

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
BIOTECNOLÓGICOS

**Revestimento polimérico e farmacocinética de
grânulos gastrorresistentes contendo didanosina
incorporada em micropartículas de quitosana**

Patrícia Severino
Autora

Maria Helena Andrade Santana
Orientadora

Teresa Cristina Tavares Dalla Costa
Co-orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, da Área de Concentração de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Campinas – São Paulo
Setembro, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

Se83r Severino, Patrícia
Revestimento polimérico e farmacocinética de
grânulos gastrorresistentes contendo didanosina
incorporada em micropartículas de quitosana : grânulos
gastrorresistentes contendo didanosina / Patrícia
Severino. --Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana, Teresa
Cristina Tavares Dalla Costa.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Agentes antivirais. 2. Quitosana. 3.
Microencapsulação. 4. Tecnologia de liberação
controlada. 5. AIDS (Doença). I. Santana, Maria
Helena Andrade. II. Dalla Costa, Teresa Cristina
Tavares. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Polymeric coating and pharmacokinetic of chitosan
granules containing ddI incorporated in microparticles:
coating granules containing ddI incorporated

Palavras-chave em Inglês: Didanosine, Chitosan, Microparticle, Granule

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

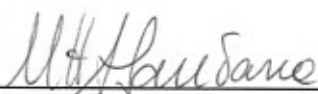
Banca examinadora: Marco Vinícius Chaud, Telma Teixeira Franco,

Samantha Cristina de Pinho, Sonia Maria Malmonge

Data da defesa: 30/09/2008

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Patrícia Severino e aprovada em 30 de setembro de 2008, pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Orientadora



Prof. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa
Co-orientadora



Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud
Membro Titular



Prof. Dra. Telma Teixeira Franco
Membro Titular



Prof. Dra. Samantha Cristina de Pinho
Suplente

Prof. Dra. Sonia Maria Malmonge
Suplente

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de Mestrado em Engenharia Química

Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana (orientadora)

*Dedico aos meus pais Dirceu e Ivone,
pelo carinho e confiança.*

“Existe somente uma idade para ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los a despeito de todas as dificuldades e obstáculos. (.....)

Essa idade tão fugaz na vida da gente se chama

PRESENTE

e tem a duração do instante que passa.... “

Mário Quintana

Agradecimentos

- À professora Dra. Maria Helena Andrade Santana pela orientação, aprendizado, amizade, paciência e confiança.
- À professora Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa pela co-orientação, amizade e aprendizado.
- Aos membros da banca, pelas sugestões, críticas e elogios.
- Ao professor Dr. Humberto Ferraz e seu aluno de doutorado George Gualberto por acompanharem os experimentos de leite fluidizado e terem cedido espaço na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.
- Ao professor Dr. Marco Vinícius Chaud, pela descoberta da minha vocação pela pesquisa.
- Aos meus queridos amigos Patrícia Zancanella e Classius Ferreira da Silva, que mesmo longe sempre estiveram presente nos momentos mais difíceis e alegres desta etapa da minha vida.
- Ao professor Dr. Sinézio do DTP-FEQ-Unicamp e seu aluno Viktor pela disponibilidade no uso do goniômetro
- Ao Gilson técnico do LDB por sempre ter me ajudado com otimismo, paciência e alegria.
- Aos amigos do LDPB, Luciana, Beatriz, André, Lucimara, Amanda, Reinaldo, Thaís, Aline, Sônia, Silas, Giuliana, Pablo e Silas pela amizade e companheirismo.
- À Família Martinez que me recebeu com muito carinho, quando estive em Porto Alegre, principalmente a Dra. Gabriela pela amizade, companheirismo e incentivo nos momentos mais difíceis.

- Aos amigos do laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, Bibiana, Flávia, Cândice, Clarissa, Nataly, Rodrigo, Leandro, Karina, Moacir, Renata, Moacir, Sandra, Vitória, Alessandro, Irene pelo companheirismo e paciência.
- As funcionárias do LUC que sempre estiveram prontas para ajudar.
- Ao Prof. Alvimar José da Costa pela gentileza de me receber no CPPAR/Unesp (Centro de Pesquisa em Sanidade Animal), juntamente com seus alunos, Tiago, Cláudio, Artur, Mariele, Heloísa e Marcos pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos.
- Aos amigos de todos os momentos: Charles, Rodrigo, Grínia, Maria, Georgiana, Mariana e Mônica, que tornaram meus dias mais alegres e inesquecíveis.
- A Labogen S/A Biotecnologia e Química fina por ter gentilmente cedido o fármaco para nossa pesquisa.
- A Basf, The chemical Company, por ter cedido os polímeros de revestimento para a pesquisa.
- A todos os meus familiares pelo carinho e incentivo.
- Aos funcionários e professores da FEQ pela atenção e colaboração.
- As entidades financiadoras CNPq e Fapesp.
- A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradecimento aos Animais

“Chegará o dia em que os homens conhecerão a alma dos animais e, nesse dia, um crime contra o animal será um crime contra a humanidade”.

Leonardo Da Vinci

Agradeço àqueles que foram imprescindíveis à nossa pesquisa. Àqueles que, mesmo sem querer ou entender o porquê, nos ajudaram com seus corpos, suas atitudes, suas reações e seus olhares.

RESUMO

Neste trabalho foram estudados a produção e farmacocinética de uma nova formulação do fármaco didanosina (ddl), composta de grânulos de quitosana contendo a ddl incorporada em micropartículas, para administração por via oral no tratamento da AIDS. As vantagens dessa nova forma farmacêutica são: assegurar a estabilidade da ddl no meio gastrointestinal, produzir adesão à membrana intestinal proporcionando assim melhor absorção através do aumento da permeação e liberação controlada, facilitar o manuseio (fracionamento de comprimidos e ajuste da dose) e deglutição em relação à forma farmacêutica convencional (comprimidos ou cápsulas revestidas), principalmente para idosos e crianças. O estudo abrangeu os seguintes aspectos: otimização do carregamento da ddl em micropartículas de quitosana previamente desenvolvidas por Silva, 2006; produção dos grânulos em leito fluidizado e por extrusão/esferonização; revestimento polimérico gastroresistente em leito fluidizado; e obtenção dos perfis farmacocinéticos plasmáticos em cães através da administração oral dos grânulos produzidos. A otimização do carregamento da ddl foi realizada através de modificações nas condições fluidodinâmicas do processo de produção das micropartículas. A produção e o revestimento dos grânulos foram realizados em leito fluidizado, avaliando as variáveis do processo e utilizando a suspensão polimérica Kollicoat[®] MAE 100 P para o revestimento gastroessistente, já que a ddl sofre desacetilação e torna-se ineficaz farmacologicamente quando exposta ao pH gástrico. Os perfis farmacocinéticos plasmáticos em cães foram analisados por modelo não-compartimental. Os resultados experimentais mostraram que através das modificações das condições fluidodinâmicas conseguimos aumentar a encapsulação da ddl em micropartículas em 13,3%, em relação a formulação inicialmente desenvolvida por SILVA, 2006. O revestimento entérico dos grânulos mostrou-se adequado em estudos *in vitro*, como preconizado pela farmacopéia. A metodologia analítica por CLAE acoplada a extração em fase sólida desenvolvida mostrou-se adequada para a quantificação do ddl e foi validada para determinação simultânea de ddl e ACL (padrão interno), em amostras de plasma de cão. Os perfis cinéticos mostraram que a nova formulação apresenta-se estatisticamente diferente das distribuídas no SUS, devido a sua liberação modificada de 36 horas. Estes resultados contribuem para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas de administração oral, liberação modificad, requerendo menor frequência de administração, proporcionando maior adesão ao tratamento em várias patologias.

ABSTRACT

This work studied the production and pharmacokinetic of a new pharmaceutical formulation of the didanosine (ddl) drug, composed by chitosan granules containing ddl incorporated in microparticles, for oral administration in the AIDS therapy. The advantages of this new pharmaceutical formulation compared to the conventional one are: to assure ddl stability in gastrointestinal medium, to produce adhesion to intestinal membrane, enhancing absorption through the increasing of permeation and controlled release and to facilitate the handling and deglutition especially to elderly and children.

The approach included the following aspects: optimization of the ddl amount in the chitosan microparticles previously developed by Silva, 2006; production of granules in fluidized bed and by extrusion/spheronization; polymeric gastroresistant coating in fluidized bed and acquiring of the plasmatic pharmacokinetic profiles in dogs through oral administration of the produced granules. The optimization of ddl amount in granules was carried out through modifications on the fluid-dynamic conditions of the process for production of the microparticles. The production and coating were carried out in fluidized bed, evaluating the variables of the process. A polymeric suspension of Kollicoat[®] MAE 100 P for coated enteric coating was used, because the ddl suffers desacetylation and losses its pharmacological efficacy when exposed to the gastric pH. The plasmatic pharmacokinetic profiles in dogs were analyzed by non-compartmental models. The experimental results shown that the encapsulation of ddl in microparticles was increased 13.3% compared to the previous formulation developed by Silva 2006, when modified fluid-dynamic conditions were introduced in the production process. The enteric coating of the granules was suitable as evaluated *in vitro* according to pharmacopeia. The analytical CLAE methodology associated to extraction in solid phase was adequate for the quantification of ddl. This methodology was validated to determine simultaneously ddl and ACL (internal standard) in samples of dog's plasma. The kinetic profiles shown that the new formulation is statistically different of the formulations distributed by SUS due to its controlled delivery along 36 hours. These results contribute for development new pharmaceutical form for oral administration. That possibility controlled liberation, requiring lower administration frequency, promoting treatment adhesion in a lot of diseases

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xx
LISTA DE ABREVIACÕES	xxii
CAPÍTULO 1	1
1.0. Introdução	
CAPÍTULO 2	
2.0. Objetivo	4
CAPÍTULO 3	
3.0. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)	6
3.1. Ciclo do HIV	7
3.2. Anti-retrovirais	8
3.2.1. <i>Inibidores de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo</i>	9
3.2.2. <i>Inibidores de transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo</i>	9
3.2.3. <i>Inibidores de protease</i>	9
3.3. O Fármaco Didanosina (2',3'- Didesoxiinosina)	10
3.3.1. <i>Características físico-química da ddl</i>	11
3.3.2. <i>Farmacocinética da ddl</i>	11
3.3.3. <i>Mecanismo de ação da ddl</i>	12
3.3.4. <i>Formas Farmacêuticas da ddl</i>	14
3.4. Quitosana	15
3.4.1. <i>Quitosana como material de veiculação de ativos</i>	17
3.4.1.1. <i>Gelificação ionotrópica</i>	17
3.4.1.2. <i>Secagem por atomização (spray-drying):</i>	18

3.4.1.3. <i>Emulsificação</i>	19
3.4.1.4. <i>Coacervação/precipitação</i>	19
3.4.2. <i>ddl em micropartículas de quitosana</i>	20
3.5. Granulação e Revestimento de Partículas através de Fluidização	21
3.5.1. <i>Fundamentos da fluidização</i>	22
3.5.1.1. <i>Regime de Fluidização</i>	22
3.5.1.2. <i>Características das partículas</i>	24
3.5.1.3. <i>Parâmetros fluidinâmicos</i>	25
3.5.1.3.1. <i>Porosidade mínima de fluidização</i>	26
3.5.1.3.2. <i>Velocidade de fluidização mínima</i>	26
3.5.1.3.3. <i>Distribuidor de gás para leito</i>	27
3.5.2. <i>Principais variáveis que afetam a fluidização</i>	28
3.5.2.1. <i>Parâmetros do equipamento</i>	29
3.5.2.2. <i>Parâmetros do processo</i>	29
3.5.2.3. <i>Parâmetros do material</i>	31
3.6. Revestimento de produtos farmacêuticos	33
3.6.1. <i>Revestimento Peliculado</i>	35
3.6.1.1. <i>Polímeros</i>	37
3.6.1.2. <i>Plastificantes</i>	38
3.6.1.3. <i>Corantes</i>	38
3.6.1.4. <i>Solventes</i>	39
3.6.2. <i>Revestimento com açúcar ou drageamento</i>	39
3.6.3. <i>Revestimento a seco</i>	40
3.6.4. <i>Kollidon® VA 64 e Kollicoat® MAE 100 P</i>	40
3.7. Ângulo de contato e revestimento	41
3.8. Farmacocinética	43
CAPÍTULO 4	
4.0. Material	45
4.1. Equipamentos	46

4.2. Métodos	48
4.2.1. <i>Caracterização da quitosana</i>	48
4.2.1.1. <i>Determinação do grau de desacetilação da quitosana</i>	48
4.2.1.2. <i>Determinação da massa molar da quitosana</i>	49
4.2.2. <i>Caracterização da ddl</i>	50
4.2.2.1. <i>Características físicas</i>	50
4.2.2.2. <i>Ponto de fusão</i>	51
4.2.2.3. <i>Espectroscopia de infravermelho (IE)</i>	51
4.2.2.4. <i>Espectroscopia de ultravioleta (UV)</i>	51
4.2.3. <i>Preparação das micropartículas de quitosana</i>	52
4.2.3.1. <i>Preparação da solução de quitosana</i>	52
4.2.3.2. <i>Preparação da solução de Tripolifosfato de sódio</i>	52
4.2.4. <i>Caracterização das micropartículas</i>	53
4.2.4.1. <i>Determinação da Distribuição granulométrica e potencial zeta das partículas de quitosana/TPP</i>	53
4.2.4.2. <i>Razão de Cargas das partículas de quitosana/TPP</i>	53
4.2.4.3. <i>Espectroscopia de infravermelho (IE) das micropartículas de quitosana/TPP</i>	55
4.2.4.4. <i>Reticulação da quitosana/TPP contendo ddl</i>	55
4.2.4.5. <i>Eficiência de incorporação da ddl</i>	56
4.2.4.6. <i>Carregamento da ddl</i>	56
4.2.4.7. <i>Grau de intumescimento</i>	56
4.2.4.8. <i>Densidade Real e aparente</i>	57
4.2.4.9. <i>Características das partículas quanto à fluidização</i>	57
4.2.5. <i>Morfologia das micropartículas de quitosana contendo didanosina</i>	58
4.2.5.1. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	58
4.2.5.2. <i>Microscopia óptica</i>	58
4.2.6. <i>Granulação e Revestimento das Micropartículas</i>	58
4.2.6.1. <i>Granulação por leite fluidizado</i>	58
4.2.6.2. <i>Esferonização e extrusão</i>	62

4.2.6.3. <i>Revestimento</i>	62
4.2.6.1.1. <i>Caracterização dos polímeros de revestimento</i>	63
4.2.6.1.1.1. <i>Tensão superficial</i>	63
4.2.6.1.1.2. <i>Determinação do ângulo de contato e do trabalho</i>	63
<i>de adesão</i>	
4.2.7. <i>Caracterização dos grânulos revestidos</i>	64
4.2.7.1. <i>Determinação do crescimento do grânulo</i>	65
4.2.7.2. <i>Características dos grânulos</i>	65
4.2.7.3 <i>Análise morfológica dos grânulos revestidos</i>	66
4.2.8. <i>Ensaio de gastrorresistência</i>	66
4.2.9. <i>Metodologia analítica</i>	67
4.2.9.1. <i>Adaptação da metodologia analítica</i>	67
4.2.9.2. <i>Preparação das soluções da curva padrão</i>	68
4.2.9.3. <i>Validação da metodologia analítica</i>	69
4.2.9.4. <i>Estudos de estabilidade</i>	69
4.2.9.5. <i>Protocolo Experimental</i>	70
4.2.9.6. <i>Avaliação do perfil de concentração plasmática x tempo</i>	71
4.2.9.7. <i>Análise não compartimental</i>	71
4.2.9.8. <i>Análise estatística</i>	73
CAPÍTULO 5	
5.0. <i>Caracterização da quitosana</i>	74
5.0.1. <i>Grau de desacetilação da quitosana</i>	74
5.0.2. <i>Massa molar</i>	75
5.1. <i>Análise da ddl</i>	76
5.1.1. <i>Características físicas</i>	76
5.1.2. <i>Ponto de fusão</i>	77
5.1.3. <i>Espectrofotômetro de infravermelho</i>	77
5.1.4. <i>Espectrofotômetro de ultravioleta</i>	78
5.2. <i>Caracterização das micropartículas</i>	79
5.2.1. <i>Distribuição granulométrica, razão de cargas R(+/-) e</i>	79

<i>potencial zeta das partículas de quitosana/TPP</i>	
5.2.2. <i>Espectroscopia de infravermelho (IE) das micropartículas</i>	84
5.2.3. <i>Melhoramento do processo de agitação</i>	85
5.2.4. <i>Eficiência de incorporação, carregamento e grau de intumescimento</i>	86
5.2.5. <i>Densidade real e aparente</i>	86
5.2.6. <i>Características das partículas quanto à fluidização</i>	86
5.3. <i>Morfologia das micropartículas</i>	87
5.3.1. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	87
5.3.2. <i>Microscopia óptica</i>	88
5.4. <i>Granulação e revestimento das partículas</i>	88
5.4.1. <i>Granulação</i>	88
5.5. <i>Caracterização dos polímeros de revestimento</i>	89
5.5.1. <i>Tensão Superficial</i>	89
5.5.2. <i>Ângulo de contato e do trabalho de adesão</i>	89
5.5.3. <i>Crescimento do grânulo</i>	90
5.5.4. <i>Características dos grânulos</i>	90
5.5.5. <i>Análise morfológica dos grânulos revestidos</i>	91
5.6. <i>Ensaio de gastrorresistência</i>	93
5.7. <i>Validação da metodologia analítica por CLAE</i>	93
5.7.1. <i>Seletividade</i>	94
5.7.2. <i>Linearidade</i>	94
5.7.3. <i>Exatidão</i>	96
5.7.4. <i>Repetibilidade e precisão intermediária</i>	96
5.7.5. <i>Limite de quantificação</i>	98
5.7.6. <i>Avaliação da recuperação e estabilidade da didanosina</i>	98
5.7.7. <i>Perfis plasmáticos de ddl em cães</i>	99

CAPÍTULO 6

6.0. <i>Conclusões</i>	104
------------------------	-----

CAPÍTULO 7

7.0. Sugestões para trabalhos futuros	106
---------------------------------------	-----

CAPÍTULO 8

8.0. Referências Bibliográficas	107
---------------------------------	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura do HIV (Adaptado de: SOUZA & ALMEIDA, 2003)	7
Figura 3.2. Esquema resumido do ciclo da replicação viral com as etapas em que atuam os medicamentos disponíveis no mercado (Adaptado de: SOUZA & ALMEIDA, 2003)	8
Figura 3.3. Estrutura química (1) da ddl; (2) da ddA; (3) da hipoxantina	12
Figura 3.4. Mecanismo simplificado da ativação da ddl (Adaptado de CAHOURS <i>et al.</i> , 2000)	13
Figura 3.5. Estrutura química da quitina (a); quitosana (b) (Adaptado de KUMAR, 2000)	16
Figura 3.6. Reticulação da quitosana com TPP, por gelificação ionotrópica (LAM <i>et al.</i> , 2006)	18
Figura 3.7. Configurações do leito fluidizado (a) leito fixo; (b) fluidização particulada; (c) fluidização borbulhante; (d) pistonado; (e) turbulento; (f) fluidização rápida (Adaptado de PONCELET & TEUNOU, 2001)	22
Figura 3.8. Diagrama simplificado de classificação de partículas para fluidização através de ar em condições normais (Adaptado de: GELDART, 1986).	24
Figura 3.9. Alguns projetos de distribuidor de uso comum: (a) placa perfurada, (b) campânula, (c) fendas horizontais contínuas, (d) coluna de tubos, (e) tubos com aberturas apontando para baixo (Adaptado de GELDART, 1986)	28
Figura 3.10. Estrutura química dos polímeros Kollidon [®] VA 64 e do Kolicat [®] MAE 100 P (www.pharma-solutions.basf.com . Acessado em 15/FEV/2007)	41
Figura 3.11. Ângulo de contato do sistema sólido-líquido-gás (DONIDA, 2004)	42
Figura 3.12. Fases da ação dos fármacos (Adaptado de Pereira, 2007)	43
Figura 4.1. Viscosímetro capilar utilizado para calcular a massa molar média da quitosana	49

Figura 4.2. Modelo de recipiente e impelidor padronizados no processo de agitação	55
Figura 4.3. Leito Fluidizado tipo Wurster (a); Distribuidor de gás para leito (b)	59
Figura 4.4. Apresenta a padronização dos tamises (a), tamisador vibratório (b) e moinho (c)	60
Figura 4.5. Goniômetro da marca Tantec utilizado no experimento	64
Figura 4.6. Dissolutor (a); aparato I (b)	67
Figura 5.1. (a) Curva de titulação potenciométrica e (b) sua derivada primeira para quitosana.	75
Figura 5.2. Relação linear entre concentração e viscosidade intrínseca, usada para a determinação da viscosidade intrínseca	76
Figura 5.3. Micrografias de ddl obtidas através de microscopia eletrônica de varredura utilizando aumento de 2.000 vezes	77
Figura 5.4. Espectro de infravermelho da ddl em pastilha de brometo de potássio	78
Figura 5.5. Espectro de UV da solução de 10 µg/mL ddl, em estudo, em metanol	79
Figura 5.6. Diâmetro médio da partícula em relação a razão de cargas R(+/-) (a); Potencial zeta em relação a razão de cargas R(+/-) (b); e a razão de cargas R(+/-) em relação a massa de TPP em (g) (c)	80
Figura 5.7. Influência de TPP no diâmetro médio das partículas	83
Figura 5.8. (a) Espectro de infravermelho da quitosana sólida e (b) Espectro das partículas de chitosana/TPP	84
Figura 5.9. Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (a) utilizando aumento de 500vezes e (b) utilizando aumento de 1000vezes	87
Figura 5.10. Micrografia das partículas através de microscopia óptica utilizando o aumentode 100 vezes.	88
Figura 5.11. Fotografias dos grânulos revestidos obtidas por estereoscópio das formulações 1, 2, 3 e 4	92

Figura 5.12. Perfis da liberação da ddl nas formulações testadas	93
Figura 5.13. Cromatogramas obtidos pela análise de CLAE (a) branco de plasma; (b) amostra da curva de calibração contendo ddl e ACL (padrão interno).	94
Figura 5.14. Média de seis curvas de calibração de ddl em plasma empregadas na validação da metodologia analítica por CLAE.	95
Figura 5.15. Perfil de concentração plasmático médio de ddl após administração de 500 mg do fármaco sob a forma de (a) grânulos (n = 11); (b) Videx EC [®] (n = 12) e (c) forma convencional (n = 9).	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Formulações utilizadas para o revestimento gastrorresistente em leito fluidizado.	62
Tabela 4.2. Formulações utilizadas para o revestimento gastrorresistente, por extrusão e esferonização.	62
Tabela 5.1. Condições experimentais para obter o grau de desacetilação da quitosana	76
Tabela 5.2. Principais bandas de infravermelho obtidas da ddl.	78
Tabela 5.3. Principais bandas de infravermelho obtidas com quitosanasólida e partículas de CS/TPP	84
Tabela 5.4. Condições agitação, a eficiência de encapsulação e carregamento da ddl	85
Tabela 5.5. Eficiência de incorporação, carregamento e grau de intumescimento referentes às micropartículas de quitosana contendo ddl	86
Tabela 5.6. Ângulos de contatos obtidos através da solução de Kollidon [®] VA 64 e da formulação de Kollicoat [®] MAE 100P	89
Tabela 5.7. Parâmetros geométricos dos grânulos de quitosana contendo ddl com diferentes revestimentos, sendo os grânulos de Videx [®] EC utilizados como controle	91
Tabela 5.8. Valores individuais de intercepto, inclinação e coeficiente de correlação das curvas de calibração de ddl obtidas na validação do método analítico.	95
Tabela 5.9. Valores de exatidão determinados para didanosina em plasma durante a validação do método analítico.	96
Tabela 5.10. Valores de variação intra-dia das amostras de LIQ e de controle de qualidade de ddl em plasma de cães.	97
Tabela 5.11. Valores de variação inter-dia das amostras de LIQ e de controle de qualidade de ddl em plasma de cães.	97
Tabela 5.12. Valores de variação da recuperação e estabilidade de ddl	99

em plasma de cão, no estudo de 24 horas, em temperatura ambiente.

Tabela 5.13. Valores de variação da recuperação e estabilidade de ddl 99
em plasma de cão, no estudo de 3 ciclos de congelamento e
descongelamento, sendo 12 horas cada ciclo.

Tabela 5.14. Parâmetros farmacocinéticos obtidos pela análise não- 102
compartimental a partir dos resultados plasmáticos.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ddAMP	2',3'- dideoxiadenosina -5'- monofosfato
ddA	2', 3' – dideoxiadenosina
ddATP	2', 3'- dideoxiadenosina trifosfato
g	Aceleração da gravidade
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
H	Altura do leito
θ	Ângulo de contato
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva do tempo zero ao infinito
f	biodisponibilidade,
CL_{tot}	Clearance total
C	Concentração
C_{max}	Concentração máxima plasmática
K	Constante de velocidade
ka	Constante de velocidade de absorção
ρ_s	Densidade aparente do sólido
ρ	Densidade do fluido
ρ_r	Densidade real do sólido
dp	Diâmetro da partícula
ddl	Didanosina
Φ_s	Esfericidade da partícula
PK	Farmacocinética
PD	Farmacodinâmica
FDA	<i>Food and drug administration</i>
ddIMP	Fosforilada em 5' monofosfato de ddl
GA	Grau médio de desacetilação
PK/PD	Modelos farmacocinéticos e farmacodinâmicos
n	Ordem da reação
ε	Porosidade do leito

pH	Potencial hidrogeniônico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
MAT	Tempo de absorção médio
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
MRT_{plasma}	Tempo de residência médio no plasma
t_{max}	Tempo para obter concentração máxima
σ	Tensão superficial
σ_{LV}	Tensão superficial entre as fases líquida e gasosa
σ_{SV}	Tensão superficial entre as fases sólido e líquido
WAD	Trabalho de adesão
TPP	Tripolifosfato de sódio
ΔP	Variação de pressão
U_{mf}	Velocidade de mínima fluidização
U_B	Velocidade para iniciar as bolhas
V	Velocidade superficial média
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
μ	Viscosidade do fluido
V_{dss}	Volume de distribuição no steady-state
AZT	Zidovudina

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.0. Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 2006, a AIDS é a manifestação clínica na forma de sinais, sintomas e resultados laboratoriais que indiquem deficiência imunológica causada por infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) que leva, em média, oito anos para se manifestar. No Brasil, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, até junho de 2006, já foram registrados cerca de 430 mil casos da doença.

O Brasil mantém sua posição entre os países com epidemia, com prevalência da infecção pelo HIV de 0,61% entre a população de 15 a 49 anos. A OMS estima ainda que no Brasil, cerca de 600 mil pessoas estão infectadas com HIV ou desenvolveram AIDS.

Dentre os fármacos utilizados para o tratamento da AIDS, a ddl é um importante anti-retroviral, também produzido pela indústria brasileira. Na sua forma

convencional, a ddl é administrada em comprimidos tamponados a fim de prevenir a sua desacetilação, com conseqüente desativação, quando exposta ao pH ácido do estômago (Mc EVOY, 2002)

A administração da ddl com antiácidos, como carbonato de cálcio e hidróxido de magnésio e alumínio, para aumentar o pH gástrico, está associada com alguns efeitos colaterais como constipação, diarreia e com o uso contínuo pode ocasionar problemas renais, por isso é contra indicado para pacientes que já apresentam algum problema relacionado aos rins. Além disso, a alta dose de antiácidos diminui a biodisponibilidade de alguns fármacos que por ventura podem ser associado ao tratamento do paciente portador de AIDS por alterar o pH gástrico, como por exemplo, a administração de ddl com cetoconazol, ou por causar a formação de precipitados insolúveis ao ser administrado com quinolonas e tetraciclina (¹DAMLE *et al.*, 2002).

A fim de diminuir os efeitos colaterais provocados pela forma farmacêutica convencional de ddl nos pacientes portadores de HIV, na década de 90 foram iniciados estudos de gastroproteção em grânulos de ddl, como também a veiculação da ddl em lipossomas. A empresa pioneira na produção de cápsulas contendo grânulos gastrorresistente de ddl foi a Bristol-Myers Squibb em 2001, cujo medicamento comercializado é denominado Videx EC[®]. Diversos estudos mostram os benefícios farmacocinéticos que levaram a comodidade de administração uma vez ao dia, e a ausência de efeitos colaterais indesejáveis, decorrentes dos antiácidos (OKIYMA *et al.*, 2002; COOPER, 2002; KUNCHES *et al.*, 2001; ¹DAMLE *et al.*, 2002; ²DAMLE *et al.*, 2002; ³DAMLE *et al.*, 2002). A veiculação da ddl em lipossomas produziu resultados satisfatório, porém não teve boa aceitação por parte dos pacientes devido à sua forma injetável de administração.

Apesar dos benefícios, o medicamento Videx EC[®] possui alto custo, que o inviabiliza com relação à distribuição por parte dos órgãos governamentais em países em desenvolvimento como o Brasil. Para contornar o problema de custo,

mantendo os benefícios da ausência de antiácidos no medicamento, SILVA (2006) estudou a veiculação da ddl em micropartículas de quitosana reticulada com tripolifosfato (TPP). Nesse trabalho foram preparadas e caracterizadas várias formulações, selecionando a mais promissora com relação ao tipo de agente reticulante, estabilidade e eficiência de incorporação da ddl, diâmetro médio das partículas e grau de intumescimento.

A quitosana é um polímero natural abundante no Brasil que, além de representar redução de custos do medicamento, possui propriedades vantajosas para a veiculação de fármacos, tais como a capacidade de liberação controlada dos agentes ativos; mucoadesividade nas mucosas corpóreas; facilidade de esterilização pelos métodos convencionais e capacidade de facilitar a dissolução de fármacos insolúveis e pouco solúveis em água (AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

Os estudos de SILVA (2006) conduziram à apresentação da ddl na forma de grânulos compostos de micropartículas de quitosana reticulada com TPP, utilizando a própria quitosana como excipiente. Esses grânulos apresentaram um aumento significativo na afinidade pela mucosa, caracterizada pela interação eletrostática entre cargas positivas dos grupos amina protonados da quitosana com as cargas negativas do ácido siálico presente na mucina. Em estudo *in vitro* através da técnica do saco intestinal invertido os grânulos apresentaram maior liberação da ddl em relação à forma farmacêutica convencional da ddl e dos grânulos sem o uso de excipiente.

Neste contexto, o presente trabalho teve por finalidade aprimorar a formulação desenvolvida por SILVA (2006), através da obtenção de maior eficiência de encapsulação, estudar o recobrimento dos grânulos com polímero gastrorresistente em leito fluidizado e realizar os estudos de farmacocinética *in vivo* desta forma farmacêutica.

CAPÍTULO 2

OBJETIVO

2.0. Objetivo

Neste trabalho foram estudados a produção e farmacocinética de uma nova formulação farmacêutica do fármaco ddl, composta de grânulos gastrorresistentes de quitosana contendo a ddl incorporada em micropartículas, para administração por via oral no tratamento da AIDS.

Para atingir este objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

1. Otimização do processo de produção das partículas de quitosana contendo ddl desenvolvidas por SILVA (2006), através do aprimoramento das condições experimentais, como agitação, parâmetros fluidodinâmicos, uso de chicanas, para proporcionar maior eficiência de encapsulação da ddl nas micropartículas de quitosana.

2. Produção de grânulos compostos de micropartículas de quitosana contendo ddl, em leite fluidizado e por extrusão/esferonização. Seleção de uma formulação de polímero gastrorresistente para o recobrimento dos grânulos e avaliação das condições operacionais adequadas para o seu recobrimento.

3. Avaliação do perfil farmacocinético plasmático da ddl após administração oral dos grânulos revestidos a cães a fim de determinar sua biodisponibilidade relativa e possível liberação controlada *in vivo*.

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.0. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O HIV é diferente dos outros vírus por atacar e danificar o sistema imunológico do homem (PEÇANHA, *et al.*, 2002; SOUZA & ALMEIDA, 2003).

Um dos componentes do sistema imunológico alvo principal do vírus HIV são os linfócitos T. Dentre os linfócitos T existe uma classe denominada T4, que tem um papel de extrema importância no desencadear da resposta imunológica. O vírus HIV ao infectar os linfócitos T, conduz à deficiência do sistema imunológico e à sua progressiva inoperância, produzindo imunodeficiência (PEÇANHA, *et al.*, 2002)

3.1. Ciclo do HIV

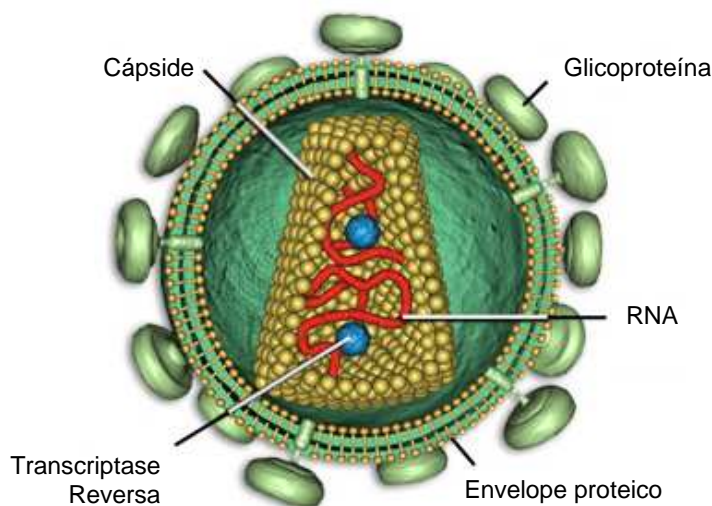


Figura 3.1. Estrutura do HIV (Adaptado de SOUZA & ALMEIDA, 2003).

O ciclo do HIV começa quando ocorre a infecção de uma célula como conseqüência da ligação do vírus HIV (Figura 3.1.) a um receptor celular, geralmente o T CD4+, por meio de sua proteína gp 120; o vírus então se funde à membrana celular e o conteúdo da cápside é liberado no citoplasma celular. A enzima transcriptase reversa, presente no HIV catalisa a produção de uma cópia de ácido desoxirribonucléico (DNA) a partir do ácido ribonucléico (RNA) do vírus HIV. A cópia de DNA de dupla hélice é então transportada ao núcleo celular onde uma segunda enzima do HIV, a integrase, catalisa a incorporação do DNA viral ao material genético do hospedeiro. A expressão subsequente dos genes virais resulta na transcrição do RNA a partir do DNA do HIV e na tradução das proteínas virais.

As proteínas virais recém-formadas são, no entanto, produzidas na forma de precursores de poliproteínas, longas unidades compostas de enzimas virais e proteínas estruturais ajuntadas.

As poliproteínas e o RNA viral movem-se para a superfície da célula onde ficam incorporados aos novos vírus que brotam na membrana celular, levando parte da mesma com eles para formar a camada externa viral. Os vírus recém-formados seriam, no entanto, não infectantes sem a ação de uma terceira e essencial enzima do HIV, a protease, que processa as poliproteínas virais em proteínas e enzimas estruturais funcionais (Figura 3.2) (SOUZA & ALMEIDA, 2003).

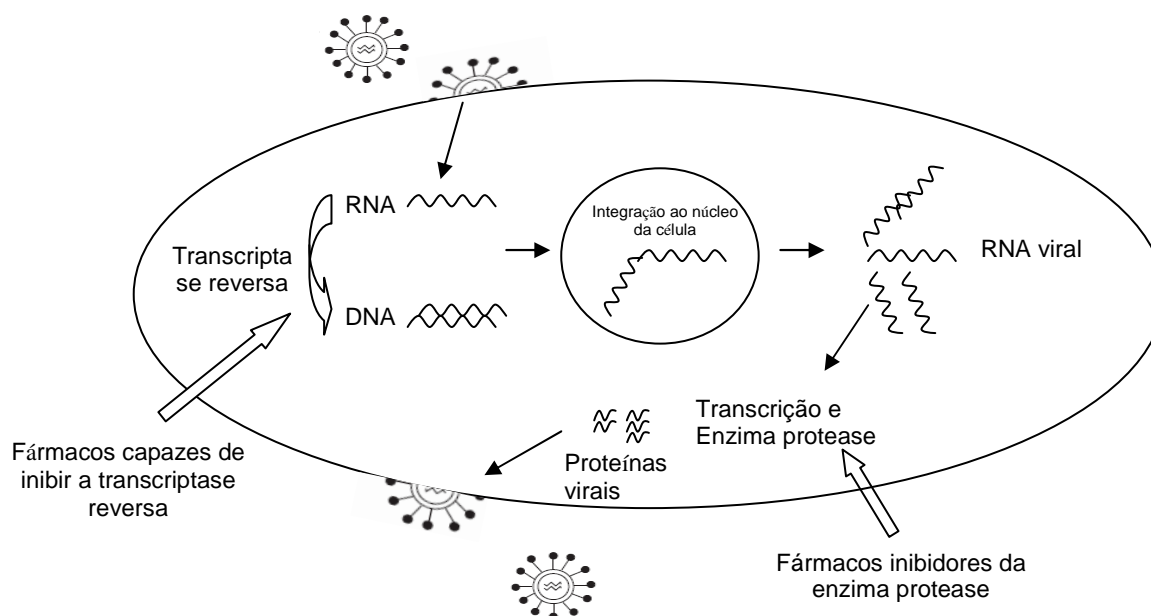


Figura 3.2. Esquema resumido do ciclo da replicação viral com as etapas em que atuam os medicamentos disponíveis no mercado (Adaptado de SOUZA & ALMEIDA, 2003).

3.2. Anti-retrovirais

O ciclo de replicação HIV apresenta diversos eventos relacionados exclusivamente a componentes virais, que podem ser utilizados para intervenção quimioterápica. Os componentes disponíveis atualmente como fármacos anti-HIV

atuam na inibição de transcriptase reversa análoga de nucleosídeos, na inibição de transcriptase reversa não análoga de nucleosídeo ou na inibição da protease (PEÇANHA, *et al.*, 2002; SOUZA & ALMEIDA, 2003).

3.2.1. Inibidores de transcriptase reversa análoga de nucleosídeo

São medicamentos administrados na forma de pró-fármacos, pois necessitam ser fosforilados pelo organismo pelas enzimas celulares chamadas de quinases para se tornarem ativos, e em seguida, atuam através da inclusão de falsos nucleosídeos na molécula de DNA viral, interrompendo assim a replicação viral. Exemplos desse grupo de medicamentos são zidovudina (AZT), stavudina, zalcitabina, lamivudina, didanosina (ddl), abacavir e tenofovir diisopropil (PEÇANHA, *et al.*, 2002; SOUZA & ALMEIDA, 2003).

3.2.2. Inibidores de transcriptase reversa não análoga de nucleosídeo

São fármacos que atuam como inibidores não competitivos de transcriptase reversa, bloqueando a reação química de duplicação da molécula de RNA viral sem interferir na ligação dos nucleosídeos. Exemplos desses medicamentos são nevirapina, efavirens e delavirdina (PEÇANHA, *et al.*, 2002; SOUZA & ALMEIDA, 2003).

3.2.3. Inibidores de protease

Atua na inibição da protease viral e proteases celulares, enzima responsável por clivar a poliproteína codificada, formada no ribossomo da célula hospedeira. Exemplos desses medicamentos são saquinavir, ritonavir, indinavir,

lopinavir, nelfinavir e amprenavir (PEÇANHA, *et al.*, 2002; SOUZA & ALMEIDA, 2003).

3.3. O Fármaco Didanosina (2',3'- Didesoxiinosina)

Dentre os fármacos para o combate do HIV, a ddl é um importante anti-retroviral, cujo medicamentos são produzidos pela indústria brasileira, tais como Farmanguinhos, Lafepe, Furpe, Lifal e Iquego e Cristália, usado no tratamento da AIDS. Na sua forma convencional é administrada em comprimidos tamponados a fim de prevenir a sua desacetilação quando exposto ao pH ácido do estômago (CLARK, *et al.*, 2006).

A administração da ddl com antiácidos para aumentar o pH gástrico, como carbonato de cálcio e hidróxido de magnésio e alumínio está associada com alguns efeitos colaterais como constipação e diarreia e com o uso contínuo podem ocasionar problemas renais. Por isso, é contra indicado para pacientes que já apresentam algum problema relacionado com os rins. Além disso, a alta dose de antiácidos diminui a biodisponibilidade de alguns fármacos por alterar o pH gástrico, como por exemplo, a administração de ddl com cetoconazol, quinolonas e tetraciclina (DAMLE *et al.*, 2002).

Além dos efeitos colaterais, o uso de hidróxido de magnésio e alumínio, e carbonato de cálcio aumenta expressivamente o tamanho do comprimido. Para contornar essa desvantagem, a indústria farmacêutica americana lançou em 2001 a ddl em grânulos gastrorresistentes. Em função do custo elevado, o Ministério da Saúde disponibiliza essa nova formulação com restrições, priorizando a importação de outros anti-retrovirais não produzidos no Brasil (SILVA, 2006).

Uma maneira para proteger a ddl da degradação estomacal, devido ao pH ácido, é revesti-la com polímero resistente à acidez, mas que possa ser melhor absorvido na primeira porção do duodeno (¹DAMLE *et al.*, 2002).

3.3.1. Características físico-química da ddl

Segundo a Farmacopéia Brasileira, 2003, a ddl é um pó cristalino branco, de fórmula molecular $C_{10}H_{12}N_4O_3$, massa molar 236,23 g/mol e faixa de fusão 160-163⁰ C. A ddl apresenta-se ligeiramente solúvel em água, insolúvel em acetona, clorofórmio, etanol e éter etílico e solúvel em soluções alcalinas diluídas.

Segundo o FDA, 2006, a ddl é altamente instável em meio ácido e completamente estável em meio básico. Por exemplo, uma solução de ddl a 10% em pH < 3 a 37°C se decompõe em hipoxantina em menos de dois minutos.

3.3.2. Farmacocinética da ddl

Segundo o FDA, 2006, a ddl é rapidamente absorvida em humanos após a liberação da forma farmacêutica, e a administração oral proporciona um pico de concentração plasmática em torno de 15 minutos. A concentração plasmática aumenta proporcionalmente com a dose administrada que pode variar de 50 a 400 mg.

A ddl é degradada em meio ácido e sua absorção é reduzida na presença de alimentos, sendo o ideal é administrá-la 30 minutos antes da refeição ou 2 horas após a mesma. Com isso, a ddl administrada com antiácidos apresenta biodisponibilidade de 40%, podendo ocorrer variação dependendo do indivíduo (BALINT, 2001).

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) no plasma é de aproximadamente 1 hora e do seu metabólito 2', 3'- didesoxiadenosina trifosfato (ddATP) é de aproximadamente 12 horas. A concentração da ddl no fluido cérebro-espinhal é de aproximadamente 20% em relação à concentração plasmática e a sua ligação as proteínas representam menos que 5% (BALINT, 2001).

A ddl é metabolizada em ácido úrico, em metabólitos purínicos e hipoxantina. Cerca de 40 a 50% do fármaco excretado de forma inalterada na urina.

3.3.3. Mecanismo de ação da ddl

A ddl requer metabolismo intracelular para se tornar ativa em ddATP. A ddl tem sido preparada enzimaticamente em temperatura ambiente, por desaminação da 2', 3' – dideoxiadenosina (ddA) usando a enzima adenosina e posterior recristalização com metanol (NASSAR, 1993). A ddA administrada pela via oral é nefrotóxica e por isso, a ddl foi desenvolvida como um pró-fármaco da ddATP. A Figura 3.3. representa as moléculas de ddl, ddA e da hipoxantina que é o metabólito da ddl (BALINT, 2001; CAHOUS et al, 2000).

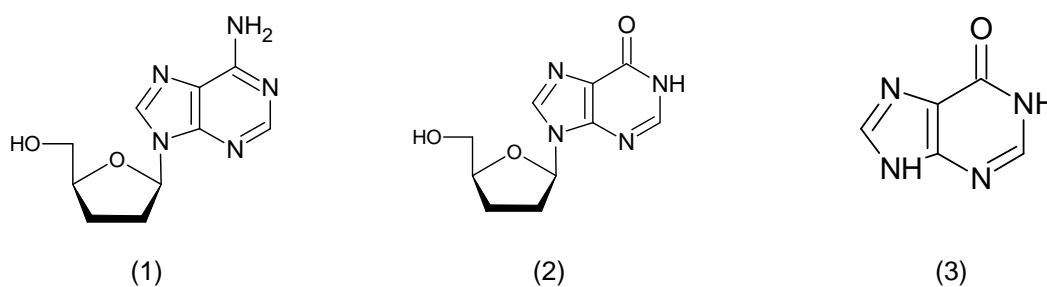


Figura 3.3. Estrutura química (1) da ddl; (2) da ddA; (3) da hipoxantina.

A ddl penetra nas células por difusão passiva utilizando o mesmo mecanismo que os nucleosídeos fisiológicos. Como os outros nucleosídeos

análogos, três níveis de fosforilação são requeridos para transformar a ddI na forma ativa trifosfato. Portanto, há biotransformação intracelular originando metabólito ativo, o ddATP, que ao inibir a transcriptase reversa, suprime a replicação do vírus HIV (BALINT, 2001; CAHOURS *et al.*, 2000). A Figura 3.4 representa o mecanismo de ação simplificado de ativação da ddI.

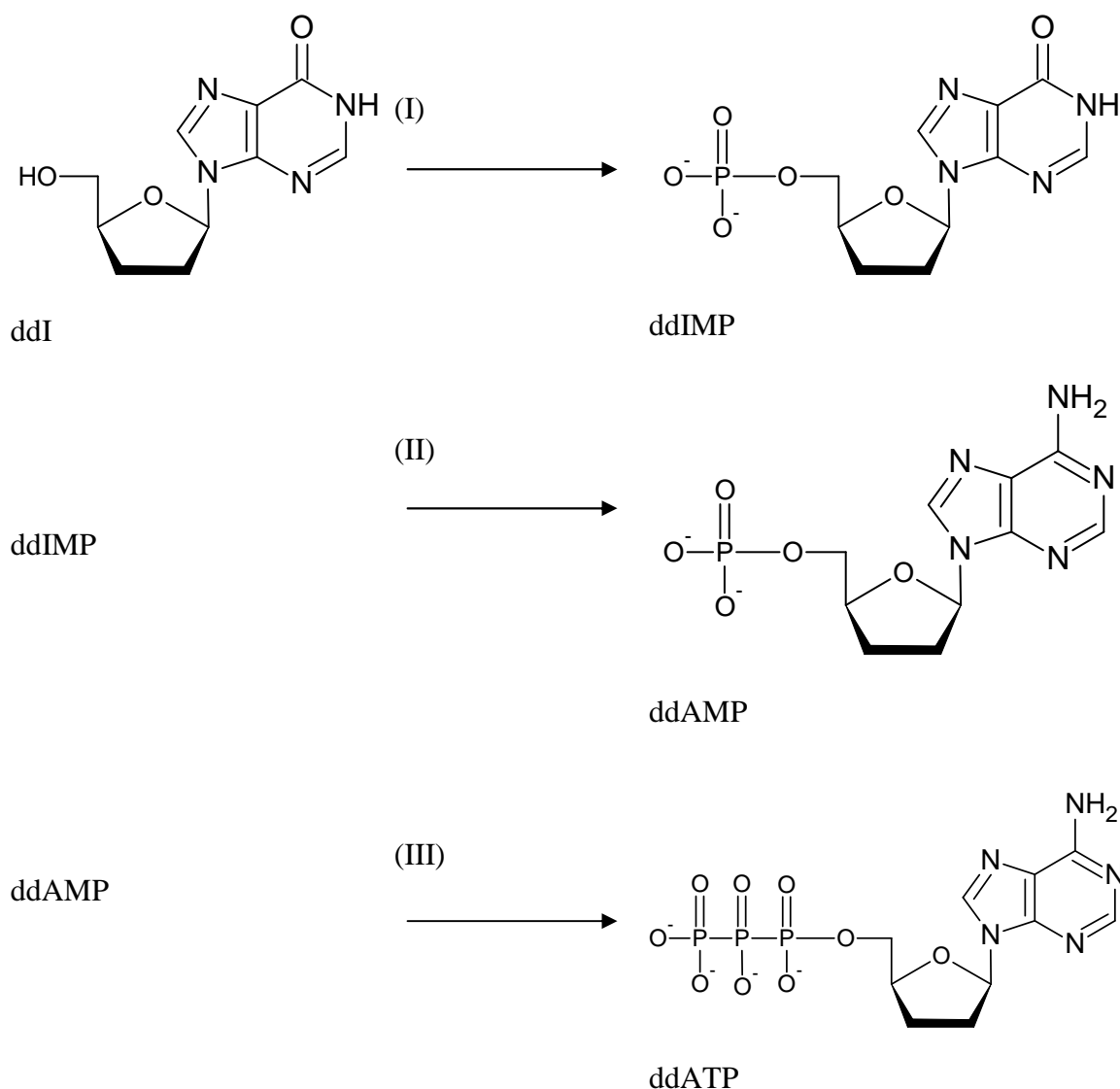


Figura 3.4. Mecanismo simplificado da ativação da ddI (Adaptado de: CAHOURS *et al.*, 2000)

Etapa I - Inicialmente, é fosforilada em 5' monofosfato de ddI, ou 2',3'-didesoxiinosina -5'- monofosfato (**ddIMP**), pela ação da fosfotransferase associada à enzima 5' nucleotidase.

Etapa II - Em seguida a **ddIMP**, é aminada transformando-se em 2',3'-didesoxiadenosina -5'- monofosfato (**ddAMP**) pela ação combinada das enzimas adenilsuccinato sintetase com a adenilsuccinato liase.

Etapa III - Posteriormente, a **ddAMP** sofre duas fosforilações subseqüentes, pela ação de uma quinase, sendo transformada em 2',3'-didesoxiadenosina-5'-trifosfato (**ddATP**), o metabólito ativo. (CAHOURS *et al*, 2000).

3.3.4. Formas Farmacêuticas da ddl

A fim de diminuir os efeitos colaterais provocados pela forma farmacêutica convencional de ddl nos pacientes portadores de HIV, na década de 90 iniciaram-se estudos de encapsulação da ddl em lipossomas, grânulos e micropartículas.

HARVIE *et al.* (1995) & DESORMEAUX *et al.* (1994) obtiveram resultados significativos ao analisar a farmacocinética *in vivo* da ddl encapsulada em lipossomas, trazendo benefícios como o direcionamento aos reservatórios de HIV corpóreos, menor toxicidade, redução da dose e da frequência de administração, mas esses resultados foram obtidos com a administração intravenosa, o que se torna um inconveniente na terapia anti-retroviral.

A empresa pioneira na produção de cápsulas com grânulos gastrorresistentes de ddl foi a Bristol-Myers Squibb em 2001, denominado Videx EC®. Diversos estudos mostram os benefícios farmacocinéticos que levaram a comodidade de administração uma vez ao dia, sem causar efeitos colaterais indesejáveis decorrentes aos antiácidos (OKIYMA *et al.*, 2002 & COOPER, 2002; KUNCHES *et al.*, 2001; ¹DAMLE *et al.*, 2002; ²DAMLE *et al.*, 2002; ³DAMLE *et al.*, 2002).

Recentemente, SILVA (2006) patenteou a forma farmacêutica de grânulos contendo micropartículas de quitosana incorporando ddl, favorecendo importantes

características como a mucoadesão na parede do trato gastrointestinal promovendo a liberação modificada do fármaco, menor frequência de administração, não apresentando efeitos colaterais relacionados aos antiácidos, facilidade de administração para crianças e custo acessível para o Ministério da Saúde distribuir aos portadores de HIV que fazem uso desta medicação.

3.4. Quitosana

A quitosana foi descoberta recentemente e vem recebendo grande atenção em uso na forma de biomaterial e no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada (JANES *et al.*, 2001).

A quitosana (Figura 3.5.b) é obtida da desacetilação da quitina (Figura 3.5.a), um abundante polissacarídeo obtido de exoesqueleto de crustáceos, como o siri (KUMAR, 2000). Caracteriza-se por ser um aminopolissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível (ROBERTS, 1992; LEE *et al.*, 2001). Sua estrutura química é formada pelos copolímeros β -(1 \rightarrow 4)- 2-amino 2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4) - 2-acetamida 2-desoxi-D-glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário. A quitosana vem sendo estudada como biomaterial de potencial aplicação principalmente nas áreas médica e farmacêutica (ROBERTS, 1992).

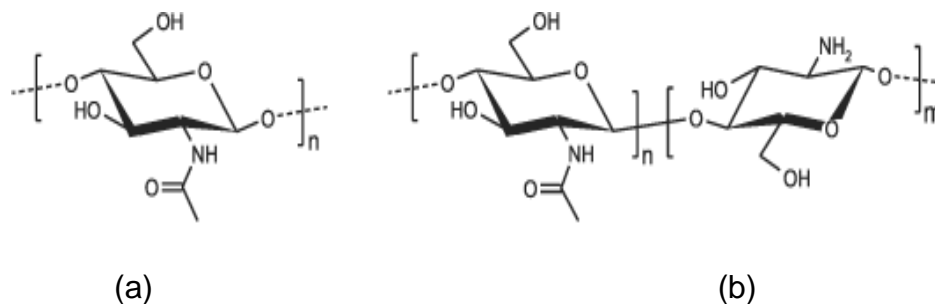


Figura 3.5. Estrutura química da quitina (a); quitosana (b) (Adaptado de KUMAR, 2000).

A quitosana é usada no tratamento de águas, produção de cosméticos, medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais. É insolúvel em água, mas dissolve-se em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, fórmico, cítrico, além de ácido clorídrico diluído resultando em soluções viscosas (SANTOS *et al.*, 2003).

Nessas soluções diluídas de ácidos a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico, constituído de um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-acetomido-2-deoxi-D-glicopirranose de composição variável em função do grau médio de acetilação (GA), que representa a fração de unidades 2-acetomido-2-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e é um dos principais parâmetros para a sua caracterização. A proporção relativa dessas unidades nas cadeias macromoleculares de quitosana tem efeito marcante na sua solubilidade (SANTOS *et al.*, 2003).

Desde 1980, a quitosana vem sendo usada como excipiente de fármacos solúveis em água a fim de obter uma liberação controlada/sustentada ou utilizada como componente de formulações de fármacos pouco solúveis em água a fim de melhorar a biodisponibilidade. Recentemente, a quitosana tem mostrado atividade mucoadesiva e propriedades que facilitam a penetração de macromoléculas através das células intestinais e da mucosa nasal. Essas propriedades têm aberto promissoras perspectivas para o uso da quitosana em formas farmacêuticas de

uso oral e nasal, principalmente como carreador de proteínas e peptídeos (REMUNAN-LOPEZ *et al.*, 1998).

O uso de polímeros naturais em formas farmacêuticas com liberação modificada tem recebido considerável atenção, especialmente sob ponto de vista de segurança. Entre os polímeros, a quitosana tem aumentado sua importância farmacêutica devido a sua boa biocompatibilidade, atoxicidade e biodegradabilidade (REMUÑAN-LOPEZ *et al.*, 1998)

3.4.1. Quitosana como material de veiculação de ativos

A quitosana tem sido considerado material para a produção de micro ou nanopartículas, devido a algumas vantagens como a habilidade de proporcionar uma liberação controlada na presença de agentes ativos; possuir mucoadesividade nas mucosas corpóreas, ser facilmente esterilizável pelos métodos convencionais e melhorar a dissolução de fármacos insolúveis e pouco solúveis em água (AGNIHOTRI *et al.*, 2004)

As principais técnicas empregadas para a veiculação de compostos ativos incluem gelificação ionotrópica, secagem por atomização (*spray-drying*), emulsificação e coacervação.

3.4.1.1. Gelificação ionotrópica:

Devido às características catiônicas da quitosana, ela se complexa com cargas opostas de moléculas como tripolifosfato de sódio (TPP), mostrado na Figura 3.6., ou polímeros catiônicos como o alginato, para a produção de partículas para liberação controlada de fármacos e tem sido muito utilizado devido a sua simplicidade e facilidade. Além disso, essa aplicação evita possível

toxicidade dos reagentes e de efeitos indesejáveis (SHU & ZHU, 2000; AGNIHOTRI *et al*, 2004; SINHA *et al*, 2004).

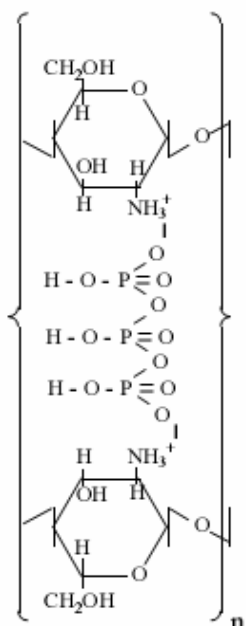


Figura 3.6. Reticulação da quitosana com TPP, por gelificação ionotrópica (LAM *et al*, 2006).

O TPP caracteriza-se como um poliânion e pode interagir com quitosana através das forças eletrostáticas (SHU & ZHU, 2000). Além disso, é atóxico e promove a reticulação iônica da quitosana em condições relativamente fáceis e com baixo custo de processo. Ao contrário de outros agentes reticulantes, ele não apresenta graves restrições no manuseio e armazenamento.

3.4.1.2. Secagem por atomização (*spray-drying*)

Esse método baseia-se na dissolução da quitosana em uma solução aquosa em pH ácido, o fármaco é dissolvido ou disperso no mesmo solvente junto com o agente capaz de realizar a reticulação (*crosslinking*). Essa solução é

atomizada em uma câmara com fluxo de ar quente. A atomização leva a produção de gotas, no qual o solvente evapora instantaneamente e forma partículas secas que são coletadas através de um ciclone (AGNIHOTRI *et al*, 2004; SINHA *et al*, 2004).

3.4.1.3. Emulsificação

A emulsificação consiste na adição de uma fase oleosa contendo tensoativo na solução aquosa de quitosana. As gotas de quitosana suspensas na fase oleosa podem ser enrijecidas pela adição de um ânion polivalente como o TPP ou glutaraldeído, como agente reticulantes. Em seguida, as partículas são separadas, lavadas repetidamente com solvente orgânico e secadas. Geralmente, o fármaco é adicionado na solução de quitosana.

Nesse procedimento os tamanhos das partículas são controlados através do tamanho da gota da fase aquosa, temperatura, velocidade, concentração de quitosana, concentração de tensoativo, viscosidade das fases, entre outros (AGNIHOTRI *et al*, 2004; SINHA *et al*, 2003).

3.4.1.4. Coacervação/precipitação

No método da coacervação/precipitação, a solução aquosa do polímero terá a sua solubilidade diminuída pela modificação do meio de solubilização, como pela adição de não-solventes ou solutos hidrossolúveis que concorram pelo solvente, pelo abaixamento da temperatura ou por alteração do pH. A adição desses fatores induzirá a separação das fases do sistema, constituindo-se uma delas rica em matéria coloidal e outra pobre. Na coacervação simples, o colóide hidrofílico é subtraído do solvente pela adição de uma substância hidrofílica concorrente, tal como um sal ou álcool. A coacervação complexa é produzida pela

mistura de dois polietrólitos de cargas opostas (AGNIHOTRI *et al*, 2004; SINHA *et al*, 2004).

3.4.2. *ddl em micropartículas de quitosana*

Como mencionado anteriormente, a quitosana possui característica catiônica e com isso pode ser complexada com polímeros de cargas negativas como o TPP. Essa complexação apresenta uma propriedade importante da quitosana em formar gel devido à atuação de forças intra-intermoleculares de ligações cruzadas mediada pelos poliânions, ao entrar em contato com alguns polímeros (JANES *et al.*, 2001). ^{1,2}BODMEIER *at al.* (1989) foi o primeiro autor a mencionar a gelificação ionotrópica com TPP para encapsulação de fármacos.

SILVA (2006) desenvolveu um estudo da preparação de micropartículas de quitosana complexada com TPP contendo ddl. Nesse trabalho foram avaliados várias formulações e foi escolhida a que apresentou características ótimas como tipo de agente reticulante, estabilidade da ddl, diâmetro médio das partículas, grau de intumescimento e eficiência de incorporação da ddl, sendo que as melhores condições foram obtidas com o uso de 2,0% (m/v) de quitosana, 10,0% de TPP e 39,0 g de ddl/mL.

Os grânulos desenvolvidos por SILVA (2006) foram preparados pelo método úmido de extrusão-esferonização. A extrusão foi realizada manualmente e a esferonização foi realizada artesanalmente. Realizou-se também o revestimento gastrorresistente desses grânulos, porém o revestimento não atendeu às especificações farmacopéicas.

3.5. Granulação e Revestimento de Partículas através de Fluidização

A fluidização é uma operação unitária usada para revestimento e granulação simultaneamente, através da atomização de uma solução ou suspensão de revestimento, nas partículas em suspensão (HEMATI *et al.*, 2003). O ar, filtrado e aquecido, responsável pela suspensão das partículas, é insuflado ou succionado por meio do leito de pó ainda não misturado para fluidizar as partículas e misturar os pós. A fluidização é considerada atualmente um processo de mistura muito eficiente em relação aos outros métodos (AULTON, 2005).

O processo de leito fluidizado (Figura 3.7.) tem recebido considerável atenção na indústria farmacêutica e cosmética. Entretanto, outras indústrias como alimentícia, química e agro-químico tem adaptado essa tecnologia para uso em larga escala (HEMATI *et al.*, 2003).

As principais razões para o uso desta tecnologia são melhorar as propriedades de fluxo, manuseio e as características de compressão dos pós; produzir partícula do mesmo tamanho ou da mesma geometria, modificando a densidade das mesmas; melhorar a aparência, textura, odor das partículas e proteger do oxigênio, umidade e incompatibilidades dos agentes ativos; controlar o tempo de dissolução (HEMATI *et al.*, 2003).

A aplicação da fluidização na granulação e revestimento de partículas apresenta vantagens em relação aos processos convencionais realizados em drageadeiras. Em leito fluidizado, os processos de granulação e revestimento são realizados em uma única unidade, economizando custos, tempo e perdas de transferências, ao contrário dos métodos convencionais e o processo é totalmente automatizado, uma vez que as condições operacionais determinantes para o processo de granulação tenham sido otimizadas (AULTON, 2005).

As principais desvantagens do uso do leito fluidizado estão em requerer investimentos iniciais maiores que os métodos mais tradicionais (AULTON, 2005) e o processo de desenvolvimento em granuladores de leito fluidizado é longo e específico para cada produto.

3.5.1. Fundamentos da fluidização

3.5.1.1. Regime de Fluidização

O princípio do leito fluidizado é manter as partículas em suspensão num compartimento fechado do equipamento através de um jato de ar ascendente. GELDART (1986) descreve diferentes configurações da função da velocidade do ar dentro do compartimento em estudo (Figura 3.7.).

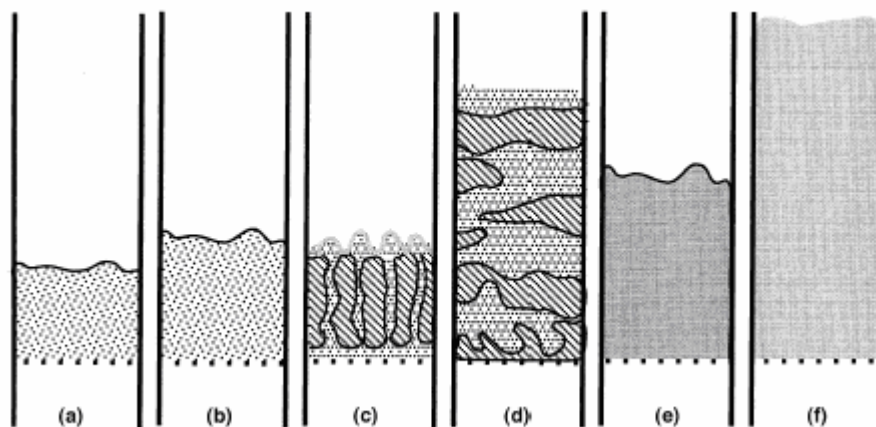


Figura 3.7. Configurações do leito fluidizado (a) leito fixo; (b) fluidização particulada; (c) fluidização borbulhante; (d) pistonado; (e) turbulento; (f) fluidização rápida (Adaptado de: PONCELET & TEUNOU, 2001).

De acordo com GRACE (1984), a fluidização pode ser dividida em vários regimes:

Leito fixo: com velocidade do gás de zero até a de mínima fluidização. Nesta fase, as partículas estão imóveis e o fluido escoava entre os interstícios.

Fluidização particulada: com a velocidade do gás mínima fluidização e a mínima para iniciar o regime de bolhas. O leito se expande de maneira homogênea, a superfície superior é bem definida, pouca agregação de partículas e flutuação de pressão pequena.

Fluidização borbulhante: com velocidade do gás entre a mínima para iniciar o regime de bolhas e a mínima para o regime pistonado. Várias bolhas são formadas próximas ao distribuidor e sobem para a superfície do leito.

Fluidização pistonada: com velocidade do gás entre a mínima para a fluidização pistonada e a mínima para o regime turbulento. As bolhas formadas ocupam grande parte da coluna e a superfície superior sobe e sofre colapsos com frequência, flutuações de pressão são observadas.

Fluidização turbulenta: com velocidade do gás entre a mínima para a fluidização turbulenta e a velocidade terminal das partículas. São observadas pequenas regiões de vazios e movimentos desordenados de partículas, a superfície superior é indefinida e pequenas flutuações de pressão são observadas.

Fluidização rápida: com velocidade do gás acima da velocidade terminal das partículas. A superfície não é definida, as partículas são transportadas para fora pelo topo e podem ser capturadas por um ciclone e reticuladas próximo ao fundo da coluna.

Transporte pneumático: a velocidade do gás é muito superior à velocidade terminal das partículas. Não há praticamente partículas descendentes próximos a superfície do distribuidor de ar, pois as partículas são arrastadas do leito.

3.5.1.2. Características das partículas

As partículas podem ser classificadas de acordo com suas propriedades e funcionalidade. GELDART (1986) mostra que o processo de fluidização dos pós pode ser classificado em grupo de acordo com a densidade do fluido, tamanho. Esta classificação pode ser melhor visualizada na figura 3.8. em que, o eixo das abscissas caracteriza o diâmetro da partícula (d_p) em micrômetro e o eixo das ordenadas é composto pela diferença entre a densidade aparente do sólido (ρ_s) e da densidade do fluido (ρ).

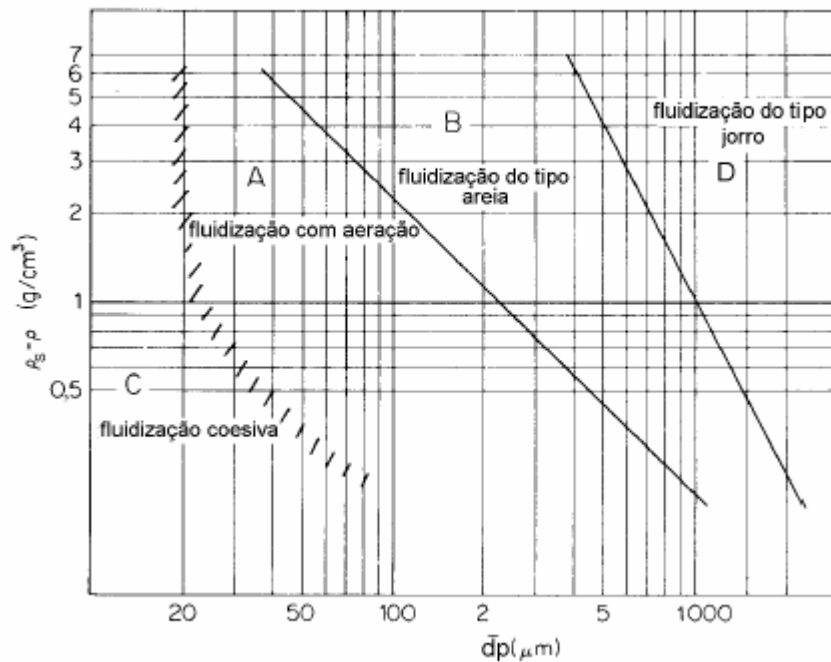


Figura 3.8. Diagrama simplificado de classificação de partículas para fluidização através de ar em condições normais (Adaptado de: GELDART, 1986).

Categoria C: possui baixa densidade, tem partículas coesivas, é extremamente difícil de fluidizar, com a formação de canais e sem a formação de bolhas. Proporciona baixa expansão do leito e pobre mistura dos sólidos.

Categoria A: possui uma grande faixa de fluidização entre a velocidade de mínima fluidização (U_{mf}) e velocidade para iniciar as bolhas (U_B), proporcionando

alta expansão do leito e alta mistura do gás e do sólido. Quando a velocidade do gás aumenta acima da velocidade para iniciar as bolhas, a fluidização é borbulhante e é caracterizada por:

- As bolhas têm movimento ascendente e mais rápido que o gás
- As bolhas surgem após o distribuidor, dividem-se e coalescem quando sobem em direção à superfície do leito.
- Em leito raso, só há uma boa mistura das partículas, quando poucas bolhas estão presentes.
- Quando essas bolhas atingem o diâmetro do leito, o regime muda para pistonado.

Categoria B: não há evidência do tamanho máximo de bolhas, de modo que a coalescência é fenômeno predominante. Os tamanhos das bolhas aumentam com a altura do leito e com a velocidade do gás em excesso, apresentando moderada expansão do leito e mistura de partículas.

Categoria D: possui alta densidade, requer alta velocidade para fluidizar e proporciona baixa expansão do leito e também baixa mistura de sólidos. São mais adequados ao movimento do jorro. As bolhas têm movimentos ascendentes mais lentos que o gás e quando atingem o diâmetro do leito, observa-se o *slugging* ou regime pistonado.

3.5.1.3. Parâmetros fluidinâmicos

Para a compreensão do mecanismo de fluidização de sólidos em determinado processo, faz-se necessário à determinação de parâmetros fluidodinâmicos, velocidade e porosidade de mínima fluidização, que traduzem o comportamento do leito poroso quando da passagem do fluido através deste. Para que tais parâmetros possam ser determinados e avaliados, deve-se analisar

o efeito da velocidade superficial do fluido sobre o gradiente de pressão (SILVA, 2003).

3.5.1.3.1. Porosidade mínima de fluidização

A porosidade mínima de fluidização (ε_{mf}) corresponde à porosidade do leito na condição de mínima fluidização que, por sua vez, corresponde à velocidade superficial do fluido na qual se tem o início da fluidização.

$$\varepsilon_{mf} = 1 - \frac{\Delta P}{H (\rho_r - \rho) g} \quad \text{Equação 3.1}$$

onde, ΔP é a variação de pressão, ρ_r é a densidade real do sólido, ρ densidade do fluido, H é a altura do leito e g é a aceleração da gravidade.

A Equação 3.1 pode ser usada para o cálculo da porosidade do leito em função da queda de pressão e altura do leito quando a velocidade superficial do ar varia desde zero até a velocidade máxima.

McCABE & SMITH, 1967 propuseram uma equação empírica para estimar a velocidade de fluidização mínima em função do diâmetro das partículas em micrometro (μm).

$$\varepsilon_{mf} = 1 - 0,356(\log dp - 1) \quad \text{Equação 3.2}$$

3.5.1.3.2. Velocidade de fluidização mínima

A velocidade de fluidização mínima corresponde à velocidade superficial do gás quando a queda de pressão é igual a massa aparente dos sólidos. Nestas condições, imediatamente, a fluidização é iniciada. As várias correlações

existentes para a estimativa da velocidade de mínima fluidização, são baseadas na Equação de Ergun.

$$\frac{\Delta P}{H} \cdot \frac{\phi_s \cdot d_p}{\rho \cdot v^2} \cdot \frac{\varepsilon^3}{(1-\varepsilon)} = \frac{150 \cdot (1-\varepsilon)}{\phi_s \cdot d_p \cdot v \cdot \left(\frac{\rho}{\mu}\right)} + 1,75 \quad \text{Equação 3.3}$$

onde, Φ_s é a esfericidade da partícula, d_p é o diâmetro da partícula, μ é a viscosidade do fluido, ρ é a densidade do fluido, ε é a porosidade do leito, H é a altura do leito, ΔP é a queda de pressão do fluido através do leito e v é a velocidade superficial média.

Na literatura existem diversas correlações em relação à velocidade de fluidização mínima, entre eles podemos citar WEN & YU, 1966, BABU *et al.* 1978, LUCAS *et al.* 1986, GRACE 1982.

3.5.1.3.3. Distribuidor de gás para leito

O distribuidor de gás para leito fluidizado é um dispositivo projetado para assegurar que o gás fluidizante seja distribuído uniformemente pela seção transversal do leito, pois a taxa de distribuição do gás é um dos parâmetros responsáveis pelo movimento das partículas, granulação e secagem.

Além disso, a solução ou suspensão de revestimento é atomizada na superfície da partícula através de um bico atomizador presente no distribuidor de gás, a gota atomizada deve ser inferior ao tamanho da partícula, mas não muito pequena para evitar que o líquido seja secado antes de entrar em contato com a mesma, e também não pode apresentar-se muito grande devido à dificuldade de secagem (HEMATI *et al.*, 2003).

Estudos de distribuidor de leito fluidizado são apresentados por GELDART, 1986; e KUNII & LEVENSPIEL, 1969. Alguns tipos de distribuidores comumente usados são mostrados na Figura 3.9.

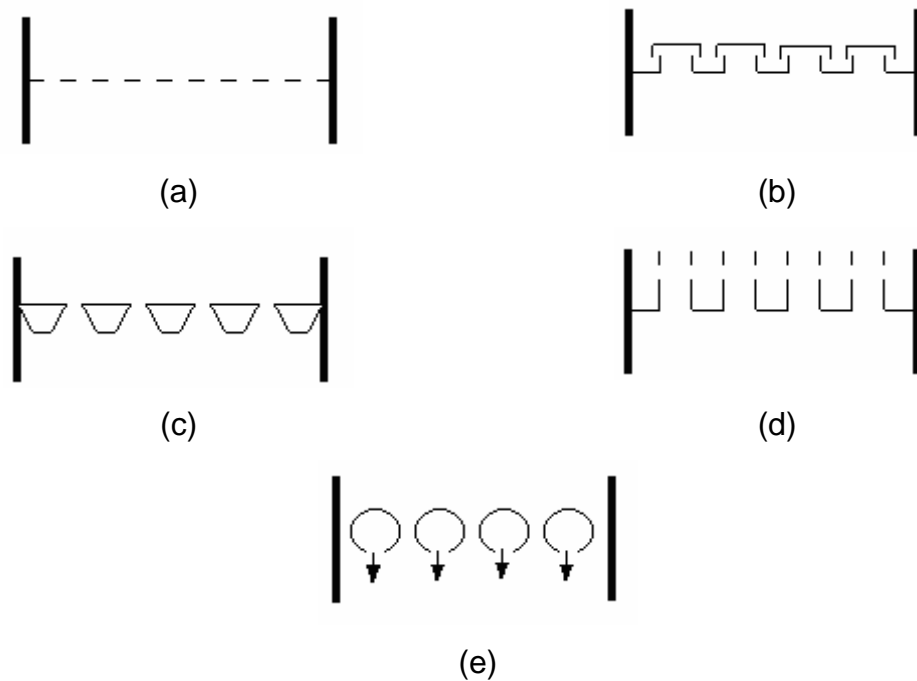


Figura 3.9. Alguns projetos de distribuidor de uso comum: (a) placa perfurada, (b) campânula, (c) fendas horizontais contínuas, (d) coluna de tubos, (e) tubos com aberturas apontando para baixo (Adaptado de GELDART, 1986).

3.5.2. Principais variáveis que afetam a fluidização

As principais variáveis associadas à fluidização que afetam a qualidade do produto final em relação à granulação são enfatizadas por AULTON, 2005 e descritas abaixo:

3.5.2.1. *Parâmetros do equipamento*

- A altura do bico é responsável pela distribuição uniforme do leito para a circulação adequada das partículas, se a distribuição não for adequada na granulação e no recobrimento, pode ocorrer à formação descontrolada de aglomerados;
- A geometria do leito interfere no movimento das partículas e dependendo deste movimento à aglomeração pode ser favorecida ou não;
- A altura e localização do bico atomizador: pode ser no topo, verticalmente, na lateral, angularmente, ou na base do leito, junto com o fluxo de ar. A altura deve ser regulada de forma que a nuvem formada com a atomização seja suficientemente adequada para que as gotas formadas não sequem antes de atingir as partículas, ao atingir espalhem-se e não ocorram perdas nas paredes do leito e finalmente a;
- Vibração mecânica é um acessório que oferece ao leito uma modificação no equipamento, permitindo a movimentação de materiais coesivos, ou para a quebra de aglomerados grandes formados devido a inadequada distribuição do agente ligante (AULTON & BANKS, 1981; SILVA, 2003, GORE, 1990, KLEINBACH & RIEDE, 1995, DEWETTINCK *et al.*, 1998, SHELUKAR *et al.*, 2000).

3.5.2.2. *Parâmetros do processo*

- Carga do leito: está diretamente relacionada com a fluidodinâmica da partícula. Leitões com grandes cargas apresentam canais preferenciais e zonas mortas, devido a uma circulação insuficiente dos sólidos. Estas zonas mortas prejudicam a uniformidade do produto e favorecem a formação de aglomerados em condições indesejáveis;

- Velocidade do ar de fluidização: é responsável por regimes fluidinâmicos estáveis, com movimento adequado do material, como também pela taxa de evaporação do agente ligante da suspensão. O aumento da taxa de ar provoca o aumento da taxa de evaporação e o atrito entre partículas, formando assim aglomerados com distribuição de tamanhos mais estreita;
- Temperatura do ar: influencia na qualidade do recobrimento, eficiência do processo e no crescimento do grânulo. É um parâmetro importante na secagem e na qualidade do recobrimento como também no processo de formação de aglomerados;
- Umidade do ar: afeta diretamente o processo de secagem. Variações na umidade do ar de entrada mudam o gradiente de temperatura de granulação. Maiores variações de temperatura de granulação e secagem fornecem aglomerados de maiores tamanhos, ou seja, quanto maior a umidade do ar menor é a eficiência de secagem, formando aglomerados maiores;
- Ângulo de atomização: influencia no diâmetro do jato pelo “spray”, o aumento do ângulo do “spray” aumenta o tamanho das gotas formadas, aumentando diretamente a formação de aglomerados;
- Regime de “spray”: a aspersão da suspensão durante o recobrimento/granulação pode ser contínua ou intermitente;
- Tamanho e tipo de bico atomizador: os bicos atomizadores mais adequados são os de duplo fluido, sendo com orifícios de 1,2-2,2 mm, dependendo da taxa de líquido a ser utilizada, viscosidade e tensão superficial da suspensão. Com os bicos atomizadores de duplo fluido pode-se controlar o tamanho das gotas formadas, através da vazão e pressão do ar comprimido;
- Taxa de ar de atomização: o tamanho da gota formada depende linearmente da razão ar-líquido. Qualquer mudança na taxa de ar de atomização altera esta vazão e, por consequência, o tamanho das gotas. A taxa de ar de atomização deve ser ajustada com a taxa de

líquido para se obter uma atomização adequada, com tamanho de gotas controlado, para evitar a formação de gotas grandes que dificultam a secagem e favorecem a formação de aglomerados;

- Pressão de ar de atomização: é responsável pela vazão ar-líquido no orifício do bico atomizador. O aumento da pressão de ar de atomização diminui o tamanho das gotas formadas;
- Tamanho da gota: é dependente da taxa de líquido, da taxa do ar de atomização, da pressão de ar de atomização, da viscosidade do líquido e do ângulo do “spray”;
- Vazão de líquido: deve ser balanceada com a taxa de evaporação do solvente durante o processo. Altas taxas de líquido podem causar o encharcamento do leito, favorecendo a formação de aglomerados. O equilíbrio da umidade no leito deve ser monitorado para evitar o encharcamento ou perdas por elutriação de gotas secas (AULTON & BANKS, 1981; SILVA, 2003, GORE 1990, KLEINBACH & RIEDE, 1995, DEWETTINCK *et al*, 1998, SHELUKAR *et al.*, 2000).

3.5.2.3. Parâmetros do material

- Propriedades físicas do material a ser revestido: uma eficiente movimentação e circulação dos sólidos no leito dependem das propriedades do material, como coesividade, distribuição de tamanho, forma, natureza cristalina ou amorfa, propriedades estáticas e higroscopicidade. Materiais extremamente coesivos ou com grande carga estática são difíceis de movimentar. Materiais higróscopicos são difíceis de recobrir sem a formação de aglomerados. Materiais com ampla distribuição de tamanhos apresentam problemas de segregação no leito. Todas essas propriedades afetam diretamente a fluidinâmica do leito, e por conseqüência o processo de recobrimento e secagem;

- Molhamento: a natureza hidrofóbica ou hidrofílica das partículas tem grande efeito no grau de molhamento. O molhamento está diretamente ligado às características da superfície do sólido e da tensão superficial do líquido, através do ângulo de contato entre o líquido de recobrimento e a superfície da partícula a ser recoberta;
- Material formador de filme e concentração: geralmente são polímeros e devem ser escolhidos de acordo com o objetivo do revestimento desejado. A concentração de material formador de filme afeta o tempo de processamento e adesão entre a partícula e o filme já seco. Concentrações altas geralmente formam não uniformes e favorecem a formação de aglomerados;
- Temperatura da solução/suspensão: a temperatura afeta diretamente a viscosidade da solução influenciando na formação de gotas no “spray”, favorecendo ou não a formação de aglomerados, dependendo do comportamento reológico da solução;
- Solvente utilizado: podem ser orgânicos ou aquosos. Em geral, solventes orgânicos, devido à rápida vaporização da superfície molhada, tendem a formarem menos aglomerados. No entanto, para a utilização de solventes orgânicos, o equipamento deve ser especialmente projetado e instalado, prevenindo explosões e contaminações do meio ambiente. Os solventes aquosos vêm sendo comumente utilizados para drogas sensíveis e por ser de fácil manuseio. O solvente utilizado determina as condições térmicas e operacionais do processo;
- Viscosidade da suspensão: a concentração da solução afeta a viscosidade e esta afeta o tamanho da gota atomizada, favorecendo ou não a formação de aglomerados (AULTON & BANKS, 1981; SILVA, 2003, GORE, 1990, KLEINBACH & RIEDE, 1995, DEWETTINCK *et al*, 1998, SHELUKAR *et al.*, 2000).

3.6. Revestimento de produtos farmacêuticos

O revestimento de produtos farmacêuticos é uma operação bastante antiga, sendo que publicações francesas do século XVII descrevem o revestimento como uma maneira de mascarar o sabor das pílulas. Nessa época, o recobrimento com soluções a base de açúcar foram desenvolvidas, e devido à sua rápida aceitação, as pílulas recobertas com esse tipo de solução foram as formas preferidas dos medicamentos sólidos na Europa e nos Estados Unidos (FREIRE & OLIVEIRA, 1992).

O processo para o revestimento em larga escala se faz necessário e foram desenvolvidos os primeiros equipamentos para serem utilizados pela indústria farmacêutica, as chamadas “panelas rotatórias” ou drageadeiras. Por muito tempo o processo não sofreu muita modificação até a substituição das pílulas pelos comprimidos. Nos anos 50 uma mudança drástica ocorreu no desenvolvimento do processo de revestimento quando o laboratório Abbott introduziu o comprimido recoberto com filmes poliméricos e o Dr. Dale Wurster patenteou o primeiro equipamento para recobrimento utilizando um leito de comprimidos movimentado por ar, normalmente chamado de recobrimento em leito fluidizado ou leito móvel (FREIRE & OLIVEIRA, 1992).

Esse tipo de equipamento mostrou uma boa eficiência e motivou o interesse no desenvolvimento de novas tecnologias no recobrimento de comprimidos. As novas tecnologias incluem tanto as novas formulações das soluções utilizadas para recobrir como os novos projetos de equipamentos. Entre esses equipamentos está o leito de jorro, em todas as suas configurações (FREIRE & OLIVEIRA, 1992).

O revestimento de formas farmacêuticas consiste na aplicação de um material sobre a superfície externa de uma forma farmacêutica sólida com a

intenção de conferir benefícios e propriedades à forma farmacêutica em relação à não revestida (AULTON, 2005; TARANTO, 1996).

Existem várias razões para se aplicar o revestimento em partículas, razões estas que vão destes fatores estéticos ao controle da taxa de dissolução de substâncias químicas e incluem:

- Proteção de um produto da ação de agentes ambientais, em particular contra a umidade, luminosidade e calor excessivo.
- Facilitar a manipulação de produtos, em especial na indústria farmacêutica, onde o recobrimento reduz a uma mínima possibilidade de contaminação do produto.
- Melhorar a aparência estética, em particular quando há uma diferença perceptível de um lote de produção para outro.
- Mascarar sabores e odores desagradáveis.
- Aumentar a resistência mecânica do produto.
- Reduzir a taxa de dissolução de substâncias químicas (FREIRE & OLIVEIRA, 1992).

O revestimento e o encapsulamento das partículas é considerado uma operação unitária utilizada no processamento de uma grande variedade de produtos. Esta operação é de grande importância comercial. Exemplos de aplicação incluem o recobrimento de comprimidos na indústria farmacêutica e o recobrimento de produtos alimentícios nas indústrias de alimentos. Aplicações destas técnicas na agricultura incluem o recobrimento de semente, de fertilizantes e pesticidas. Aplicação na área nuclear inclui o recobrimento de microesferas de combustível nuclear com carbono pirolítico ou com carbeto de silício (FREIRE & OLIVEIRA, 1992).

Os principais tipos de revestimento são:

- Revestimento películado;
- Revestimento com açúcar ou dragamento;

- Revestimento a seco.

Desses, o revestimento peliculado é a técnica mais importante. Praticamente todos os novos produtos revestidos existentes no mercado são do tipo peliculado. O drageamento é uma tecnologia mais tradicional e não tem experimentado nenhum desenvolvimento real nos últimos anos. Apesar disso, essa tecnologia ainda possui certa importância econômica (AULTON, 2005).

3.6.1. *Revestimento Peliculado*

Esta é a técnica mais moderna e mais frequentemente empregada no revestimento de formas farmacêuticas. O revestimento peliculado envolve a deposição, normalmente por meio de um método de aspersão, de uma fina película de polímero sobre o núcleo da forma farmacêutica. É possível utilizar as tradicionais turbinas de revestimento, porém, cada vez torna-se mais comum o emprego de equipamentos especializados, com a finalidade de tirar proveito do curto tempo de revestimento e do potencialmente elevado grau de automação.

O líquido de revestimento (solução ou suspensão) contém um polímero em meio líquido apropriado, junto com outros adjuvantes, como pigmentos e plastificantes. Essa solução é aspergida sobre o leito misturado de comprimidos em rotação ou leito fluidizado. As condições de secagem permitem a remoção do solvente, de modo a deixar um depósito fino do material de revestimento

As principais vantagens atribuídas ao recobrimento por película são pequena variação de peso, tamanho e forma do produto; curto tempo de processamento; maior eficiência e rendimento do processo; flexibilidade das formulações e maior resistência da cobertura (FREIRE & OLIVEIRA, 1992).

Estas vantagens devem-se principalmente à maior volatilidade dos solventes orgânicos, porém é necessário ter consciência de que certas

desvantagens podem ser um fator limitante. Estas desvantagens relacionadas aos sistemas solventes utilizados são perigo de combustão, perigo de intoxicação do operador e perigo de contaminação ambiental (FREIRE & OLIVEIRA, 1992).

3.6.1.1. *Polímeros*

As características ideais de um polímero para revestimento pelculado são relacionados à solubilidade que, no caso do revestimento pelculado convencional, deverá ter uma boa solubilidade em fluidos aquosos, para facilitar a dissolução das substâncias ativas a partir do produto final.

Contudo, quando se trata de uma ação de liberação modificada, a opção será exigir do sistema polimérico uma dissolução ou uma permeabilidade em meio aquoso lenta; viscosidade, já que os polímeros deverão possuir baixa viscosidade na concentração requerida, o que permitirá uma aspersão fácil e livre de problemas durante o processo industrial, utilizando equipamentos de revestimento peculiado; permeabilidade, pois o revestimento pode ser utilizado para otimizar o prazo de validade em prateleira, uma vez que diversos polímeros constituem barreiras eficientes contra permeação de vapor de água ou outros gases da atmosfera.

Essas propriedades podem variar amplamente entre os diferentes polímeros; propriedades mecânicas, pois a escolha de um polímero em particular para a formulação do revestimento pelculado deve possuir uma elevada resistência ao impacto e à abrasão, encontrados no manuseio normal dos comprimidos revestidos. Um revestimento com escassa resistência revela-se pela presença de rachaduras ou imperfeições na superfície (AULTON, 2005).

Os tipos de polímeros disponíveis são os derivados da celulose, os quais na maioria das vezes consistem em ésteres da celulose. Um exemplo é a hidroxipropilmetilcelulose, polímero amplamente utilizado, solúvel em meio aquoso

e forma filmes de elevada resistência e de fácil aplicação. O filme resultante pode ser claro ou colorido.

Outros derivados da celulose são metilcelulose e hidroxipropilcelulose, os copolímeros de ésteres de amino-metacrilato são basicamente insolúveis em água em pH inferior a 4, porém, em meio neutro ou alcalino, o filme permite a solubilidade do fármaco, mediante intumescimento e aumento da sua permeabilidade.

Para formulações simples, a desintegração do revestimento pode ser otimizada por meio da incorporação de substâncias solúveis em água e também de amidos. Para revestimentos projetados para produzir um efeito de liberação modificada à forma farmacêutica final, costuma-se utilizar polímeros ainda mais solúveis em água, estes podem incluir metilcelulose e os copolímeros do metacrilato de amônio.

Além destes, outros grupos de polímeros têm sido projetados para conferir proteção entérica à forma farmacêutica, sendo alcançado esse por meio da seletividade do polímero em termos de pH, quando este é insolúvel no meio ácido estomacal, mas torna-se solúvel ao entrar em contato com o pH alcalino próprio do duodeno e das regiões distais do trato gastrointestinal (BANDO & MACGINITY, 2006).

Nas formulações industriais, é freqüente encontrar revestimento de esferas e grânulos destinados à fabricação de formas farmacêuticas de liberação modificada. A base desses revestimentos consiste em dispersões especiais de polímeros insolúveis em água, como etilcelulose e copolímeros do metacrilato de amônio, as quais são aplicadas em meio aquoso. A vantagem desses materiais é que permitem o processamento de polímeros em meio aquoso, que são insolúveis em água (AULTON, 2005, BANDO & MACGINITY, 2006).

3.6.1.2. *Plastificantes*

Os plastificantes geralmente são adicionados em formulações de revestimento pelculado com o objetivo de modificar as propriedades físicas do polímero, tornando-o mais flexível.

Uma propriedade importante é a sua capacidade de diminuir a fragilidade do filme. Usualmente o mecanismo pelo qual um plastificante atua é baseado na interposição das moléculas deste entre as cadeias do polímero. Com isso, é facilitado o livre movimento destas, e, conseqüentemente, o polímero apresenta um comportamento mais flexível (LECOMTE *et al*, 2004).

Como exemplo de plastificantes pode citar os polióis, como polietilenoglicol 400; propilenoglicol, ésteres orgânicos, como dietilftalato; e óleos e glicerídeos, como óleo de coco fracionado (LECOMTE *et al*, 2004).

3.6.1.3. *Corantes*

Todos os corantes permitidos para uso no revestimento peculiado são, invariavelmente, insolúveis em água.

Os pigmentos possuem certa vantagem sobre os corantes solúveis em água, devido à sua estabilidade química frente à luz, assim como pelo fato e proporcionarem uma melhor opacidade e recobertura de pós, ao mesmo, tempo em que promovem a impermeabilidade da película ao vapor da água (AULTON, 2005).

Os exemplos são pigmentos a base de óxido de ferro; dióxido de titânio; lacas de alumínio (AULTON, 2005).

3.6.1.4. Solventes

Após o desenvolvimento inicial do revestimento peculiado, na década de 1950, os polímeros utilizados eram invariavelmente dissolvidos em solventes orgânicos.

As técnicas modernas baseiam-se no uso de água como solvente, devido à significativa redução de custos, que pode facilmente ser constatada quando solventes orgânicos são utilizados (AULTON, 2005, LECOMTE *et al*, 2004).

Em termos de processo, as desvantagens associadas ao uso de solvente orgânico podem ser devido à agressão ao meio ambiente devido as emissões para a atmosfera dos vapores de solventes orgânicos não tratados são inaceitáveis do ponto de vista ecológico. No entanto, a remoção eficiente de vapores de solventes, a partir de efluentes gasosos, é um processo muito dispendioso, diversos solventes orgânicos são suscetíveis à explosão, inflamáveis, e acarretam riscos tóxicos aos operários de fábrica, além disso o uso de solventes orgânicos exige a construção à prova de fogo explosão (AULTON, 2005, LECOMTE *et al*, 2004).

O custo é comparativamente muito elevado e associa-se aos custos de estocagem e de controle de qualidade, que também devem ser considerados aos resíduos de solvente. Para um determinado processo, a quantidade de resíduos de solventes orgânicos no revestimento polimérico deve ser avaliada. Com aumento da pressão por partes das agências reguladoras, isso será um aspecto adicional de controle de qualidade (AULTON, 2005, LECOMTE *et al*, 2004).

3.6.2. Revestimento com açúcar ou drageamento

É considerado um método tradicional de revestimento. Esse método envolve a aplicação sucessiva de soluções que contém sacarose, utilizando equipamentos de revestimentos adequados. A turbina de drageamento

convencional, com adição manual de xarope, tem sido amplamente utilizada. Contudo, a introdução de alguns equipamentos especiais e de métodos automatizados tem modificado esse panorama (AULTON, 2005).

3.6.3. *Revestimento a seco*

A tecnologia de revestimento a seco difere de maneira radical das descritas para o revestimento pelculado e para o drageamento. O revestimento a seco envolve a compactação em material granulado ao redor de um núcleo.

O moderno revestimento a seco é empregado para separar componentes quimicamente incompatíveis e as desvantagens surgem das relativas complexidades associadas aos mecanismos próprios desses equipamentos de compressão (AULTON, 2005).

3.6.4. *Revestimento entérico*

Dentre os polímeros de revestimentos, o Kollidon VA 64[®] e o Kollicoat MAE 100 P[®], caracterizam-se por serem copolímero composto de acetato de polivinilpirrolidona e copolímero derivado do ácido metacrílico/etil acrilato (Figura 3.10), sendo utilizado como um filmes de revestimento das formas farmacêuticas sólidas pelas indústrias farmacêuticas (www.pharma-solutions.basf.com. Acessado em 10ago2006).

O Kollidon[®] VA 64 apresenta solubilidade tanto em água quanto em álcool, sendo utilizado desde 1975 pela indústria farmacêutica Européia como revestimento de grânulos e comprimidos. A principal aplicação é facilitar a adesão superficial do Kollicoat MAE 100P (www.pharma-solutions.basf.com. Acessado em 10ago2006).

Kollicoat MAE 100 P[®], apresenta a proporção dos componentes dos polímeros na ordem de 1:1, sendo o filme de revestimento de caráter aniônico e peso molecular da ordem de 250,000 kDa. Caracteriza-se em ser pó que pode ser diluído em solventes orgânicos ou aquosos, normalmente é utilizado na concentração de contendo 30% (p/v), possui a coloração branca, baixa viscosidade e cheiro característico. É utilizado para revestir comprimidos e grânulos que degradam no pH estomacal e melhorar a biodisponibilidade dos princípios ativos nos sítios de absorção, como o intestino (www.pharma-solutions.basf.com. Acessado em 10ago2006).

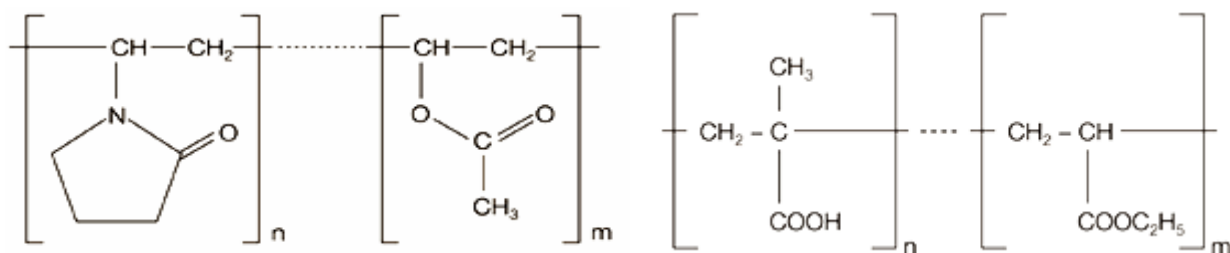


Figura 3.10: Estrutura química dos polímeros Kollidon[®] VA 64 e do Kollicoat[®] MAE 100 P (www.pharma-solutions.basf.com. Acessado 10ago2006).

3.7. Ângulo de contato e revestimento

Segundo ADAMSON (1990), a energia de molhamento de um sólido por um líquido depende do ângulo de contato entre as três fases presentes: sólido-líquido-gás. O ângulo de contato (θ) é definido como ângulo formado entre a tangente da interface gás-líquido (σ_{LV}) a partir do ponto trifásico e a tangente da interface sólido-líquido (σ_{SV}) a partir do mesmo ponto, como representado abaixo:

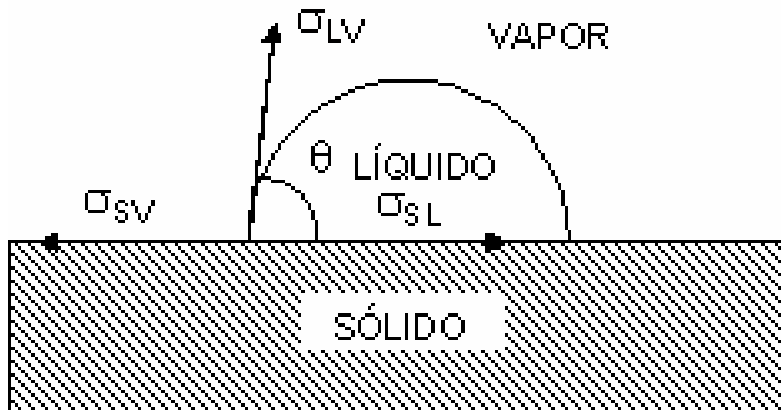


Figura 3.11 Ângulo de contato do sistema sólido-líquido-gás (DONIDA, 2004).

A receptividade da superfície sólida pelo líquido é dada pelo ângulo de contato. Quando o ângulo de contato é menor que 90° , o sólido é molhado pelo líquido. Em condições limites, quando $\theta = 0$ e $\theta = 180^\circ$ ocorrem, respectivamente, molhamento completo (espalhamento espontâneo), e o não molhamento completo (aglutinação espontânea das gotas).

O ângulo de contato depende de propriedades físicas do sistema trifásico, como a tensão superficial (σ) que é definida como a força necessária para estender a superfície por unidade de distância, ou ainda, a energia necessária para criar uma unidade de área superficial para uma dada interface. A energia de adesão, que é quantificada pelo trabalho de adesão (W_{AD}), foi definida por NEUMANN & GOOD (1979) como:

$$W_{AD} = \sigma_{LV} (1 + \cos\theta) \quad \text{Equação 3.4}$$

onde, σ_{LV} é a tensão superficial entre as fases líquida e gasosa e θ é o ângulo de contato. Altos valores de W_{AD} indicam um bom molhamento para cada conjunto sólido-líquido (ADAMSON, 1990).

3.8. Farmacocinética

A administração de medicamento no organismo e o trajeto até o seu efeito é estudada pela farmacologia. O percurso do fármaco no organismo pode ser dividido em 3 fases após sua administração a um organismo vivo (Figura 3.12).

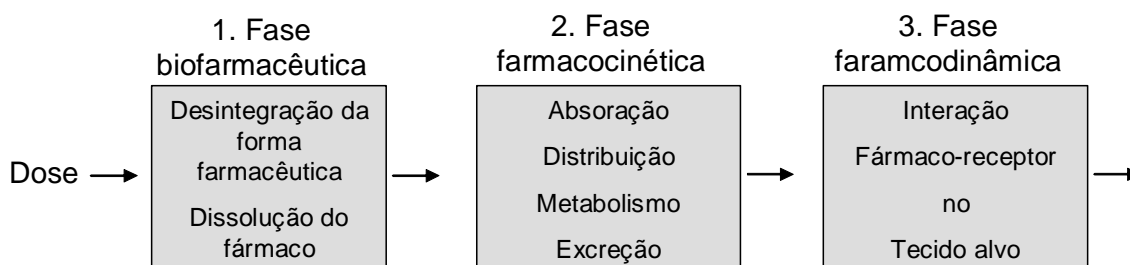


Figura 3.12. Fases da ação dos fármacos (Adaptado de Pereira, 2007).

Na fase farmacêutica ocorre a desintegração da forma farmacêutica, seguida da dissolução da substância ativa deixando o fármaco disponível para a absorção (PEREIRA, 2007). Posteriormente ocorre a fase farmacocinética (PK), na qual se realiza o estudo dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos e das múltiplas relações que possam afetar os mecanismos, tais como: absorção incompleta, saturação do transportador e biotransformação. Na fase farmacodinâmica (PD) se estuda o mecanismo de ação do fármaco no tecido alvo, que leva ao efeito esperado para o medicamento administrado.

O pré-requisito para se obter sucesso no estudo farmacocinético é dispor de uma metodologia analítica adequada para dosar tanto o fármaco quanto os seus metabólitos, se necessário, em vários fluidos corpóreos. Por outro lado, o sucesso terapêutico não depende somente da concentração do fármaco circulante sistematicamente no organismo, mas também da concentração presente nos sítios ativos, como no receptor e em enzimas (PÉREZ-URIZAR et al., 2000).

A abordagem não-compartimental visa estabelecer os parâmetros farmacocinéticos a partir dos perfis plasmáticos sem se preocupar com o modelo matemático que descreve os perfis. É utilizada quando já se conhece o fármaco e

pretende-se avaliar seu comportamento em uma nova formulação. A vantagem desse tratamento decorre do fato de se poderem calcular parâmetros farmacocinéticos sem comprometer-se com nenhum modelo matemático (SCHARGEL & YU (1999)).

Os parâmetros farmacocinéticos passíveis de determinação pela abordagem não-compartimental são: constante de velocidade de eliminação (λ), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$), clearance total (CL_{tot}), área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao infinito ($ASMC_{0-\infty}$), volume de distribuição no steady-state (V_{dss}), quando se tem dados da administração intravenosa do fármaco, tempo de residência médio no plasma (MRT_{plasma}), que mostra o tempo de permanência médio no organismo de 62,4% das moléculas do fármaco que compõe a dose, após sua administração intravenosa ou oral, e o tempo de absorção médio MAT, que pode ser calculado quando uma doses intravenosa e oral foram administradas no mesmo grupo de indivíduos. Além disso, são determinados a concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo necessário para obtê-la (t_{max}), através da observação dos perfis plasmáticos, bem como a biodisponibilidade absoluta (em relação à administração i.v.) e relativa (em relação a outra formulação na mesma via de administração) do fármaco (SCHARGEL & YU, 1999).

CAPÍTULO 4

MATERIAL E MÉTODOS

4.0. Material

- Para a preparação das partículas utilizou-se quitosanas adquiridas pela empresa Polymar (Fortaleza, Ceará);
- Didanosina gentilmente cedida pela empresa Labogen S/A Química fina e Biotecnologia;
- Tripolifosfato (TPP), Synth;
- Ácido acético glacial, Grupo Química;
- Hidróxido de magnésio, Vetec;
- Água MILLI-Q®, produzida por membrana de osmose reversa e membrana de troca iônica;
- Brometo de potássio, Synth;
- Diclorometano, da Synth;
- Kollidon® VA 64 (copolímero de acetato de polivinilpirrolidona) e Kollicoat® MAE 100 P (copolímero do ácido metacrílico/etil acrilato) foram gentilmente cedidos pela empresa BASF;

- Propilenoglicol, Ecibra;
- Trisilicato de magnésio, Henrifarma;
- Celulose microcristalina, Microcel, MC101;
- Acetonitrila grau HPLC, Mtedia;
- Fosfato de potássio monobásico anidro, Synth;
- Hidróxido de sódio, Synth;
- Ácido sulfônico heptano, J.T. Baker;
- Trietanolamina, Synth;
- Videx® EC, lote 5L3016A, Bristol-Myers Squibb, gentilmente cedido pelo Programa de Aids da Unicamp;
- Didanosina em comprimidos mastigáveis, gentilmente cedido pelo Centro Corsini;
- Aciclovir;
- Filtros 0,45 µm, Millipore;
- Metanol grau HPLC, mTedia.

4.1. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram:

- Agitador mecânico digital, marca Tecnal, modelo TE 039/1;
- Agitador planetário doméstico, marca arno;
- Analisador de umidade por infra-vermelho marca Gehaka, modelo IV2002.
- Banho sonificador, marca Branson, modelo2200;
- Bomba peristáltica, marca Watson Marlow, modelo 323;
- Cartuchos de extração em fase sólida SPE sorbent bonElut C18 40-90 µm;
- Centrífuga refrigerada para tubo de eppendorf, marca eppendorf, modelo 5417R;
- Centrífuga, marca Metroterm, modelo MTD III Plus;
- Coluna cromatográfica C₁₈ 15cm x 4mm, V04-745, acoplada a pré-coluna ACE® 5C18, V03-417 Analítica®;

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), acoplado a detector de ultravioleta, marca Shimadzu®; injetor automático SIL-10AVDP, marca Shimadzu®; bomba LC-10ADVP, marca Shimadzu®;
- Dissolutor, marca Vankel®, modelo VK 7010, acoplado ao espectrofotometro, marca Cary, modelo 50 UV;
- Equipamento ponto de fusão, marca Fisatom, modelo 430;
- Esferonizadora, marca caleva, modelo spheronizer 250;
- Espectro FTIR (Fourier Transform Infrared) MB-series, marca Bomem, modelo B100;
- Espectrôfotometro, marca Hitachi, modelo U2001;
- Espectrômetro de espalhamento de luz por incidência de raio laser, marca Malvern Mastersizer S, modelo S – MAM 5005;
- Estereoscópio, marca motic, modelo SMZ-168;
- Extrator modelo Porspekt 2, marca Spark Holland;
- Extrusora marca caleva, modelo extruder 20;
- Goniômetro marca Tanteq, modelo CAM – Micro;
- Iluminação por fibra ótica, marca motic, modelo MLC-150c;
- Leito fluidizado marca hüttlin, modelo mycrolab;
- Máquina fotográfica marca fujifilm, modelo S5100;
- Microscopia ótica marca LEICA, modelo Q500IW;
- Microscópio eletrônico de varredura, marca LEO, modelo LEO440i;
- Moinho, marca IKA, modelo A11basic;
- Peagômetro, marca Quimis, modelo Q400M1;
- Prensa, marca Carver, modelo #3912;
- Programa Excel®, (Microsoft);
- Programa Shimadzu CLASS VP 612.
- Sistema de água ultrapura, marca MILLI-Q MILLIPORE;
- Tamisador vibratório, marca haver & boecker, modelo haver ELML digital plus;
- Vórtex, modelo certomat MV, marca Braun;

4.2. Métodos

4.2.1. Caracterização da quitosana

4.2.1.1. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana é essencial para a sua caracterização. Diversas técnicas são propostas, incluindo espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear, potenciometria, espectroscopia de massa e de ultravioleta, cromatografia (RAYMOND *et al.*, 1993).

A titulação potenciométrica é uma técnica analítica bem conhecida para quantificar o percentual de grupos amino presentes na quitosana, apesar de se observar uma imprecisão. Esse método é recomendável quando se trabalha com grau de desacetilação maiores que 5% (RAYMOND *et al.*, 1993).

O método consistiu em adicionar 25 mL solução de HCl (25mL-0,02M) em excesso, a uma determinada massa seca de quitosana (~0,20g) deixando-a o tempo suficiente para protonar os grupos amino disponíveis (24 horas). Em seguida, titulou-se a solução resultante com NaOH (0,1M) para obter uma curva típica de titulação potenciométrica. Dessa forma, através das inflexões das curvas, é possível determinar a porcentagem de grupos amino na quitosana (BEPFU, 1999). O número de grupos amino é calculado usando a Equação:

$$\% NH_2 = \frac{M_{NaOH} * (V_2 - V_1) * 161 * 100}{m_2} \quad \text{Equação 4.1}$$

onde M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH (mols/L), V_1 e V_2 são respectivamente os volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de quitosana protonada (L), 161 é a massa molecular da unidade monomérica da quitosana e m_2 a massa da amostra no estado seco tomado para titulação (g).

4.2.1.2. Determinação da massa molar da quitosana

A massa molar da quitosana foi determinada pela técnica de viscosímetria capilar. O método consistiu em preparar soluções de quitosana nas concentrações de 0,001; 0,003; 0,006; 0,009; 0,012 (g/mL) em sistema solvente de ácido acético 0,1M, cloreto de sódio 0,2M e água.

O tipo de viscosímetro, número, diâmetro, constante K foram respectivamente 520 01, 75, $0,54 \times 10^{-2}$ cm, $0,007509 \times 10^{-4}$ cm²/s². Durante o experimento o viscosímetro permaneceu a 25^o C em um recipiente transparente contendo água a 25^o C, essa temperatura foi mantida por um banho termóstatisado recirculante.

Cada solução de quitosana foi adicionada ao equipamento na quantidade de 10 mL e sugada com uma bomba de vácuo até o preenchimento do viscosímetro. A viscosidade de cada concentração solução foi determinada pelo tempo (seg) entre a passagem da solução de quitosana entre os meniscos 1 e 2, como na figura 4.1, esse experimento foi realizado em triplicata para cada solução de quitosana

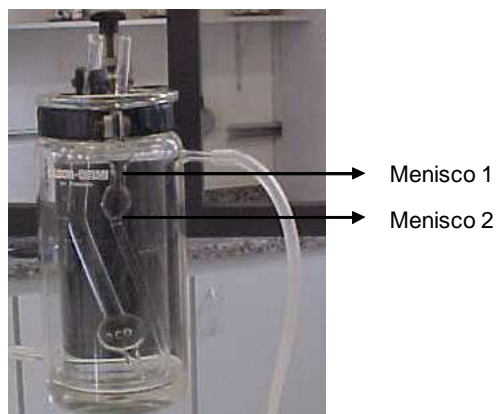


Figura 4.1. Viscosímetro capilar utilizado para calcular a massa molar média da quitosana.

A massa molar foi calculada utilizando as equações de viscosidade relativa (η_{rel}), específica (η_{esp}), e equação de Mark-Houwink consecutivamente:

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad \text{Equação 4.2}$$

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = (t - t_0) / t_0 \quad \text{Equação 4.3}$$

$$M_v = \sqrt[a]{\eta_{esp} / K} \quad \text{Equação 4.4}$$

onde, t é o tempo da solução de quitosana, t_0 é o tempo da solução padrão, c é a concentração das soluções, a e K são constantes.

A viscosidade intrínseca da solução foi determinada com auxílio do software Origin[®] 6.0 através do gráfico de viscosidade intrínseca (η_{sp}/c) em função da concentração (c) das soluções das amostras, por extrapolação da reta obtida por regressão linear para $c=0$, conforme apresentado por ALSARRA *et al.*, 2002.

Para a determinação da massa molar viscosimétrica média (M_v) de polímeros lineares, utilizou-se a equação empírica de Mark-Houwink (Equação 4.4), que relaciona a viscosidade intrínseca à massa molar do polímero.

4.2.2. caracterização da ddl

Para analisar as características da ddl utilizamos os parâmetros descritos na Farmacopéia Brasileira 4^o Edição, 2003 e do relatório da Organização Mundial da Saúde, 2004.

4.2.2.1. Características físicas

As características físicas foram analisados visualmente e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra de ddl metalizada com ouro, no Laboratório de Uso Comum da FEQ (LUC-FEQ).

4.2.2.2. Ponto de fusão

O ponto de fusão foi analisada em aparelho de determinação de ponto de fusão, Fisatom®, modelo 430, no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa (LIP) da UNIMEP.

Esse procedimento consiste em vedar uma das extremidades de um capilar e preenchê-lo com uma pequena quantidade de ddl. O capilar contendo ddl e um termômetro (0 – 300oC) foram acoplados ao equipamento e com o decorrer do tempo e aumento da temperatura, a fusão do fármaco foi visualizada através do visor do equipamento.

4.2.2.3. Espectroscopia de infravermelho (IE)

A espectroscopia de absorção no infravermelho foi realizado do Instituto de Química da Unicamp (IQ). A técnica consistiu em triturar 1 mg de ddl com 100 mg de brometo de potássio, essa mistura foi transferida para um frasco de aço inox e prensado com auxílio de uma prensa hidráulico com 7 toneladas para a formação de um disco.

O disco foi transferido para o equipamento, espectro FTIR MB-series, marca Bomem, modelo B100 e realizado na leitura, na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} . A aquisição dos dados foi obtida software Win-Bomem Easy (16 varredura na resolução de 4 cm^{-1}).

4.2.2.4. Espectrofotômetro de ultravioleta (UV)

No espectrofotômetro de UV foi realizada uma varredura no comprimento de onda de 200nm a 400nm, de uma solução de 10 $\mu\text{g/mL}$ de ddl em metanol. Utilizando metanol como branco.

4.2.3. *Preparação das micropartículas de quitosana*

4.2.3.1. *Preparação da solução de quitosana*

A quitosana 2% (m/v) foi suspensa em metade do volume total da água e adicionou-se o ácido acético glacial 0,75% (v/v). A mistura foi realizada com agitação magnética por 24 h a temperatura ambiente (25^oC) e completou-se o volume com o restante da água. Agitou por mais 24 h nas mesmas condições, em seguida ajustou o pH para 4.8, com solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1N ou ácido clorídrico 0,1N. Durante o processo de agitação para solubilização da quitosana, o recipiente foi coberto com filme plástico para evitar a evaporação do solvente (SILVA, 2006),

A quitosana utilizada para o estudo da incorporação de ddl apresentou massa molar de 296kDA e 82% de desacetilação

A mesma metodologia citada acima foi utilizada para o estudo da influência da massa molar da quitosana e seu grau desacetilação, na reticulação com TPP, diferindo somente na concentração de quitosana 0,5% (m/v).

4.2.3.2. *Preparação da solução de tripolifosfato de sódio*

A solução de TPP foi preparada em água, em concentração e composição adequadas aos experimentos a serem realizados. Assim, para a reticulação das micropartículas usadas na preparação dos grânulos, a solução de TPP continha também hidróxido de magnésio na proporção de 10 e 30% em relação ao peso da quitosana, ddl 39g/mL e água. Os componentes dessa solução foram pesados e transferidos para um recipiente e em seguida, acrescentou-se a água e transferiu-se para o banho sonificador por 20 minutos de acordo com o trabalho de SILVA, 2006.

Para o estudo da influência da massa molar da quitosana e seu grau desacetilação, na reticulação com TPP, foi usado somente TPP em água na concentração de 1% (m/v).

4.2.4. Caracterização das micropartículas

4.2.4.1. Determinação da distribuição granulométrica e potencial zeta das partículas de quitosana/TPP

Três lotes de quitosana, adquiridos comercialmente, denominadas A (370 kDa; 96 %), B (296 kDa; 82 %) e C (105 kDa; 82 %) foram solubilizadas, na presença de ácido acético glacial 1% (m/v) e reticuladas com TPP separadamente com auxílio de agitador mecânico.

Quantidades conhecidas da solução de TPP foram adicionadas a solução de quitosana e analisada pelo diâmetro médio e distribuição de tamanhos das partículas por espalhamento de luz quase-elástico utilizando luz laser de alta potência pelo equipamento Malvern Autosizer 4700 do Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais da FEQ. Além disso, em cada adição de TPP foi avaliado o potencial zeta, com ângulo de 90° das partículas em equipamento Malvern Zetasizer 3000HSA do Laboratório de Físico Química de Superfícies e Colóides do Departamento de Química de Ribeirão Preto, da USP.

4.2.4.2. Razão de Cargas das partículas de quitosana/TPP

Rädler et al., 1998, introduziu o parâmetro razão de cargas (R+/-), relacionando moles de cargas positiva dos lipídios catiônicos e moles de cargas negativas da molécula de DNA. Esse conceito foi adaptado a fim de obtermos uma razão de cargas (+/-) entre a CS e o TPP, como a equação abaixo:

$$R_{+/-} = \left(\frac{f_{(CS^+)}}{MW_{(CS^+)}} \right) \left(\frac{MW_{(TPP^-)}}{5 M_{(TPP^-)}} \right) \quad \text{Equação 4.5}$$

onde, $R_{+/-}$, $M_{(CS^+)}$, $M_{(TPP^-)}$, $MW_{(CS^+)}$, $MW_{(TPP^-)}$ e $f_{(CS^+)}$ são respectivamente razão de cargas entre a CS e o TPP, massa de quitosana utilizada no experimento (g), massa utilizada de TPP (g), massa molar da quitosana, massa molar média do TPP e o grau de desacetilação da quitosana. Sendo o valor de $R_{+/-}=1$ corresponde à neutralidade estequiométrica de cargas.

4.2.4.3. Espectroscopia de infravermelho (IE) das micropartículas de quitosana/TPP

As espectroscopias de absorção no infravermelho da quitosana sólida e da micropartícula de quitosana reticuladas com TPP foi realizados do Instituto de Química da Unicamp (IQ), no Laboratório de Síntese de Substâncias Orgânicas (LASSO).

O equipamento de infravermelho utilizado era da marca Thermo Nicolet, modelo IR200.

4.2.4.4. Reticulação da quitosana/TPP contendo ddl

As partículas de quitosana foram preparadas através de gelificação ionotrópica utilizando TPP como agente reticulante, e foi preparada com 60 mL solução A (solução de quitosana) e 60 mL solução B (da solução contendo TPP, hidróxido de magnésio e ddl). O procedimento consistiu em adicionar lentamente a solução B à solução A com agitação mecânica por 90 minutos, em seguida as partículas foram centrifugadas por 30 minutos a 3.200 rpm.

SILVA (2006) padronizou o processo de agitação na preparação das suas partículas de quitosana incorporando ddl, utilizando um recipiente de vidro com

6,5 cm de diâmetro e 9 cm altura, impelidor do tipo pá dentada com diâmetro de 2cm e rotação de 4.500 rpm.

A fim de aprimorar o processo de agitação e obter melhores resultados na eficiência de encapsulação e carregamento da ddl, acrescentou-se 3 chicanas, distribuídas uniformemente e com largura de 0,6 cm na parede do mesmo recipiente padronizado por SILVA, 2006, e impelidor do tipo pá dentada com diâmetro de 3,3 cm, com isso a frequência pode ser reduzida para 2.000 rpm (Figura 4.2.). As modificações realizadas seguiram o estudo de DORAN, 1997, e foram utilizadas com o intuito de maximizar a transferência de potência para o fluido, minimizar a rotação sólida do fluido no tanque, evitar a formação de vórtex e a entrada de ar no sistema.

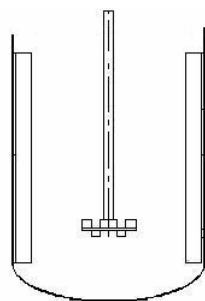


Figura 4.2. Modelo de recipiente e impelidor padronizados no processo de agitação.

Tanto para a preparação das partículas a serem utilizadas para incorporação da ddl, quanto para o estudo da influência da massa molar e do grau de desacetilação da quitosana foi utilizada a mesma padronização de agitação ajustada nesse trabalho.

4.2.4.5. Eficiência de incorporação da ddl

$$\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = \frac{(M_{\text{inicial}} - M_{\text{final}})}{M_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Equação 4.6}$$

onde, M_{inicial} é a massa inicial adicionada de ddl e M_{final} é a massa de ddl presente no sobrenadante, determinada por espectrofotometria UV.

Para realizar esse experimento utilizou-se TPP na concentração de 10% em relação à massa de quitosana, a concentração de quitosana de 2% (utilizamos 60mL da solução de quitosana e 60mL da solução de TPP, citada no item 4.2.3.2).

4.2.4.6. Carregamento da ddl

$$\text{Carregamento de didanosina} = \frac{\text{Massa de didanosina Incorporada}}{\text{Massa de Quitosana}} \quad \text{Equação 4.7}$$

Resultado em mg de ddl/g de quitosana

4.2.4.7 Grau de intumescimento

A capacidade das micropartículas de absorver, ou grau de intumescimento, é definida pela razão entre a massa de água absorvida pelas partículas e a massa de partículas secas.

$$\text{Grau de intumescimento} = \left(\frac{M_{\text{água}}}{M_{\text{partículas}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4.8}$$

onde, a $M_{\text{água}}$ é a massa e água absorvida pelas partículas secas e $M_{\text{partículas}}$ é a massa de partículas secas. O grau de intumescimento é dado em porcentagem.

O experimento consistiu em pesar cerca de 100mg de partículas secas e em seguida água destilada foi adicionada gota-a-gota até completa absorção da água e saturação das partículas. As partículas molhadas foram pesadas para a quantificação da água absorvida e o grau de intumescimento calculado de acordo com a equação acima. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4.8. Densidade real e aparente

As densidades real e aparente das partículas de quitosana contendo ddl foram determinadas em picnômetro a gás hélio e em porosímetro por intrusão de mercúrio, respectivamente. Antes das partículas serem analisadas, elas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 horas, para a eliminação da umidade. A partir das densidades real e aparente, foi calculada a porosidade do material, utilizando a Equação 4.10.

$$\varepsilon = \frac{VP}{VT} = 1 - \left(\frac{VS}{VT} \right) = 1 - \left(\frac{\rho_s}{\rho_p} \right) \quad \text{Equação 4.9}$$

onde, VP, VT, VS ρ_s ρ_p são volume dos poros, volume do recipiente ou cubeta, volume dos sólidos, densidade aparente, densidade real, respectivamente.

4.2.4.9. Características das partículas quanto a fluidização

Segundo a classificação de GELDART, 1986 (Figura 3.9.) as partículas de quitosana contendo ddl, foram analisadas quanto ao diâmetro por microscopia eletrônica de transmissão (MET) no Laboratório de Uso Comum da FEQ (LUC-FEQ), a densidade aparente foi determinada por porosímetro por intrusão de mercúrio, e a densidade do fluido, que no caso é o ar foi obtido de valores tabelados da literatura.

4.2.5. Morfologia das micropartículas de quitosana contendo didanosina

4.2.5.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micropartículas foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas por 48 horas. Após a liofilização, as micropartículas foram metalizadas com ouro e analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório de Uso Comum da FEQ (LUC-FEQ).

4.2.5.2. Microscopia óptica

As micropartículas foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas por 48 horas. Após a liofilização as micropartículas foram misturadas com óleo específico para visualização em microscopia eletrônica de transmissão (MET) no Laboratório de Uso Comum da FEQ (LUC-FEQ).

4.2.6. Granulação e Revestimento das Micropartículas

A granulação foi realizada em leito fluidizado e por extrusão/esferonização, e o revestimento foi realizado em equipamento do tipo leito fluidizado Wurter.

4.2.6.1. Granulação por leito fluidizado

Após a preparação e a centrifugação das micropartículas, elas foram secadas em estufa a temperatura de 40 °C até a umidade de 75 %.

Em leito fluidizado (Figura 4.3.a), utilizou-se a quitosana, como excipiente, na concentração de 4,8% (m/m), devido às suas propriedades de mucoadesividade (SILVA, 2006).

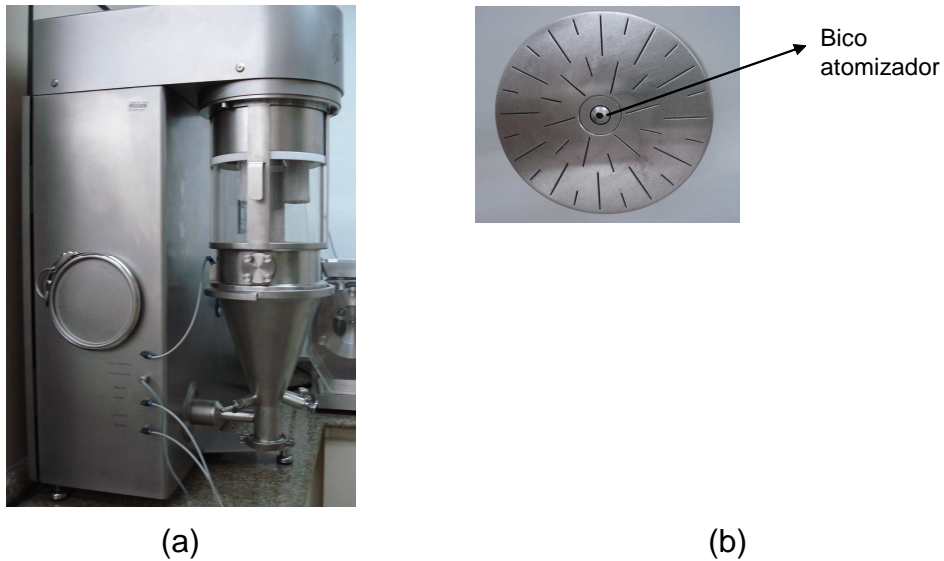


Figura 4.3. Leito Fluidizado tipo Wurster (a); Distribuidor de gás para leito (b).

Os parâmetros gerais do equipamento são:

- A geometria do leito fluidizado utilizado é cilíndrica na parte superior com 21,5 cm de base e 33 cm altura e cônica na parte inferior com altura de 25 cm, como a figura 4.3 a;
- Bico atomizador e o distribuidor de ar localizam na base do leito fluidizado, apresentando diâmetro de 1 mm e 5,3 cm respectivamente, figura 4.3. b;
- A carga utilizada foi de 40 gramas de partículas;
- Regime de “spray” da suspensão durante o recobrimento foi contínuo;
- Utilizou-se o regime de fluidização turbulenta;
- Porosidade mínima de fluidização foi calculada utilizando a equação 3.1;
- Velocidade de mínima fluidização foi calculada pela equação de Ergun (Equação 3.3.);
- Fluxo de ar a $6\text{m}^3/\text{h}$;
- Temperatura de entrada do ar a 50°C ;
- Temperatura do material a 40°C .

Os grânulos formados apresentaram grande variabilidade de tamanho, por isso foram moídos por 30 segundos em moinho (Figura 4.4. c) e padronizados com ajuda de um tamisador vibratório (Figura 4.4 b).

A padronização realizada através da análise dos tamises é uma técnica simples e direta para a determinação da distribuição dos tamanhos dos grânulos. Os tamises selecionados foram empilhados, como a figura 4.4 a, e colocadas sobre um tamisador vibratório durante 3 minutos com intervalos de 7 segundos e amplitude 1.

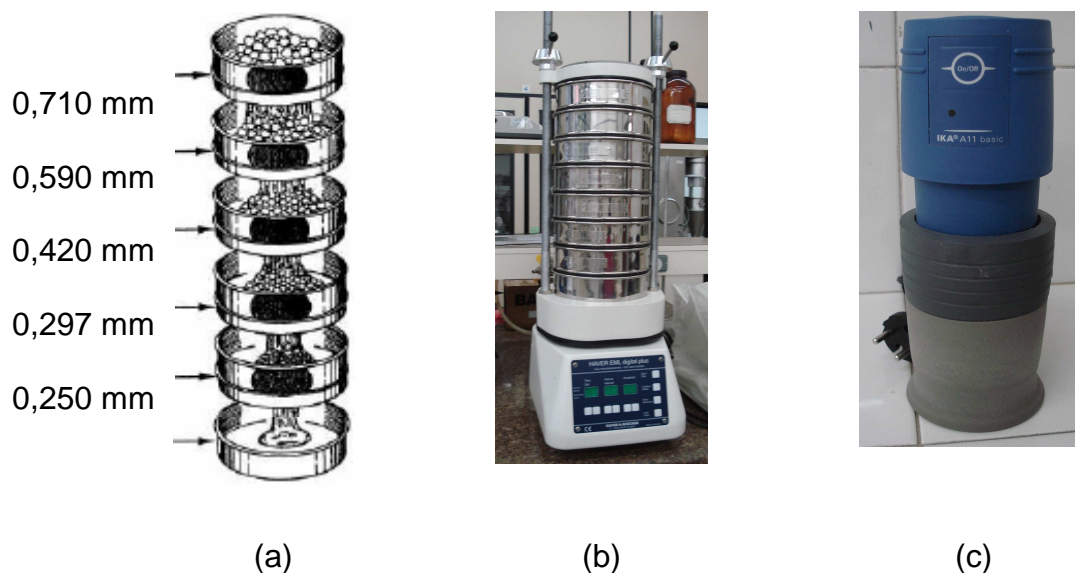


Figura 4.4. Apresenta a padronização dos tamises (a,b), tamisador vibratório (b) e moinho (c).

4.2.6.2. Esferonização e extrusão

A fim de melhorar a uniformidade dos grânulos optou-se em modificar o processo de produção e acrescentar celulose microcristalina e quitosana na mesma proporção como excipientes.

A massa úmida foi submetida à extrusão sob rotação do eixo central do extrusor em 20 rpm. O extrusado formado foi esferonizado por 5 minutos a 100rpm

em esferonizador provido de placa giratória com ranhuras. Os grânulos formados foram secados em leito fluidizados e revestidos com os polímeros Kollidon[®] VA 64 e Kollicoat[®] MAE 100P.

4.2.6.3. Revestimento

Os polímeros de revestimentos utilizadas foram Kollidon[®] VA 64 e Kollicoat[®] MA 100P. O Kollidon[®] VA 64 foi disperso em solução aquosa a 5 e 10% (m/v) e utilizado para isolamento do núcleo para posterior revestimento com o Kollicoat[®] MA 100P . O Kollicoat[®] MA 100P foi disperso em água a 30% (m/v) com auxílio de um agitador magnético por 24 horas, em seguida acrescentou-se os adjuvantes (tabela 4.1) e agitou por mais 3 horas.

As formulações testadas estão presentes na Tabela 4.1 e 4.2:

Tabela 4.1. Formulações utilizadas para o revestimento gastrorresistente em leito fluidizado.

Função	Formulação	1	2	3	4
Isolamento do núcleo	Kollidon [®] VA 64	5%	-	5%	10%
	Água	30 mL	-	60 mL	100 mL
Revestimento gastrorresistente	Kollicoat [®] MAE 100 P	10%	20%	30%	20%
	Propilenoglicol (plastificante)	2,25%	2,25%	2,25%	2,5%
	Trisilicato de magnésio (antiaderente)	4%	4%	4%	4%
	Dióxido de titânio (antiaderente)	-	-	-	2%
	Água	30 mL	50 mL	60 mL	100 mL

Tabela 4.2. Formulações utilizadas para o revestimento gastrorresistente por extrusão e esferonização.

Função	Formulação	5	6	7
Isolamento do núcleo	Kollidon [®] VA 64	10%	10%	10%
	Álcool	30mL	30mL	30mL
Revestimento gastrorresistente	Kollicoat [®] MAE 100 P	10%	20%	30%
	Propilenoglicol (plastificante)	1,5%	1,5%	1,5%
	Trisilicato de magnésio (antiaderente)	0,5%	0,5%	0,5%
	Dióxido de titânio (antiaderente)	0,5%	0,5%	0,5%
	Álcool	100mL	100mL	100mL

Primeiramente, os grânulos foram recobertos com Kollidon[®] VA 64, exceto a formulação 2 da Tabela 4.1., e após a secagem a formulação de Kollicoat[®] MA 100P foi aplicada.

As condições do leito fluidizado para aplicação do revestimento foram: vazão volumétrica de ar 6m³/h, temperatura de entrada do ar a 50 °C, temperatura dos grânulos 40 °C, fluxo de pressão de 0,9 bar, microclima 0,30 bar.

As dispersões de revestimento foram aplicadas a uma velocidade de 0,5 g/minuto com auxílio de uma bomba peristáltica, da marca Watson Marlow.

A secagem, granulação e revestimento das partículas foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

4.2.6.1.1. Caracterização dos polímeros de revestimento

Os polímeros de revestimento Kollidon[®] VA 64 e Kollicoat[®] MAE 100P foram caracterizadas quanto à tensão superficial, ângulo de contato e determinação do trabalho de adesão.

4.2.6.1.1.1. Tensão superficial

A tensão superficial das suspensões foram determinadas pelo tensiômetro automático, marca OCA-20 neste método, a tensão foi determinada a partir de uma gota do líquido formada no interior de um frasco de vidro e sua imagem foi projetada através de uma câmera, através de um software específico mensurou a gota e forneceu a tensão superficial. Esse experimento foi realizado no Laboratório de Físico Química de Superfícies e Colóides do Departamento de Química da USP.

4.2.6.1.1.2. Determinação do ângulo de contato e do trabalho de adesão

As medidas do ângulo de contato foram realizadas pelo método ótico, utilizando um goniômetro manual da Tanteq, do Laboratório de Física de Polímeros da FEQ.

O método consiste na deposição de uma gota da suspensão sobre uma superfície plana na qual se deseja determinar o ângulo de contato. Um feixe de luz incide nessa gota, projetando-se sobre um anteparo graduado, como a Figura 4.5.

Para a obtenção da superfície plana, sobre a qual a gota foi depositada, alguns grânulos foram prensados em um frasco de aço inox com auxílio de uma prensa hidráulico utilizando 2 toneladas.

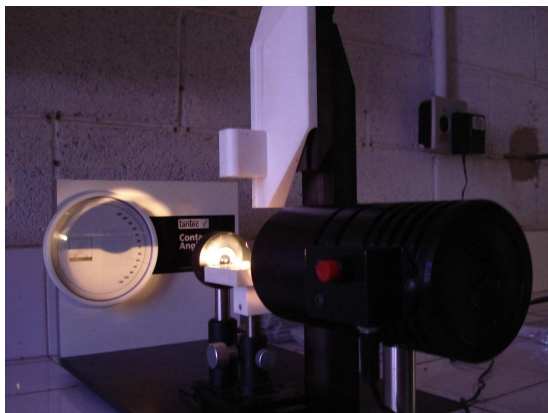


Figura 4.5. Goniômetro da marca Tantec utilizado no experimento.

As medições foram realizadas a 25 °C e com 65% de umidade relativa e realizadas de 3 maneiras diferentes:

- 1) Deposição da solução de Kollidon® VA 64 diretamente nas pastilhas;
- 2) Deposição da formulação de Kollicoat® MAE 100P (Tabela 4.1) diretamente nas pastilhas e;
- 3) Revestimento das pastilhas com Kollidon® VA 64, secagem e deposição da formulação de Kollicoat® MAE 100P.

O trabalho de adesão foi calculado pela equação de NEUMANN & GOOD (1979).

4.2.7. Caracterização dos grânulos revestidos

Os grânulos obtidos foram caracterizados através da determinação do seu crescimento, parâmetros geométricos e análise morfológica.

4.2.7.1. Determinação do crescimento do grânulo

O crescimento do grânulo (δ), definido como a razão entre as massas dos filmes formados durante o revestimento e a massa original dos grânulos.

$$\delta = \left(\frac{M_{\text{filme}}}{M_{\text{grânulos iniciais}}} \right) * 100 \quad \text{Equação 4.10}$$

onde, M_{filme} e $M_{\text{grânulos iniciais}}$ são respectivamente, massa do filme formado sobre os grânulos e massa inicial dos grânulos.

4.2.7.2. Parâmetros dos grânulos

Os parâmetros geométricos foram determinados através da análise de fotografias digitais dos grânulos espalhados sobre uma superfície negra, obtidas com uma camera digital SONY Cyber-shot 5 megapixels. As fotografias foram processadas pelo programana UTHSCSA *Image Tool 3.0*. os parâmetroso geométricos determinados foram:

Área (Ar): corresponde à área ocupada pelo grânulo na fotografia.

Perímetro (PM): comprimento da projeção do limite exterior do grânulo.

Comprimento do maior eixo: comprimento da maior linha traçada na maior distância.

Comprimento do eixo menor: comprimento da menor linha traçada na menor distância.

Alongamento (AL): relação entre o comprimento do maior eixo e o comprimento do menor eixo.

Esferonicidade (Esf): medida dependente da rugosidade da superfície externa do grânulo (perímetro). Representa um número entre 0 e 1, quanto maior o valor maior é o grau de esferonicidade. É calculada pela equação abaixo.

$$Esf = \frac{4.\pi.Ar}{Pm^2} \quad \text{Equação 4.11}$$

onde, Ar e Pm são respectivamente, área e perímetro da partícula na fotografia digital.

Diâmetro de Feret (DF): é o diâmetro de um círculo com a mesma área do objeto. É calculado pela equação abaixo.

$$DF = \sqrt{\frac{4.Ar}{\pi}} \quad \text{Equação 4.12}$$

4.2.7.3 Análise morfológica dos grânulos revestidos

As morfologias das estruturas externas dos grânulos foram visualizadas por estereoscópio acoplado com máquina fotográfica e Iluminação por fibra ótica, no Laboratório de Uso Comum da FEQ (LUC-FEQ).

4.2.8. Ensaio de gastrorresistência

A avaliação da gastrorresistência dos grânulos foi realizada conforme a USP XXVIII e consistiu em transferir para as cubas de dissolução 750mL da solução de HCl 0,1N em água e manter à temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sendo utilizado o aparato I (Figura 4.6. b) e agitação de 75 rpm utilizando dissolutor automatizado, da marca Vankel (Figura 4.6. a) do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da USP.

As amostras foram coletadas do meio de dissolução nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 minutos. Após a última coleta, 250 mL de tampão fosfato 0,05M e pH 6,8 foram adicionados às cubas de dissolução. O pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) até pH 6,8. Para este meio, foram coletadas as amostras nos tempo 150, 140, 160, 180, 200, 250 e 300 minutos. As amostras

foram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 248nm, em sistema automatizado.



(a)

(b)

Figura 4.6. Dissolutor (a); aparato I (b).

4.2.9. Metodologia analítica

4.2.9.1. Adaptação da metodologia analítica

A partir da metodologia analítica para cromatografia de alta eficiência descrita por ASCENZI *et al.*, 2006, foram ajustadas condições cromatográficas para a determinação simultânea em plasma de cão, ddl e aciclovir (padrão interno).

A metodologia consistiu em utilizar um sistema de extração em fase sólida on-line utilizando Triathlon[®], sistema de injeção da amostra, ligado no Prospekt 2[™] (Spark Holland), que consiste em utilizar trocas automáticas de cartuchos (ACE). Os cartuchos utilizados consistem em BondElut C18, 10mm×2mm i.d., 40–90 µm particles.

No sistema Triathlon[®] injeções das amostras foram realizadas no volume de 50 µL, seguidas para o Prospekt 2[™]. Para receber a amostra os cartuchos

foram previamente ativados com 1000µL de metanol, em fluxo de 3000 µL/minuto e lavados com 1000uL de água, em fluxo de 3000 µL/minuto.

Após a lavagem do cartucho a amostra foi injetada com 500 µL de água, em fluxo de 1000 µL/min e lavada com metanol/água (50:50) em fluxo de 3000 µL/minuto.

A fase móvel empregada no CLAE foi composta de tampão fosfato 0,02 M (KH₂PO₄), acetonitrila (96:4, v/v) e ácido sulfônico heptano 0,5% (m/v). O pH foi ajustado para 6,5 com trietanolamina. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min, detecção por detector de ultravioleta em 250 nm.

As condições cromatográficas da coluna foi C₁₈ de 15 cm, acoplada a pré-coluna (ACE 5[®] C₁₈, Analítica[®]). Antes da utilização a fase móvel foi filtrada através de filtro de membrana MILLIPORE[®] e degaseificada em banho de ultrassom por 10 minutos. A coluna foi mantida a 28^o C.

A quantificação de ddl e ACL nas amostras de plasma foi realizada utilizando sistema CLAE Shimadzu[®] com detecção por ultravioleta em $\lambda = 250\text{nm}$.

4.2.9.2. Preparação das soluções da curva padrão

Para o preparo da solução mãe de ddl foi pesado 0,01 g de ddl, em balança analítica, e solubilizado em tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH=7, até o volume de 50mL em balão volumétrico. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo da solução mãe de aciclovir (ACL).

A solução mãe de ddl foi submetida a sucessivas diluições até alcançar as concentrações de 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 20000 e 50000 ng/mL. A solução mãe do ACL foi diluída na concentração de 20 µg/mL.

Alíquotas de 10 µL das soluções finais de ddl e da solução de ACL foram adicionadas a 90 µL de plasma e agitadas por vórtex por 25 segundos.

Posteriormente essas amostras foram colocadas no extrator de fase sólida e analisadas em CLAE.

4.2.9.3. Validação da metodologia analítica

A metodologia analítica foi validada de acordo com a ANVISA e *Food Drug Administration* (FDA) analisando a seletividade, exatidão, linearidade, repetibilidade e precisão.

As curvas de calibração foram realizadas utilizando concentrações conhecidas de solução de didanosina e aciclovir em plasma. As concentrações da curva de calibração foram determinadas a partir do estudo piloto de cães.

A metodologia analítica foi validada utilizando as concentrações de 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 e 5000 ng/mL e os controles de qualidade foram 75, 1500 e 3500 ng/mL.

Seis curvas de calibração foram preparadas, a partir de soluções mães diferentes, e analisadas em relação à linearidade e controles de qualidade. Os controles de qualidade para cada curva foram diferentes dos utilizados para o preparo da curva padrão.

A relação área ddl/área ACL obtida pela análise de plasma de cão em CLAE, acoplado com extrator em fase sólida, foi comparado com a área obtida com soluções padrões nas mesmas concentrações injetadas diretamente no CLAE.

4.2.9.4. Estudos de estabilidade

Para avaliação da estabilidade da ddl e do ACL em plasma de cão foram realizados 3 testes diferentes, em triplicata e nas concentrações de 25ng/ml e 4500ng/ml. As condições estudadas foram:

- 3 ciclos 12 horas de congelamento seguida do descongelamento, seguida da análise da amostra.

- As amostras foram analisadas no tempo zero, congeladas por 30 dias a -20°C descongeladas e analisadas.

- As amostras foram mantidas no carrossel do equipamento, em temperatura ambiente e analisadas nos tempos zero, 12 horas e 24 horas.

4.2.9.5. Protocolo Experimental

O experimento com animais foram realizado no CPPAR (Centro de Pesquisa em Sanidade Animal), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp Jaboticabal. Todos os procedimentos com os animais, desde a administração até as coletas de sangue, foram conduzidos pela veterinária Dra. Heloísa da Silva.

Nesta etapa foram avaliados os grânulos desenvolvidos neste trabalho e as duas formulações disponibilizadas pelo SUS, comprimidos mastigáveis de ddl e Videx EC®.

Os animais receberam a medicação por via oral na dose de 500 mg, sendo que os pellets foram administrados em cápsulas gelatinosas duras e a formulação convencional em comprimidos mastigáveis. Todas as formulações foram administradas com 10 mL de água. Foi observado um período de *wash out* de uma semana entre os experimentos.

Em estudo randomizado cruzado, foram utilizados cães machos e adultos, pesando 10 Kg. Os animais foram vermifugados uma semana antes do experimento e mantidos separadamente. Os animais ficaram em jejum por 12 horas antes da administração das formulações e receberam água após duas horas e alimentação após 4 horas da administração das formulações.

Após a administração dos medicamentos foram coletadas amostras de sangue, (2 mL) da veia cefálica nos tempos 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18; 24 e 36 horas.

As amostras de sangue, coletadas em tubos VACUETTE® previamente heparinizados, submetidas à centrifugação por 10 minutos a 9000 rpm.

O plasma foi separado, adicionado em tubo Eppendorf e congelado a -20°C até o momento de sua análise por CLAE.

Após o término dos experimentos os animais voltaram a sua rotina.

Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do rio Grande do Sul.

4.2.9.6. Avaliação do perfil de concentração plasmática x tempo

A partir das concentrações plasmáticas, obtidas dos medicamentos em estudos, os perfis farmacocinéticos foram obtidos a partir das análises não-comportamentais, utilizando o programa Excel[®] 2003 (Microsoft[®]).

4.2.9.7. Análise não-compartimental

A análise não-compartimental foi realizada individualmente para cada animal pertencente ao grupo experimental.

Os parâmetros farmacocinéticos analisados foram constante de velocidade de eliminação (λ), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$), área sob a curva de primeiro momento do tempo zero ao infinito ($ASMC_{0-\infty}$), e tempo de residência médio no plasma (MRT_{plasma}). Além disso, foram determinados a concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo necessário para obtê-la (t_{max}), bem como a biodisponibilidade relativa do fármaco.

A constante de velocidade de eliminação (λ) foi calculada pela inclinação da fase terminal da curva log-linear dos perfis de concentração em relação ao tempo de cada animal, empregando-se os últimos 4 pontos dos perfis, o $t_{1/2}$ foi determinado pela equação

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda}$$

Equação 4.13

A área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi calculada pelo método trapezoidal do tempo 0 a t (ASC_{0-t}). A ASC_{0-t} foi acrescida da área sob a curva extrapolada (ASC_{extr}), como as equações abaixo:

$$ASC_{0-t} = \frac{(C_0 + C_1)}{2} * (t_1 - t_0) + \dots + \frac{(C_{t-1} + C_t)}{2} * (t_t - t_{t-1}) \quad \text{Equação 4.14}$$

$$ASC_{extr} = \frac{C_t}{\lambda} \quad \text{Equação 4.15}$$

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + ASC_{extr} \quad \text{Equação 4.16}$$

Onde, C_t é a concentração plasmática do último ponto da coleta, C_{t-1} é a concentração plasmática do penúltimo ponto da coleta, t_t é o tempo do último ponto da coleta e t_{t-1} é o tempo do penúltimo ponto da coleta.

A $ASMC_{0-t}$ foi calculada pelo método trapezoidal a partir de curva de concentração vezes tempo (Cxt) por tempo. A extrapolação da $ASMC$ foi determinada por:

$$ASMC_{extr} = \frac{Ct \times t}{\lambda} + \frac{Ct}{\lambda} \quad \text{Equação 4.17}$$

e a $ASMC_{0-\infty}$ pela equação:

$$ASMC_{0-\infty} = ASMC_{0-t} + ASMC_{extr} \quad \text{Equação 4.18}$$

O tempo de residência médio no plasma foi determinado pela equação:

$$MRT_{plasma} = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad \text{Equação 4.19}$$

4.2.9.8. Análise estatística

Os parâmetros farmacocinéticos não-comportamentais foram comparados estatisticamente entre os grupos estudados pelo teste ANOVA ($\alpha = 0,05$), para verificar se havia diferença significativa entre os grupos em estudo.

Os resultados de ANOVA que apresentaram diferenças significativas passaram pelo teste de teste *Kruskal-Wallis* a fim de evidenciar qual grupo estaria apresentando tal diferença.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.0. Caracterização da quitosana

5.1. Grau de desacetilação da quitosana

Uma propriedade importante na caracterização da quitosana é o seu grau de desacetilação. Essa propriedade foi usada no presente trabalho, para determinar a quantidade de agente gelificante (TPP) adequado à produção das micropartículas de quitosana com didanosina. O resultado $82,83 \pm 3,63$ foi obtido a partir de experimentos realizados em triplicata.

A tabela 5.1 apresentam os resultados obtidos das titulações realizadas com pó seco de quitosana adquirida da Polymar[®].

Tabela 5.1. Condições experimentais para obter o grau de desacetilação da quitosana.

Massa quitosana (g)	$\Delta (V_2 - V_1)$ (mL)	% Molar de desacetilação da quitosana
0,2171	11,74	87,00
0,2509	12,64	81,10
0,2149	10,74	80,38

A figura 5.1. (a) apresenta a curva de titulação potenciométrica da quitosana e a figura 5.1. (b) sua derivada primeira.

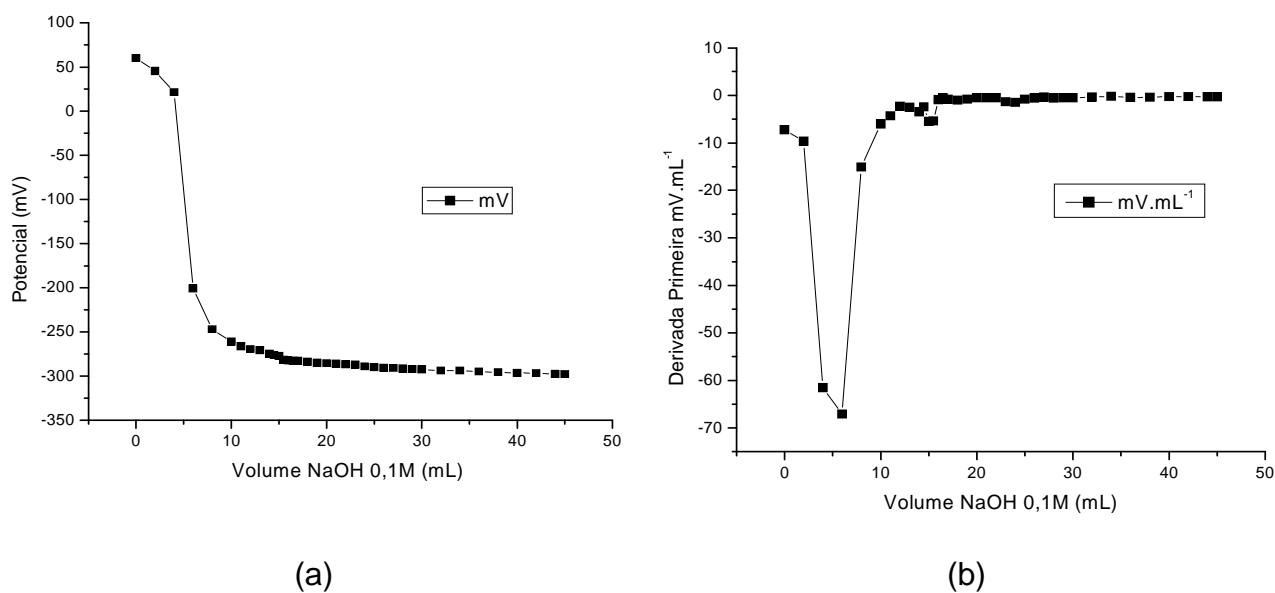


Figura 5.1. (a) Curva de titulação potenciométrica e (b) sua derivada primeira para quitosana em mV (milivolts).

5.2. Massa molar

A Figura 5.2, apresenta a relação linear obtida entre viscosidade intrínseca (η_{sp}/c) em função da concentração (c) das soluções das amostras. Obteve-se um coeficiente de ajuste, R^2 igual a 0,94, demonstrando uma boa linearidade dos dados experimentais obtidos.

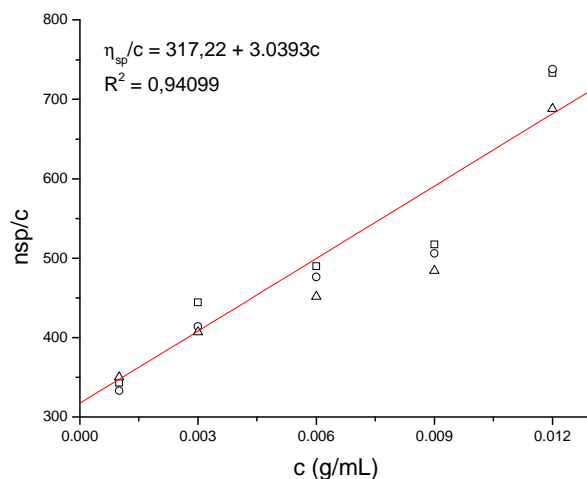


Figura 5.2. Relação linear entre concentração e viscosidade intrínseca, usada para a determinação da viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca, determinada pela extrapolação da reta a concentração zero, usada na equação empírica de Mark-Houwink (Equação 4.4) para o cálculo da massa molar, juntamente com os valores das constantes K , $1,81 \cdot 10^{-3}$ mL/g e 0,93 para a quitosana em um sistema solvente constituído de ácido acético 0,1M e cloreto de sódio 0,2M, a temperatura de 25°C,. A massa molar média obtida foi de 296,6 kDa.

5.1. Análise da ddl

5.1.1. Características físicas

A análise visual mostrou que a ddl é um pó branco na forma cristalina. O formato pode ser confirmado através da micrografia realizada em MEV, como a figura 5.3, sendo esses resultados preconizados pela Farmacopéia Brasileira 4^o Edição, 2003.

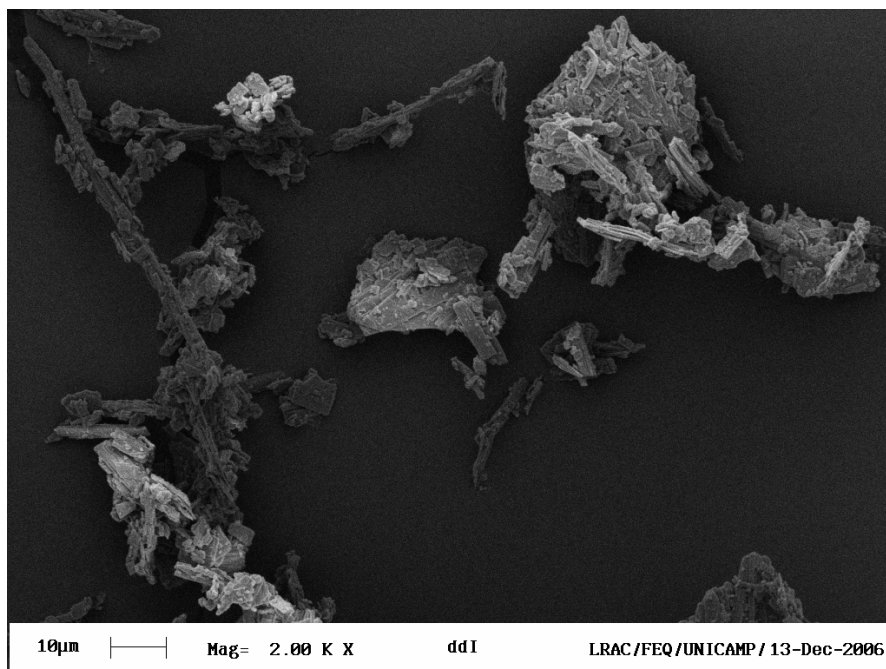


Figura 5.3. Micrografias de ddl obtidas através de microscopia eletrônica de varredura utilizando aumento de 2.000 vezes.

5.1.2. Ponto de fusão

A temperatura de ponto de fusão obtida da ddl analisada foi 185°C, sendo que a Farmacopéia Brasileira, 4^o Edição 2003, preconiza que a ddl pura funde a 160-163 °C. O resultado obtido, foi cerca de 12% maior que o valor esperado do valor esperado, mostra que a ddl em estudo não está com grau de pureza exigido.

5.1.3. Espectrofotometria de infravermelho

O espectro de infravermelho da Figura 5.4 e a Tabela 5.2 obtidos pela leitura na região do infravermelho mostraram que as bandas obtidas caracterizam a ddl. Com isso podemos concluir que a ddl analisada está caracterizada.

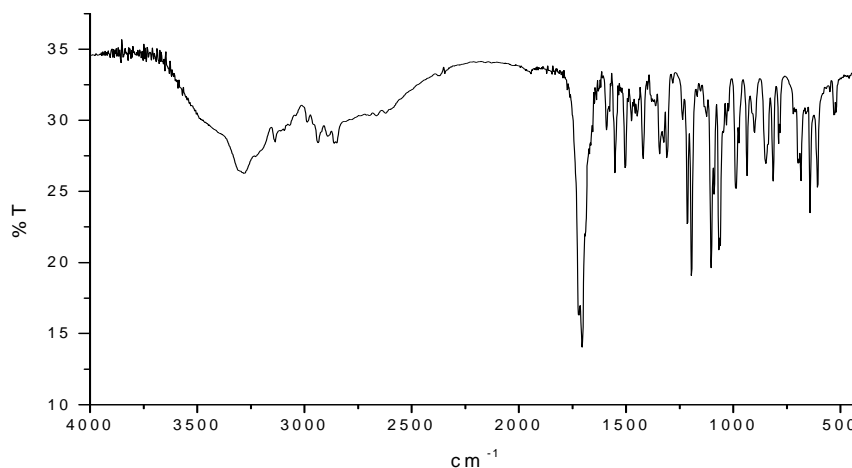


Figura 5.4. Espectro de infravermelho da ddl em pastilha de brometo de potássio.

Tabela 5.2. Principais bandas de infravermelho obtidas da ddl.

Possíveis ligações	Dados da literatura*	Didanosina
	ν (cm^{-1})	ν (cm^{-1})
N – H	3200	3126
O – H	2500 – 3300	3280
Amina aromática (C-N)	1560 -1615	1541
Amina aromática (C=N)	1615 -1700	1700
C – O – C	1000 -1300	1296
C – C	700 -1200	783 - 1181

*MORAN *et al.*,1978 e MORRISON *et al.*, 1961.

5.1.4. Espectrofotometria de ultravioleta

A varredura obtida com a amostra de ddl em estudo foi idêntica à referência da Farmacopéia Brasileira, mostrando absorvância máxima no comprimento de onda de 248nm.

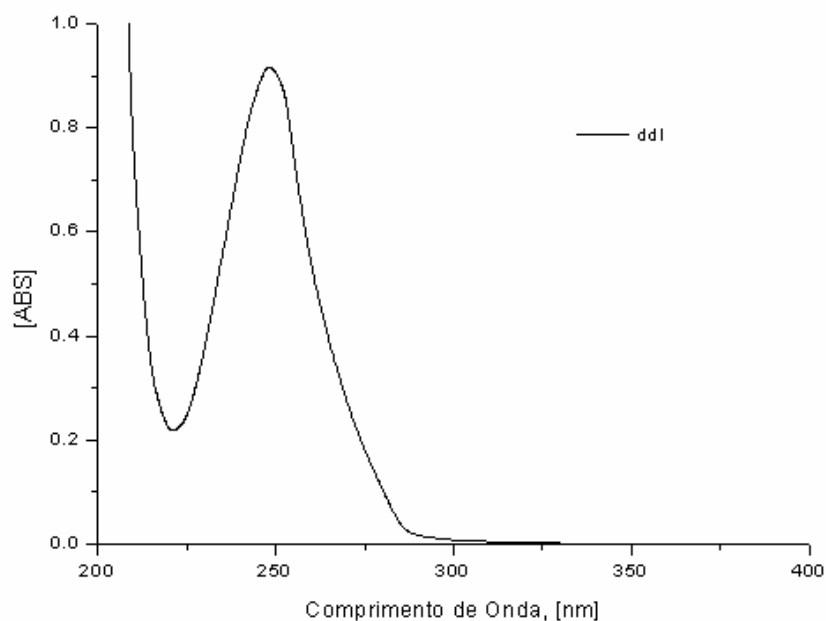


Figura 5.5. Espectro de UV da solução de 10 µg/mL ddl em metanol.

5.2. Caracterização das micropartículas de quitosana

5.2.1. Distribuição granulométrica, razão de cargas $R(+/-)$ e potencial zeta das partículas de quitosana/TPP

Os resultados da caracterização das quitosanas em termos de distribuição granulométrica, razão de cargas e potencial zeta são apresentados na Figura 5.6.

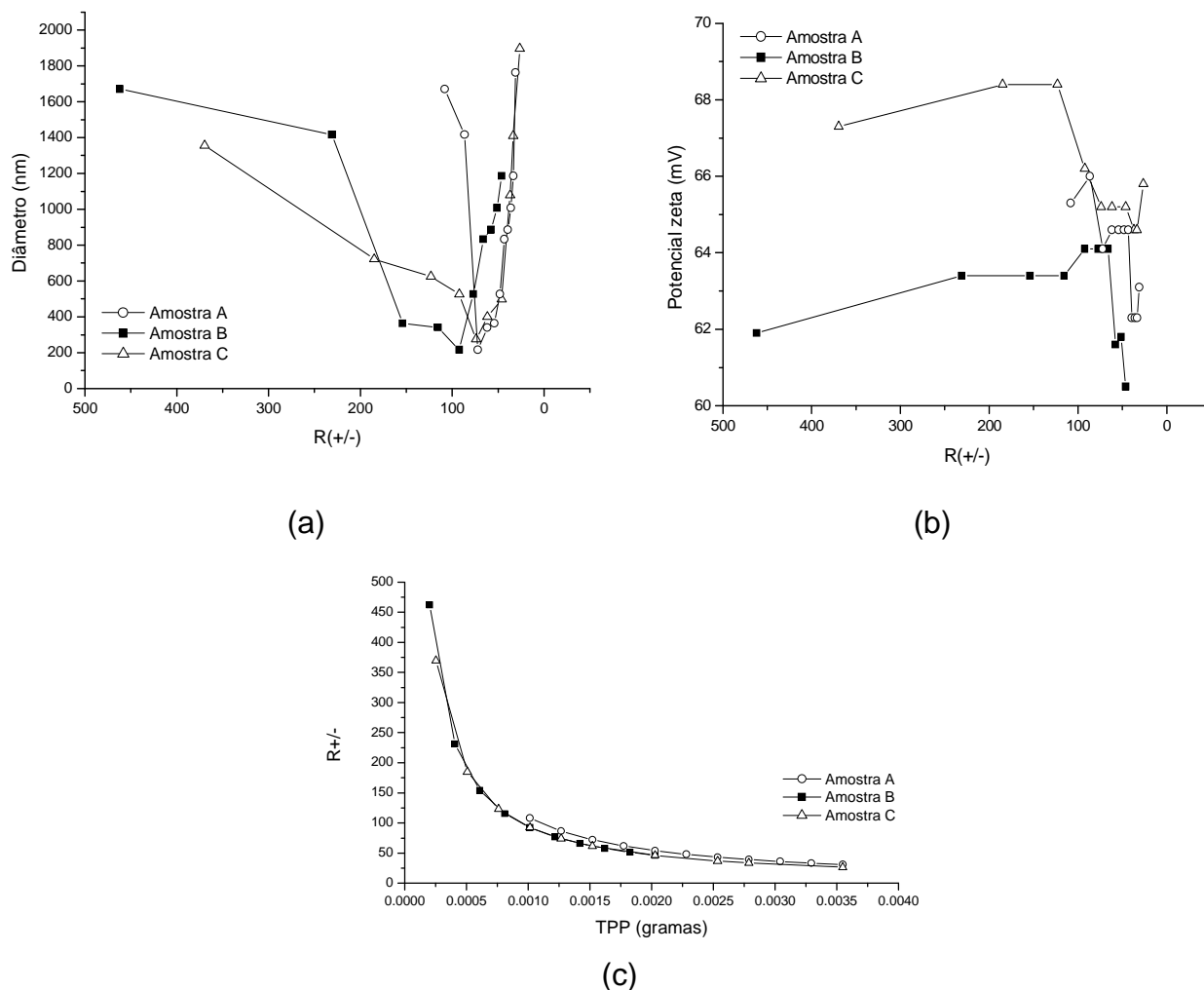


Figura 5.6. (a) diâmetro médio da partícula em relação a razão de cargas R(+/-); (b) potencial zeta em relação a razão de cargas R(+/-); e (c) a razão de cargas R(+/-) em relação a massa de TPP em (g).

A figura 5.6 (a) mostra o diâmetro médio das partículas em relação à razão de cargas R(+/-) das moléculas dos polieletrólitos presentes no sistema. Verifica-se que as partículas variam de tamanho consideravelmente com a diminuição da R(+/-).

Como o objetivo foi à generalização da razão de cargas R(+/-), independente da característica da quitosana, obtiveram-se partículas nanométricas de tamanho inferior a 400 nm, na razão de cargas entre 100 e 50 sempre encontramos partículas com característica independente da quitosana.

SILVA, 2006 dividiu o processo de formação das partículas em 3 regiões, denominando região 1 ao início da reticulação, a região 2 valores inferiores a 1000nm e região 3 quando ocorre a precipitação das nanopartículas formando micropartículas.

A primeira região apresenta razão de cargas maior correspondente às cadeias de quitosana distendidas. Nesse caso a quantidade de TPP é muito pequena, da ordem de 1 µg. Na segunda região obtêm-se as nanopartículas, na faixa de diâmetro médio de 300 nm, ou seja, a quantidade de TPP é suficiente para promover o enovelamento das cadeias de quitosana.

Analisando a Figura 5.6 (a) e (b) observa-se que na terceira região tem-se maior quantidade de TPP em relação à região 2, mas não apresentou neutralização total das cargas positivas presentes na quitosana, por isso as partículas apresentaram pouca variação do potencial zeta, em torno de 62 a 68 mV. Relacionando os valores obtidos pelo potencial zeta e pela razão de cargas as partículas de quitosana contendo TPP apresentam característica catiônica na superfície.

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al*, 2003).

O potencial zeta apresentou perfis e valores (62 a 68 mV) semelhantes entre as amostras de quitosanas (A, B e C), reticuladas com TPP, devido à pouca variação entre as quantidades de TPP utilizadas (Figura 5.6 b). O desvio padrão foi baixo, variando de 0,6 a 2, por isso podemos sugerir a presença de partículas nas amostras analisadas.

SCHAFFAZICK *et al*, 2003 através do estudo da caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos ressalta que em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a

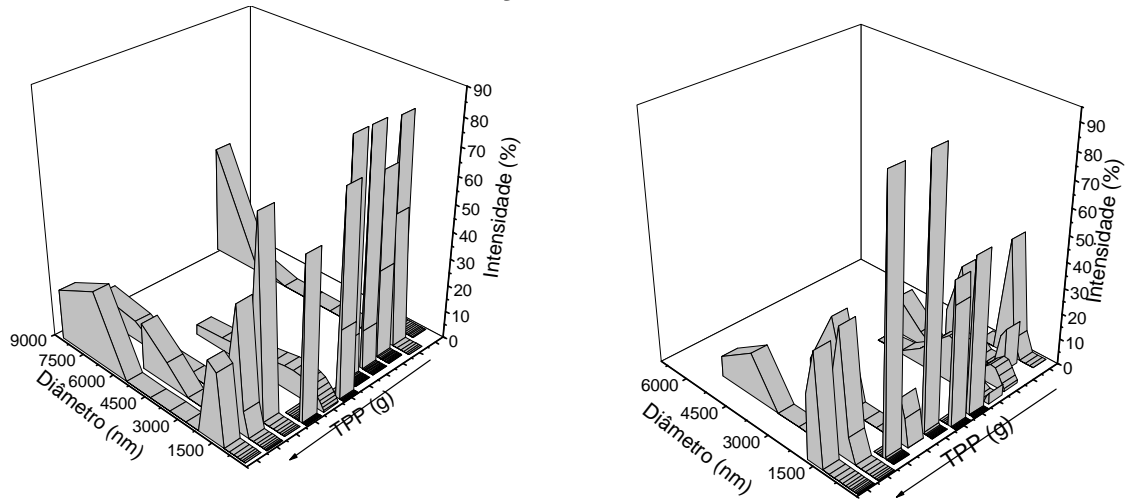
evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes. Valores altos referidos pelo estudo apresentam-se acima de 30 mV.

Uma análise do potencial zeta das partículas de quitosana da amostra B, contendo ddl foi realizada e obteve-se o valor de $0,18 \text{ mV} \pm 0,045$, mostrando-nos que o fármaco encontra-se na superfície da partícula.

A figura 5.5 c mostra que com o aumento da massa de TPP utilizada para a reticulação da quitosana diminuimos a razão de cargas, mas não igualamos em quantidades estequiométricas, por isso as partículas possuem uma quantidade maior de cargas positivas em relação às cargas negativas.

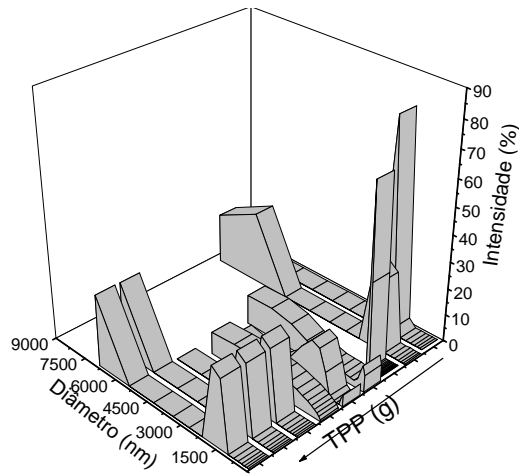
A Figura 5.7., demonstra dados de intensidade (%), diâmetros (nm) e quantidade de TPP, aumentando conforme a indicação da seta, podemos verificar que as três amostras de quitosanas analisadas apresentaram polidispersidade aproximam-se de 1, inicialmente. Na região nanométrica (400nm) a polidispersidade foi menor, apresentando uma região unimodal, evidenciando a presença de nanopartículas, seguida da formação da micropartículas

Distribuição de Tamanhos



Amostra A

Amostra B



Amostra C

Figura 5.7. Influência de TPP no diâmetro médio das partículas e na intensidade (%).

5.2.2. Espectroscopia de infravermelho (IE) das micropartículas

A Figura 5.8. apresenta os espectros de infravermelho da quitosana sólida e da CS/TPP. A Tabela 5.3. apresenta as principais bandas de infravermelho obtidos da quitosana sólida e da quitosana/TPP.

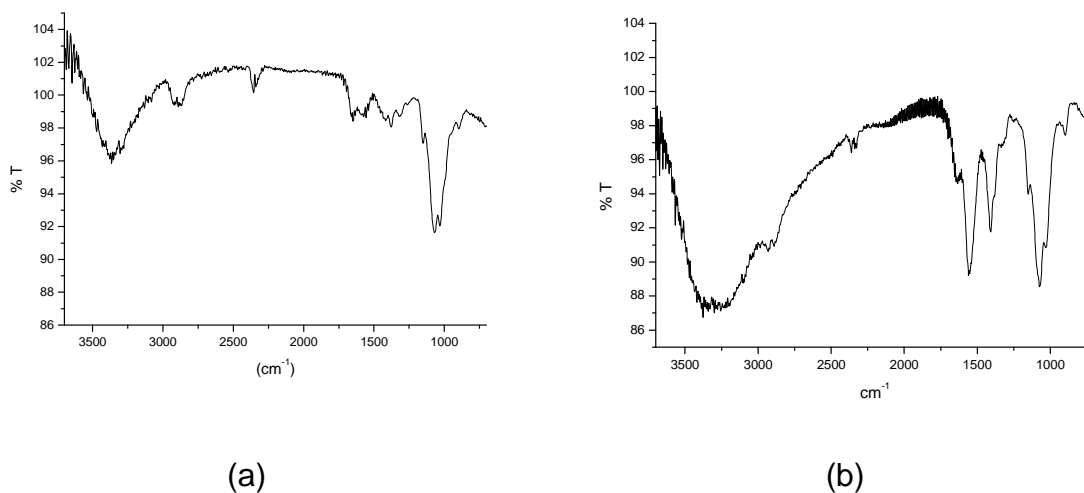


Figura 5.8. (a) Espectro de infravermelho da quitosana sólida e (b) Espectro das partículas de CS/TPP.

Tabela 5.3. Principais bandas de infravermelho obtidas com quitosana sólida e partículas de CS/TPP

Possíveis ligações	Quitosana sólida	Partículas
	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)
O - H, ligações H	3362	3301
C - H	2884	2929
C - O	1650	1638
N - H	1552	1560
C ₃ O	1376 - 1151	1409
C ₆ O	1070 - 1025	1074 - 1029
P - O - P	-	898
P = O	-	1151

A presença de bandas (cm^{-1}) de P-O-P e P=O em 898 e 1151 respectivamente caracterizam a presença de TPP e não se apresentaram muito intensas na Figura 5.8 (b), devido a menor massa de TPP em relação à massa de quitosana.

As bandas 1650-1552 correspondentes a C-O e N-H caracterizam a quitosana pura, enquanto que o alargamento dessas bandas (1638-1560) caracteriza a formação das partículas CS/TPP, indicando a interação entre a quitosana e o TPP (LAM *et al.*, 2006).

5.2.3. Melhoramento do processo de agitação

A tabela 5.4. apresenta a comparação entre a metodologia utilizada por SILVA, 2006, denominada de A e o resultado obtido com nova metodologia empregada no processo de agitação, denominada B, utilizado no preparo das micropartículas de quitosana contendo ddl.

Tabela 5.4. Condições agitação, a eficiência de encapsulação e carregamento da ddl.

Ensaio	Chicanas	Diâmetro do impelidor (cm)	Rotações (rpm)	Eficiência de encapsulação (%)	Carregamento (mg ddl/g quitosana)
A	ausente	2	4.500	35,6	1397,63
B	presente	3,3	2.000	48,9	1884,30

Os resultados presentes na tabela 5.4 mostram um aumento da porcentagem de encapsulação de 13,3% e da eficiência de encapsulação em 486,67 mg ddl/g de quitosana.

Além disso, visando o produção em escala industrial conseguiu-se diminuir a intensidade de agitação do equipamento em 2.500 rpm, fazendo com que haja menor desgaste do equipamento.

5.2.4. Eficiência de incorporação, carregamento e grau de intumescimento

As características de eficiência de incorporação, carregamento e grau de intumescimento das micropartículas de quitosana contendo ddl apresentaram maior eficiência em comparação com os resultados de SILVA, 2006, devido as modificações no processo de agitação.

Tabela 5.5. Eficiência de incorporação, carregamento e grau de intumescimento referentes às micropartículas de quitosana contendo ddl.

Eficiência de incorporação (%)	Carregamento (mg de ddl/g de quitosana)	Grau de intumescimento (%)
48,90±2,34	1884,30±8,35	512,61±2,55

5.2.5. Densidade real e aparente

As densidades real e aparente obtidas foram respectivamente 1,49 g/mL e 0,25 g/mL.

A porosidade (ϵ) calculada utilizando a equação 4.10 foi de 0,84. Essa porosidade caracteriza-se que o sólido é extremamente poroso com uma fração de vazios de 83,23%

5.2.6. Características das partículas quanto à fluidização

As micropartículas em estudo, pode ser classificado como fluidização com aeração, de acordo com Geldart, 1986 por apresentar diâmetro de 100 μm e a

diferença entre a densidade aparente das partículas (0,2488 g/mL) e a densidade do fluido (0,001095 g/mL), mostrando facilidade para fluidizar.

5.3. Morfologia das micropartículas

5.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As figuras 5.9 abaixo representam as micrografias das micropartículas obtidas no item 4.2.4.4. Observa-se nas figuras a predominância de partículas esféricas e a presença de estruturas de formato cristalino que representam a ddl.

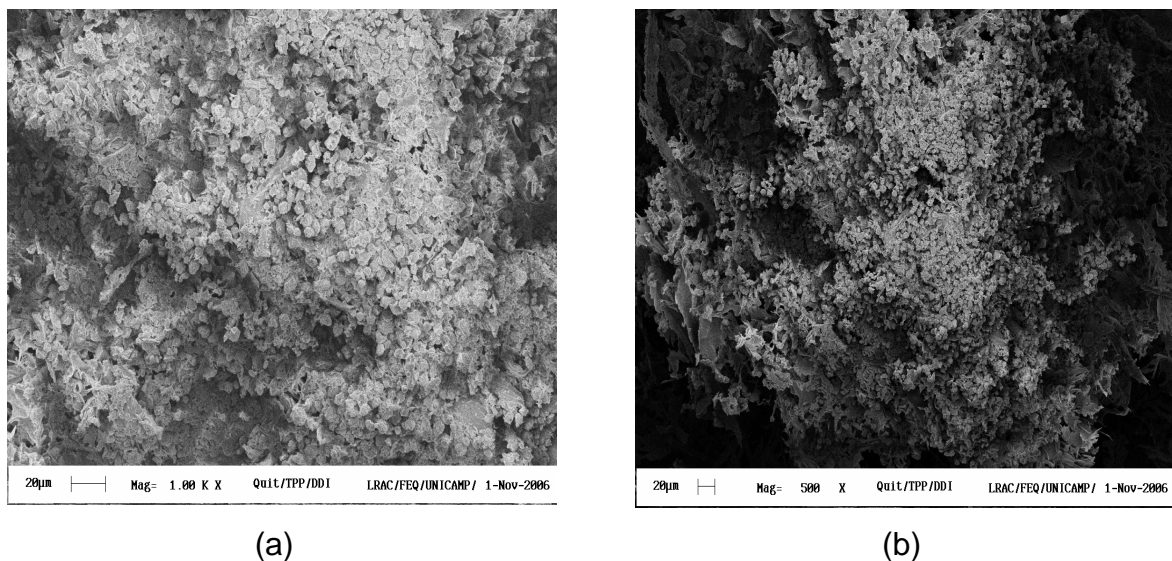


Figura 5.9. Micrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura (a) utilizando aumento de 500x e (b) utilizando aumento de 1000x.

5.3.2. Microscopia óptica

A figura 5.8 abaixo representa a micrografia das micropartículas obtida no item 4.2.4.4. .Nesta figura observa-se a predominância de partículas esféricas e alguns pontos cristalinos que representam a ddl não encapsulada.

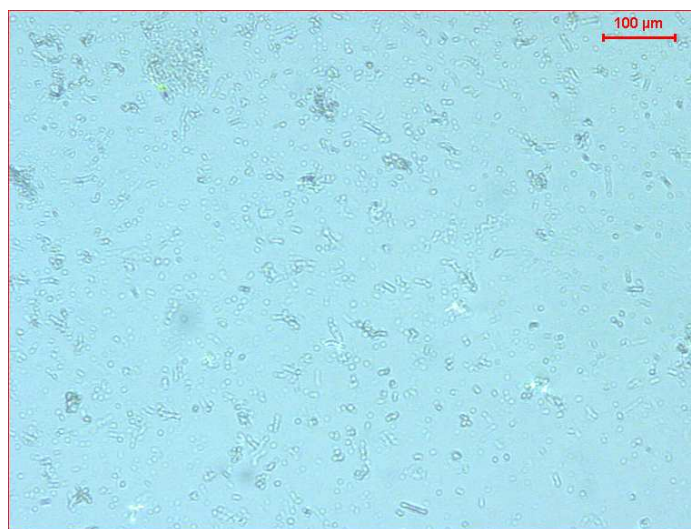


Figura 5.10. Micrografia das partículas através de microscopia óptica utilizando o aumentode 100 vezes, em imersão em óleo.

5.4 Granulação e revestimento das partículas

5.4.1. Granulação

A porosidade mínima de fluidização foi calculada considerando queda de pressão no leito de 5%, altura mínima de fluidização de 40 cm, diferença entre a densidade real e densidade do fluido de 1481,905 Kg/m³ e gravidade de 9,81 m/s². O resultado obtido foi de 21,6%, demonstrando a facilidade de fluidização para esse tipo de partícula.

A velocidade de mínima fluidização obtida foi de 0,25 m/s, calculada utilizando a esfericidade da partícula de 0,85, o diâmetro da partícula de 100 μm , a viscosidade do fluido de $1,927 \times 10^{-5}$ Kg/m.s, a densidade do fluido $10,95 \text{Kg/m}^3$, a porosidade do leito de 0,216, a altura do leito de 0,4 m, e a queda de pressão do fluido através do leito $4559,625 \text{Kg/m.s}^2$. Como a vazão volumétrica do ar de entrada foi $6 \text{m}^3/\text{h}$, a velocidade de fluidização mínima foi rapidamente atingida.

5.5. Caracterização dos polímeros de revestimento

5.5.1. Tensão Superficial

Os valores obtidos pelas medidas de tensão superficial das formulações de Kollidon[®] VA 64 e do Kollicoat[®] MAE 100P foram respectivamente 49,2 mN/metro e 34,8 mN/metro.

5.5.2. Ângulo de contato e do trabalho de adesão

O resultado apresentado na tabela 5.6 representa a média dos valores de 10 medidas dos polímeros Kollidon[®] VA 64 e da formulação de Kollicoat[®] MAE 100P.

Tabela 5.6. Ângulos de contato obtidos através da solução de Kollidon[®] VA 64 e da formulação de Kollicoat[®] MAE 100P.

Kollidon [®] VA 64 em pastilhas sem revestimento	Formulação de Kollicoat [®] MAE 100P em pastilhas sem revestimento	Formulação de Kollicoat [®] MAE 100P em pastilhas revestidas previamente com Kollidon [®] VA 64
41,80±1,75	28,33±4,63	37,60±3,23

Os resultados apresentados são menores que 90° , mostrando que ocorre molhamento das partículas em todos casos, além disso ao comparar as duas metodologias empregadas para o Kollicoat[®] MAE 100P, podemos notar que o ângulo de contato é maior nas pastilhas que apresentam revestimento prévio de Kollidon[®] VA 64, por absorver menor quantidade de água devido diminuição da energia de superficial.

Dessa análise conclui-se que o Kollidon[®] VA 64 realiza um revestimento eficiente na proteção da ddl.

O trabalho de adesão calculado W_{AD} de Kollidon[®] VA 64 e Kollicoat[®] MAE 100P foram respectivamente 86,29 mN/metro e 65,42 mN/metro. Este valor apresenta 83,27 % do trabalho de adesão máximo ($W = 78,56$ mN/m) que corresponde a 0° , ou seja, há molhamento completo ou espalhamento espontâneo.

5.5.3. Crescimento do grânulo

Nas formulações 1, 2, 3, e 4 (Tabela 4.1.) não foram possível determinar o crescimento dos grânulos devido a formação de aglomerados, o que inviabilizou a realização deste teste.

Nas formulações 5, 6 e 7 (Tabela 4.2.) o crescimento dos grânulos foram respectivamente 10, 20 e 30% em relação ao seu tamanho sem revestimento.

5.5.4. Características dos grânulos

A tabela 5.7 apresenta os parâmetros geométricos determinados pelos grânulos preparados com diferentes revestimentos, analisando os dados do alongamento verificamos que houve variação entre as formulações e a que mais se aproximou da referência (Videx[®] EC) foi a formulação 4.

Os valores de esfericidade obtidos foram maiores que 0,80, sendo considerado valores satisfatórios para grânulos.

Os diâmetros de Feret foram baixos em relação ao valor (1 mm) adequado para enchimento de cápsulas gelatinosas duras.

Tabela 5.7. Parâmetros geométricos por unidade de grânulo de quitosana contendo ddl com diferentes revestimentos, sendo os grânulos de Videx® EC utilizados como controle.

Formulação	Alongamento	Esfericidade	Diâmetro de Feret (mm)
1	1,70 ± 0,82	0,90 ± 0,24	0,25 ± 0,18
2	1,58 ± 0,71	0,92 ± 0,25	0,19 ± 0,16
3	1,63 ± 0,72	0,81 ± 0,20	0,70 ± 0,38
4	1,48 ± 0,46	0,81 ± 0,28	0,49 ± 0,29
5	1,23 ± 0,26	0,76 ± 0,11	1,11 ± 0,16
6	1,45 ± 1,2	0,66 ± 0,17	1,28 ± 0,48
7	1,25 ± 0,48	0,74 ± 0,15	1,05 ± 0,26
Videx® EC*	1,43 ± 0,31	0,86 ± 0,10	1,52 ± 0,28

*Valores obtidos por SILVA, 2006 pela mesma metodologia utilizada neste experimento.

5.5.5. Análise morfológica dos grânulos revestidos

A Figura 5.11. mostra a superfície dos grânulos obtidos por estereoscópio, podemos visualizar que o polímero não apresentou uma aderência desejável nos grânulos, e isso pode ser causado pela geometria irregular dos grânulos no qual o revestimento não conseguiu aderir adequadamente.

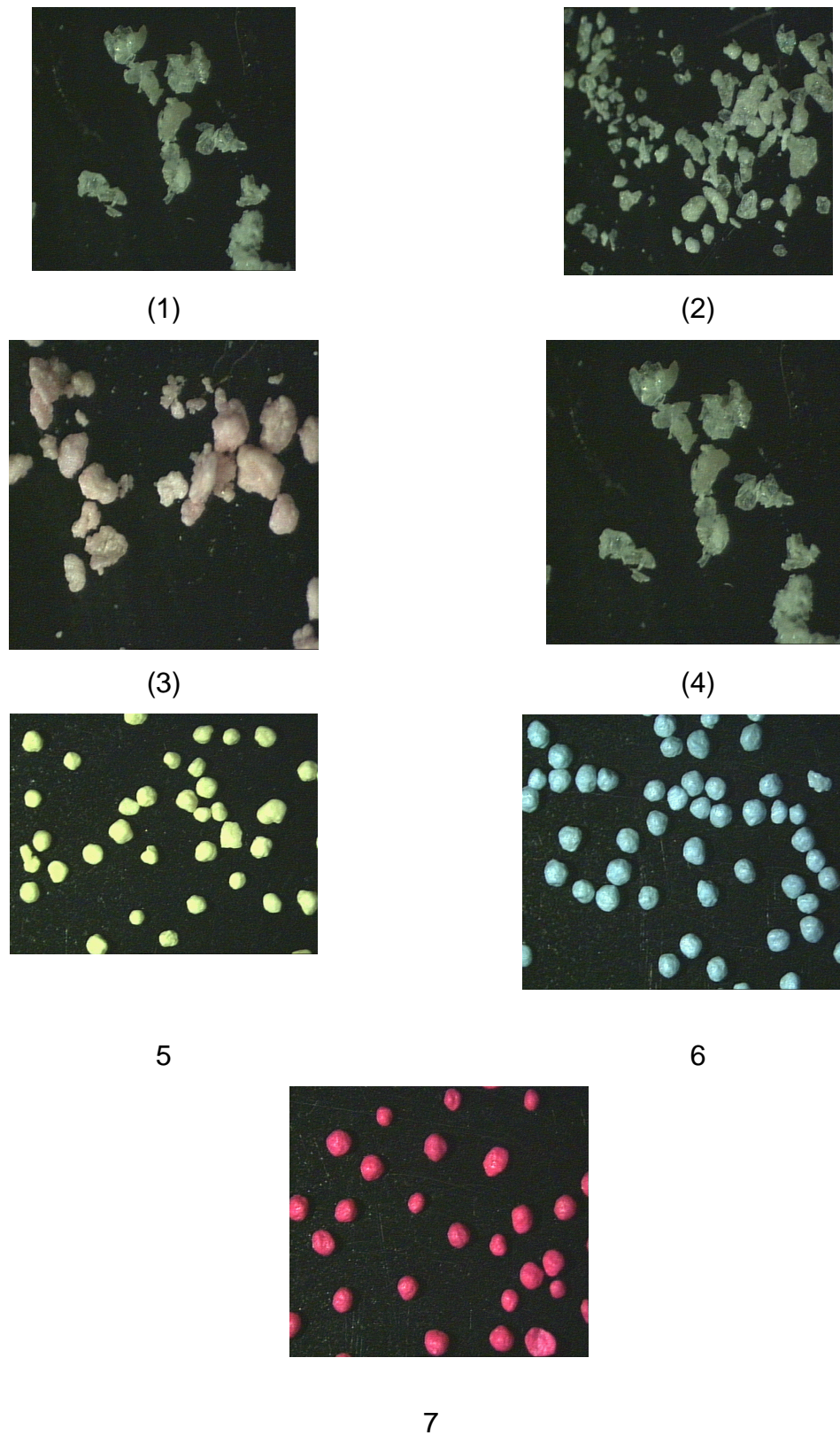


Figura 5.11. Fotografias dos grânulos revestidos obtidas por estereoscópio das formulações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

5.6. Ensaio de gastrorresistência

A figura 5.12. apresenta os perfis da liberação da ddl em relação ao tempo, mostrando que com os revestimentos testados, somente a formulação 7 apresentou a gastrorresistência desejada, já que na Farmacopéia preconiza que o revestimento gástrico deve liberar o fármaco em pH 6,8 após permanecer 2 horas, em pH ácido, sem liberação, como descrito no item 4.2.8.

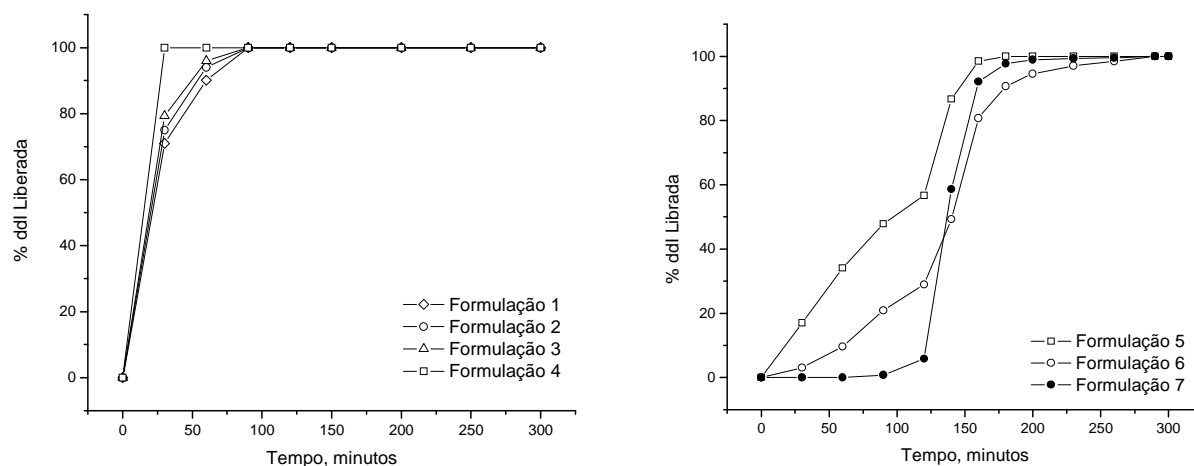


Figura 5.12. Perfis da liberação da ddl nas formulações testadas.

A diferença do perfil de liberação da ddl na Figura 5.12., mostra que a concentração de polímero de revestimento influencia na liberação da ddl. A Formulação 7, na qual foi utilizada 30% de polímero proporcionou o efeito de gastrorresistência desejado.

5.7. Validação da metodologia bioanalítica por CLAE

A validação da metodologia bioanalítica deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Com isso, deve apresentar seletividade, linearidade, precisão,

sensibilidade, limite de quantificação, faixa de concentração da curva de calibração e exatidão adequados à análise (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

5.7.1. Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). A Figura 5.13 mostra os cromatogramas do branco de plasma e de uma amostra de plasma contendo ddl e ACL.

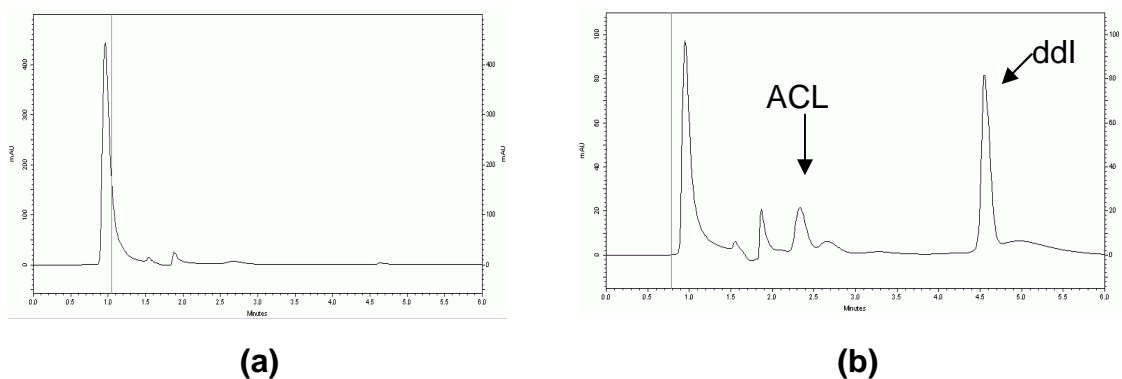


Figura 5.13. Cromatogramas obtidos pela análise de CLAE (a) branco de plasma; (b) amostra da curva de calibração contendo ddl e ACL (padrão interno).

5.7.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). A média das curvas de calibração obtidas na validação está apresentada na Figura 5.14. Na Tabela

5.8 encontram-se os resultados dos valores de intercepto, inclinação e coeficientes de correlação das curvas de calibração da validação.

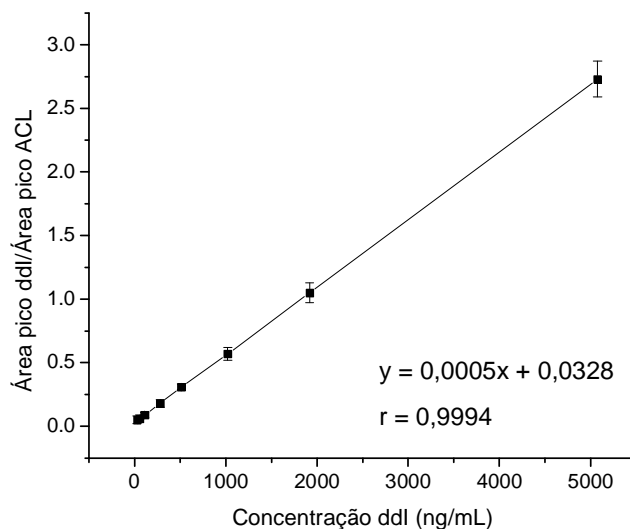


Figura 5.14. Média de seis curvas de calibração de ddl em plasma empregadas na validação da metodologia analítica por CLAE.

Tabela 5.8. Valores individuais de intercepto, inclinação e coeficiente de correlação das curvas de calibração de ddl obtidas na validação do método analítico.

Dia	Curva	Intercepto	Inclinação	Coeficiente de correlação
1	1	0,0162	0,0005	0,9972
	2	0,0302	0,0005	0,9981
	3	0,0058	0,0006	0,9964
2	1	0,0119	0,0005	0,9994
	2	0,0659	0,0005	0,9994
	3	0,0670	0,0006	0,9987
Média		0,0328	0,0005	0,9994
D. P.		0,0272	0,00005	
D.P.R.			9,43	

D.P.: Desvio padrão; D.P.R.: Desvio Padrão Relativo

Pode-se observa na Figura 5.14 e Tabela 5.8 que o fármaco mostrou resposta linear na faixa de concentração de 500 a 5000 ng/mL, com coeficientes de correlação maiores que 0,996, confirmando a linearidade do método utilizado.

5.7.3. Exatidão

A exatidão do método analítico demonstra a relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração nominal correspondente da amostra (ANVISA, 2003; FDA, 2001). Os valores de exatidão determinados para as amostras de CQ durante a validação, bem como para o limite inferior de quantificação (LIQ) encontram-se na Tabela 5.9, estando todos de acordo com os limites estabelecidos pelos *guidelines* utilizados.

Tabela 5.9. Valores de exatidão determinados para didanosina em plasma durante a validação do método analítico.

Concentração nominal (ng/ml)	Faixa de concentração determinada (ng/mL)	Média (ng/mL)	D.P.	Exatidão (%)
LIQ	21 – 30	27	1,41	84 - 120
75	65 - 80	85	3,76	86 - 106
2500	2381 - 2659	2582	78,25	95 - 106
4500	4125 - 4758	4659	247,01	91 – 105

N = 6, D.P.: Desvio padrão

5.7.4. Repetibilidade e precisão intermediária

A precisão de um método analítico expressa a reprodutibilidade das medidas através do desvio padrão e desvio padrão relativo. Na Tabela 5.10 e 5.11 mostram a repetibilidade intra e inter-dias, respectivamente.

Tabela 5.10. Valores de variação intra-dia das amostras de LIQ e de controle de qualidade de ddl em plasma de cães.

Dia	Concentração nominal (ng/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	D.P.	D.P.R. (%)
1	LQ	27	21	30	26	4,58	17,62
	75	85	85	80	83	2,88	3,46
	2500	2442	2537	2600	2526	79	3,14
	4500	4172	4334	4949	4485	409	9,13
2	LIQ	25	29	30	28	2,64	9,44
	75	89	82	75	82	7	8,53
	2500	2381	2959	2571	2637	294	11,17
	4500	4520	4425	4458	4467	48	1,07

Tabela 5.11. Valores de variação inter-dia das amostras de LIQ e de controle de qualidade de ddl em plasma de cães.

Concentração nominal (ng/mL)	Dia 1	Dia 2	Média	D.P.	D.P.R. (%)
LIQ	26	28	27	1,41	5,23
75	83	82	82,50	0,70	0,85
2500	2526	2637	2581	78,48	3,04
3500	4485	4467	4476	12,72	0,28

n = 3/dia/concentração

Pode-se observar nas Tabelas 5.10 e 5.11 que nenhum valor de DPR ultrapassou 15% para os CQ e 20% para o LIQ, estando de acordo com o critério de precisão estabelecido pela ANVISA (2003) e FDA (2001) para amostras de matriz biológica.

5.7.5. Limite de quantificação

O limite inferior de quantificação de uma curva padrão é a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão de 20% e exatidão de 80 a 100% (FDA, 2001). O método analítico proposto neste trabalho apresentou um limite de quantificação de 25 ng/mL, o qual foi determinado pela equação abaixo:

$$\text{LIQ} = \frac{\text{DP}_a * 100}{\text{IC}} \quad \text{Equação 5.1.}$$

onde, DP_a é o valor de desvio padrão do intercepto de pelo menos 3 curvas padrão construídas contendo concentrações da ddl próximas ao suposto limite de quantificação com o eixo y e IC é o valor médio de inclinação das curvas padrão (ANVISA, 2003).

Como todos os parâmetros encontraram-se dentro dos limites oficiais preconizados (FDA, 2001 e ANVISA, 2003), o método foi considerado validado para a quantificação de ddl em plasma de cão.

5.7.6. Avaliação da recuperação e estabilidade da didanosina

No estudo de estabilidade da ddl em amostras plasma processadas que permaneceram no carrossel por 24 horas, em temperatura ambiente, e as amostras que passaram por 3 ciclos de congelamento e descongelamento, não apresentaram uma redução significativa em relação ao tempo zero.

Tabela 5.12. Valores de variação da recuperação e estabilidade de ddl em plasma de cão, no estudo de 24 horas, em temperatura ambiente.

Concentração (ng/mL)	Tempo zero	Tempo 12 horas	Tempo 24 horas	Recuperação em %
25	25 ± 0,1	24 ± 0,3	24 ± 0,3	96%
4500	4459 ± 0,5	4450± 0,4	4400 ± 0,6	97%

Tabela 5.13. Valores de variação da recuperação e estabilidade de ddl em plasma de cão, no estudo de 3 ciclos de congelamento e descongelamento, sendo 12 horas cada ciclo.

Concentração (ng/mL)	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Recuperação em %
25	24 ± 0,4	24 ± 0,2	24 ± 0,4	96%
4500	4450 ± 10	4449± 5	4439 ± 10	98%

Nas amostras armazenadas por 30 dias, na temperatura de -20 °C apresentaram uma perda de 5% em relação ao dia zero, sendo que somente 95% da quantidade adicionada foi recuperada. Desse modo, pode-se comprovar que o ddl permaneceu com as concentrações inalteradas nas condições empregadas no estudo, sendo os resultados obtidos confiáveis.

Com os resultados acima podemos confirmar que a didanosina apresentou-se estável no plasma de cão.

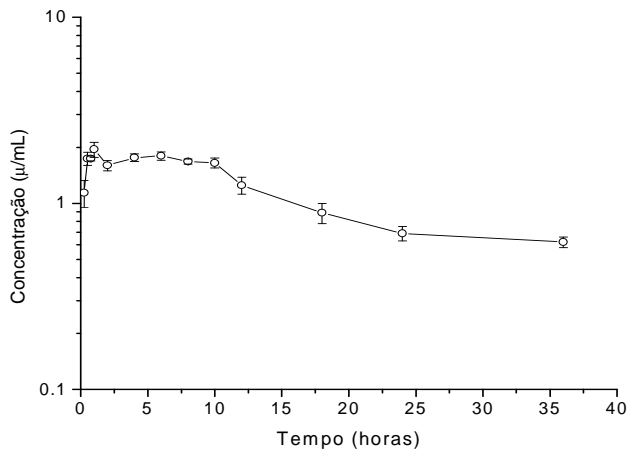
5.7.7. Perfis plasmáticos de ddl em cães

Os perfis plasmáticos obtidos em cães após a administração de ddl sob forma de comprimidos convencional, Videx EC[®] ou grânulos preparados neste trabalho encontram-se na Figura 5.15. Os parâmetros médios obtidos pela análise não-compartimental individual dos perfis em cada situação encontram-se apresentados na Tabela 5.12.

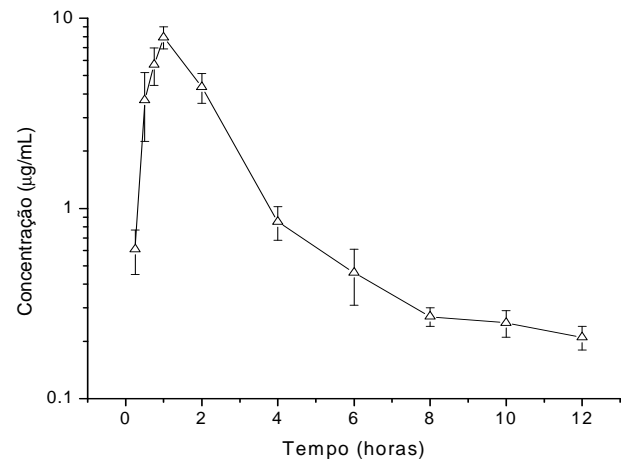
Pode-se observar que o perfil plasmático dos grânulos foi diferenciado, não apresentando pico de concentração como observando para a forma convencional ou o Videx ER[®], mas um platô em torno que se prolongou além todo tempo de coleta das amostras, que foi de 36 horas.

A análise estatística dos parâmetros $t_{1/2}$, $ASC_{0-\infty}$ e C_{max} e t_{max} evidenciaram diferença significativa entre as formulações avaliadas, sendo que essas diferenças foram estatisticamente significativas para os grânulos preparados neste trabalho, em comparação com Videx[®] EC ou forma convencional. Desse modo, a $ASC_{0-\infty}$ após administração dos grânulos foi significativamente maior ($59 \pm 11 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) do que após administração da forma convencional ($20 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) ou Videx[®] EC ($16 \pm 5 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). O tempo de meia-vida aumentou significativamente, de $5,4 \pm 2,4$ h após forma convencional ou $2,9 \pm 0,7$ h após Videx[®] EC, para $22,1 \pm 7,5$ h após administração dos grânulos, mostrando que para os grânulos a absorção ocorreu de modo prolongado, enquanto nas outras duas formulações a liberação/absorção foi imediata.

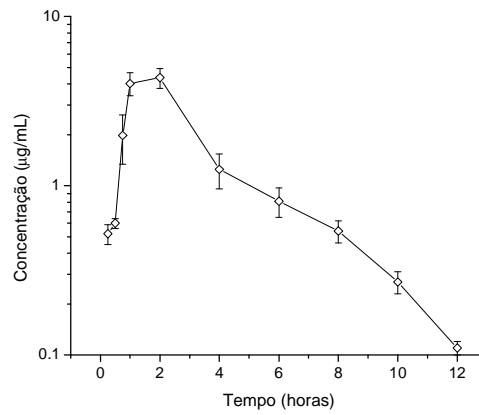
Os dados da Tabela 5.12 também mostram que as alterações observadas nos valores de C_{max} e t_{max} . Enquanto a forma convencional e o Videx[®] EC apresentam pico de concentração de $9,1 \pm 3,0$ e $4,5 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{mL}$, em $53,4 \pm 10,8$ e $93,6 \pm 31,8$ min, respectivamente, os grânulos apresentam platô de concentração plasmática de $2,21 \pm 0,47 \mu\text{g}/\text{mL}$ que se estendeu até pelo menos 36 horas após a administração da dose de 500 mg.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.15. Perfil de concentração plasmático médio de ddl após administração de 500 mg do fármaco sob a forma de (a) grânulos (n = 11); (b) Videx EC[®] (n = 12) e (c) forma convencional (n = 9).

Tabela 5.14. Parâmetros farmacocinéticos obtidos pela análise não-compartimental a partir dos resultados plasmáticos.

Parâmetros			
Farmacocinéticos	Convencional	Videx EC[®]	Grânulos
Tamanho amostral	9	12	11
ke (h ⁻¹)	0,159 ± 0,090	0,258 ± 0,080	0,034 ± 0,010
t _{1/2} (h)	5,4 ± 2,4 ^{***}	2,9 ± 0,7 ^{***}	22,1 ± 7,5 ^{***}
ASC _{0-t} (µg·h/mL)	18 ± 5 ^{***}	15 ± 5 ^{***}	39 ± 5 ^{***}
ASC _{extrap}	2 ± 1	1 ± 0	21 ± 10
ASC _{0-∞} (µg·h/mL)	20 ± 5	16 ± 5	59 ± 11
% de ASC extrapolada	9 ± 6	3 ± 1	33 ± 10
ASMC (µg·h ² /mL)	80 ± 28	60 ± 21	2035 ± 1040
MRT (h)	4,2 ± 1,6	3,8 ± 0,5	32,8 ± 9,9
CL/f (L/h)	27,0 ± 6,7	34,2 ± 9,4	16,4 ± 4,5
C _{max} (µg/mL)	9,1 ± 3,0 ^{***}	4,5 ± 1,2 ^{***}	2,2 ± 0,5 ^{***}
t _{max} (min)	53,4 ± 10,8 ^{***}	93,6 ± 31,8 ^{***}	-
ASC ₀₋₁₂ (µg·h/mL)	18 ± 5	15 ± 5	20 ± 2
ASC ₀₋₃₆ (µg·h/mL)	-	-	39 ± 5
F _{rel, (0-12h)} (%) [*]	referência	85	111
F _{rel, (0-36h grânulos)} (%) ^{**}	referência	-	217

^{*}F_{rel(0-12h)}: biodisponibilidade relativa do tempo 0 a 12 horas;

^{**}F_{rel (0-36h pellets)}: biodisponibilidade relativa do tempo 0 a 12 horas.

^{***}Resultados que apresentaram diferenças significativas

Assumindo-se a formulação convencional como referência, pode-se dizer a quantidade de ddl absorvida até 12 horas é igual para as três formulações, com F_{rel} de 1,11 para o grânulos e 0,85 para o Videx[®] EC. Como a partir de 12 horas o ddl continua sendo absorvido após a administração dos grânulos, por pelo menos 36 horas, a quantidade de fármaco absorvida em 36 horas é o dobro a partir dos grânulos do que em relação a forma convencional (F_{rel} 2,17), podendo-se dizer que a biodisponibilidade do fármaco a partir dos grânulos é o dobro da observada quando do uso da formulação distribuída pelo SUS.

O percentual de extrapolação da ASC indica se o estudo foi conduzido por tempo suficiente para caracterizar a fase de eliminação do fármaco. Valores abaixo de 20% são considerados adequados após a administração oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação imediata. Como o ddl nos grânulos apresentou perfil de liberação controlada, pode-se observar que a área extrapolada foi de $33 \pm 10\%$ (Tabela 5.14). Pela observação do gráfico da Figura 5.15(a), pode-se observar que a fase de eliminação do fármaco está apenas iniciando em 36 horas, o que levou à alteração significativa no tempo de meia-vida após uso dos grânulos. Se os grânulos estivessem alterando o processo de eliminação do fármaco, e não o processo de absorção, o *clearance* deveria ser alterado. Na Tabela 5.14 estão mostrados os valores de *clearance* em relação à biodisponibilidade absoluta (CL/F), uma vez que para a determinação dessa haveria necessidade de ter-se um grupo de animais com administração intravenosa do fármaco. Se, no entanto, se assumir que a biodisponibilidade da forma convencional é igual a 1 e as biodisponibilidades relativas (F_{rel}) das demais formulações referem-se às suas disponibilidades absolutas, os valores de CL mostrados na referida tabela se equivalem, comprovando que os grânulos estão interferindo apenas com o processo de absorção da ddl.

A partir dos perfis plasmáticos e dos parâmetros farmacocinéticos avaliados neste estudo, verifica-se que obtivemos êxito na produção da formulação em relação à liberação controlada. Com isso, a formulação desenvolvida trará vantagens aos pacientes por permitir, provavelmente, o aumento do intervalo entre doses, facilitar a administração em crianças e pessoas com dificuldade de deglutição e proporcionar melhor adesão do paciente ao tratamento pela comodidade terapêutica. Além disso, a formulação desenvolvida não causará os efeitos colaterais relacionados ao hidróxido de magnésio e alumínio, observados com a formulação convencional.

A liberação sustentada ocorre pela adesão da quitosana à membrana intestinal, através das ligações entre as cargas positivas de quitosana e as cargas negativas de ácido siálico, presentes no intestino, que proporcionaram melhor absorção através do aumento da permeação

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

6.0. Conclusões

Neste trabalho, foram reproduzidas e aprimoradas as condições experimentais para a produção de micropartículas de quitosana, reticuladas com TPP, aumentando a eficiência de encapsulação da ddl.

No estudo da influência da massa molar da quitosana e do seu grau desacetilação, na reticulação com TPP, obteve-se uma generalização de razão de carga molar ideal para a preparação de partículas nanométricas e micrométricas.

O potencial zeta, das partículas de quitosana isentas de fármaco, foi positivo, com pouca variação nas várias preparações e baixo desvio padrão.

O revestimento entérico com o polímero Kollicoat[®] MAE 100P foi eficaz em estudos *in vitro*, como preconizado pela farmacopéia.

A metodologia analítica por CLAE acoplada a extração em fase sólida desenvolvida mostrou-se adequada para a quantificação do ddl e foi validada para determinação simultânea de ddl e ACL (padrão interno) em amostras de plasma de cão.

Na administração oral, tanto da forma convencional quanto a de Videx[®] EC, não apresentaram diferenças significativas nas análises estatísticas dos parâmetros farmacocinéticos estudados.

A formulação desenvolvida neste trabalho é estatisticamente diferente das demais, por apresentar um platô de concentração plasmática que se estendeu por pelo menos 36 horas após a administração oral. Este comportamento, levou a duplicação da ddl absorvida em relação á administração da formulação convencional, mostrando que os grânulos apresentaram liberação controlada do fármaco.

Os grânulos de quitosana contendo micropartículas incorporando ddl, desenvolvidos neste trabalho, apresentam-se promissores para a terapia da AIDS, e para a encapsulação de outros tipos de fármacos administrados por via oral.

CAPÍTULO 7

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7.0. Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar o estudo de farmacocinética em humanos, para caracterizar o perfil plasmático e a alteração do intervalo de doses em relação às formulações comerciais.
- Estudar possíveis modificações na modelagem matemática dos modelos comportamentais usuais, de modo a ajustar também os dados de formulações de liberação controlada.
- Utilizar a formulação proposta para outros fármacos que degradam pela ação do suco gástrico ou que necessitem melhorar sua biodisponibilidade.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.0. Referências Bibliográficas

1. ¹BODMEIER, R., CHEN, H. & PAERATAKUL, O. A novel approach to the delivery of microparticles or nanoparticles. *Pharmaceutical research*. v.6, p.413-417, 1989.
2. ¹DAMLE, B., YAN, J., BEHR, D., MARA, E., NICHOLA, P., KAUL, S., & KNUPP, C. Effect of food on the oral bioavailability of didanosine from encapsulated enteric-coated beads. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, p.419-427. 2002.
3. ²BODMEIER, R., OH, K. H. & PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drugs-containing chitosan-beads. *Drug delivery industry pharmacy*. v.15, p.1475-1494, 1989.
4. ²DAMLE, B., KAUL, S., & KNUPP, C. Bioequivalence of two formulations of didanosine, encapsulated enteric-coated beads and buffered tablet, in healthy volunteers and HIV-infected subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.42, p.791-797. 2002.

5. ³DAMLE, B., ULLAH, I., DOLL, W., WILEY, G. & KNUPP, C. Pharmacokinetics and gamma scintigraphy evaluation of two enteric coated formulations of didanosine in healthy volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, v.54, p.255-261. 2002.
6. ADAMSON, A. W. *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th Edition, John Wiley & Sons, 1990.
7. AGNIHOTRI, S. A., NADAGOUDA, N. M., & AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal Controlled Release*. v.100, p.5-28, 2004.
8. ALLINGER, N. L., CAVA, M. P., JONGH, D. C., LEBEL, C. R., STEVES, C. L. *Química Orgânica*. Ed. Guanabara dois, Rio de Janeiro, p.191, 1978.
9. ALSARRA, I. A., BETIGERI, S., ZHANG, H., EVAN, B. A. NEAU, S. H. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*. v. 23, p. 3637-3644, 2002.
10. AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. São Paulo. 2^o edição, Ed. Atmed, p.444-452, 2005.
11. AULTON, M. E., BANKS, M. Fluidized Bed Granulation – Factors influencing the quality of the product. *Pharmaceutical Technology*, v.2, p.24, 1981.
12. BABU, S.P., SHAH, B. TALWALKER, A. Fluidization correlations for coal gasification materials – minimum fluidization velocity and fluidized bed expansion ratio. *AIChE Symposium Series*, 74 (176), p. 176-186, 1978.
13. BALINT, G. A. Antiretroviral therapeutics possibilities for human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacology & therapeutics*, v.89, p.17-27, 2001.
14. BANDO, H. & MACGINITY, J.W. Physicochemical properties of enteric films prepared from aqueous dispersions and organic solutions. *International Journal of Pharmaceutics*. v.313, p.43-48, 2006.
15. BEPPU, M. *Estudo da calcificação “in vitro” da quitosana*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999, Tese (Doutorado).

16. CAHOURS, X., DESSANS, H., MORIN, P., DREUX, M. & AGROFOGLIO, L. Determination at ppb level of an anti-human immunodeficiency virus nucleoside drug by capillary electrophoresis-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. v.895, p. 101-109, 2000.
17. CLARK, T. N., WHITE, C. A. & BARTLETT, M. G. Determination of didanosine in maternal plasma, amniotic fluid, fetal and placental tissues by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical chromatography*. v.20, p.605-611, 2006.
18. COPPER, D. A. Update on didanosine. *Journal of international association of physicians in AIDS care*. v.1, p.15-25, 2002.
19. DERENDORF, H. & MEIBOHM, B. Modeling of Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) Relationships: Concepts and perspectives. *Pharmaceutical research*. v.16, n. 2, p.176-185, 1999.
20. DESORMEAUX, A., HARVIE, P., PERRON, S., MAKABI-PANZU, B., BEAUCHAMP, D., TREMBLAY, M., & BERGERON, M. G. Antiviral efficacy, intracellular and pharmacokinetics of free and liposome-encapsulated 2', 3'-dideoxyinosine. *AIDS*. v.8, p.1545-1553, 1994.
21. DEWETTINCK, K., HUYGHEBAERT, A. Fluidized bed coating in food technology. *Trends in food Science & Technology*, v.10, p.4267-4274, 1995.
22. DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. Ed. Academic Press. p. 150, 1997.
23. FREIRE, J. T. & OLIVEIRA, W. P. *Tópicos especiais em secagem*. São Carlos. v.1, p.255-325, 1992.
24. GELDART, D. *Gas fluidization technology*. Jhon Wiley & Sons, Inc. New York, 1986.
25. GORE, A.Y. *Granulation Technology for Bioproducts*. CRC Press p.29-70, 1990
26. GRACE, J. R. *Hydrodynamics of gas fluidized bed, fluidized bed boilers: design and application*. Ed. Pergamon Press. p.13-90, 1984.
27. GRACE, J.R. *Handbook of multiple systems*. Ed. Hetsromi, G., Hemisphere publishing corporation, New York, 1982.

28. HARVIE, P., DESORMEAUX, A., GAGNE, N., TREMBLAY, M., POULIN, L., BEAUCHAMP, D. & BERGERON, M. G. Lymphoid tissues targeting of liposome-encapsulated 2', 3'- dideoxyinosine. *AIDS*. v.9, p.701-707, 1995.
29. HEMATI, M., CHERIF, R. & PONT, V. Fluidized bed coating and granulation: influence of process-related variables and physicochemical properties on the growth kinetics. *Power Technology*. v.130, p.18-34, 2003.
30. <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISD3352823ITEMID80FBE363C51842AAA02B89ED8003A071PTBRIE.htm>. Acessado em 14ago2006.
31. http://www.farmacopeia.org.br/downloads/pdf/5ed/didanosina_230.pdf?PHPS ESSID=6c602c7c341653032484b32bc42764da. Acessado em 15ago2006 (farmacopéia, 4ª edição, 2003)
32. http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2003/03MAR_PI/Videx_PI.pdf. Acessado em 12/09/2006
33. <http://www.pharma-solutions.basf.com>. Acessado em 10ago2006.
34. JANES, K. A., CALVO, P. & ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.47, p.83-97, 2001.
35. KLEINBACH, E.; RIEDE, T. Coating of solids. *Chemical Engineering and Processing*, v.34, p.329-337, 1995.
36. KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v.46, p.1-27, 2000.
37. KUNCHES, L. M., REINHALTER, N. E., MARQUIS, A., EUGENIE, C., COAKLEY, C., MORRIS, A. B. & MAZZULLO, J. M. Tolerability of enteric-coated didanosine capsules compared with didanosine tablets in adults with HIV infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. v.28, p.150-153, 2001.
38. KUNII, D., LEVENSPIEL, O. Fluidization Engeneering. Elsevier. United States of America, 1969.
39. LAM, T. D., HOANG, V. D., LIEN, N. L., THINK, N. N., DIEN, G. P. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles used as drug carrier. *Journal of Chemistry*. v.44(1), p. 105-109, 2006.

40. LECOMTE, F., SIEPMANN, J., WALTHER, M., MACRAE, R. J., BODMEIER, R. Polymer blends used for the aqueous coating of solid dosage forms: importance of the type of plasticizer. *Journal of Controlled Release*. v.99, p.1-13, 2004.
41. LEE, S. T., MI, F. L., SHEN, Y.J. & SHYU, S. S. *Polymer*, 42, p.1879, 2001.
42. LUCAS, A., ARNALDOS, J., CASAL, J., PUIGJANER, L. High temperature incipient fluidization in mono and polydisperse systems, *Chemical Engineers Communication*. v.121-132, 1986.
43. Mc EVOY GR. *AHFS Drug Information*. American Society of Health-System Pharmacists: Bethesda, MD, p.642–653, 2002.
44. McCABE, W. L., SMITH, J. C. Unit operations of chemical engineering, McGraw-Hill, Inc., New York, 1967.
45. MORRISON, R., BOYD, R.N., SILVA, M.A. Química Orgânica. Ed. Fundação calouste gulbenkian, p. 824-835, 1961.
46. NASSAR, M. N. Didanosine. Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. New York: Academic Press, v.22, p.185-227, 1993.
47. NEUMANN, A. W. & GOOD, R. J. Surface and Colloid Science. v.II, 1979.
48. OKIYAMA, M., KAWASHIMA, H. & FUKUNISHI, S. Pharmacological and clinical properties of didanosine (VIDEX), a nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Folia Pharmacologia Japonica*. v.120, p.2115-2112, 2002.
49. PEÇANHA, P. P., ANTUNES, A. C. A. & TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova*, v.25, n. 6B, p.1108-1116, 2002.
50. PEREIRA, D. G. Importância do Metabolismo no Planejamento de Fármacos. *Química Nova*. v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.
51. PÉREZ-URIZAR, J., SOTO-GRANADOS, V., FLORES-MURRIETA, F. J. & CASTAÑELA-HÉRNÁNDEZ. Pharmacokinetic-pharmacodynamic Modeling: Why?. *Archives of Medical Research*, v.31, p.539-545, 2000.
52. RÄDLER, J. O., KOLTOVER, I., JAMIELSON, A., SAFINYA, C. R. Structure and interfacial aspects of self-assembled cationic lipid-DNA gene carrier complexes. *Langmuir* . v.14, p.151-164, 2000.

53. RAYMOND, MORIN, F.G., MARCHESSAULT, R.H. Degree of desacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research*, v.246, p.331-336, 1993.
54. REMUNAN-LOPEZ, C., LORENZO-LAMOSA, M. L., VILA-JATO, J. L. & ALONSO, M. J. Development of new chitosan-cellulose multicore microparticle for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.45, p.49-56, 1998.
55. ROBERTS, G. A. Chitin chemistry. The Macmillian Press Ltda., London, 1992.
56. SANTOS, J. E., SOARES, J. P., DOCKAL, E. R., FILHO, S. P. C. & CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.13, n.4, p.242-249. 2003.
57. SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. v.26 (5), p.726-737, 2003.
58. SCHARGEL, L.; YU, A. B. C. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 4. ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1999.
59. SHELUKAR, S., HO, J., ROLAND, E., YEH, N., QUIRAM, D., NOLE, A., KATDARE, A. REYNOLDS, S. Identification and characterization of factors controlling tablet coating uniformity in Wurster coating process. *Power technology*, v.110, p.29-36, 2000.
60. SHU, X. Z. & ZHU, K. J. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *Internacional journal of pharmaceutics*, v.201, p.51-58, 2000.
61. SILVA, C. F. *Micropartículas de quitosana com didanosina e sua formulação em grânulos mucoadesivos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006, Tese (Doutorado).

- 62.** SILVA, C.F., SANTANA, M.H.A.; MARTINS, F.;. Grânulos mucoadesivos contendo nano e/ou microesferas de quitosana e processo de obtenção de grânulos mucoadesivos. Protocolo número 018070025829, 2007, (Patente).
- 63.** SILVA, O. S. Desenvolvimento do processo de recobrimento e secagem de microgrânulos em leite fluidizado. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003, Tese (Mestrado).
- 64.** SINHA, V. R., SINGLA, S. W., WADHAWAN, R. K., KUMRIA, R., BANSAL, K. & DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. v.274, p.1-33, 2004.
- 65.** SOUZA, M. V. N. & ALMEIDA, M. V. Drogas anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. *Química Nova*, v.26, n.3, p.366-372, 2003.
- 66.** TARANTO, O. P. *Monitoramento de regimes e recobrimento de partículas em leitos de jorro bidimensionais*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996, Tese (Doutorado).
- 67.** WEN, C. Y., YU, Y.H. Mechanics of fluidization. Chemical Engineering Progress Symposium Series, 1966.