



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



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**MICROESFERAS DE GOMA GELANA E PECTINA COMO POTENCIAL
ESTRATÉGIA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

Fabíola Garavello Prezotti

ARARAQUARA

2013

FABÍOLA GARAVELLO PREZOTTI

**MICROESFERAS DE GOMA GELANA E PECTINA COMO POTENCIAL
ESTRATÉGIA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista

Coorientadora: Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury

ARARAQUARA

2013

Ficha Catalográfica

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

Prezotti, Fabíola Garavello

P944m Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos / Fabíola Garavello Prezotti. – Araraquara, 2013

111 f.

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

Orientador: Raul Cesar Evangelista

1. Microesferas. 2. Goma gelana. 3. Pectina. 4. Geleificação ionotrópica. 5. Liberação controlada. I. Evangelista, Raul Cesar, orient.. II. Título.

Dedico este trabalho a meus pais, Sandra e Waldir,
e a meus orientadores, Raul e Beatriz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a meu anjo da guarda que sempre protege e ilumina meus caminhos.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, a quem tenho como símbolo de professor e profunda admiração por seu modo de ensinar. Agradeço a confiança depositada em mim, a oportunidade concedida para que minha carreira acadêmica se iniciasse e todo incentivo e carinho durante todos esses anos.

À minha querida coorientadora, Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury, em quem me espelho e a quem tenho como símbolo de pesquisadora. Agradeço a amizade, a confiança, os ensinamentos passados e toda ajuda prestada, que foram indispensáveis para que este trabalho fosse concluído com seriedade e qualidade.

À minha mãe Sandra, meu irmão Fábio e ao João Victor, que acompanharam minha trajetória, apoiando, dando conselhos e incentivando, e em especial a meu pai, Waldir, por incentivar o primeiro passo nessa trajetória. Agradeço também os demais familiares que apoiaram e sempre se preocuparam comigo.

Em especial à Profa. Dra Ana Dóris de Castro, grande incentivadora para que minha carreira acadêmica fosse iniciada, ainda no trabalho de conclusão de curso.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, agradeço a participação na banca de qualificação e toda confiança, incentivo, discussões e ensinamentos passados.

Aos docentes do Laboratório de Farmacotécnica, Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião e Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, agradeço a convivência e os conhecimentos transmitidos.

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

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, à Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa e à técnica Fátima, agradeço a colaboração e disponibilização de equipamentos do laboratório de Controle de Qualidade.

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

Ao Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro, do Instituto de Química, a disponibilização dos equipamentos para a realização das análises térmicas, e à sua aluna Mariana, o auxílio na realização das análises de TG e DSC.

Às técnicas do nosso laboratório, Margareth e Natália, por todo apoio e presteza em auxiliar-me no que fosse necessário.

A todas as funcionárias da secretaria de pós-graduação, agradeço toda atenção e auxílios prestados com tanta agilidade.

Agradeço, às agências de fomento FAPESP (processo 2011/16847-7) e CNPq, as bolsas concedidas, que diretamente propiciaram o desenvolvimento do projeto, e a CAPES, que indiretamente auxiliou na concretização do trabalho.

Aos amigos que aprendi a amar e se tornaram minha família em Araraquara, que tornaram as longas jornadas de trabalho menos árduas e muito mais alegres. A vocês eu digo: “Sozinhos vamos mais rápido, mas juntos vamos mais longe”.

Aos amigos da Turma 77 de Farmácia-Bioquímica da UNESP, em especial Giordano Tinucci Costa, Beatriz Rogatto e Laura R. C. de Moraes, que, com suas visitas à Morada do Sol e longas conversas, trouxeram alegria, esperança e a certeza de estar trilhando o caminho certo.

E a todos os amigos, que, mesmo estando em outros laboratórios, e mesmo nos encontrando pouco, não deixaram de estar presentes em minha vida. A todos vocês, deixo a seguinte mensagem de Machado de Assis:

“Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra e nem se vende, amigo a gente sente!”

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

A goma gelana e a pectina são polissacarídeos naturais que encontram diversas aplicações na área farmacêutica devido às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesividade. Além disso, ambos podem formar hidrogéis capazes de controlar a liberação de fármacos. A geleificação ionotrópica é uma técnica simples, que não utiliza solventes orgânicos tóxicos e com possibilidade de produção em escala industrial. O objetivo do presente trabalho foi a obtenção e a caracterização de microesferas de goma gelana e pectina através da geleificação ionotrópica com íons Al^{3+} para a liberação controlada de fármacos. Dispersões aquosas de misturas de gelana:pectina (1:1 e 4:1), em diferentes concentrações (2 e 4%), contendo cetoprofeno (0,5 ou 1%) como fármaco modelo foram obtidas pelo método de geleificação ionotrópica com cátion Al^{3+} (3% e 5%). As microesferas apresentaram forma esférica, com circularidade entre 0,730 e 0,849, e diâmetro médio entre 728,9 e 924,5 μm . A análise de morfologia de superfície revelou microesferas com superfície irregular e estrutura interna homogênea e pouco porosa. A técnica de obtenção se mostrou eficiente para o preparo das microesferas, com rendimento máximo de 92,76% e a máxima eficiência de encapsulação foi de 88,78%. As análises térmicas evidenciaram a presença de fármaco nas partículas, e comprovaram que as condições brandas utilizada na metodologia evitam a degradação dos componentes do sistema. Os dados de FTIR demonstraram a ausência de ligações químicas entre fármaco-polímero. O método de quantificação do fármaco mostrou-se seletivo, linear, preciso e exato. Os estudos de mucoadesão revelaram a elevada capacidade mucoadesiva das microesferas, e o processo de adsorção da mucina seguiu o modelo de Freundlich. A capacidade de absorção de líquidos determinada em dispositivo de Enslin adaptado evidenciou a grande capacidade de intumescimento das partículas, com comportamento pH independente. Já a avaliação do intumescimento e da erosão por método gravimétrico foi capaz de evidenciar o comportamento pH dependente, sendo que em pH 1,2 houve predomínio da erosão e em pH 7,4 predominou o intumescimento. O processo de liberação do fármaco apresentou comportamento pH dependente, com baixas taxas de liberação em pH ácido e aceleração da liberação com a passagem para o pH 7,4. O modelo de Korsmeyer – Peppas, o qual apresentou melhor correlação com os dados, indicou que a liberação do fármaco obedeceu ao transporte super caso II. Foi possível obter, de maneira eficiente, microesferas capazes de controlar a liberação do cetoprofeno.

PALAVRAS-CHAVE: microesferas, goma gelana, pectina, geleificação ionotrópica, liberação controlada.

ABSTRACT

Gellan gum and pectin are natural polysaccharides that find several applications in pharmaceutical field due to their biocompatibility, biodegradability and mucoadhesive characteristics. Besides, both can form hydrogels capable of controlling drug release. Ionotropic gelation is a simple technique, which does not use organic solvents, and have the possibility of industrial scale production. The aim of the present work was the preparation and characterization of gellan gum and pectin microspheres obtained by ionotropic gelation technique with Al^{3+} ions for drug controlled release. Aqueous dispersions of gellan gum:pectin mixtures (1:1; 4:1) at different concentrations (2 and 4%) containing ketoprofen (0.5 or 1.0%) were prepared and microspheres were obtained via ionotropic gelation method by dropping the dispersions into a solution of Al^{3+} (3% or 5%). Microspheres were spherical in shape, with circular degree between 0.730 and 0.849 and size range of 728.9 – 924.5 μm . The Scanning Electron Microscopy analysis showed irregular surfaces and homogeneous and little porous internal structure. The technique proved to be efficient for obtaining microspheres, with maximum percentage yield of 92.76% and maximum entrapment efficiency of 88.78%. Thermal analyses showed the presence of drug inside the particles, and evidenced that the mild conditions employed in this methodology prevent the degradation of components of the system. Fourier transform infrared spectroscopy data demonstrated the absence of chemical interactions between drug-polymer. The spectrophotometric method for ketoprofen quantification was specific, linear, precise and accurate. Mucoadhesion evaluation revealed the high mucoadhesive capacity of microspheres, and mucin adsorption followed the Freundlich model. The liquid uptake assessment using Enslin device showed the high uptake capacity of the particles, with pH-independent behavior. The evaluation of swelling and erosion by gravimetric method was able to evidence the pH-dependent behavior of these parameters, showing that in pH 1.2 there was predominance of erosion, and in pH 7.4 the swelling predominated. The drug release was pH-dependent, with low rates in acid media and high rates in pH 7.4. The Korsmeyer – Peppas model, that best fitted the data, indicated that drug release followed super case II transport. It was possible to obtain, efficiently, microspheres able to control the release of ketoprofen.

KEYWORDS: microspheres, gellan gum, pectin, ionotropic gelation, controlled release.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Classificação das micropartículas quanto à estrutura (adaptado de SILVA <i>et al.</i> (2003)).	22
Figura 2 – Representação esquemática para a reação de reticulação que ocorre durante a obtenção de micropartículas pelo método da geleificação ionotrópica.	27
Figura 3 – Estrutura da goma gelana deacilada com indicação dos sítios de ligação dos grupamentos acetil e gliceril da forma nativa (adaptado de MORRIS <i>et al.</i> (2012)).	30
Figura 4 – Mudanças na conformação das cadeias da goma gelana durante sua gelificação (adaptado de MIYOSHI <i>et al.</i> (1995)).	31
Figura 5 – Estrutura esquemática dos domínios da pectina (adaptado de TARZIA (2010)).	32
Figura 6 – Possíveis disposições dos domínios da pectina para formação da macromolécula. A) modelo em que regiões lisas e ramificadas se alternam e B) modelo proposto por Vincken e co-autores, em que domínios de HG são cadeias laterais de RG-I (adaptado de SCHOLS <i>et al.</i> (2009)).	34
Figura 7 – Estrutura química do cetoprofeno.	35
Figura 8 – Representação esquemática do processo de obtenção de microesferas de goma gelana e pectina através do método de geleificação ionotrópica.	40
Figura 9 – Dispositivo de Enslin adaptado para determinação da capacidade de absorção de líquidos.	46
Figura 10 – Esquema das diferentes morfologias das partículas após o gotejamento. A) Partículas esféricas da amostra 11H1-3; B) Partículas deformadas – 1% (m/v) de concentração polimérica e C) Partículas com cauda – proporção gelana:pectina 1:4.	51
Figura 11 – Microesferas após o processo de obtenção por geleificação ionotrópica. A) amostra 11H1-3 e B) amostra 11H0-3.	52
Figura 12 – Distribuição de tamanho de partícula para as microesferas de gelana:pectina	55
Figura 13 – Fotomicrografia evidenciando a superfície irregular característica das partículas (amostra 11L0,5-3; aumentos de 100 e 300x).	57
Figura 14 – Fotomicrografias de microesferas de gelana:pectina na proporção 1:1 e 2% de concentração polimérica (aumento de 100x).	58
Figura 15 – Fotomicrografias de microesferas de gelana:pectina na proporção 1:1 e 4% de concentração polimérica (aumento de 100x).	58
Figura 16 – Fotomicrografias de microesferas de gelana:pectina na proporção 4:1 e 2% de concentração polimérica (aumento de 100x).	59
Figura 17 – Fotomicrografias de microesferas de gelana:pectina na proporção 4:1 e 4% de concentração polimérica (aumento de 100x).	59
Figura 18 – Fotomicrografias evidenciando o interior de microesferas A) com fármaco e B) sem fármaco (aumentos de 100 e 1000x).	60
Figura 19 – Espectros de absorção na região do ultravioleta de cetoprofeno em A) HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; B) tampão fosfato pH 6,0 e C) tampão fosfato pH 7,4.	63

Figura 20 – Espectro de absorção na região do UV de misturas de gelana e pectina em A) HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; B) tampão fosfato pH 6,0 e C) tampão fosfato pH 7,4.	64
Figura 21 – Curvas analíticas da absorbância em função da concentração de cetoprofeno em A) HCl 0,1 N com 0,75% de tensoativo – pH 1,2; B) tampão fosfato pH 6,0 e C) tampão fosfato pH 7,4.....	65
Figura 22 – Curvas DSC obtidas para o cetoprofeno, a goma gelana e a pectina.	69
Figura 23 - Curvas DSC de microesferas de gelana:pectina.	70
Figura 24 – Curvas TG/DTG do cetoprofeno.....	71
Figura 25 – Curvas TG/DTG das microesferas de gelana:pectina.	72
Figura 26 – Espectros obtidos por FTIR. (1) comparação entre as amostras 11L0-3 e 11L0,5-3 e (2) comparação entre as amostras 41L0-3 e 41L0,5-3.	74
Figura 27 – Bandas características do cetoprofeno.	75
Figura 28 – Relação entre concentração de polímeros e circularidade das microesferas.....	77
Figura 29 – Relação entre a concentração de cetoprofeno e a eficiência de encapsulação das microesferas.	78
Figura 30 – Concentração de mucina adsorvida nas microesferas.	79
Figura 31 – Isotermas de adsorção da mucina nas diferentes microesferas avaliadas.	80
Figura 32 – Adsorção da mucina segundo os modelos teóricos de Langmuir e Freundlich.	81
Figura 33 – Isotermas de adsorção de Freundlich para mucina adsorvida nas diferentes microesferas.....	82
Figura 34 – Intumescimento das microesferas 11H1-3, 11H1-5, 41H1-3 e 41H1-5.....	84
Figura 35 – Erosão (%) das microesferas após exposição aos meios HCl 0,1N pH1,2 e tampão fosfato pH 7,4 (média ± DP; n=3).....	85
Figura 36 – Comportamento de erosão e intumescimento das microesferas após exposição aos meios com diferentes valores de pH.	86
Figura 37 – Perfis de liberação do CP a partir das microesferas em meios com diferentes valores de pH (entre 0 – 120 min em pH 1,2 e entre 120 – 360 min em pH 7,4).....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura e composição das microesferas obtidas pela técnica de geleificação ionotrópica, a partir dos polímeros goma gelana e pectina, em solução reticulante de cloreto de alumínio utilizando cetoprofeno como fármaco modelo.	41
Tabela 2 – Circularidade, diâmetro do círculo equivalente e índice <i>Span</i> das microesferas de goma gelana:pectina (média $\pm$ DP).	53
Tabela 3 – Rendimento (%) do processo de obtenção de microesferas.	61
Tabela 4 – Valores de Eficiência de Encapsulação (EE%) das microesferas (média $\pm$ DP).	61
Tabela 5 – Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.	66
Tabela 6 – Resultados obtidos para o teste de repetibilidade.	67
Tabela 7 – Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária.	67
Tabela 8 – Resultados obtidos para o teste de exatidão.	68
Tabela 9 – Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.	68
Tabela 10 – Resultados de % de líquido absorvido pelas microesferas nos diferentes meios analisados (HCl 0,1N pH 1,2; tampão fosfato pH 7,4 e pH 6,0) em t=90 min (média $\pm$ DP).	76
Tabela 11 – Parâmetros do modelo da isoterma de Freundlich obtidos a partir da regressão linear das curvas de $\log C_e$ vs $\log Q_e$	81
Tabela 12 – Solubilidade (mg/mL) do cetoprofeno em diferentes meios.	83
Tabela 13 – Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos nos diferentes meios (r^2 = coeficiente de determinação).	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C	Concentração média determinada experimentalmente
C ₀	Concentração teórica
COX	Ciclo-oxigenase
CP	Cetoprofeno
CV	Coeficiente de variação
D ₁₀	Diâmetro em µm determinado para o percentil 10
D ₅₀	Diâmetro em µm determinado para o percentil 50
D ₉₀	Diâmetro em µm determinado para o percentil 90
Dha	Ácido 3-deoxi-D-lixo-heptulosárico
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EE%	Eficiência de encapsulação em porcentagem
FTIR	Espectrometria no infravermelho por transformações de Fourier
HG	Homogalacturonana
IC	Coeficiente angular da curva analítica
Kdo	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-manooctulosônico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação ácida
Qt	Quantidade total de fármaco adicionada
Qq	Quantidade quantificada de fármaco
r	Coeficiente de correlação linear
r ²	Coeficiente de determinação
RG-I	Ramnogalacturonana I
RG-II	Ramnogalacturonana II
TGA	Termogravimetria
TGI	Trato gastrintestinal
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta – visível
XG	Xilogalacturonana

SUMÁRIO

1	Introdução.....	16
2	Fundamentação teórica.....	20
2.1	<i>Via oral e liberação controlada de fármacos</i>	<i>20</i>
2.2	<i>Micropartículas poliméricas</i>	<i>21</i>
2.2.1	Sistemas mucoadesivos	23
2.2.1.1	Mecanismo de mucoadesão: teorias	23
2.2.2	Técnicas de microencapsulação.....	25
2.3	<i>Polissacarídeos empregados na obtenção de micropartículas</i>	<i>28</i>
2.3.1	Estudos do grupo de pesquisa.....	28
2.3.2	Goma gelana	29
2.3.3	Pectina	32
2.4	<i>Cetoprofeno.....</i>	<i>34</i>
3	Objetivos.....	37
4	Materiais e Métodos.....	39
4.1	<i>Principais matérias-primas</i>	<i>39</i>
4.2	<i>Principais equipamentos.....</i>	<i>39</i>
4.3	<i>Obtenção das microesferas.....</i>	<i>40</i>
4.4	<i>Caracterização das microesferas.....</i>	<i>41</i>
4.4.1	Análise de tamanho e forma das partículas.....	41
4.4.2	Análise de morfologia de superfície e estrutura interna.....	42
4.4.3	Rendimento	42
4.4.4	Avaliação da eficiência de encapsulação	42
4.4.4.1	Validação de metodologia analítica para quantificação do cetoprofeno por espectrofotometria na região do ultravioleta	43
4.4.4.1.1	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do cetoprofeno na região do ultravioleta	43

4.4.4.1.2	<i>Especificidade / Seletividade</i>	43
4.4.4.1.3	<i>Linearidade</i>	43
4.4.4.1.4	<i>Precisão</i>	44
4.4.4.1.5	<i>Exatidão</i>	44
4.4.4.1.6	<i>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	44
4.4.5	<i>Análises térmicas</i>	44
4.4.5.1	<i>DSC</i>	45
4.4.5.2	<i>TG/DTG</i>	45
4.4.6	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	45
4.4.7	<i>Determinação da capacidade de absorção de líquidos</i>	45
4.5	<i>Seleção de amostras para estudos de mucoadesão e dissolução</i>	46
4.6	<i>Estudo da mucoadesividade das microesferas</i>	46
4.6.1	<i>Isotermas de adsorção da mucina</i>	47
4.7	<i>Estudo da liberação do fármaco</i>	48
4.7.1	<i>Avaliação da solubilidade do cetoprofeno</i>	48
4.7.2	<i>Avaliação do intumescimento e erosão</i>	48
4.7.3	<i>Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do cetoprofeno</i>	49
4.7.4	<i>Análise dos mecanismos de liberação do fármaco</i>	49
4.8	<i>Análise estatística dos resultados</i>	49
5	Resultados e Discussão	51
5.1	<i>Obtenção das microesferas</i>	51
5.2	<i>Caracterização das microesferas</i>	52
5.2.1	<i>Análise de tamanho e forma das partículas</i>	52
5.2.2	<i>Análise de morfologia de superfície e estrutura interna</i>	56
5.2.3	<i>Rendimento</i>	60
5.2.4	<i>Avaliação da eficiência de encapsulação</i>	61
5.2.4.1	<i>Validação de metodologia analítica para quantificação do cetoprofeno por espectrofotometria na região do ultravioleta</i>	62

5.2.4.1.1	<i>Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do cetoprofeno na região do ultravioleta</i>	62
5.2.4.1.2	<i>Especificidade/Seletividade</i>	63
5.2.4.1.3	<i>Linearidade</i>	65
5.2.4.1.4	<i>Precisão</i>	66
5.2.4.1.5	<i>Exatidão</i>	67
5.2.4.1.6	<i>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	68
5.2.5	<i>Análises térmicas</i>	68
5.2.5.1	<i>DSC</i>	68
5.2.5.2	<i>TG/DTG</i>	70
5.2.6	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	73
5.2.7	<i>Determinação da capacidade de absorção de líquidos</i>	76
5.3	<i>Seleção de amostras para estudos de mucoadesão e dissolução</i>	77
5.4	<i>Estudo da mucoadesividade in vitro</i>	78
5.4.1	<i>Isotermas de adsorção da mucina</i>	80
5.5	<i>Estudo da liberação do fármaco</i>	82
5.5.1	<i>Avaliação da solubilidade do cetoprofeno</i>	82
5.5.2	<i>Avaliação do intumescimento e erosão</i>	83
5.5.3	<i>Determinação do perfil de liberação in vitro do fármaco</i>	86
5.5.4	<i>Análise dos mecanismos de liberação do fármaco</i>	88
6	Conclusões	92

1 INTRODUÇÃO

Por ser considerada uma via natural para a administração de fármacos, a via oral é facilmente aceita pelos pacientes e ainda é uma das mais utilizadas na terapêutica. Apresenta diversas vantagens como comodidade, esquema terapêutico mais simples e totalmente sob o controle do paciente, posologia flexível, facilidade de administração e evita o sofrimento provocado pelas injeções das vias parenterais, além de ser econômica, pois não requer condições de esterilidade na linha de produção (FASANO, 1998; KHAFAGY *et al.*, 2007; PINTO, 2010; ISHA *et al.*, 2012). No entanto, diferenças fisiológicas provocam grande variabilidade nas respostas aos tratamentos que utilizam formas farmacêuticas convencionais administradas por essa via. Por isso, atualmente o desenvolvimento de sistemas capazes de liberar o fármaco em um sítio ou órgão específico e de maneira controlada tem sido alvo de inúmeras pesquisas (LUCINDA-SILVA e EVANGELISTA, 2003; SINHA *et al.*, 2004; FRIEND, 2005; OLIVEIRA e CAVALCANTI, 2007; PINTO, 2010; SAHASATHIAN *et al.*, 2010; FERRARI *et al.*, 2012; MOEBUS *et al.*, 2012).

Formas farmacêuticas de liberação convencional são aquelas em que o sistema não é delineado para exercer o efetivo controle da liberação do fármaco, e, assim, o princípio ativo tende a ser mais rapidamente liberado e absorvido pelo organismo, dependendo das suas características de solubilidade e permeabilidade, diferentemente daquelas de liberação modificada são delineadas para vetorizar e/ou liberar o fármaco gradualmente em um determinado sítio (ANSEL *et al.*, 2000; PEZZINI *et al.*, 2007). Com a liberação controlada sítio-específica, o fármaco é veiculado até seu local de ação ou absorção, o que melhora a resposta terapêutica, tornando o tratamento mais eficiente (OLIVEIRA e CAVALCANTI, 2007). Ainda, é possível administrar doses menores, diminuir as flutuações da concentração plasmática e, conseqüentemente, o risco de se atingir níveis tóxicos ou subterapêuticos. Além disso, formas farmacêuticas de liberação prolongada evitam várias administrações diárias, o que aumenta a adesão do paciente e o sucesso da terapêutica (PEZZINI *et al.*, 2007; ISHA *et al.*, 2012).

O uso de polímeros naturais hidrofílicos como a goma gelana e a pectina tem sido alvo de diversas pesquisas para o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos, já que esses polissacarídeos são passíveis de sofrer modificações químicas e/ou bioquímicas e apresentam, na maioria das vezes, ampla variedade de estruturas, elevada estabilidade, boas propriedades de geleificação, biocompatibilidade, atoxicidade e mucoadesividade (FRIEND, 2005; ORLU *et al.*, 2006); além de formarem géis que agem como uma barreira controladora da taxa de liberação de fármacos (ONOFRE *et al.*, 2009).

A goma gelana é um exopolissacarídeo obtido através do processo de fermentação aeróbia pelo microorganismo *Sphingomonas elodea* (GIAVASIS *et al.*, 2000). Por ser um polímero hidrofílico aniônico apresenta importantes propriedades mucoadesivas (LEE *et al.*, 2000; SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005; NARKAR *et al.*, 2010); é capaz de formar microesferas de hidrogel na presença de cátions divalentes e seu emprego na obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos tem despertado particular interesse (AGNIHOTRI *et al.*, 2006; PATIL *et al.*, 2006; RAJINIKANTH e MISHRA, 2007; BABU *et al.*, 2010).

A pectina é um polissacarídeo constituinte da parede celular de diversos vegetais (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2010), amplamente empregada como excipiente na obtenção de sistemas de liberação cólon-específica, uma vez que permanece como agregados de macromoléculas no ambiente ácido do estômago, não sendo digerida por proteases e amilases ali presentes, e é degradada por enzimas produzidas pela microbiota colônica (SINHA e KUMRIA, 2001b; a; VANDAMME *et al.*, 2002).

As formas farmacêuticas multiparticuladas, como as microesferas, apresentam importantes vantagens em relação às monolíticas, como tempo de esvaziamento gástrico mais previsível e menos dependente do estado prandial (ZERBINI, 2010), e distribuição mais ampla e uniforme sobre a superfície do TGI, o que promove uma absorção mais regular e diminui o risco de irritação causada por acúmulo localizado de fármacos irritantes às mucosas (MAESTRELLI *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2010; ZERBINI, 2010; KULKARNI *et al.*, 2011; MAITI *et al.*, 2011).

Microesferas obtidas a partir de polímeros mucoadesivos possuem a capacidade de aderirem a diversas mucosas, como a nasal, vaginal, retal e a oral, e, seu emprego como sistemas de liberação controlada de fármacos agrega importantes vantagens como a vetorização e a ação localizada de fármacos, maior tempo de residência do sistema no órgão alvo, liberação prolongada do fármaco, aumento da biodisponibilidade, redução na frequência de administração com consequente aumento da adesão do paciente ao tratamento (HÄGERSTRÖM *et al.*, 2000; VASIR *et al.*, 2003; EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005).

A microencapsulação é uma das técnicas capazes de modificar e controlar a liberação de fármacos (KHAN *et al.*, 2010). Dependendo dos materiais utilizados em sua obtenção, as microesferas podem liberar o fármaco em um sítio específico e ainda protegê-lo de condições adversas encontradas durante o trânsito no TGI, como o pH ácido do estômago ou a presença de enzimas que podem inativá-lo antes de desempenhar o efeito terapêutico (TRAN *et al.*, 2011).

Existem vários métodos de microencapsulação, como, por exemplo, emulsificação-evaporação do solvente, coacervação, geleificação ionotrópica, polimerização, *spray-drying*, leito fluidizado, dentre outros. A escolha do método mais adequado deve levar em consideração o tipo

de fármaco que se deseja encapsular, o mecanismo de liberação desejado e a aplicação pretendida (SUAVE *et al.*, 2009).

A geleificação ionotrópica baseia-se na complexação entre polieletrólitos e íons de carga contrária, que ao entrarem em contato sofrem reticulação iônica. A formação de ligações cruzadas intra e intermoléculas dá origem aos hidrogéis, que são redes tridimensionais hidrofílicas capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (PATIL *et al.*, 2010; KEAWCHAOON e YOKSAN, 2011). A obtenção de microesferas por geleificação ionotrópica pode ser feita através de duas técnicas, gotejamento utilizando-se seringa ou por atomização ou *air atomization* (BULMER *et al.*, 2012). A não utilização de solventes orgânicos tóxicos é uma grande vantagem deste método de obtenção, que permite o desenvolvimento de produtos em ambientes não poluentes, também chamados de *eco friendly* (PATIL *et al.*, 2012).

As propriedades do gel formado dependem, dentre outros fatores, do tipo de cátion que se utiliza no processo de geleificação, MORITAKA *et al.* (1991) mostraram que para formar géis de gelatina reticulados de mesmo módulo de armazenamento (G') é preciso empregar maiores concentrações de cátions monovalentes se comparados com cátions divalentes. Do mesmo modo, em estudo com géis de goma gelatina, TANG *et al.* (1996) demonstraram que a maior valência dos cátions pode ser mais eficiente no processo de reticulação, pois ocorre uma interação direta poliânion-cátion-poliânion. REDDY e TAMMISHETTI (2002), em estudo com carboximetil guar, relataram que o Al^{3+} , devido a sua valência mais elevada que a do Ca^{2+} , promoveu uma reticulação mais rápida, além de uma maior capacidade de incorporação de soroalbumina bovina, permitindo um tempo de liberação mais prolongado, o que demonstra a eficiência do íon alumínio como agente reticulante.

O cetoprofeno (CP) é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, sendo muito utilizado no tratamento de dores e artrites (MORETTI *et al.*, 2001). O mecanismo de ação do CP baseia-se na inibição não seletiva das isoformas I e II da enzima ciclo-oxigenase (VANE e BOTTING, 1998). Por possuir meia-vida biológica muito curta, tem sido veiculado em formas farmacêuticas de liberação controlada e escolhido como fármaco modelo adequado para investigação de formulações de sistemas para liberação controlada de fármacos (YAMADA *et al.*, 2001).

No presente trabalho, microesferas de goma gelatina e pectina obtidas por geleificação ionotrópica através da reticulação com o cátion Al^{3+} foram desenvolvidas e caracterizadas. O cetoprofeno foi utilizado como fármaco modelo para avaliar o desempenho das microesferas como sistema de liberação controlada de fármacos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Via oral e liberação controlada de fármacos

Dentre as diversas vias de administração de fármacos, a via oral é ainda a mais utilizada e preferida, apresentando diversas vantagens como comodidade e adesão do paciente ao tratamento, esquema terapêutico mais simples e totalmente sob o controle do usuário, posologia flexível e facilidade de administração. Além disso, elimina o sofrimento provocado pelas injeções das vias parenterais, e representa uma via relativamente econômica, pois não requer condições de esterilidade na linha de produção (FASANO, 1998; SASTRY *et al.*, 2000; CHOURASIA e JAIN, 2003; KHAFAGY *et al.*, 2007; PINTO, 2010; ISHA *et al.*, 2012).

Apesar dos evidentes benefícios, a absorção sistêmica de fármacos a partir dessa via de administração apresenta alguns problemas relacionados às barreiras impostas pelo TGI, como a diversidade de pH, tempo de trânsito, espessura da camada de muco e conteúdo enzimático encontrados nas suas diferentes porções. Além disso, o próprio epitélio que reveste todo o TGI representa uma barreira física e bioquímica à entrada das moléculas de fármacos (HUNTER *et al.*, 2012; GAMBOA e LEONG, 2013; RENUKUNTLA *et al.*, 2013).

Outros problemas associados à liberação oral são a distribuição irregular do fármaco pelo organismo, a baixa especificidade e a necessidade de doses elevadas para se conseguir a concentração local requerida, o que pode provocar efeitos adversos. Porém, tais dificuldades podem ser superadas com o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada capazes de vetorizar o fármaco a um sítio específico (GREGORIADIS, 1981; TORCHILIN, 2000).

O termo liberação controlada é utilizado para sistemas capazes de controlar tanto a quantidade quanto a velocidade de liberação do fármaco veiculado (HAAN e LERK, 1984; SANTUS e BAKER, 2003). Os primeiros produtos que chegaram ao mercado farmacêutico com esta tecnologia foram na década de 1950 e continham fármacos antigripais. Eram designados como medicamentos de longa duração, pois foram delineados para liberar o agente ativo de maneira controlada e lenta, utilizando materiais de revestimento capazes de retardar a dissolução da forma farmacêutica (SANTUS e BAKER, 2003), diferentemente das formas convencionais existentes, que liberavam seu conteúdo rápida e prontamente (PEZZINI *et al.*, 2007).

Desde então, diversos sistemas de liberação controlada para os mais diferentes tipos de fármacos foram desenvolvidos, como lipossomas (CROSASSO *et al.*, 2000), nanopartículas lipídicas sólidas (JAIN *et al.*, 2013), cristais líquidos (NEGRINI e MEZZENGA, 2011), dentre outros, com grande destaque para os sistemas poliméricos baseados em hidrogéis como

microesferas (MAITI *et al.*, 2011) e microcápsulas (SAH *et al.*, 1995), sistemas matriciais (TIWARI *et al.*, 2003), *pellets* (FERRARI *et al.*, 2012) sistemas flutuantes (MALAKAR *et al.*, 2012), dentre outros, muitos dos quais podem ser empregados para a liberação oral de macromoléculas (MORISHITA e PEPPAS, 2006; CARVALHO *et al.*, 2010).

Além de controlar a quantidade e a taxa de liberação de um fármaco, pode-se ainda desenvolver sistemas de liberação sítio-específica, com o intuito de melhorar sua biodisponibilidade, diminuir efeitos adversos e aumentar a adesão do paciente ao tratamento (SASTRY *et al.*, 2000). De modo geral, a vetorização de um fármaco é sua liberação seletiva e em quantidade satisfatória em um órgão ou tecido alvo, no qual o fármaco irá desempenhar seu efeito farmacológico ou será melhor absorvido para exercer um efeito sistêmico, e independe da via de administração escolhida (TORCHILIN, 2000).

Utilizando tal estratégia, é possível maximizar a concentração de fármaco na região afetada pela doença e minimizá-la em outros locais que não o de escolha para o tratamento, o que pode prevenir efeitos adversos. Além do mais, a dose administrada, que em sistemas convencionais deve ser elevada para se produzir efeito terapêutico, diminui e, com isso, o custo da terapia é reduzido (TORCHILIN, 2002).

Ao desenvolver um sistema de liberação oral sítio-específica, três características importantes devem ser consideradas para que sua ação seja ideal: 1) manter a integridade do fármaco durante o trânsito pelo TGI até seu sítio de absorção; 2) liberar o fármaco no sítio alvo e 3) o sistema deve permanecer por tempo suficiente no sítio alvo para garantir a absorção do fármaco, e manter-se ali por interações específicas, para que não seja facilmente eliminado (RENUKUNTLA *et al.*, 2013).

2.2 Micropartículas poliméricas

O termo geral micropartícula é utilizado para sistemas da ordem de tamanho micro e pode ser subdividido quanto à sua estrutura em microesferas e microcápsulas (COUVREUR e PUISIEUX, 1993; SUAVE *et al.*, 2009).

Microesferas são partículas de formato esférico, que formam sistemas matriciais ou monolíticos, nas quais o fármaco encontra-se dissolvido ou disperso através da matriz polimérica. Já as microcápsulas são sistemas do tipo reservatório, nos quais o fármaco está encapsulado e circundado por polímeros, que constituem a membrana da cápsula com espessura variável (COUVREUR e PUISIEUX, 1993; SILVA *et al.*, 2003; SUAVE *et al.*, 2009).

Se o fármaco estiver no estado molecular, ou seja, dissolvido na matriz polimérica, a microesfera é dita homogênea, se estiver disperso, esta será heterogênea (SILVA *et al.*, 2003). Nas microcápsulas, o fármaco pode formar um ou vários núcleos, podendo ser classificadas como mono ou polinucleares, respectivamente (Figura 1) (SILVA *et al.*, 2003), sendo que o fármaco pode estar incorporado na forma molecular ou em agregados, nos estados amorfo, cristalino ou mesmo líquido. Estas estruturas morfológicas podem ocorrer simultaneamente, por exemplo, a maior parte do fármaco pode formar o núcleo e ser envolvido pelo polímero, porém algumas moléculas podem dispersar separadamente ou então podem ser adsorvidas na superfície do polímero. Assim, torna-se difícil a distinção morfológica entre microesferas e microcápsulas polinucleares que contém o fármaco dividido em diversos núcleos pequenos (OKADA, 1997).

Figura 1- Classificação das micropartículas quanto à estrutura (adaptado de SILVA *et al.* (2003)).



O emprego de formas farmacêuticas multiparticuladas, como as microesferas, apresenta importantes vantagens em relação às formas monolíticas, como, por exemplo, o tempo de trânsito gastrointestinal mais previsível e reprodutível devido ao pequeno tamanho que apresentam (MAESTRELLI *et al.*, 2008). Partículas de até 2 mm são capazes de passar livremente através do piloro, comportando-se como líquidos e, dessa forma, o esvaziamento gástrico fica menos dependente do estado prandial (MAESTRELLI *et al.*, 2008; ZERBINI, 2010).

As micropartículas também podem se distribuir por uma área maior do TGI e de maneira mais uniforme, o que promove uma absorção mais regular e diminui o risco de irritação causada por acúmulo localizado de fármacos irritantes às mucosas (ZHANG *et al.*, 2002; MAESTRELLI *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2010; ZERBINI, 2010; KULKARNI *et al.*, 2011; MAITI *et al.*, 2011)

Além de melhorar as propriedades de transporte, a administração de fármacos em micropartículas pode trazer outros benefícios, como controlar a exposição do fármaco aos diferentes ambientes do TGI, protegendo-o da destruição em outros sítios que não o de ação, resultando em uma melhor estabilidade. Por outro lado, a encapsulação do fármaco também pode evitar possíveis efeitos tóxicos e inflamações das mucosas (CELLESI *et al.*, 2004).

Ainda, a liberação pode ser controlada pela degradação específica dos materiais que constituem as micropartículas, permitindo delinear perfis de liberação conforme desejado e

vetorizar o agente ativo a um tecido ou órgão alvo, o que é muito importante para otimizar o efeito terapêutico e reduzir efeitos adversos (CELLESI *et al.*, 2004; FREIBERG e ZHU, 2004; GAMBOA e LEONG, 2013).

2.2.1 Sistemas mucoadesivos

Apesar do longo histórico do uso de sistemas de liberação modificada de fármacos, cujo início data de 1950 (SANTUS e BAKER, 2003), o conceito de mucoadesividade e a aplicação de polímeros bioadesivos como estratégia para melhorar a absorção de fármacos são mais recentes, introduzidos na década de 1980 (PARK e ROBINSON, 1984; VASIR *et al.*, 2003; EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005).

A grande atenção voltada aos polímeros naturais hidrofílicos, devido à sua característica de atoxicidade e ampla disponibilidade aliada a baixo custo (MAIOR *et al.*, 2008), levou ao desenvolvimento de diversos sistemas bioadesivos para a liberação controlada de fármacos, como comprimidos revestidos (LLABOT *et al.*, 2002), lipossomas revestidos (TAKEUCHI *et al.*, 2003; THIRAWONG *et al.*, 2008b), pellets (BAUTZOVÁ *et al.*, 2012), micro e nanopartículas (KRIWET *et al.*, 1998; LIM *et al.*, 2000; DHAWAN *et al.*, 2004; NAYAK *et al.*, 2013), dentre outros, para administração pelas mais variadas vias, como a oral, a nasal, a ocular, a bucal, a vaginal e a retal (HÄGERSTRÖM *et al.*, 2000).

Os sistemas mucoadesivos apresentam particular capacidade de aderir à camada de muco que recobre as mucosas do TGI. Eles podem permanecer por um período maior e em contato mais efetivo com o sítio de absorção do fármaco, o que pode melhorar a biodisponibilidade, principalmente para moléculas de elevado peso molecular e altamente hidrofílicas, que geralmente são pouco absorvidas. A melhora na absorção também se deve ao fato de que o gradiente de concentração no local onde o sistema permanece aderido é aumentado (HÄGERSTRÖM *et al.*, 2000; MORISHITA e PEPPAS, 2006).

A mucoadesão é uma característica importante para os sistemas multiparticulados, que deve evitar sua eliminação em função do tempo de trânsito ao longo do TGI, permitindo um tempo de contato mais prolongado com sítio de absorção (GAMBOA e LEONG, 2013).

2.2.1.1 Mecanismo de mucoadesão: teorias

O termo bioadesão é um termo geral que se refere à ligação entre uma macromolécula qualquer (biológica ou sintética) e um tecido biológico. A adesão pode envolver tanto a camada de células epiteliais quanto a camada de muco que as recobre. Se a ligação envolve o muco,

utiliza-se o termo mucoadesão (GU *et al.*, 1988; VASIR *et al.*, 2003; SMART, 2005; MORALES e MCCONVILLE, 2011).

O muco é uma secreção viscosa, com características de gel, que recobre as células epiteliais de diversos órgãos, como os do TGI, com a finalidade de protegê-las de possíveis agressões e manter a homeostase, além de conferir lubrificação. É produzido pelas células caliciformes do epitélio e sua composição é complexa e dependente do local onde é encontrado, sendo constituído principalmente de glicoproteínas, água, lipídios, sais, fragmentos celulares, enzimas, podendo também conter produtos bacterianos (SCHACHTER e WILLIAMS, 1982; KHANVILKAR *et al.*, 2001)

A mucina, principal constituinte do muco, é uma glicoproteína, ou seja, possui em sua estrutura cadeias de oligossacarídeos ligadas covalentemente à cadeia polipeptídica (PEREZ-VILAR e HILL, 2004). A cadeia proteica é grande, representando de 10 a 30% do peso total da mucina, e constituída de repetidas sequências ricas em serina, treonina e prolina. Os oligossacarídeos, cujos tamanhos variam de 2 a 15 açúcares, são ligados através de ligações do tipo O-glicosídica e na maioria das vezes essas cadeias laterais possuem ácido siálico, ácido sulfônico ou L-frutose como terminações, permanecendo negativamente carregadas em pH fisiológico (GANDHI e ROBINSON, 1994; KHANVILKAR *et al.*, 2001; SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005).

Os polímeros mucoadesivos são capazes de interagir com a mucina através de um processo muito complexo de adesão, para o qual diversas teorias foram formuladas na tentativa de explicar os mecanismos envolvidos. Essas teorias são adaptações das teorias que explicam a adesão de materiais não farmacêuticos, como tintas e adesivos, propostas anteriormente ao surgimento das formas farmacêuticas mucoadesivas (EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005). Isoladamente, as teorias mais utilizadas, que são a da adsorção, a da difusão e a eletrônica, não são capazes de explicar o fenômeno de mucoadesão, portanto muitas vezes são utilizadas em conjunto para entender o mecanismo complexo da interação com o muco (EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005).

DUCHÊNE *et al.* (1988) propuseram pela primeira vez um mecanismo de três estágios para elucidar a mucoadesão. No primeiro estágio, ocorre um íntimo contato entre o polímero bioadesivo e a superfície biológica, seguido da interpenetração das cadeias poliméricas com as da mucina e, por fim, a possível formação de ligações químicas fracas entre elas, sendo que o primeiro estágio só é possível devido à capacidade de intumescimento do polímero ou à existência de líquido no muco (DUCHÊNE *et al.*, 1988; SRIAMORNSAK *et al.*, 2010).

Na teoria da adsorção, a mucoadesão pode ser explicada através da formação de ligações químicas secundárias entre o polímero bioadesivo e o muco, tais como ligações de Van der Waals,

ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Polímeros com grupamentos carboxílicos realizam ligações de hidrogênio, sendo esta a principal força que mantém a adesão. Já a interação hidrofóbica explica a mucoadesão de substratos hidrofóbicos, que muitas vezes podem aderir mais fortemente que os hidrofílicos (LEE *et al.*, 2000; VASIR *et al.*, 2003; EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005).

A teoria da difusão baseia-se na interpenetração entre as cadeias do polímero bioadesivo e as cadeias de mucina. Esta interdifusão na interface de contato atinge certa profundidade entre eles que é capaz mantê-los aderidos através da formação de uma ligação semipermanente. A taxa de penetração depende de diversos fatores, como a mobilidade das cadeias, a flexibilidade do polímero, os coeficientes de difusão de ambos, que por sua vez é dependente do peso molecular, da densidade de reticulação e do comportamento das redes quando estas estão expandidas (LEE *et al.*, 2000; VASIR *et al.*, 2003; EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005).

Já a teoria eletrônica explica a mucoadesão através da atração eletrostática entre o polímero bioadesivo e a mucina, devido à presença de cargas elétricas de sinais opostos. Ao entrarem em contato, forma-se uma bicamada elétrica na interface, sendo a adesão uma consequência das forças atrativas nesta bicamada (LEE *et al.*, 2000; VASIR *et al.*, 2003; EDSMAN e HÄGERSTRÖM, 2005).

2.2.2 Técnicas de microencapsulação

O início das pesquisas de microencapsulação data da década de 1930, mas o primeiro produto comercial lançado empregando microcápsulas foi o papel de cópia sem carbono, e só ocorreu em 1954. Através da coacervação, Barret Green desenvolveu microcápsulas sólidas de gelatina contendo tinta incolor dissolvida. As costas do papel recebiam uma fina camada deste material e ao pressionar a caneta durante a escrita essas esferas se rompiam, liberando a tinta, que reagia com o revestimento ácido da frente das demais vias mudando de cor em função do pH, originando assim a cópia (FANGER, 1974).

A microencapsulação pode ser aplicada em diversas áreas, como para a encapsulação de agrotóxicos (MOGUL *et al.*, 1996), na área alimentícia para a liberação controlada de ingredientes como vitaminas e minerais (SCHROOYEN *et al.*, 2001); em cosméticos e mesmo na área têxtil (NELSON, 2002; SUAVE *et al.*, 2009). Na área farmacêutica, as primeiras pesquisas surgiram na década de 1950 (SUAVE *et al.*, 2009). Desde então, micropartículas biodegradáveis têm sido amplamente estudadas para a liberação controlada de fármacos com o intuito de melhorar os efeitos terapêuticos e diminuir os efeitos adversos (OKADA, 1997) sendo que diversas técnicas de

obtenção já estão descritas na literatura (BODMEIER e CHEN, 1988; YEH *et al.*, 1995; DE KRUIF *et al.*, 2004).

As mais usuais são por separação de fases ou coacervação, emulsificação-evaporação do solvente, *spray drying* e geleificação ionotrópica.

A coacervação é uma das técnicas mais antigas e comumente utilizadas na obtenção de micropartículas. O termo coacervação designa a agregação de macromoléculas, como os polímeros, que dá origem a duas fases líquidas imiscíveis: uma delas rica em colóides, (coacervado) e a outra pobre em colóides (sobrenadante) (VANDEGAER, 1974; SILVA *et al.*, 2003; SUAVE *et al.*, 2009), de modo que esta técnica também é denominada por separação de fases. A coacervação pode ser dividida em dois tipos, simples, quando apenas um polímero faz parte do processo, ou complexa, quando duas ou mais macromoléculas de cargas opostas participam da reação (SILVA *et al.*, 2003; DE KRUIF *et al.*, 2004).

Na técnica da emulsificação-evaporação do solvente, o fármaco é dissolvido ou disperso na fase que contém o polímero em um solvente orgânico, e então esta é emulsionada em uma fase externa, aquosa ou oleosa. Com isso, pequenas gotículas são formadas. O solvente orgânico é então removido por evaporação e o fármaco e o polímero precipitam dando origem às microesferas, que são posteriormente filtradas e secas (O'DONNELL e MCGINITY, 1997). Apesar de muito explorada, esta técnica possui o inconveniente de utilizar solventes orgânicos tóxicos.

Já a obtenção de micropartícula por *spray-drying* é um método físico, no qual um polímero que dará origem à partícula é hidratado juntamente com o fármaco, e a mistura é atomizada através de um orifício do *spray-dryer* em uma corrente de ar quente que seca o material, originando as partículas. Uma das grandes vantagens desta técnica é a possibilidade de obtenção contínua e em grandes quantidades, sendo possível a formação de microcápsulas e microesferas, dependendo da forma em que o fármaco encontra-se na solução polimérica, disperso ou dissolvido (YEO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2003).

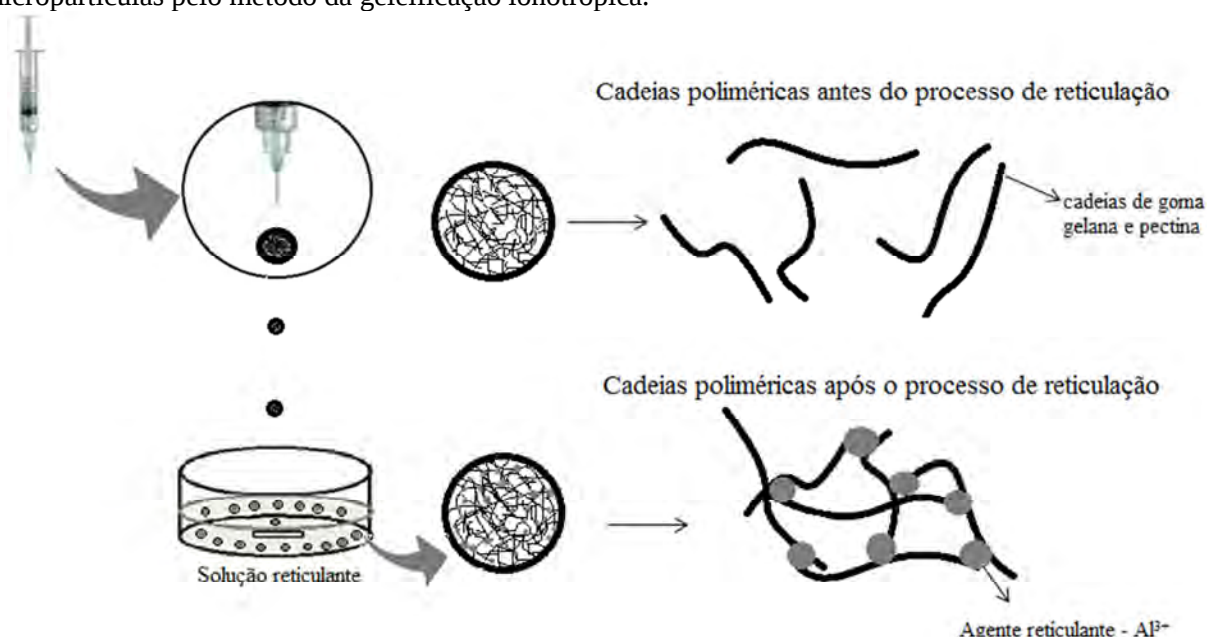
A técnica de geleificação ionotrópica permite a encapsulação dos mais diversos materiais, como células, fármacos, enzimas, dentre outros (READ *et al.*, 2001; BETIGERI e NEAU, 2002; MAITI *et al.*, 2011). Este método baseia-se na habilidade dos polímeros hidrofílicos carregados positiva ou negativamente interagirem com moléculas de cargas opostas dando origem a redes tridimensionais reticuladas (BODMEIER *et al.*, 1989).

Na geleificação ionotrópica, as micropartículas são obtidas pela extrusão da dispersão polimérica contendo o fármaco, ou outro material a ser encapsulado, sobre a solução do agente reticulante, podendo ser utilizado para isso seringa e agulha (PATIL *et al.*, 2012), ou então um

sistema de ar comprimido, sendo que o tamanho da partícula dependerá do diâmetro do bocal por onde as gotículas são formadas (YEO *et al.*, 2001). As esferas de hidrogel são produzidas no momento em que a dispersão contendo os polímeros é gotejada e entra em contato com a solução reticulante, responsável pela formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares, dando origem a uma rede tridimensional (PATIL *et al.*, 2010; PATIL *et al.*, 2012).

A Figura 2 apresenta um esquema do método de obtenção por geleificação ionotrópica, evidenciando a reticulação dos polímeros aniônicos goma gelana e pectina com íons Al^{3+} como agente reticulante.

Figura 2 – Representação esquemática para a reação de reticulação que ocorre durante a obtenção de micropartículas pelo método da geleificação ionotrópica.



No método de gotejamento, a gota se desprende da ponta da agulha no momento em que seu peso supera a força de tensão superficial e adota a forma esférica (SEIFERT e PHILLIPS, 1997), mas para que as partículas mantenham essa forma esférica mesmo após o processo de reticulação, é necessário que a gota de hidrogel formada não se deforme ao sofrer o impacto com a superfície da solução reticulante e durante a agitação, sendo a viscosidade da dispersão polimérica um dos fatores que contribuem para isso (CELLESI *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2009).

A maior vantagem desta técnica é a possibilidade de obter micropartículas sem a necessidade de empregar solventes orgânicos ou temperaturas elevadas, o que permite a encapsulação de células, enzimas e proteínas, além de fármacos, sem perder a viabilidade celular

ou a estabilidade dos demais. Além disso, trata-se de um método simples, rápido e com possibilidade de escalonamento industrial da produção (YEO *et al.*, 2001).

Independentemente do método escolhido para a obtenção de micropartículas, deve-se garantir que a técnica não afete a atividade biológica do fármaco, a eficiência de encapsulação deve ser satisfatória, e a qualidade da micropartícula e o perfil de liberação do fármaco devem ser reprodutíveis (BRAGA, 2005).

2.3 Polissacarídeos empregados na obtenção de micropartículas

A diversidade de polímeros que podem ser utilizados na obtenção de micropartículas é grande, e a escolha deve ser muito bem fundamentada, uma vez que os constituintes influenciarão em características como morfologia, presença de cargas, força de bioadesão e perfil de liberação do fármaco. Polímeros adequados à obtenção de tais sistemas incluem diversas classes de materiais, como biodegradáveis e não-biodegradáveis, solúveis ou insolúveis, naturais ou sintéticos (VASIR *et al.*, 2003).

A utilização de matérias-primas de origem natural, como os polissacarídeos, tem ganhado atenção para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. Isso se deve às diversas vantagens que tais materiais apresentam em relação aos sintéticos, como por exemplo: não são tóxicos, sendo aprovados para o consumo humano, relativo baixo custo e são amplamente disponíveis na natureza (KULKARNI *et al.*, 2011; BANERJEE *et al.*, 2012).

Além disso, a biodegradabilidade e a resistência frente a algumas enzimas específicas, como é o caso da goma gelana e da pectina, que podem ser especificamente metabolizadas pelas polissacaridasas da microbiota colônica, permitem o desenvolvimento de sistemas de liberação sítio específica (BHARDWAJ *et al.*, 2000; PREZOTTI *et al.*, 2012).

2.3.1 Estudos do grupo de pesquisa

O uso de polissacarídeos naturais modificados e a associação de diferentes tipos tem sido objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa, com o objetivo de obter diferentes materiais e sistemas inovadores para a liberação controlada de fármacos.

Inicialmente, a modificação da alta amilose, amido modificado com 70% de amilose (Hylon VII - National Starch & Chemical), pela reticulação com trimetafosfato de sódio em meio básico foi estudada e a influência do grau de reticulação nas suas propriedades físico-químicas e no controle de liberação na forma de comprimidos contendo diferentes fármacos foi extensamente avaliada, sendo que o material, mesmo como mistura física na forma não compactada, levou ao

prolongamento do tempo de liberação por até 24h. Os resultados também demonstraram que o polímero modificado permitiu o significativo aumento dos índices de intumescimento, bem como o efetivo controle das taxas de liberação dos diferentes fármacos estudados (CURY, 2005; CURY *et al.*, 2009).

Em outro estudo, a alta amilose foi associada à pectina e a mistura foi reticulada pelo mesmo processo. Os resultados da caracterização físico-química também evidenciaram importantes modificações estruturais e aumento dos índices de intumescimento dessas amostras, bem como a redução das taxas de liberação em meio ácido (CARBINATTO, 2010). A incorporação de diclofenaco por imersão a essas matrizes permitiu reduzidos percentuais de liberação do fármaco em meio ácido (<10%) (SOARES *et al.*, 2013).

As misturas de alta amilose e pectina reticuladas foram empregadas na obtenção de filmes livres. Os filmes foram obtidos através da técnica de evaporação do solvente e foram caracterizados, demonstrando reduzida capacidade de intumescimento em meio ácido, reduzida degradação enzimática e moderadas propriedades mucoadesivas (PREZOTTI *et al.*, 2012).

Outro material, o amido resistente, obtido pelo método da retrogradação em ciclos alternados de temperatura, também tem sido estudado pelo grupo. Este material associado à pectina foi utilizado na obtenção de filmes que demonstraram reduzida permeabilidade ao fármaco em meio ácido (MENEGUIN, 2012). Associado à goma gelana, em estudos preliminares, tem demonstrado a habilidade para a formação de microesferas através do método da geleificação ionotrópica com íons trivalentes.

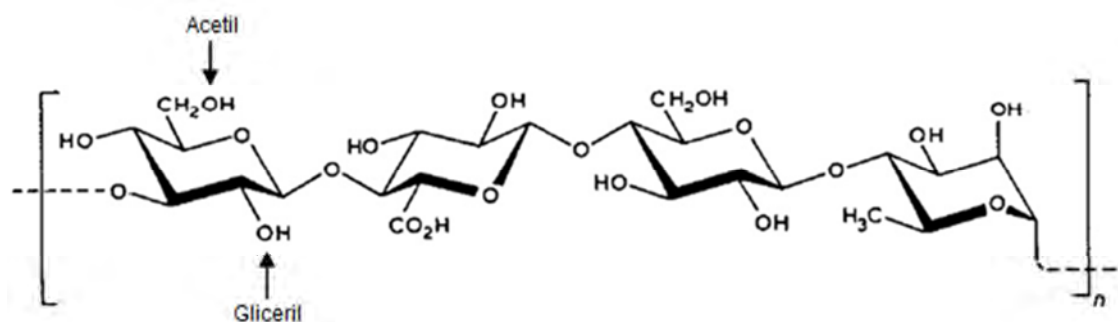
2.3.2 Goma gelana

A goma gelana é um exopolissacarídeo hidrofílico linear aniônico obtido através do processo de fermentação aeróbia pela bactéria *Sphingomonas elodea*, antes conhecida como *Auromonas elodea* ou *Pseudomonas elodea* (MORRIS *et al.*, 2012). Foi descoberta em 1977 por pesquisadores da empresa CPKelco, após um minucioso *screening* feito com mais de 30.000 isolados bacterianos (CHANDRASEKARAN e RADHA, 1995) com o intuito de produzir polissacarídeos microbianos de massa molecular e pureza controladas, e assim, eliminar a grande variabilidade que pode existir e afetar as propriedades físicas dos biopolímeros naturais (WHITTAKER *et al.*, 1997; YAMAMOTO, 2006).

Comercialmente está disponível como Gelzan[®], utilizada em meios de cultura, ou Kelcogel[®], para fins alimentícios e uso em produtos dos mais variados tipos, como cremes dentais (PATIL *et al.*, 2010). É aprovada pelos órgãos sanitários para consumo e muito utilizada pela

indústria alimentícia, devido à sua propriedade de formar géis transparentes e resistentes ao calor e a ácidos, mesmo em baixas concentrações (CHANDRASEKARAN *et al.*, 1988; MORITAKA *et al.*, 1991; CHANDRASEKARAN e RADHA, 1995; OGAWA *et al.*, 2006; PICONE, 2008). Sua estrutura é constituída de unidades repetidas do tetrassacarídeo (β -1,3-D-glicose, β -1,4-D-ácido glucurônico, β -1,4-D-glicose e α -1,4-L-ramnose). Na forma nativa possui dois grupamentos acila ligados a um único resíduo de glicose, sendo um acetil na posição 2 e um gliceril na posição 6 (Figura 3) (CHANDRASEKARAN *et al.*, 1988; GIAVASIS *et al.*, 2000; PICONE, 2008), que são removidos por hidrólise alcalina para gerar as formas comerciais, disponíveis com alto ou baixo grau de acilação (GRASDALEN e SMIDSRØD, 1987; MORRIS *et al.*, 2012). No estado sólido, a gelana possui uma estrutura ordenada na forma de dupla hélice coaxial, em que cada fita é uma hélice com giro para a esquerda (CHANDRASEKARAN *et al.*, 1988; MORRIS *et al.*, 2012).

Figura 3 – Estrutura da goma gelana deacilada com indicação dos sítios de ligação dos grupamentos acetil e gliceril da forma nativa (adaptado de MORRIS *et al.* (2012)).



Seu pKa é próximo de 3,5 devido à presença dos resíduos de ácido glucurônico (PICONE e DA CUNHA, 2010). Apesar de ser um polímero aniônico como a pectina, sua densidade de carga é menor, cerca de 0,25 mol de cargas negativas/mol de monossacarídeo (PICONE, 2008). A forma nativa acilada origina géis fracos, elásticos e não quebradiços, já a forma desacilada origina géis firmes, não elásticos e quebradiços (CHANDRASEKARAN *et al.*, 1988; RINAUDO e MILAS, 2000).

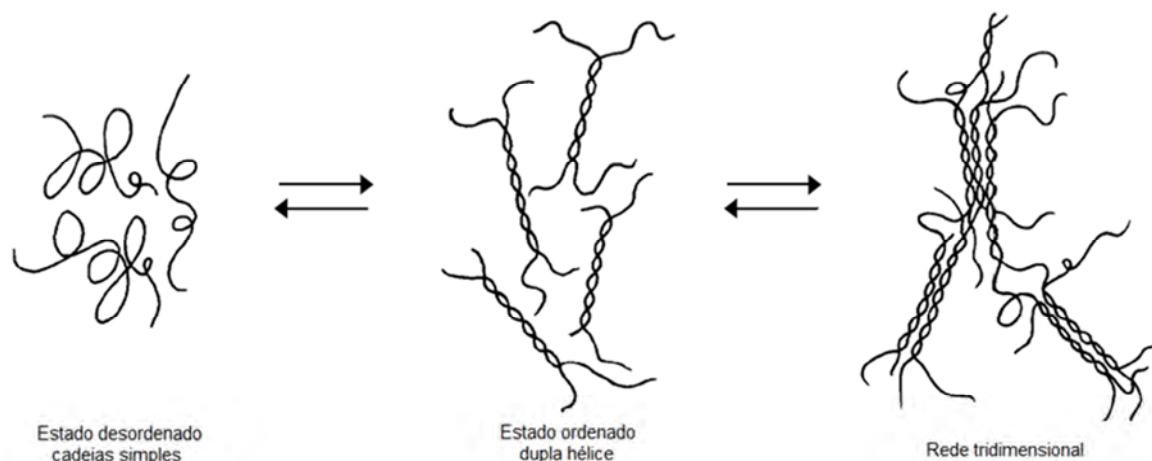
A habilidade de formar hidrogéis faz da goma gelana um material promissor para a aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos, já que a natureza hidrofílica e a estrutura tridimensional da rede formada auxiliam na encapsulação e na regulação da liberação do fármaco (NARKAR *et al.*, 2010). Além disso, apresenta importantes propriedades mucoadesivas (LEE *et al.*, 2000; SALAMAT-MILLER *et al.*, 2005; NARKAR *et al.*, 2010), e sua utilização já foi explorada em sistemas para liberação nasal (CAO *et al.*, 2009; MAHAJAN e GATTANI,

2009), ocular (SANZGIRI *et al.*, 1993), e em diversos sítios da via oral (KUBO *et al.*, 2003; RAJINIKANTH e MISHRA, 2007; NARKAR *et al.*, 2010).

O mecanismo de formação do gel é reversível e envolve duas etapas, a transição entre os estados desordenado (enovelada) e ordenado (dupla hélice) e a associação entre as moléculas ordenadas, sendo fortemente influenciado pela força iônica, tipo e quantidade de cátions em solução, temperatura e concentração do polímero (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2003; OGAWA *et al.*, 2006; YAMAMOTO, 2006).

Em soluções com temperaturas elevadas há a presença de cadeias simples e enoveladas de gelana (estado desordenado) que, ao serem resfriadas, se ordenam no formato de dupla hélice. As moléculas em dupla hélice então se agregam e formam zonas de junção, e ao se complexarem com cátions em solução e formarem ligações de hidrogênio com a água dão origem à rede tridimensional do gel (Figura 4) (OGAWA *et al.*, 2006; YAMAMOTO, 2006; PICONE, 2008; NARKAR *et al.*, 2010).

Figura 4 – Mudanças na conformação das cadeias da goma gelana durante sua gelificação (adaptado de MIYOSHI *et al.* (1995)).



A habilidade em formar microcápsulas de hidrogel na presença de cátions divalentes, particularmente Ca^{2+} , tem sido explorada para a obtenção de sistemas de liberação controlada de diferentes fármacos (AGNIHOTRI *et al.*, 2006; PATIL *et al.*, 2006; RAJINIKANTH e MISHRA, 2007; BABU *et al.*, 2010; NARKAR *et al.*, 2010).

Recentemente, MAITI *et al.* (2011) avaliaram a utilização do cátion trivalente Al^{3+} na obtenção de microcápsulas de goma gelana para a liberação de glipzida e demonstraram a efetiva redução das taxas de liberação do fármaco em meio ácido.

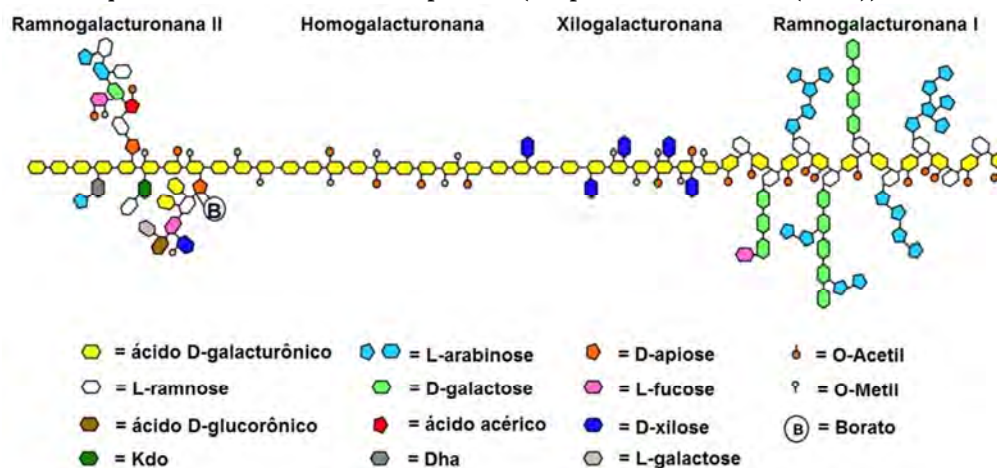
2.3.3 Pectina

A pectina é um polissacarídeo natural, amplamente empregado pela indústria alimentícia, como agente espessante, estabilizante e geleificante (FISSORE *et al.*, 2013), e pela farmacêutica, como excipiente na obtenção de sistemas de liberação cólon-específica de fármacos (LIU *et al.*, 2003; BIGUCCI *et al.*, 2009). Recentemente, tem sido empregada na engenharia de tecidos (MUNARIN *et al.*, 2012), na vetorização de genes (KATAV *et al.*, 2008) e na cicatrização de feridas (LIU *et al.*, 2004).

É encontrada em diversas espécies vegetais, principalmente na parede celular, sendo responsável pela manutenção de estruturas e pela sustentação da planta (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2010).

Apesar de sua abundância na natureza, poucas são as plantas usadas como fonte deste polissacarídeo, dependendo do rendimento, custo e tempo do processo de extração. As substâncias pecticas podem ser extraídas de tecidos frescos ou secos de frutas ou vegetais através de diversos processos extrativos como a extração com água quente, com compostos quelantes e com enzimas. Maracujá, frutas cítricas, toranja e manga são algumas das fontes de pectina com maior rendimento para sua extração, no entanto este polissacarídeo tem sido obtido basicamente de resíduos das indústrias que processam sucos e maçãs (MUNARIN *et al.*, 2012).

Figura 5 – Estrutura esquemática dos domínios da pectina (adaptado de TARZIA (2010)).



A pectina possui pKa entre 3 – 4 (SRIAMORNSAK *et al.*, 2010) e sua estrutura é composta por três domínios principais: homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II, os quais estão covalentemente ligados entre si (Figura 5), no entanto há autores que consideram a xilogalacturonana um quarto domínio (MOHNEN, 2008), e ainda há

controvérsias sobre o posicionamento de tais domínios para a formação da macromolécula (YAPO, 2011).

A homogalacturonana (HG) é um homopolímero linear e o principal componente estrutural da pectina, cerca de 60% de sua estrutura é composta por HG, que contém ácidos D-galacturônicos unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4). Estes resíduos podem estar esterificados com grupamentos metila e acetila (VRIESMANN, 2008; CAFFALL e MOHNEN, 2009; YAPO, 2011).

A ramnogalacturonana I (RG-I) representa de 20 a 35% da estrutura da pectina e é composta por unidades repetidas do dissacarídeo formado por ácido D-galacturônico e ramnose ligados em α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 2), respectivamente (MOHNEN, 2008; TARZIA, 2010). Cerca de 20 a 80% dos resíduos de ramnose desta cadeia principal possuem ramificações, principalmente arabinose e galactose ligadas na forma de mono ou oligossacarídeos. Outros sacarídeos podem ainda ser encontrados como resíduos terminais dessas cadeias laterais, como por exemplo, fucose, glicopirranose, 4-O-metilglicopirranose (MOHNEN, 2008; TARZIA, 2010; MUNARIN *et al.*, 2012).

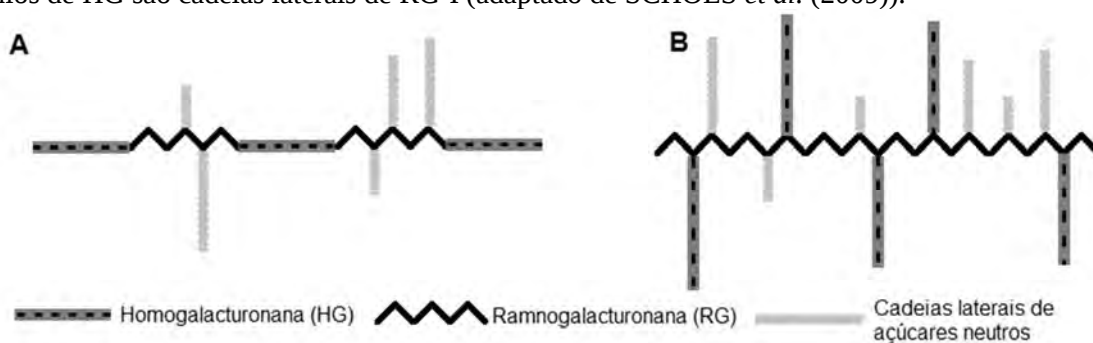
A ramnogalacturonana II (RG-II) é a região mais complexa da estrutura da pectina, representando aproximadamente 10% desta (MOHNEN, 2008). Possui uma cadeia principal pequena, com pelo menos oito resíduos de ácido D-galacturônico ligados entre si por ligações do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4), como nas regiões de HG, e cadeias laterais compostas por diversos tipos de açúcares. Autores relatam a existência de 12 diferentes tipos de monossacarídeos ligados por mais de 20 diferentes ligações glicosídicas (MOHNEN, 2008; VRIESMANN, 2008). Dentre os açúcares das cadeias laterais estão a ramnose, a galactose, a fucose, o próprio ácido galacturônico, a arabinose e açúcares raros, como o ácido acérico, a apiose, o Dha (ácido 3-deoxi-D-lixoheptulosárico) e o Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-manooctulosônico) (VRIESMANN, 2008; TARZIA, 2010; MUNARIN *et al.*, 2012).

As xilogalacturonanas (XG), consideradas por muitos autores como outro domínio da pectina, são cadeias de HG parcialmente substituídas na posição O-3 por β -D-xilose e estas, por sua vez, podem ser substituídas por uma molécula adicional de xilose formando um dissacarídeo (MOHNEN, 2008; CAFFALL e MOHNEN, 2009; TARZIA, 2010).

Por serem regiões altamente ramificadas, as RG I e II são chamadas de *hairy region* ou região ramificada e a região linear da cadeia constituída por HG é denominada de *smooth region* ou região lisa (MUNARIN *et al.*, 2012). Um dos modelos que tradicionalmente descreve a disposição desses domínios para formar a macromolécula de pectina é a alternância entre regiões lisas (HG) e ramificadas (RG-I) (SCHOLS e VORAGEN, 1996). Porém, Vincken e co-autores

(VINCKEN *et al.*, 2003) sugerem um modelo em que domínios HG fazem parte das cadeias laterais dos domínios RG-I (Figura 6).

Figura 6 – Possíveis disposições dos domínios da pectina para formação da macromolécula. A) modelo em que regiões lisas e ramificadas se alternam e B) modelo proposto por Vincken e co-autores, em que domínios de HG são cadeias laterais de RG-I (adaptado de SCHOLS *et al.* (2009)).



A mucoadesividade da pectina é bem reconhecida e já foi estudada através de diferentes técnicas, como análise em texturômetro (THIRAWONG *et al.*, 2007), em viscosímetro (THIRAWONG *et al.*, 2008a) e em estudos *ex vivo* (LIU *et al.*, 2005). Devido a essa propriedade, a pectina tem sido explorada em vários sistemas mucoadesivos de liberação controlada (KIM *et al.*, 2003; THIRAWONG *et al.*, 2008b), isolada ou combinada com outros polímeros, naturais ou sintéticos. O uso de misturas de polímeros representa uma estratégia racional para a obtenção de materiais com propriedades moduladas para atender a necessidades terapêuticas específicas (LIU *et al.*, 2003; KHONDKAR *et al.*, 2007; PREZOTTI *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013).

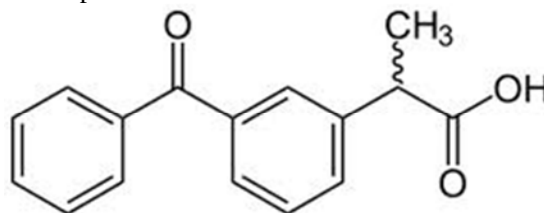
2.4 Cetoprofeno

Este fármaco surgiu em 1967, sintetizado no Rhône-Poulenc Laboratories (França), atual Sanofi, apenas 3 anos após o seu protótipo ibuprofeno (CAILLETEAU, 1988). Aprovado desde 1973 para uso na Europa e desde 1986 nos Estados Unidos (CAILLETEAU, 1988; RAINSFORD, 1988).

O cetoprofeno (CP) é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) da classe das benzofenonas, derivado do ácido arilpropiónico, com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. Pelo sistema de classificação biofarmacêutica é considerado um fármaco de classe II, por apresentar baixa solubilidade em água e alta permeabilidade (SHENG *et al.*, 2006; SHOHIN *et al.*, 2011). Trata-se de um ácido fraco, seu pKa é aproximadamente 4,6 (SHENG *et al.*, 2006), de fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$ e sua estrutura química está representada na Figura 7.

Possui massa molecular de 254,29 g/mol e seu ponto de fusão é 94°C. Em metanol, o comprimento de onda de máxima absorção é 255nm e seu log E é 4,33. É solúvel em éter, etanol, acetona, clorofórmio, dimetilformamida e acetato de etila (BUDAVARI *et al.*, 1996).

Figura 7 – Estrutura química do cetoprofeno.



O CP é um anti-inflamatório muito eficaz, sendo rapidamente absorvido e eliminado, com uma elevada biodisponibilidade (90%), curta meia-vida (1 h), cuja atividade analgésica persiste por aproximadamente 3 - 4 h após a tomada. O tratamento de doenças inflamatórias crônicas com CP exige várias administrações diárias, o que pode acarretar em baixa adesão do paciente, ou mesmo em variações das concentrações plasmáticas a níveis abaixo do terapêutico por atrasos na administração (HABIB e MESUE, 1995). O uso prolongado e regular de um AINE pode ainda causar danos nas porções superiores do trato gastrointestinal (TGI), como dispepsia em 15 – 60% dos usuários e úlceras gástricas ou duodenais, presentes em 15 – 30% dos pacientes. Esses danos são causados tanto por seu efeito tópico, quando o fármaco, que é um ácido fraco, entra em contato direto com a mucosa, quanto sistêmico, devido à inibição da produção de prostaciclina, sendo este último o principal mecanismo causador de úlceras (LAINE, 2002).

Para melhorar o esquema posológico, aumentando a adesão do paciente ao tratamento, e reduzir os danos na parte superior do TGI, diversos sistemas de liberação controlada contendo CP foram desenvolvidos, como por exemplo, microesferas contendo complexos de CP e ciclodextrinas (MAESTRELLI *et al.*, 2008), micropéletes lipídicos (HASSAN *et al.*, 1995), comprimidos revestidos para liberação pulsátil (RANE *et al.*, 2009), nanopartículas lipídicas sólidas obtidas a partir de misturas de ceras de abelha e de carnaúba (KHERADMANDNIA *et al.*, 2010) e comprimidos destinados a uma administração diária com liberação do fármaco por 24 h (RODA *et al.*, 2002). Dentre as formas farmacêuticas citadas, as multiparticuladas apresentam a vantagem de se distribuírem melhor que as monolíticas, evitando a irritação à mucosa gástrica pelo acúmulo localizado de fármaco (HASSAN *et al.*, 1995).

3 OBJETIVOS

Obter e caracterizar microesferas de misturas de goma gelana e pectina obtidas através da geleificação ionotrópica com Al^{3+} , bem como avaliar as propriedades de liberação controlada do fármaco.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Principais matérias-primas

- Ácido clorídrico (Quimis)
- Brometo de potássio (Synth)
- cetoprofeno (Sigma)
- Cloreto de alumínio (Vetec)
- Fosfato de sódio tribásico 12H₂O (Henrifarma)
- Fosfato de potássio monobásico (Vetec)
- Goma gelana (Kelcogel® CG-LA - CP Kelco)
- Hidróxido de sódio (Grupo Química)
- Mucina tipo II (Sigma-Aldrich®)
- Pectina de baixo grau de metoxilação (LM-5206CS - CP Kelco)
- Laurilsulfato de sódio (Vetec)

4.2 Principais equipamentos

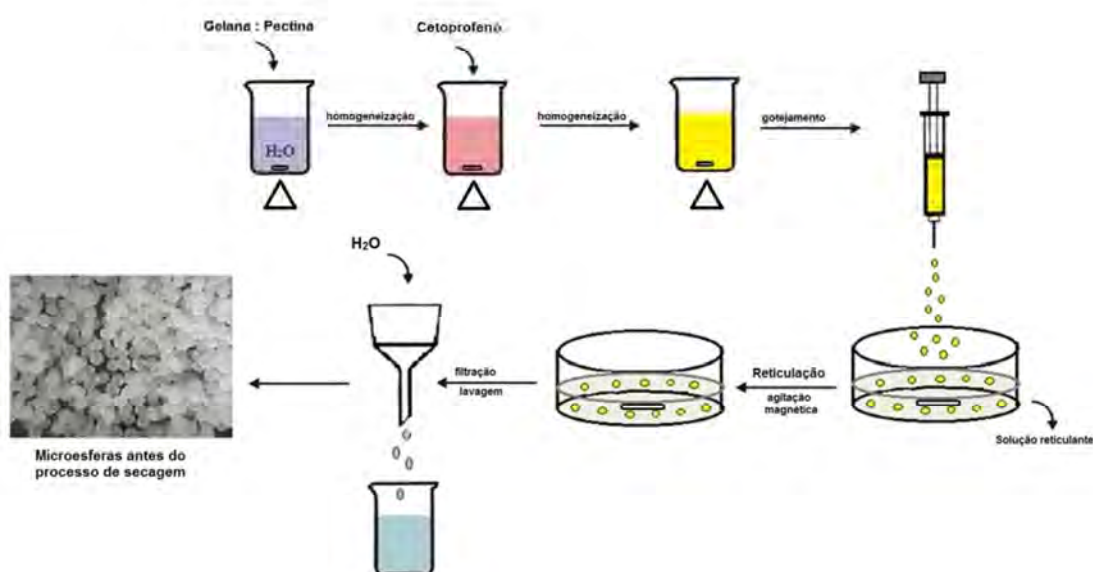
- Agitador magnético (Quimis)
- Analisador termogravimétrico *SDT Q600* (TA Instruments)
- Balança Analítica (Mettler Toledo)
- Bomba a vácuo TE-058 (Tecnal)
- Centrífuga (Sorvall TC)
- Calorímetro exploratório diferencial *DSC 1 Star System* (Mettler Toledo)
- Dispositivo para determinação de intumescimento segundo Enslin
- Dissolutor SR8 Plus (Hanson Research)
- Espectrofotômetro UV-Visível (Hewlett Packard-Kayak XA)
- Espectrômetro FTIR-8300 (Shimadzu)
- Estufa com circulação forçada de ar (Fabbe)
- Homogeneizador de soluções (Phoenix)
- Homogeneizador ultra-turrax (IKA)
- Microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-7500F)
- Microscópio-Estereoscópio com dispositivo de captura de imagens (Leica MZ APO)
- Peagômetro digital (Micronal®)

4.3 Obtenção das microesferas

Dispersões aquosas de misturas de gelana:pectina (1:1 e 4:1), em diferentes concentrações (2% e 4%), foram preparadas a 80°C, sob agitação magnética durante 20 minutos, para a completa dispersão dos polímeros. Em seguida, adicionou-se o fármaco (0,5% e 1,0%, m/v) também sob agitação magnética até completa dispersão.

As dispersões obtidas foram gotejadas, utilizando seringa e agulha de irrigação sem bisel 23G 1" (0,6 x 25 mm), sobre uma solução de cloreto de alumínio (3 e 5%, m/v), previamente resfriada em banho de gelo (4°C). As microesferas obtidas permaneceram sob agitação por 20 minutos adicionais, a fim de completar a reação de reticulação, e posteriormente foram separadas por filtração, lavadas com água purificada (150 ml) e secas em estufa à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção de microesferas sem fármaco, utilizadas como controle. As microesferas foram armazenadas em dessecador, sob vácuo. A Figura 8 representa o processo de obtenção descrito.

Figura 8 – Representação esquemática do processo de obtenção de microesferas de goma gelana e pectina através do método de geleificação ionotrópica.



As amostras foram denominadas de acordo com a proporção gelana:pectina (1:1 e 4:1 como 11 e 41, respectivamente), a concentração polimérica (L = 2% e H = 4%), a concentração de fármaco (0 = controle; 0,5 = 0,5% e 1 = 1% de cetoprofeno) e a concentração da solução reticulante (3 = 3% e 5 = 5% de Al^{3+}). A Tabela 1 mostra a composição de cada amostra obtida, com a respectiva sigla que a denomina.

Tabela 1 – Nomenclatura e composição das microesferas obtidas pela técnica de geleificação ionotrópica, a partir dos polímeros goma gelana e pectina, em solução reticulante de cloreto de alumínio utilizando cetoprofeno como fármaco modelo.

Sigla	Proporção gelana:pectina	Concentração de polímeros (%)	Concentração de fármaco (%)	Concentração de agente reticulante Al^{3+} (%)
11L0-3	1:1	2,0	0	3,0
11L0,5-3	1:1	2,0	0,5	3,0
11L1-3	1:1	2,0	1,0	3,0
11H0-3	1:1	4,0	0	3,0
11H0,5-3	1:1	4,0	0,5	3,0
11H1-3	1:1	4,0	1,0	3,0
41L0-3	4:1	2,0	0	3,0
41L0,5-3	4:1	2,0	0,5	3,0
41L1-3	4:1	2,0	1,0	3,0
41H0-3	4:1	4,0	0	3,0
41H0,5-3	4:1	4,0	0,5	3,0
41H1-3	4:1	4,0	1,0	3,0
11H1-5	1:1	4,0	1,0	5,0
41H1-5	4:1	4,0	1,0	5,0

4.4 Caracterização das microesferas

4.4.1 Análise de tamanho e forma das partículas

As análises foram realizadas em estereoscópio Leica MZ APO[®] em aumento de 10 vezes. Microesferas, previamente secas até peso constante, foram dispostas em uma placa de Petri e imagens foram capturadas com auxílio do programa Motic Images Advance 2.0 e digitalizadas utilizando o programa analisador de imagem Motic Images Advance 3.2. Foram analisadas populações de 100 partículas de cada formulação e os parâmetros avaliados foram o diâmetro do círculo equivalente e a circularidade.

Para uma análise quantitativa da distribuição granulométrica das amostras, foi determinado o índice de Span, que representa a polidispersidade da amostra, a partir da seguinte equação:

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

em que D_{90} , D_{10} e D_{50} são os diâmetros (μm) determinados para os percentis 90, 10 e 50, respectivamente (ABASHZADEH *et al.*, 2011).

4.4.2 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna

A morfologia de superfície e a estrutura interna das microesferas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura de alta resolução JEOL JSM-7500F. Para avaliar a estrutura interna, as microesferas passaram por um processo de criofratura, em que foram congeladas utilizando nitrogênio líquido e posteriormente fraturadas. As amostras foram fixadas em fita de carbono dupla face e fotomicrografias em diferentes aumentos foram obtidas.

4.4.3 Rendimento

Para avaliar o rendimento do processo de obtenção, as microesferas foram secas até peso constante em dessecador contendo sílica gel, sob vácuo. O rendimento foi calculado como sendo a massa obtida de microesferas secas dividida pela soma das massas dos polímeros e fármaco utilizados na sua obtenção, de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{massa de microesferas secas}}{(\text{massa de polímeros} + \text{massa de fármaco})} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

4.4.4 Avaliação da eficiência de encapsulação

Para avaliar a eficiência de encapsulação do cetoprofeno, uma massa precisamente pesada de microesferas foi intumescida em tampão fosfato pH 7,4 por 24 horas e então trituradas em ultra-turrax (IKA) a 11.000 rpm durante 1 minuto, para a completa extração do fármaco. Em seguida a dispersão foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos e o fármaco presente no sobrenadante foi quantificado utilizando espectrofotômetro UV-VIS em 260 nm, em triplicata. O mesmo foi feito com microesferas que não continham fármaco incorporado, como controle. A eficiência de encapsulação foi calculada através da seguinte equação:

$$EE\% = \frac{Q_q}{Q_t} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

em que $EE\%$ é a eficiência de encapsulação (%), Q_q é a quantidade quantificada de fármaco e Q_t é a quantidade total de fármaco adicionada.

A metodologia analítica para a quantificação do fármaco foi validada.

4.4.4.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do cetoprofeno por espectrofotometria na região do ultravioleta

Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade / seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) conforme preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Americana e Conferência Internacional de Harmonização (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011b). Foram validadas três metodologias, para quantificação do cetoprofeno nos meios: HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; tampão fosfato pH 6,0 e tampão fosfato pH 7,4.

4.4.4.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do cetoprofeno na região do ultravioleta

Soluções de concentração 20 µg/mL de cetoprofeno em HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; tampão fosfato pH 6,0 e tampão fosfato pH 7,4 foram submetidas a uma varredura entre 200 e 400 nm, em espectrofotômetro UV-Vis, a fim de se verificar o comprimento de onda no qual o fármaco apresenta seu pico de máxima absorção.

4.4.4.1.2 Especificidade / Seletividade

Com o objetivo de avaliar a interferência da goma gelana e da pectina na quantificação de cetoprofeno encapsulado nas microesferas e demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses polímeros, a especificidade/seletividade foi determinada avaliando-se o espectro de absorção destes polímeros entre 200 e 400 nm. Soluções contendo 75 µg/mL de misturas de gelana:pectina (1:1 e 4:1) nos diferentes meios testados foram submetidas a varreduras no UV.

4.4.4.1.3 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica de cetoprofeno nos diferentes meios testados. A partir de soluções estoque contendo 200 µg/mL de cetoprofeno, foram preparadas diluições com concentrações variando de 1 a 20 µg/mL, em triplicata.

4.4.4.1.4 Precisão

A precisão foi avaliada em três níveis de concentração, baixa (5 µg/mL), média (10 µg/mL) e alta (15 µg/mL), em triplicata, a partir de solução estoque a 200 µg/mL, contemplando o intervalo linear do método.

4.4.4.1.5 Exatidão

A exatidão foi determinada utilizando-se três diferentes concentrações, baixa (5 µg/mL) média (10 µg/mL) e alta (15 µg/mL), contemplando a faixa de linearidade do método. Realizaram-se cinco determinações por concentração e a exatidão foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C}{C_0} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

em que C é a concentração média determinada experimentalmente e C_0 é a concentração teórica.

4.4.4.1.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados por meio da análise de soluções de concentrações decrescentes de cetoprofeno até o menor nível detectado (de 5 a 1 µg/mL), em triplicata, e calculados através das seguintes equações:

$$LD = \frac{3 \times DP_a}{IC} \quad (\text{Equação 5})$$

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{IC} \quad (\text{Equação 6})$$

em que LD é o limite de detecção, LQ é o limite de quantificação, DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo y das três curvas construídas com as concentrações decrescentes do fármaco e IC é o coeficiente angular da curva analítica.

4.4.5 Análises térmicas

Para estudo de possíveis interações fármaco-polímero bem como do estado físico em que o fármaco encapsulado se encontra, realizaram-se as análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria / termogravimetria derivada (TG/DTG) do fármaco puro, da goma gelana, da pectina e das diferentes microesferas obtidas.

4.4.5.1 DSC

As curvas de DSC das amostras foram registradas utilizando-se calorímetro exploratório diferencial, modelo *DSC 1 Star System* (Mettler Toledo®) a uma razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera inerte de gás nitrogênio (50 mL/min), na faixa de aquecimento de 25 a 200 °C para o fármaco, -30 a 400 °C para os polímeros e 20 a 100 °C para as microesferas. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se cadinho de alumínio com tampa perfurada contendo cerca de 1 mg de amostra e como referência um cadinho de alumínio vazio com tampa perfurada.

4.4.5.2 TG/DTG

As curvas de TG/DTG das amostras foram registradas em equipamento *TA Instruments SDT Q600* a uma razão de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera inerte de gás nitrogênio (100 mL/min), na faixa de aquecimento de 25 a 500 °C. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se cadinho de alumínio contendo aproximadamente 7 mg de amostra.

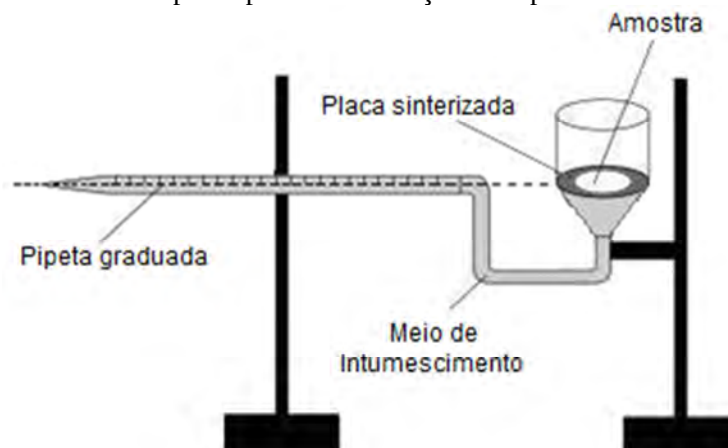
4.4.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Espectros em infravermelho por transformações de Fourier (FTIR) foram obtidos para os polímeros isolados, o cetoprofeno e para microesferas obtidas a partir de misturas de gelana e pectina nas proporções 1:1 e 4:1 contendo 0,5% de cetoprofeno e microesferas sem fármaco. Os espectros foram obtidos utilizando pastilhas de brometo de potássio em espectrômetro FTIR-8300 (Shimadzu®) entre 4000 e 400 cm⁻¹.

4.4.7 Determinação da capacidade de absorção de líquidos

A capacidade de absorção de líquidos das microesferas foi determinada utilizando-se dispositivo de Enslin adaptado (Figura 9) (VOIGT, 2000; CURY, 2005).

Figura 9 – Dispositivo de Enslin adaptado para determinação da capacidade de absorção de líquidos.



As microesferas foram secas até peso constante e uma massa de amostra precisamente pesada foi imediatamente disposta sobre a placa de vidro sinterizada do dispositivo. As extremidades do dispositivos foram vedadas. Foram utilizados meios com diferentes valores de pH, simulando as diferentes regiões do TGI – meio gástrico simulado sem enzimas (HCl 0,1N pH 1,2), meio entérico simulado sem enzimas (tampão fosfato pH 7,4) e meio colônico simulado sem enzimas (tampão fosfato pH 6,0). O volume de líquido absorvido foi avaliado em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 min). Foram analisadas microesferas com e sem fármaco.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de líquido absorvido, calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ líquido absorvido} = \frac{m_{liq}}{m_{par}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

em que, m_{liq} (g) é a massa de líquido absorvido, considerando a densidade da água de 1 g/ml, e m_{par} é a massa de microesferas (g) utilizadas.

4.5 Seleção de amostras para estudos de mucoadesão e dissolução

Com a finalidade de realizar os testes de mucoadesão e dissolução com as amostras de características mais promissoras, avaliaram-se os resultados de obtenção e caracterização das partículas para a seleção das amostras.

4.6 Estudo da mucoadesividade das microesferas

A mucoadesão foi avaliada através da interação entre a mucina, principal glicoproteína constituinte do muco (KHANVILKAR *et al.*, 2001), e microesferas dispersas em solução aquosa (DHAWAN *et al.*, 2004; SONIA e SHARMA, 2011).

Soluções aquosas de mucina (tipo II; Sigma-Aldrich®) foram preparadas nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 ug/ml a partir de uma solução estoque de 500 ug/ml. Microesferas (20 mg) foram adicionadas à 10 ml das soluções aquosas de mucina nas diferentes concentrações citadas. Após agitação em vortex, as amostras foram incubadas em banho termostatzado com circulação a 37°C por 1h. Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação da mucina livre empregando-se o método de Lowry modificado por Peterson (PETERSON, 1977; DHAWAN *et al.*, 2004). Trata-se de um método colorimétrico que permite a quantificação de proteínas utilizando espectrofotômetro.

Para a determinação da mucina livre no sobrenadante, utilizaram-se os reagentes do kit *Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification* (Sigma-Aldrich). Adicionou-se 1 ml do reagente de Lowry à alíquotas de 1 ml de sobrenadante. As soluções permaneceram à temperatura ambiente por 20 minutos e, então, adicionou-se 0,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu's. As soluções permaneceram em repouso por mais 30 minutos para o desenvolvimento de cor e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro UV-Visível em 749 nm, em duplicata. Para o branco, o mesmo procedimento foi empregado utilizando-se água destilada.

Para o cálculo da quantidade de mucina livre, utilizou-se uma curva analítica padrão de equação $y=0,0085x+0,0741$ e $r: 0,997$.

A quantidade de mucina adsorvida foi determinada indiretamente a partir da quantificação da mucina livre no sobrenadante, através da equação:

$$Q_{mucina\ adsorvida} = Q_{mucina\ adicionada} - Q_{mucina\ livre} \quad (\text{Equação 8})$$

4.6.1 Isotermas de adsorção da mucina

Os dados obtidos foram interpretados utilizando-se as equações de Freundlich (Equação 9) e Langmuir (Equação 10), que descrevem as isotermas de adsorção (HE *et al.*, 1998).

$$Q_e = k \times C_e^{1/n} \quad (\text{Equação 9})$$

$$Q_e = \frac{a \times C_e}{b + C_e} \quad (\text{Equação 10})$$

em que Q_e é a quantidade de mucina adsorvida por unidade de massa de microesferas (mg/g) e C_e é concentração de mucina livre no sobrenadante (mg/L), k é a constante de Freundlich e representa a capacidade de adsorção, n é a constante que representa a intensidade da adsorção, a e b são parâmetros de Langmuir, sendo a constante a a máxima capacidade de ligação e b o coeficiente de dissociação, que representa a afinidade entre a mucina e a microesfera (LAN *et al.*, 2001; KYZAS *et al.*, 2013). Para aplicar o modelo de Freundlich, plotou-se o gráfico de $\log C_e$ vs

log Q_e , para o modelo de Langmuir plotou-se o gráfico $1/C_e$ vs $1/Q_e$ e os valores das constantes foram obtidas a partir de uma regressão linear simples.

4.7 Estudo da liberação do fármaco

4.7.1 Avaliação da solubilidade do cetoprofeno

A solubilidade do cetoprofeno foi determinada através do método do equilíbrio (TONG e WEN, 2008) nos meios HCl 0,1 N (pH 1,2) sem tensoativo ou contendo laurilsulfato de sódio (0,5, 0,75 e 1,0%), tampão fosfato pH 6,0 e tampão fosfato pH 7,4. Cetoprofeno foi adicionado em excesso aos diferentes meios testados, para garantir a saturação, e mantido sob agitação em homogeneizador de soluções por 72h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (1500 rpm, 5 minutos), o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 μ m e o fármaco solúvel foi quantificado em espectrofotômetro UV-Visível.

Para determinar a concentração do fármaco solúvel a partir das absorbâncias, utilizaram-se as curvas analíticas previamente obtidas e validadas para cada meio.

4.7.2 Avaliação do intumescimento e erosão

O comportamento de intumescimento das amostras submetidas ao ensaio de liberação *in vitro* foi determinado gravimetricamente. Uma massa precisamente pesada das amostras foi imersa nos diferentes meios (HCl 0,1N pH 1,2 e tampão fosfato pH 7,4) por 2 h e, após esse período, as amostras foram retiradas e o excesso de líquido removido cuidadosamente com papel absorvente. As microesferas intumescidas foram precisamente pesadas, secas até peso constante e pesadas novamente. A porcentagem de líquido absorvido foi calculada a partir da equação (BANERJEE *et al.*, 2012):

$$\% \text{ intumescimento} = \frac{(m_{int} - m_{fps})}{m_{fps}} \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

em que m_{int} = massa das partículas intumescidas e m_{fps} = massa final das partículas secas.

A erosão que as partículas sofrem quando expostas a meios com diferentes valores de pH foi obtida a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ erosão} = \frac{(m_{ips} - m_{fps})}{m_{ips}} \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

em que m_{ips} = massa inicial das partículas secas e m_{fps} = massa obtida após a secagem das partículas intumescidas.

4.7.3 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do cetoprofeno

Os ensaios de dissolução para a determinação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco foram realizados com uma massa precisamente pesada de microesferas correspondente a 150mg de fármaco, baseado na eficiência de encapsulação de cada amostra. Para este estudo, foram utilizadas as amostras 11H1-3; 11H1-5; 41H1-3 e 41H1-5, que apresentaram bons resultados para os testes de circularidade e eficiência de encapsulação.

O ensaio foi realizado utilizando-se o aparato 1 (cesto), sob velocidade de agitação de 50 rpm e temperatura de $37 \pm 0,4$ °C. Foram empregados, como meios de dissolução, soluções com diferentes valores de pH, simulando a variação que ocorre ao longo do trato gastrointestinal e garantindo-se as condições *sink*. Inicialmente o ensaio foi realizado em meio gástrico simulado sem enzimas (900 mL de HCl 0,1N – pH 1,2) durante 2 horas. Laurilsulfato de sódio (0,75%) foi adicionado como tensoativo devido à escassa solubilidade do fármaco neste meio. A segunda etapa do ensaio foi realizada em meio entérico simulado sem enzimas (900 mL de tampão fosfato – pH 7,4) durante 4h como preconizado pela USP (USP, 2011a). Para última etapa do ensaio, o pH foi ajustado para 6,0 através da adição de HCl 2,0 N, simulando o pH do meio colônico. Os meios foram preparados de acordo com o descrito pela USP. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, sendo feita a reposição imediata de meio à mesma temperatura.

A quantidade de fármaco liberada foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível, nos comprimentos de onda de máxima absorção observados para cada meio. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7.4 Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

O mecanismo de liberação do fármaco foi avaliado a partir dos dados de dissolução obtidos e aplicação de modelos matemáticos utilizando o software Sigma Plot 10.0. Os modelos matemáticos empregados foram Korsmeyer – Peppas, Higuchi, Primeira-Ordem, Hixson – Crowell e Baker – Lonsdale.

4.8 Análise estatística dos resultados

Os dados foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey e adotou-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

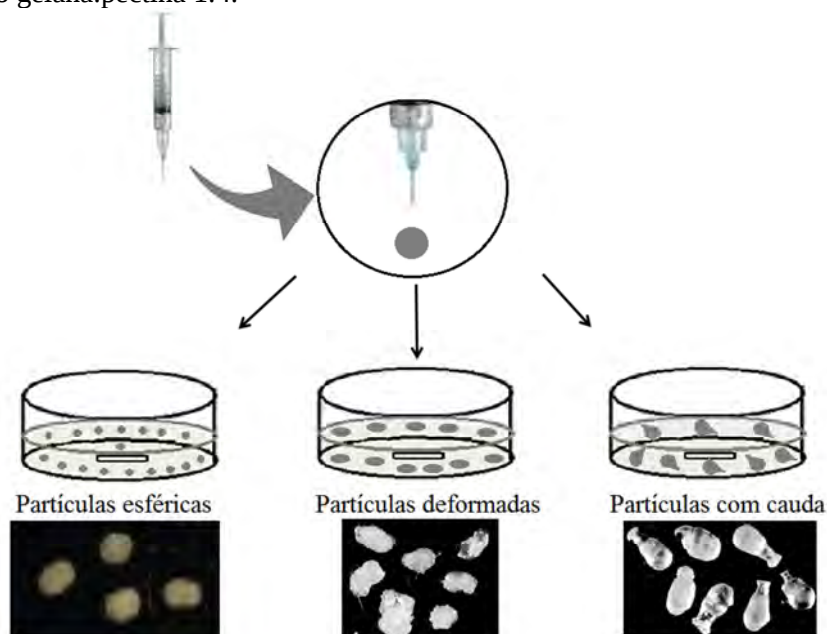
5.1 Obtenção das microesferas

Microesferas de goma gelana e pectina foram obtidas através do método de geleificação ionotrópica utilizando Al^{3+} como agente reticulante.

Embora a obtenção de microesferas através de gotejamento seja amplamente empregada, a otimização de alguns parâmetros, como concentração da dispersão polimérica e da solução reticulante, altura do gotejamento e diâmetro da agulha, para obtenção de partículas com propriedades desejadas geralmente impõe desafios (CHAN *et al.*, 2009). Estudos preliminares foram realizados para investigar o efeito da concentração de polímeros e da proporção goma gelana:pectina na obtenção das microesferas. Observou-se que as dispersões com 2% (m/v) de polímeros permitiu a obtenção de partículas com melhores propriedades de forma e tamanho, e que a proporção 1:4 (goma gelana:pectina) não permitiu a formação de partículas esféricas, pois houve formação de cauda e a circularidade máxima foi $0,538 \pm 0,149$, sendo 1,0 o valor do círculo perfeito (BARREIROS *et al.*, 1996).

Para as baixas concentrações de polímeros (0,5, 1,0 e 1,5%) e a proporção 1:4, a viscosidade e a tensão superficial não foram suficientes para contrariar o efeito de impacto e arraste (SEIFERT e PHILLIPS, 1997; CHAN *et al.*, 2009), originando partículas deformadas e com cauda, como representado na Figura 10, e foram, portanto, excluídas dos demais estudos.

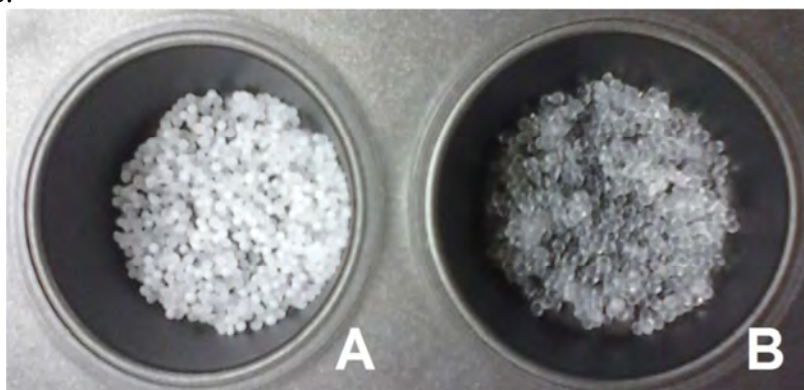
Figura 10 – Esquema das diferentes morfologias das partículas após o gotejamento. A) Partículas esféricas da amostra 11H1-3; B) Partículas deformadas – 1% (m/v) de concentração polimérica e C) Partículas com cauda – proporção gelana:pectina 1:4.



Para a reticulação com maior concentração de Al^{3+} (5%), utilizaram-se somente as concentrações mais elevadas de polímeros (4%) e fármaco (1%) com base nos maiores valores de circularidade apresentados pelas amostras obtidas nessas mesmas condições, quando reticuladas com alumínio 3% (item 5.2.1).

A Figura 11 mostra microesferas com e sem cetoprofeno logo após a obtenção por geleificação ionotrópica. A presença do fármaco nas partículas é indicada pela coloração branca, enquanto na ausência do cetoprofeno as partículas mostraram-se transparentes.

Figura 11 – Microesferas após o processo de obtenção por geleificação ionotrópica. A) amostra 11H1-3 e B) amostra 11H0-3.



5.2 Caracterização das microesferas

5.2.1 Análise de tamanho e forma das partículas

Ao desenvolver um sistema multiparticulado para a liberação controlada de fármacos, é de extrema importância que o método de obtenção seja capaz de produzir partículas esféricas e com distribuição de tamanho monodispersa, para que as taxas de liberação do fármaco sejam altamente reprodutíveis (CHAN *et al.*, 2009).

Para avaliar o tamanho e a forma das partículas, mediu-se o diâmetro do círculo equivalente, que corresponde ao diâmetro de um círculo de área equivalente à da partícula analisada (BARBER e HEALTHCARE, 1993) e o grau de circularidade, que é um fator de forma e expressa a regularidade da partícula, sendo 1,0 o valor que representa um círculo perfeito (BARREIROS *et al.*, 1996). Avaliou-se a influência da proporção entre gelatina e pectina, e das concentrações de polímeros, fármaco e reticulante sobre o tamanho e a forma das microesferas. Também foi avaliada a distribuição de tamanho das amostras através do cálculo do índice Span, que representa sua polidispersidade, ou seja, a amplitude da distribuição (TABBAKHIAN *et al.*, 2006; KAWADKAR e CHAUHAN, 2012).

Os resultados do diâmetro médio, circularidade e índice *Span* das amostras analisadas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Circularidade, diâmetro do círculo equivalente e índice *Span* das microesferas de goma gelana:pectina (média $\pm$ DP).

Amostra	Circularidade	Diâmetro do círculo equivalente (μm)	Span
11L0-3	0,734 $\pm$ 0,062	728,947 $\pm$ 34,875	0,12
11L0,5-3	0,770 $\pm$ 0,054	747,182 $\pm$ 56,050	0,19
11L1-3	0,738 $\pm$ 0,049	838,593 $\pm$ 59,695	0,18
11H0-3	0,730 $\pm$ 0,052	877,529 $\pm$ 27,966	0,08
11H0,5-3	0,827 $\pm$ 0,026	793,486 $\pm$ 25,478	0,08
11H1-3	0,809 $\pm$ 0,032	844,840 $\pm$ 51,481	0,16
41L0-3	0,733 $\pm$ 0,040	777,444 $\pm$ 34,049	0,11
41L0,5-3	0,751 $\pm$ 0,043	779,024 $\pm$ 61,488	0,20
41L1-3	0,757 $\pm$ 0,043	817,253 $\pm$ 52,011	0,16
41H0-3	0,791 $\pm$ 0,034	821,133 $\pm$ 20,611	0,06
41H0,5-3	0,814 $\pm$ 0,025	799,921 $\pm$ 49,207	0,16
41H1-3	0,830 $\pm$ 0,025	803,368 $\pm$ 48,851	0,16
11H1-5	0,819 $\pm$ 0,022	924,557 $\pm$ 31,640	0,09
41H1-5	0,849 $\pm$ 0,035	887,221 $\pm$ 70,774	0,20

De acordo com o tamanho, as partículas que compõem um sistema de liberação multiparticulado podem ser divididas em nanopartículas, que variam de 10 a 1000 nm e em micropartículas, que variam de 1 a 1000 μm (FASANO, 1998).

As partículas analisadas apresentaram diâmetro médio entre 728,9 e 924,5 μm , podendo ser classificadas como micropartículas. O tamanho da partícula dependerá, dentre outros fatores, da quantidade de material que compõe a gota que a originou (ZANIBONI *et al.*, 1995), assim a amostra que apresentou o menor diâmetro médio foi a 11L0-3 (728,947 μm , $p < 0,05$), o que pode ser atribuído à ausência de fármaco e a baixa concentração de polímeros (2%) nesta amostra.

Para as amostras contendo cetoprofeno, o aumento da concentração de 0,5 para 1% levou ao aumento do diâmetro das microesferas ($p < 0,05$), exceto para as amostras 41H0,5-3 e 41H1-3. Considerando que ao aumentar a concentração de CP, mais fármaco está disponível para ocupar os espaços intersticiais entre as cadeias poliméricas, ocorre uma expansão da estrutura, o que origina partículas de maiores tamanhos (KULKARNI *et al.*, 2011). No entanto, para essas amostras, a concentração polimérica e a proporção gelana:pectina não influenciaram no tamanho de partícula.

Para as amostras sem fármaco, a maior concentração de polímeros (4%) originou microesferas de maior diâmetro ($p < 0,05$), o que pode ser atribuído a maior massa de polímero, bem como a maior viscosidade da dispersão, o que promove a formação de gotas maiores durante

o gotejamento, originando partículas de maiores dimensões (MARTINS *et al.*, 2007; KULKARNI *et al.*, 2011).

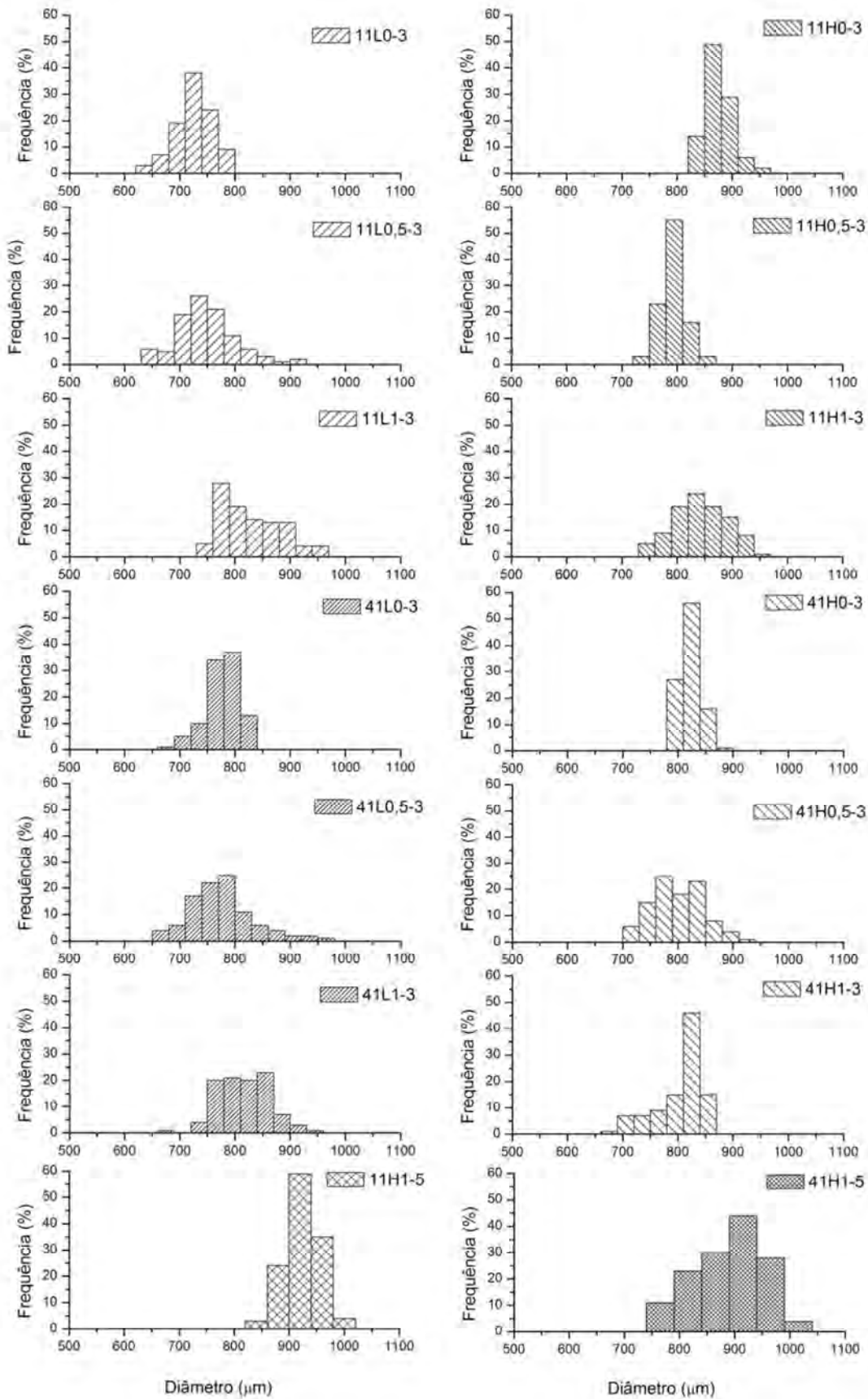
O aumento da concentração do agente reticulante originou partículas de maiores diâmetros para ambas as proporções poliméricas ($p < 0,05$) e nenhuma correlação entre o tamanho das partículas e a proporção de polímeros foi observada.

As distribuições de tamanho podem ser classificadas quanto à sua amplitude de variação, em monodispersas, quando a amplitude é estreita, ou polidispersas, quando é ampla (GAUMET *et al.*, 2008). Quanto menor é o valor do Span, menor é a amplitude da distribuição de tamanho das partículas e, portanto, mais homogênea é a amostra (YIN WIN; FENG, 2005).

O controle do tamanho e da distribuição de tamanho das microesferas é importante, pois esses parâmetros afetam a reprodutibilidade da liberação do fármaco, a absorção e, consequentemente, a biodisponibilidade (KHAFAGY *et al.*, 2007).

Os perfis da distribuição de tamanho das microesferas estão representados na Figura 12 e os valores do índice Span são mostrados na Tabela 2.

Figura 12 – Distribuição de tamanho de partícula para as microesferas de gelana:pectina



As amostras analisadas demonstraram distribuição de tamanho unimodal, ou seja, valores compreendidos em um único intervalo, com baixos valores de Span (0,06 a 0,2). Segundo GAUMET *et al.* (2008), em uma escala de 0 a 1, valores de Span abaixo de 0,1 estão correlacionados a elevada homogeneidade na população das partículas. Segundo essa classificação, somente as amostras 11H0-3, 11H0,5-3 41H0-3 e 11H1-5, que apresentaram Span de 0,08, 0,08, 0,06, e 0,09 respectivamente, podem ser classificadas como monodispersas, todas as demais são consideradas polidispersas.

Quanto à forma das microesferas, os valores de circularidade foram satisfatórios, apresentando-se entre 0,730 e 0,849, sendo o maior valor apresentado pela amostra 41H1-5 ($p < 0,05$). A maior reticulação desta amostra deve dar origem a uma estrutura mais forte, a qual sofre menor impacto da tensão superficial, mantendo sua estrutura preservada.

O aumento da concentração de polímeros promoveu a formação de microesferas com maior circularidade ($p < 0,05$), exceto para as amostras 11L0-3 e 11H0-3, que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si ($p > 0,05$). Microesferas com fármaco apresentaram maior circularidade que seus respectivos controles ($p < 0,05$), exceto para as amostras 11L0-3 e 11L1-3. No entanto a circularidade não foi influenciada pela proporção dos polímeros.

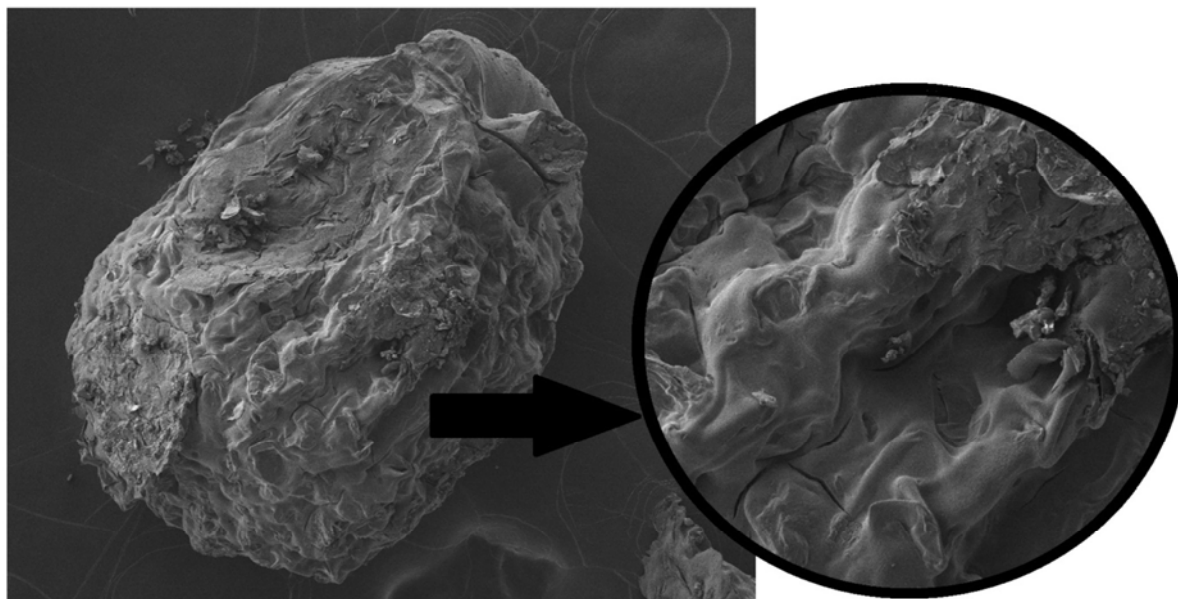
A viscosidade da dispersão polimérica deve ser suficiente para que as partículas formadas mantenham-se esféricas após sofrer o impacto do gotejamento sobre a solução reticulante, caso contrário, partículas deformadas ou com caudas serão produzidas (SEIFERT e PHILLIPS, 1997; CHAN *et al.*, 2009). Assim, a maior viscosidade das dispersões com maior concentração de polímeros e a presença de fármaco devem ter permitido maior resistência mecânica das microesferas, originando partículas mais esféricas ao final do processo.

5.2.2 Análise de morfologia de superfície e estrutura interna

A microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV) fornece visualização direta das partículas, e dessa forma permite avaliar a forma, o tamanho e outras características (GAUMET *et al.*, 2008).

As fotomicrografias revelaram a superfície altamente irregular das microesferas, como observado por MAITI *et al.* (2011) em estudo com microesferas de goma gelana contendo glipizida e reticuladas com alumínio. A Figura 13 evidencia essa característica.

Figura 13 – Fotomicrografia evidenciando a superfície irregular característica das partículas (amostra 11L0,5-3; aumentos de 100 e 300x).



As figuras 14 a 17 apresentam as fotomicrografias das amostras estudadas, em que é possível observar que a incorporação de fármaco levou a uma maior irregularidade de superfície, provavelmente devido à maior deposição do fármaco nessa região.

Resultados e Discussão

Figura 14 – Fotomicrografias de microesferas de gelana:pectina na proporção 1:1 e 2% de concentração polimérica (aumento de 100x).

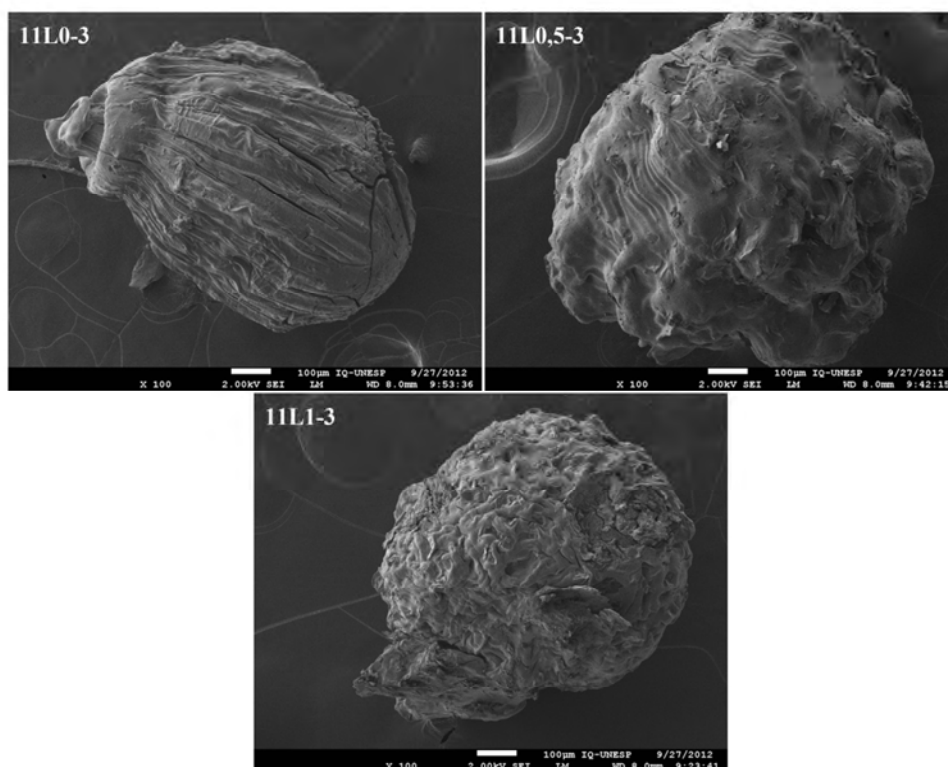


Figura 15 – Fotomicrografias de microesferas de gelana:pectina na proporção 1:1 e 4% de concentração polimérica (aumento de 100x).

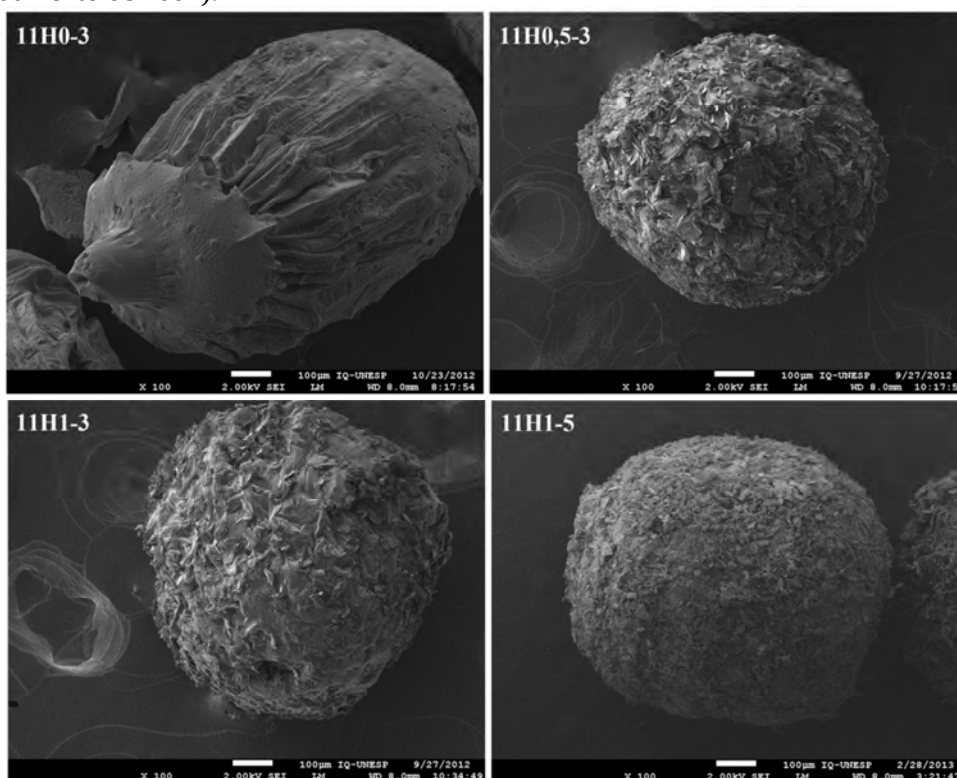


Figura 16 – Fotomicrografias de microesferas de gelana:pectina na proporção 4:1 e 2% de concentração polimérica (aumento de 100x).

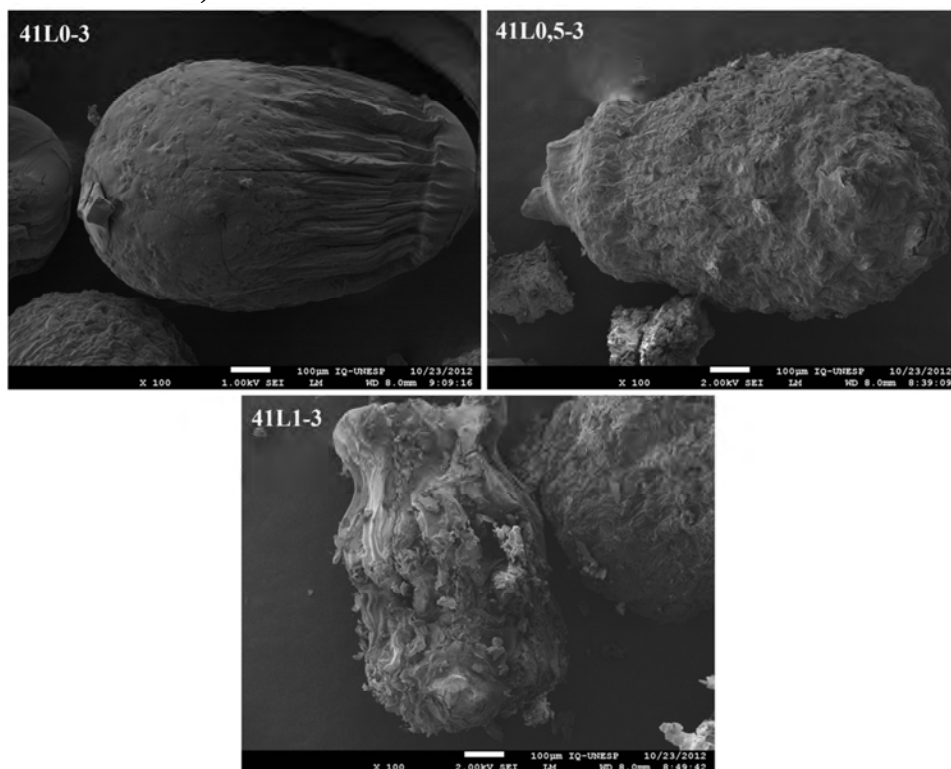
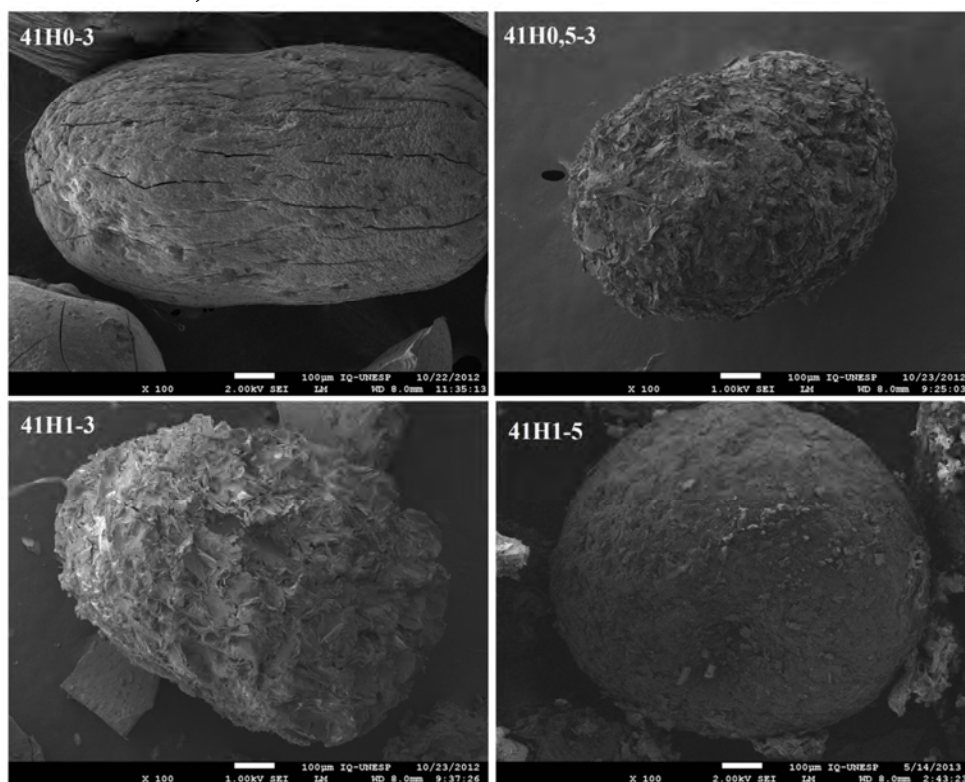
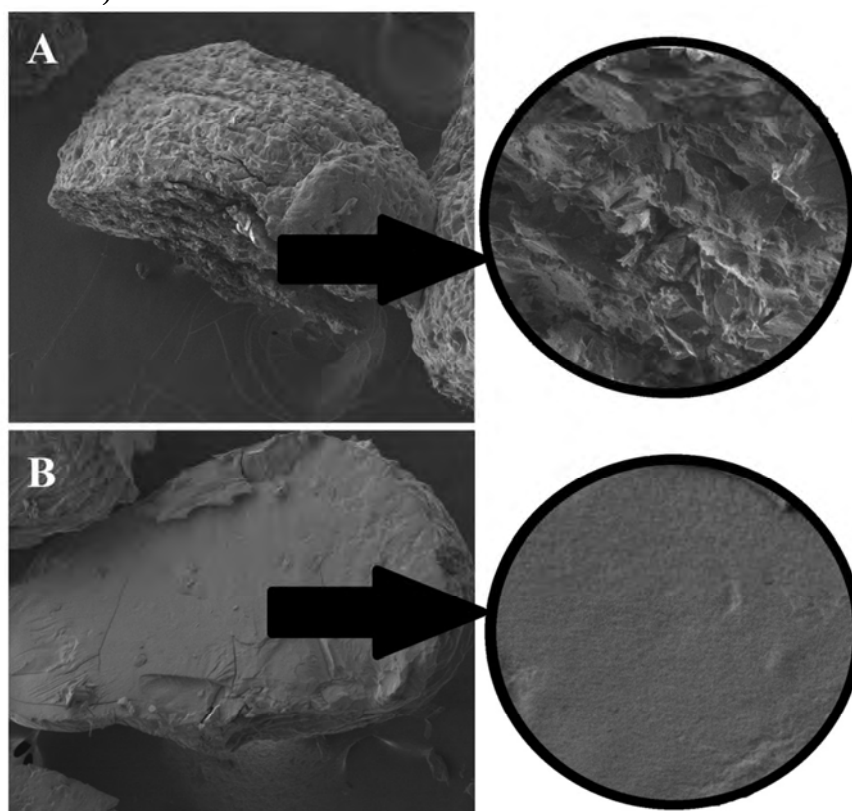


Figura 17 – Fotomicrografias de microesferas de gelana:pectina na proporção 4:1 e 4% de concentração polimérica (aumento de 100x).



Para avaliar a estrutura interna, as microesferas foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente fraturadas. Internamente é possível verificar uma matriz polimérica homogênea na ausência de fármaco, no entanto, na presença do fármaco verifica-se uma estrutura altamente irregular com a presença de poros, o que indica que o fármaco se interpõe entre as cadeias, expandindo a rede que adota uma estrutura diferente. A Figura 18 mostra a diferença entre partículas com e sem fármaco.

Figura 18 – Fotomicrografias evidenciando o interior de microesferas A) com fármaco e B) sem fármaco (aumentos de 100 e 1000x).



5.2.3 Rendimento

O rendimento das amostras (Tabela 3) variou entre 59,91 e 92,76% e os valores elevados indicam que a técnica de obtenção de microesferas pelo método de geleificação ionotrópica foi eficiente, sendo o rendimento médio entre todas as amostras de 79,37%.

Tabela 3 – Rendimento (%) do processo de obtenção de microesferas.

Amostra	Rendimento (%)
11L0-3	86,39
11L0,5-3	86,43
11L1-3	59,91
11H0-3	84,66
11H0,5-3	80,47
11H1-3	79,43
41L0-3	92,76
41L0,5-3	67,20
41L1-3	90,18
41H0-3	73,89
41H0,5-3	88,30
41H1-3	75,24
11H1-5	76,83
41H1-5	69,55

5.2.4 Avaliação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) representa a porcentagem de fármaco que realmente é encapsulado pelo sistema em relação à quantidade total adicionada (AHUJA *et al.*, 2010) e traduz a capacidade que a formulação possui de aprisionar o fármaco nas partículas formadas (OLIVEIRA, 2005). Maiores valores de EE% representam processos de obtenção mais eficientes.

A EE% das microesferas variou em um intervalo de 52,22 a 88,78% (Tabela 4), sendo a amostra com iguais proporções entre gelana:pectina e com baixas concentrações de polímeros e fármaco (11L0,5-3) a de menor EE% ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Valores de Eficiência de Encapsulação (EE%) das microesferas (média $\pm$ DP).

Amostra	EE %
11L0,5-3	52,22 $\pm$ 3,14
11L1-3	74,63 $\pm$ 8,68
11H0,5-3	72,67 $\pm$ 3,17
11H1-3	88,78 $\pm$ 2,16
41L0,5-3	84,89 $\pm$ 4,69
41L1-3	76,44 $\pm$ 4,38
41H0,5-3	74,27 $\pm$ 3,60
41H1-3	72,93 $\pm$ 3,15
11H1-5	84,54 $\pm$ 2,89
41H1-5	77,89 $\pm$ 1,22

A EE% elevada deve-se à baixa solubilidade do CP em meio aquoso, o que dificulta sua perda para a solução reticulante durante o processo de obtenção e na lavagem das microesferas (ELGINDY *et al.*, 2011). AGNIHOTRI *et al.* (2006) desenvolveram microesferas de goma gelana

reticuladas com mistura de íons cálcio e zinco para a liberação controlada de cefalexina e a EE% encontrada variou de 47,58 a 69,24%.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, para as amostras 1:1, o aumento das concentrações de fármaco e de polímeros levou ao aumento da EE% ($p < 0,05$), entretanto para as amostras 4:1 essas variáveis não influenciaram a EE%.

Para as amostras 1:1, o aumento da concentração de CP de 0,5% para 1,0% permitiu o aumento da EE%, o que deve estar relacionado com o aumento do diâmetro observado no item 5.2 (Tabela 2). Da mesma forma, o aumento da concentração de polímeros de 2 para 4% levou ao aumento da EE%, mesmo sem influenciar o diâmetro da partícula. Nesse caso, o aumento observado pode ser atribuído ao maior número de sítios disponíveis para a reticulação com íons Al^{3+} quando o polímero se encontra em maior concentração, originando redes com maior capacidade de aprisionamento do fármaco (NAYAK *et al.*, 2012).

A análise estatística mostrou que para as amostras de proporção 4:1 não houve diferença estatisticamente significativa entre elas ($p > 0,05$). Essa proporção também não apresentou diferenças entre o tamanho das partículas, o que pode explicar a mesma EE% para todas.

Não se observou uma correlação direta entre a alteração da proporção gelatina:pectina, de 1:1 para 4:1, e da concentração de Al^{3+} , de 3 para 5% com a EE% ($p > 0,05$).

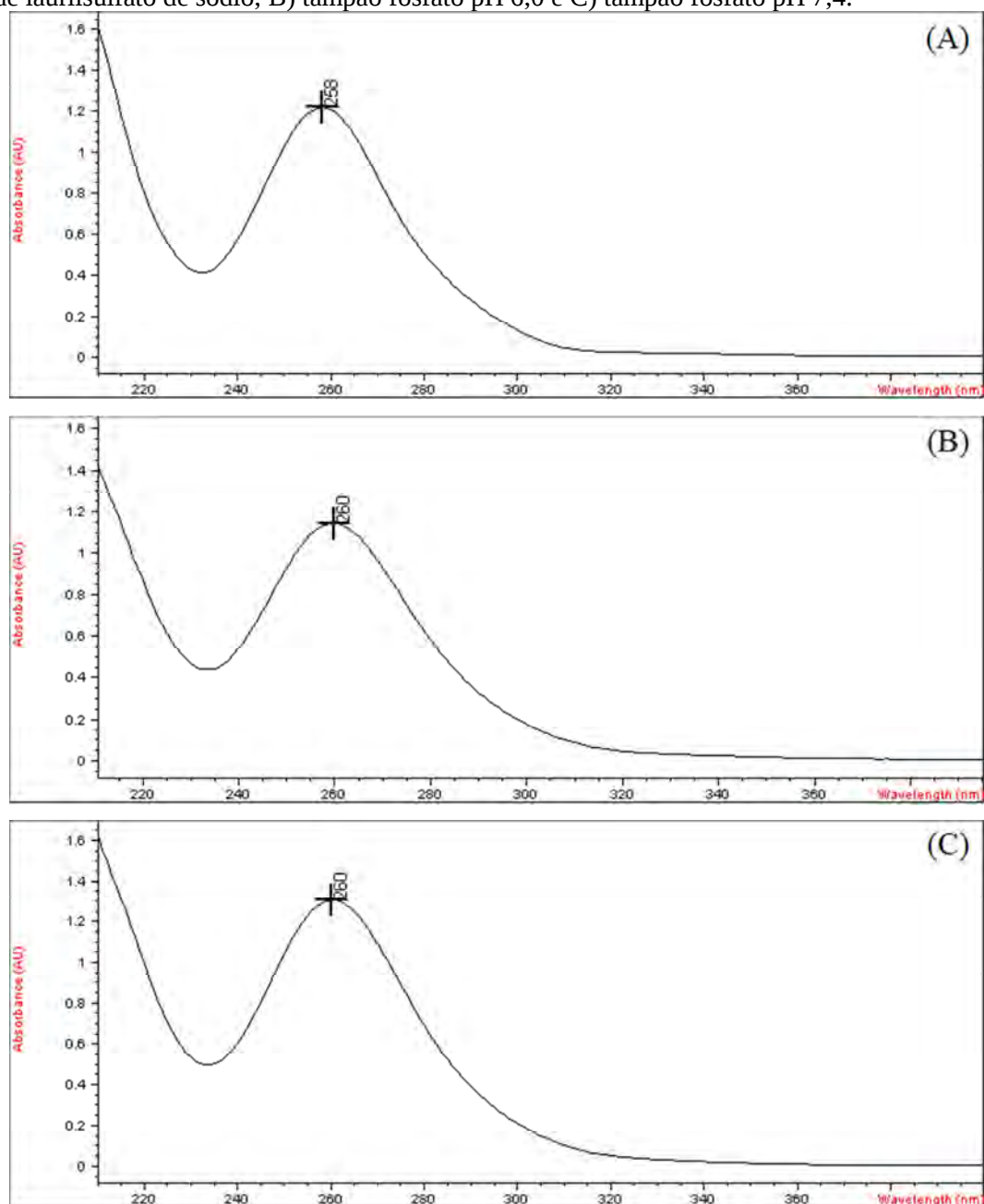
5.2.4.1 Validação de metodologia analítica para quantificação do cetoprofeno por espectrofotometria na região do ultravioleta

A validação foi feita para demonstrar que os métodos empregados para quantificar o fármaco encapsulado nas microesferas e liberado durante o teste de dissolução *in vitro* são adequados e atendem as exigências analíticas, gerando resultados confiáveis.

5.2.4.1.1 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do cetoprofeno na região do ultravioleta

A Figura 19 mostra os espectros de absorção de cetoprofeno na região do UV nos meios HCl 0,1 N com 0,75% de tensoativo laurilsulfato de sódio – pH 1,2; tampão fosfato pH 6,0 e tampão fosfato pH 7,4, com picos de máxima absorção em 258, 260 e 260 nm, respectivamente.

Figura 19 – Espectros de absorção na região do ultravioleta de cetoprofeno em A) HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; B) tampão fosfato pH 6,0 e C) tampão fosfato pH 7,4.



5.2.4.1.2 Especificidade/Seletividade

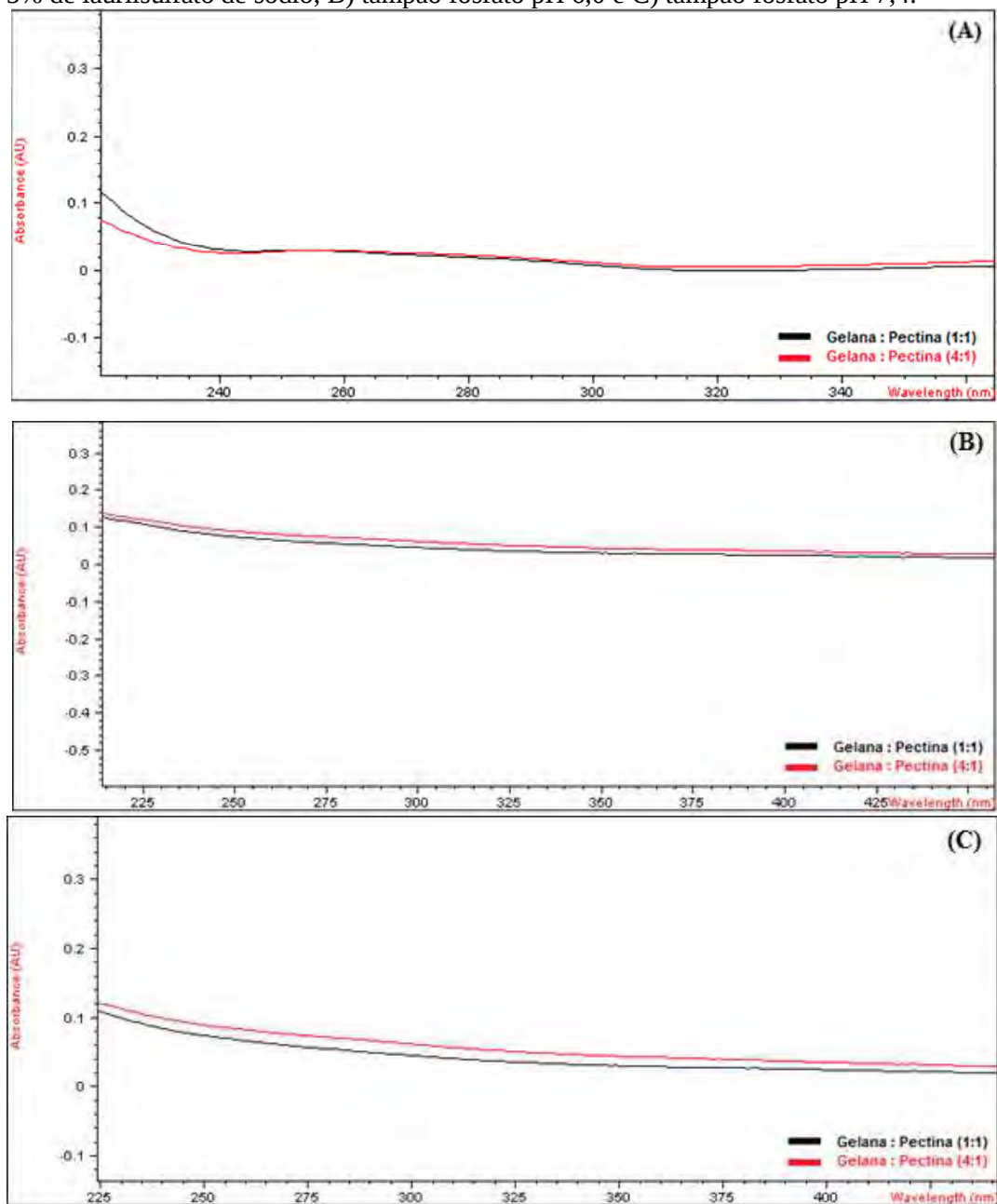
Especificidade/seletividade do método é sua capacidade de medir exatamente uma substância em presença de outras, como componentes do sistema, impurezas ou produtos de degradação, sem que estes interfiram significativamente no resultado. A especificidade/seletividade pode ser determinada analisando amostras contendo os possíveis interferentes que compõem o sistema. Um método específico e seletivo fornece resultados exatos que permitem uma definição acurada do conteúdo de fármaco na amostra. Caso a

Resultados e Discussão

especificidade/seletividade não seja comprovada, a linearidade e a precisão do teste podem ser afetadas (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011; USP, 2011b).

Os polímeros não apresentaram picos de absorção na região do UV (Figura 20), o que comprova que as absorbâncias mensuradas referem-se somente ao fármaco e que os métodos desenvolvidos são seletivos e específicos.

Figura 20 – Espectro de absorção na região do UV de misturas de gelana e pectina em A) HCl 0,1 N, pH 1,2 com 0,75% de laurilsulfato de sódio; B) tampão fosfato pH 6,0 e C) tampão fosfato pH 7,4.

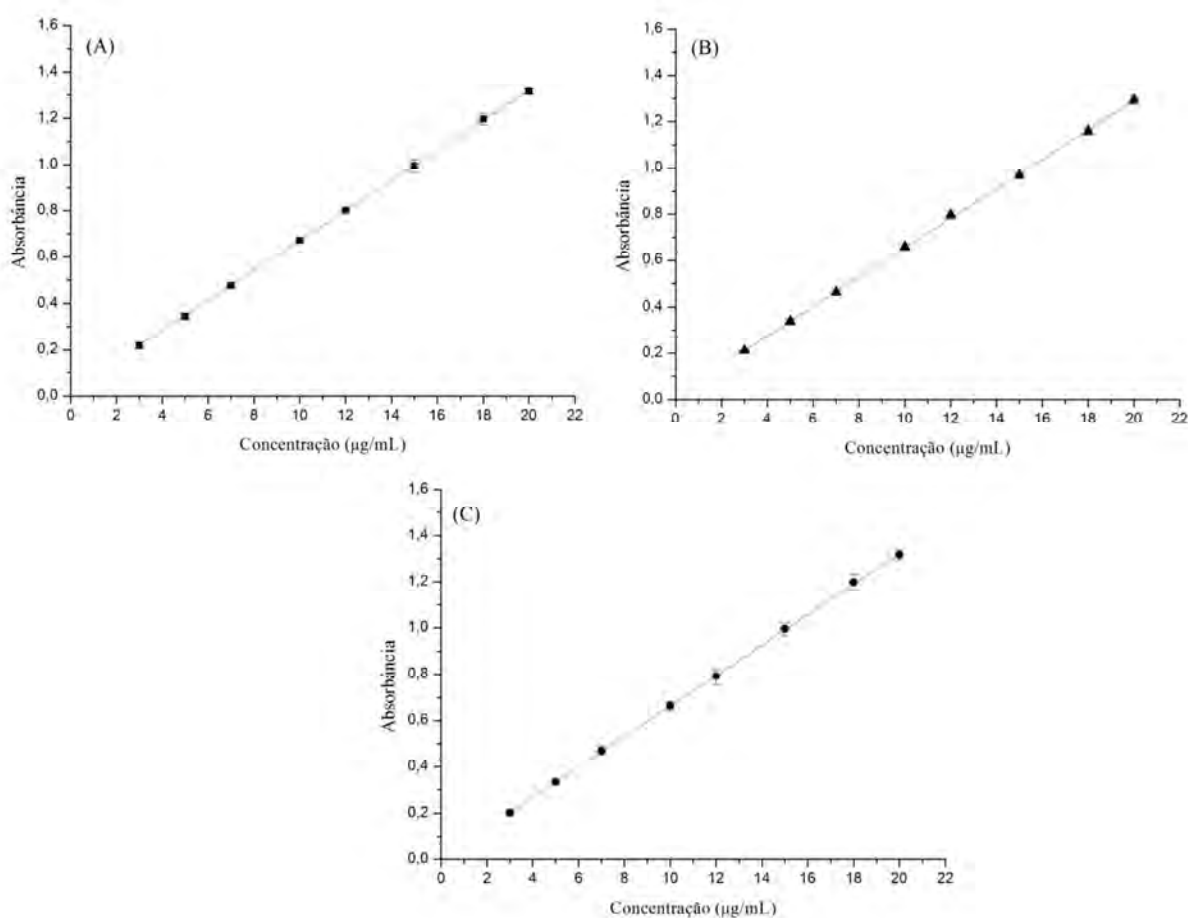


5.2.4.1.3 Linearidade

Linearidade de um método analítico é sua capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um dado intervalo (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011).

As curvas analíticas da absorbância em função da concentração de CP (Figura 21) foram obtidas a partir da média dos valores das absorbâncias lidas para cada concentração, nos comprimentos de onda de máxima absorção do fármaco.

Figura 21 – Curvas analíticas da absorbância em função da concentração de cetoprofeno em A) HCl 0,1 N com 0,75% de tensoativo – pH 1,2; B) tampão fosfato pH 6,0 e C) tampão fosfato pH 7,4.



Os dados obtidos a partir da regressão linear para as curvas analíticas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.

Parâmetros	HCl 0,1 N com 0,75% de tensoativo – pH 1,2	Tampão fosfato pH 6,0	Tampão fosfato pH 7,4
Faixa de linearidade (µg/mL)	3 – 20	3 – 20	3 – 20
Coefficiente angular	0,0648	0,0634	0,0658
Intercepto	0,0236	0,0223	0,0059
Coefficiente de correlação (r)	0,9999	0,9998	0,9999

Os coeficientes de correlação linear (r) obtidos estão em conformidade com o preconizado pela ANVISA, o que confirma a linearidade do método para o intervalo proposto.

5.2.4.1.4 Precisão

Precisão de um teste analítico é a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas feitas para uma mesma amostra. Existem três níveis de precisão, a intra-corridas ou repetibilidade, a inter-corridas ou intermediária e a inter-laboratorial ou reprodutibilidade (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2011b).

A repetibilidade avalia a concordância dos resultados obtidos por um mesmo analista, no mesmo local, utilizando o mesmo instrumento sob as mesmas condições, no menor espaço de tempo possível, em um único dia, por isso é também denominada de precisão intra-corridas. Por outro lado, a precisão intermediária avalia a concordância de resultados obtidos em diferentes dias por analistas distintos, podendo utilizar diferentes equipamentos, portanto indica a variabilidade que os resultados podem apresentar em um mesmo laboratório. Já a reprodutibilidade requer um estudo colaborativo, uma vez que avalia a concordância entre resultados obtidos em diferentes laboratórios, com analistas e equipamentos diferentes, por isso a denominação de inter-laboratorial (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2011).

A repetibilidade foi avaliada utilizando-se três diferentes concentrações, com três réplicas cada, contemplando o intervalo linear do método e a precisão intermediária foi avaliada por analistas diferentes, no mesmo laboratório, com resultados obtidos em dias diferentes, respeitando-se o intervalo mínimo de dois dias, conforme preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para os testes de repetibilidade.

Resultados e Discussão

Tabela 6 – Resultados obtidos para o teste de repetibilidade.

Meio	Concentração teórica (µg/ml)	Abs média	DP	CV (%)
HCl 0,1N com 0,75% tensoativo pH 1,2	5	0,357	0,005	1,52
	10	0,752	0,007	0,97
	15	1,023	0,011	1,07
Tampão fosfato pH 6,0	5	0,348	0,002	0,55
	10	0,675	0,003	0,50
	15	1,002	0,009	0,86
Tampão fosfato pH 7,4	5	0,340	0,005	1,49
	10	0,680	0,006	0,82
	15	1,008	0,005	0,51

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para os testes de precisão intermediária.

Tabela 7 – Resultados obtidos para o teste de precisão intermediária.

Meio	Concentração teórica (µg/ml)	Abs média	DP	CV (%)
HCl 0,1N com 0,75% tensoativo pH 1,2	5	0,366	0,010	2,65
	10	0,680	0,008	1,23
	15	1,032	0,011	1,06
Tampão fosfato pH 6,0	5	0,337	0,005	1,42
	10	0,668	0,014	2,05
	15	0,985	0,023	2,37
Tampão fosfato pH 7,4	5	0,342	0,006	1,70
	10	0,674	0,010	1,46
	15	1,000	0,012	1,20

O método proposto é preciso, visto que os CV obtidos para as diferentes concentrações analisadas, nos três meios testados, foram menores que 5%, conforme preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

5.2.4.1.5 Exatidão

Exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em relação ao valor admitido como verdadeiro. Valores próximos a 100% são desejáveis, porém admitem-se variações na faixa entre 80 – 120% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Os valores obtidos no teste de exatidão (Tabela 8) demonstram que a metodologia desenvolvida é adequada para a quantificação de cetoprofeno.

Tabela 8 – Resultados obtidos para o teste de exatidão.

Meio	Concentração teórica (µg/ml)	Concentração média experimental (µg/ml)	Exatidão (%)
HCl 0,1N com 0,75% tensoativo pH 1,2	5	4,99	99,88
	10	9,94	99,39
	15	15,42	102,78
Tampão fosfato pH 6,0	5	4,98	99,56
	10	10,18	101,76
	15	14,98	99,89
Tampão fosfato pH 7,4	5	4,98	99,69
	10	9,99	99,93
	15	15,04	100,26

5.2.4.1.6 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O LD é a menor concentração do analito na amostra que o método consegue detectar, diferenciando-o do ruído de fundo, mas não é necessariamente quantificado com exatidão. Já o LQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com níveis aceitáveis de exatidão e precisão pelo método desenvolvido (ICH, 2005). Os valores de LD e LQ obtidos são apresentados na Tabela 9 e demonstram que a metodologia desenvolvida é capaz de detectar e quantificar baixíssimas concentrações de fármaco nos meios testados.

Tabela 9 – Dados das curvas analíticas obtidas nos diferentes meios.

Parâmetros	HCl 0,1 N com 0,75% de tensoativo – pH 1,2	Tampão fosfato pH 6,0	Tampão fosfato pH 7,4
Limite de detecção (µg/mL)	0,27	0,29	0,17
Limite de quantificação (µg/mL)	0,89	0,97	0,56

5.2.5 Análises térmicas

Análise térmica compreende um grupo de técnicas utilizadas para estudar o efeito dos eventos térmicos, como o aquecimento, sobre uma substância, e estas são muito úteis para a área farmacêutica, uma vez que são capazes de fornecer informações importantes sobre estabilidade e comportamento térmico de fármacos e excipientes (GIRON, 2002).

5.2.5.1 DSC

A calorimetria exploratória diferencial (DSC –*Differential Scanning Calorimetry*) é uma das análises térmicas mais utilizadas na área farmacêutica (DUNCAN e MIKE, 2006), pois

permite avaliar a estabilidade térmica e oxidativa de fármacos e materiais biológicos, podendo até ser utilizada para determinação de pureza (BERNAL *et al.*, 2002).

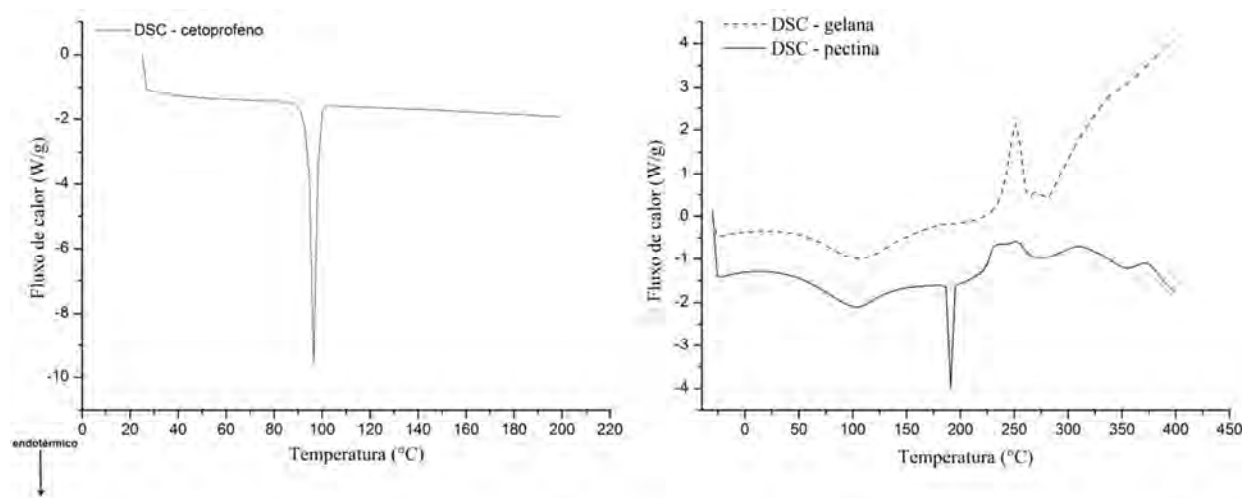
Durante o desenvolvimento de um novo produto, seja ele um novo fármaco ou uma nova forma farmacêutica para fármacos já existentes no mercado, é importante estudar as possíveis interações fármaco-excipientes, pois estas podem originar alterações químicas que afetam a resposta terapêutica de maneira positiva ou negativa (MURA *et al.*, 1995; TIȚA *et al.*, 2011).

O emprego da técnica de DSC permite avaliar tais interações, a partir de deslocamentos, surgimento ou desaparecimento de picos endo ou exotérmicos que podem ocorrer nas curvas DSC de uma amostra (MURA *et al.*, 1995).

No DSC, a amostra é submetida a um aquecimento ou resfriamento e mede-se a variação de entalpia entre a substância em análise e uma referência. Essa variação de entalpia está associada a vários eventos térmicos que a amostra pode sofrer, como fusão, cristalização, transição vítrea, reações de decomposição, dentre outros (BERNAL *et al.*, 2002; DUNCAN e MIKE, 2006)

As curvas DSC obtidas para o fármaco, a gelana e a pectina estão apresentadas na Figura 22.

Figura 22 – Curvas DSC obtidas para o cetoprofeno, a goma gelana e a pectina.



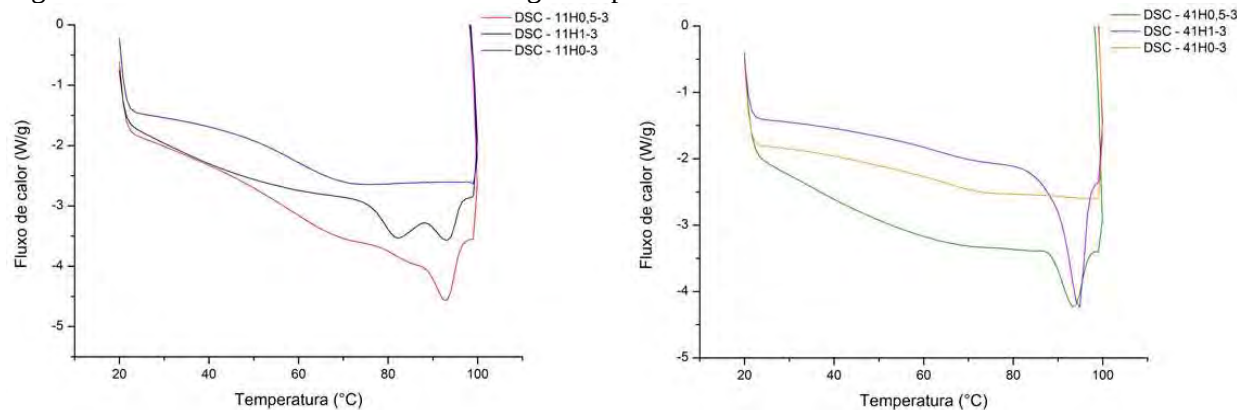
A curva de DSC do CP puro mostrou um único pico endotérmico que pode ser atribuído à fusão do fármaco, sendo $T_{\text{onset}} = 91,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{pico}} = 96,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, muito próximas às relatadas na literatura por MURA *et al.* (1999) ($T_{\text{onset}} = 91,6^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{pico}} = 95,8^{\circ}\text{C}$) e TIȚA *et al.* (2011) ($T_{\text{onset}} = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{pico}} = 96,8^{\circ}\text{C}$).

A curva de DSC da gelana mostrou um amplo pico endotérmico entre 70 e 140°C, correspondente à evaporação de água quimicamente ligada, e um pico exotérmico estreito entre 230 e 260 °C, que pode ser atribuído à degradação do polímero, ambos muito próximos aos observados e relatados por VERMA *et al.* (2012).

A curva de DSC da pectina, assim como a da gelana, também apresentou um pico largo entre 55 e 140°C, correspondente à perda de água quimicamente ligada. No entanto a pectina apresenta um estreito pico endotérmico adicional em 191°C, que pode ser atribuído à despolimerização das cadeias de pectina (SOARES *et al.*, 2013), e em 220°C aparece um pico exotérmico que pode ser atribuído à degradação do polímero (EINHORN-STOLL *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2013).

A Figura 23 apresenta as curvas DSC obtidas para as microesferas estudadas.

Figura 23 - Curvas DSC de microesferas de gelana:pectina.



As curvas representadas na Figura 23 demonstram que as amostras contendo fármaco apresentaram o pico de fusão do CP próximo a 95°C, o que pode ser confirmado pela ausência do pico nas amostras que não continham CP. O pico endotérmico, no entanto, apresenta-se mais largo que o pico do fármaco puro, o que pode ser atribuído à sobreposição do amplo efeito endotérmico causado pela desidratação dos polímeros (MURA *et al.*, 1995).

5.2.5.2 TG/DTG

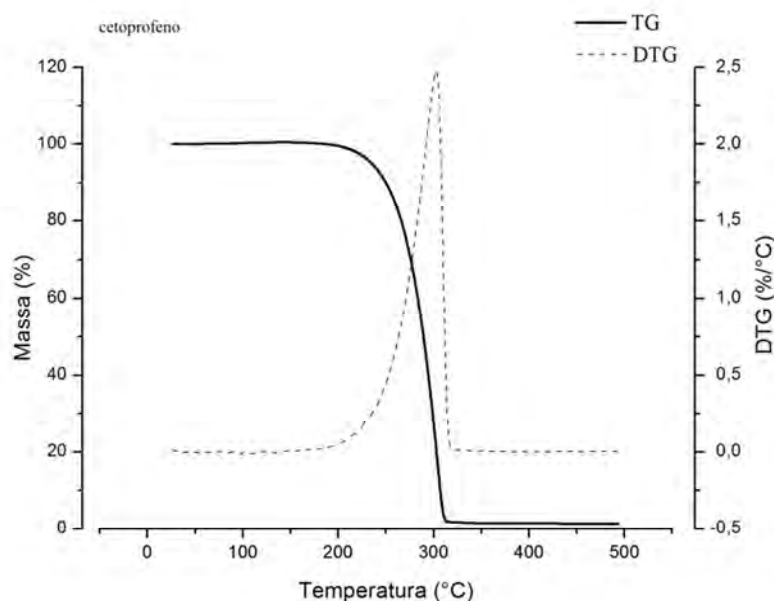
Na Termogravimetria (TG) a amostra é submetida a um aquecimento controlado e sua massa é avaliada em função da temperatura ou tempo (GROENEWOUD, 2001). É uma técnica muito utilizada, pois as mudanças na massa da amostra permitem obter informações importantes sobre composição, estabilidade térmica e até mesmo sobre estequiometria e cinética de reações (BROWN, 2001; GIRON, 2002).

Quando um sólido é aquecido, este pode sofrer mudanças físicas e químicas, tais como transição de fases, fusão, sublimação, decomposição, oxidação, porém nem todos os eventos térmicos são acompanhados de mudanças na massa da amostra. No caso dos processos de decomposição térmica, dessorção e oxidação, há variação de massa, assim curvas TG/DTG podem ser usadas para estudar condições experimentais que degradariam um polímero (BROWN, 2001), ou determinar desidratação e higroscopicidade da amostra (DA SILVA *et al.*, 2007).

A curva TG representa a perda de massa durante o aquecimento da amostra; já a curva DTG é a primeira derivada da curva TG e está relacionada com a velocidade de degradação (EINHORN-STOLL *et al.*, 2007).

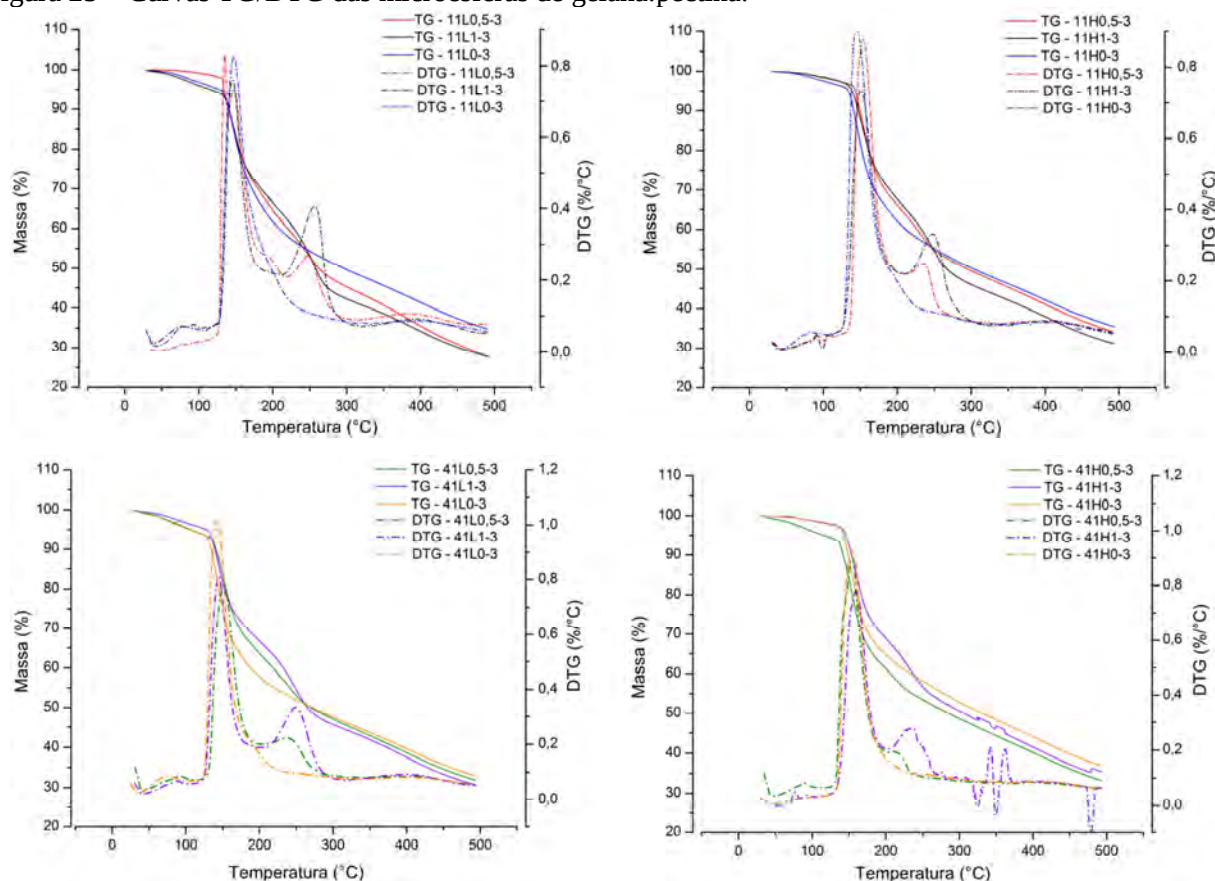
A curva TG do CP (Figura 24) apresenta uma única etapa de perda de massa, sendo esta atribuída à decomposição térmica do fármaco e ocorre entre 210 e 310°C, valores muito próximos foram observados por TIȦ *et al.* (2011). O pico da curva DTG ocorre em 303 °C e ao final do processo há uma perda de massa de 98,8%.

Figura 24 – Curvas TG/DTG do cetoprofeno.



As curvas TG/DTG das microesferas estudadas estão representadas na Figura 25.

Figura 25 – Curvas TG/DTG das microesferas de gelana:pectina.



Ao analisar as curvas TG, é possível observar que todas as amostras apresentaram um primeiro evento de discreta perda de massa, da ordem de 2 a 7,5%, representado por um pequeno pico alargado na curva DTG entre 50 e 100 °C, e que pode ser atribuído à perda de umidade por evaporação durante o processo de aquecimento (SOARES *et al.*, 2013).

Para as microesferas com fármaco, observa-se a decomposição térmica em duas etapas consecutivas, sendo um pico principal e estreito, entre 125 e 200 °C e um menor entre 200 e 300 °C.

O primeiro e maior pico da curva DTG pode ser atribuído à degradação dos polímeros e aparece na forma de um único pico integrado devido à reação de reticulação (SOARES *et al.*, 2013)

O segundo pico pode ser atribuído à degradação do cetoprofeno. Tal fato é comprovado pela ausência deste pico entre as amostras que não contêm CP e pela análise térmica do fármaco isolado, que demonstrou que sua degradação ocorre na mesma faixa de temperatura (Figura 24).

Para as amostras sem fármaco, a degradação ocorre em apenas uma etapa atribuída à decomposição dos polímeros, portanto um único pico pode ser observado nas curvas DTG.

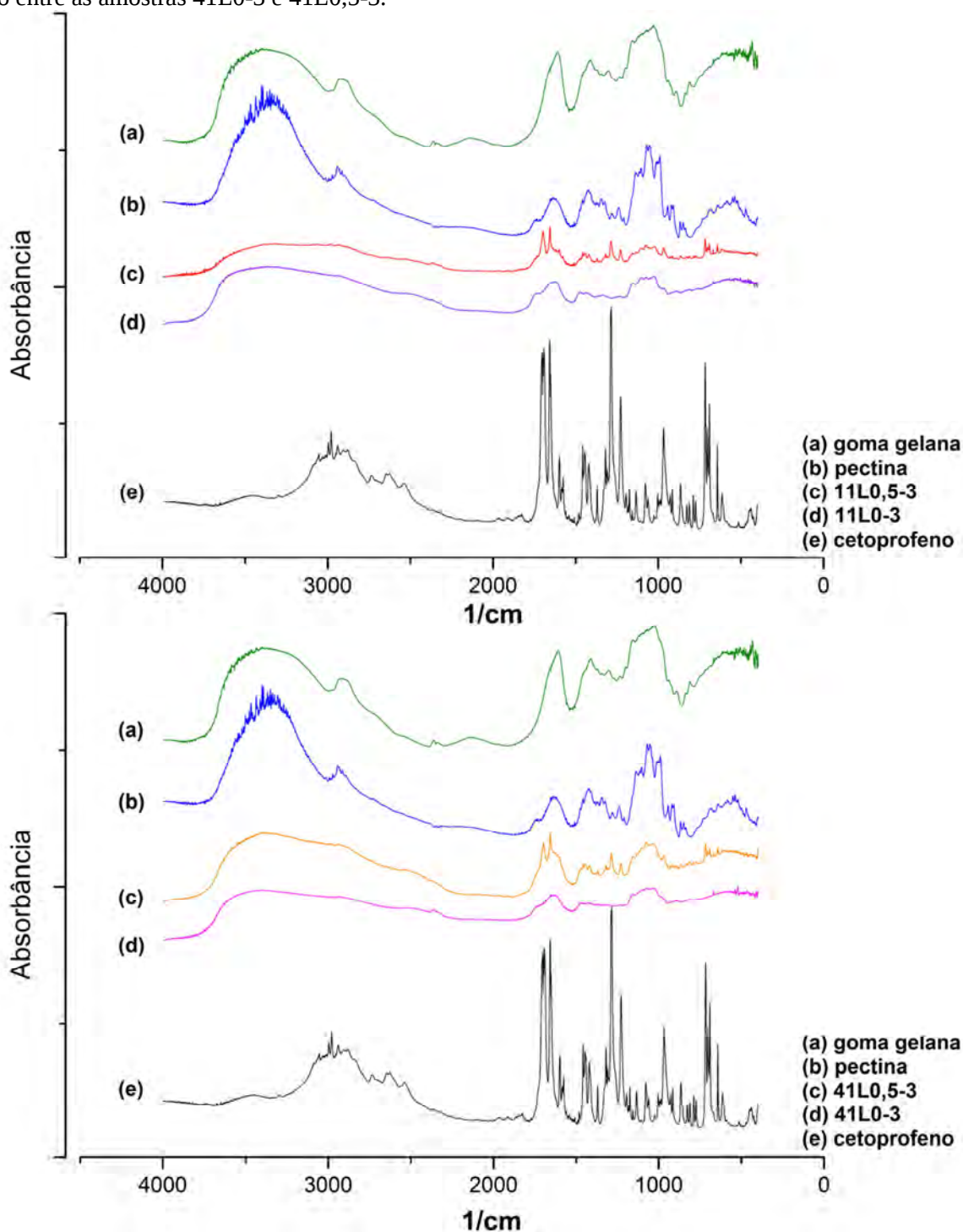
Os dados de análise térmica demonstram que as condições experimentais brandas do processo de obtenção de microesferas pelo método de geleificação ionotrópica evitaram a degradação dos polímeros ou do fármaco.

5.2.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia no infravermelho é um método que permite caracterizar compostos em nível molecular e estudar as interações intermoleculares entre diferentes compostos. A espectrometria com transformações de Fourier (FTIR) apresenta algumas vantagens, como a necessidade de pouca amostra por análise, ganho de tempo e sensibilidade, pois os espectros apresentam altas resoluções (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Para investigar possíveis interações entre fármaco e polímeros, analisou-se o fármaco puro, os polímeros isoladamente e microesferas com e sem CP. A Figura 26 mostra os espectros obtidos.

Figura 26 – Espectros obtidos por FTIR. (1) comparação entre as amostras 11L0-3 e 11L0,5-3 e (2) comparação entre as amostras 41L0-3 e 41L0,5-3.



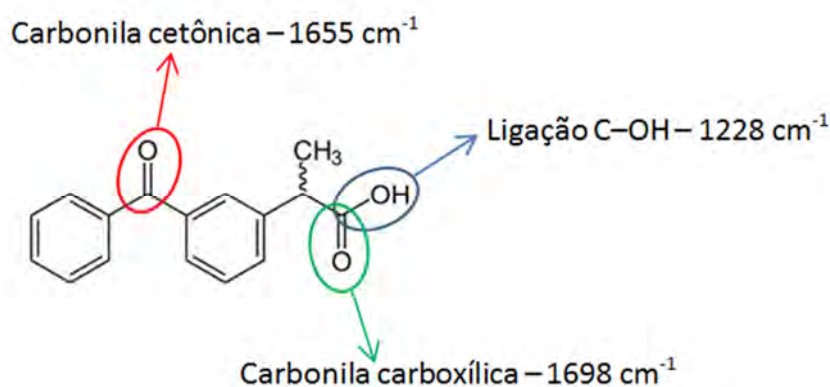
No espectro da gelana é possível identificar uma banda larga entre 3650 e 3100 cm^{-1} referente a hidroxilas do anel da glicopirranose, que formam ligações de hidrogênio em vários graus. A banda em 2925 cm^{-1} é referente à deformação axial de grupos $-\text{CH}_2$, enquanto as bandas em 1609 e em 1418 cm^{-1} ocorrem devido à presença de ânions carboxilato (COO^-). Uma banda

em 1157 cm^{-1} e uma próxima a 1050 cm^{-1} correspondem à deformação axial de ligações C–O etérea e hidroxílica, respectivamente (AGNIHOTRI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2012).

Assim como para a gelana, no espectro da pectina verifica-se uma banda larga entre 3600 e 3100 cm^{-1} referente à deformação axial de hidroxilas (–OH) que participam de ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares. Bandas que podem ser atribuídas a deformações axiais simétricas e assimétricas de ligações C–H ocorrem entre 3000 e 2800 cm^{-1} . Uma banda característica em 1745 cm^{-1} pode ser vista e corresponde à deformação axial de C=O de metil éster, porém esta é discreta, uma vez que se trata de pectina de baixa metoxilação. Outra banda característica ocorre em 1617 cm^{-1} devido à deformação axial de C=O de ânion carboxilato (COO^-) (GNANASAMBANDAM e PROCTOR, 2000; SRIAMORNSAK *et al.*, 2008).

No espectro do CP é possível verificar uma banda larga entre 3300 e 2700 cm^{-1} devido a deformação axial do grupamento –OH que faz ligações de hidrogênio e bandas acima de 3000 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformação axial de ligações C–H. Bandas fortes e características do fármaco aparecem em 1698 cm^{-1} , referente à deformação axial de C=O carboxílica, e 1655 cm^{-1} , referente à deformação axial de C=O cetônica (Figura 27). Bandas em 1598 , 1575 e 1445 cm^{-1} são referentes às ligações C=C dos anéis aromáticos. Outra banda característica desse fármaco é a da deformação angular no plano da ligação C–OH que aparece em 1228 cm^{-1} (VUEBA *et al.*, 2006; YADAV *et al.*, 2011; LIU e GAO, 2012).

Figura 27 – Bandas características do cetoprofeno.



Os espectros das microesferas carregadas de fármaco (11L0,5-3 e 41L0,5-3) apresentaram picos fortes em 1698 e 1655 cm^{-1} , característicos do cetoprofeno, enquanto estes estavam ausentes nos espectros das microesferas controle (11L0-3 e 41L0-3), o que indica que o fármaco está intacto no interior das partículas e permanece fisicamente aprisionado aos polímeros.

5.2.7 Determinação da capacidade de absorção de líquidos

Um parâmetro importante a ser considerado no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada utilizando-se polímeros hidrofílicos é sua capacidade de intumescimento, ou seja, de absorção de líquidos, pois fornece informações importantes para o entendimento da cinética de liberação do fármaco (MAITI *et al.*, 2011).

Quando um fármaco é administrado oralmente, ele é exposto aos diferentes conteúdos do TGI e a grandes variações de pH ao passar pelo esôfago, estômago, intestino e cólon (MAITI *et al.*, 2011). O pH do TGI aumenta de aproximadamente 1,2 – 3 no estômago, dependendo do estado de jejum ou alimentado, para 7 – 8 no intestino e depois diminui novamente entre 5,5 – 7 no cólon, devido a acidificação causada pelos produtos de fermentação das bactérias presentes nesta região (GUPTA *et al.*, 2001; MAITI *et al.*, 2011). Deste modo, a análise de intumescimento foi realizada em meios com valores de pH que simulam os diferentes ambientes do TGI.

A capacidade de absorver líquidos também está relacionada com a proteção do fármaco durante o trânsito no TGI e com a degradabilidade do sistema, pois para a degradação enzimática ocorrer, é necessário o acesso aos sítios de clivagem pelas enzimas, que é dependente da entrada de líquidos na rede polimérica (YIN *et al.*, 2001; PREZOTTI *et al.*, 2012).

Além disso, ao absorver e reter o solvente no interior da rede polimérica, o arranjo entre as cadeias é modificado, permitindo assim que o fármaco aprisionado seja liberado (COLOMBO *et al.*, 2000).

O percentual de líquido absorvido após 90 minutos está apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados de % de líquido absorvido pelas microesferas nos diferentes meios analisados (HCl 0,1N pH 1,2; tampão fosfato pH 7,4 e pH 6,0) em t=90 min (média±DP).

Amostra	Líquido absorvido (%)		
	HCl 0,1N pH 1,2	Tampão fosfato pH 7,4	Tampão fosfato pH 6,0
11L0-3	321,85 ± 33,66	238,89 ± 11,47	246,79 ± 25,51
11L0,5-3	293,54 ± 50,70	276,68 ± 18,84	248,51 ± 14,76
11L1-3	266,18 ± 15,12	258,19 ± 0,36	243,06 ± 7,70
11H0-3	276,17 ± 24,94	233,71 ± 6,54	200,96 ± 14,08
11H0,5-3	285,43 ± 19,36	277,50 ± 27,64	273,30 ± 0,57
11H1-3	284,31 ± 35,76	263,16 ± 6,28	237,29 ± 16,16
41L0-3	268,20 ± 42,09	310,53 ± 0,64	236,55 ± 4,08
41L0,5-3	280,93 ± 9,52	216,04 ± 25,80	252,10 ± 32,66
41L1-3	216,97 ± 12,46	219,67 ± 28,09	209,76 ± 20,41
41H0-3	208,13 ± 26,41	185,19 ± 18,16	189,05 ± 20,44
41H0,5-3	241,08 ± 45,13	248,02 ± 30,85	257,91 ± 21,53
41H1-3	283,55 ± 67,85	244,14 ± 2,36	217,39 ± 41,90
11H1-5	269,73 ± 50,77	233,25 ± 9,11	197,43 ± 5,92
41H1-5	180,00 ± 35,36	207,51 ± 20,96	187,75 ± 43,14

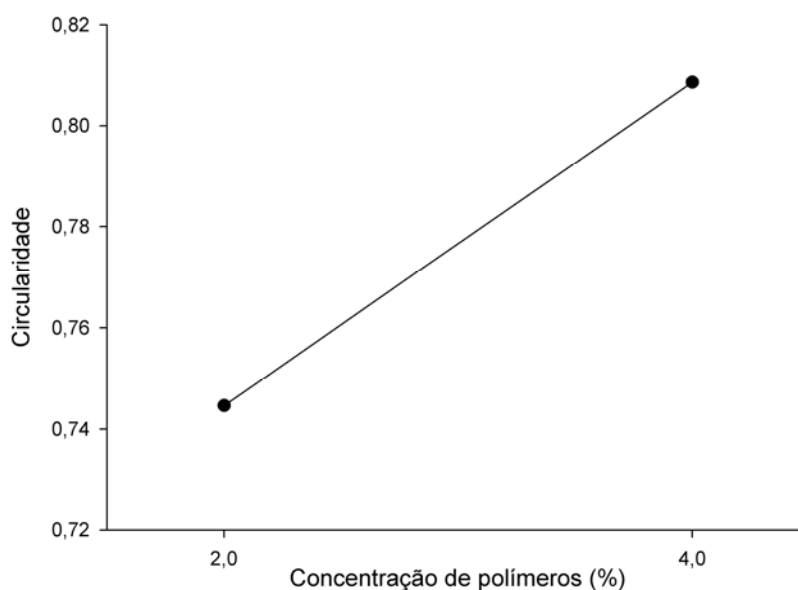
A goma gelana e a pectina têm a capacidade de formar hidrogéis, que são redes tridimensionais reticuladas formadas por polímeros hidrofílicos, capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos orgânicos, mantendo sua estrutura tridimensional (GUPTA *et al.*, 2002). As amostras apresentaram elevada capacidade de absorção de líquidos, com resultados variando de 180,00 a 321,85 %.

A análise estatística mostrou que tanto o pH do meio quanto as variáveis estudadas (proporção gelana:pectina, concentração de polímero, fármaco e reticulante) não influenciaram de maneira significativa o comportamento de intumescimento das microesferas ($p > 0,05$).

5.3 Seleção de amostras para estudos de mucoadesão e dissolução

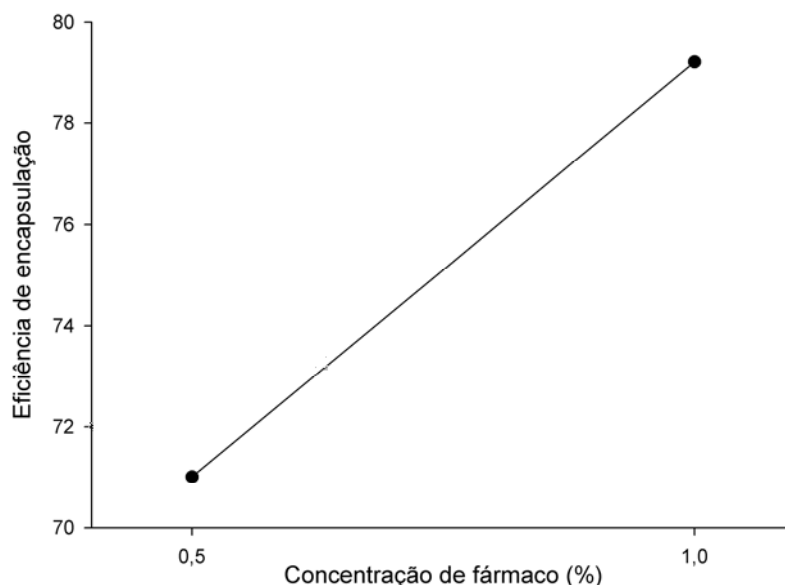
De modo geral, amostras de maior concentração de polímeros (4%) apresentaram maior circularidade, como é possível observar na Figura 28.

Figura 28 – Relação entre concentração de polímeros e circularidade das microesferas.



Já a maior concentração de fármaco (1%) levou a maiores eficiências de encapsulação (Figura 29).

Figura 29 – Relação entre a concentração de cetoprofeno e a eficiência de encapsulação das microesferas.

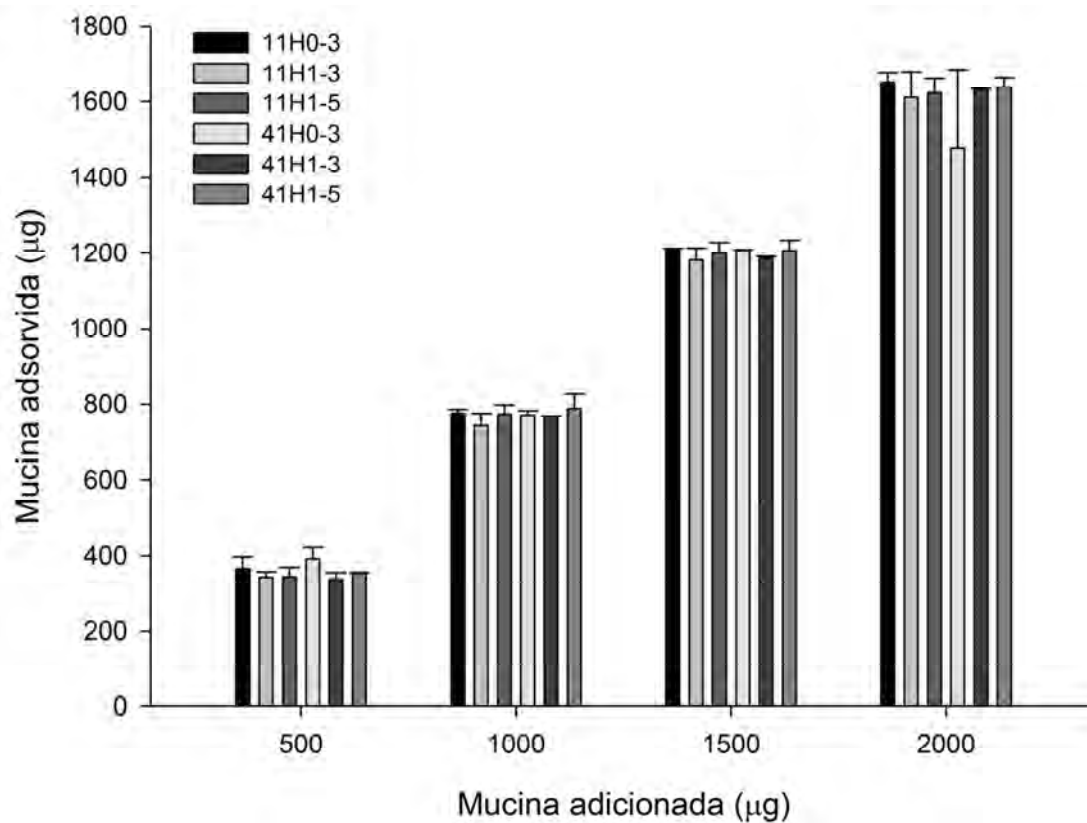


Sendo assim, foram selecionadas as amostras obtidas com maiores concentrações de polímeros e de fármaco, nas diferentes concentrações de reticulante (11H1-3, 11H1-5, 41H1-3 e 41H1-5) para os estudos de dissolução e mucoadesão, sendo que para este último ensaio, os controles 11H0-3 e 41H0-3 também foram utilizados.

5.4 Estudo da mucoadesividade in vitro

A capacidade mucoadesiva dos polímeros está relacionada à flexibilidade de suas cadeias e à presença de grupos funcionais capazes de interagir com os grupos funcionais do muco. Porém, quando se realiza uma reação de reticulação, tanto a flexibilidade quanto o número de grupos funcionais livres podem ser reduzidos e interferir na mucoadesão do sistema (CRCAREVSKA *et al.*, 2008).

Figura 30 – Concentração de mucina adsorvida nas microesferas.



Para todas as amostras, a quantidade de mucina adsorvida aumentou com o aumento da quantidade de mucina adicionada (Figura 30). O mesmo comportamento foi observado por SONIA e SHARMA (2011) para micropartículas de quitosana modificada e não modificada para liberação oral de insulina, obtidas por geleificação ionotrópica.

As amostras apresentaram valores de adsorção de mucina bastante superiores (cerca de 4x) aos relatados por DHAWAN *et al.* (2004) em estudos com microesferas de quitosana. Os elevados percentuais de mucina adsorvida (68 a 83%) demonstram a elevada capacidade mucoadesiva das microesferas.

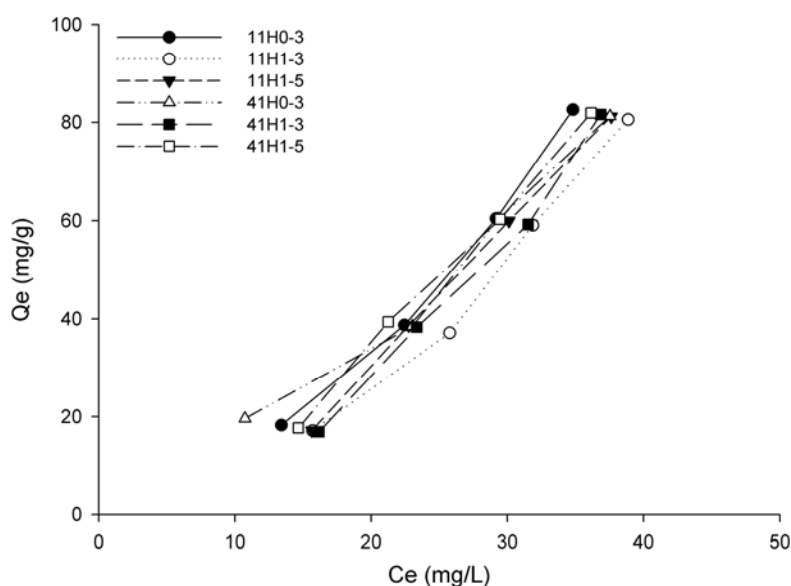
Para cada concentração de mucina, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na quantidade de mucina adsorvida, o que demonstra que a proporção polimérica, a quantidade de reticulante (3 ou 5%) e a presença do fármaco não influenciaram a capacidade mucoadesiva das microesferas.

5.4.1 Isotermas de adsorção da mucina

Uma isoterma de adsorção é uma representação gráfica da relação entre quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorbente *versus* a quantidade de soluto livre no sobrenadante, a partir deste gráfico é possível avaliar a distribuição da mucina adsorvida nas microesferas e livre no sobrenadante (SNOEYINK e SUMMERS, 1990; NG *et al.*, 2002).

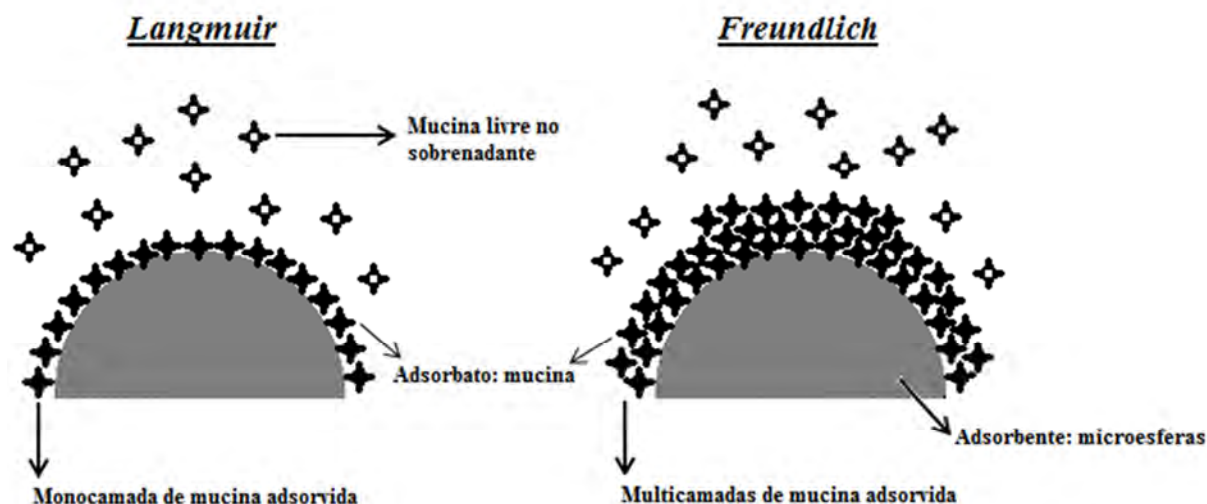
As isotermas de adsorção da mucina nas diferentes amostras avaliadas estão representadas na Figura 31.

Figura 31 – Isotermas de adsorção da mucina nas diferentes microesferas avaliadas.



Vários modelos teóricos são empregados para descrever o fenômeno de adsorção. O modelo de Langmuir é usualmente aplicado para processos em que a adsorção ocorre em uma monocamada (Figura 32), e considera uma distribuição homogênea do soluto por toda a superfície do adsorbente, neste caso as microesferas. Este modelo é aplicável quando existe uma forte interação entre a superfície e o adsorbato, neste caso a mucina, que leva à formação da monocamada (NG *et al.*, 2002).

Figura 32 – Adsorção da mucina segundo os modelos teóricos de Langmuir e Freundlich.



O modelo de Freundlich é adequado para a adsorção de um único soluto e baseia-se na distribuição multicamadas deste soluto na fase sólida. Este modelo assume uma superfície heterogênea com uma distribuição de calor de adsorção não uniforme sobre a superfície do adsorbente (FREUNDLICH e HATFIELD, 1926; SNOEYINK e SUMMERS, 1990; NG *et al.*, 2002; GUO e GEMEINHART, 2008), e foi o que demonstrou melhor correlação com os dados de adsorção da mucina (Tabela 11).

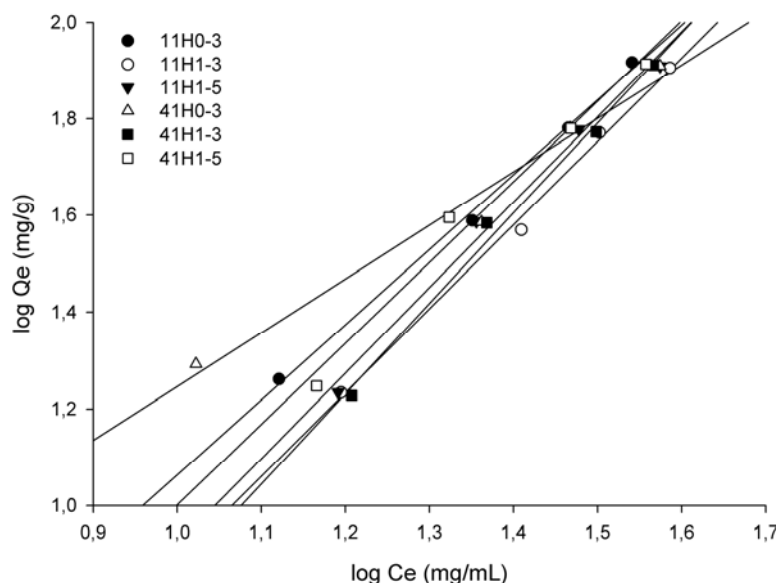
Foi realizada a linearização dos dados (Figura 33), pois isotermas que podem ser bem descritas pelo modelo de Freundlich se transformam em linhas retas (RAMPEY *et al.*, 2004) e os parâmetros k e n foram obtidos a partir de uma regressão linear simples, através da (Equação 13):

$$\log Q_e = \log k + \frac{1}{n} \log C_e \quad (\text{Equação 13})$$

Tabela 11 – Parâmetros do modelo da isoterma de Freundlich obtidos a partir da regressão linear das curvas de $\log C_e$ vs $\log Q_e$.

Amostra	k	Freundlich	
		1/n	r ²
11H0-3	0,327	1,550	0,997
11H1-3	0,144	1,731	0,996
11H1-5	0,143	1,765	0,989
41H0-3	1,374	1,109	0,976
41H1-3	0,098	1,866	0,992
41H1-5	0,215	1,669	0,983

Figura 33 – Isotermas de adsorção de Freundlich para mucina adsorvida nas diferentes microesferas.



Para o modelo de Freundlich, baixos valores de $1/n$ indicam que a interação na adsorção é forte e quanto menor fica, mais independente de C_e é a adsorção; já os valores de $1/n > 1$ indicam uma fraca interação durante a adsorção e que os valores de quantidade de adsorbato adsorvido por massa de adsorbente (Q_e) sofrem alterações mesmo com pequenas mudanças na concentração da solução (C_e) (SNOEYINK e SUMMERS, 1990), de modo que os valores de $1/n$ obtidos (Tabela 11) estão de acordo com os dados de adsorção observados, em que verificou-se aumento da quantidade de mucina adsorvida em função do aumento da concentração da glicoproteína no meio.

Os elevados valores de $1/n$ indicam uma interação fraca entre as microesferas e a mucina. Considerando que as soluções de mucina utilizadas no estudo apresentavam valor de pH (4,79) superior ao pK_a dos materiais (goma gelana - $pK_a=3,5$; pectina - pK_a 3-4; mucina - $pK_a=2,6$), as estruturas devem apresentar-se carregadas negativamente, devido à ionização dos grupos carboxílicos e, dessa forma, interações hidrofóbicas e/ou ligações de hidrogênio devem ser as responsáveis pela interação (SRIAMORNSAK *et al.*, 2010).

5.5 Estudo da liberação do fármaco

5.5.1 Avaliação da solubilidade do cetoprofeno

Como a solubilidade é um parâmetro determinante para o teste de liberação, uma vez que é necessário trabalhar nas condições *sink*, a solubilidade do cetoprofeno foi determinada nos meios

Resultados e Discussão

de dissolução utilizados, através do método do equilíbrio, no qual o fármaco é adicionado em excesso para garantir a saturação da solução (PEZZINI e FERRAZ, 2007; TONG e WEN, 2008).

As solubilidades encontradas estão representadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Solubilidade (mg/mL) do cetoprofeno em diferentes meios.

Meio	Solubilidade (mg/mL)
HCl 0,1N pH 1,2	0,12
HCl 0,1N pH 1,2 com 0,5% laurilsulfato de sódio	0,90
HCl 0,1N pH 1,2 com 0,75% laurilsulfato de sódio	1,35
HCl 0,1N pH 1,2 com 1% laurilsulfato de sódio	2,34
Tampão fosfato pH 6,0	1,63
Tampão fosfato pH 7,4	10,45

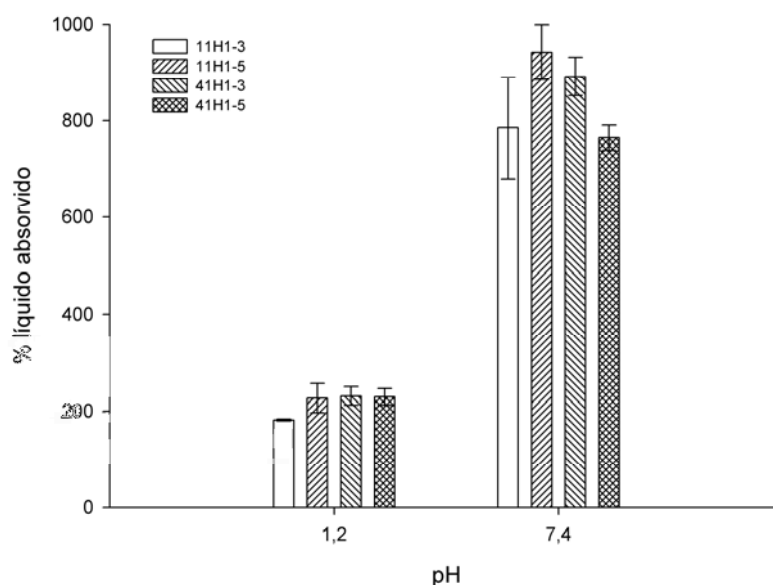
O efeito da adição de tensoativo na solubilidade do cetoprofeno foi avaliado em HCl 0,1N, e os resultados mostram que a adição de 0,5% de laurilsulfato de sódio aumentou a solubilidade do fármaco em 7,5 vezes; com 0,75% a solubilidade foi 11,25 vezes maior e 19,5 vezes maior para adição de 1% do tensoativo. A concentração de 0,75% de laurilsulfato de sódio foi a escolhida para o meio de dissolução, pois foi a menor concentração que permitiu trabalhar em condições *sink*.

Comparando-se os meios sem tensoativo, é possível comprovar a solubilidade pH-dependente do fármaco. A maior solubilidade do CP ocorreu em tampão fosfato pH 7,4 e pode ser explicada devido ao caráter ácido do fármaco. Por se tratar de um ácido fraco ($pK_a \sim 4,6$) sua solubilidade aumenta com o aumento do pH, sendo muito mais solúvel em valores de $pH \gg pK_a$ (GENNARO, 2004; PEZZINI e FERRAZ, 2007).

5.5.2 Avaliação do intumescimento e erosão

O comportamento de intumescimento das amostras é apresentado na Figura 34. Os dados evidenciam o comportamento de intumescimento pH dependente das partículas, em que a capacidade de absorção de líquidos em pH 7,4 foi até 5,5 vezes maior que em pH 1,2. Tal comportamento não pôde ser evidenciado através do teste de absorção de líquidos utilizando o dispositivo de Enslin (seção 5.2.7).

Figura 34 – Intumescimento das microesferas 11H1-3, 11H1-5, 41H1-3 e 41H1-5.

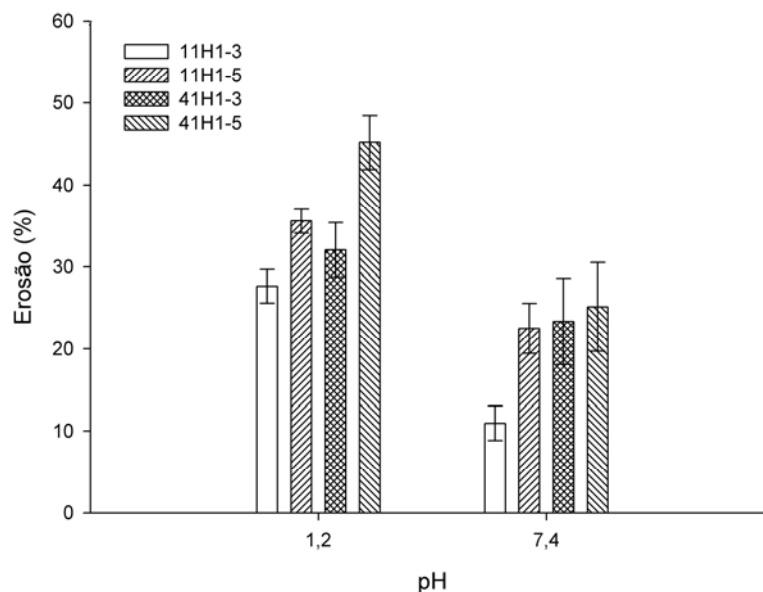


Tanto a goma gelana quanto a pectina são polieletrólitos aniônicos e a alteração do pH afeta a conformação das cadeias (NARKAR *et al.*, 2010). Em pH ácido, há predomínio de íons H^+ , que leva à protonação dos grupamentos carboxílicos, reduzindo a repulsão eletrostática, assim as cadeias podem se aproximar dificultando a penetração de líquido no sistema (BAJPAI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SOUTO-MAIOR *et al.*, 2010). Já em valores de pH mais elevados, os grupos carboxílicos permanecem em sua forma ionizada, o que aumenta a hidrofília e promove a expansão da rede por repulsão eletrostática, ambos fatores que favorecem a entrada de líquido no sistema. Deste modo, os polímeros apresentaram maior capacidade de intumescimento em pH 7,4.

Para a amostra 41H1-5, em tampão pH 7,4, o aumento da concentração de agente reticulante levou à redução da capacidade de absorção de líquidos ($p < 0,05$), o que indica que o maior grau de reticulação deve ter permitido a formação de uma rede polimérica mais rígida e com malhas de menores dimensões, o que desfavorece a entrada de líquido (BANERJEE *et al.*, 2012). Por outro lado, a menor capacidade de absorção dessa amostra em relação à 11H1-5 deve ser atribuída à menor proporção de pectina em sua estrutura, uma vez que a maior proporção de pectina deve favorecer a hidrofília do sistema.

O comportamento de erosão das amostras está apresentado na Figura 35.

Figura 35 – Erosão (%) das microesferas após exposição aos meios HCl 0,1N pH1,2 e tampão fosfato pH 7,4 (média $\pm$ DP; n=3).

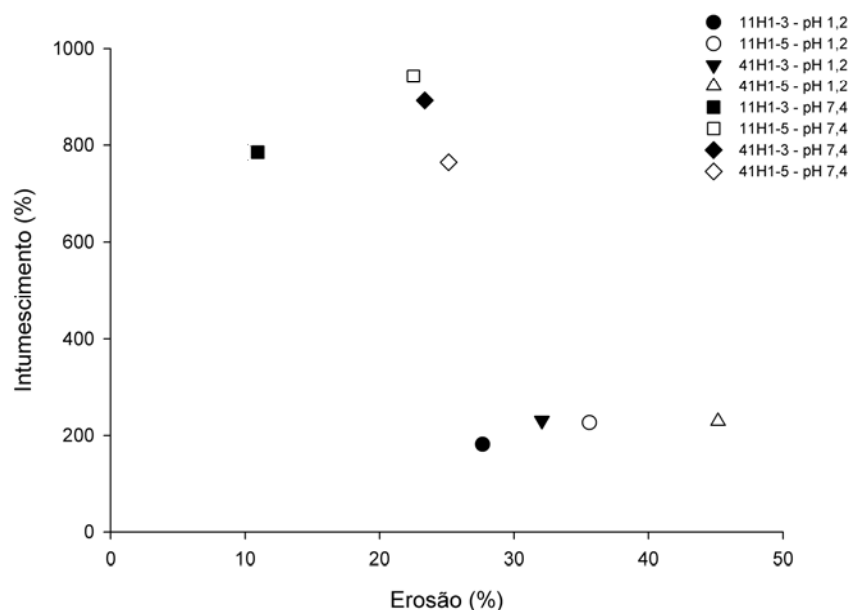


As microesferas sofreram uma maior erosão em meio ácido chegando a valores 4x maiores que em tampão pH 7,4 ($p < 0,05$), sendo a amostra 41H1-5 a que apresentou a maior perda de massa em meio ácido (aproximadamente 45%) ($p < 0,05$).

A elevada perda de massa dessa amostra sugere que a maior reticulação deve ter originado uma rede mais rígida e empacotada, e a entrada de água nessa estrutura deve provocar uma elevada pressão hidrostática nas cadeias poliméricas, resultando na ruptura das cadeias ou mesmo dos pontos de reticulação.

Analisando-se o gráfico apresentado na Figura 36, pode-se observar que, de modo geral, em pH 1,2 houve predomínio da erosão das microesferas, e em pH 7,4 houve predomínio do intumescimento. Em pH ácido, a rede deve permanecer mais fechada devido à protonação dos grupos carboxílicos e, apesar do baixo intumescimento (Figura 34), a quantidade de água que entra no sistema é capaz de exercer pressão suficiente para desestruturar a rede polimérica. Por outro lado, a maior hidrofilia do sistema em pH 7,4 deve permitir maior acomodação de moléculas de água no interior da rede, já que a ionização dos grupos carboxílicos leva ao afastamento das cadeias e expansão da rede por repulsão eletrostática, mantendo a conformação tridimensional da rede.

Figura 36 – Comportamento de erosão e intumescimento das microesferas após exposição aos meios com diferentes valores de pH.

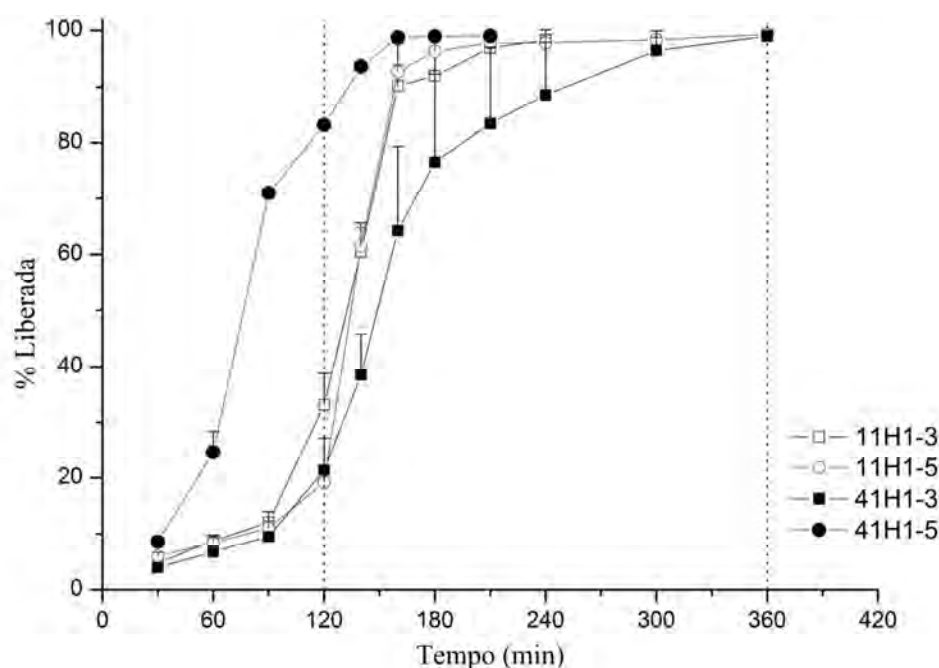


5.5.3 Determinação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco

Para que o fármaco possa ser absorvido após sua administração, é necessário que ocorra sua dissolução, ou seja, suas moléculas devem ser liberadas da forma farmacêutica como uma dispersão molecular (RODRIGUES e SILVA, 2005; JAMBHEKAR, 2013). Como a dissolução é uma etapa fundamental para a farmacocinética, é importante avaliar a velocidade com que esse processo ocorre, e isso pode ser feito através da avaliação do perfil de liberação *in vitro* do fármaco, que é indispensável no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e permite prever o comportamento *in vivo* do sistema de liberação (MANADAS *et al.*, 2002).

Os perfis de liberação do CP a partir das microesferas estão representados na Figura 37. Nos primeiros 120 min de ensaio em meio ácido (pH 1,2), as amostras 11H1-3, 11H1-5 e 41H1-3 liberaram apenas 34, 20 e 22% do fármaco, respectivamente, demonstrando reduzidas taxas de liberação em comparação com o meio entérico simulado sem enzimas (pH 7,4). Esses resultados mostram-se coerentes já que estas amostras apresentaram comportamentos de intumescimento e erosão semelhantes em pH ácido.

Figura 37 – Perfis de liberação do CP a partir das microesferas em meios com diferentes valores de pH (entre 0 – 120 min em pH 1,2 e entre 120 – 360 min em pH 7,4).



Para a amostra 41H1-5, um pronunciado aumento das taxas de liberação foi observado, particularmente a partir de 60 minutos de ensaio e 84% do fármaco foi liberado até 120 minutos. Esse comportamento particular deve ser atribuído à elevada erosão dessa amostra em meio ácido (Figura 35), já que esse é um processo que deve resultar na aceleração das taxas de liberação do fármaco.

Em tampão fosfato pH 7,4, todas as amostras apresentaram taxas de liberação mais elevadas, apresentando um efeito *burst* durante os primeiros 40 minutos de ensaio. A amostra 41H1-5 liberou 100% de fármaco em 180 min, enquanto para a amostra 11H1-3, a liberação se completou após 240 min, e para as amostras 11H1-5 e 41H1-3 esse tempo foi 360 minutos.

O efeito *burst* pode ser explicado pelo maior intumescimento dos polímeros (Figura 34) e pela maior solubilidade do fármaco em pH 7,4. Com o aumento da solubilidade, a velocidade da interface fármaco dissolvido e fármaco disperso é maior, levando a uma liberação mais rápida (NARASIMHAN e LANGER, 1997). Além disso, a expansão da rede polimérica após o intumescimento dá origem a uma estrutura mais frouxa e móvel, e essa nova conformação das cadeias favorece a liberação do fármaco.

A amostra 41H1-3 foi a que exibiu as menores taxas de liberação do fármaco, diferentemente da amostra 41H1-5 que, assim como no meio ácido, manteve a maior taxa de

liberação também no meio entérico ($p < 0,05$). Para a amostra 41H1-3, a menor concentração do cátion deve ter permitido um menor grau de reticulação, de modo que mesmo após a entrada de grande quantidade de líquido a rede polimérica intumescida manteve sua conformação relativamente preservada, permitindo maior controle das taxas de liberação do fármaco. Esses dados estão de acordo com a menor erosão em pH 1,2 e maior intumescimento em pH 7,4 apresentados por esta amostra.

Entre as amostras de igual proporção polimérica (1:1), não foi observada influência do grau de reticulação sobre a liberação do fármaco, sendo que ambas apresentaram perfis de liberação semelhantes.

5.5.4 Análise dos mecanismos de liberação do fármaco

Para avaliação do mecanismo que rege a liberação do fármaco, diferentes modelos matemáticos (Korsmeyer – Peppas, Higuchi, Primeira ordem, Hixson – Crowell e Baker – Lonsdale) foram aplicados aos dados de liberação (Figura 37).

A partir dos valores de coeficiente de determinação (r^2) (Tabela 13), o modelo matemático que melhor se correlacionou com os dados de liberação dos sistemas estudados foi o de Korsmeyer – Peppas (Tabela 13), em ambos os meios.

Esse modelo baseia-se na Lei das Potências e relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo, através da seguinte equação:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \times t^n \quad (\text{Equação 14})$$

em que M_t = quantidade de fármaco liberado no tempo t ; M_∞ = quantidade de fármaco liberado no tempo infinito, ou seja, a massa inicial; n = expoente de liberação e k = constante cinética.

Tabela 13 – Valores dos coeficientes dos diferentes modelos matemáticos nos diferentes meios (r^2 = coeficiente de determinação).

Modelos		Amostra							
		Meio gástrico simulado sem enzimas				Meio entérico simulado sem enzimas			
		11H1-3	11H1-5	41H1-3	41H1-5	11H1-3	11H1-5	41H1-3	41H1-5
Korsmeyer – Peppas	k	0,0003	0,1250	0,0122	0,0797	0,0000	0,0000	0,0000	5,0188
	r^2	0,9238	0,9021	0,9083	0,9329	0,9940	0,9490	1,0000	0,9680
	n	2,4473	1,0354	1,5343	1,4649	3,4885	4,4091	3,8300	0,5887
Higuchi	k	1,9018	1,3734	1,326	6,0754	6,4723	6,1099	5,3006	7,4208
	r^2	0,4692	0,7119	0,5468	0,5938	0,6155	0,1106	0,7253	0,0000
Primeira ordem	k	0,0023	0,0016	0,0016	0,0097	0,0111	0,0119	0,0070	0,0220
	r^2	0,6961	0,8917	0,792	0,7336	0,4887	0,4971	0,6902	0,6784
Hixson – Crowell	k	0,0008	0,0005	0,0005	0,0029	0,0027	0,0029	0,0019	0,0044
	r^2	0,709	0,8952	0,8001	0,7814	0,6112	0,6011	0,7827	0,8521
Baker – Lonsdale	k	0,0001	0,0000	0,0000	0,0008	0,0014	0,0014	0,0008	0,0025
	r^2	0,4544	0,6999	0,5358	0,5248	0,4563	0,481	0,5877	0,8291

Para a Equação 14, o valor de n determina o mecanismo de liberação do fármaco a partir da matriz polimérica. No caso de sistemas esféricos, valores de $n = 0,43$ indicam que o mecanismo de liberação é a difusão Fickiana, ou seja, a liberação é controlada pela difusão das moléculas do fármaco segundo um gradiente de potencial químico, o que constitui o transporte tipo I. Valores de n entre 0,43 e 0,85 correspondem ao transporte anômalo ou não-Fickiano, no qual as parcelas de contribuição dos processos de difusão e de relaxamento das cadeias poliméricas para a liberação do fármaco são bastante semelhantes. Para $n = 0,85$, o mecanismo é o transporte caso II, no qual o intumescimento do polímero controla a liberação. E valores de $n > 0,85$ representam o mecanismo de transporte super caso II, em que ocorre uma aceleração das taxas de liberação, a qual pode ser atribuída a um elevado estado de mobilidade das cadeias poliméricas ou a um processo de erosão da matriz (KORSMEYER *et al.*, 1983; LEE, 1985; MADERUELO *et al.*, 2011; KAITY *et al.*, 2013).

De acordo com os valores do expoente de liberação (n) observados em meio ácido (Tabela 13), o mecanismo que governa a liberação do fármaco a partir das microesferas é o transporte super caso II, o qual deve estar relacionado com a elevada erosão dos sistemas nesse meio (Figura 35).

Em meio entérico, com exceção da amostra 41H1-5, a liberação foi governada pelo mesmo mecanismo de liberação (transporte super caso II). Para a amostra 41H1-5 a liberação em pH 7,4 foi controlada por um processo anômalo, de modo que as parcelas de contribuição do relaxamento das cadeias e da difusão do fármaco são semelhantes, comportamento que está de acordo com a

significativa erosão que esta amostra sofre em meio ácido, e o elevado intumescimento em pH 7,4 (Figura 34).

A cinética de liberação de fármacos a partir de matrizes hidrofílicas, como as microesferas de gelana:pectina, envolve mecanismos complexos, pois depende de diversos processos, como o intumescimento do polímero e a dissolução e posterior difusão do fármaco para o meio, que geralmente não segue a difusão Fickiana, além da contribuição da erosão do sistema. A partir dos resultados, é possível concluir a grande influência que fatores como o grau de reticulação, o intumescimento, a estrutura polimérica e o pH do meio de dissolução exercem sobre o controle da liberação do fármaco, sendo que o menor grau de reticulação e a maior quantidade de gelana na estrutura da microesfera 41H1-3 foram as condições que melhor controlaram a liberação do cetoprofeno.

6 CONCLUSÕES

A técnica de geleificação ionotrópica mostrou-se eficiente para a obtenção de microesferas de goma gelana e pectina, apresentando elevados rendimento e eficiência de encapsulação.

As partículas mostraram-se esféricas e com distribuição de tamanho homogênea, e o comportamento térmico evidenciou que a estabilidade dos componentes do sistema foi preservada. A ausência de ligações químicas entre o fármaco e os polímeros foi evidenciada pelos dados de FTIR.

As microesferas apresentaram elevada capacidade mucoadesiva, com valores de adsorção de mucina superiores aos descritos na literatura e exibiram comportamento de erosão e intumescimento dependentes do pH.

Com exceção da amostra 41H1-5, as microesferas permitiram o controle efetivo das taxas de liberação em meio ácido, apesar da significativa erosão sofrida nesse meio, enquanto em meio entérico, as microesferas mostraram-se capazes de controlar a liberação do fármaco por até 360 minutos.

O mecanismo de liberação do fármaco mostrou-se independente do pH do meio e foi controlado pelo transporte super caso II, com exceção da amostra 41H1-5, para a qual, em pH 7,4, a liberação seguiu o transporte anômalo.

No presente trabalho, foi desenvolvido e caracterizado um novo sistema promissor para a liberação controlada de fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASHZADEH, S.; DINARVAND, R.; SHARIFZADEH, M.; HASSANZADEH, G.; AMINI, M.; ATYABI, F. Formulation and evaluation of an in situ gel forming system for controlled delivery of triptorelin acetate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 514-521, 2011.
- AGNIHOTRI, S. A.; JAWALKAR, S. S.; AMINABHAVI, T. M. Controlled release of cephalexin through gellan gum beads: Effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, n. 3, p. 249-261, 2006.
- AHUJA, M.; YADAV, M.; KUMAR, S. Application of response surface methodology to formulation of ionotropically gelled gum cordia/gellan beads. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 161-167, 2010.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, 2000. 568p.
- BABU, R. J.; SATHIGARI, S.; KUMAR, M. T.; PANDIT, J. K. Formulation of Controlled Release Gellan Gum Macro Beads of Amoxicillin. **Current Drug Delivery**, v. 7, p. 36-43, 2010.
- BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, 2008.
- BANERJEE, S.; SIDDIQUI, L.; BHATTACHARYA, S. S.; KAITY, S.; GHOSH, A.; CHATTOPADHYAY, P.; PANDEY, A.; SINGH, L. Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 198-206, 2012.
- BARBER, T. A.; HEALTHCARE, B. **Pharmaceutical particulate matter: analysis and control**. Buffalo Grove, IL: Interpharm Press, 1993. ISBN 0935184295.
- BARREIROS, F. M.; FERREIRA, P. J.; FIGUEIREDO, M. M. Calculating Shape Factors from Particle Sizing Data. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 13, n. 6, p. 368-373, 1996.
- BAUTZOVÁ, T.; RABIŠKOVÁ, M.; BÉDUNEAU, A.; PELLEQUER, Y.; LAMPRECHT, A. Bioadhesive pellets increase local 5-aminosalicylic acid concentration in experimental colitis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 2, p. 379-385, 2012.
- BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.
- BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**, v. 23, n. 17, p. 3627-3636, 2002.

Referências bibliográficas

- BHARDWAJ, T. R.; KANWAR, M.; LAL, R.; GUPTA, A. Natural Gums and Modified Natural Gums as Sustained-Release Carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 10, p. 1025-1038, 2000.
- BIGUCCI, F.; LUPPI, B.; MONACO, L.; CERCHIARA, T.; ZECCHI, V. Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 41-46, 2009.
- BODMEIER, R.; CHEN, H. Preparation of Biodegradable Poly ($\pm$) lactide Microparticles Using a Spray-Drying Technique. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, n. 11, p. 754-757, 1988.
- BODMEIER, R.; CHEN, H.; PAERATAKUL, O. A Novel Approach to the Oral Delivery of Micro- or Nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 6, n. 5, p. 413-417, 1989/05/01 1989.
- BRAGA, G. K. **Determinação das especificações do processo 'spray drying' na obtenção de micropartículas biodegradáveis para liberação sustentada de princípios ativos com aplicações odontológicas**. 2005. 96f (Dissertação de Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 2003.
- BROWN, M. E. Termogravimetry (TG). In: BROWN, M. E. (Ed.). **Introduction to thermal analysis: techniques and applications**. 2 ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2001. p.19-52. ISBN 1402004729.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; KINNEARY, J. F. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 12. ed. White House Station, NJ: Merck & CO., Inc. p. 905. 1996.
- BULMER, C.; MARGARITIS, A.; XENOCOSTAS, A. Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 68, n. 0, p. 61-69, 2012.
- CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009.
- CAILLETEAU, J. G. Ketoprofen in dentistry: a pharmacologic review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 66, n. 5, p. 620-624, 1988.
- CAO, S.-L.; REN, X.-W.; ZHANG, Q.-Z.; CHEN, E.; XU, F.; CHEN, J.; LIU, L.-C.; JIANG, X.-G. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 365, n. 1, p. 109-115, 2009.
- CARBINATTO, F. M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. 2010. 109f (Dissertação de Mestrado em Ciências

Referências bibliográficas

- Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara. 2010.
- CARVALHO, F. C.; BRUSCHI, M. L.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 1-17, 2010.
- CELLESI, F.; WEBER, W.; FUSSENEGGER, M.; HUBBELL, J. A.; TIRELLI, N. Towards a fully synthetic substitute of alginate: Optimization of a thermal gelation/chemical cross-linking scheme (“tandem” gelation) for the production of beads and liquid-core capsules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 740-749, 2004.
- CHAN, E.-S.; LEE, B.-B.; RAVINDRA, P.; PONCELET, D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 1, p. 63-72, 2009.
- CHANDRASEKARAN, R.; MILLANE, R. P.; ARNOTT, S.; ATKINS, E. D. T. The crystal structure of gellan. **Carbohydrate Research**, v. 175, n. 1, p. 1-15, 1988.
- CHANDRASEKARAN, R.; RADHA, A. Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 5, p. 143-148, 1995.
- CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 33-66, 2003.
- COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; PEPPAS, N. A. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 6, p. 198-204, 2000.
- COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 10, n. 2–3, p. 141-162, 1993.
- CRCAREVSKA, M. S.; DODOV, M. G.; GORACINOVA, K. Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 565-578, 2008.
- CROSASSO, P.; CERUTI, M.; BRUSA, P.; ARPICCO, S.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 63, n. 1-2, p. 19-30, 2000.
- CURY, B. S. F. **Reticulação da Alta Amilose: Processo de Obtenção, Caracterização e Avaliação do Desempenho em Sistemas de Liberação Prolongada de Fármacos**. 2005. 124f (Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara. 2005.
- CURY, B. S. F.; CASTRO, A. D.; KLEIN, S. I.; EVANGELISTA, R. C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: Physical parameters,

Referências bibliográficas

- cross-linking degrees and drug delivery relationships. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, n. 1–2, p. 8-15, 2009.
- DA SILVA, E. C.; DE PAOLA, M. V. R. V.; DO ROSÁRIO MATOS, J. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 3, 2007.
- DE KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; DE VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 5, p. 340-349, 2004.
- DHAWAN, S.; SINGLA, A.; SINHA, V. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 4, p. 122-128, 2004/12/01 2004.
- DUCHÊNE, D.; TOUCHARD, F.; PEPPAS, N. A. Pharmaceutical and Medical Aspects of Bioadhesive Systems for Drug Administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14, n. 2-3, p. 283-318, 1988.
- DUNCAN, C.; MIKE, R. Principles of Differential Scanning Calorimetry. In: (Ed.). **Thermal Analysis of Pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p.1-21. ISBN 978-0-8247-5814-1.
- EDSMAN, K.; HÄGERSTRÖM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 3-22, 2005.
- EINHORN-STOLL, U.; KUNZEK, H.; DONGOWSKI, G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1101-1112, 2007.
- ELGINDY, N.; ELKHODAIRY, K.; MOLOKHIA, A.; ELZOGHBY, A. Biopolymeric microparticles combined with lyophilized monophasic dispersions for controlled flutamide release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 411, n. 1–2, p. 113-120, 2011.
- FANGER, G. Microencapsulation: A Brief History and Introduction. In: VANDEGAER, J. (Ed.). **Microencapsulation**: Springer US, 1974. cap. 1, p.1-20. ISBN 978-1-4684-0741-9.
- FASANO, A. Innovative strategies for the oral delivery of drugs and peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 152-157, 1998.
- FERRARI, P. C.; SOUZA, F. M.; GIORGETTI, L.; OLIVEIRA, G. F.; CHAUD, M. V.; FERRAZ, H. G.; EVANGELISTA, R. C. In vitro drug permeation from chitosan pellets. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2526-2531, 2012.
- FISSORE, E. N.; ROJAS, A. M.; GERSCHENSON, L. N.; WILLIAMS, P. A. Butternut and beetroot pectins: Characterization and functional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p. 172-182, 2013.
- FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, n. 1–2, p. 1-18, 2004.
- FREUNDLICH, H.; HATFIELD, H. S. Colloid and capillary chemistry. 1926.

Referências bibliográficas

- FRIEND, D. R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 2, p. 247-265, 2005.
- GAMBOA, J. M.; LEONG, K. W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 0, 2013.
- GANDHI, R. B.; ROBINSON, J. R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 13, n. 1, p. 43-74, 1994.
- GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.
- GENNARO, A. R. Soluções e equilíbrios de fases. In: GENNARO, A. R. (Ed.). **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 16, p.211-230.
- GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellan Gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 177-211, 2000.
- GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 335-357, 2002.
- GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 327-332, 2000.
- GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Gelation of gellan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 7, n. 5, p. 371-393, 1987.
- GREGORIADIS, G. Targeting of drugs: implications in medicine. **The Lancet**, v. 318, n. 8240, p. 241-247, 1981.
- GROENEWOUD, W. M. Thermogravimetry. In: GROENEWOUD, W. M. (Ed.). **Characterisation of Polymers by Thermal Analysis** Amsterdam: Elsevier Science, 2001.
- GU, J.; ROBINSON, J.; LEUNG, S. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure-property relationships. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 5, n. 1, p. 21, 1988.
- GUO, C.; GEMEINHART, R. A. Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly (lactide-co-glycolide) particles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 597-604, 2008.
- GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 10, p. 569-579, 2002.
- GUPTA, V. K.; BECKERT, T. E.; PRICE, J. C. A novel pH- and time-based multi-unit potential colonic drug delivery system. I. Development. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, n. 1-2, p. 83-91, 2001.

HAAN, P.; LERK, C. F. Oral controlled release dosage forms. A review. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition**, v. 6, n. 2, p. 57-67, 1984/04/01 1984.

HABIB, M. J.; MESUE, R. Development of controlled release formulations of ketoprofen for oral use. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 21, n. 12, p. 1463-1472, 1995.

HÄGERSTRÖM, H.; PAULSSON, M.; EDSMAN, K. Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 301-309, 2000.

HASSAN, E. E.; ESHRA, A. G.; NADA, A. H. Formulation of prolonged release lipid micropellets by emulsion congealing: Optimization of ketoprofen entrapment and release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 121, n. 2, p. 149-155, 1995.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 1, p. 75-88, 1998.

HUNTER, A. C.; ELSOM, J.; WIBROE, P. P.; MOGHIMI, S. M. Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: a pathophysiological perspective. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, Supplement 1, n. 0, p. S5-S20, 2012.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 - revisão 04**, 2011.

ISHA, C.; NIMRATA, S.; RANA, A. C.; SURBHI, G. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.

JAIN, A.; SINGHAI, P.; GURNANY, E.; UPDHAYAY, S.; MODY, N. Transferrin-tailored solid lipid nanoparticles as vectors for site-specific delivery of temozolomide to brain. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 3, p. 1-9, 2013.

JAMBHEKAR, S. S. Physicochemical and Biopharmaceutical Properties of Drug Substances and Pharmacokinetics. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A., *et al* (Ed.). **Foye's Principles of Medicinal Chemistry** 7.ed., 2013. cap. 3, p.61-105.

KAITY, S.; ISAAC, J.; GHOSH, A. Interpenetrating polymer network of locust bean gum-poly (vinyl alcohol) for controlled release drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, 2013.

KATAV, T.; LIU, L.; TRAITTEL, T.; GOLDBART, R.; WOLFSON, M.; KOST, J. Modified pectin-based carrier for gene delivery: Cellular barriers in gene delivery course. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 2, p. 183-191, 2008.

KAWADKAR, J.; CHAUHAN, M. K. Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 563-572, 2012.

- KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163-171, 2011.
- KHAFAGY, E.-S.; MORISHITA, M.; ONUKI, Y.; TAKAYAMA, K. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: A comparative review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 15, p. 1521-1546, 2007.
- KHAN, S. A.; AHMAD, M.; MURTAZA, G.; AAMIR, M. N.; AKHTAR, N.; KOUSAR, R. Formulation of two-drug controlled release non-biodegradable microparticles for potential treatment of muscles pain and spasm and their simultaneous spectrophotometric estimation. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 299-306, May-Jun 2010.
- KHANVILKAR, K.; DONOVAN, M. D.; FLANAGAN, D. R. Drug transfer through mucus. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2-3, p. 173-193, 2001.
- KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 753-759, 2010.
- KHONDKAR, D.; TESTER, R. F.; HUDSON, N.; KARKALAS, J.; MORROW, J. Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinised waxy maize starch with pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 8, p. 1296-1301, 2007.
- KIM, T. H.; PARK, Y. H.; KIM, K. J.; CHO, C. S. Release of albumin from chitosan-coated pectin beads in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 2, p. 371-383, 2003.
- KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.
- KRIWET, B.; WALTER, E.; KISSEL, T. Synthesis of bioadhesive poly(acrylic acid) nano- and microparticles using an inverse emulsion polymerization method for the entrapment of hydrophilic drug candidates. **Journal of Controlled Release**, v. 56, n. 1-3, p. 149-158, 1998.
- KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; ATTWOOD, D. Oral sustained delivery of paracetamol from in situ-gelling gellan and sodium alginate formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1-2, p. 55-64, 2003.
- KULKARNI, R. V.; MANGOND, B. S.; MUTALIK, S.; SA, B. Interpenetrating polymer network microcapsules of gellan gum and egg albumin entrapped with diltiazem-resin complex for controlled release application. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 1001-1007, 2011.
- KYZAS, G. Z.; LAZARIDIS, N. K.; BIKIARIS, D. N. Optimization of chitosan and β -cyclodextrin molecularly imprinted polymer synthesis for dye adsorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 198-208, 2013.

-
- LAINE, L. The gastrointestinal effects of nonselective NSAIDs and COX-2-selective inhibitors. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 32, n. 3, Supplement, p. 25-32, 2002.
- LAN, Q.; BASSI, A. S.; ZHU, J.-X. J.; MARGARITIS, A. A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v. 81, n. 1, p. 179-186, 2001.
- LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.
- LEE, M.-W.; TSAI, H.-F.; WEN, S.-M.; HUANG, C.-H. Photocrosslinkable gellan gum film as an anti-adhesion barrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 1132-1138, 2012.
- LEE, P. I. Kinetics of drug release from hydrogel matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 2, n. 0, p. 277-288, 1985.
- LIM, S. T.; MARTIN, G. P.; BERRY, D. J.; BROWN, M. B. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. **Journal of Controlled Release**, v. 66, n. 2-3, p. 281-292, 2000.
- LIU, L.; FISHMAN, M. L.; HICKS, K. B.; KENDE, M. Interaction of various pectin formulations with porcine colonic tissues. **Biomaterials**, v. 26, n. 29, p. 5907-5916, 2005.
- LIU, L.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3333-3343, 2003.
- LIU, L.; GAO, H. First principles study on the molecular structure and vibrational spectra of ketoprofen. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, n. 0, p. 329-339, 2012.
- LIU, L.; WON, Y. J.; COOKE, P. H.; COFFIN, D. R.; FISHMAN, M. L.; HICKS, K. B.; MA, P. X. Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 25, n. 16, p. 3201-3210, 2004.
- LLABOT, J. M.; MANZO, R. H.; ALLEMANDI, A. Double-layered mucoadhesive tablets containing nystatin. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 3, p. 47-52, 2002/09/01 2002.
- LUCINDA-SILVA, R. M.; EVANGELISTA, R. C. Microspheres of alginate-chitosan containing isoniazid. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 2, p. 145-152, 2003.
- MADERUELO, C.; ZARZUELO, A.; LANA, J. M. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. **Journal of Controlled Release**, v. 154, n. 1, p. 2-19, 2011.
- MAESTRELLI, F.; ZERROUK, N.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; MURA, P. Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 1, p. 1-11, 2008.
-

-
- MAHAJAN, H. S.; GATTANI, S. G. Gellan gum based microparticles of metoclopramide hydrochloride for intranasal delivery: development and evaluation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 4, p. 388-392, 2009.
- MAIOR, J. F. A. S.; REIS, A. V.; MUNIZ, E. C.; CAVALCANTI, O. A. Reaction of pectin and glycidyl methacrylate and ulterior formation of free films by reticulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1–2, p. 184-194, 2008.
- MAITI, S.; RANJIT, S.; MONDOL, R.; RAY, S.; SA, B. Al³⁺ ion cross-linked and acetalated gellan hydrogel network beads for prolonged release of glipizide. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 164-172, 2011.
- MALAKAR, J.; NAYAK, A. K.; PAL, D. Development of cloxacillin loaded multiple-unit alginate-based floating system by emulsion–gelation method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 138-147, 2012.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Brazilian J. Pharm. Sci**, v. 38, p. 375-400, 2002.
- MARTINS, S.; SARMENTO, B.; SOUTO, E. B.; FERREIRA, D. C. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 4, p. 725-731, 2007.
- MENEGUIN, A. B. **Obtenção e caracterização de filmes de misturas de amido resistente e pectina como estratégia para liberação cólon específica de fármacos**. 2012. 99f (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara, 2012.
- MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Effects of salts on the gel-sol transition of gellan gum by differential scanning calorimetry and thermal scanning rheology. **Thermochimica Acta**, v. 267, n. 0, p. 269-287, 1995.
- MOEBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Novel preparation techniques for alginate–poloxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 358-366, 2012.
- MOGUL, M. G.; AKIN, H.; HASIRCI, N.; TRANTOLO, D. J.; GRESSER, J. D.; WISE, D. L. Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. **Resources, conservation and recycling**, v. 16, n. 1, p. 289-320, 1996.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.
- MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 2, p. 187-199, 2011.
-

Referências bibliográficas

- MORETTI, M. D. L.; GAVINI, E.; JULIANO, C.; PIRISINO, G.; GIUNCHEDI, P. Spray-dried microspheres containing ketoprofen formulated into capsules and tablets. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 1, p. 111-121, 2001.
- MORISHITA, M.; PEPPAS, N. A. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 19-20, p. 905-910, 2006.
- MORITAKA, H.; FUKUBA, H.; KUMENO, K.; NAKAHAMA, N.; NISHINARI, K. Effect of monovalent and divalent cations on the rheological properties of gellan gels. **Food Hydrocolloids**, v. 4, n. 6, p. 495-507, 1991.
- MORRIS, E. R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. Gelation of gellan – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 373-411, 2012.
- MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681-689, 2012.
- MURA, P.; FAUCCI, M. T.; PARRINI, P. L.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of ketoprofen–cyclodextrin binary systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 179, n. 1, p. 117-128, 1999.
- MURA, P.; MANDERIOLI, A.; BRAMANTI, G.; FURLANETTO, S.; PINZAUTI, S. Utilization of differential scanning calorimetry as a screening technique to determine the compatibility of ketoprofen with excipients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 119, n. 1, p. 71-79, 1995.
- NARASIMHAN, B.; LANGER, R. Zero-order release of micro- and macromolecules from polymeric devices: the role of the burst effect. **Journal of Controlled Release**, v. 47, n. 1, p. 13-20, 1997.
- NARKAR, M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Iontropic Gelation Method. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 267-277, 2010.
- NAYAK, A. K.; DAS, B.; MAJI, R. Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: Development and in vitro characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1070-1078, 2012.
- NAYAK, A. K.; PAL, D.; DAS, S. Calcium pectinate-fenugreek seed mucilage mucoadhesive beads for controlled delivery of metformin HCl. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 349-357, 2013.
- NEGRINI, R.; MEZZENGA, R. pH-Responsive Lyotropic Liquid Crystals for Controlled Drug Delivery. **Langmuir**, v. 27, n. 9, p. 5296-5303, 2011/05/03 2011.
- NELSON, G. Application of microencapsulation in textiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1-2, p. 55-62, 2002.

-
- NG, C.; LOSSO, J. N.; MARSHALL, W. E.; RAO, R. M. Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmin–water system. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 2, p. 131-135, 2002.
- O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 1, p. 25-42, 1997.
- OGAWA, E.; TAKAHASHI, R.; YAJIMA, H.; NISHINARI, K. Effects of molar mass on the coil to helix transition of sodium-type gellan gums in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 2–3, p. 378-385, 2006.
- OKADA, H. Preface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 1, p. 1-3, 1997.
- OLIVEIRA, F. M.; CAVALCANTI, O. A. Pré-Bióticos na formação de filmes isolados de Eudragit® RS30D: Avaliação das propriedades de intumescimento e permeabilidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 325, 2007.
- OLIVEIRA, G. F. **Incorporação de polímeros gastrorresistentes à sistema multiparticulado a base de quitosana**. 2005. 159p (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2005.
- OLIVEIRA, G. F.; FERRARI, P. C.; CARVALHO, L. Q.; EVANGELISTA, R. C. Chitosan–pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 1004-1009, 2010.
- ONOFRE, F.; WANG, Y.-J.; MAUROMOUSTAKOS, A. Effects of structure and modification on sustained release properties of starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 541-547, 2009.
- ORLU, M.; CEVHER, E.; ARAMAN, A. Design and evaluation of colon specific drug delivery system containing flurbiprofen microsponges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, n. 1–2, p. 103-117, 2006.
- PARK, K.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 19, n. 2, p. 107-127, 1984.
- PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Iontropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: The Novel Techniques to Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.
- PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH, M. A Review on Iontropic Gelation Method: Novel Approach for Controlled Gastroretentive Gelispheres. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. Suppl 4, p. 27-32, 2012.
- PATIL, S.; SHARMA, S.; NIMBALKAR, A.; PAWAR, A. Study of formulation variables on properties of drug-gellan beads by factorial design. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, n. 3, p. 315-326, 2006.
-

- PEREZ-VILAR, J.; HILL, R. L. Mucin Family of Glycoproteins. In: EDITORS-IN-CHIEF: WILLIAM, J. L. e LANE, M. D. (Ed.). **Encyclopedia of Biological Chemistry**. New York: Elsevier, 2004. p.758-764. ISBN 978-0-12-443710-4.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.
- PEZZINI, B. R.; FERRAZ, H. G. Perfis de Dissolução em Bio-Dis de Péletes de Cetoprofeno obtidos por Extrusão-esferonização e Revestimento em Leito Fluidizado. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 26, n. 4, p. 490-8, 2007.
- PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.
- PICONE, C. S. F. **Influência da conformação da gelana sobre a gelificação das proteínas do leite**. 2008. 141f (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008.
- PICONE, C. S. F.; DA CUNHA, R. L. Interactions between milk proteins and gellan gum in acidified gels. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 5, p. 502-511, 2010.
- PINTO, J. F. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: From the mouth to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 44-52, 2010.
- PREZOTTI, F. G.; MENEGUIN, A. B.; EVANGELISTA, R. C.; FERREIRA CURY, B. S. Preparation and characterization of free films of high amylose/pectin mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 11, p. 1354-1359, 2012.
- RAINSFORD, K. D. Novel non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Baillière's clinical rheumatology**, v. 2, n. 2, p. 485-511, 1988.
- RAJINIKANTH, P.; MISHRA, B. Preparation and in vitro characterization of gellan based floating beads of acetohydroxamic acid for eradication of H. pylori. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, n. 4, p. 413-427, 2007.
- RAMPEY, A. M.; UMPLEBY, R. J.; RUSHTON, G. T.; ISEMAN, J. C.; SHAH, R. N.; SHIMIZU, K. D. Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 1123-1133, 2004/02/01 2004.
- RANE, A. B.; GATTANI, S. G.; KADAM, V. D.; TEKADE, A. R. Formulation and Evaluation of Press Coated Tablets for Pulsatile Drug Delivery Using Hydrophilic and Hydrophobic Polymers. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 11, p. 1213-1217, 2009.
- READ, T.-A.; SORENSEN, D. R.; MAHESPARAN, R.; ENGER, P. Ø.; TIMPL, R.; OLSEN, B. R.; HJELSTUEN, M. H.; HARALDSETH, O.; BJERKVIG, R. Local endostatin treatment of

- gliomas administered by microencapsulated producer cells. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 29-34, 2001.
- REDDY, T.; TAMMISHETTI, S. Gastric resistant microbeads of metal ion cross-linked carboxymethyl guar gum for oral drug delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 3, p. 311-318, 2002.
- RENUKUNTLA, J.; VADLAPUDI, A. D.; PATEL, A.; BODDU, S. H. S.; MITRA, A. K. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 75-93, 2013.
- RINAUDO, M.; MILAS, M. Gellan gum, a bacterial gelling polymer. In: DOXASTAKIS, G. e KIOSSEOGLOU, V. (Ed.). **Developments in Food Science**: Elsevier, v. Volume 41, 2000. p.239-263. ISBN 0167-4501.
- RODA, A.; SABATINI, L.; MIRASOLI, M.; BARALDINI, M.; RODA, E. Bioavailability of a new ketoprofen formulation for once-daily oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, n. 1, p. 165-172, 2002.
- RODRIGUES, P. O.; SILVA, M. A. S. Avaliação in vitro de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependentes e independentes de análise. **Rev. Col. Cien. Quím. Farm**, v. 34, n. 1, p. 13, 2005.
- RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A. I.; DURAND, S.; GARNIER, C.; TECANTE, A.; DOUBLIER, J. L. Rheology-structure properties of gellan systems: evidence of network formation at low gellan concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 5, p. 621-628, 2003.
- SAH, H.; TODDYWALA, R.; CHIEN, Y. W. Continuous release of proteins from biodegradable microcapsules and in vivo evaluation of their potential as a vaccine adjuvant. **Journal of Controlled Release**, v. 35, n. 2-3, p. 137-144, 1995.
- SAHASATHIAN, T.; PRAPHAIRAKSIT, N.; MUANGSIN, N. Mucoadhesive and floating chitosan-coated alginate beads for the controlled gastric release of amoxicillin. **Archives of pharmacal research**, v. 33, n. 6, p. 889-899, 2010.
- SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1666-1691, 2005.
- SANTUS, G.; BAKER, R. W. Pharmaceuticals, Controlled Release of. In: EDITOR-IN-CHIEF: ROBERT, A. M. (Ed.). **Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)**. New York: Academic Press, 2003. p.791-803. ISBN 978-0-12-227410-7.
- SANZGIRI, Y. D.; MASCHI, S.; CRESCENZI, V.; CALLEGARO, L.; TOPP, E. M.; STELLA, V. J. Gellan-based systems for ophthalmic sustained delivery of methylprednisolone. **Journal of Controlled Release**, v. 26, n. 3, p. 195-201, 1993.
- SASTRY, S. V.; NYSHADHAM, J. R.; FIX, J. A. Recent technological advances in oral drug delivery – a review. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 4, p. 138-145, 2000.

Referências bibliográficas

- SCHACHTER, H.; WILLIAMS, D. Biosynthesis of Mucus Glycoproteins. In: CHANTLER, E.; ELDER, J., *et al* (Ed.). **Mucus in Health and Disease—II**: Springer US, v.144, 1982. cap. 1, p.3-28. (Advances in Experimental Medicine and Biology). ISBN 978-1-4615-9256-3.
- SCHOLS, H. A.; COENEN, G. J.; VORAGEN, A. G. J. Revealing pectin's structure. In: SCHOLS, H. A.; VISSER, R. G. F., *et al* (Ed.). **Pectins and pectinases**: Wageningen Academic Pub, 2009. ISBN 978-90-8686-108-8.
- SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Complex Pectins: Structure elucidation using enzymes. In: VISSER, J. e VORAGEN, A. G. J. (Ed.). **Progress in Biotechnology**: Elsevier, v.14, 1996. p.3-19. ISBN 0921-0423.
- SCHROOYEN, P. M. M.; MEER, R. V. D.; KRUIF, C. G. D. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 04, p. 475-479, 2001.
- SEIFERT, D. B.; PHILLIPS, J. A. Production of Small, Monodispersed Alginate Beads for Cell Immobilization. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 5, p. 562-568, 1997.
- SHENG, J. J.; KASIM, N. A.; CHANDRASEKHARAN, R.; AMIDON, G. L. Solubilization and dissolution of insoluble weak acid, ketoprofen: Effects of pH combined with surfactant. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3-4, p. 306-314, 2006.
- SHOHIN, I. E.; KULINICH, J. I.; RAMENSKAYA, G. V.; VASILENKO, G. F. Evaluation of In Vitro Equivalence for Drugs Containing BCS Class II Compound Ketoprofen. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 1, p. 26-29, 2011.
- SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, 2003.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.
- SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Colonic drug delivery: prodrug approach. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 5, p. 557-564, 2001a.
- _____. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 19-38, 2001b.
- SINHA, V. R.; MITTAL, B. R.; BHUTANI, K. K.; KUMRIA, R. Colonic drug delivery of 5-fluorouracil: an in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 101-108, 2004.
- SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.
- SNOEYINK, V. L.; SUMMERS, R. S. Adsorption of organic compounds. **Water quality and treatment**, v. 5, 1990.

Referências bibliográficas

- SOARES, G. A.; CASTRO, A. D. D.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Blends of cross-linked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.
- SONIA, T. A.; SHARMA, C. P. In vitro evaluation of N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan for oral insulin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 103-109, 2011.
- SOUTO-MAIOR, J. F. A.; REIS, A. V.; PEDREIRO, L. N.; CAVALCANTI, O. A. Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. **Polymer International**, v. 59, n. 1, p. 127-135, 2010.
- SRIAMORNSAK, P.; THIRAWONG, N.; NUNTHANID, J.; PUTTIPIATKHACHORN, S.; THONGBORISUTE, J.; TAKEUCHI, H. Atomic force microscopy imaging of novel self-assembling pectin-liposome nanocomplexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 324-329, 2008.
- SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 54-59, 2010.
- SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.; PEZZIN, A.; SILVA, D.; MEIER, M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2009.
- TABBAKHIAN, M.; TAVAKOLI, N.; JAAFARI, M. R.; DANESHAMOUZ, S. Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes: 1. In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p. 1-10, 2006.
- TAKEUCHI, H.; MATSUI, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. **Journal of Controlled Release**, v. 86, n. 2, p. 235-242, 2003.
- TANG, J.; TUNG, M. A.; ZENG, Y. Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono- and divalent cations. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 1, p. 11-16, 1996.
- TARZIA, A. **Efeito do processamento pós-colheita sobre as frações polissacarídicas dos grãos de café (Coffea Arabica) e suas bebidas**. 2010. 102f (Tese de Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.
- THIRAWONG, N.; KENNEDY, R. A.; SRIAMORNSAK, P. Viscometric study of pectin-mucin interaction and its mucoadhesive bond strength. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 170-179, 2008a.
- THIRAWONG, N.; NUNTHANID, J.; PUTTIPIATKHACHORN, S.; SRIAMORNSAK, P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 1, p. 132-140, 2007.

Referências bibliográficas

- THIRAWONG, N.; THONGBORISUTE, J.; TAKEUCHI, H.; SRIAMORNSAK, P. Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin–liposome nanocomplexes. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 236-245, 2008b.
- TIȚA, B.; FULIAȘ, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TIȚA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 221-227, 2011.
- TIWARI, S.; MURTHY, T. K.; RAVEENDRA PAI, M.; MEHTA, P.; CHOWDARY, P. Controlled release formulation of tramadol hydrochloride using hydrophilic and hydrophobic matrix system. **AAPS PharmSciTech**, v. 4, n. 3, p. 18-23, 2003/09/01 2003.
- TONG, W.-Q.; WEN, H. Preformulation Aspects of Insoluble Compounds. In: LIU, R. (Ed.). **Water-Insoluble Drug Formulation**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 4, p.61-90. ISBN 978-0-8493-9644-1.
- TORCHILIN, V. P. Drug targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, Supplement 2, n. 0, p. S81-S91, 2000.
- TORCHILIN, V. P. Strategies and Means for Drug Targeting: An Overview. In: MUZYKANTOV, V. e TORCHILIN, V. (Ed.). **Biomedical Aspects of Drug Targeting**: Springer US, 2002. cap. 1, p.3-26. ISBN 978-1-4419-5312-4.
- TRAN, V.-T.; BENOÎT, J.-P.; VENIER-JULIENNE, M.-C. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 407, n. 1–2, p. 1-11, 2011.
- USP. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) **Chapter <711> Dissolution**, 2011a.
- _____. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 34–NF 29) **Chapter <1225> Validation of compendial procedures**, 2011b.
- VANDAMME, T. F.; LENOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J. C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 3, p. 219-231, 2002.
- VANDEGAER, J. E. Encapsulation by coacervation. In: (Ed.). **Microencapsulation**: Springer, 1974. p.21-37. ISBN 1468407414.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **The American Journal of Medicine**, v. 104, n. 3, Supplement 1, p. 2S-8S, 1998.
- VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, n. 1–2, p. 13-32, 2003.
- VERMA, A.; RAMESH, C. N.; SHARMA, S. D.; PANDIT, J. K. Preparation and Characterization of Floating Gellan-Chitosan Polyelectrolyte Complex Beads. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 1, p. 138-46, 2012.

Referências bibliográficas

- VINCKEN, J.-P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. F. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, 2003.
- VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie: für Studium und Beruf**. 9 ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 2000.
- VRIESMANN, L. C. **Extração, Caracterização e Aspectos Reológicos de Polissacarídeos da Polpa dos Frutos de Theobroma grandiflorum (Cupuaçu)**. 2008. 118f (Dissertação de Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.
- VUEBA, M. L.; PINA, M. E.; VEIGA, F.; SOUSA, J. J.; DE CARVALHO, L. A. E. B. Conformational study of ketoprofen by combined DFT calculations and Raman spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 56-65, 2006.
- WHITTAKER, L. E.; AL-RUQAIE, I. M.; KASAPIS, S.; RICHARDSON, R. K. Development of composite structures in the gellan polysaccharide/sugar system. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 1, p. 39-46, 1997.
- YADAV, P. S.; KUMAR, V.; SINGH, U. P.; BHAT, H. R.; MAZUMDER, B. Physicochemical characterization and in vitro dissolution studies of solid dispersions of ketoprofen with PVP K30 and d-mannitol. **Saudi Pharmaceutical Journal**, n. 0, 2011.
- YAMADA, T.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Sustained release ketoprofen microparticles with ethylcellulose and carboxymethylcellulose. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, p. 271-282, 2001.
- YAMAMOTO, F. **Reologia e microestrutura de géis ácidos de gelana**. 2006. 126f (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.
- YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373-385, 2011.
- YEH, M.-K.; COOMBES, A.; JENKINS, P.; DAVIS, S. A novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 33, n. 3, p. 437-445, 1995.
- YEO, Y.; BAEK, N.; PARK, K. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 4, p. 213-230, 2001.
- YIN, Y.; YANG, Y.; XU, H. Hydrogels for colon-specific drug delivery: Swelling kinetics and mechanism of degradation in vitro. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 39, n. 24, p. 3128-3137, 2001.
- ZANIBONI, H. C.; FELL, J. T.; COLLETT, J. H. Production and characterisation of enteric beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, n. 1, p. 151-155, 1995.

Referências bibliográficas

ZERBINI, A. P. N. D. A. **Desenvolvimento e avaliação de minicomprimidos contendo atorvastatina cálcica**. 2010. 104f (Dissertação de Mestrado em Fármacos e Medicamentos). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

ZHANG, H.; ALSARRA, I. A.; NEAU, S. H. An in vitro evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, n. 1–2, p. 197-205, 2002.