacidade de intumescimento em pH fisiológicos, demonstrando ser um polímero em potencial para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada (PIGNATELLO et al., 2002; CORTESI et al., 2012). Este polímero se apresenta na forma de grânulos transparentes, com fraco odor de amina. É solúvel em acetona, diclorometano, álcool metílico, etílico e isopropílico. É insolúvel em água e éter de petróleo (EVONIK, 2012). Este polímero pode se

fixar à mucosa por intumescimento polimérico (GAREKANI, MOGHADDAM, SADEGHI, 2013).

O segundo polímero utilizado neste trabalho foi o ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf), é um derivado de celulose, constituído por grupos hidroxila, alguns deles substituídos por éster metílico, éster 2-hidroxipropílico ou éster ftálico, preparado através da esterificação de hidroxipropilmetil celulose (HPMC) com anidrido ftálico (Figura 5). O grau de substituinte alcóxi ou carboxibenzoíla determina as propriedades do polímero e, em particular, o pH no qual ele se dissolve em meio aquoso (ROWE et al., 2006).

Figura 5. Estrutura química da HPMCF.



Fonte: Kim et al., 2003.

O polímero HPMCF se apresenta na forma de grânulos ou flocos livres brancos, geralmente sem odor ou levemente ácido, é solúvel em misturas de acetona e álcool metílico ou etílico (1:1), diclorometano e álcool metílico (1:1) e soluções com pH maiores que 5; ele é insolúvel em água e álcool hidratado (ROWE et al., 2006). O ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, também conhecido como ftalato de hipromelose, é muito utilizado em sistemas entéricos como material de revestimento de comprimidos e grânulos. Podendo ser utilizado sozinho ou em combinação com outros polímeros em formulações farmacêuticas de liberação modificada pH-dependente (KIM et al., 2003; ROWE et al., 2006).

Além destas propriedades, o HPMCF é um polímero que possui propriedades mucoadesivas, o que desperta o interesse de aplicação em sistemas de liberação mucoadesivo. Os grupamentos hidroxila presentes na estrutura interagem com o muco por ligações secundárias não covalentes,

formando ligações de hidrogênio com a estrutura do muco, proporcionando a mucoadesão. Por ser um polímero derivado de celulose, o HPMCf também pode se fixar à mucosa por intumescimento polimérico (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; CARVALHO et al., 2010).

3. OBJETIVO

Desenvolver e caracterizar micropartículas mucoadesivas poliméricas com Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose ou Eudragit[®] RS100 contendo budesonida para a administração oral, para tratamento de doenças inflamatórias intestinais, por emulsificação e evaporação do solvente e *spray-drying*.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver micropartículas poliméricas contendo budesonida com Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose ou Eudragit[®] RS100 por emulsificação e evaporação do solvente.
- Desenvolver micropartículas poliméricas contendo budesonida com Ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose ou Eudragit[®] RS100 por *spray-drying*.
- Caracterizar físico-quimicamente as estruturas obtidas.
- Determinar o teor de budesonida e eficiência de encapsulação das estruturas obtidas.
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* da budesonida a partir das estruturas obtidas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes, solventes, soluções e matérias-primas

- Ácido trifluoroacético (J.T.Baker, Deventer - Holanda)
- Acetonitrila grau CLAE 99,9% (J.T.Baker, Deventer - Holanda)
- Álcool polivinílico hidrolisado (Fluka[®], São Paulo-Brasil).
- Budesonida grau farmacêutico (Fagron[®], São Paulo-Brasil)
- Diclorometano grau analítico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- Eudragit[®] RS 100 (Rohm GmbH[®], Darmstadt-Alemanha)
- Fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- Fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (Shin-Etsu, Tóquio-Japão)
- Metanol grau CLAE 99,9% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)

4.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético (Velp Scientifica, Itália)
- Agitador Orbital KS250 Basic (IKA[®] Labortechnik, Alemanha)
- Analisador Térmico NETZSCH modelo 409 (NETZSCH STA-Gerätebau GmbH)
- Aparelho medidor de pH (Crison Instruments, Espanha)
- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Agilent Technologies[®], Santa Clara, Estados Unidos), com duas bombas de injeção (modelo 1200 Series G1310A Iso Pump), detector espectrofotométrico com UV-Vis (G1314B) e sistema de injeção com *loop* de 50 µL
- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters[®], 600E, Milford, MA, EUA) com detector de arranjos de fotodiodos (Waters[®] 2998 PDA, Milford, MA, EUA) e sistema de injeção com *loop* de 20 µL
- Balança analítica (Acculab – Sartorius Group, Alemanha)
- Balança semi-analítica (Radwag, Polônia)

- Células de difusão de Franz modificadas
- Coluna para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência C18 (Luna-Phenomenex[®] 5µm) com dimensões de 250 x 4,6 mm
- Difrátômetro de raios X Bruker D-8 Advance
- Espectrofotômetro de correlação de fótons NanoPlus Series[®]
- Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier Perkin- Elmer[®] 1600
- Filme de PVC (Parafilm[®])
- Membrana de Acetato de Celulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- Membrana filtrante de Náilon Whatman[®] (0,20 µm)
- Micro-seringa de vidro de 100 µL (Hamilton[®])
- Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM-7500F, Tokyo, Japão)
- Mini Spray Dryer Büchi B-191
- Pipetas automáticas (Discovery comfort – HTL Lab Solutions, Polônia)
- Ultra-purificador de água (Milli Q Plus - Millipore[®])
- Ultra Turrax[®] T25 sonda S25N-10G (IKA[®] Labortechnik, Alemanha)
- Unidade filtrante Whatman[®] Spartan, com membrana de celulose regenerada para filtração de solventes orgânico e aquosos (0,20 µm)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação da budesonida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Dois métodos para quantificação de budesonida foram desenvolvidos e validados. O primeiro foi para quantificação do fármaco nas micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente produzidas durante o período de desenvolvimento parcial da parte experimental na Università degli studi di Ferrara - Itália, o segundo para as micropartículas obtidas por *spray-drying* produzidas no Brasil.

4.2.1.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da obtenção da curva de análise de budesonida em um cromatógrafo Agilent[®] e um cromatógrafo

Waters[®]. Preparou-se uma solução-mãe (SM) em uma mistura (60:40) acetonitrila e água acidificada com ácido trifluoroacético (TFA) (pH 3,2) na concentração de 2,5 mg/mL. Em seguida, foram obtidas as diluições (Figura ???). Após a obtenção das soluções, procedeu-se a leitura em CLAE ($\lambda = 242$ nm – Agilent[®]; 245 nm - Waters[®]). Os ensaios representam a média de seis determinações e foram utilizados para o cálculo da regressão linear e obtenção da equação da reta (curva de análise), coeficiente de correlação, inclinação da reta, intercepto do eixo y, análise de resíduos e análise da falta de ajuste (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

Figura 6. Concentrações de budesonida analisadas utilizadas para obtenção das curvas de análise.

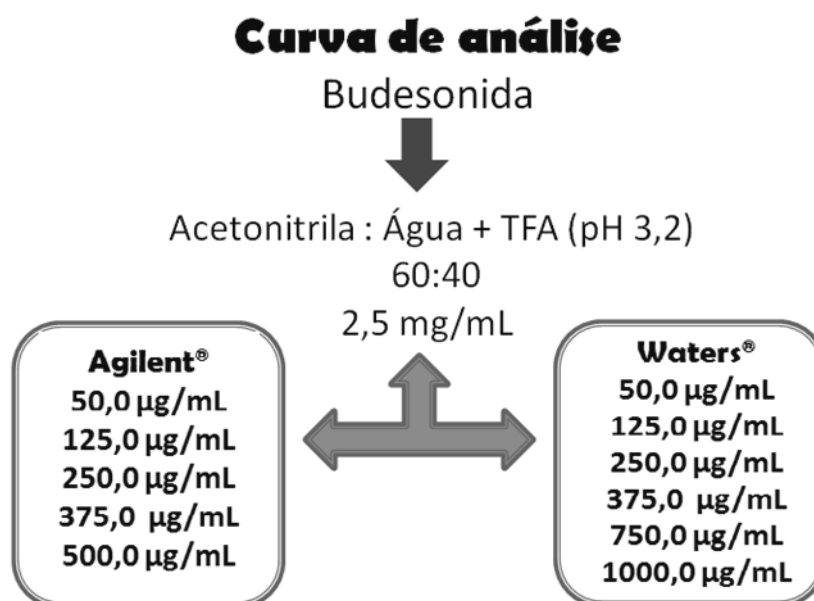


Tabela 1. Condições do sistema cromatográfico para quantificação de budesonida – Equipamento Agilent®.

Sistema CLAE	Agilent®, equipado com detector de UV
Coluna	Coluna de fase reversa Luna® C18, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm (Phenomenex®, EUA).
Fase Móvel* (A:B; 60:40)	A: Acetonitrila B: Água com (TFA) pH 3,2
Sistema de eluição	Isocrático
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	50 µL
Comprimento de onda	242 nm
Tempo de corrida	6,1 minutos
Equilíbrio	A coluna foi equilibrada com a fase móvel, durante 40 min em fluxo de 0,8 mL/min

Tabela 2. Condições do sistema cromatográfico para quantificação de budesonida – Equipamento Waters®.

Sistema CLAE	Waters®, equipado com detector de arranjos de fotodiodos
Coluna	Coluna de fase reversa Luna® C18, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm (Phenomenex®, EUA).
Fase Móvel* (A:B; 60:40)	A: Acetonitrila B: Água com (TFA) pH 3,2
Sistema de eluição	Isocrático
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	245 nm
Tempo de corrida	6,2 minutos
Equilíbrio	A coluna foi equilibrada com a fase móvel, durante 40 min em fluxo de 0,8 mL/min

4.2.1.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para o método CLAE em ambos cromatógrafos foram calculados baseando-se no desvio padrão (s) e na inclinação (S) da curva de análise, de acordo com as seguintes fórmulas (ICH, 2005; BRASIL, 2003):

$$LD = \frac{3,3 \cdot s}{S} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{S} \quad (2)$$

Onde:

s = Desvio padrão da interseção da curva analítica

S = Coeficiente angular da curva analítica

4.2.1.3 Precisão

A precisão, para o método CLAE em ambos cromatógrafos, foi determinada de acordo com as normas descritas pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - Topic Q2-R1* (ICH, 2005) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução específica RE 899/2003-ANVISA) (ICH, 2005; BRASIL, 2003). Na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária, o desvio padrão(s) e o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de seis determinações foram considerados.

4.2.1.4 Exatidão

A exatidão, para o método CLAE em ambos cromatógrafos, foi determinada pela recuperação, adicionando quantidades pré-determinadas de budesonida à amostra. O experimento de recuperação foi realizado em triplicata. O resultado foi determinado pela razão do valor encontrado na análise da amostra simulada pela quantidade real adicionada do padrão, multiplicado por 100 (ICH, 2005). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de software Statistica 8.0®.

4.2.2 Estudo de solubilidade

A solubilidade da budesonida foi determinada em diferentes meios - água, meio pH gástrico e pH intestinal (pH 2,0 e 6,8, respectivamente). Quantidades do fármaco foram saturadas nos diferentes meios, em triplicata, e mantidas sob agitação mecânica por 24 horas à 37 °C, em velocidade constante. Após este período, a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 15 min e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,45 µm. Em seguida, as soluções foram diluídas e analisadas em cromatógrafo líquido. A solubilidade foi determinada após validação da metodologia analítica, pela leitura das absorvâncias na região do UV, no comprimento de onda de máxima absorção da budesonida, $\lambda = 245$ nm (BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014).

4.2.3 Preparação do sistema mucoadesivo contendo budesonida para administração oral

4.2.3.1 Método por emulsificação e evaporação de solvente

Desenvolveram-se quatro formulações contendo budesonida (MHEB-1, MHEB-2, MEEB-1 e MEEB-2), as quais foram submetidas as mesmas condições, diferenciando-se entre si na proporção polímero/fármaco, conseqüente da alteração da concentração de polímero, e no tipo de polímero, e o restante manteve-se inalterado, conforme a Tabela 3.

Inicialmente, o polímero foi disperso em 5 mL de uma mistura de diclorometano e álcool metílico (1:1). Em seguida, a budesonida foi adicionada nesta dispersão, sob agitação, obtendo-se a fase orgânica. A mistura foi emulsionada em 100 mL de solução aquosa de álcool polivinílico (PVA) à 1,0% (p/V) em Ultra-Turrax (T25-Ika Labortechnik, Alemanha) durante 3 min à 11000 rpm. Após total gotejamento da fase orgânica na fase aquosa, a emulsão resultante foi submetida à agitação magnética até a evaporação total da fase orgânica. As estruturas obtidas foram lavadas com água purificada e filtradas à vácuo, em seguida secas em dessecador por, no mínimo, 12 h. Além das micropartículas contendo budesonida, preparou-se micropartículas sem

fármaco (MHE-1, MHE-2, MEE-1 e MEE-2). A metodologia de preparo utilizada foi a mesma descrita para as micropartículas anteriores.

Tabela 3. Composição das formulações para o preparo das micropartículas com e sem budesonida pelo método de emulsificação e evaporação de solvente.

Formulação	Proporção Polímero: Budesonida	Concentração de Budesonida (% p/p)	Concentração de HPMCF (% p/p)	Concentração de ERS (% p/p)
MHE - 1	25:0	—	250	—
MHE - 2	50:0	—	500	—
MHEB - 1	25:1	10	250	—
MHEB - 2	50:1	10	500	—
MEE - 1	25:0	—	—	250
MEE - 2	50:0	—	—	500
MEEB - 1	25:1	10	—	250
MEEB - 2	50:1	10	—	500

4.2.3.2 Método por *spray-drying*

As micropartículas contendo budesonida foram preparadas pelo método de *spray-drying*, utilizando-se HPMCF ou ERS. Desenvolveram-se quatro formulações contendo budesonida (MHSB-1, MHSB-2, MESB-1 e MESB-2), as quais foram submetidas ao mesmo mini *Spray Dryer* (Mini Spray Dryer Büchi B-191) diferenciando-se entre si nos parâmetros utilizados nos processos de secagem para cada tipo de polímero, além da proporção polímero/fármaco, e no tipo de polímero, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Composição das formulações para o preparo das micropartículas com e sem budesonida pelo método de *spray-drying*.

Formulação	Proporção Polímero: Budesonida	Concentração da Budesonida (% p/V)	Concentração do HPMCF (% p/V)	Concentração do ERS (% p/V)
MHS - 1	—	—	7,5	—
MHS - 2	—	—	10,0	—
MHSB - 1	4:1	1,875	7,5	—
MHSB - 2	4:1	2,5	10,0	—
MES - 1	—	—	—	7,5
MES - 2	—	—	—	10,0
MESB - 1	4:1	1,875	—	7,5
MESB - 2	4:1	2,5	—	10,0

Para preparação das micropartículas de HPMCF, o método foi o mesmo utilizado por Palmieri (2000) com poucas modificações, neste trabalho o autor utilizou solução de hidróxido de amônio 0,05N para dissolver o polímero, no presente trabalho foi utilizado solução de trietanolamina 1N.

O polímero foi inicialmente disperso em solução aquosa de trietanolamina 1N (pH 8,0), após ser totalmente disperso, foi adicionada budesonida sob agitação magnética. Foram testadas as condições do *spray* variando a temperatura de entrada, o fluxo e pressão até alcançar a condição mais favorável. A dispersão final foi seca nas seguintes condições: temperatura de entrada de 150 °C, temperatura de saída de 90 ± 5 °C, fluxo de 1mL/min e pressão de 2 bar.

Para preparação das micropartículas de Eudragit RS100, o método foi o mesmo utilizado por Cortesi (2012). Foi utilizada uma dispersão aquosa 30% (p/V) do polímero, esta foi diluída para as concentrações de 7,5 e 10,0% (p/V), após ser totalmente disperso, foi adicionada a budesonida nesta dispersão sob agitação magnética. Foram testadas as condições do *spray* variando a temperatura de entrada e o fluxo até obter-se a condição mais favorável. Posteriormente, a dispersão final foi seca no mesmo equipamento

anteriormente descrito, nas condições determinadas: temperatura de entrada de 130 °C, temperatura de saída de 80 ± 5 °C, fluxo de 1mL/min e pressão de 2 bar.

Além das micropartículas contendo budesonida, prepararam-se as micropartículas sem fármaco (MHS-1, MHS-2, MES-1 e MES-2). A metodologia de preparo utilizada foi semelhante ao descrito para micropartículas anteriores, diferindo-se apenas na ausência da budesonida, conforme a Tabela 4.

O rendimento do processo por *spray-drying* foi calculado a partir da quantidade de micropartículas contendo budesonida obtidas, ao final do processo, em relação ao total de sólidos utilizados no preparo.

4.2.4 Caracterização físico-química das estruturas obtidas

4.2.4.1 Análise morfológica

A análise morfológica e as características de superfície das micropartículas foram realizadas por meio das fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Jeol[®] JSM-7500F). O material foi colocado sobre uma fita dupla-face aderida a um suporte de metal e revestidas, sob atmosfera de argônio, com ouro coloidal.

4.2.4.2 Análise granulométrica e índice de polidispersão

As dimensões e o índice de polidispersão das micropartículas com o fármaco incorporado foram determinadas pelo espectrofotômetro de correlação de fótons, com um laser hélio neon de 5 mW em comprimento de onda de 633 nm. As medições foram realizadas à uma temperatura de 25 °C, em um ângulo de 90°. As micropartículas foram dispersas em 2000 µL de água purificada e homogeneizou-se a dispersão, esta foi colocada em uma cubeta de vidro. Este conjunto foi levado ao espectrofotômetro de correlação de fótons NanoPlus Series[®] e as análises foram realizadas pelo menos em triplicata.

4.2.4.3 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de budesonida

O teor de budesonida nas micropartículas por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray-drying* foi determinado pelo método cromatográfico previamente validado e descrito no item 4.2.1.1.

Em balão volumétrico de 5 mL foi adicionado 3,0 mg de micropartículas contendo budesonida, exatamente pesados e completou-se o volume com uma mistura 60:40 de acetonitrila e água acidificada com TFA (pH 3,2), a mesma da fase móvel. Em seguida a amostra foi sonicada durante 5 minutos, filtrada através de filtro seringa (13 mm) com membrana de celulose regenerada com poro de 0,20 µm (Spartan – Whatman, Alemanha), sendo em seguida submetida à análise nas condições descritas no item 4.2.1.1. A determinação foi realizada em triplicata, sendo o pico quantificado em massa (g) de budesonida em 100 g de micropartículas.

A eficiência de encapsulação foi determinada empregando-se a metodologia descrita anteriormente para a determinação do teor de budesonida. O resultado foi calculado a partir da equação 3. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

$$EE\% = \left(\frac{MassaExperimental}{MassaTeórica} \right) \times 100 \quad (3)$$

4.2.4.4 Difractometria de raios X

A difratometria foi realizada em temperatura ambiente (25°C) em um difratômetro de raios X Bruker D-8 Advance, sob radiação monocromática Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), com uma voltagem de 40 kV e corrente elétrica de 30 mA. Para este ensaio, foram analisadas as micropartículas, os polímeros livres e o fármaco. As amostras foram analisadas com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 3° e 60° e velocidade do goniômetro de 2 graus/segundo.

4.2.4.5 Análise Térmogravimétrica e Calorimetria diferencial exploratória

As técnicas de termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram obtidas na faixa de temperatura de 22 a 300 °C, fluxo de argônio de 30 mL/min e a razão de aquecimento de 10 °C/min em Analisador Térmico NETZSCH modelo 409 (NETZSCH STA-Gerätebau GmbH). Amostras com aproximadamente 5,0 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio, com

massa de 1,0 mg, com tampa não selada. Foram empregados padrões de Índio e Zinco metálicos para calibração do equipamento (ELKAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007).

4.2.4.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Uma amostra de cada micropartícula, polímero e BUD foi finamente triturada com brometo de potássio (KBr) em gral e, posteriormente, a mistura foi comprimida sob pressão de 10 kg/cm². Estas pastilhas foram analisadas na faixa de 650 a 4000 cm⁻¹ em Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier Perkin- Elmer[®] 1600. Três replicatas foram analisadas para cada amostra (NESSEEM; EID; ELHOUSENY, 2011; ANUAR et al., 2007).

4.2.4.7 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* da budesonida a partir das micropartículas

O perfil de liberação da budesonida a partir das micropartículas obtidas foi determinado em um aparelho de liberação composto por células de difusão de Franz modificadas (Figura 7). O aparelho consistiu de uma célula de vidro, de formato circular e com controle de temperatura, por meio de banho termostático. Utilizou-se um volume de 30,0 mL como meio de dissolução para garantir uma condição *sink*, para as primeiras duas horas foi utilizado uma solução de HCl pH 2,0, e para as seguintes 22 horas uma solução tampão fosfato pH 6,8, com o intuito de simular os meios gástrico e intestinal, respectivamente, e temperatura de 37 ± 0,5 °C sob agitação constante com auxílio de barra magnética, utilizando-se membrana de acetato de celulose como suporte. O tempo de ensaio foi de 24 h, com tempos de amostragem (500 µL) em 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 e 1440 min, com reposição de volume.

Após a coleta, cada uma das amostras foi injetada no cromatógrafo e analisada de acordo com o item 4.2.1.1. Foram avaliadas três replicatas de cada amostra. Os resultados foram analisados em termos do teor absoluto e

acumulado de budesonida liberada em cada intervalo de tempo, considerando o teor real de fármaco presente na formulação.

Para investigar o mecanismo de liberação de budesonida a partir das micropartículas, os dados obtidos foram analisados por meio da equação geral que descreve a liberação de fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais (KORSMEYER et al., 1983), utilizando transformações logarítmicas e análise dos mínimos quadrados (regressão linear) como descrito abaixo:

$$\frac{Mt}{M^\infty} = k \cdot t^n \quad (4)$$

$$\log \frac{Mt}{M^\infty} = \log k + n \cdot \log t \quad (5)$$

Onde: Mt/M_∞ é a fração de fármaco liberado, t é o tempo de liberação, k é a constante cinética de incorporação de características estruturais e geométricas do dispositivo de liberação e n é o expoente o qual pode indicar o mecanismo de liberação do fármaco (JONES et al., 2000; BRUSCHI, 2006).

Figura 7. Célula de difusão de Franz modificada: 1) compartimento contendo o meio de liberação; 2) abertura de coleta de amostras; 3) banho termostaticado; seta vermelha: barra magnética para manter o sistema sob agitação.



4.2.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados, no mínimo em triplicata e os dados foram comparados por meio da análise de variância de um fator (ANOVA) e nas comparações *post hoc* das médias dos grupos individuais foram realizadas utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey, utilizando-se o programa Statistica 8[®] (StatSoft, EUA). Em todos os casos, um nível de $\alpha < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

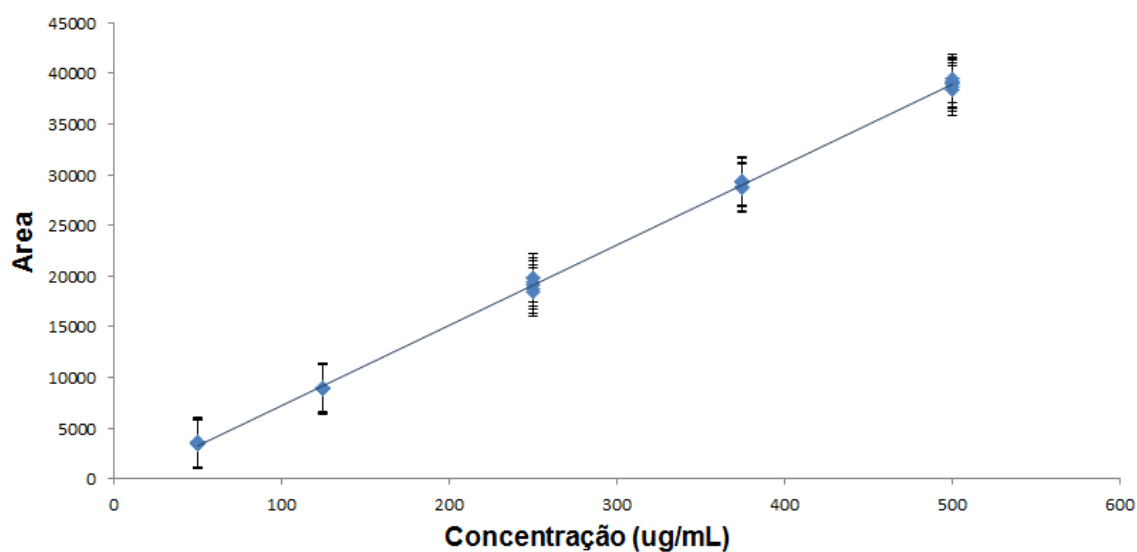
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação de metodologia analítica para determinação da budesonida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.1.1 Equipamento Agilent®

A linearidade do método de quantificação do teor de budesonida das micropartículas foi realizada a partir de diluições da solução-mãe de budesonida. A curva analítica foi determinada investigando-se a budesonida em cinco níveis de concentração (50,0 a 500,0 µg/mL). As análises foram realizadas em seis replicatas para cada concentração (Figura 8).

Figura 8. Curva de análise da budesonida obtida por CLAE em 242 nm – Equipamento Agilent® (n = 6).



A equação linear representativa foi $y = 79,304x - 682,32$. O coeficiente de correlação linear (r) foi de 0,9992, com isso pode-se afirmar a existência de correlação linear entre as absorvâncias e as concentrações da budesonida. Este valor concorda com a Resolução Brasileira RE n° 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), que estabelece uma $r \geq 0,99$ como critério de aceitação do método proposto.

Segundo o ICH (2005) e a resolução RE nº899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), após a obtenção da curva de análise deve ser determinado os parâmetros de linearidade por meio de análise estatística, como demonstrado na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros de linearidade para curva de análise da budesonida - Equipamento Agilent®.

	Budesonida
Faixa linear (µg/mL)	50,0 – 500,0
Número de concentrações	5
Coefficiente de correlação	0,9992
Intercepto ± Erro padrão	682,32 ± 130,088
Inclinação ± Erro padrão	79,304 ± 0,426
Limite de detecção (LD) (µg/mL)	5,45
Limite de quantificação (LQ) (µg/mL)	16,50

Foi realizada a regressão linear por meio do teste de Fisher, com nível de confiança de 95%. Nesta análise o valor de F, calculado pela razão da média quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos ($F_{\text{calculado}} = \text{MRQ} / \text{MQE}$) é comparado com o valor de $F_{\text{crítico}}$ tabelado. Quando $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$, aceita-se, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero ($a \neq 0$), com isso conclui-se que a regressão é significativa e a inclinação da reta da regressão não é nula. Os resultados da regressão linear para a budesonida encontram-se na tabela 6.

Tabela 6. Regressão linear da curva de análise da budesonida - Equipamento Agilent®.

	Regressão	Resíduos
Soma quadrática	5028143550,82	4068908,25
Graus de liberdade	1	28
Média quadrática	5028143550,82	145318,15
Teste F	346000,93	
F crítico	4,20	

Resultados e Discussão

Como o $F_{\text{calculado}}$ é mais que dez vezes maior que o $F_{\text{crítico}}$, pode-se concluir que a regressão é significativa.

A análise da falta de ajuste foi realizada pelo teste de Fisher, com intervalo de confiança de 95%. Ela é realizada comparando-se o valor de $F_{\text{calculado}}$ (determinado pela razão das médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro) com o valor de $F_{\text{crítico}}$.

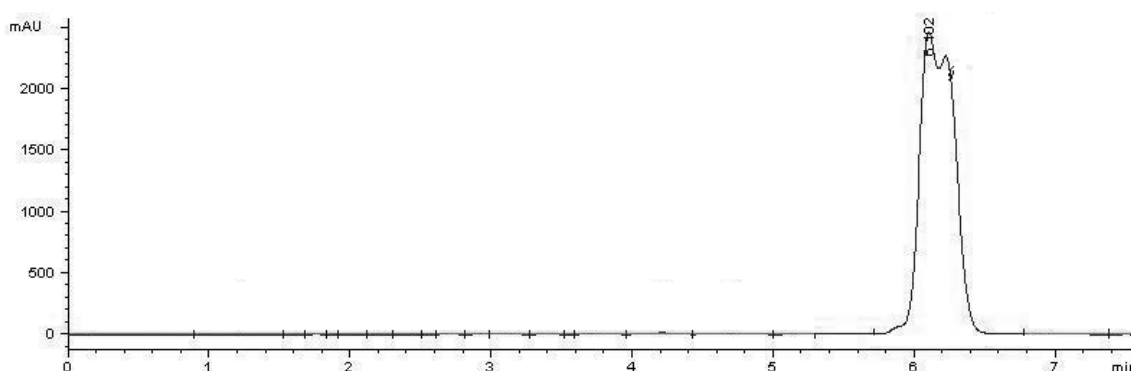
Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$, o modelo apresenta ajuste satisfatório. Os valores da análise da falta de ajuste estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Análise da falta de ajuste da curva de análise da budesonida - Equipamento Agilent®.

	Falta de ajuste	Erro puro
Soma quadrática	1020562,36	3048345,88
Graus de liberdade	3	25
Média quadrática	340187,45	121933,83
Teste F		2,79
F crítico		2,99

Como o $F_{\text{calculado}}$ é menor que o $F_{\text{crítico}}$, pode-se concluir que o modelo linear não apresenta falta de ajuste.

Figura 9. Cromatograma da budesonida em 242 nm – Equipamento Agilent®



O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação percentual para as concentrações de analisadas (Tabela 8) demonstraram reprodutibilidade.

Tabela 8. Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de budesonida analisadas - Equipamento Agilent®.

Budesonida (µg/mL)	50,0	125,0	250,0	375,0	500,0
CV (%)	2,24	0,74	2,99	1,10	1,05

Para determinação do parâmetro de precisão (Tabela 9) foram realizadas a repetibilidade e precisão intermediária. Este resultado é referente à média de três determinações e está de acordo com o limite estabelecido (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 9. Precisão do método de quantificação de budesonida - Equipamento Agilent®.

Budesonida (µg/mL)	Dias	Repetibilidade	CV %	Precisão intermediária	CV %
		Média ± s		Média ± s	
125,0	1	121,86 ± 2,17	1,78	120,81 ± 0,83	0,68
	2	121,85 ± 2,29	1,88		
250,0	1	251,85 ± 4,91	1,95	252,36 ± 3,97	1,57
	2	251,69 ± 2,23	0,89		
500,0	1	498,66 ± 4,77	0,96	497,43 ± 4,11	0,83
	2	497,79 ± 2,79	0,56		

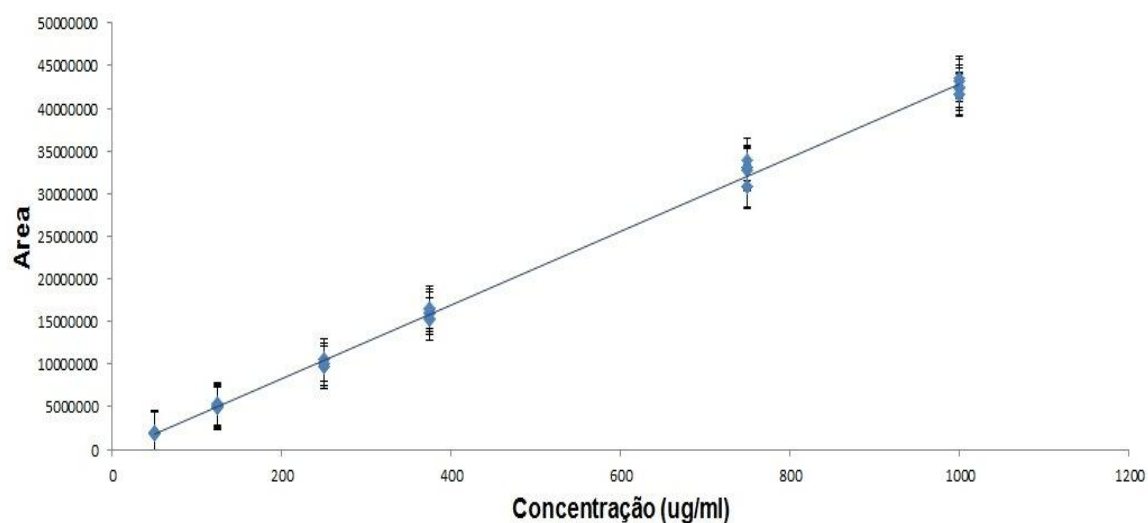
A análise de uma amostra preparada contendo uma quantidade conhecida de budesonida determinou a exatidão do método utilizando ensaios de recuperação (Tabela 10). A recuperação de budesonida foi de 99,26 ± 2,73%. Este resultado é referente a média de três determinações e está de acordo com os valores de referência de 80 - 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 10. Recuperação para método de quantificação de budesonida - Equipamento Agilent®.

Budesonida ($\mu\text{g/mL}$) Adicionada	Budesonida ($\mu\text{g/mL}$) Encontrada	Recuperação (% \pm s)	Média (% \pm s)
125,0	120,81 \pm 0,67	96,65 \pm 0,54	
250,0	253,72 \pm 8,02	101,49 \pm 3,21	99,26 \pm 2,73
500,0	498,21 \pm 5,73	99,64 \pm 1,15	

5.1.2 Equipamento Waters®

A linearidade do método de quantificação do teor de budesonida das micropartículas foi realizada a partir de diluições da solução-mãe de budesonida. A curva analítica foi determinada investigando-se a budesonida em seis níveis de concentração (50,0 a 1000,0 $\mu\text{g/mL}$). As análises foram realizadas em seis replicatas para cada concentração (Figura 10).

Figura 10. Curva de análise da budesonida obtida por CLAE em 245 nm – Equipamento Waters® (n = 6).

A equação linear representativa foi $y = 43069x - 310547$. O coeficiente de correlação linear (r) foi de 0,9990, com isso pode-se afirmar a existência de correlação linear entre as absorvâncias e as concentrações da budesonida. Este valor concorda com a Resolução Brasileira RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), que estabelece uma $r \geq 0,99$ como critério de aceitação do método proposto. Após a obtenção da curva de análise, foram determinados os parâmetros de linearidade por meio de análise estatística, como demonstrado na tabela abaixo (Tabela 11).

Tabela 11. Parâmetros de linearidade para curva de análise da budesonida - Equipamento Waters®.

	Budesonida
Faixa linear ($\mu\text{g/mL}$)	50,0 – 1000,0
Número de concentrações	6
Coeficiente de correlação	0,9990
Intercepto \pm Erro padrão	310547 \pm 183547,8
Inclinação \pm Erro padrão	43069 \pm 336,6
Limite de detecção (LD) ($\mu\text{g/mL}$)	14,06
Limite de quantificação (LQ) ($\mu\text{g/mL}$)	42,62

Foi realizada a regressão linear por meio do teste de Fisher, com nível de confiança de 95%. Nesta análise o valor de F , calculado pela razão da média quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos ($F_{\text{calculado}} = \text{MRQ} / \text{MQE}$) é comparado com o valor de $F_{\text{crítico}}$ tabelado. Quando $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$, aceita-se, com 95% de confiança, que a inclinação da reta é diferente de zero (" a " $\neq 0$), com isso conclui-se que a regressão é significativa e a inclinação da reta da regressão não é nula. Os resultados da regressão linear para a budesonida encontram-se na tabela 12.

Tabela 12. Regressão linear da curva de análise da budesonida - Equipamento Waters®.

	Regressão	Resíduos
Soma quadrática	7,790916 E ¹⁵	1,618242 E ¹³
Graus de liberdade	1	34
Média quadrática	7,790916 E ¹⁵	4,759537 E ¹¹
Teste F		16369,06
F crítico		4,13

Como o $F_{\text{calculado}}$ é mais que dez vezes maior que o $F_{\text{crítico}}$, pode-se concluir que a regressão é significativa.

A análise da falta de ajuste foi realizada pelo teste de Fisher, com intervalo de confiança de 95%.

Se $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$, o modelo apresenta ajuste satisfatório. Os valores da análise da falta de ajuste estão descritos na tabela 13.

Tabela 13. Análise da falta de ajuste da curva de análise da budesonida - Equipamento Waters®.

	Falta de ajuste	Erro puro
Soma quadrática	2,445689 E ¹²	1,373674 E ¹³
Graus de liberdade	4	30
Média quadrática	6,114221 E ¹¹	4,578912 E ¹¹
Teste F		1,33
F crítico		2,65

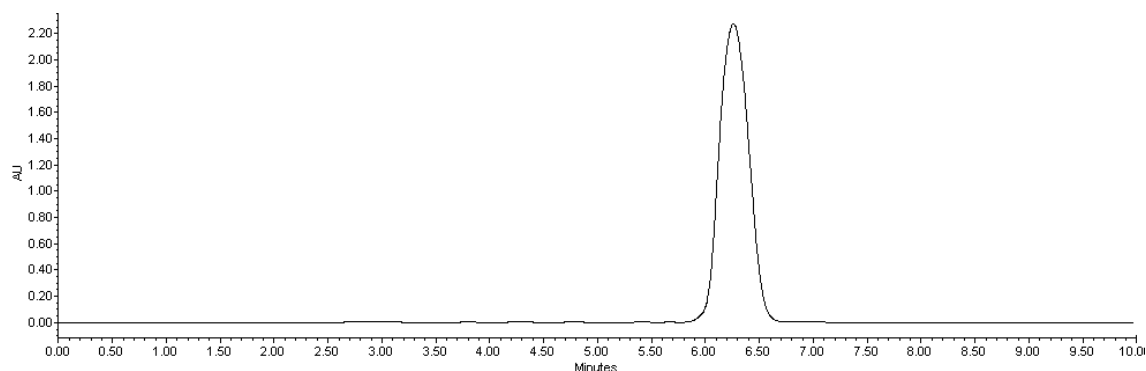
Como o $F_{\text{calculado}}$ é menor que o $F_{\text{crítico}}$, pode-se concluir que o modelo linear não apresenta falta de ajuste.

Os perfis cromatográficos da solução de budesonida (1000 µg/mL) obtidos utilizando-se os dois equipamentos apresentaram pouca variação no tempo de retenção, como se pode observar na Figuras 9 e 11. No entanto, as áreas dos picos de budesonida tiveram uma diferença na forma do pico, o cromatograma do Equipamento Agilent® (Figura 9) mostra os picos dos epímeros da budesonida, o epímero B (o primeiro dos dois picos principais) e o epímero A.

A diferença entre as áreas dos picos encontradas pelos diferentes equipamentos deve-se a utilização de detectores distintos, o detector UV-VIS

(Agilent®) e o detector de arranjos de fotodiodos (Waters®), por meio do qual obteve-se um único pico. Essa questão pode ser explicada pelo fato do detector UV-VIS possuir maior sensibilidade em relação ao detector de arranjos de fotodiodos (MÜLLER, 1997).

Figura 11. Cromatograma da budesonida em 245 nm - Equipamento Waters®



Zgórka e Kawka (2001) também encontraram diferenças nos resultados quantitativos utilizando detector UV-VIS e PDA, o qual é justificado pelos distintos modos de aquisição e integração dos dados.

O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação percentual para as concentrações de analisadas (Tabela 14) demonstraram reprodutibilidade.

Tabela 14. Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de budesonida analisadas - Equipamento Waters®.

Budesonida (µg/mL)	50,0	125,0	250,0	375,0	750,0	1000,0
CV (%)	3,50	3,69	3,77	3,41	3,94	1,88

Para determinação do parâmetro de precisão (Tabela 15) foram realizadas a repetibilidade e precisão intermediária. Este resultado é referente à média de três determinações e está de acordo com o limite estabelecido (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 15. Precisão do método de quantificação de budesonida - Equipamento Waters®.

Budesonida (µg/mL)	Dias	Repetibilidade		Precisão intermediária	
		Média ± s	CV %	Média ± s	CV %
125,0	1	124,57 ± 3,86	3,10	125,21 ± 4,50	3,59
	2	125,64 ± 4,81	3,83		
375,0	1	376,12 ± 12,76	3,39	376,99 ± 12,61	3,34
	2	377,14 ± 12,52	3,32		
750,0	1	762,07 ± 36,82	4,83	758,89 ± 29,22	3,85
	2	754,28 ± 22,50	2,98		

A análise de uma amostra preparada contendo uma quantidade conhecida de budesonida determinou a exatidão do método utilizando ensaios de recuperação (Tabela 16). A recuperação de budesonida foi de 100,52 ± 3,47%. Este resultado é referente a média de três determinações e está de acordo com os valores de referência de 80 - 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 16. Recuperação para método de quantificação de budesonida - Equipamento Waters®.

Budesonida (µg/mL) Adicionada	Budesonida (µg/mL) Encontrada	Recuperação (% ± s)	Média (% ± s)
125,0	124,57 ± 3,86	96,66 ± 3,09	100,52 ± 3,47
375,0	376,12 ± 12,76	100,30 ± 3,40	
750,0	762,07 ± 36,82	101,61 ± 4,91	

5.2 Estudo de solubilidade

A solubilidade aquosa de uma substância química é definida como a quantidade de soluto dissolvido em uma solução aquosa saturada em condições de equilíbrio em determinada temperatura. Esta característica é um

parâmetro essencial quando se trata do delineamento de formulações farmacêuticas. No entanto, a solubilidade de alguns fármacos varia consideravelmente com o pH do meio, e como o TGI apresenta valores diferentes de pH em toda sua extensão, é essencial avaliar a solubilidade de um fármaco nos meios em que ele estará exposto (BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014).

A solubilidade da budesonida foi avaliada em três diferentes meios: água destilada, meio gástrico simulado, e meio intestinal simulado, a temperatura de 37°C. Os valores de solubilidade da budesonida estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Solubilidade da budesonida nos diferentes meios.

Meio	BUD solubilizada (µg/mL)	CV (%)
	Média (%) ± s	
Água destilada	35,64 ± 1,07	3,00
Meio gástrico simulado (pH 2,0)	32,66 ± 0,39	1,20
Meio intestinal simulado (pH 6,8)	36,48 ± 0,40	1,11

Os resultados obtidos demonstram que a solubilidade da budesonida é baixa independente do pH do meio, semelhante aos resultados obtidos por Bhatt e colaboradores (2014) que encontraram solubilidade de 38,5 µg/mL para água destilada e 42,9 µg/mL para pH 6,8, caracterizando o fármaco como praticamente insolúvel segundo a Farmacopéia Brasileira (2010). O estudo de solubilidade foi realizado para comprovar que os valores de pH e volume de meio utilizados nos métodos na avaliação do perfil de liberação da budesonida possuíam condição *sink*.

5.3. Caracterização físico-química das micropartículas obtidas

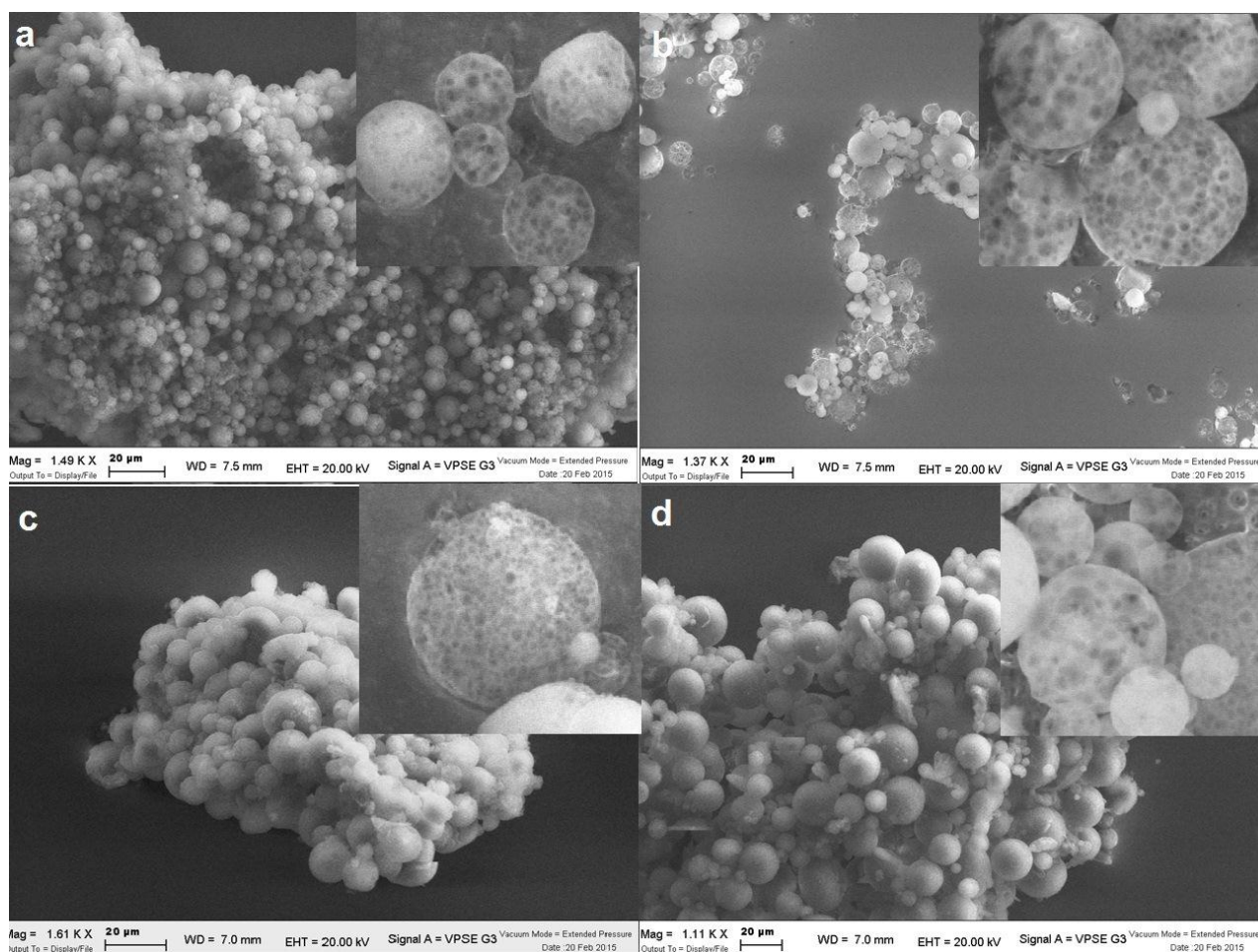
5.3.1 Análise morfológica

A análise morfológica das micropartículas de budesonida preparadas por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray-drying* foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 12 e 13).

O método por emulsificação e evaporação de solvente é um dos mais utilizados na preparação das micropartículas poliméricas e permite a incorporação de fármacos hidrossolúveis ou lipossolúveis. Uma vantagem desta metodologia é a sua simplicidade de execução, requerendo apenas a seleção adequada dos solventes, emulsificantes e condições de agitação (SEVERINO et al., 2011).

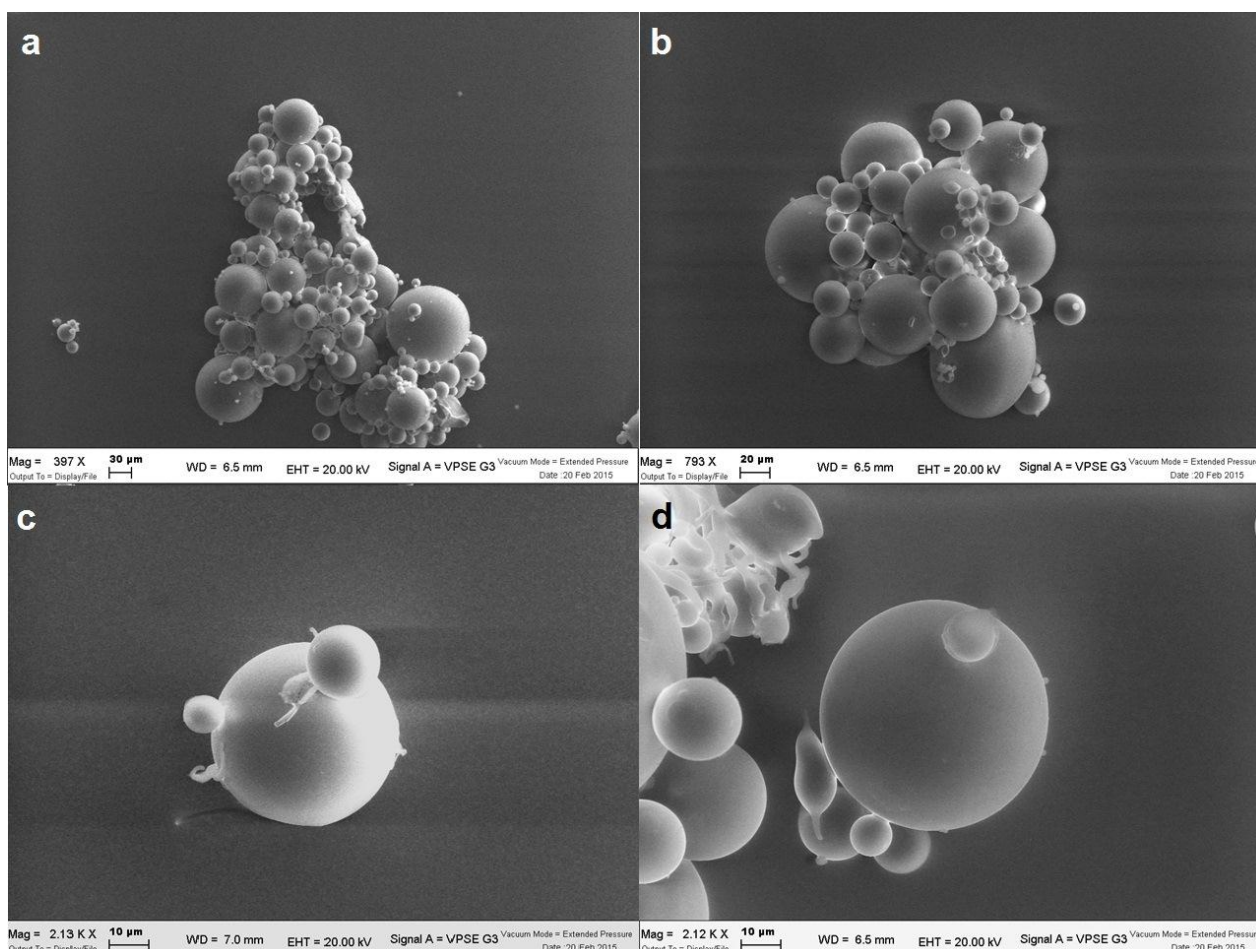
As micropartículas utilizando o ERS (Figura 12) apresentaram uma estrutura esférica com poros na superfície. Cortesi e colaboradores (2012) em estudo com dois tipos de Eudragit[®], um deles o RS100 usado neste trabalho, também obtiveram micropartículas esféricas e com poros na superfície por este mesmo método. Alai e Lin (2013) produziram micropartículas com Eudragit RS100 contendo lansoprazol por emulsificação e evaporação, estas também se apresentaram esféricas e com poros na superfície.

Figura 12. Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação do solvente: (a) MEEB-1 (1490x); (b) MEE-1 (1370x); (c) MEEB-2 (1610x); (d) MEEB-2 (1110x).



As micropartículas utilizando o HPMCF (Figura 13) apresentaram uma estrutura esférica e superfície lisa. Dai e colaboradores (2004) produziram micropartículas com HPMCF contendo ciclosporina A por este método, estas também apresentaram-se esféricas e lisas.

Figura 13. Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação do solvente: (a) MHEB-1 (400x); (b) MHE-1 (400x); (c) MHEB-2 (2100x); (d) MHEB-2 (2100x).



As fotomicrografias das micropartículas preparadas por *spray-drying* de HPMCF com e sem budesonida, obtidas por MEV, demonstram partículas com características variadas (Figura 14). As MHSB-1, MHS-1, MHSB-2, MHSB-2 apresentaram-se na forma esférica, com a superfície lisa, no entanto, a maioria possui depressões na parede, com aspecto de amassadas. As reentrâncias na parede das micropartículas ocorrem com maior frequência nas de menor diâmetro (Figura 14 (a e b)). Isso pode ser atribuído à taxa de secagem, já que altas taxas, associadas às partículas pequenas levam a rápida solidificação do material de parede, e assim a sua expansão e,

consequentemente, a suavização das reentrâncias não ocorre (SHEU; ROSENBERG, 1998).

Segundo Peres e colaboradores (2011), partículas com morfologias diferentes podem ocorrer, já que dependem do tamanho e das características da parede no final do processo de secagem. Materiais secos por nebulização podem apresentar-se de diferentes formas, em esferas intactas, com superfície inteira ou fragmentada, e partículas ocas, dependendo da elasticidade e permeabilidade da parede.

As características das micropartículas obtidas concordam com a literatura, as quais utilizaram HPMCF como material de encapsulação. RASSU e colaboradores (2014) obtiveram micropartículas utilizando HPMCF com esse mesmo aspecto esféricas e com reentrâncias na parede pelo método *spray-drying* com timol.

As fotomicrografias das micropartículas produzidas por *spray-drying* de ERS com e sem budesonida, obtidas por MEV (MESB-1, MES-1, MESB-2, MESB-2) (Figura 15) apresentam-se na forma esférica, com a superfície lisa, no entanto, a maioria possui poros, lembrando o aspecto de “donuts”. GAREKANI e colaboradores (2013) em um estudo comparativo de micropartículas de teofilina produzidas por *spray dryer* utilizando para o preparo Eudragit[®] RS 100 em solução orgânica e em dispersão aquosa obtiveram micropartículas com o mesmo aspecto de “donuts” quando utilizado a dispersão ERS, como neste presente trabalho.

Comparando-se as micropartículas contendo budesonida (Figura 14 (a e c) e 15 (a e c)), com as suas respectivas sem o fármaco, nota-se que são semelhantes na morfologia, embora o tamanho tenha aumentado com o aumento da concentração polimérica. Essa semelhança demonstra que a budesonida incorporada na matriz polimérica não alterou a morfologia das micropartículas.

Figura 14. Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas por *spray-drying*: (a) MHSB-1(1500x); (b) MHS-1(1500x); (c) MHSB-2(1500x); (d) MHSB-2 (1500x).

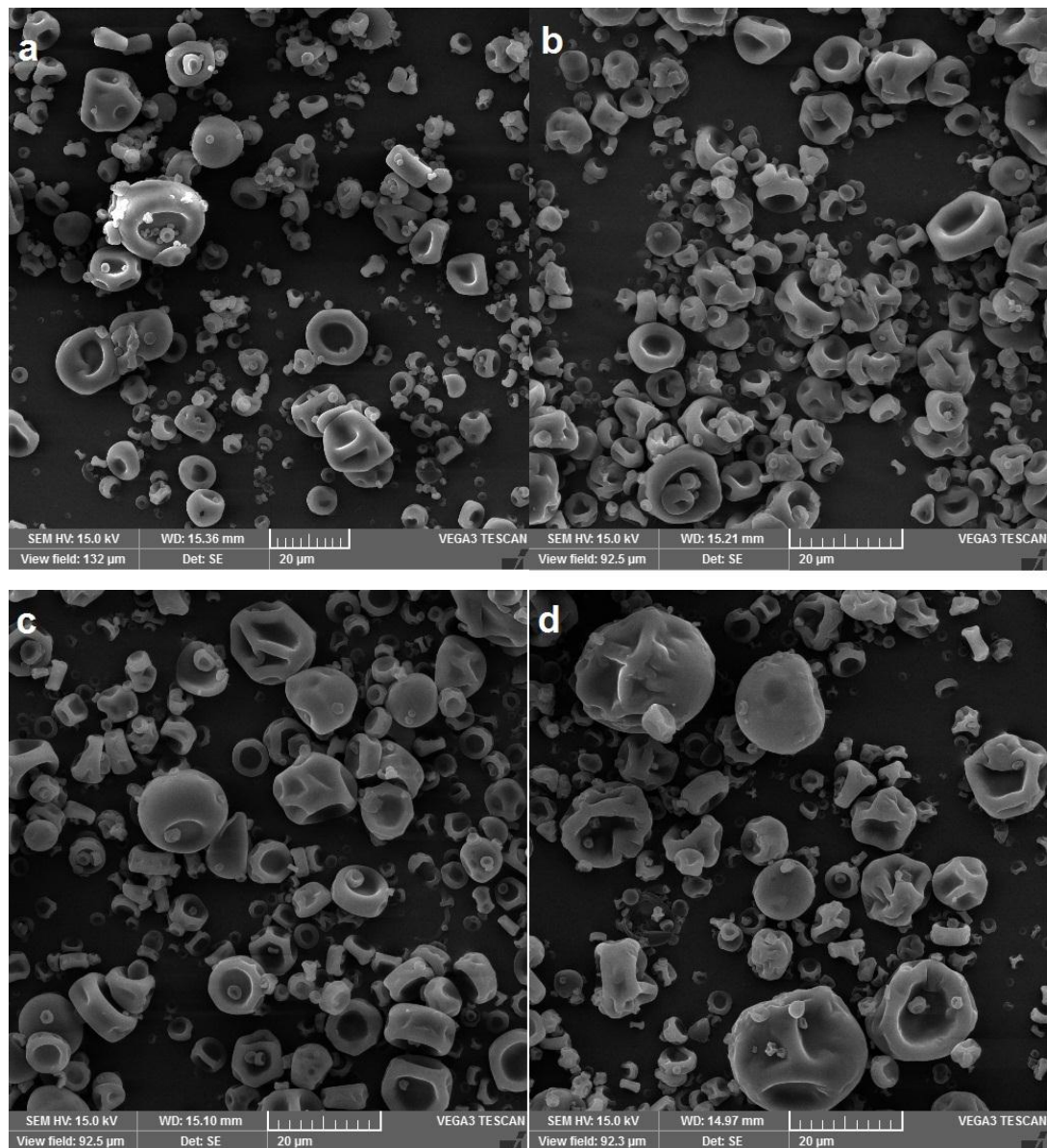
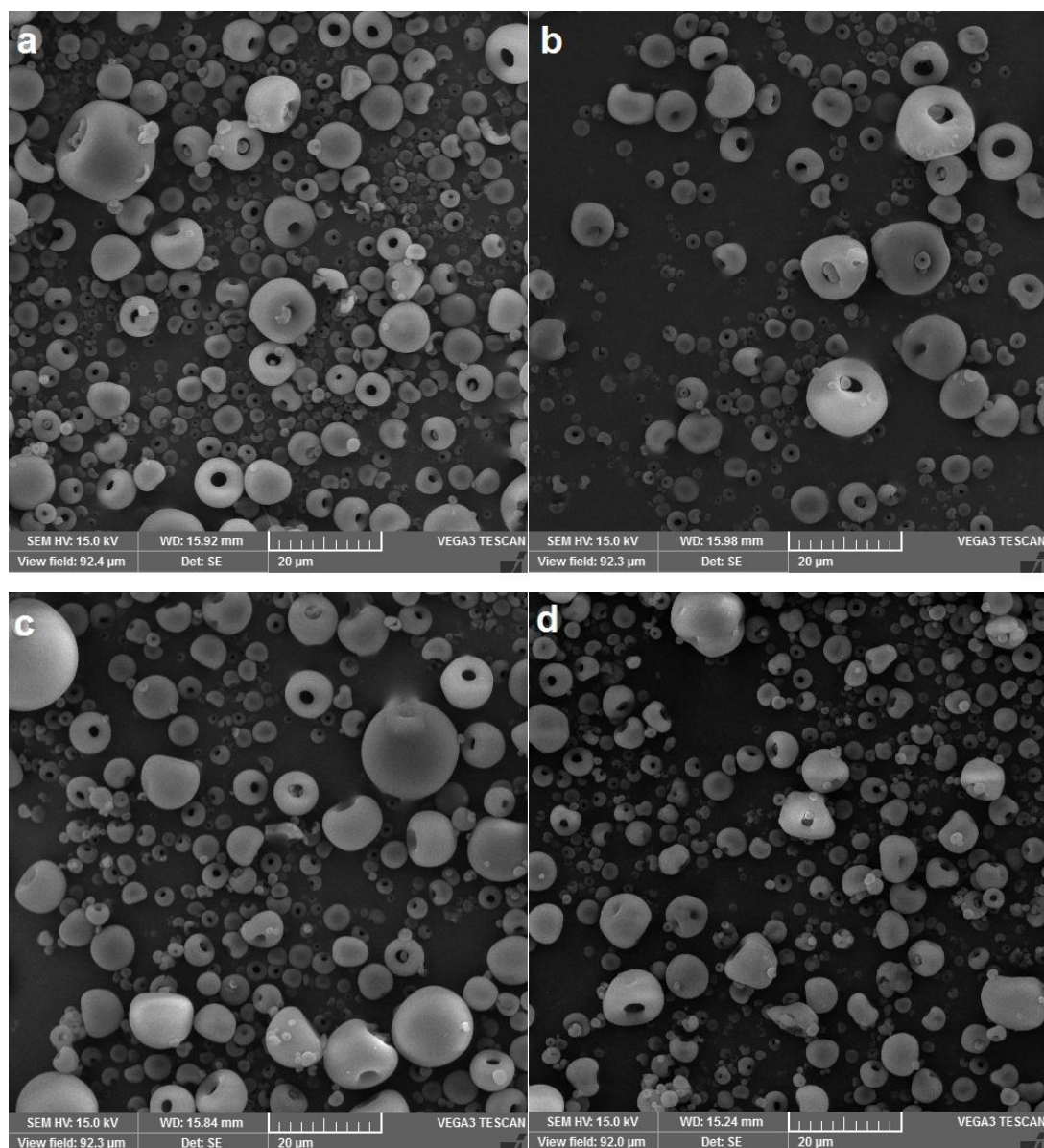


Figura 15. Fotomicrografia por microscopia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas por *spray-drying*: (a) MESB-1(1500x); (b) MES-1(1500x); (c) MESB-2(1500x); (d) MESB-2 (1500x).



5.3.2 Análise granulométrica e índice de polidispersão

Além da avaliação morfológica das partículas, o conhecimento da distribuição de tamanho é muito importante no desenvolvimento dos sistemas de liberação de fármacos. A análise granulométrica tem grande importância devido ao fato de o tamanho das partículas poder afetar a performance do fármaco em relação a sua liberação, a eficiência de encapsulação e a captação das mesmas por células fagocíticas (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005).

Dependendo do tamanho da partícula, a análise de distribuição de tamanho pode ser realizada por tamisação a seco ou a úmido, por microscopia óptica e eletrônica, por espalhamento de luz, por difração de laser, por elutriação, por sedimentação centrífuga e por permeabilidade e absorção em gás (BARBER, 1993).

O diâmetro das micropartículas de budesonida obtidas por emulsificação e evaporação de solvente foram realizadas e reportadas em diâmetro médio e índice de polidispersão (Tabela 18).

Tabela 18. Diâmetro médio e índice de polidispersão das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente.

Formulação	Diâmetro médio (μm)	Índice de polidispersão
MHE - 1	12,52 \pm 7,76	0,598
MHE - 2	15,13 \pm 9,49	0,803
MHEB - 1	14,76 \pm 8,73	0,615
MHEB - 2	17,52 \pm 9,71	0,812
MEE - 1	19,98 \pm 6,71	0,709
MEE - 2	21,77 \pm 8,67	0,914
MEEB - 1	22,20 \pm 9,90	0,727
MEEB - 2	25,02 \pm 8,70	0,889

As micropartículas sem fármaco tanto com ERS quanto HPMCF apresentaram diâmetro médio menor, quando comparadas às respectivas

micropartículas contendo budesonida, para ambos os polímeros utilizados, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Além disso, também foi avaliado se com o aumento da concentração de polímero havia diferença significativa no diâmetro das partículas, e ficou comprovado que também não houve diferença estatisticamente significativa.

Por meio dos resultados pode-se observar que a polidispersão também aumentou com o aumento da concentração de ambos os polímeros utilizados na produção das micropartículas. A partir dos resultados obtidos, a MHEB-1 é a formulação que obteve partículas contendo budesonida com menor diâmetro médio e índice de polidispersão.

O tamanho das micropartículas de budesonida obtidas por *spray-drying* foram realizadas e reportadas em diâmetro médio e o índice de polidispersão (Tabela 19). Pela comparação, tanto do diâmetro médio como do índice de polidispersão, das micropartículas por *spray*, nota-se que o aumento da proporção de polímeros na formulação ocasionou o aumento da polidispersão, o que pode ser devido ao aumento da viscosidade e do teor de sólidos na amostra, o que é responsável pela formação de gotas maiores e, conseqüentemente, partículas com diâmetro maior.

A polidispersão é um parâmetro que analisa a função de autocorrelação em medidas de espalhamento dinâmico de luz. Nesta análise, assume-se que as partículas possuem um único tamanho e um ajuste exponencial simples é aplicado á função de autocorrelação. Sabe-se que índices de polidispersão inferiores a 0,50 indicam que a distribuição de tamanho de partículas é homogênea (TRIERWEILER, 2009).

As micropartículas sem fármaco tanto com ERS quanto HPMCF apresentaram diâmetro médio menor, quando comparadas às respectivas micropartículas contendo budesonida, e verificou-se que para as micropartículas produzidas com ambos os polímeros houve diferença estatisticamente significativa no diâmetro.

Além disso, também foi avaliado se com o aumento da concentração de polímero havia diferença significativa no diâmetro das partículas, e ficou comprovado somente para as partículas produzidas com HPMCF esta diferença

foi estatisticamente significativa quando aumentou-se a concentração polimérica.

Tabela 19. Diamêtro médio e índice de polidispersão das micropartículas obtidas por *spray-drying*.

Formulação	Diamêtro médio (μm)	Índice de polidispersão
MHS - 1	0,51 \pm 0,02	0,422
MHS - 2	1,12 \pm 0,01	0,512
MHSB - 1	0,72 \pm 0,05	0,436
MHSB - 2	1,44 \pm 0,12	0,611
MES - 1	0,29 \pm 0,02	0,227
MES - 2	0,36 \pm 0,03	0,295
MESB - 1	0,39 \pm 0,02	0,263
MESB - 2	0,47 \pm 0,04	0,307

Segundo Oliveira e Petrovick (2010), o tamanho das partículas formadas pelo método de *spray-drying* pode ser diretamente influenciado pela viscosidade, teor de sólidos, tensão superficial do material de entrada e também do tipo de atomizador do equipamento. A partir dos resultados obtidos, a MESB-1 é a formulação que obteve partículas contendo budesonida com menor diâmetro médio e índice de polidispersão.

5.3.3 Rendimento do processo por *spray-drying*

Os rendimentos do processo para as micropartículas produzidas com HPMCF (MHSB-1 e MHSB-2) e com ERS (MESB-1 e MESB-2) estão apresentados na tabela 20.

Os parâmetros de operação do equipamento, bem como as características da amostra influenciam no rendimento do processo quando utiliza-se a técnica por *spray-drying*. Assim, esses fatores devem ser controlados para a obtenção de um rendimento adequado, minimizando a

aderência de partículas na câmara de secagem (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

No presente estudo, as condições do equipamento foram mantidas nos quatro testes, sendo, as diferenças, o polímero e a proporção budesonida/polímero utilizada. Dessa forma, foram os fatores que influenciaram nos rendimentos do processo obtidos. Nota-se que quanto maior a proporção de polímeros em relação ao fármaco, maior a quantidade de sólidos totais em suspensão e menor o rendimento do processo (MHSB-2 e MESB-2) observado. A isso, sugere-se que o aumento da proporção de sólidos na amostra acarretou o aumento da aderência das partículas na câmara de secagem, ocasionando a diminuição da quantidade de micropartículas coletadas (WADE; WELLER, 1994).

Os resultados obtidos são satisfatórios para o *spray dryer* em escala laboratorial e estão de acordo com trabalhos anteriores. Crcarevska e colaboradores (2008) obtiveram rendimento do processo entre 51,4% a 53,5% no preparo de micropartículas de quitosana com alginato de sódio contendo budesonida utilizando o mini *spray dryer*. Resultados entre 52% e 74% foram encontrados no preparo de micropartículas com a dispersão aquosa de ERS contendo teofilina pela técnica de *spray drying* por Garekani e colaboradores (2013). Estudos utilizando o HPMCF para produção de micropartículas obtiveram rendimentos de 30 a 40% com cetoprofeno (MORETTI et al., 2001) e cerca de 52% com timol (RASSU et al., 2014).

Tabela 20. Rendimento do processo por *spray-drying*

Formulação	Rendimento (%)	Concentração da Budesonida (% p/V)	Concentração do HPMCF (% p/V)	Concentração do ERS (% p/V)
MHSB - 1	59,93	1,875	7,5	—
MHSB - 2	49,11	2,5	10,0	—
MESB - 1	66,12	1,875	—	7,5
MESB - 2	48,35	2,5	—	10,0

5.3.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de budesonida

O teor de budesonida foi calculado utilizando-se a curva de análise e levando-se em consideração as diluições efetuadas. A eficiência de encapsulação foi determinada dividindo o teor de budesonida das micropartículas pelo teor de budesonida teórico das mesmas, multiplicando o resultado por 100, ambos os parâmetros foram avaliados pelo método cromatográfico e os resultados estão apresentados nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21. Teor de budesonida nas micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray drying*.

Micropartículas	Média* (% p/p) ± s	CV (%)
MEEB-1	4,99 ± 0,01	0,17
MEEB-2	3,83 ± 0,00	0,12
MHEB-1	6,42 ± 0,07	1,09
MHEB-2	5,09 ± 0,01	0,20
MESB-1	18,07 ± 0,09	0,50
MESB-2	20,76 ± 0,17	0,81
MHSB-1	16,33 ± 0,11	0,66
MHSB-2	17,40 ± 0,11	0,63

* Massa de budesonida (g) em 100g de micropartículas secas

As micropartículas produzidas por emulsificação e evaporação (MHEB-1, MHEB-2, MEEB-1 e MEEB-2) apresentaram uma eficiência de encapsulação não muito alta, com valores entre 40 e 68% (Tabela 22), com maiores valores para as partículas produzidas com HPMCF.

A escolha do material utilizado para a encapsulação, das micropartículas produzidas por *spray dryer*, é vital para uma eficiente encapsulação (KANAKDANDE et al., 2007). Assim, pelos resultados de eficiência de encapsulação obtidos (Tabela 22), pode-se concluir que os polímeros HPMCF e ERS, nas proporções utilizadas, foram adequados para a microencapsulação

da budesonida, já que a porcentagem de encapsulação foi alta, entre 81,66% e 103,31%.

Tabela 22. Eficiência de encapsulação de budesonida nas micropartículas por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray-drying*.

Micropartículas	Média* (%) ± s	CV (%)
MEEB-1	53,10 ± 1,61	3,03
MEEB-2	40,76 ± 1,26	3,08
MHEB-1	68,34 ± 1,48	2,16
MHEB-2	55,24 ± 1,68	3,09
MESB-1	103,31 ± 0,83	0,81
MESB-2	90,33 ± 0,46	0,50
MHSB-1	86,58 ± 0,39	0,45
MHSB-2	81,66 ± 0,05	0,06

* Massa de experimental de BUD (g) dividida pela massa teórica de BUD (g) x 100

Os resultados obtidos estão de acordo com a eficiência de encapsulação encontrados em trabalhos anteriores. Cortesi e colaboradores (2012) obtiveram uma eficiência de encapsulação de 79,33% de budesonida utilizando como polímero o Eudragit® RS100 pelo método de *spray dryer*. A eficiência de encapsulação de cetoprofeno em micropartículas de HPMCF por *spray dryer* ficou entre 80 e 99% o que concorda com os resultados obtidos nesse trabalho (Tabela 22) (MORETTI et al., 2001).

5.3.5 Difractometria de raios X

A análise por difração de raios X (DRX), é uma técnica não destrutiva que oferece uma identificação precisa da fase sólida cristalina. A técnica consiste na projeção de um feixe de raios X monocromático sobre um material cristalino em um ângulo teta, e para que a difração ocorra é necessária uma diferença entre o caminho percorrido pelo raios X e o comprimento de onda da

radiação incidente. Pela variação do ângulo teta, as posições angulares e intensidades dos picos difratados resultantes da radiação produzem um padrão, que é característica de cada material (CULLITY, STOCK, 2002; MLADENOVSKA et al., 2007).

Os padrões de difração da BUD, ERS, HPMCF e micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação estão apresentados nas Figura 16 e 17.

Figura 16. Difratoograma de raios X das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação do solvente. (a) BUD; (b) ERS; (c) MEE-1; (d) MEEB-1.

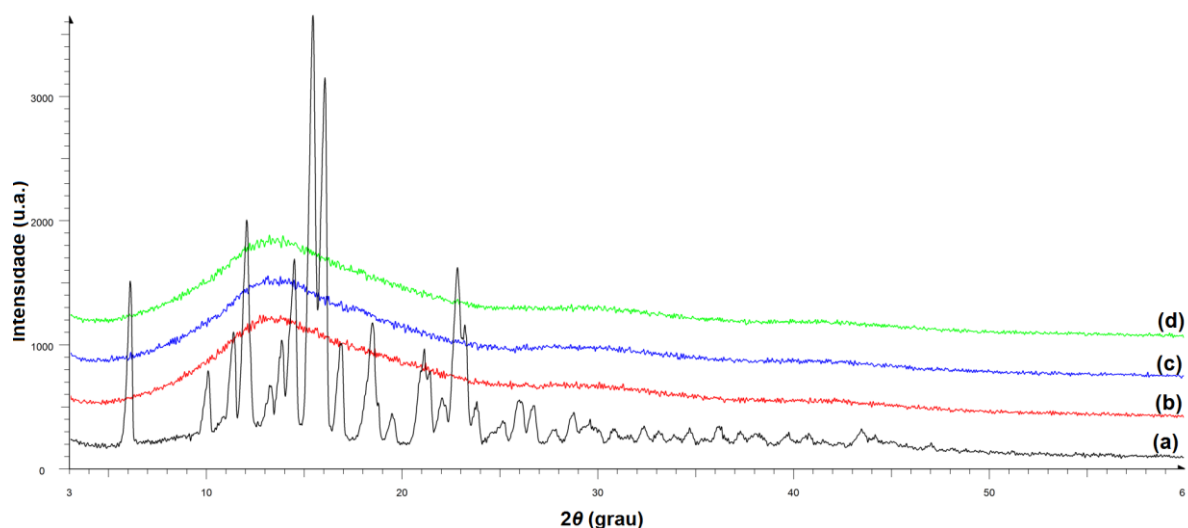
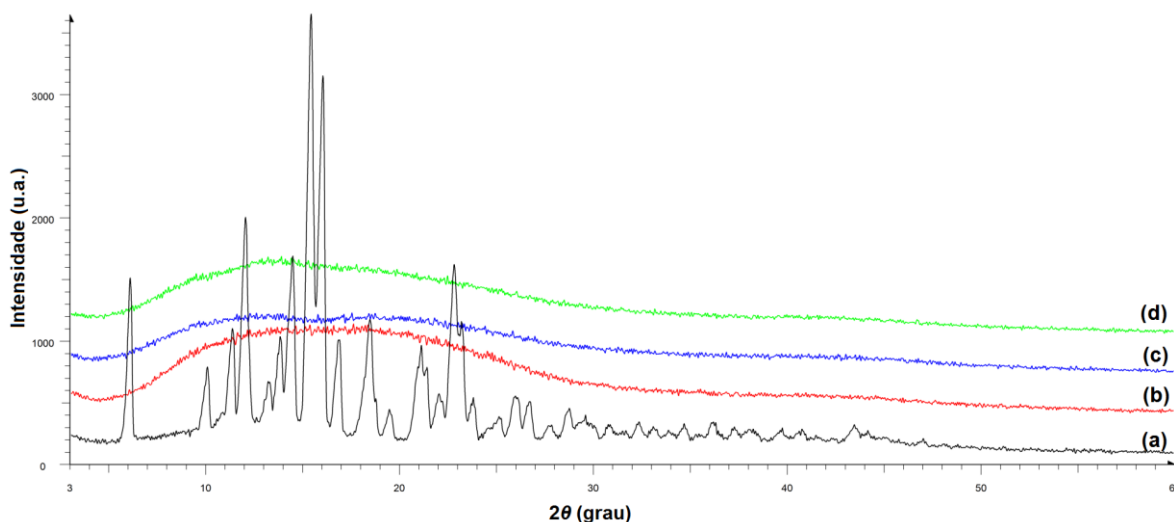


Figura 17. Difratoograma de raios X das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente. (a) BUD; (b) HPMCF; (c) MHE-1; (d) MHEB-1.



O difratograma de raios X da budesonida (Figuras 16 (a) e 17 (a)) mostrou uma série de picos estreitos em 5°, 10°, 11°, 12°, 15°, 16°, 22° os quais são compatíveis com o perfil do fármaco relatado na literatura, e caracterizam a natureza cristalina desse composto (MEZZENA et al., 2009; TAJBER et al., 2009; VARSHOSAZ et al., 2011; BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014).

Os perfis de DRX obtidos dos polímeros HPMCF e ERS (Figuras 16(b) e 17(b)) apresentaram-se na forma de um halo difuso, demonstrando que tratam-se de materiais não cristalinos (CHEN et al., 2006; GENÇ et al., 2006; ADIBKIA et al., 2011; CORTESI et al., 2012)

Estas características também foram observadas para as micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente sem o fármaco (MEE-1 e MHE-1) (Figuras 16 (c) e 17 (c)). As micropartículas contendo fármaco (MEEB-1 e MHEB-1) não apresentaram picos característicos da BUD como pode ser observado na Figura 16 (d) para as MPs com ERS, e na Figura 17 (d) para as com HPMCF.

As micropartículas terem apresentado difratogramas similares aos difratogramas dos polímeros componentes da formulação (ERS ou HPMCF), não apresentando picos correspondentes ao fármaco na forma cristalina, indicam que não há fármaco na superfície das partículas (BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014).

Os padrões de difração das micropartículas obtidas por *spray-drying* estão apresentados nas Figuras 18 e 19. O difratograma de raios X da budesonida, apresentado anteriormente (Figuras 16 (a) e 17 (a)), demonstrou a natureza cristalina desse composto (MEZZENA et al., 2009; TAJBER et al., 2009; VARSHOSAZ et al., 2011; BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014).

Os perfis de DRX obtidos dos polímeros HPMCF e ERS (Figuras 18(b) e 19(b)) apresentados no método por *spray-drying* demonstraram que ambos os polímeros não são cristalinos (CHEN et al., 2006; GENÇ et al., 2006; ADIBKIA et al., 2011; CORTESI et al., 2012).

Figura 18. Difratoograma de raios X das micropartículas obtidas por *spray-drying*: (a) MESB-1; (b) MES-1; (c) MESB-2; (d) MES-2.

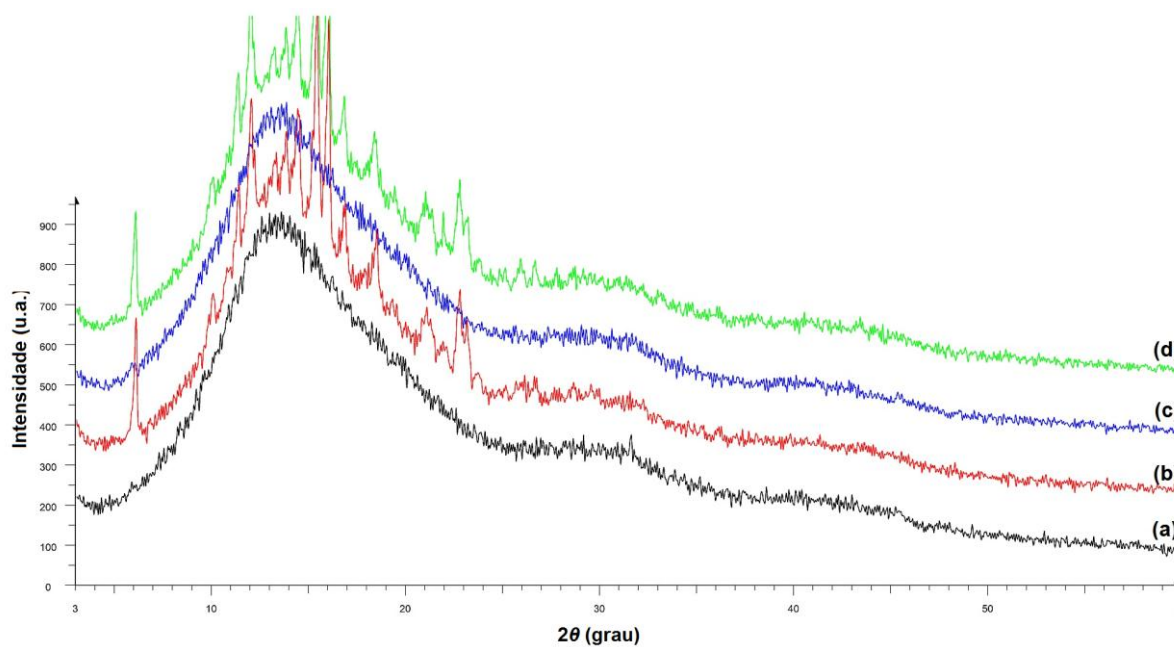
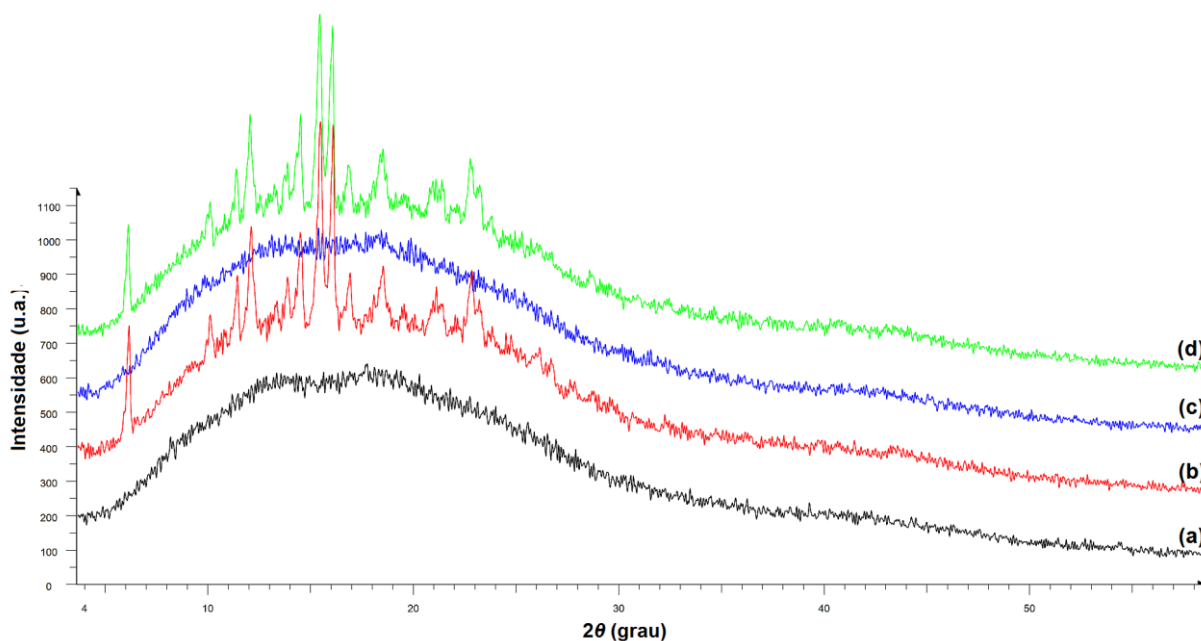


Figura 19. Difratoograma de raios X das micropartículas obtidas por *spray-drying*: (a) MHSB-1; (b) MHS-1; (c) MHSB-2; (d) MHS-2.



Estas características também foram observadas para as micropartículas obtidas por *spray-drying* sem o fármaco (MES-1, MES-2, MHS-1, MHS-2) (Figuras 18 (c) e 19 (c)). As micropartículas com fármaco obtidas por *spray-drying* (MESB-1, MESB-2, MHSB-1, MHSB-2) ao contrário das anteriores apresentaram picos evidenciando os resíduos cristalinos da BUD tanto para as micropartículas com ERS (Figura 18 (b e d)), quanto para as com HPMCF (Figura 19 (b e d)), isso pode indicar que o fármaco esteja na superfície das micropartículas.

5.3.6 Análise Termogravimétrica

A termogravimetria é uma técnica de análise térmica a qual examina a variação de massa da amostra em função da temperatura (HATAKEYAMA; QUINN, 1999). Trata-se de uma técnica simples e exata para estudar a decomposição e a estabilidade dos materiais (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004), sendo dependente das condições experimentais empregadas (HATAKEYAMA; QUINN, 1999).

As análises por termogravimetria (TG) da budesonida, do Eudragit RS100 e HPMCF, das micropartículas por emulsificação e evaporação de solvente sem o fármaco (MEE-1 e MHE-1) e das micropartículas contendo o fármaco (MEEB-1 e MHEB-1) foram realizadas, e os perfis resultantes estão demonstrados na Figuras 20 e 21.

Observando as Figuras 20 e 21, compreende-se que a BUD apresentou estabilidade térmica durante quase toda à análise, com uma pequena decomposição de cerca de 4% de sua massa inicial ao final da análise.

Os perfis de TG obtidos são semelhantes aos encontradas na literatura para o Eudragit (GENÇ et al., 2006; ADIBKIA et al., 2011; GAREKANI, MOGHADDAM, SADEGHI, 2013) e HPMCF (GUZMAN et al., 1996; CHEN et al., 2006). O polímero HPMCF apresentou uma massa residual de 63,15%, enquanto o polímero ERS apresentou massa residual de 97,12%.

Figura 20. Curva TG das substâncias puras budesonida (BUD) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente MHEB-1 e MHE-1.

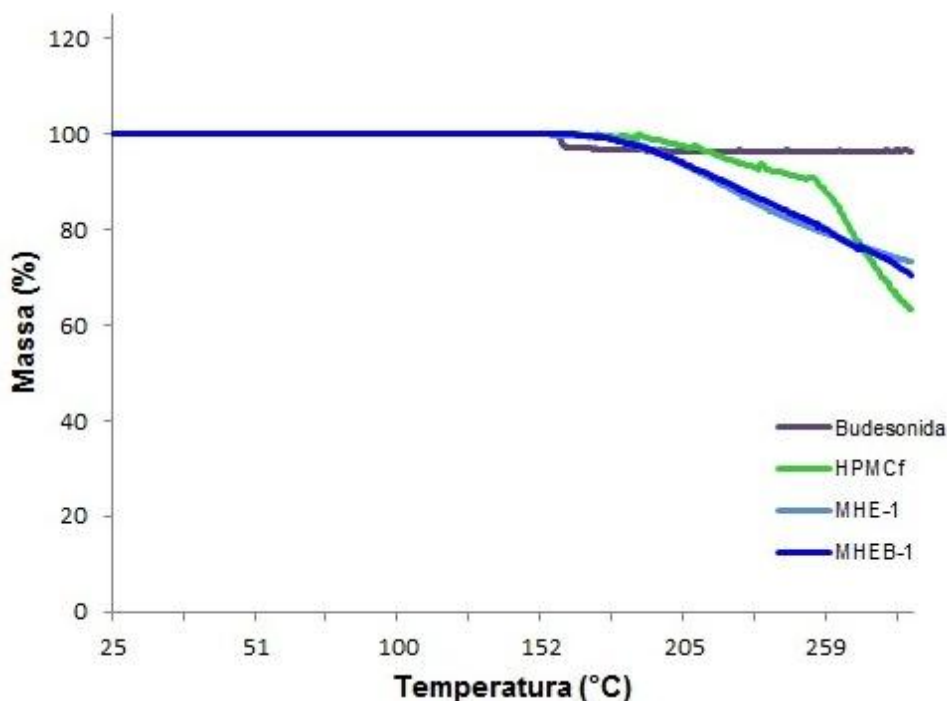
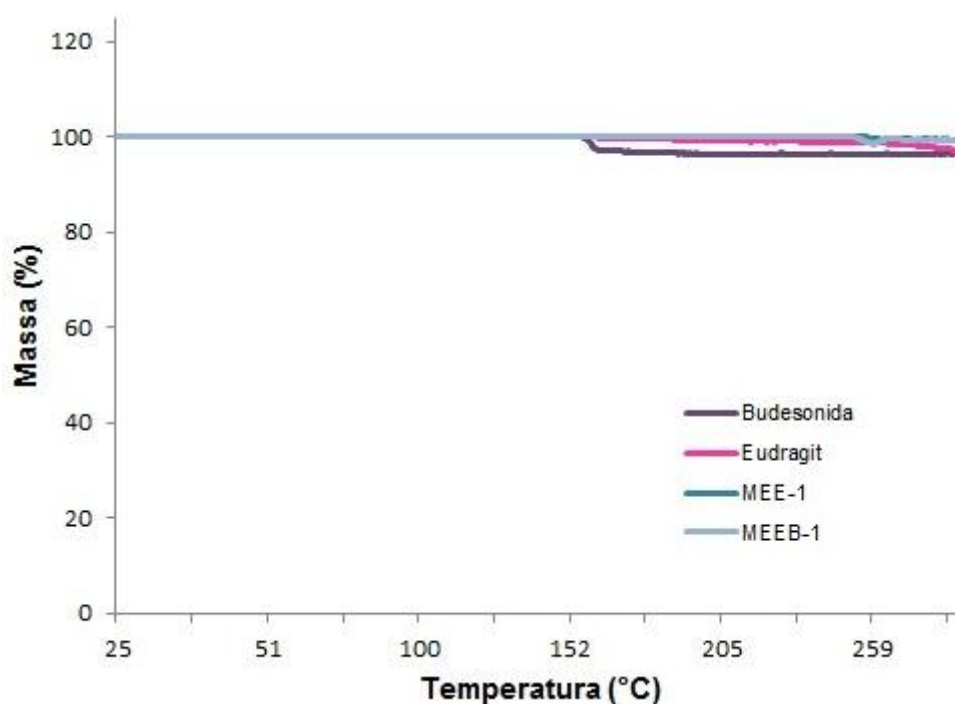


Figura 21. Curva TG das substâncias puras budesonida (BUD) e Eudragit® RS100 (ERS), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente MEEB-1 e MEE-1.



Comparando-se os perfis de TG das micropartículas com budesonida com a curva TG do fármaco (MEEB-1 e MHEB-1), ilustrados na Figuras 20 e 21, nota-se que a BUD apresentou uma massa residual ao final da análise (300 °C) de 96,35%, e as micropartículas de HPMCF contendo BUD (MHEB-1) apresentaram uma massa residual de 70,45%, enquanto que as micropartículas de ERS contendo BUD (MEEB-1) apresentaram massa residual de 98,86%.

5.3.7 Calorimetria diferencial exploratória

As interações químicas e físico-químicas entre o fármaco e os excipientes no estado sólido, podem influenciar na estabilidade, na taxa de dissolução e na biodisponibilidade (MURA et al., 1998), por isso devem ser investigadas.

O DSC combinado com outras técnicas pode fornecer informações sobre as possíveis interações entre fármaco-polímero, bem como a estabilidade física dos materiais após os processos tecnológicos (SANSONE et al., 2011). Na Figura 18 e 19, estão ilustrados os perfis de DSC obtidos da budesonida, dos polímeros ERS e HPMCF, das MEE-1 e MHE-1 e das MEEB-1 e MHEB-1.

Analisando as curvas DSC da budesonida (Figuras 22 e 23), observa-se que o fármaco exibe um pico endotérmico em 255,29 °C, característico do processo de fusão da substância com decomposição, confirmando o preconizado na literatura para a BUD (CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA., 2008; BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014).

A curva de DSC de BUD apresentada neste estudo foi semelhante ao encontrado na literatura, estando de acordo com o pico de fusão encontrado por Cortesi e colaboradores (2012) que relataram pico em 250 °C; Crcarevska e colaboradores (2008) pico em 257 °C; Velaga e colaboradores (2002) e Tajber e colaboradores (2009), ambos pico em 258,7 °C; Mezzena e colaboradores (2009) em 259 °C; Bhatt e colaboradores (2014) em 259,14 °C.

O pico endotérmico em 255,29 °C não foi visualizado nas micropartículas com BUD (CRCAREVSKA; DODOV; GORACINOVA., 2008; BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014).

Figura 22. Curvas DSC das substâncias puras budesonida (BUD) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf) e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: MHE-1 e MHEB-1.

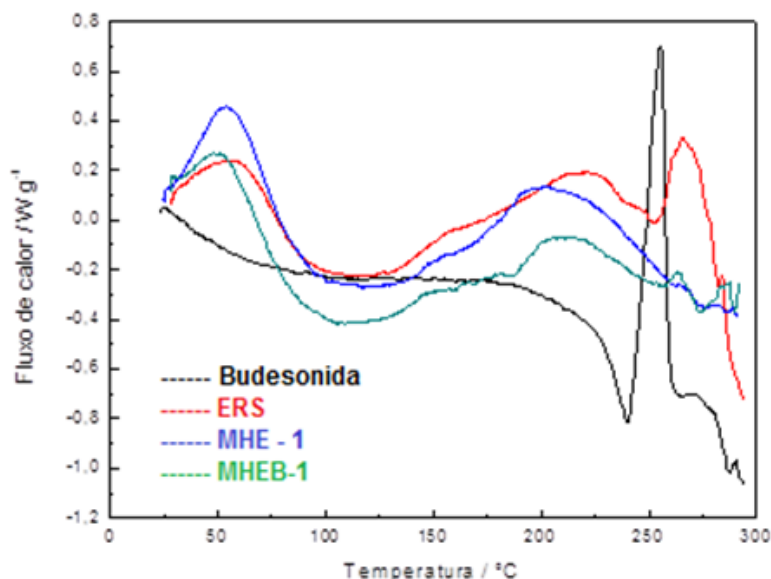
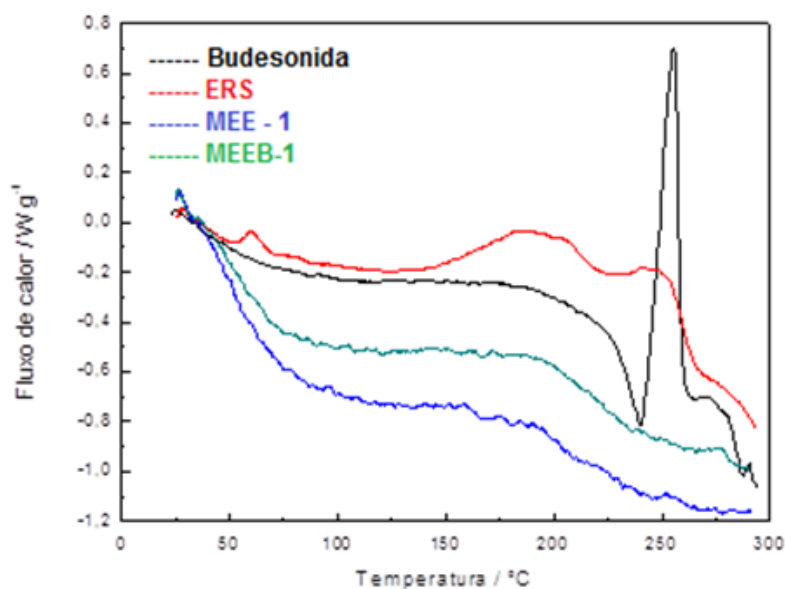


Figura 23. Curvas DSC das substâncias puras budesonida (BUD), e Eudragit RS100 (ERS), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: MEE-1 e MEEB-1.



A curva DSC do HPMCF (Figura 22) não apresentou pico endotérmico, sendo característico de estruturas amorfas, confirmando o preconizado na literatura para o HPMCF (GUZMAN et al., 1996; CHEN et al., 2006). A curva DSC do ERS (Figura 23) também não apresentou pico endotérmico, demonstrando comportamento característico de estruturas amorfas, concordando com o que descrito na literatura (ADIBKIA et al., 2011; GAREKANI, MOGHADDAM, SADEGHI, 2013).

Os vários parâmetros que são envolvidos no processo de microencapsulação por *spray-drying*, como o solvente utilizado, a temperatura e a taxa de evaporação do solvente, podem afetar a estabilidade do fármaco, a interação fármaco-polímero, ou a proporção amorfa/cristalina de um produto (SILVA-JUNIOR et al., 2009).

O pico endotérmico em 255,29 °C e exotérmico em 239,99 °C não foram visualizados nas micropartículas de HPMCF com BUD, estando de acordo com o encontrado por Chen e colaboradores (2006) em estudo para obtenção de micropartículas de HPMCF com paracetamol.

O mesmo foi observado para as micropartículas de ERS com BUD, o que demonstra que para as partículas produzidas concordando com o encontrado por Adibkia e colaboradores (2011) em estudo para obtenção de micropartículas de ERS com paracetamol. As micropartículas de teofilina utilizando ERS obtidas por Garekani e colaboradores (2013) também não apresentaram pico de fusão característico da budesonida.

Figura 24. Curvas DSC das micropartículas obtidas por *spray-drying*: MHS-1, MHSB-1, MHS-2 e MHSB-2.

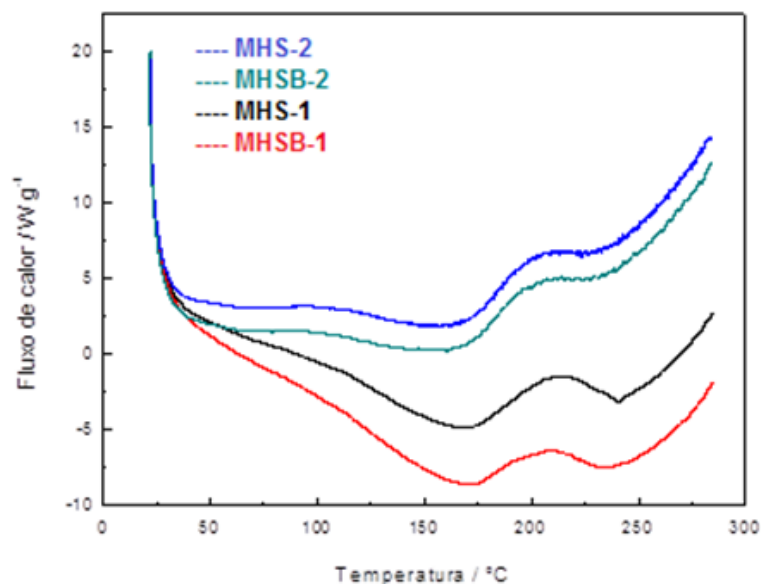
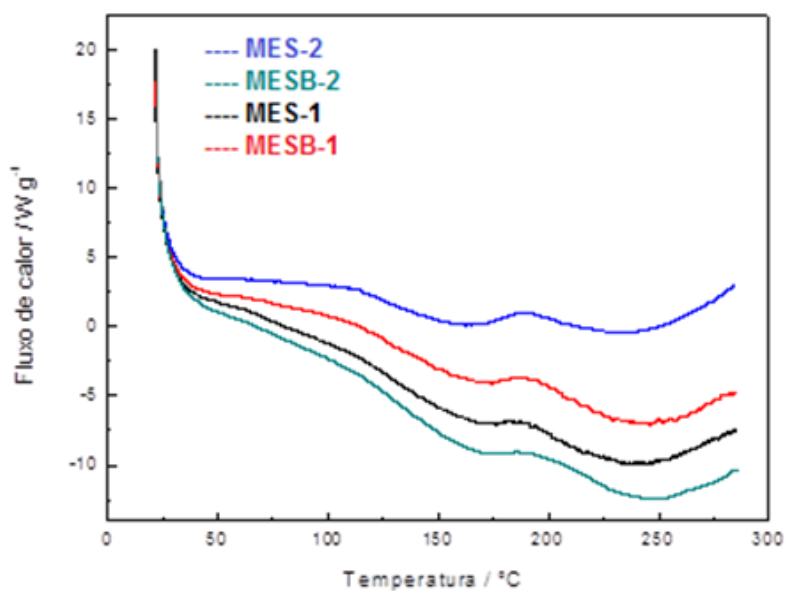


Figura 25. Curvas DSC das micropartículas obtidas por *spray-drying*: MES-1, MESB-1, MES-2, MESB-2.

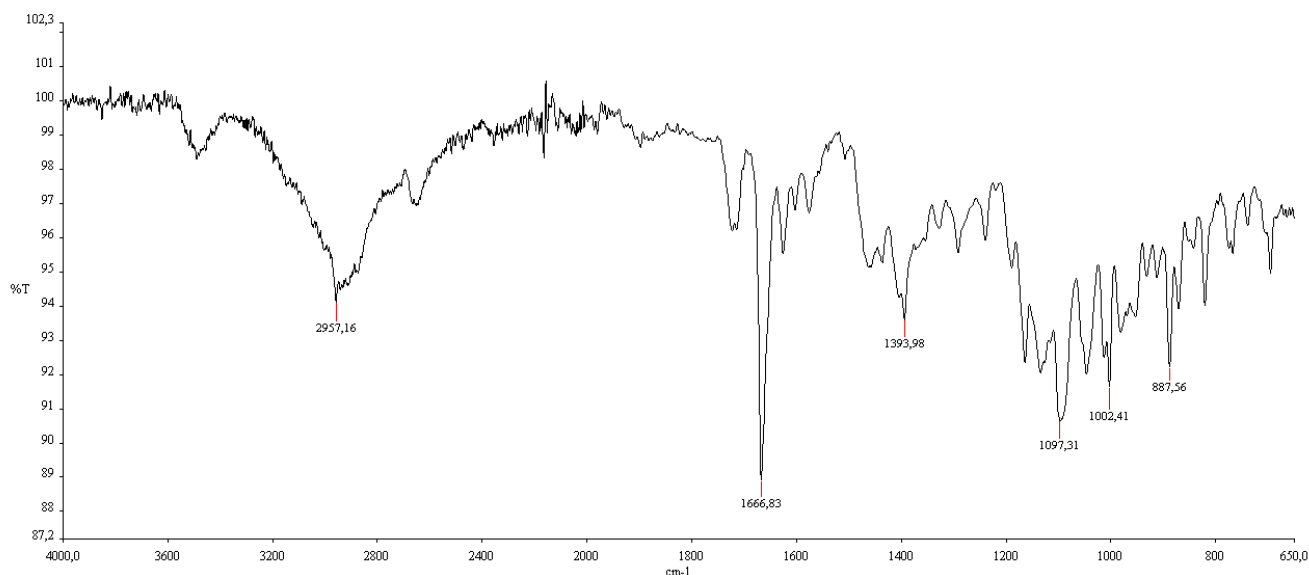


5.3.8 Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

As análises por espectroscopia no infravermelho fornecem informações sobre as ligações químicas, a estrutura molecular dos materiais (KRISHNAIAH et al., 2012) e sobre as possíveis interações entre o ativo e os polímeros (MLADENOVSKA et al., 2007). Esta análise baseia-se na medida da energia absorvida pela vibração ou rotação de cada uma das ligações químicas do material analisado. As frequências vibracionais ou rotacionais são previsíveis e correlacionáveis com as ligações químicas que compõem a estrutura molecular, permitindo a análise de substância pura ou em mistura (YOSHIDA et al., 2011).

Habitualmente, esta técnica é usada no estudo de compostos orgânicos, usando radiação no intervalo 4000-400 cm^{-1} , sendo traçado um espectro de todas as frequências de absorção na amostra. Isto permite obter informação acerca da composição da amostra, no que diz respeito à presença de grupos químicos e à sua pureza (ALMEIDA, 2009).

Figura 26. Infravermelho com transformada de Fourier para a budesonida.

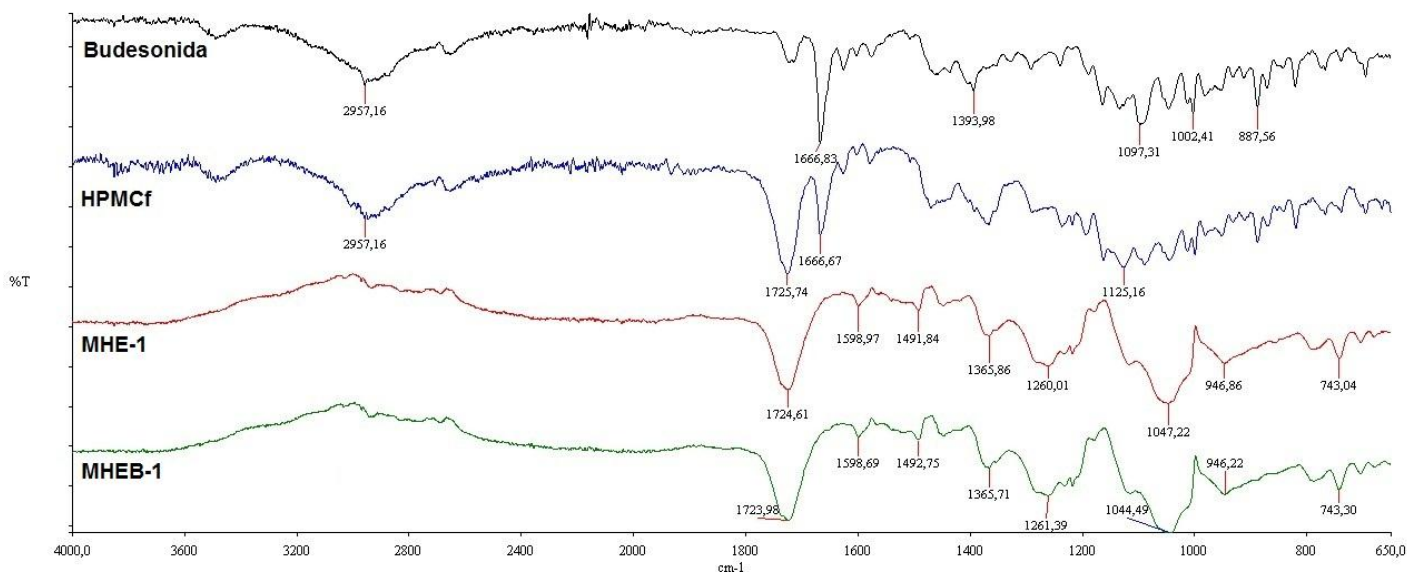


Os espectros FTIR da budesonida, dos polímeros Eudragit RS100 e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, das misturas físicas, das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente com fármaco (MHEB-1 e

MEEB-1) e sem fármaco (MHE-1 e MEE-1) estão apresentados nas Figuras 26 a 30.

O espectro FTIR da budesonida (Figura 26) apresentou as bandas características para esse fármaco, estando de acordo com os resultados encontrados na literatura (TAJBER et al., 2009; CORTESI et al., 2012; BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014). A banda de absorção em 3490 cm^{-1} é devido ao estiramento do O-H. A banda em 2957 cm^{-1} é referente ao estiramento do C-H. Em 1720 cm^{-1} nota-se a presença de uma banda, devido ao estiramento C=O. Em 1666 cm^{-1} nota-se a presença de uma banda, devido ao estiramento C=C. As bandas de absorção em 887 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento C-H do anel aromático (TAJBER et al., 2009; CORTESI et al., 2012; BHATT, NAIK, DHARAMSI, 2014).

Figura 27. Infravermelho com transformada de Fourier das substâncias puras budesonida (BUD) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: MHEB-1 e MHE-1.

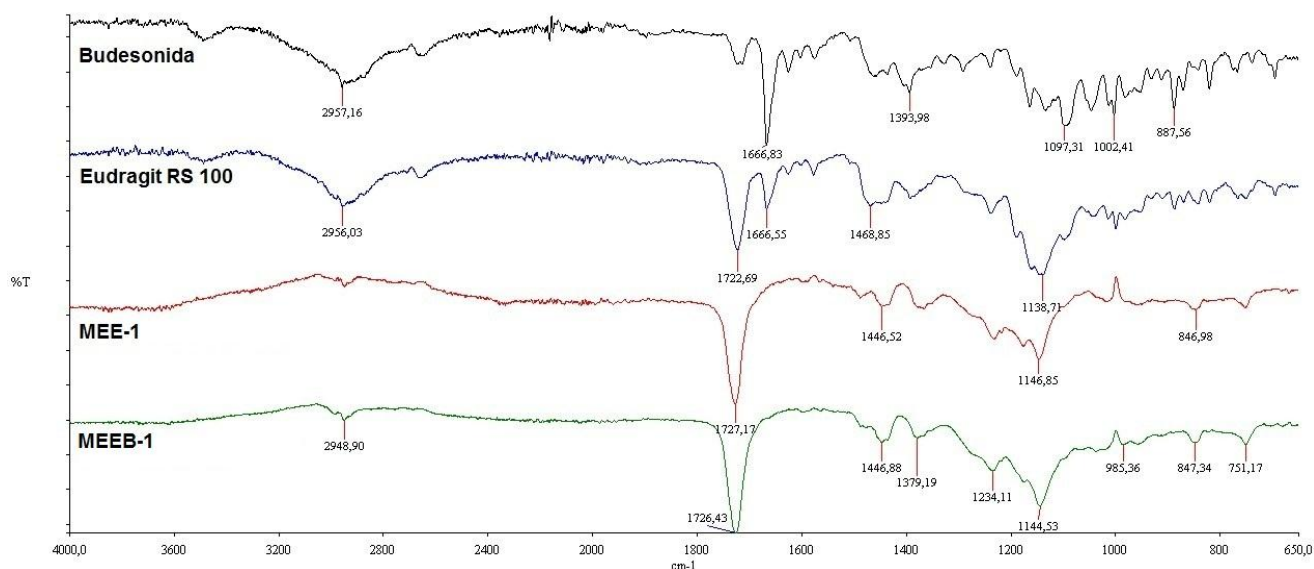


O espectro FTIR do HPMCf (Figura 27) apresentou uma banda de absorção em 3400 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo O-H. A banda de absorção em 2957 cm^{-1} devido ao estiramento do C-H do grupamento alquil.

Uma banda em 1725 cm^{-1} e outra em 1666 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento do C=O. Na região entre $1400\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuído ao estiramento do C-O-C do grupamento éter. A banda de absorção em 1057 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento do C-O do grupamento éter cíclico. Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente (CHEN et al., 2006; JEGANATHAN; PRAKYA, 2015).

O espectro FTIR do ERS (Figura 28) apresentou uma banda em 2956 cm^{-1} devido ao estiramento do C-H do grupamento alquil. Uma banda em 1722 cm^{-1} devido a vibração do grupo éster C=O. A banda de absorção em 1138 cm^{-1} é característica do polímero, e atribuída ao estiramento do grupo éster C=O. Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente (EVONIK, 2012; JEGANATHAN; PRAKYA, 2015).

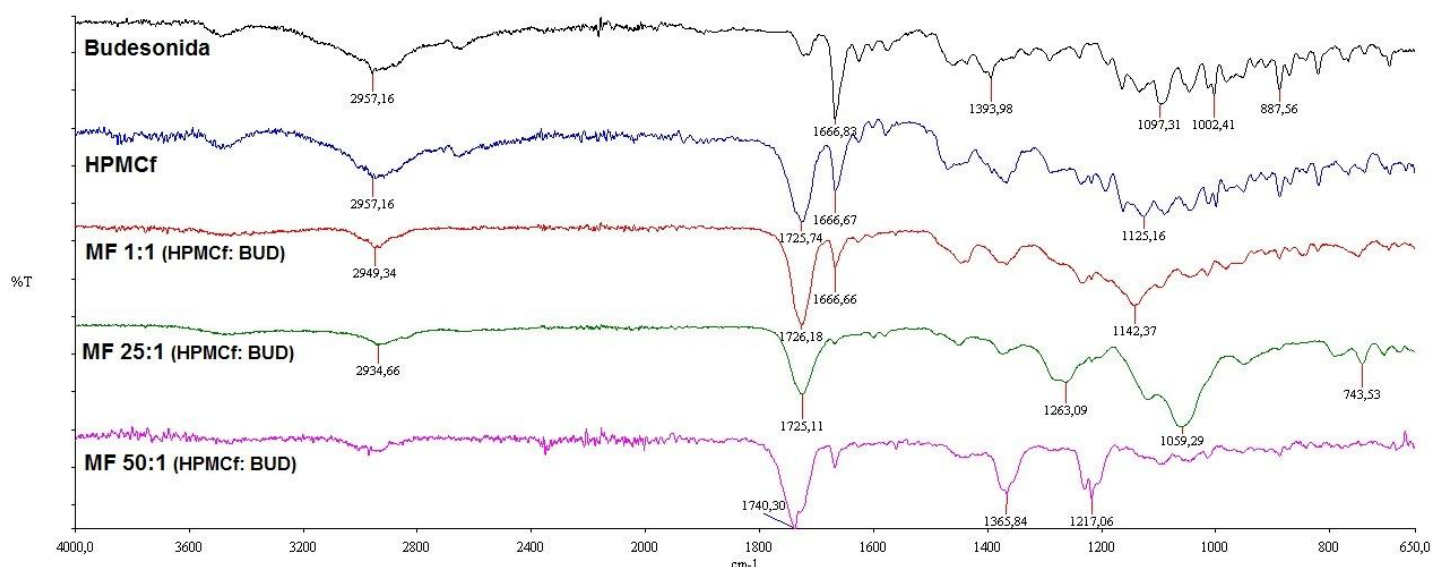
Figura 28. Infravermelho com transformada de Fourier das substâncias puras budesonida (BUD) e Eudragit RS100 (ERS), e das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente: MEEB-1 e MEE-1.



Com o intuito de avaliar a existência de interações entre o fármaco e os polímeros nas partículas, o perfil das micropartículas contendo o fármaco (MHEB-1 e MEEB-1), obtidas pelo método de emulsificação e evaporação do solvente, foram comparadas com as suas respectivas micropartículas sem

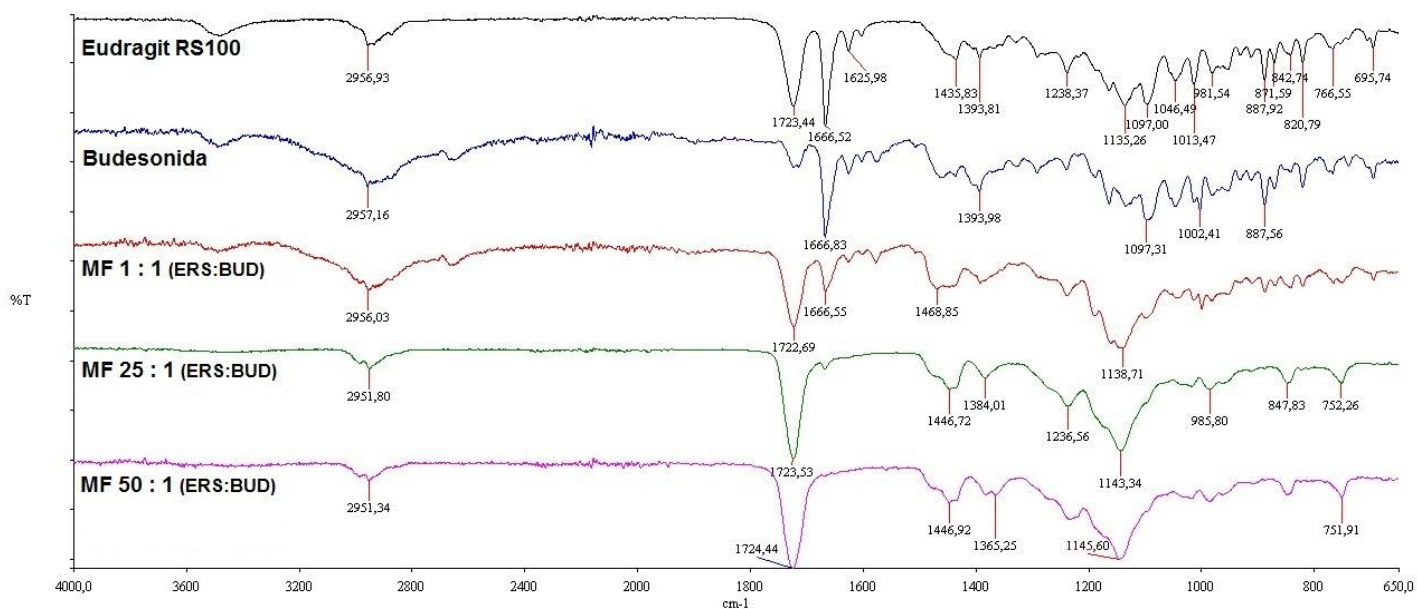
fármaco (MHE-1 e MEE-1) (Figuras 27 e 28). Não foram verificados deslocamentos das bandas de absorção, podendo indicar que não há interações (iônicas, hidrogênio e/ou forças de Van der Waals) entre o fármaco e os polímeros.

Figura 29. Infravermelho com transformada de Fourier das substâncias puras budesonida (BUD) e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HPMCf), e das misturas físicas 25:1, 50:1 e 1:1 de HPMCf:BUD.



Os espectros das misturas físicas do fármaco com os polímeros HPMCf e ERS, demonstraram muita semelhança com o perfil dos polímeros, componentes em maior quantidade nas formulações (Figuras 29 e 30). Não foram verificados deslocamentos das bandas de absorção, o que pode sugerir a ausência de interação entre o fármaco e polímeros nas misturas físicas.

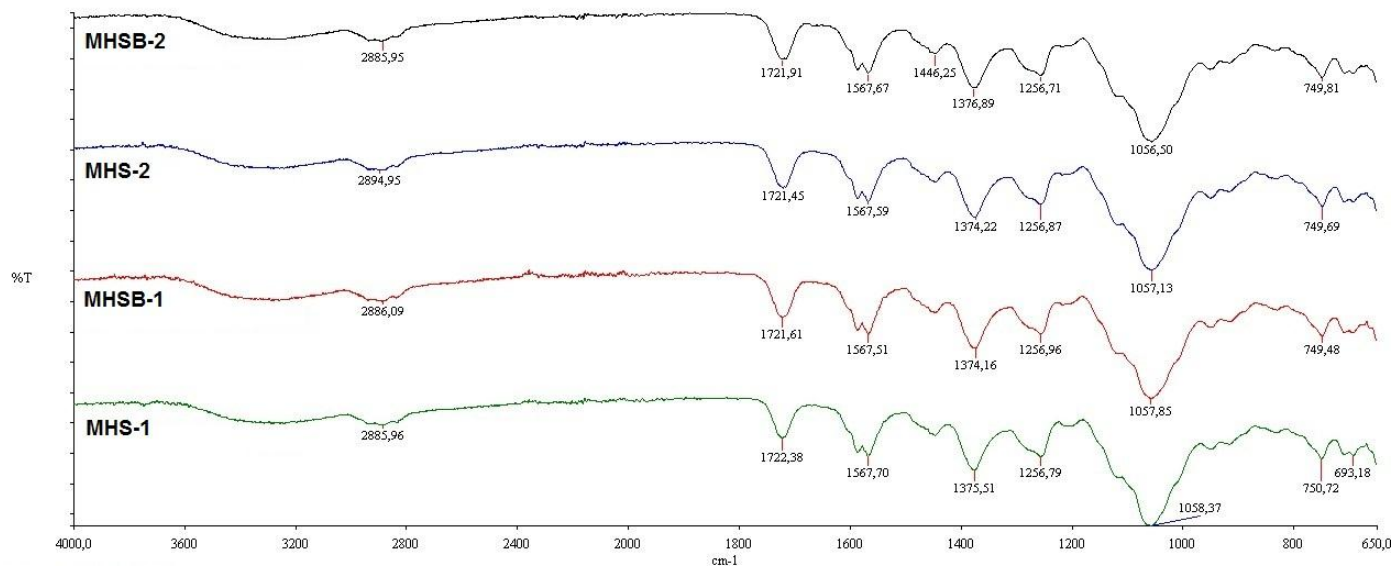
Figura 30. Infravermelho com transformada de Fourier das substâncias puras budesonida (BUD) e Eudragit RS100 (ERS), e das misturas físicas 25:1, 50:1 e 1:1 de ERS:BUD.



Interações entre fármaco e polímero conduzem a alterações nos padrões de FTIR (ADIBKIA et al., 2011). Com o intuito de avaliar a existência de interações entre o fármaco e os polímeros nas partículas foram realizadas as análises das micropartículas obtidas pelo método de *spray-drying*, utilizando os polímeros HPMCF e ERS.

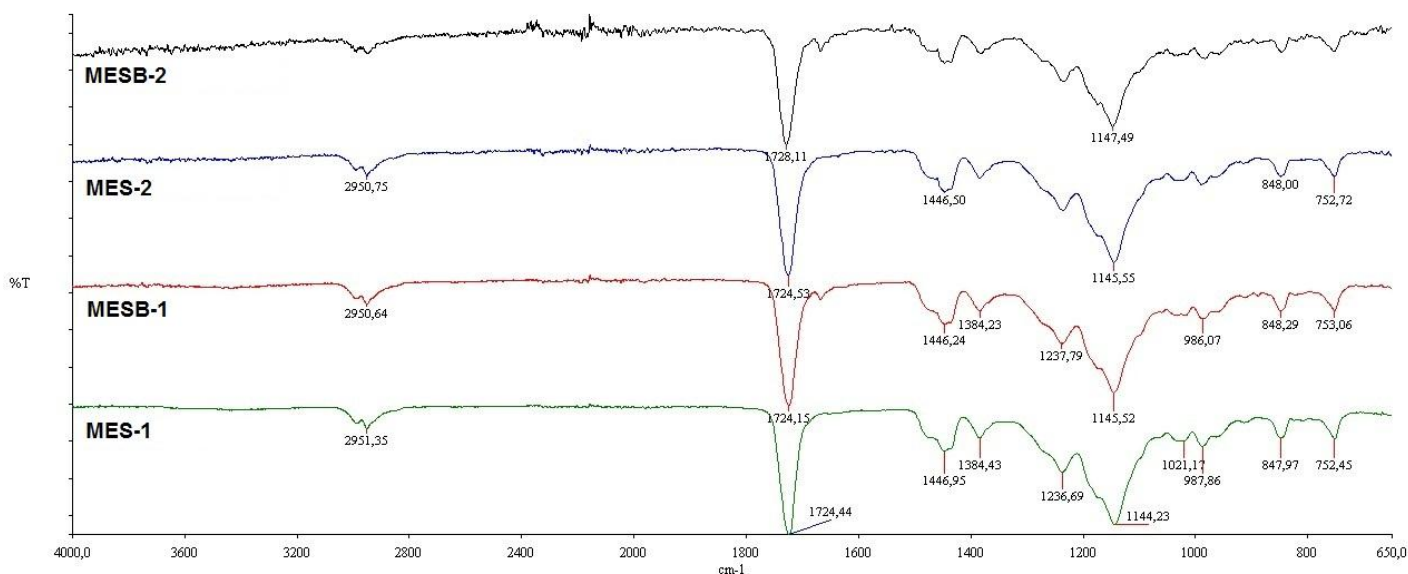
O espectro das micropartículas produzidas com o polímero HPMCF (Figura 31) apresentou banda de absorção em 2957 cm⁻¹ devido ao estiramento do C-H do grupamento alquil. Uma banda em 1725 cm⁻¹ que pode ser atribuída ao estiramento do grupo C=O. Na região entre 1400-1350 cm⁻¹ pode ser atribuído ao estiramento do C-O-C do grupamento éter. A banda de absorção em 1057 cm⁻¹ pode ser atribuída ao estiramento do C-O do grupamento éter cíclico (CHEN et al., 2006; JEGANATHAN; PRAKYA, 2015).

Figura 31. Infravermelho com transformada de Fourier para as micropartículas por *spray-drying* com HPMCf: MHS-1, MHSB-1, MHS-2, MHSB-2.



As micropartículas com fármaco (MHSB-1 e MHSB-2) foram comparadas com as suas respectivas micropartículas sem fármaco (MHS-1 e MHS-2) (Figura 32). Não foram verificados deslocamentos das bandas de absorção, podendo indicar que não há interações (iônicas, hidrogênio e/ou forças de Van der Waals) entre o fármaco e os polímeros.

Figura 32. Infravermelho com transformada de Fourier para as micropartículas por *spray-drying* com ERS: MES-1, MESB-1, MES-2, MESB-2.



O espectro das micropartículas produzidas com o polímero ERS (Figura 32) apresentou banda de absorção em 2957 cm^{-1} devido ao estiramento do C-H do grupamento alquil. Uma banda em 1725 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento do grupo C=O. Na região entre $1400\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuído ao estiramento do C-O-C do grupamento éter. A banda de absorção em 1057 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento do C-O do grupamento éter cíclico (ADIBKIA et al., 2011; CORTESI et al., 2012).

As micropartículas com fármaco (MESB-1 e MESB-2) foram comparadas com as suas respectivas micropartículas sem fármaco (MES-1 e MES-2) (Figura 32). Não foram verificados deslocamentos das bandas de absorção, podendo indicar que não há interações (iônicas, hidrogênio e/ou forças de Van der Waals) entre o fármaco e os polímeros.

5.3.9 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da budesonida a partir das micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray-drying*

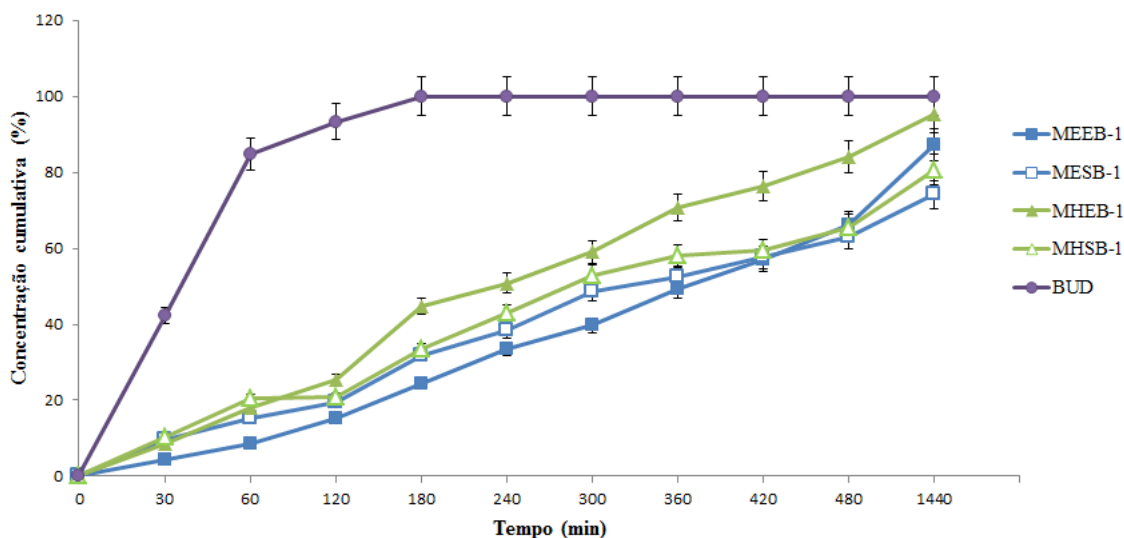
Os testes *in vitro* fornecem condições apropriadas para a realização de medidas de liberação reproduzíveis e precisas, importantes para distinguir diferentes formulações com o mesmo fármaco, a mesma formulação após o envelhecimento ou mudança de processo, como também durante o processo de produção. Quando estes são realizados de maneira adequada, podem ser utilizados no monitoramento das etapas de fabricação durante a fase de desenvolvimento do produto, além de prever o comportamento do sistema *in vivo* e diminuir o risco de falta de bioequivalência entre lotes do mesmo (FLORENCE; ATWOOD, 2006).

A avaliação do perfil de liberação *in vitro* do budesonida foi realizada utilizando membranas de acetato de celulose em células de Franz modificadas contendo 30 mL de meio sob agitação magnética constante, este foi o volume necessário para garantir uma condição *sink*, conforme os resultados do estudo de solubilidade (item 5.2). O experimento foi realizado em pH = 2,0 nas primeiras 2 horas, e pH 6,8 nas 22 horas seguintes.

A Figura 33 mostra o perfil de liberação da budesonida em água purificada e a partir das micropartículas por emulsificação e evaporação de solvente constituídas de ERS (MESB-1) ou HPMCF (MHSB-1), e por *spray-drying* constituídas de ERS (MEEB-1) ou HPMCF (MHEB-1), que foram selecionadas a partir dos resultados do diâmetro médio, índice de polidispersão, rendimento de processo (*spray-drying*) e teor e eficiência de encapsulação.

Nesta figura também é mostrado que o perfil de liberação da budesonida foi modificado quando esta foi encapsulada tanto pelo ERS quanto pelo HPMCF para ambos os processos por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray-drying*.

Figura 33. Perfil de liberação *in vitro* da budesonida (BUD) dispersa em água purificada e nas micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação de solvente e por *spray-drying* (n = 3).



As micropartículas por *spray-drying* preparadas com HPMCF apresentaram liberação mais rápida em relação as com ERS, sendo que a MHSB-1 liberou 65,59% nas primeiras 8 horas e um total de 80,74% com 24 horas de ensaio, enquanto a MESB-1 liberou em 8 horas 63,18%, e 74,12% com 24 horas de ensaio.

As micropartículas por emulsificação e evaporação de solvente preparadas com HPMCF de forma semelhante ao que ocorreu com as preparadas pelo outro método, apresentaram liberação mais rápida que as de ERS, sendo que a MHEB-1 liberou 84,22% nas primeiras 8 horas e um total de 95,27% com 24 horas de ensaio, enquanto a MEEB-1 liberou em 8 horas 66,29%, e 87,22% com 24 horas de ensaio. Além disso, as micropartículas obtidas per esse método apresentaram maior taxa de liberação tanto as produzidas com HPMCF quanto as com ERS.

A liberação em pH ácido das micropartículas obtidas por *spray drying* assim como ocorreu com as obtidas por emulsificação foi mais lenta nesse meio. Isso foi observado para as micropartículas produzidas com HPMCF, que por ser um polímero insolúvel em pH ácido reduziu as taxas de liberação do fármaco em meio gástrico, quanto para as micropartículas com ERS,

copolímero com baixa quantidade de grupos amônio quaternários, que devido a isso possui baixa permeabilidade, retardando a liberação e promovendo uma proteção nesse meio.

Observa-se que as micropartículas produzidas com HPMCF, um polímero insolúvel em pH ácido devido aos grupos carboxílicos (-COO-) de sua estrutura, reduziu as taxas de liberação do fármaco em meio gástrico, promovendo uma proteção nesse meio. O mesmo foi observado para as micropartículas produzidas com ERS, um derivado do ácido metacrílico, que contém uma quantidade baixa de grupos amônio quaternários, cerca de 4,5-6,8%, devido a isso possui baixa permeabilidade, retardando a liberação e promovendo uma proteção no pH ácido.

Muitos modelos matemáticos têm sido desenvolvidos com o propósito de descrever a liberação do fármaco a partir de uma matriz farmacêutica. E a escolha do modelo cinético mais adequado ocorre por meio da avaliação do coeficiente de correlação (R), onde o modelo mais ajustado é aquele próximo da linearidade (MANADAS e col., 2002; RODRIGUES e col., 2006).

No presente trabalho, os modelos testados foram de ordem zero, primeira e segunda ordem. Pelos respectivos coeficientes de correlação (R), descritos na Tabela 23, constatou-se que o modelo mais adequado para liberação da budesonida a partir da MHEB-1 e MEEB-1 foi o de segunda ordem, com coeficientes de correlação (R) de 0,9296 e de 0,9592, respectivamente.

Tabela 23. Equações e coeficientes de correlação linear (R) para avaliação da cinética de liberação da budesonida a partir das micropartículas por emulsificação e evaporação de solvente MEEB-1 e MHEB-1 (n = 3)

Modelo	MEEB-1		MHEB-1	
	Equação	R	Equação	R
Ordem 0	$0,034x+9,0967$	0,8606	$0,0437x+16,417$	0,8345
1ª ordem	$-0,0005x+4,515$	0,8974	$-0,0007x+4,4346$	0,9046
2ª ordem	$7E-06x+0,0108$	0,9296	$1E-05x+0,0115$	0,9592

*Fonte: HIGUCHI, 1963

As micropartículas produzidas por *spray-drying* também foram avaliadas quanto aos mesmos modelos matemáticos (Tabela 24), constatou-se que o modelo mais adequado para liberação da budesonida para ambas as micropartículas foi o de segunda ordem, com o coeficiente de correlação (R) de 0,9544 para MESB-1, e com o coeficiente de correlação (R) de 0,9881 para MHSB-1.

Tabela 24. Equações e coeficientes de correlação linear (R) para avaliação da cinética de liberação da budesonida a partir das micropartículas MESB-1 e MHSB-1 (n = 3)

Modelo	MESB-1		MHSB-1	
	Equação	R	Equação	R
Ordem 0	0,0483x+21,398	0,8045	0,0516x+23,334	0,8152
1ª ordem	-0,0009x+4,3714	0,8886	-0,0011x+4,362	0,9227
2ª ordem	2E-05x+0,0012	0,9544	3E-05x+0,0111	0,9881

*Fonte: HIGUCHI, 1963

Posteriormente, o mecanismo de liberação foi investigado por meio da equação geral que descreve a liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais, utilizando transformações logarítmicas e análise dos quadrados. A Tabela 25 mostra os resultados dessa análise.

Tabela 25. Análise dos dados obtidos com o ensaio de liberação *in vitro* a partir das micropartículas.

Sistemas	Parâmetros (média ± s)		
	n	K (min ⁻ⁿ)	r ²
MEEB-1	0,4638 ± 0,0037	0,1779 ± 0,0027	0,9493 ± 0,0010
MHEB-1	0,6927 ± 0,0020	0,6447 ± 0,0106	0,9393 ± 0,0041
MESB-2	0,6651 ± 0,0047	1,3774 ± 0,0464	0,9367 ± 0,0022
MHSB-2	0,6962 ± 0,0084	1,7922 ± 0,0645	0,9294 ± 0,0014

O mecanismo de liberação da budesonida a partir das micropartículas foi investigado por meio da equação geral que descreve a liberação de fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais (KORSMEYER et al., 1983; BRUSCHI, 2006), utilizando transformações logarítmicas e análise dos quadrados. Nesse contexto, $n > 0,43$ indica liberação controlada por difusão fickiana (HIGUCHI, 1963) e $n = 0,86$ indica uma liberação controlada puramente pelo relaxamento das cadeias poliméricas (transporte Caso II). Os valores intermediários entre 0,43 e 0,86, indicam um comportamento anômalo (cinética não fickiana correspondente aos fenômenos de difusão e de relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER; PEPPAS, 1987). Eventualmente verificam-se valores de $n > 0,86$ que estão relacionados com cinéticas do tipo Super Caso II) (HIGUCHI, 1963).

Assim, por meio da equação (5) foi possível encontrar o valor de "n" e para avaliar a ordem de liberação do sistema. Os valores encontrados para as micropartículas por emulsificação e evaporação de solvente (Tabela 25) foram $n = 0,4638$ e $n = 0,6927$, para as MEEB-1 e MHEB-1, e para as micropartículas por *spray-drying* foram $n = 0,6651$ e $n = 0,6962$, para as MESB-1 e MHSB-1, portanto no intervalo entre 0,43 e 0,86, indicando comportamento anômalo, ou seja, a liberação foi controlada por difusão e relaxamento das cadeias poliméricas para as micropartículas produzidas por ambos os métodos.

6. CONCLUSÃO

Método por emulsificação e evaporação de solvente

- ✓ Micropartículas produzidas com HPMCf apresentaram forma esférica, superfície lisa, diâmetro médio entre 12,52 e 17,52 μm e índice de polidispersão entre 0,598 e 0,812.
- ✓ Micropartículas produzidas com ERS apresentaram forma esférica com poros na superfície, diâmetro médio entre 19,98 e 25,02 μm e índice de polidispersão entre 0,709 e 0,889.
- ✓ Os valores de EE% encontrados para as micropartículas obtidas por emulsificação e evaporação do solvente ficaram entre 40,76 e 68,34%, sendo que a estrutura contendo 7,5 % de HPMCf, a MHEB-1, foi a capaz de microencapsular maior quantidade de budesonida.
- ✓ As micropartículas de budesonida por emulsificação e evaporação do solvente são de natureza não cristalina.
- ✓ A taxa de liberação da budesonida nas micropartículas por emulsificação e evaporação de solvente de ERS (MEEB-1) foi um pouco mais lenta em comparação as de HPMCf (MHEB-1). O modelo matemático mais adequado para a liberação da budesonida para ambas foi o de segunda ordem, sendo que ambas apresentaram mecanismo de liberação do fármaco por comportamento anômalo, ou seja, não Fickiana, governada pelos fenômenos de difusão e relaxamento das cadeias poliméricas.

Método por *spray-drying*

- ✓ Micropartículas produzidas com HPMCf apresentaram forma esférica, superfície lisa e depressões na parede, com aspecto de amassadas, diâmetro médio entre 0,51 e 1,44 μm e índice de polidispersão entre 0,422 e 0,611.
- ✓ Micropartículas produzidas com ERS apresentaram forma esférica com poros na superfície lembrando o aspecto de “donuts”, diâmetro médio entre 0,29 e 0,47 μm e índice de polidispersão entre 0,227 e 0,307.

Conclusão

- ✓ Os valores de EE% encontrados foram altos entre 81,66 e 103,31%, sendo que a estrutura contendo 7,5 % de ERS, a MESB-1, foi a capaz de microencapsular maior quantidade de budesonida.
- ✓ Método apresentou rendimentos do processo satisfatórios para a escala laboratorial.
- ✓ Micropartículas apresentaram resíduos cristalinos da budesonida que podem sugerir que ele encontra-se na superfície das estruturas.
- ✓ A taxa de liberação da budesonida nas micropartículas por *spray-drying* de ERS (MESB-1) foi ligeiramente mais lenta em comparação as de HPMCF (MHSB-1). O modelo matemático mais adequado para a liberação da budesonida nas MHSB-1 e MESB-1 foi o de segunda ordem. Para ambas as micropartículas o mecanismo de liberação da budesonida foi por comportamento anômalo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIBKIA, K.; JAVADZADEH, Y.; DASTMALCHI, S.; MOHAMMADI, G.; NIRI, F.K.; ALAEI-BEIRAMI, M. Naproxen–eudragit® RS100 nanoparticles: Preparation and physicochemical characterization. **Coll. Surf. B: Biointer.**, v. 83, p.155-159, 2011.

ANDRÉO FILHO, N.; OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **Infarma**, v. 09, p. 18-21, 1999.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.71, n.3, p.505-518, 2009.

ASHFORD, M.; FELL, J. T. Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration. **J. Drug Targeting**, v. 2, p. 241-258, 1994.

BANDZAR, S.; GUPTA, S.; PLATT, M.O. Crohn's disease: A review of treatment options and current research. **Cellular Immunology.**, v. 286, p. 45-52, 2013.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W.J. Crohn's disease. **The Lancet** , v. 380, p. 1590-1605, 2012.

BELOQUI, A.; COCO, R.; ALHOUAYEK, M.; SOLINÍS, M.A.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; MUCCIOLI, G.G.; PRÉAT, V. Budesonide-loaded nanostructured lipid carriers reduce inflammation in murine DSS-induced colitis. **Int. J. Pharm.**, v. 454, 775-783, 2013.

BHATT, H.; NAIK, B.; DHARAMSI, A. Solubility Enhancement of Budesonide and Statistical Optimization of Coating Variables for Targeted Drug Delivery. **J. Pharm.**, v. 2014, 13 p., 2014.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; MANDELLI, K.K.; PEREIRA, M.A.C.; FATURI, J.L. Opções terapêuticas para as doenças inflamatórias intestinais: revisão. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 23(3), p. 172-182, 2003.

BONACUCINA, G. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvent. **Int. J. Pharm.**, v. 282, p. 115–130, 2004.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n.º 899, de 29 de abril de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique:

preparation and characterization. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 264, p. 45-55, 2003.

BRUSCHI, M.L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. 318f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CARVALHO, F.C.; BRUSCHI, M.L.; EVANGELISTA, R.C.; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 46 (1), p.1-18, 2010.

CARVALHO, F.C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M.P.D. Plataformas Bio(Muco) Adesivas Poliméricas Baseadas em Nanotecnologia para Liberação Controlada de Fármacos - Propriedades, Metodologias e Aplicações. **Polímeros**, v. 24(2), p. 203-213, 2014.

CHANG, J.Y.; OH, Y-K.; KONG, H.S.; KIM, E.J.; JANGD, D.D.; NAMD, K.T.; KIMA, C-K. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. **J. Control. Rel.**, v. 82, p. 39-50, 2002.

CHAUD, M.V.; LIMA, A.C.; VILA, M.M.D.C.; PAGANELLI, M.O.; PAULA, F.C.; PEDREIRO, L.N.; GREMIÃO, M.P.D. Development and Evaluation of Praziquantel Solid Dispersions in Sodium Starch Glycolate. **Trop. J. Pharm. Res.**, v.12(2), p. 163-168, 2013.

CHENG, S. Y.; YUEN, M. C. W.; KAN, C. W.; CHEUK, L. K.; CHUI, C. H.; LAM, K. H. Cosmetic textiles with biological benefits: Gelatin microcapsules containing Vitamin C. **Int. J. Mol. Med.**, v. 24, p. 411-419, 2009.

CHIDAMBARAM, N., & SRIVATSAVA, A. K. Buccal drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 21(9), p. 1009-1036, 1995.

COLLETT, J.; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005. Cap. 20, p. 298-313.

COLLNOT, E-M.; ALI, H.; LEHR, C-M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed ntestinal mucosa **J. Control. Rel.**, v. 161, p. 235-246, 2012.

CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; LAASS, M.W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmun. Rev.**, v. 13, p. 463-466, 2014.

CORTESI, R., RAVANI, L.; MENEGATTI, E.; ESPOSITO, E.; RONCONI, F. Eudragit® Microparticles for the Release of Budesonide: A Comparative Study. **Indian J. Pharm. Sci.**, v.74(5), p. 415-421, 2012.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. T. Patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000.

CRCAREVSKA, M.S.; DODOV, M.G.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.68, p. 565-578, 2008.

DANESE, S.; SANS, M.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental Factors. **Autoimmun. Rev.**, v.3, p. 394-400, 2004.

DAS, K.M.; EASTWOOD, M.A.; MCMANUS, J.P.; SIRCUS, W. Adverse reactions during salicylazosulfapyridine therapy and the relation with drug metabolism and acetylator phenotype. **N. Engl. J Med.** v: 289, p. 491-495, 1973.

DE FRANCISCO, L. M. B.; CERQUETANI, J. A.; BRUSCHI, M. L. Development and characterization of gelatin and ethylcellulose microparticles designed as platforms to delivery fluoride. **Drug Dev Ind Pharm.** p. 1-7, 2012.

DÉO, S.C. **Desenvolvimento de sistema multiparticulado contendo péletes de mesalazina revestidos com derivado metacrílico.** 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DONBROW, M. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy.** 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1992, 360 p.

EDSBACKER, S.; ANDERSSON, T.; MCKEAGE, K.; GOA, KL. Pharmacokinetics of budesonide (Entocort EC) capsules for Crohn's disease. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 43(12):803-821, 2004.

ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 64, p. 557-570, 2012.

ESSA, S.; RABANEL, J. M.; HILDGEN, P. Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density. **Int. J. Pharm.**, v. 411, p. 178-187, 2011.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, v. 21, 2009.

FABIA, R.; WILLÉN, R.; ARRAJAB, A.; ANDERSSON, R.; AHRÉN, B.; BENGMARK, S. Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible experimental model for acute ulcerative colitis. **Eur. Surg. Res.**, v. 24 (4), p. 211-225, 1992.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, p.182–205, 1998.

FLORENCE, A. T.; ATWOOD, D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. 4th ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2006.

FREIRE, A.C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II - Tipos de sistemas utilizados. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 42(3),p. 337-355, 2006.

FREITAS, M.N.; MARCHETTI, J.M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **Inter. J. Pharm.**, v. 295, p. 201-211, 2005.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **J. Control. Release**, v. 102, p. 313-332, 2005.

FUNDUEANU, G.; CONSTANTIN, M.; BORTOLOTTI, F.; CORTESI, R.; ASCENZI, P.; MENEGATTI, E. Cellulose acetate butyrate–pH/thermosensitive polymer microcapsules containing aminated poly(vinyl alcohol) microspheres for oral administration of DNA. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 66, p.11-20, 2007.

GANGURDE, H.H.; CHORDIVA, M.A.; TAMIZHARASI, S.; SIVAKUMAR, T. Optimization of Budesonide pH Dependent Coated Pellets for Potential Colon Targeted Drug Delivery. **Insight Pharm. Sci.**, v. 3 (1), p. 1-13, 2013.

GAREKANI, H.A.; MOGHADDAM, Z.F.; SADEGHI, F. Organic solution versus aqueous dispersion of Eudragit RS in preparation of sustained release microparticles of theophylline using spray drying. **Coll. Surf. B: Biointer.**, v. 108, 374-379, 2013.

HAN, I-K.; KIM, Y.B.; KANG, H-S.; SUL, D.; JUNG, W-W.; CHO, H.J.; OH, Y-K. Thermosensitive and mucoadhesive delivery systems of mucosal vaccines. **Methods**, v. 38, 106-111, 2006.

HASSAN, A. S., SAPIN A., LAMPRECHT, A., EMOND E., EL GHAZOUANI, F., MAINCENT, P. Composite microparticles with in vivo reduction of the burst release effect. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**,v. 73, p. 337-344, 2009.

HANAUER, S.B.; FEAGAN, B.G.; LICHTENSTEIN, G.R., et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. **Lancet**, v. 359, p. 1541-1549, 2002.

HAZLEWOOD, G.S; REZAI, A.; BORMAN, M.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; SEOW, C.H.; KUENZIG, E.; TOMLINSON, G.; SIEGEL, C.A.; MELMED; G.Y.; KAPLAN G.G. Comparative Effectiveness of Immunosuppressants and

Biologics for Inducing and Maintaining Remission in Crohn's Disease: A Network Meta-analysis. **Gastroenterology**, v. 148, p. 344-354, 2015.

HERRMANN, J.; BODMEIER, R. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 45, p. 75-82, 1998.

<https://gi.jhsps.org/> acesso 06/05/2015.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **J. Pharm. Sci.**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

ICH (International Conference on the Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use) - **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.

JEGANATHAN, B.; PRAKYA, V. Interpolyelectrolyte Complexes of Eudragit[®] EPO with Hypromellose Acetate Succinate and Eudragit[®] EPO with Hypromellose Phthalate as Potential Carriers for Oral Controlled Drug Delivery. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.16(4), p.878-888, 2015.

JONES, D. S.; PEARCE, K. J. An investigation of the effects of some process variables on the microencapsulation of propranolol hydrochloride by the solvent evaporation method. **Int. J. Pharm.**, v. 118, p. 199-205, 1995.

JONES, D.S.; BRUSCHI, M.L.; DE FREITAS, O.; GREMIÃO, M.P.D.; LARA, E.H.G.; ANDREWS, G.P. Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and Carbopol 974P[®] designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. **Int. J. Pharm.**, 372, 49-58, 2009.

JOSTINS, L.; RIPKE, S.; WEERSMA, R.K.; DUERR, R.H.; MCGOVERN, D.P.; HUI, K.Y.; et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 491, p.119-1124, 2012.

JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, P. M.; SAKARKAR, S. N.; PRABHA, K. S.; RAMAIAH, P. S.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **J. Microencapsul.**, v. 27, n. 3, p. 187-197, 2010.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, p. 307-317, 2011.

KILPELÄINEN, M.; RIIKONEN, J.; VLASOVA, M. A.; HUOTARI, A.; LEHTO, V. P.; SALONEN, J.; HERZIG, K. H.; JÄRVINEN, K. In vivo delivery of a peptide, ghrelin antagonist, with mesoporous silicon microparticles. **J. Control. Release**, v. 137, p. 166-170, 2009.

KILPELÄINEN, M.; MÖNKÄRE, J.; VLASOVA, M. A.; RIIKONEN, J.; LEHTO, V-P.; SALONEN, J.; JÄRVINEN, K.; HERZIG, K-H. Nanostructured porous silicon microparticles enable sustained peptide (Melanotan II) delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 77, p. 20-25, 2011.

KIM, I.H.; PARK, J.H.; CHEONG, I.W.; KIM, J.H. Swelling and drug release behavior of tablets coated with aqueous hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP) nanoparticles. **J. Control. Rel.**, v.89, p. 225-233, 2003.

KLOTZ, U. The role of aminosalicylates at the beginning of the new millenium in the treatment of chronic inflammatory bowel disease, **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v.56, p.353-362, 2000.

KLOTZ, U.; SCHWAB, M. Topical delivery of therapeutics agents in the treatment of inflammatory bowel disease. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 57, p. 267-279, 2005.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KOUTROUBAKIS, I.; MANOUSOS, O.N.; MEUWISSEN, S.G.; PENA, A.S. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease, **Hepatogastroenterology**, v. 43, p. 381-393, 1996.

KRISHNAMACHARI, Y.; MADAN, P.; LIN, S. Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. **Int. J. Pharm.**, v. 338, p. 238-247, 2007.

KULKARNI, P. V.; KESHAVAYYA, J.; KULKARNI, V. H. Effect of method of preparation and process variables on controlled release of insoluble drug from chitosan microspheres. **Polym. Adv. Technol.**, v. 18, p. 814-821, 2007.

LAASS, M.W.; ROGGENBUCK, D.; CONRAD, K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. **Autoimmun. Rev.**, v. 13 p. 467-471, 2014.

LAKATOS, P.L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p. 6102-6108, 2006.

LAUTENSCHLÄGER, C.; SCHMIDT, C.; FISCHER, D.; STALLMACH, A. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 71, p. 58-76, 2014.

LEVESQUE, B. G.; KANE, S. V. Searching for the Delta: 5-Aminosalicylic Acid Therapy for Crohn's Disease. **Gastroenterol. Hepatol.**, v. 7(5), p. 295-301, 2011.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **Int. J. Pharm.**, v. 363, p. 26-39, 2008.

LLOYD G.R., CRAIG D.Q.M., SMITH A. A calorimetric investigation into the interaction between paracetamol and polyethylene glycol 4000 in physical mixes and solid dispersions. **Euro. J. Pharm. Biopharm.**, v. 48 (1), p. 59-65, 1999.

LOFTUS, E.V. JR Epidemiology of inflammatory bowel disease In: Nicholas J. Talley et al. **GI Epidemiology: Diseases and Clinical Methodology**. 2.ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, Ltd., 2014.

LOFTUS, E.V. JR; SANDBORN, W.J. Epidemiology of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin North Am.**, v. 31(1), p. 1-20, 2002.

LOFTUS, E.V. JR; SILVERSTEIN, M.D.; SANDBORN, W.J.; TREMAINE, W.J.; HARMSEN, W.S.; ZINSMEISTER, A.R. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940 -1993: incidence, prevalence, and survival. **Gut.**, v. 46, p. 336-343, 2000.

LUZZI, L.; PALMIERI, A. An overview of pharmaceutical applications. In: LIM, F. (Org.). **Biomedical applications of microencapsulation**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1985, cap. 1, 1-18p.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R.C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **Int. J. Pharm.**, v. 290, p. 137-144, 2005.

MARÍN-JIMÉNEZ, I.; PEÑA, A.S. Budesonide for ulcerative colitis. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, v. 98(5), p. 362-373, 2006.

MATSUMOTO, A.; MATSUKAWA, Y.; SUZUKI, T.; YOSHINO, H.; KOBAYASHI, M. The polymer-alloys method as a new preparation method of biodegradable microspheres: principle and application to cisplatinloaded microspheres. **J. Control. Release**, v.48, p. 19-27, 1997.

MOHAMED, A.; KIDIA, E.; BASIT, A.W. Spray-drying enteric polymers from aqueous solutions: A novel, economic, and environmentally friendly approach to produce pH-responsive microparticles. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 79, p. 432-439, 2011.

MOLODECKY, N.A; SOON, I.S.; RABI, D.M.; GHALI, W.A.; FERRIS, M.; CHERNOFF, G.; BENCHIMOL, E.I.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; BARKEMA, H.W.; KAPLAN, G.G. et al Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systemic review. **J. Gastroenterology**, v.142(1), p. 46-54, 2012.

MONTELEONE, G.; CARUSO, R.; PALLONE, F. Targets for new immunomodulation strategies in inflammatory bowel disease. **Autoimmun. Rev.**, v. 13, p. 11-14, 2014.

MURA, P.; BETTINETTI, G.P.; FAUCCIA, M.T.; MANDEROLIA, A.; PARRINIC, P.L. Differential scanning calorimetry in compatibility testing of picotamide with pharmaceutical excipients. **Thermochim. Acta.**, v. 321, p. 59-65, 1998.

NESSEEM, D. I.; EID, S. F.; EL-HOUSENY, S. S. Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. **Life Sci.**, v. 89, p. 430-438, 2011.

NG, S-M.; CHOI, J-Y.; HAN, H-S.; HUH, J-S.; LIM, J. O. Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: Hydrogen peroxide as a candidate compound. **Int. J. Pharm.**, v. 384, p. 120-127, 2010.

ORDÁS, I.; ECKMANN, L.; TALAMINI, M.; BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W.J. Ulcerative colitis. **The Lancet** , v. 380, p. 1606-1619, 2012.

PALMIERI, G.F.; MICHELINI, S.; DI MARTINO, P.; MARTERLLI, S. Polymers with pH-dependent solubility: Possibility of use in the formulation of gastroresistant and controlled-release matrix tablets. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.26(8): 837-845, 2000.

PATEL, V. M.; PRAJAPATI, B.G.; PATEL, M.M. Effect of Hydrophilic Polymers on Buccoadhesive Eudragit Patches of Propranolol Hydrochloride Using Factorial Design . **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 8 (2), Article 45, 2007.

PEREIRA, R.R.A. **Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivotermostensível contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal**, Maringá-PR. UEM, 2011. 172p. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, 2011.

PEREIRA, R.R.A.; BRUSCHI, M. L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.38(6): 643-652, 2012.

PEREIRA, R.R.A.; GODOY, J.S.R. ; SVIDZINSKI, T.I.S.; BRUSCHI, M.L. . Preparation and characterization of mucoadhesive thermoresponsive systems containing propolis for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **J. Pharm. Sci.**, v. 102, p. 1222-1234, 2013.

PERES, I; ROCHA, S.; GOMES, J.; MORAIS, S.; PEREIRA, M.C.; COELHO, M. Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles. **Carbohydr. Polym.**, v.86, p.147-153, 2011.

PÉREZ, M. H.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; ASTIER, A.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. **J. Control. Release**, v. 65, p. 429-438, 2000.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PIGNATELLO, R.; BUCOLO, C.; FERRARA, P.; MALTESE, A.; PULEO, A.; PUGLISI, G. Eudragit RS100[®] nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.16, p. 53-61, 2002.

POKROTNIEKS, J.; MARLICZ, K.; PARADOWSK, L.; MARGUS, B.; ZABOROWSKI, P.; GREINWALD, R. Efficacy and tolerability of mesalazine foam enema (Salofalk foam) for distal ulcerative colitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v. 14, p. 1191-1198, 2000.

PRANTERA, C.; RIZZI, M. 5-ASA in ulcerative colitis: Improving treatment compliance. **World J. Gastroenterol.**, v.15 (35), p. 4353-4355, 2009.

QUILICI, F.A.; MISZPUTEN, S.J. Introdução, História e Epidemiologi. In: TEIXEIRA, F.V.; KOTZE, P.G. **Retocolite Ulcerativa Inespecífica – Estado atual do tratamento no século XXI**. 1.ed. Rio de Janeiro: DOC, 2013.

RAFFIN, R.P.; JORNADA, D.S.; RÉ, M.I.; POLHMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Sodium pantoprazole-loaded enteric microparticles prepared by spray drying: Effect of the scale of production and process validation. **Int. J. Pharm.**, v.324(1), p. 10-18, 2006.

RASSU, G.; NIEDDU, M.; BOSIB, P.; TREVISI, P.; COLOMBO, M.; PRIORI, D.; MANCONI, P.; GIUNCHEDI, P.; GAVINI, E.; BOATTO, G. Encapsulation and modified-release of thymol from oral microparticles as adjuvant or substitute to current medications. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1627-1632, 2014.

RAVIKUMARA, N.R.; MADHUSUDHAN, B.; NAGARAJ, T.S.; HIREMAT, S. R.; RAINA, G. Preparation and Evaluation of Nimesulide-loaded Ethylcellulose and Methylcellulose Nanoparticles and Microparticles for Oral Delivery. **J. Biomater. Appl.**, v. 24, p. 47-64, 2009.

RODIER, E. A three step supercritical process to improve the dissolution rate of Eflucimibe. **Euro. J. Pharm. Sci.**, v.26 (2), p. 184-193, 2005.

RUBINSTEIN, A.; TIROSH, B.; BALUOM, M.; NASSAR, T.; DAVID, A.; RADAI, R.; GLIKO-KABIR, I.; FRIEDMAN, M. The rationale for peptide drug delivery to the colon and the potential of polymeric carriers as effective tools. **J. Control. Rel.**, v. 46, p. 59-73, 1997.

SANSONE, F.; MENCHERINI, T.; PICERNO, P.; D'AMORE, M.; AQUINO, R.P.; LAURO, M.R. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. **J. Food Eng.**, v. 105, p.468-476, 2011.

SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A.; PINHO, S.C.; SOUTO, E.B. Polímeros Sintéticos Biodegradáveis: Matérias-primas e Métodos de Produção de Micropartículas para uso em Drug Delivery e Liberação Controlada. **Polímeros**, v. 21 (4), p. 286-292, 2011.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 39 (1), p. 1-20, 2003.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K.P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Adv. Col. Inter. Sci.**, v. 223, p. 40-54, 2015.

SOUTO, E.B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M.H.A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – parte II **Polímeros**, v. 22 (1), p. 101-106, 2012.

SOUZA, M.H.L.P.; TRONCON, L.E.A.; RODRIGUES, C.M.; VIANA, C.F.G.; ONOFRE, P.H.C.; MONTEIRO, R.A.; PASSOS, A.D.C.; MARTINELLI, A.L.C.; MENEGHELLI, U. Evolução da ocorrência (1980-1999) da doença de Crohn e da retocolite ulcerativa idiopática e análise das suas características clínicas em um hospital universitário do sudeste do Brasil. **Arq. Gastroenterol.**, v. 39(2), p. 98-105, 2002.

STEED, K. P.; WILSON, C. G.; WASHINGTON, N. Drug delivery to the large intestine. In: WILSON, G.; WASHINGTON. **Physiological pharmaceutics: Biological Barriers to drug absorption**. N. ed. London: Ellis Horwood Limited, 1989.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes areas. **Health Environment J.**, v.7, n. 2, p. 12-20, 2006.

VARSHOSAZ, J.; AHMADI, F.; EMAMI, J.; TAVAKOLI, N.; MINAIYAN, M.; MAHZOUNI, P.; DORKOOSH, F. Microencapsulation of budesonide with dextran by spray drying technique for colon-targeted delivery: an *in vitro/in vivo* evaluation in induced colitis in rat. **J. Microencapsul.**, v. 28(1), p. 62-73, 2011.

VENKATESAN, P.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. **J. Pharm. Sci. Res.**, v. 1, n. 4, p. 26-35, 2009.

VICTORIA, C.R.; SASSAKI, L.Y.; NUNES, H.R.C. Incidence and Prevalence Rates of Inflammatory Bowel Diseases, in Midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol.**, v. 46(1), p. 20-25, 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WATTS, P. J.; ILLUM, L. Colonic drug delivery. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 23, p. 893-913, 1997.

ZALTMAN, C. Doença inflamatória intestinal: qual a relevância da doença no Brasil? **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23(5), p. 992-993, 2007.

YEHIA, S.A.; ELSHAFEEY, A.H.; SAYED, I.; SHEHATA, A.H. Optimization of Budesonide Compression-Coated Tablets for Colonic Delivery. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 10 (1), p. 147-157, 2009.

YOSHIDA, V.M.H.; OLIVEIRA JUNIOR, J.M.; GONÇALVES, M.M.; VILA, M.M.D.C.; CHAUD, M.V. Development and Evaluation of a Floating Multiparticulate Gastroretentive System for Modified Release of AZT. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 12 (2), p. 658-664, 2011.