

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DO FÁRMACO  
DICLOFENACO DE SÓDIO A PARTIR DE MICROESFERAS DE  
QUITOSANA RETICULADAS

Dissertação submetida a Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do  
grau de mestre em química

Vanessa Lima Gonçalves

Florianópolis – SC

Novembro-1999

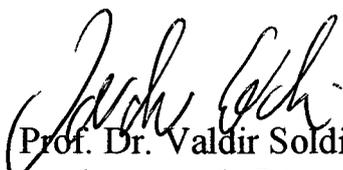
**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DO FÁRMACO  
DICLOFENACO DE SÓDIO A PARTIR DE MICROESFERAS DE  
QUITOSANA RETICULADAS**

**VANESSA LIMA GONÇALVES**

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



Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira  
(orientador)



Prof. Dr. Valdir Soldi  
(Coordenador do curso de Pós - Graduação)

**BANCA EXAMINADORA**



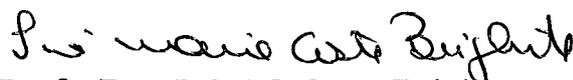
Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira



Profa. Dra. Rozângela Curi Pedrosa



Prof. Dr. Carlos Cesar Stadler



Profa. Dra. Inês M. Costa Brighente

*Todo este universo é um livro em que cada um de nós é uma frase. Nenhum de nós, por si mesmo, faz mais do que um pequeno sentido, ou uma parte do sentido, só no conjunto do que se diz é que se percebe o que cada um realmente quer dizer.*

*Fernando Pessoa*

*Dedico este trabalho à minha  
avó Olinda, por ser a minha  
eterna companheira...*

## AGRADECIMENTOS

Meu carinho e minha gratidão às seguintes pessoas:

Aos meus avós, Geraldo e Olinda, que sempre foram meu porto seguro e encheram minha vida de amor e fé. Pela dedicação e amor com que me ensinaram a ser quem sou, não me deixando desanimar nos momentos difíceis. Hoje, não posso agradecer pessoalmente, mas digo para onde quer que estejam, MUITO OBRIGADA.

À minha irmã, por ser sempre companheira nos bons e maus momentos. Meu eterno amor à você e Joselito.

À minha família, pelo amor, união e respeito que sempre tivemos uns pelos outros.

Em especial ao meu tio, Sérgio A. Lima, pelo incansável apoio e incentivo, pela compreensão, preocupação e valorização pelo que faço.

À Carla, pela amizade e atenção dispensada durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Carlos C. Stadler, pela sua iniciativa e desejo de crescimento.

Aos amigos especiais do grupo QUITTECH, pela fidelidade e sobretudo pela amizade.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Mauro C. M. Laranjeiras e Prof<sup>o</sup> Dr. Valfredo T. Fávere, pela oportunidade de realização deste trabalho junto ao grupo QUITTECH, meus sinceros agradecimentos.

Aos novos amigos Maria da Graça e Jadir pelo apoio quando precisei da Secretaria de Pós-Graduação.

Aos professores da banca por aceitarem meu convite e por terem valorizado meu trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Federal de Santa Catarina.

À Capes e SETI pelo suporte financeiro, possibilitando novas oportunidades sempre.

A Deus.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Processo Inflamatório .....	1
1.2 Antiinflamatórios Não Esteróides .....	2
1.3 Artrite reumatóide.....	2
1.3.1 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	4
1.3.2 Tratamento.....	4
1.4 Diclofenaco de Sódio.....	5
1.5 Quitina e Quitosana .....	7
1.6 Agentes Reticulantes.....	9
1.6.1 Glutaraldeído .....	9
1.6.2 Epiclorigrina.....	10
1.7 Sistemas de Liberação de Fármacos.....	11
1.7.1 Liberação e biodisponibilidade de fármacos.....	11

1.7.2 Dissolução de fármacos no Trato Gastrointestinal.....	13
1.7.3 Principais sistemas de liberação de fármacos .....	14
1.7.4 Mecanismos de liberação de fármacos .....	18
1.8 Sistema Gastrointestinal.....	19
1.8.1 Condições fisiológicas para a liberação controlada .....	20
1.8.2.1 Variação do pH no TGI.....	22
1.8.2.2 Esvaziamento gástrico.....	22
1.8.2.3 Atividade enzimática.....	24
1.9 Liberação Controlada de Fármacos Microencapsulados.....	25
1.9.1 Métodos de preparação de microcápsulas.....	26
1.9.2 Aplicações .....	27
1.10 Liberação Controlada de Fármacos a partir de Sistemas de Aprisionamento Diversos .....	31
1.11 Liberação Controlada de Fármacos a partir de Matriz de Quitosana.....	33
1.12 Liberação Controlada de Diclofenaco de Sódio .....	34
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
2.1 Objetivo geral .....	36
2.2 Objetivos Específicos .....	36
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 Materiais e Reagentes .....	37
3.1.1 Equipamentos .....	37

3.1.2 Reagentes.....	38
3.1.3 Soluções.....	38
Solução de Quitosana.....	38
Solução de liberação.....	38
Solução de Impregnação.....	39
3.2 MÉTODOS.....	39
3.2.1 Preparação e purificação da quitosana.....	39
3.2.2 Determinação do grau de desacetilação.....	39
3.2.3 Preparação das microesferas .....	40
Microesferas de Quitosana reticuladas com epícloridrina.....	41
Microesferas de Quitosana reticuladas com glutaraldeído .....	41
3.2.4 Microencapsulação .....	42
3.2.5 Impregnação .....	43
3.2.5.1 Processo de impregnação do diclofenaco de sódio.....	43
3.2.5.2 Determinação da massa de DS impregnada .....	43
3.2.6 Liberação in vitro de DS .....	44
Controle da liberação isolada de DS.....	44
Controle da liberação seqüencial de DS.....	44
3.2.6.2 Curvas de Calibração.....	45
3.2.6.3 Cálculo da porcentagem de DS liberada.....	45
3.2.7 Liberação seqüencial.....	46

3.2.8 Determinação do grau de intumescimento (GI).....	46
3.2.9 Determinação do grau de reticulação (GR).....	47
3.2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4.1 FORMAÇÃO DAS MICROESFERAS .....	48
4.2 Análise da Morfologia das Esferas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	50
4.3 Grau de Reticulação.....	54
4.4 Grau de Intumescimento.....	57
4.5 Determinação da Massa de DS Impregnado nas Microesferas .....	60
4.6 Liberação In Vitro do Diclofenaco de Sódio .....	61
4.6.1 Controle da liberação isolada de DS .....	62
4.6.2 Controle da liberação seqüencial de DS .....	65
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do diclofenaco de sódio.....	05
Figura 2.	Estrutura química da quitosana.....	07
Figura 3.	Estrutura química do glutaraldeído.....	10
Figura 4.	Estrutura química da epicloridrina.....	11
Figura 5.	Etapas envolvidas na liberação do fármaco a partir da fórmula farmacêutica.....	13
Figura 6.	Anatomia do Trato Gastrointestinal.....	21
Figura 7.	Resumo da atividade gastrointestinal envolvendo mobilidade, secreção, digestão e absorção.....	25
Figura 8.	MEV de microesfera reticulada com epicloridrina, sem DS.....	50
Figura 9.	MEV de microesfera MRE impregnada com DS.....	51
Figura 10.	MEV de microesfera porosa obtida a partir do desprendimento de hidrogênio durante a reação do pó de alumínio com o NaOH e posteriormente reticulada com glutaraldeído.....	52
Figura 11.	MEV de microesfera porosa MRG impregnada com DS.....	52
Figura 12.	MEV de microcápsula porosa de quitosana sem reticulação.....	54
Figura 13.	MEV de microesfera formada após reticulação com glutaraldeído.....	55
Figura 14.	MEV de microesfera reticulada com epicloridrina.....	55
Figura 15.	Representação da reticulação da quitosana com glutaraldeído....	56
Figura 16.	Representação da reticulação da quitosana com epicloridrina....	57
Figura 17.	MEV da microesfera MRE após 2 horas em pH 1.2.....	68
Figura 18.	MEV da microesfera MRE após 4 horas em pH 6.8.....	69

Figura 19.	MEV da microesfera MRE após 6 horas em pH 9.0.....	69
Figura 20.	MEV da microesfera MRG após 2 horas em pH 1.2 .....	70
Figura 21.	MEV da microesfera MRG após 4 horas em pH 6.8.....	71
Figura 22.	MEV da microesfera MRG após 6 horas em pH 9.0.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Grau de intumescimento das microesferas MRE e MPG com variação do pH.....	58
Tabela 2.	Valores da porcentagem de liberação isolada de DS das microesferas MRG.....	63
Tabela 3.	Valores da porcentagem de liberação isolada de DS das microesferas MRE.....	64
Tabela 4.	Valores da porcentagem de liberação seqüencial de DS das microesferas MRG.....	66
Tabela 5.	Valores da porcentagem de liberação seqüencial de DS das microesferas MRE.....	67

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Grau de intumescimento das MRE em diferentes valores de pH.....	59
Gráfico 2. Grau de intumescimento das MRG em diferentes valores de pH.....	59
Gráfico 3. Liberação isolada de DS das MRG.....	62
Gráfico 4. Liberação isolada de DS das MRE.....	64
Gráfico 5. Liberação seqüencial de DS das MRG.....	66
Gráfico 6. Liberação seqüencial de DS das MRE.....	67
Gráfico 7. Análise por microsonda de energia dispersiva de raio-X, presença significativa de cloro e sódio nas microesferas MRG.....	72

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>AINES</b>	<b>Antiinflamatório Não Esteróide</b>
<b>AR</b>	<b>Artrite Reumatóide</b>
<b>PCR</b>	<b>Proteína C Reativa</b>
<b>DS</b>	<b>Diclofenaco de Sódio</b>
<b>TGI</b>	<b>Trato Gastrointestinal</b>
<b>TDDs</b>	<b>Sistema Transdérmico</b>
<b>CPK</b>	<b>Enzima Creatinina Fosfoquinase</b>
<b>PVA</b>	<b>Álcool Polivinílico</b>
<b>HLB</b>	<b>Balanço Hidrofílico/ Lipofílico</b>
<b>QT</b>	<b>Quitina</b>
<b>QTS</b>	<b>Quitosana</b>
<b>MRE</b>	<b>Microesfera Reticulada com Epicloridrina</b>
<b>MRG</b>	<b>Microesfera Reticulada com Glutaraldeído</b>
<b>MEV</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura</b>
<b>UV</b>	<b>Ultra Violeta</b>

## RESUMO

Neste trabalho foi investigada a preparação de microesferas de quitosana, utilizadas como suporte para a liberação de diclofenaco de sódio (DS). As microesferas foram preparadas pelo método de separação de fases, via coacervação simples. Dois tipos de microesferas foram obtidas; microesferas reticuladas com epícloridrina (MRE) e microesferas reticuladas com glutaraldeído (MRG). Para a formação das microesferas MRG foi adicionado pó de alumínio como artifício para aumentar a porosidade. O DS foi impregnado em ambas as microesferas e a massa foi determinada por espectrofotometria UV.

As variáveis estudadas foram a massa de DS impregnada nas microesferas MRE e MRG, onde foi observado que as microesferas MRG devido a sua maior porosidade impregnam duas vezes mais que as MRE. O grau de reticulação e o grau de intumescimento também foram analisados e foi verificado que as microesferas MRE possuem menor grau de reticulação porém apresentam maior grau de intumescimento enquanto que para as microesferas MRG, o grau de reticulação é maior e o grau de intumescimento menor. Ambas as microesferas intumescem melhor em pH 1,2, onde os grupos amino da quitosana estão protonados. Os valores de pH das soluções utilizadas nas cinéticas de liberação de DS foram 1,2, 6,8 e 9,0, que simulam as condições fisiológicas. Apesar do maior intumescimento acontecer em pH ácido, a liberação do DS começa a partir do pH 6,8, devido a insolubilidade do fármaco em meio ácido. Cinéticas de liberação isolada e liberação seqüencial foram analisadas. Os valores de liberação seqüencial obtidos após 12 horas para MRE e MRG foram 38,7% e 20,5%, respectivamente

A microscopia eletrônica de varredura comprovou a impregnação do DS, a reticulação das microesferas com os agentes reticulantes.

## ABSTRACT

Chitosan microspheres were prepared by the simple coacervation method and crosslinked using epichlorohydrin and glutaraldehyde as crosslinking agents for the controlled-release of the diclofenac sodium. The diclofenac sodium was incorporated into microspheres by impregnation technique. The mass of diclofenac sodium impregnated was determined by spectrophotometry UV. The studies of degree of crosslinking and degree of swelling showed epichlorohydrin crosslinked microspheres (MRE) with a smaller degree of crosslinking and a larger degree of swelling while glutaraldehyde crosslinked microspheres (MRG) with a larger degree of crosslinking and a smaller degree of swelling.

Both microspheres swelled better at pH 1.2 where the groups amino of chitosan are protonated. The separate and sequential releases studies were performed at pH 1.2, 6.8 and 9.0, simulating the gastrointestinal tract conditions. The values of sequential release of diclofenac sodium for microspheres MRE and MRG, after 12 hours were 38.7% and 20.5%, respectively. The release was higher with lesser crosslinking whereas the release decrease with an increase in the degree of crosslinking.

The scanning electronic microscopy confirmed the impregnation of the diclofenac sodium and showed that the drug was diffused in the microspheres.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. PROCESSO INFLAMATÓRIO

Ocorre inflamação quando células imunologicamente competentes são ativadas em resposta a organismos estranhos ou proteínas antigênicas. Esta resposta pode ter sobre o hospedeiro um efeito benéfico (como se observa quando ele faz com que organismos invasores sejam fagocitados ou neutralizados) ou maléfico (como se verifica no caso das artrites, quando ele leva à destruição óssea e da cartilagem e à conseqüente limitação da função articular).<sup>1</sup>

A resposta inflamatória é usualmente causada por traumatismo ou por antígenos (virais, bacterianos, protozoários ou fúngicos). A lesão celular causada pela inflamação envolve as membranas celulares, fazendo com que os leucócitos liberem enzimas lisossômicas e o ácido araquidônico é então liberado a partir de compostos precursores e vários eicosanóides são sintetizados.<sup>1</sup>

A estimulação das membranas dos neutrófilos produz radicais livres derivados do oxigênio. O ânion superóxido é formado pela redução do oxigênio molecular, podendo estimular a produção de outras moléculas reativas, tais como o peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxílicos. A interação destas substâncias como o ácido araquidônico resulta na formação de substâncias quimiotáticas, dessa maneira, perpetuando o processo inflamatório.<sup>1</sup>

## 1.2. ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES

Os agentes utilizados no tratamento das doenças reumáticas têm em comum a capacidade de suprimir os sinais e os sintomas da inflamação. Algumas dessas drogas também exercem efeitos analgésicos, mas são suas propriedades antiinflamatórias que as tornam úteis para o tratamento de doenças em que a dor se relaciona à intensidade do processo inflamatório .<sup>1</sup>

Drogas como a aspirina, fenoprofen, ibuprofeno, indometacina, diclofenaco e outras são exemplos de antiinflamatórios não estereóides (AINES) que possuem a capacidade de bloquear a atividade da enzima ciclooxigenase e conseqüentemente a produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanes. Essas drogas estão todas associadas com um amplo espectro de efeitos colaterais. Casos como irritação gástrica, disfunção plaquetária e acentuação de rinites alérgicas e asma são relacionados com a inibição da enzima ciclooxigenase, enquanto que vários outros, como erupção, anormalidades da função hepática podem não ser .<sup>2,3</sup>

## 1.3. ARTRITE REUMATÓIDE

A prevalência da artrite reumatóide (AR) é aproximadamente 1% da população; mulheres são afetadas cerca de três vezes mais que os homens. Esta prevalência aumenta com a idade e afeta todas as raças. Tem sido sugerido também, que a artrite reumatóide seria uma manifestação de uma resposta a um agente infeccioso em um hospedeiro geneticamente suscetível.<sup>2</sup>

Apesar de existir uma variedade de manifestações sistêmicas, o aspecto característico da artrite é a inflamação sinovial persistente, geralmente envolvendo articulações periféricas em distribuição simétrica.

A potencialidade da inflamação sinovial causa destruição da cartilagem e erosão óssea e conseqüentes deformações articulares é a marca registrada desta doença. Apesar de sua potencialidade destrutiva, o progresso da AR pode ser variável.<sup>2</sup>

Caracteristicamente, a artrite reumatóide é uma poliartrite crônica. Em aproximadamente 2/3 dos pacientes, ela começa com fadiga, anorexia e fraqueza generalizada até que o aparecimento da sinovite se torne evidente. Estes sintomas podem persistir por semanas ou meses. Sintomas específicos usualmente aparecem gradualmente em várias articulações, especialmente as das mãos, pulsos, joelhos e pés; os quais tornam-se afetados em simetria. Em aproximadamente 10% dos indivíduos, o ataque é mais agudo com um rápido desenvolvimento da poliartrite, geralmente acompanhada por sintomas como febre, linfadenopatia e esplenomegalia. Em cerca de 1/3 dos pacientes, sintomas podem inicialmente ser limitado para uma ou poucas articulações.

Dor, inchamento e sensibilidade podem inicialmente ser pouco localizados nas articulações. Dor nas articulações afetadas, agravada por movimento é a manifestação mais comum da artrite reumatóide estabelecida.<sup>2</sup>

Rigidez matinal com duração superior a uma hora é um aspecto quase invariável de artrite inflamatória e serve para distingui-la de várias outras doenças articulares não inflamatórias. Dor originada predominantemente da cápsula articular, a qual é abundantemente suprida de receptores para dor e marcadamente sensível ao estiramento ou distensão. O inchamento articular resulta de acúmulo de fluido sinovial e o espessamento da cápsula articular.

Inicialmente a locomoção é limitada pela dor. Porém, a artrite apresenta uma variedade de manifestações extraarticulares. Apesar delas ocorrerem freqüentemente nem todas têm significado clínico. Entretanto, elas podem ser a maior evidência da atividade da doença e origem da morbidez. Como regra, estas manifestações ocorrem em indivíduos com altos títulos de auto anticorpos para o fator reumatóide.<sup>2</sup>

### 1.3.1. Diagnóstico clínico e laboratorial

A artrite reumatóide não possui testes laboratoriais específicos para o seu diagnóstico. Entretanto, fatores reumatóides que são autoanticorpos reativos, são encontrados em mais de 2/3 dos adultos com a doença. A presença do fator reumatóide não é específico para a artrite reumatóide. A sua presença não estabelece o diagnóstico da doença mas pode ser um prognóstico. Geralmente os exames realizados para o complemento do diagnóstico da AR são fator reumatóide, proteína C reativa (PCR) e hemograma. Anemia normocítica normocrômica está freqüentemente presente na AR ativa.

O diagnóstico da AR é facilmente feito em pessoas com a doença estabelecida. Na maioria dos pacientes, a doença assume seus aspectos clínicos característicos dentro de 1 a 2 anos. A típica figura de poliartrite inflamatória simétrica bilateral, envolvendo pequenas e grandes articulações em ambas as extremidades (superior e inferior) sugere o diagnóstico.<sup>1,2</sup>

### 1.3.2. Tratamento

As metas de tratamento da artrite reumatóide são:

- aliviar a dor ;
- reduzir a inflamação ;
- preservar a capacidade funcional ;
- resolução do processo etiopatogênico ;
- restabelecer o bem estar ;

Medicações disponíveis são capazes de produzir o alívio da dor e algumas, de reduzir a inflamação. Sendo a etiologia da AR desconhecida, a patogênese é especulativa e os mecanismos de ação de muitos agentes terapêuticos empregados são incertos.<sup>2</sup>

#### 1.4. DICLOFENACO DE SÓDIO

Sintetizado em 1966<sup>3</sup>, o diclofenaco de sódio (DS) está no mercado mundial desde 1974. É o primeiro AINES derivado do ácido fenilacético a ser aprovado para uso. Projetado com base nas propriedades físico-químicas da fenilbutazona, indometacina e ácido mefenâmico.<sup>4</sup>

Amplamente utilizado como analgésico e antiinflamatório no tratamento de doenças reumáticas, pós operatório, cólicas biliar e renal, traumas ortopédicos e dismenorréia. Apresenta também efeito antipirético.<sup>5,6</sup>

Acredita-se que seus efeitos farmacológicos decorram da sua capacidade de inibir a cicloxigenase, impedindo a transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas.<sup>5</sup> As prostaglandinas desempenham um importante papel na cauda da inflamação, dor e febre.<sup>3</sup>

A estrutura do diclofenaco de sódio (DS), FIG.1, apresenta um grupamento de ácido fenilacético, um grupo de amina secundária e um anel fenil tendo na posição orto dois átomos de cloro.<sup>4</sup> Seu peso molecular é 318,14. Sua DL<sub>50</sub> oral em cobaias é 150mg / Kg.<sup>7</sup>

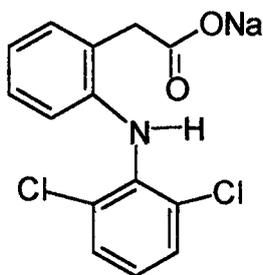


Figura 1 - Estrutura química do diclofenaco de sódio

O DS, ácido { 2 [2,6 – diclorofenilamino] – benzenoacético monossódico é um AINES que passa por ciclização intramolecular em meio ácido, sendo que a presença do suco gástrico pode resultar na inativação deste composto. Além do que, a solubilidade desta substância depende do pH do meio, sendo muito solúvel em pH acima de 6,5. <sup>6,8</sup>

A insolubilidade em condições ácidas é, talvez, o fator mais importante a considerar, com isso, não é possível realizar a dissolução em valores baixos de pH, porque somente uma pequeníssima porcentagem será dissolvida. Este fato pode levar a conclusões erradas e a pequena liberação em condições ácidas poderia ser interpretado como o resultado das características favoráveis da resistência gástrica da matriz que o veicula ou características favoráveis das microcápsulas que impedem a liberação da substância ativa, ao invés de ser interpretado como o resultado da baixíssima solubilidade do diclofenaco de sódio em valores de pH baixos. <sup>8</sup>

Apresenta pKa 4.0 (referente ao grupamento carboxílico do DS) e coeficiente de partição de 13,4. <sup>4, 6</sup> O diclofenaco de sódio é rapidamente absorvido após administração oral com  $C_{max}$  dentro de 1 – 2 horas. <sup>9</sup> Tem potente atividade e excelente tolerância. <sup>4</sup>

A biodisponibilidade oral é cerca de 60%, com um tempo de meia vida de 1,1 a 1,8 horas. Sua metabolização é hepática, por hidroxilação e sua excreção ocorre por via urinária e biliar. <sup>5,6,9</sup> O tempo de meia vida curto do DS associado aos efeitos colaterais requer um sistema de liberação controlada como sistema alternativo de formulação para este fármaco.

Os efeitos colaterais mais comuns envolvem efeitos gastrointestinais, incluindo gastrite, úlcera péptica e sangramento; reações de hipersensibilidade, efeito renal e no sistema nervoso central. <sup>10</sup> Administração intramuscular pode ser associada com trombose venosa e necrose tecidual. <sup>10, 11</sup> O comportamento farmacocinético não se altera após administração repetida. Não ocorre acúmulo desde que sejam observados os intervalos de dose recomendados. A dose máxima diária é 150mg.

## 1.5. QUITINA E QUITOSANA

Quitina e quitosana são derivados da celulose, sendo que a diferença está no grupamento hidroxila da posição 2 da celulose que foi substituída pelo grupamento acetamido na quitina e por grupo amino no caso da quitosana.<sup>12</sup>

A quitina é talvez, o segundo mais importante polissacarídeo natural, é um homopolímero plano composto por unidade de  $\beta$ -(1-4)-2-acetamino-2-desoxi-D-glicose com uma configuração tridimensional  $\alpha$ - helicoidal estabilizada por pontes de hidrogênio intramoleculares.<sup>12,13,14</sup> É encontrada em animais marinhos, insetos e fungos.<sup>15</sup>

A quitosana, ou  $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose, é um biopolímero hidrofílico obtido industrialmente por hidrólise dos grupos aminoaceta da quitina por tratamento alcalino.<sup>12,14</sup>

Após a desacetilação da quitina, flocos de quitosana seca são obtidos. Esta quitosana é dissolvida em ácido, filtrada e o precipitado é lavado e seco, obtendo assim, quitosana com grupos amino livres.

A presença de grupos amino na cadeia polimérica permite ao polímero atuar como polieletrólito, confere propriedades quelantes e é o ponto de partida para inúmeras modificações químicas.<sup>14,16</sup> A estrutura da quitosana está representada na FIG. 2.

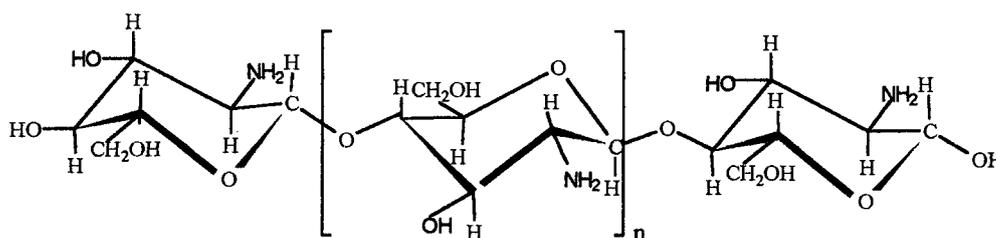


Figura 2 - Estrutura química da quitosana

Embora a estrutura seja representada como um homopolímero, o processo de desacetilação raramente é completo e a maioria dos produtos comerciais são copolímeros de unidades repetidas de quitosana e unidades repetidas de quitina.<sup>17,18</sup>

Importantes características da quitosana são, seu peso molecular, viscosidade, grau de desacetilação, cristalinidade, grau de polimerização, hidrofiliabilidade, pKa e energia de hidratação.<sup>13,14</sup>

A hidrofiliabilidade do polímero é próprio do grupamento amino e é solúvel em soluções de ácido diluído<sup>17</sup> (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, etc.)<sup>19</sup> e comporta-se como uma borracha-hidrogel em água.<sup>17</sup> O ácido acético tem sido muito usado como um solvente padrão para soluções de quitosana.<sup>20</sup>

Os grupos amino do polímero estão completamente protonados em pH ~ 3 e a cadeia polimérica está carregada positivamente, ocasionando a sua dissolução. O valor do pKa situa-se entre 5,0 e 6,7 e depende da dimensão da cadeia polimérica.<sup>16</sup>

Ligações covalentes com a quitina e quitosana são principalmente realizadas com o uso de dialdeídos, tais como glioxal, malonaldeído e glutaraldeído, os quais reagem com grupos amino livres.<sup>16</sup>

Rara solubilidade da quitosana, propriedades de solução, caráter de polieletrólito (catiônico), atributos físicos e atividade química e biológica, fazem da quitosana um biopolímero atrativo para muitas aplicações comerciais.<sup>13</sup> A quitosana tem sido empregada como um excipiente farmacêutico em formulação oral de drogas, para melhorar a dissolução de drogas pouco solúveis ou para liberação controlada de drogas por um suporte de erosão lenta de uma matriz hidratada.<sup>15</sup> A característica de insolubilidade em água e também em alguns solventes orgânicos limita seu uso como suporte de drogas.<sup>21</sup>

Este bipolímero é considerado não tóxico, com DL<sub>50</sub> oral em ratos de >160g/Kg. Recentemente, foi relatado que a quitosana é também degradada pela

microflora, a qual é ricamente distribuída no cólon.<sup>21</sup> A lisozima tem função importante na degradação da quitosana.<sup>22,23</sup>

Devido as suas propriedades favoráveis de biocompatibilidade (atóxica, biodegradável e de origem natural) e bioatividade a quitosana tem sido usada na área biomédica e farmacêutica.<sup>14</sup> Apresenta atividade bioestimulante em processos de cicatrização de vários tecidos, redução do nível de colesterol no sangue e estimulação do sistema imunológico.<sup>14</sup> Tem sido usada em projetos de membranas para hemodiálise, marcadores seletivos em células tumorais.<sup>17,20,24</sup>

A quitosana também apresenta aplicações nas áreas da agricultura (tratamento de sementes, inseticidas), processamento de alimentos e biotecnologia, produção de papel, têxtil, produtos fotográficos, agente quelante de metais pesados (Cd, Hg, Pb, Cr, Ni) e como adsorvente de corantes.<sup>25</sup>

## 1.6. AGENTES RETICULANTES

Por ser a quitosana solúvel em meio ácido, ela precisa ser reticulada para que as microesferas futuramente formadas possuam resistência química e mecânica. As moléculas da quitosana contém dois grupos funcionais, OH e NH<sub>2</sub>, sendo este último mais ativo que o OH.

### 1.6.1. Glutaraldeído

Apresenta a fórmula molecular C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> e tem peso molecular 100,11. É preparado por tratamento do 2-etoxi-3,4-diidro-2-H-pirano com HCl<sub>(aq)</sub>. É solúvel em água e volátil.

Sua LD<sub>50</sub> é de 25%, em ratos oralmente 2,38mL/ Kg, penetração através da pele em coelhos 2,56 mL/ Kg<sup>7</sup>. A estrutura do glutaraldeído está representada na FIG. 3.

O glutaraldeído pode ser usado para inibir a solubilização da quitosana, através da formação da base de Schiff com os seus grupos aldeído e os grupos amino livres da unidade glucosamina do polímero, resultando em uma cadeia polimérica reticulada.<sup>16</sup>

Recentemente, foi mostrado que microesferas da caseína reticuladas com glutaraldeído poderiam ser usadas como veículo para administração oral de drogas tais como teofilina e drogas citotóxicas e enzimas proteolíticas que no trato gastrointestinal não as degradam durante este trânsito.<sup>26</sup>

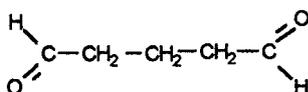


Figura 3 – Estrutura química do glutaraldeído

### 1.6.2. Epicloridrina

Apresenta a fórmula molecular  $\text{C}_3\text{H}_5\text{ClO}$  e tem peso molecular 92,53. É insolúvel em água. Miscível em álcool, éter, clorofórmio, tricloroetileno e imiscível em hidrocarbonetos de petróleo.

Sua  $\text{DL}_{50}$  oral em ratos é 0,09g/ Kg .É preparada pela ação de álcalis sobre glicerol diclorohidrina.<sup>7</sup> A epicloridrina pode ser usada para a insolubilização da quitosana através da formação de uma rede tridimensional polimérica. A reação com a quitosana envolve a abertura do anel epóxido. A epicloridrina então reage apenas com os grupos hidroxila sob condições alcalinas, mantendo os grupos amino livres .<sup>27</sup>

Membranas de quitosana reticuladas com epiclorigrina em condições alcalinas, foram preparadas para o estudo do controle do tamanho de poros nas membranas.<sup>27</sup> A estrutura está representada na FIG. 4.

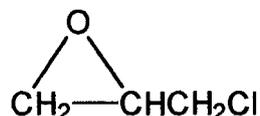


Figura 4 – Estrutura química da epiclorigrina

## 1.7. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

### 1.7.1. Liberação e biodisponibilidade de fármacos

A administração convencional de fármacos tem como objetivo principal tornar possível a ação a que ele se destina.<sup>28</sup> Porém várias etapas devem ser superadas para que um princípio ativo, contido em uma forma farmacêutica, alcance os receptores específicos e produza o efeito terapêutico desejado. Essa trajetória pode ser esquematizada como se segue<sup>29</sup> :

#### *Fase farmacotécnica*

- liberação do fármaco a partir de forma farmacêutica que o veicula → fármaco disponível para absorção;

#### *Fase farmacocinética*

- processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção → fármaco disponível para interação com os receptores;

#### *Fase farmacodinâmica*

- interações fármaco receptor → efeito farmacológico.

Em formas farmacêuticas convencionais (tabletes, cápsulas, líquidos, sprays, gotas e injetáveis) o fármaco é combinado com excipientes que o preservam, prevenindo contaminação, facilitando a produção e retardando ou facilitando a dissolução, após a administração. A concentração decai gradualmente entre os intervalos de administração até a próxima dose causar o pico plasmático novamente<sup>30</sup>. Para alguns fármacos a variação não causa problemas, mas para outros que causam reações tóxicas, essa variação acima da concentração limite terapêutica pode causar efeitos colaterais indesejáveis,<sup>30, 31</sup> ou seja, cada fármaco tem um nível plasmático acima do qual ele é tóxico e abaixo do qual ele é ineficiente.<sup>32</sup>

Após a transferência do fármaco para a corrente circulatória, os processos subsequentes dependem basicamente de suas propriedades intrínsecas e das características do paciente.<sup>29, 30</sup> Entretanto, as etapas que antecedem a absorção tornam-se determinantes para a eficácia clínica e a segurança na administração do produto, uma vez que podem refletir problemas com a formulação capazes de originar tanto medicamentos inócuos quanto tóxicos.<sup>29</sup>

Dessa forma, fatores tais como as propriedades físico-químicas dos princípios ativos e a natureza dos excipientes, além das técnicas de fabricação, devem ser otimizados pelos formuladores para obtenção de um produto adequado à sua finalidade.<sup>31</sup>

O passo inicial do desenvolvimento torna-se, portanto, estabelecer o objetivo terapêutico e o padrão de liberação do princípio ativo. Há casos em que se pretende a liberação rápida (analgésicos, antitérmicos), mas muitas vezes, a manutenção dos níveis plasmáticos efetivos durante as 24 horas é necessária, como nos tratamentos crônicos com vasodilatadores periféricos, hipotensores e antiepiléticos.<sup>29</sup>

### 1.7.2. Dissolução de fármacos no Trato Gastrointestinal

Para que um fármaco seja absorvido por via oral é necessário que esteja dissolvido nos líquidos do trato gastrointestinal (TGI). Assim, quando o fármaco é administrado em seu estado sólido é razoável assumir que a sua absorção no meio gastrointestinal se dá conforme a FIG. 5.<sup>28, 29</sup> Observa-se sua desintegração em grânulos, que por sua vez, se desagregam em partículas menores. A dissolução do princípio ativo já ocorre pelo contato dos sucos digestivos com a superfície do comprimido, mas adquire importância significativa a partir dos grânulos e das pequenas partículas. Uma vez dissolvido, o fármaco na forma não ionizada atravessa as membranas biológicas alcançando a corrente circulatória.<sup>29</sup>

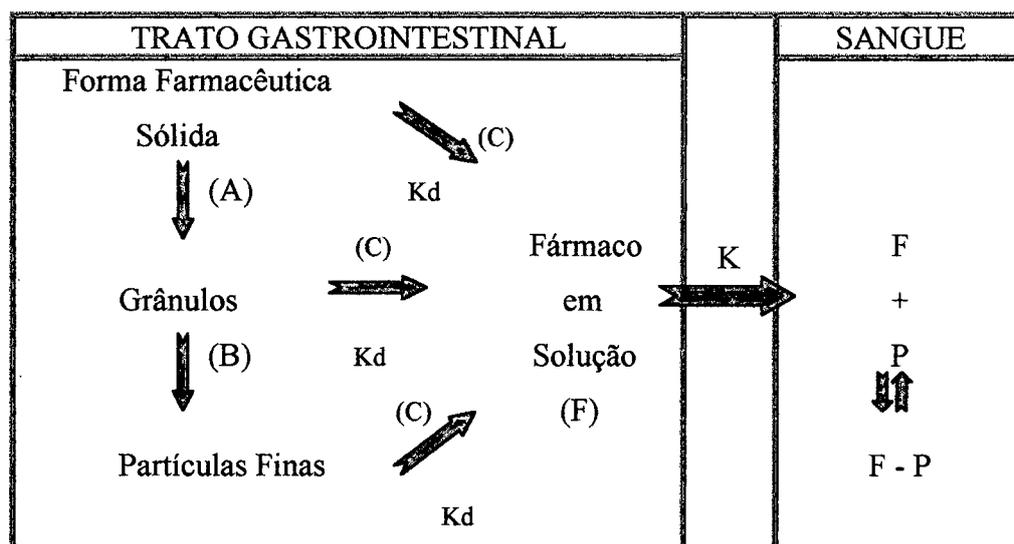


Figura 5 - Etapas envolvidas na liberação do fármaco a partir da fórmula farmacêutica. (A) desintegração, (B) desagregação, (C) dissolução, P proteína plasmática; K constante de velocidade de absorção, Kd constante de velocidade de dissolução.

Se a solubilidade intrínseca do fármaco é alta, a velocidade de permeação através da barreira gastrointestinal, é considerada como sendo o fator determinante na seqüência de absorção. Por outro lado, quando o fármaco tem uma baixa solubilidade, o alcance de uma concentração efetiva no sítio, provavelmente irá controlar a velocidade de absorção.<sup>28</sup>

Verificando-se o que ocorre no TGI, observa-se que todo fármaco que se dissolve é imediatamente absorvido.<sup>33</sup>

### **1.7.3. Principais sistemas de liberação de fármacos**

Tem-se introduzido novos sistemas terapêuticos, os quais podem alcançar maiores vantagens, melhorando e relacionando a administração de agentes terapêuticos. O objetivo não é o total de doses administradas, mas a velocidade e duração da administração do fármaco.<sup>31</sup>

Sistemas de liberação controlada liberam a droga em velocidade pré-determinada por um período de tempo definido. Em geral velocidades de liberação são determinadas pelo tipo de sistema e são quase independentes de condições ambientais, tal como pH.<sup>32</sup> O fármaco é liberado em regiões específicas do corpo, com manutenção dos índices terapêuticos com apenas uma dose simples, diminuição sistêmica da concentração do fármaco, redução da necessidade de cuidados e aumento do conforto do paciente.<sup>32, 34</sup>

Sistemas de liberação controlada diferem da liberação sustentada ou liberação lenta. Estas são preparações que incluem complexos (sais ou resinas de troca iônica), suspensões, emulsões, revestimentos que se dissolvem lentamente.

Geralmente, sistemas de liberação sustentada liberam o fármaco em menos de 24 horas e condições ambientais influenciam a velocidade de liberação, as quais comandam as variações de paciente para paciente.<sup>32</sup>

Diversas preparações de liberação controlada de drogas para tratamento da hipertensão tal como nifedipina, propanolol e captopril têm sido desenvolvidas, pois evitando concentrações plasmáticas altas iniciais, é diminuído riscos de efeitos colaterais indesejados.<sup>35</sup>

A utilização de material polimérico parece ser uma chave para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, incluindo sistemas de liberação de drogas vetorizadas.<sup>36</sup> Os sistemas poliméricos de liberação são capazes de ajustar a velocidade de liberação da droga em resposta às necessidades fisiológicas.<sup>37</sup>

A literatura cita a incorporação de drogas em polímeros como silicone, etilenovinilacetato, copolímeros, quitosana, etc.<sup>34</sup>

Muitas drogas, tanto novas como velhos produtos farmacêuticos, podem ser administrados de maneiras que não somente melhorem a segurança e eficácia mas como também permitam novas terapias. Há drogas que se forem diretamente expostas a mucosa gástrica podem sofrer modificações ou provocar alterações como irritação gástrica ou sangramento. Outras, devido ao efeito de primeira passagem pelo fígado, tem sua biodisponibilidade reduzida.<sup>38</sup>

A encapsulação de drogas é uma das alternativas viáveis para o desenvolvimento de novas formulações, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, aumentar a eficiência terapêutica de substâncias já utilizadas correntemente no tratamento de grande variedade de doenças.<sup>39</sup>

Este método tem sido utilizado para obtenção de formas sólidas de óleo, aumentar a vida útil do encapsulado, proteger a substância de efeitos de raios ultravioleta, umidade, oxidação, calor, alterações de solubilidade, mascarar o sabor e odor, na prevenção de incompatibilidade entre substâncias ativas contidas na mesma formulação, para tornar materiais tóxicos manipuláveis de maneira segura, ajudar na dispersão de substância insolúvel em água a se solubilizar em meio aquoso e para liberação controlada e vetorização de fármacos.<sup>39</sup>

Para diminuir efeitos colaterais, várias tentativas têm sido feitas para controlar a distribuição nos tecidos e a farmacocinética das drogas .<sup>38</sup>

Os lipossomas são transportadores coloidais utilizados para contornar os problemas de efeitos tóxicos produzidos por fármacos administrados por via intramuscular.

Vesículas são microcápsulas coloidais que alteram a farmacocinética e a distribuição de drogas .<sup>11</sup>

Para melhorar a biodisponibilidade de certas drogas, sistemas de liberação sublingual e administração retal foram investigados. A literatura relata a melhora da biodisponibilidade da nicardipina por sistemas de liberação intranasal.<sup>38</sup>

Drogas que podem ser quimicamente modificadas para alterar a sua seletividade tal como propriedades de biodistribuição, farmacocinética, solubilidade ou antigenicidade são chamadas de pró- drogas .<sup>40</sup>

A habilidade do sistema transdérmico (TDSs) de liberar drogas para o efeito sistêmico na pele intacta, evita o metabolismo de primeira passagem pelo fígado e por isso tem acelerado as pesquisas desse sistema no campo farmacêutico. Embora as vantagens da medicação transdérmico serem muito impressionantes, os TDSs possuem certas limitações. Uma dessas limitações é que a aplicação deste sistema pode induzir reações de sensibilização da pele, seja pela droga ou pelo material usado neste sistema .<sup>41</sup>

O sistema de microemulsões parece ser o ideal para drogas como hormônios, esteróides, diuréticos, antibióticos e vitaminas lipossolúveis. As microemulsões são soluções coloidais com água ou óleo solubilizada, consideradas termodinamicamente estáveis, de fase única e transparentes .<sup>42</sup>

Bioadesivos estabelecem um íntimo contato entre o polímero e o substrato segundo a formação e interpenetração / difusão do polímero e do substrato. Têm sido usados para aumentar a intimidade do contato entre sistemas de liberação

de drogas e a superfície de absorção . Podem ser de liberação ocular, estomacal, intestinal, colônica, retal, cervical e vaginal .<sup>43</sup>

A administração de fármacos, via intramuscular, é um método bem consolidado e de utilização muito freqüente para a obtenção de concentrações terapêuticas, em curto espaço de tempo. Em comparação com a via oral, existe a vantagem de evitar a primeira passagem pelo fígado e certos efeitos secundários. Com relação à via intravenosa, a administração intramuscular é mais cômoda, mais segura e pode permitir a modulação da velocidade de liberação do fármaco.<sup>11</sup>

Entretanto, dependendo do fármaco, existe a possibilidade do aparecimento de lesões tissulares, acompanhadas de dor, as quais pode evoluir até necrose dos tecidos locais. A necrose tissular é uma reação bem documentada como complicação de injeção intramuscular de certos fármacos, principalmente antiinflamatórios não estereóides. O desenvolvimento de formulações injetáveis exige a avaliação da toxicidade local do produto final. A toxicidade de uma formulação depende de vários parâmetros como pH, pressão osmótica, bem como da toxicidade intrínseca do fármaco, do veículo e dos adjuvantes utilizados.<sup>11</sup>

Lima, estudou o efeito da encapsulação do diclofenaco de sódio em lipossomas unilamelares na toxicidade tissular após administração em ratos. A reação foi acompanhada medindo-se a atividade sérica da enzima creatinina fosfoquinase (CPK). Os resultados mostraram que formulações contendo diclofenaco livre produziram grande aumento na atividade da enzima CPK, enquanto que o diclofenaco encapsulado resulta em reações insignificantes, similares às dos grupos controle. A análise histológica do tecido muscular local, no terceiro e no sétimo dias após a injeção, mostrou intensos danos provocados pelo diclofenaco livre e ausência de miotoxicidade para o fármaco encapsulado.<sup>11</sup>

#### 1.7.4. Mecanismos de liberação de fármacos

A liberação pode ocorrer por mecanismos químicos tal como a degradação do polímero ou a quebra da ligação droga – polímero .

Exposição em solvente pode ativar a liberação da droga. A droga é aprisionada por cadeias poliméricas e em exposição em fluido, regiões externas do polímero começam a inchar, seguido da saída da droga .<sup>32</sup>

A difusão é o mecanismo de liberação mais comum, pelo qual a droga migra de uma posição inicial no sistema polimérico para uma superfície externa e depois para o organismo. Pode ocorrer através de um reservatório, no qual a droga central é cercada pelo polímero ou em uma matriz, onde a droga é uniformemente distribuída através do sistema polimérico.<sup>33</sup>

Nos hidrogéis, a liberação por partição predomina<sup>44</sup> ,o soluto interage com o polímero e atravessa a membrana por difusão. Na liberação por poros, o soluto difunde através de microcanais dentro da estrutura da membrana. As liberações por poros e partição podem não atuar exclusivamente mas, uma pode predominar sobre a outra de acordo com a relação droga/ membrana .<sup>32</sup> O mecanismo de difusão depende da hidrofiliicidade/ hidrofobicidade do polímero, tamanho dos poros, grau de intumescimento e tamanho e hidrofiliicidade do soluto .<sup>44</sup>

Os sistemas de liberação controlado de drogas por pressão osmótica são produzidos pelo recobrimento do núcleo do reservatório de uma droga ativa ou de uma droga inativa osmoticamente. Quando a droga é inativa, ela é combinada com um sal que possa ser ativado pela pressão osmótica. A membrana de recobrimento é rígida e capaz de manter a integridade estrutural do sistema de liberação durante a liberação da droga. A espessura da membrana de recobrimento afeta a velocidade e a duração da liberação de ordem zero da droga do sistema .<sup>43</sup>

A liberação por meio de ultra-som, sugere a praticabilidade dos sistemas de liberação controlada polimérica ultrassônico, no qual a velocidade de liberação de fármacos pode ser repetidamente modulada. A erosão do polímero e liberação da droga é aumentada quando amostras são expostas ao ultra-som.<sup>37</sup>

A fonoforese é definida como sendo o movimento da droga pela pele intacta e por tecidos finos sob a influência de uma perturbação externa ultrassônica.<sup>45</sup>

A combinação dos mecanismos é possível. A vantagem de ter sistemas com diferentes mecanismos de liberação é que cada um pode atingir diferentes metas.<sup>46</sup>

## 1.8. SISTEMA GASTROINTESTINAL

O aparelho digestivo é o responsável pela incorporação de água e nutrientes e pela eliminação de resíduos. Nos diferentes segmentos do tubo digestivo, tem lugar os processos de digestão, absorção e secreção de diferentes substâncias.

Na cavidade oral (sublingual, bucal, gengival) começa a digestão do amido pela ação da amilase salivar e de grandes partículas de alimentos que são reduzidas pela trituração do aparelho dentário e umedecidos pela presença da saliva.<sup>47</sup> A mucosa sublingual é a mais permeável dos três tecidos e promove rápida absorção e boa biodisponibilidade de drogas como nitroglicerina e nifedipina.<sup>48</sup>

O esôfago não contribui na digestão, porém é a conexão entre a cavidade oral e a faringe com o estômago. O estômago é uma víscera oca com o aspecto de uma bolsa, dotado de paredes musculares que se contraem para a mistura e processamento dos elementos que recebe do esôfago.<sup>47</sup> As glândulas da mucosa gástrica liberam ácido clorídrico e enzimas (pepsina), agindo na digestão

protéica e eliminação de bactérias ingeridas. Misoprostol e clorotiazida são exemplos de drogas absorvidas no estômago .<sup>48</sup>

Finalizada a etapa gástrica, o produto final é denominado quimo, que está em condições de sofrer o passo final da digestão: o tratamento intestinal.

O intestino delgado é dividido em duodeno, jejuno e íleo. No duodeno, lipídeos, proteínas e carboidratos são digeridos pela ação combinada de enzimas pancreáticas e intestinais para a redução em componentes unitários que serão absorvidos posteriormente.

No restante do intestino delgado (jejuno e íleo) são absorvidos para o sangue açúcares simples, aminoácidos e eletrólitos e nos vasos linfáticos, lipídeos .<sup>47</sup> Drogas como teofilina, diclofenaco de sódio<sup>8</sup> são absorvidas no intestino delgado.

O segmento final do tubo digestivo é formado por ceco, cólon e reto constituindo assim o intestino grosso, que é capacitado para absorver água e é o local de atuação bacteriana. Drogas como indometacina, calcitonina, propanolol podem ser administradas por via retal .<sup>48</sup>

### **1.8.1. Condições fisiológicas para a liberação controlada**

Para se obter um sistema de liberação controlada deve-se considerar as condições fisiológicas que o sistema passará até o seu destino final.

Na administração oral, o sistema de liberação deverá passar pelo trato gastrointestinal (TGI) onde o pH varia amplamente. Em muitos casos, o sistema deve permanecer inalterado pela acidez gástrica e alcançar o intestino onde a ação e absorção da droga é desejada.<sup>49</sup>

Muitos fatores podem influenciar desfavoravelmente a dissolução e absorção das drogas, incluindo o tempo de esvaziamento gástrico, motilidade

intestinal, pH e as condições da superfície de absorção ao longo do TGI. Esses fatores, em geral podem ser afetados pela doença do paciente, postura, hábitos alimentares e aspectos do tratamento.<sup>30</sup> A anatomia do TGI<sup>50</sup> está representada na FIG. 6.

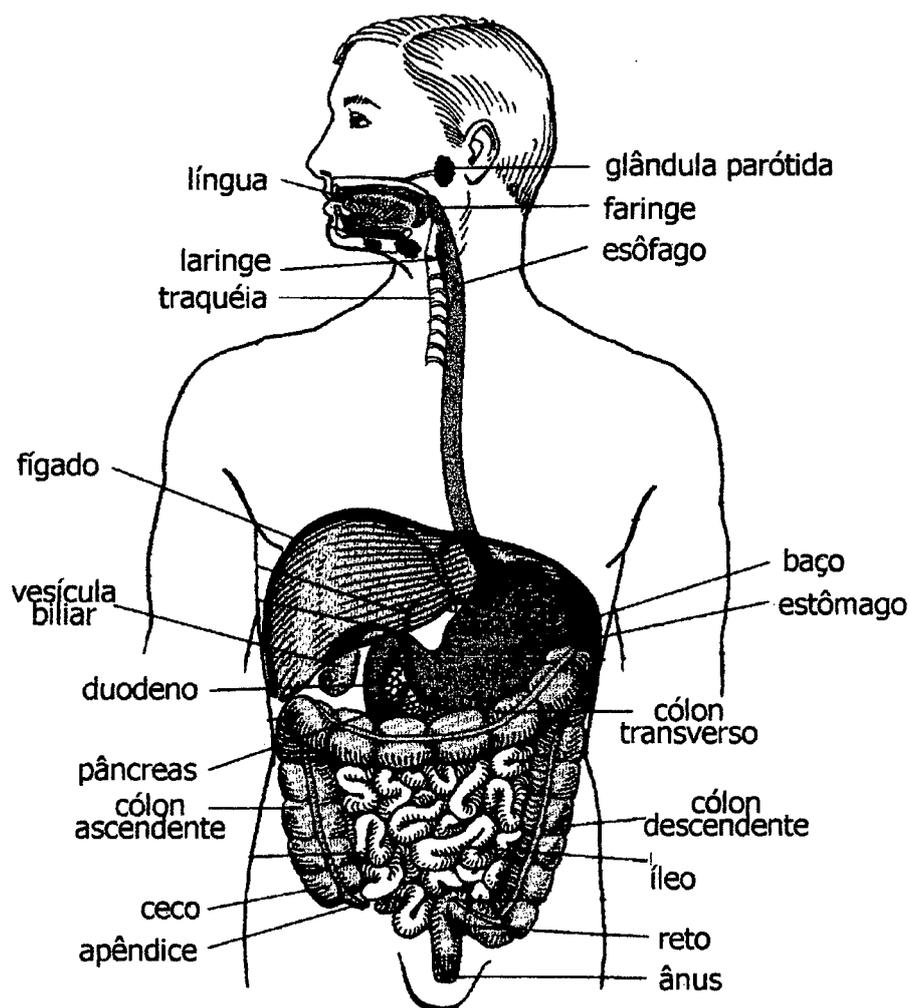


Figura 6: Anatomia do Trato Gastrointestinal

### 1.8.2.1 Variação do pH no TGI

O pH do estômago varia aproximadamente de 1,0 a 3,5<sup>51</sup>, dependendo da presença ou não de alimentos e refluxo do conteúdo intestinal para o estômago.

O pH do intestino delgado é inicialmente alto, diminuindo a um pH mínimo de 5,5 em 1 hora seguinte ao esvaziamento gástrico, retornando gradualmente a pH ~ 6,5 em 2 a 3 horas após o esvaziamento. Isto provavelmente ocorre devido a secreção pancreática de íons bicarbonato e secreções intestinais, associadas com a fase de contração. O pH do intestino grosso varia entre 7,5-8,0.<sup>52</sup>

A superfície do estômago possui células secretoras que produzem uma camada de muco com 1-1,5 mm de espessura, para a lubrificação e proteção da mucosa gástrica. As células parietais secretam HCl a uma concentração aproximada de 0,16 mol / L, mas a quantidade e concentração de ácido dependem de uma série de fatores.<sup>48</sup>

Com base nestes valores de pH, o sistema de liberação controlada a ser obtido deve resistir a dissolução em pH com valores abaixo de 4 para evitar a desintegração no estômago mas, começar a dissolver em pH 5 e acima deste e ser solúvel em pH 7.<sup>51</sup>

### 1.8.2.2. Esvaziamento gástrico

A biodisponibilidade de drogas de sistemas controlados de liberação é influenciada pelo tempo de trânsito gastrointestinal.<sup>53</sup>

Este tempo é variável, uma vez que o esvaziamento gástrico é afetado por fatores como alimentos e motilidade de TGI.<sup>53</sup> O tempo de trânsito gastrointestinal dos sistemas de liberação é similar ao dos alimentos, cerca de 3 a 4 horas.<sup>48</sup> A retenção gástrica, controlada pela motilidade gastrointestinal, é a

mais importante barreira fisiológica para a liberação controlada de drogas por administração oral .<sup>48</sup>

O esvaziamento gástrico de tabletes revestidos tem sido relatado como altamente variável, sendo de 30 minutos ou menos até 7 horas ou menos, dependendo da presença do tipo de alimento no estômago e associado a outros fatores. Há um consentimento geral que, devido a grande variabilidade do tempo de esvaziamento gástrico, um tempo arbitrário de 1 a 2 horas não é real para basear o perfil de liberação já que existem relatos na literatura de um tempo médio de esvaziamento de 6 horas .<sup>51</sup>

Uma refeição normal muda o padrão da motilidade de um estado de jejum para um estado alimentado, para mais de 8 horas dependendo do conteúdo calórico do alimento .<sup>48</sup> A variação no pH do TGI no estado em jejum poderia afetar o grau de dissolução da droga e a fração presente na forma não ionizada, a qual conseqüentemente influenciaria o grau e a velocidade de absorção da droga. O pH do estado em jejum é de grande interesse, por isso muitos estudos de biodisponibilidade são conduzidos sob condições de jejum .<sup>52</sup>

A presença de alimento no estômago, especialmente alimentos gordurosos, reduz a velocidade de esvaziamento gástrico e o nível de atividade peristáltica .<sup>54</sup> A viscosidade dos alimentos também afeta o esvaziamento pois a baixa viscosidade dos alimentos diminui o tempo de esvaziamento quando comparado com alimentos de alta viscosidade. Sólidos e líquidos são esvaziados diferentemente; o esvaziamento de líquidos é controlado pelo estômago proximal e depende do volume, tão bem como da viscosidade e conteúdo calórico e precede o esvaziamento de sólidos que é controlado pelo estômago distal .<sup>48</sup>

O tamanho das partículas é um dos mais importantes parâmetros que afetam o esvaziamento de sólidos. Tamanhos de 1-5 mm podem ser esvaziados simultaneamente com o alimento, já as partículas maiores devem ser reduzidas.

Formas não digeríveis com diâmetro maior de 5mm são somente esvaziadas depois que a maioria dos alimentos foi esvaziada .<sup>48, 52</sup>

Como o esvaziamento gástrico varia de paciente para paciente, existe a variação na quantidade de droga absorvida. Para drogas que possuem um perfil de absorção com sítio específico, um tempo lento de esvaziamento pode permitir uma maior absorção .<sup>54</sup>

### 1.8.2.3. Atividade enzimática

Existe uma variedade de enzimas no intestino que ajudam a quebrar várias substâncias em tamanhos menores. Conseqüentemente, auxiliam na liberação de fármacos.

As enzimas que fazem parte do suco pancreático são principalmente hidrolíticas e incluem tripsina, quimiotripsina, amilase e lipase as quais digerem os três maiores grupos de compostos: carboidratos, proteínas e lipídeos.<sup>51</sup>

Enzimas envolvidas no processamento de carboidratos são  $\alpha$ -amilase, que é uma enzima salivar e pancreática e várias dissacaridases. As proteínas são quebradas pela pepsina no estômago e pela tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase, aminopeptidase e tetra, tri e dipeptidases no intestino delgado. Lipídeos são metabolizados pela lipase do pâncreas bem como pela colesterol esterase. A bile é secretada para ajudar na digestão de gorduras e absorção de lipídeos .<sup>48</sup>

No cólon existe uma enzima chamada peptidase colônica que é secretada por enterobactérias, enterococos, lactobacilos e outros, a qual hidrolisa proteínas e peptídeos que tenham escapado da hidrólise no intestino delgado .<sup>54</sup>

A FIG. 7 apresenta um resumo da atividade gastrointestinal .<sup>50</sup>

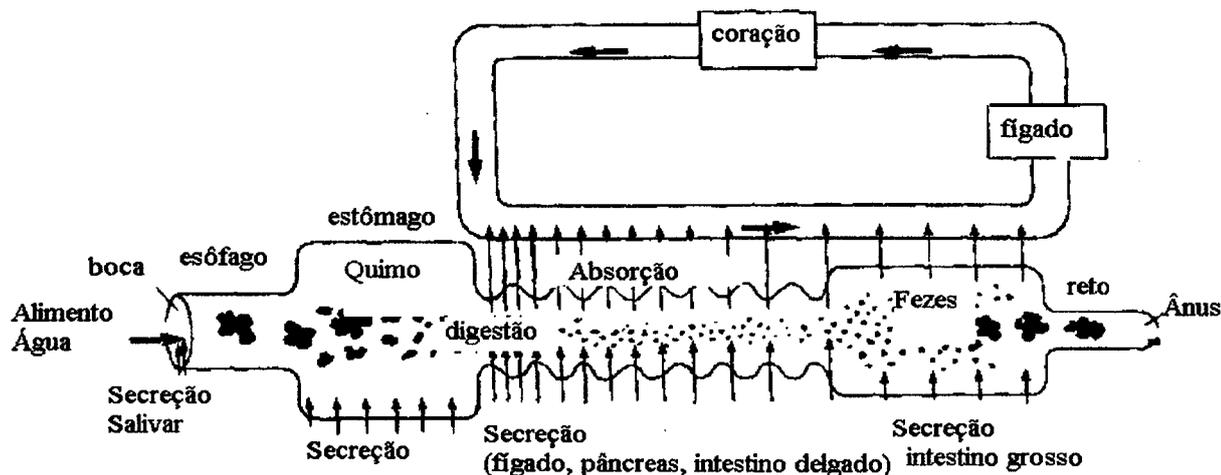


Figura 7: Resumo da atividade gastrointestinal envolvendo mobilidade, secreção, digestão e absorção

## 1.9. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS MICROENCAPSULADOS

A microencapsulação é um método bem conhecido com muitas aplicações no campo da tecnologia farmacêutica.<sup>55</sup>

O processo consiste na obtenção de uma microcápsula a qual possui um núcleo contendo uma espécie ativa, recoberto por uma membrana. Devido a sua versatilidade, tem-se variado não apenas a técnica de produção como também as características do encapsulado e da membrana encapsulante.<sup>56</sup>

A membrana encapsulante deve possuir características tais como: ser porosa o suficiente para deixar permear o substrato e o produto, sem deixar sair a espécie encapsulada e ser constituída de tal forma que proteja o material

encapsulado contra agentes externos ou o proteja do meio em que se encontra o encapsulado.<sup>57</sup>

A substância microencapsulada pode ser modificada na sua forma, volume, aparência, cor, densidade, reatividade, durabilidade e fotosensibilidade. Pode ser usada em diferentes funções e tem sido empregada em muitos campos de tecnologia, freqüentemente associada com aplicações na qual o encapsulado é liberado em condições controladas.<sup>57</sup> A liberação do componente microencapsulado pode ser controlada tanto no que se refere a quantidade como velocidade nas condições desejadas, isto é, pH, temperatura, etc. Por exemplo, o ácido acetil salicílico (aspirina) foi microencapsulado e mostrou que desta forma reduz a irritação gastrointestinal.<sup>56</sup>

É necessário se ajustar a produção da microcápsula às condições de estabilidade do encapsulado e da membrana sem perder de vista o aspecto tecnológico quanto à sua operacionalidade, custo e aplicabilidade.<sup>58,59</sup>

### **1.9.1 Métodos de preparação de microcápsulas:**

Podem ser classificados como:

- métodos mecânicos: são os mais úteis comercialmente, uma vez que estes métodos são facilmente adaptáveis a produção em larga escala. Como por exemplo “spray drying” onde o fármaco em solução ou em dispersão é atomizado, juntamente com o material revestidor solubilizado ou fundido, em câmara de evaporação causando a rápida solidificação da superfície das gotículas atomizadas originando as partículas.
- Métodos físico-químicos: de maneira geral, estes métodos consistem em transformar substâncias inicialmente solúveis, tais como polímeros e ceras, em materiais insolúveis no mesmo meio. Os processos de coacervação e

evaporação de solvente são exemplos. A coacervação ou separação de fases pode ser dividida em simples e complexa. Enquanto a coacervação simples envolve a formação do coacervado por mudança de pH, temperatura, força iônica, etc. a coacervação complexa resulta da complexação entre dois polieletrólitos de cargas opostas.<sup>39,58,59</sup>

A evaporação do solvente é um método onde o fármaco e o polímero são dissolvidos num solvente orgânico volátil e emulsificados em meio aquosos, contendo tensoativo. Após a emulsificação, o solvente orgânico é eliminado por agitação, aquecimento ou vácuo.<sup>39</sup>

- métodos químicos: fundamentam-se no desenvolvimento de reações químicas, geralmente de polimerização. A polimerização pode ocorrer no meio externo, no qual o fármaco é disperso como um sólido ou líquido, sendo que os polímeros formados difundem-se para a interface, onde se fixam. Ocorre na interface, in situ, tanto espontaneamente ou pelo contato entre monômero difundido de um lado e o catalizador de outro; ou na interface, in situ, pela condensação química de dois monômeros, quimicamente diferentes, em fases opostas, reagindo na interface.<sup>39</sup>

### 1.9.2. Aplicações

As microcápsulas estão sendo usadas e testadas com os mais diferentes objetivos:

- \* mascaramento de sabor: alcalóides e sulfas;
- \* proteção de fármacos lábeis: vitaminas, ácido acetil salicílico, enzimas e hormônios;
- \* isolamento de tecidos: encapsulação de hemácias, ilhotas de Langerhans;
- \* conversão de líquidos em sólidos: óleos, essências aromatizantes, vitamina A;

- \* liberação sustentada e controlada: antibacterianos, antineoplásicos, analgésicos e imunossupressores;
- \* vetorização de fármacos: fármacos com baixo índice terapêutico
- \*biotecnologia: diagnósticos, terapia gênica, biossíntese .<sup>39</sup>

De maneira simples, pode-se dizer que uma microcápsula é uma pequena esfera com uma parede uniforme em sua volta <sup>58</sup>, em geral elástica e que serve para a ingestão de medicamentos dosificados .<sup>60</sup>

Um número grande de materiais tem sido usado como revestimento entérico. O modo de ação pode ser baseado em um mecanismo ou a combinação de mecanismos. Alguns dos primeiros revestimentos continham materiais hidrofílicos que intumesciam na presença de umidade, causando uma quebra na camada de revestimento. O ideal deste mecanismo é que o material revestido começaria a intumescer no estômago mas só romperia no intestino .<sup>60</sup>

Thanoo e colaboradores produziram microesferas de álcool polivinílico (PVA) contendo várias drogas. Uma solução aquosa de PVA contendo várias concentrações de glutaraldeído foi dispersa como gotas em parafina líquida usando um agente estabilizante. As microesferas continham aspirina, griseofulvina ou ácido nicotínico. O estudo de liberação foi realizado em fluídos gástrico e intestinal simulados, sem enzima e a 37°C. Foi observado que devido o aumento da densidade de reticulações, há uma redução considerável na taxa de liberação, sugerindo que o perfil de liberação pode ser controlado pela mudança na densidade das ligações de PVA e glutaraldeído .<sup>61</sup>

A administração intranasal de microesferas de amido reticuladas com epícloridrina veiculando insulina, resulta em rápida diminuição da glicose plasmática. O grau de reticulação controla o inchamento e desse modo a liberação in vitro da insulina das microesferas. As microesferas de amido não induzem a hemólise eritrocitária. O estudo de liberação in vitro foi realizado em solução NaCl 0,9% a 37°C, enquanto que o estudo in vivo foi realizado em

cobaias. Foi observado a diminuição dos níveis de glicose, sendo a diminuição máxima obtida aproximadamente 30 a 40 minutos após a administração .<sup>62</sup>

A microencapsulação pode evitar a rejeição imunológica devido a transplantes nas ilhotas de Langerhans, células livres, células paratireóides ou células tumorais. Vandebossche e colaboradores, estudaram a reação do hospedeiro contra oito diferentes tipos de microcápsulas vazias produzidas a partir de alginato e poli-lisina. A reação foi investigada depois das microcápsulas residirem intraperitonealmente de 4 a 28 dias .<sup>63</sup>

A natureza química da droga, como o seu coeficiente de partição afetam seu perfil de liberação. O coeficiente de partição é definido como a tendência da distribuição da droga entre as duas maiores fases presentes. Jalšenjak e colaboradores prepararam microesferas de albumina sérica com uma série de barbitúricos pelo método de desnaturação térmica. A escolha dos barbitúricos foi devido ao fato deles serem considerados análogos estruturais, tendo propriedades gerais similares mas diferentes coeficientes de partição .<sup>33</sup>

Microesferas de policarbonato carregadas com aspirina, griseofulvina e p-nitroanilina foram preparadas pela técnica de evaporação de solvente. O aprisionamento de droga (> 50%) foi realizada neste processo. Estudos de liberação da droga foram realizados em fluídos gástrico e intestinal a 37°C. Foi verificado que aumentando a proporção de droga para polímero na microesfera, aumenta o tamanho da partícula e a velocidade de liberação das drogas. Assim, conclui-se que a liberação sustentada de drogas poderia ser realizada utilizando esta matriz .<sup>54</sup>

Um sistema de liberação colônica foi desenvolvido para liberar vasopressina, um polipeptídeo hormonal, utilizando a combinação de mecanismos de pH-dependente e liberação controlada. O polímero acetato ftalato de celulose foi o escolhido como sendo o mais indicado. O sistema foi projetado para estabelecer um tempo retardado (sem liberar a droga) por um período de 6 horas, depois disto, a vasopressina foi liberada numa velocidade

máxima entre 6 e 7 horas, que corresponde a chegada no cólon no tempo de 6 horas e 30 minutos em ratos. Estudos *in vitro* foram realizados em fluido gástrico simulado sem enzimas, a 37°C, resultando na maior liberação em pH 8 com cerca de 8 horas de contato. Sete cobaias, deficientes de vasopressina, foram testadas no período de uma semana. Devido a deficiência de vasopressina, esses ratos excretavam grande quantidade de urina, equivalente a 70% do seu peso corporal, em contraste com 3% de ratos normais. A administração exógena de vasopressina corrigiu a excreção excessiva de urina, justificando a eficiência das microcápsulas após a administração.<sup>64</sup>

Pommersheim e colaboradores, produziram um novo tipo de microcápsulas para imobilização de enzimas. A parede dessas cápsulas consiste de muitas camadas de polietilenoimina e ácido poliacrílico. A encapsulação da fosfatase ácida e da p-nitrofenil fosfatase foi usada como sistemas modelos. As cápsulas contendo as enzimas foram caracterizadas por suas atividades enzimáticas. A mais interessante propriedades das cápsulas é a sua capacidade de distinguir entre a enzima e o substrato. A permeabilidade para a primeira deveria ser menor e para o segundo tão alta quanto o possível.<sup>65</sup>

Whalen e colaboradores desenvolveram métodos para o uso de polímeros biodegradáveis para a encapsulação de vacinas. Estas microcápsulas foram projetadas para desenvolver liberação controlada do antígeno. As microcápsulas foram preparadas com copolímero D1-lactídeo e glicolídeo. O processo foi desenvolvido para a encapsulação de antígenos protéicos solúveis em água. A vacina botulínica para tipo A foi então microencapsulada.

O total de 27 ratos foram usados para estudo da eficiência da vacina. Seis ratos foram injetados com microcápsulas carregadas de solução salina e serviram como grupo controle. Amostras de plasma foram retiradas semanalmente para determinação do nível de anticorpos, usando ensaios imunoenzimáticos. Na décima quarta semana, 21 ratos imunizados e seus controles foram submetidos a presença da toxina botulínica A. Todos os 6

controles morreram dentro das 72 horas seguintes. Dos ratos inoculados, 6 dos 21 morreram entre 2 e 6 dias após a exposição, resultando na sobrevivência de 71%.<sup>66</sup>

A encapsulação de óleos tem sido investigada por várias razões, para proteger os óleos suscetíveis a decomposição por oxidação, para proteger óleos voláteis da evaporação e ajudar a encapsulação de drogas.<sup>67</sup>

Rabiskova e colaboradores selecionaram um grupo de surfactantes com diferentes balanços hidrofílico/ lipofílico (HLB) para investigar a influência das propriedades de óleos adicionados dentro da coacervação complexa de microcápsulas, o valor de HLB de um material surfactante com valor de HLB de aproximadamente 2,5 - 6 resulta em um aumento de emulsão dentro de cápsulas coacervadas. Embora surfactantes com valores de HLB acima desta média aumentem a estabilidade da emulsão, eles mudam a superfície do óleo adicionado e conseqüentemente previnem a encapsulação.<sup>67</sup>

#### 1.10. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS A PARTIR DE SISTEMAS DE APRISIONAMENTO DIVERSOS

Dispersões solúveis têm sido usadas para aumentar a dissolução de drogas de muito baixa solubilidade em suportes solúveis e também para sustentar a liberação de compostos solúveis em matrizes menos solúveis. O uso de dispersões de drogas com baixa solubilidade tem sido proposto como um viável modo de produzir formas de liberação sustentada pela via parenteral com relativa toxicidade. Os derivados menos solúveis dissolvem-se lentamente e então retardam a liberação do composto ativo. Se os derivados menos solúveis forem transformados em drogas ativas, eles então poderão suplementar a atividade da droga. A biodisponibilidade deste tipo de dispersão sólida é dependente do derivado usado, sua solubilidade e seu grau ou taxas de conversão para espécies bioativas e seu subsequente metabolismo.<sup>68</sup>

Drogas insolúveis em água são usualmente caracterizadas por baixa biodisponibilidade, porque sua absorção é limitada pela velocidade de dissolução e conseqüentemente lenta e irregular. Além disso, algumas dessas drogas são também caracterizadas por ter um tempo de meia vida curto.

Giunchedi e colaboradores prepararam tabletes com matrizes hidrofílicas capazes de liberar controladamente drogas insolúveis em água, sendo a naftazona escolhida como droga modelo. Aumento da velocidade de dissolução da droga foi feito usando reticulação com  $\beta$ -ciclodextrina, carmelose de sódio ou hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.<sup>69</sup>

A rifampicina foi aprisionada em uma matriz de silicone e seu perfil de liberação foi estudado em 10 mL de NaCl 0,9%, a temperatura ambiente, em pH 7. A solubilidade da rifampicina era de 0,28% e foram usados 30 mg de polímero. A taxa de liberação da rifampicina dependeu da quantidade de droga incorporada e mostrou dois períodos significantes. O primeiro foi chamado de efeito "burst" que é o efeito da droga dispersa na matriz, sua massa, distribuição e solubilidade dos cristais de rifampicina na superfície do polímero. O segundo período foi contínuo e após 48 horas a difusão foi controlada pela estrutura da matriz elastomérica.<sup>70</sup>

Khori e colaboradores desenvolveram dois tipos de grânulos; um com liberação pH-dependente e o outro liberação pH-independente. O primeiro foi composto de nifedipina, a droga de escolha, ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, etilcelulose e microcristais de celulose, enquanto que o segundo foi composto de nifedipina, hidroxipropilmetilcelulose, etilcelulose e amido. O efeito da mistura de quantidades diferentes dos polímeros e a droga contida em grânulos, foram examinados in vitro. Em ambos os casos, a liberação foi diminuindo com o aumento da etilcelulose. Estes grânulos de liberação sustentada e grânulos comerciais foram administrados oralmente em coelhos e o tempo de curso da droga no plasma foi comparado.<sup>71</sup>

### 1.11. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS A PARTIR DE MATRIZ DE QUITOSANA

Um grande número de artigos têm sido publicados, demonstrando a utilização da quitosana como suporte de várias drogas, justificados pelas características deste biopolímero, acrescido do interesse econômico gerado pela abundância da quitina, matéria-prima na obtenção da quitosana, por ser subproduto da indústria pesqueira e de processos de fermentação.<sup>72</sup>

Em estudos recentes foram preparados suportes de quitosana reticuladas com glutaraldeído e sensíveis ao pH. O grau de desacetilação, a quantidade de agentes reticulantes, a composição de eletrólito em solução e a temperatura também foram estudados.<sup>73</sup>

Microcápsulas de quitosana foram desenvolvidas por Tozaki e colaboradores, para a liberação controlada da insulina. A liberação *in vitro* foi realizada com cápsulas contendo fluoresceína. A absorção intestinal da insulina foi avaliada pela medida dos níveis plasmáticos de insulina e seus efeitos hipoglicêmicos após a administração oral das cápsulas contendo insulina e aditivos. A liberação foi realizada em fluídos gástrico (pH 1) e intestinal (pH 7) simulados e também em conteúdo cecal extraído de ratos. Pequena liberação de fluoresceína foi observada no pH 1 e no pH 7. Entretanto, a liberação de fluoresceína foi marcadamente aumentada na presença do conteúdo cecal. O efeito hipoglicêmico começou em 8 horas após a administração das cápsulas de quitosana.<sup>15</sup>

Drogas empregadas na quimioterapia da tuberculose tem desenvolvido resistência microbiana. Uma maneira de minimizar esta resistência é o desenvolvimento de novas formulações para drogas já existentes. A microencapsulação da rifampicina foi realizada com blenda polimérica quitosana-PVA, utilizando-se a droga na forma sólida para a microencapsulação. O estudo de liberação *in vitro* foi realizado em condições salina NaCl 0,9% e de

sulfato de sódio 10%, sem estudos biológicos posteriores. Foi observado que uma maior massa de quitosana na blenda polimérica aumenta a liberação do fármaco enquanto que uma massa maior de PVA não altera significativamente a liberação. Houve menor liberação de rifampicina em valores de pH 2 e 3; ocorrendo uma maior liberação a partir do pH 4.<sup>74</sup>

O desenvolvimento de grânulos flutuantes de liberação sustentada baseado na quitosana foi descrito por Inouye e colaboradores, usando quitosana com diferentes graus de desacetilação ( quitosana H e L). Os grânulos foram feitos com quitosana H, com mistura 1:1 de quitosana H e L, com mistura 1:2 de quitosana H e L e com quitosana L. A prednisolona foi a droga de escolha. Estudos in vitro foram realizados em fluído pH 1,2 e em água deionizada, a 37°C. Cachorros foram utilizados para a realização dos testes in vivo, com coletas de sangue em tempos apropriados.<sup>75</sup>

Machida e colaboradores, desenvolveu formas de liberação sustentada de drogas baseadas em quitosana e hidroxipropilquitosana (HP-quitosana). As possibilidades foram exploradas utilizando-se a uracil como droga modelo. Estudos in vitro, utilizando a lisozima em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C e estudos in vivo por implante subcutâneo em ratos foram realizados para confirmar a degradação enzimática da quitosana e HP-quitosana. O teste in vitro da dissolução foi realizado tendo sido encontrado que a liberação da uracil pode ser alterada pela adição da HP-quitosana.<sup>23</sup>

## 1.12. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DICLOFENACO DE SÓDIO

Microesferas biodegradáveis de diclofenaco de sódio usando quitosana foram caracterizadas e avaliadas in vitro e in vivo. O tamanho das partículas e a quantidade de droga aprisionada foram investigadas. O estudo in vitro foi realizado em meio intestinal simulado, com pH 6,8 a 37°C. Baixa liberação foi

observada, restando cerca de 55% da droga nas microesferas após 6 horas. Coelhos foram usados para o estudo in vivo e observou-se que não havia degeneração estomacal quando microesferas de quitosana vazias foram administradas, porém com a administração da droga livre, ulceração foi observada.<sup>76</sup>

Liu e colaboradores desenvolveram cinco tipos de tabletes preparados a partir de hidroxilpropilmetilcelulose (HPMC) com variações de viscosidade. O teste de dissolução in vitro indicou que todas as cinco formulações prolongam a liberação do diclofenaco de sódio. Os principais fatores que controlam a liberação da droga foram o grau de viscosidade do HPMC e a quantidade de HPMC usado. Grande quantidade de HPMC de alto grau de viscosidade foi usado, resultando em baixa taxa de liberação da droga.

Não houve degradação significativa do diclofenaco de sódio ou mudança na liberação da droga em nenhuma das cinco formulações, no período de 3 meses. A capacidade de liberação controlada de 4 formulações foi demonstrada, posteriormente, em estudos in vivo em humanos.<sup>6</sup>

Foram realizados estudos com microesferas de álcool polivinílico (PVA) reticuladas com glutaraldeído para a liberação de diclofenaco de sódio. O teste in vitro foi feito em tampão pH 7,2 a 37°C. A percentagem da droga liberada variou entre 13 a 66%.<sup>77</sup>

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Estudar a liberação controlada do diclofenaco de sódio após sua impregnação em microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e epicloridrina.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Preparar a quitosana com determinado grau de desacetilação a partir da hidrólise enérgica da quitina através de álcalis.
- Preparar microesferas de quitosana e reticulação com os agentes reticulantes glutaraldeído ou epicloridrina.
- Estudar as cinéticas de liberação do diclofenaco de sódio, tendo como variável as soluções onde ocorrem e o tempo.
- Determinar o grau de intumescimento e do grau de reticulação das microesferas.
- Determinar a porcentagem impregnada nas microesferas.
- Determinar a porcentagem de diclofenaco de sódio liberada pelas microesferas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAIS E REAGENTES**

##### **3.1.1 Equipamentos**

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica marca Shangping Eletronic Balance, modelo FAI 6045. As medidas dos valores de pH foram feitas com o pH-metro marca Corning, modelo pH / íon analyser 350. O triturador utilizado foi da marca Analysenmühle, modelo A 10.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro modelo U. 3000, marca Hitachi.

As microesferas foram feitas utilizando-se uma bomba peristáltica Ismatec Reglo modelo 78016-30 e agitador magnético, modelo AMA 102 com velocidade controlada, da Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda. Para a liberação, utilizou-se o banho termostatizado Shaker Bath. da marca Lab Line.

A morfologia interna e externa das microesferas e a análise elementar foram realizadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Philips, modelo XL 30, do Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

### 3.1.2.Reagentes

O biopolímero quitina (QT) extraído do exoesqueleto do camarão, utilizado na preparação da quitosana, foi fornecido pela KITO- Química Fina Ltda .

O alumínio em pó foi adquirido da Aldrich. O diclofenaco de sódio foi adquirido da Importadora Química Delaware Ltda. Ácido acético (MERCK), ácido clorídrico (MERCK) , epícloridrina (MERCK), hidróxido de sódio(Synth). O metanol e glutaraldeído foram obtidos da VETEC Química Fina Ltda. Os demais reagentes são de grau analítico.

### 3.1.3.Soluções

#### *Solução de Quitosana (QTS)*

Para a preparação desta solução, foi dissolvido 4 g de QTS em 100 mL de ácido acético 5%(v/v) e acrescentando 0,5 g de talco (silicato de magnésio) que funciona como um agente antiagregante e mantido sob agitação constante até completa dissolução da QTS, resultando em uma solução viscosa com aproximadamente 4% (p/v) de QTS.

#### *Soluções de liberação*

Solução tampão Clark - Lubs - pH 1,2

Solução tampão MacIlvaine - pH 6,8 e 8,0

Solução tampão de  $H_3BO_3$  . KCl - NaOH - pH 9,0

Solução tampão de tris-( hidroximetil)amino metano - pH 9,77

As soluções foram preparadas conforme Morita.<sup>78</sup>

### *Solução de impregnação*

À uma solução metanol - água na proporção 2:1, foi adicionado 2 g de DS e mantido sob agitação até dissolução completa.

## 3.2. MÉTODOS

### **3.2.1.Preparação e purificação da quitosana**

A preparação da quitosana foi realizada conforme o método de Broussignac.<sup>79</sup>

A purificação foi feita dissolvendo-se o biopolímero em ácido acético 3% (v/v), mantendo-se sob agitação constante até que esta solução ficasse bem dissolvida. Depois a mistura foi filtrada para eliminar as impurezas insolúveis e reprecipitada com solução de NaOH 1 mol/ L.

A QTS reprecipitada foi novamente filtrada, lavada com água até neutralização e seca em estufa a 60°C .Após a QTS ter secado, foi triturada e peneirada.

### **3.2.2. Determinação do grau de desacetilação**

O teor de grupos amino da QTS foi determinado por titulação potenciométrica pelo método de Broussignac.<sup>79</sup> Este consiste na titulação da QTS na presença de um excesso de HCl 0,3 mol/ L com NaOH 0,1 mol/ L. Foram dissolvidos 2,0 g de QTS em 20 mL de HCl 0,3 mol/ L e diluída com 200mL de água destilada para se ter uma boa dispersão do polímero em solução.

A titulação foi levada até o volume final de 100 mL de NaOH e acrescentado 4 gotas de fenolftaleína 1% para determinação do ponto de viragem. A curva de titulação apresenta 2 pontos de inflexão e a diferença entre os volumes corresponde a quantidade de NaOH necessária para protonar os grupos aminos.

O grau de desacetilação pode ser calculado através da equação de Broussignac <sup>79</sup>, Equação 1 :

$$\% \text{NH}_2 = 16,1 (V_2 - V_1) \times \frac{M_b}{W} \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $V_1$  e  $V_2$  correspondem aos volumes no primeiro e segundo ponto de equivalência,  $M_b$  é a molaridade da base e  $W$  é o peso original do polímero em grama empregado na titulação. O grau de desacetilação calculado por este método foi de 85%.

### 3.2.3. Preparação das microesferas

O processo de formação das microesferas foi o da separação de fases via coacervação simples.

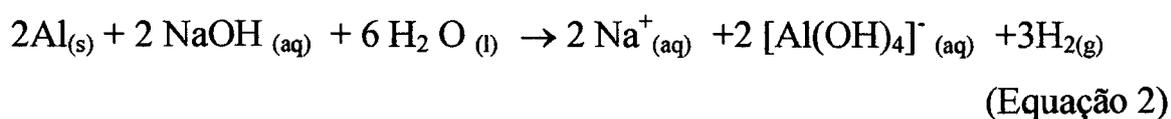
*Microesferas de quitosana reticuladas com epícloridrina ( MRE)*

A solução de QTS 4%(p/v) foi gotejada com o auxílio de uma bomba peristáltica em um banho de precipitação contendo solução de NaOH 2mol/ L, ocorrendo a formação das microesferas. Estas microesferas foram mantidas sob agitação constante por 30 minutos nesta solução. Em seguida as microesferas foram lavadas até pH neutro.

À uma suspensão de 10 gramas de microesferas úmidas em 100 mL de água foi adicionado 4,9 mL de epícloridrina e aquecido a 50°C por 1 hora. Após, foi adicionado 70 mL de NaOH 0,1 mol/ L e fervido por 2 horas. As microesferas foram lavadas com água, ácido clorídrico 0,1 mol/ L seguido de NaOH 0,1 mol/ L <sup>80</sup> .

*Microesferas porosas de quitosana reticuladas com glutaraldeído( MRG)*

À solução de QTS 4% ( p/v) foi adicionado 0,03% de pó de alumínio sob agitação. Esta solução foi gotejada com o auxílio de uma bomba peristáltica em um banho de precipitação contendo solução de NaOH 2mol/ L, com formação de microesferas de QTS artificialmente porosas devido ao desprendimento de hidrogênio. (Equação 2 )



As microesferas permaneceram sob agitação constante por 1 hora a 25°C nesta solução. As microesferas foram lavadas até pH neutro. Em seguida as microesferas permaneceram 20 minutos em solução EDTA 0,01 mol/L para a complexação do possível alumínio residual e lavadas a seguir.

Para a reticulação foi utilizada a seguinte relação: para 1g de microesferas úmidas adicionar 1,5 mL de solução de glutaraldeído 2,5 % (v/v), deixando em contato por 24 horas.

Em ambos os casos a reticulação é realizada com a finalidade de aumentar a resistência mecânica das microesferas e torná-las insolúveis em soluções ácidas. Se o polímero for tratado com um reagente que contenha dois ou mais grupos funcionais reativos, as moléculas podem ser estabilizadas por ligações intermoleculares ou ligações cruzadas.<sup>52</sup>

#### **3.2.4. Microencapsulação**

O processo de microencapsulação de DS também foi realizado. No processo de preparação das microesferas, já descrito anteriormente no item 3.2.3, foi adicionado à solução QTS 4% 1g de DS sob agitação, antes da etapa de coagulação.

Houve muita dificuldade durante a fabricação das microesferas devido a insolubilidade do DS em meio ácido, ocorrendo freqüente entupimento da agulha e perda de material.

O material incorporado fica retido na microesfera de forma não homogênea o que confere uma desvantagem na liberação. Em busca de uma metodologia mais eficiente, solubilizou-se o DS em etanol antes da sua incorporação à solução de QTS 4% (p/v) e também fez-se uma solubilização

inicial da QTS e DS em solução ácido acético 5% (v/v) e etanol na proporção 9:1.

A determinação da massa incorporada de DS foi feita com a destruição das microesferas em HCl 1% (v/v), centrifugação e leitura do sobrenadante, a qual demonstrou baixa encapsulação e perda de massa.

Tendo em vista as desvantagens mencionadas, optou-se pelo método de impregnação para interpenetrar o fármaco na matriz polimérica.

### **3.2.5. Impregnação**

#### **3.2.5.1. Processo de impregnação do diclofenaco de sódio**

A impregnação das microesferas foi realizada em uma solução de DS em metanol-água (2:1), durante 24 horas sob agitação constante. Após este período, as microesferas foram lavadas rapidamente com água gelada para retirada do excesso de DS superficial. A seguir, foram secas a temperatura ambiente. Após a secagem as microesferas perdem cerca de 90% do seu peso.

#### **3.2.5.2. Determinação da massa de DS impregnada nas microesferas**

Para determinar a massa de DS impregnada foi destruído 1g de microesferas úmidas e mantido sob agitação constante em 30 mL de metanol por 20 minutos. Em seguida a solução foi filtrada e lida em  $\lambda_{\text{máx}}$  280nm. A concentração de DS foi determinada através da curva de calibração previamente feita em metanol. A partir disso, foi calculada a massa de DS impregnada em MRE e MRG.

### 3.2.6. Liberação in vitro de DS

#### *Controle da liberação isolada de DS*

A liberação de DS foi realizada com bateladas individuais de MRE e MRG secas, que foram transferidas para sistemas contendo 50 mL de solução tampão (pH 1,2; 6,8 e 9,0). A temperatura foi mantida constante em 37°C em um banho termostaticado com agitação horizontal em 100 rpm.<sup>8</sup> As bateladas foram mantidas por 2 horas em pH 1,2; 4 horas em pH 6,8; 6 horas em pH 9,0; totalizando 12 horas.

#### *Controle da liberação seqüencial de DS*

Esta liberação foi realizada utilizando-se apenas uma batelada de MRE e MRG secas, as quais foram transferidas pelos diferentes valores de pH, simulando o TGI. Foram mantidas 2 horas no pH 1,2; transferidas para o pH 6,8, mantidas durante 4 horas e finalmente transferida para o pH 9,0 onde ficaram por 6 horas, totalizando 12 horas. A temperatura foi mantida constante em 37°C em um banho termostaticado com agitação horizontal em 100 rpm.<sup>8</sup>

Em ambos os casos, alíquotas de 1 mL foram retiradas, após homogeneização do sistema reacional em intervalos de 1 hora. A cada alíquota foi adicionado 2 mL de metanol para a solubilização do DS. A leitura foi realizada por espectrofotometria em  $\lambda_{\text{máx}}$  280nm e foi usado para cada pH sua respectiva curva de calibração.

### 3.2.6.2. Curvas de Calibração

As curvas de calibração utilizadas para a determinação das diferentes concentrações de DS e conseqüentemente da massa de DS liberada, foram feitas em solução metanol-solução tampão (2:1), utilizando-se sempre  $\lambda_{\text{máx}}$  280nm.

A absorbância foi plotada em função do tempo, obtendo-se as curvas de calibração para cada pH.

### 3.2.6.3. Cálculo da porcentagem de DS liberada

A partir da massa de DS liberada ( $m_{\text{liberada}}$ ), determinada pela concentração dada pela leitura nas curvas de calibração previamente validadas, o cálculo da porcentagem de DS liberado em cada pH foi feito a partir da Equação 3.

$$\% \text{ DS liberada} = \frac{m \text{ liberada}}{m \text{ impregnada}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

### 3.2.7. Liberação seqüencial

Utilizando-se a Equação 3, obtém-se os valores da porcentagem de DS liberado, mas neste caso, os valores do pH 6,8 deverão ser somados ao último valor do pH 1,2; assim como os valores de pH 9,0, somados ao último valor do pH 6,8; pois este é um processo cumulativo.

### 3.2.8. Determinação do grau de intumescimento (GI)

A determinação do grau de intumescimento foi realizada em soluções tampões pH 1,2, pH 6,8, pH 8,0, pH 9,0 e pH 9,77.

As microesferas secas em estufa foram inicialmente pesadas e mantidas nas soluções tampões de pH, a 37°C, em intervalos de 5 minutos foram retiradas, secas em papel filtro para retirar o excesso de água e pesadas novamente. O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t foi calculado pela Equação 4.

$$GI = ( W_t - W_o ) / W_o \quad \text{(Equação 4)}$$

onde  $W_t$  e  $W_o$  são as amostras pesadas no tempo t e no estado seco, respectivamente.

### 3.2.9. Determinação do grau de reticulação (GR)

O grau de reticulação foi realizado, pesando-se 1g de microesferas não reticuladas úmidas e 1g de microesferas reticuladas úmidas (MRE e MRG), estas, a seguir, foram secas em estufa a 50°C e pesadas novamente. O grau de reticulação foi calculado pela Equação 5.

$$GR = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

onde  $m_2$  e  $m_1$  são as massas das microesferas reticuladas secas e das microesferas não reticuladas secas, respectivamente.

### 3.2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia interna e externa das microesferas MRE e MRG vazias e impregnadas foi examinada através de micrografias realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). As amostras foram secas em estufa a 50°C, algumas foram seccionadas transversalmente, colocadas em estabes; recobertas com ouro e micrografadas e analisadas através da microsonda de energia dispersiva de raio- X - EDX. Foi analisado também o tamanho médio das microesferas MRE e MRG.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diclofenaco de sódio é um fármaco utilizado no tratamento inicial de doenças reumáticas inflamatórias e degenerativas, bem como para o tratamento de estados dolorosos causados por inflamação de origem não-reumática. Sua administração se dá por via intramuscular e por via oral, tendo esta última como consequência a passagem através do TGI por vários valores de pH. Assim, procuramos, neste estudo nos aproximar das condições fisiológicas, em relação ao pH, estudando a liberação do DS em soluções tampões simulando os diversos valores fisiológicos de pH. O sistema de liberação utilizado tem a quitosana como membrana polimérica, por ser biodegradável e conferir as características necessárias para o processo da liberação.

### 4.1. FORMAÇÃO DAS MICROESFERAS

Neste trabalho, dois tipos de microesferas foram preparados pelo método de separação de fases, via coacervação simples e seus resultados comparados posteriormente.

Segundo este método, a formação das microesferas resulta de um fenômeno de superfície e ocorre devido a interação entre a solução polimérica (solução de quitosana) e um meio coagulante (solução de hidróxido de sódio 2mol/ L) que induz a separação de fases, precipitando a membrana polimérica. A precipitação da quitosana cria uma fase coacervada rica em quitosana.

Ensaio utilizando microesferas formadas apenas com quitosana na proporção 3% p/v, ficaram quebradiças e inadequadas para uma posterior reticulação.

As microesferas de quitosana reticuladas com epícloridrina (MRE) foram preparadas a partir da mistura de quitosana-talco na proporção final de 4% de QTS (p/v) e 0,5% de talco (p/v). A quitosana é um biopolímero hidrofílico que, devido a presença dos grupos amino, é solúvel em soluções ácidas diluídas e forma hidrogel com a água. O talco ou silicato de magnésio é um excipiente utilizado para evitar a agregação das microesferas. As microesferas formadas são estruturas monolíticas esféricas e apresentam tamanho médio 0,962 mm, conforme parâmetros tais como: tamanho da agulha (método de produção), viscosidade da solução polimérica, tempo e velocidade de agitação.

As microesferas de quitosana reticuladas com glutaraldeído (MRG) foram preparadas a partir de uma solução de quitosana 4% (p/v), 0,5% de talco e 0,03% de pó de alumínio. O objetivo da utilização do pó de alumínio foi de proporcionar maior porosidade à microesfera. As microesferas formadas são menos esféricas, devido ao desprendimento de hidrogênio durante a formação e apresentam tamanho médio 1,295 mm.

Uma análise de microsonda de energia dispersiva de raio-X (EDX) das microesferas MRG foi realizada para verificar se havia ou não a presença de alumínio residual nas MRG prontas para a liberação e foi constatado que o alumínio colocado no início para a formação da microesfera é totalmente eliminado, seja pela reação com o NaOH, ou pelo processo de quelatação com o EDTA .

#### 4.2. ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS ESFERAS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDUTA (MEV)

Para a realização das fotomicrografias, as microesferas inteiras e seccionadas ao meio foram revestidas por uma camada de ouro. A superfície e morfologia externa e interna, com e sem DS das microesferas MRE e MRG são mostradas nas FIG. 8, 9, 10 e 11.

Nas FIG. 8 e 9 são observadas morfologia externa de uma microesferas reticuladas com epicloridrina.

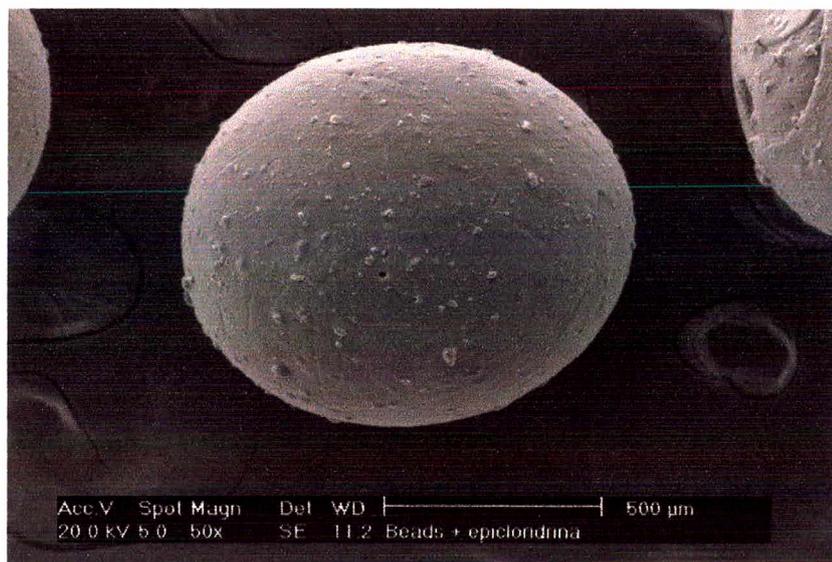


Figura 8 : Microscopia eletrônica de varredura de uma microesfera reticulada com epicloridrina e sem DS.

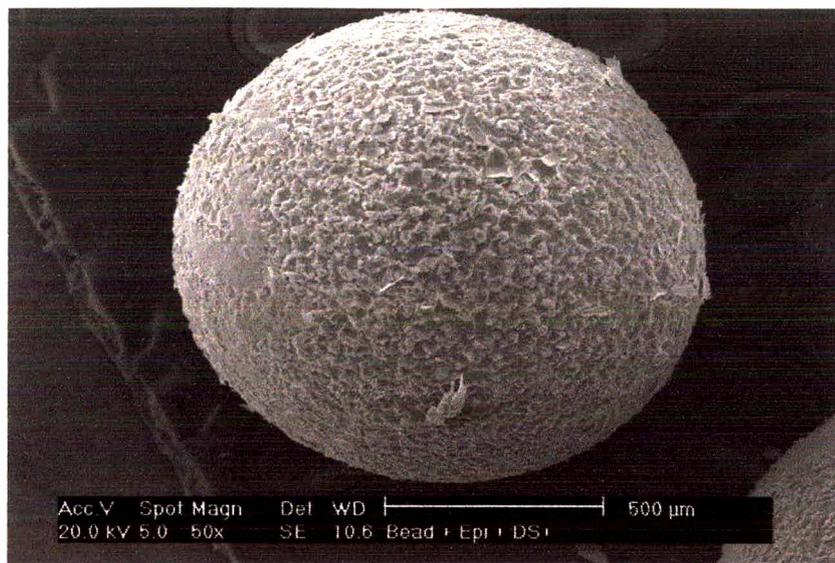


Figura 9 : Microscopia eletrônica de varredura de uma microesfera MRE impregnada com DS.

Ao comparar a morfologia da parede externa de uma microesfera sem DS impregnado (FIG. 8) com a da microesfera MRE impregnada com DS (FIG. 9), é observado a aderência de partículas que são atribuídas ao DS, que no processo de impregnação, adere e penetra na parede da esfera.

Neste caso, as microesferas apresentam uma distribuição uniforme do DS através da matriz polimérica como uma dispersão de partículas.

Nas FIG. 10 e 11 são observadas as morfologias de microesferas porosas reticuladas com glutaraldeído.

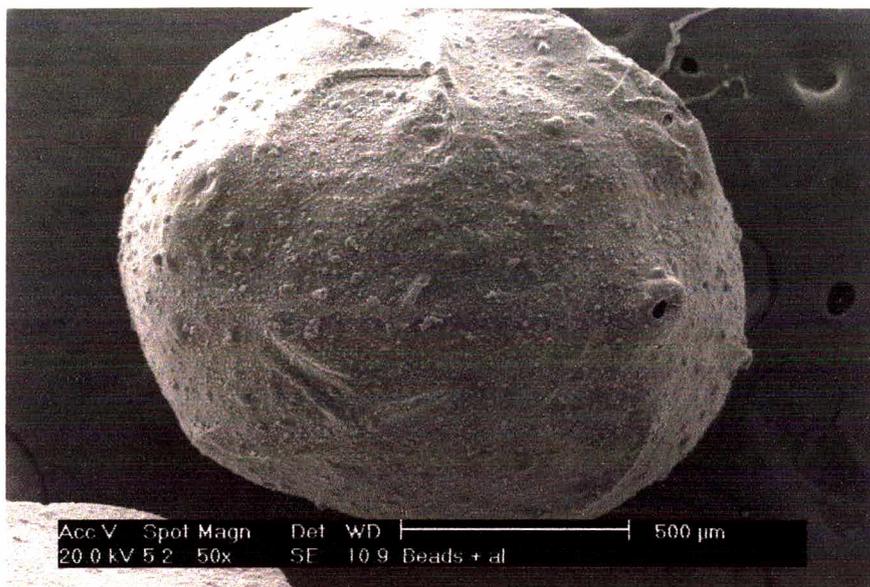


Figura 10 : Microscopia eletrônica de varredura de uma microesfera porosa obtida a partir do desprendimento de hidrogênio durante a reação do pó de alumínio com o NaOH e posteriormente reticulada com glutaraldeído, sem diclofenaco de sódio.

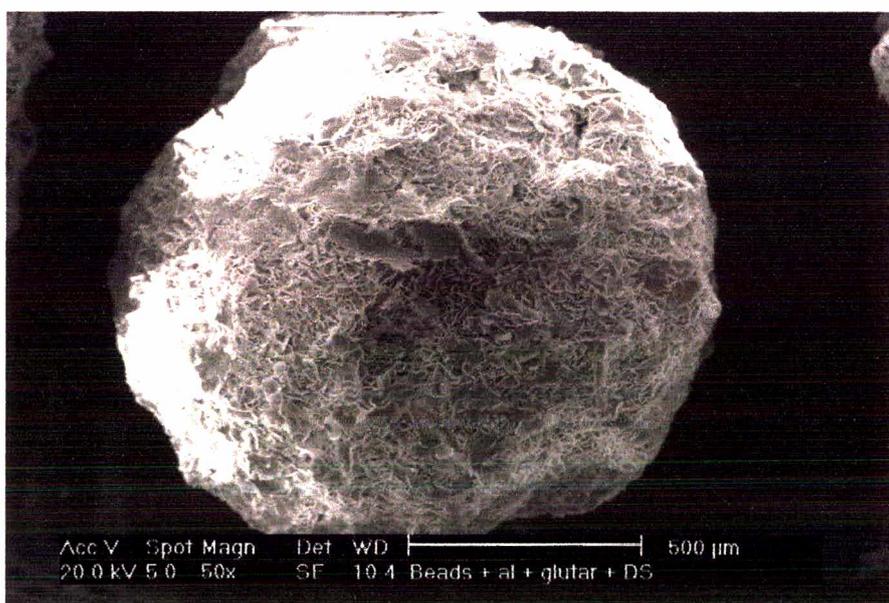


Figura 11 : Microscopia eletrônica de varredura de uma microesfera porosa MRG impregnada com DS

Comparativamente, as FIG. 10 e 11 mostram a presença do DS após a impregnação das MRG.

A incorporação ou a impregnação de fármacos em solução confere à esfera uma homogeneidade da sua parede com seu encapsulado.<sup>81</sup> Outros trabalhos incorporam seu encapsulado na forma sólida obtendo assim, aglomerados em determinadas regiões, conferindo pequena homogeneidade da parede da microesfera e desvantagem no processo de liberação.

A escolha de se impregnar as microesferas com DS em solução foi devido ao fato da insolubilidade deste na solução de quitosana. Caso fosse incorporado o fármaco em solução, a viscosidade da solução de quitosana teria sido alterada. Além disso, a solução de DS-metanol para impregnação pode ser reutilizada, pois é estável durante 15 dias a 5°C.<sup>82</sup>

Microesferas MRE e MRG permaneceram durante 24 horas em solução de metanol-água 2:1 e após este período, fotomicrografias foram tiradas mostrando que não ocorre nenhuma alteração nas esferas.

O processo de preparação produz microesferas esféricas e porosas que variam conforme MRE e MRG. As microesferas MRE apresentam ótima esfericidade e menor porosidade enquanto que as MRG apresentam esfericidade razoável e alta porosidade, devido a liberação de hidrogênio durante a reação do alumínio e NaOH e também pela cadeia do glutaraldeído ser maior que a da epícloridrina, permitindo assim maior espaço entre as cadeias de quitosana.

A FIG.12, mostra uma microcápsula formada durante o processo de formação das microesferas através da liberação de hidrogênio que faz com que a microesfera formada apresente um núcleo definido claramente resultando em uma microcápsula. Dependendo da intensidade da liberação de hidrogênio tem-se uma população mista de microesferas e microcápsulas porosas de quitosana, antes da reticulação.

### 4.3. GRAU DE RETICULAÇÃO

As microesferas foram submetidas a um processo de reticulação, que consiste no tratamento das esferas com epícloridrina, no caso das MRE ou glutaraldeído, no caso das MRG, causando o endurecimento da parede e diminuição dos poros.

O tratamento com ácido fórmico na presença de ácido sulfúrico tem sido realizado em cápsulas de gelatina<sup>60</sup> e em fibras<sup>80</sup> objetivando o aumento da resistência através do endurecimento.

O efeito causado pelo tratamento químico, no que se refere a porosidade, foi bem evidenciado na seqüência de fotomicrografias tiradas da seção transversal da microcápsula não reticulada, representada na FIG. 12 e reticulada com glutaraldeído representada na FIG. 13.

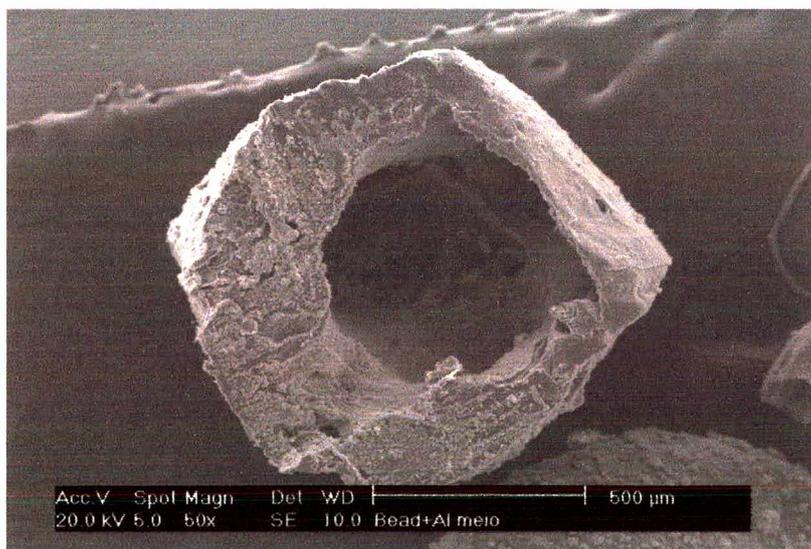


Figura 12 : Microscopia eletrônica de varredura da microcápsula porosa de quitosana sem reticulação

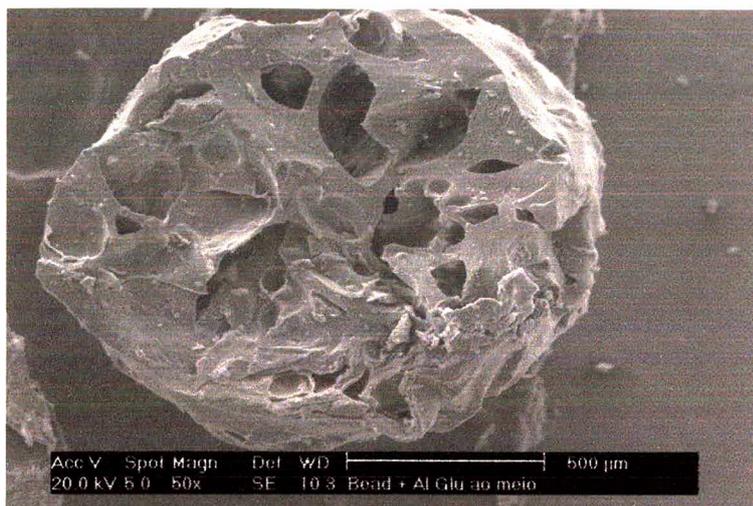


Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura da microesfera formada após reticulação com glutaraldeído

As microesferas de quitosana apenas, apresentaram homogeneidade quanto a sua estrutura interna, ou seja, não houve a formação de microcápsulas.

Na FIG. 14, a representação de uma microesfera seccionada, mostra a reticulação com epiclorigidrina com compactação da superfície externa e interna. Em comparação com a FIG. 13, apresenta poucos e pequenos poros e estrutura polimérica compacta.

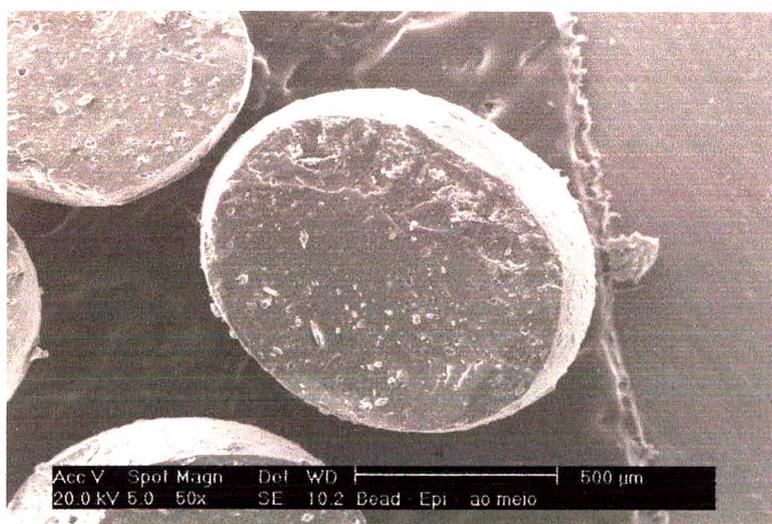


Figura 14 : Microscopia eletrônica de varredura de uma microesfera reticulada com epiclorigidrina

O grau de reticulação foi calculado para ambas as microesferas conforme o item 3.2.9., página 47.

Os resultados obtidos para MRE e MRG foram 25% e 64%, respectivamente.

Os agentes reticulantes bifuncionais usados ligam-se em sítios reacionais diferentes na quitosana. Isto é, o glutaraldeído liga-se à quitosana através dos seus aldeído com os grupos amino da quitosana. ( FIG.15)

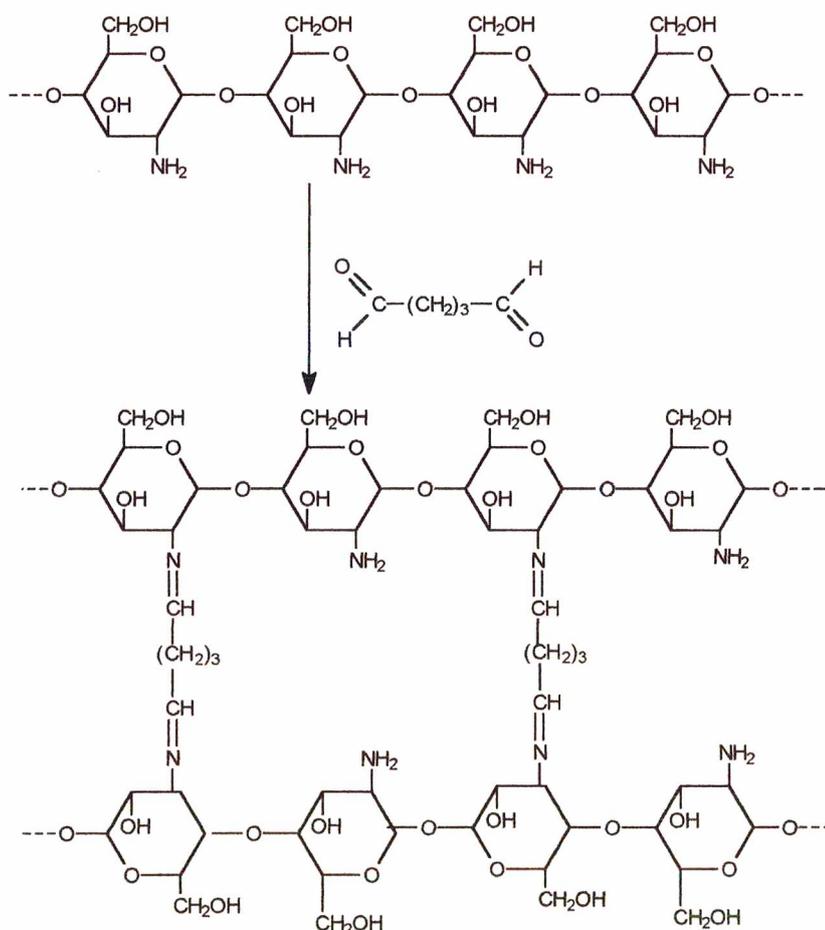


Figura 15. Representação da reticulação da quitosana com glutaraldeído

A epícloridrina se liga através dos átomos de carbono resultantes da ruptura do anel epoxi e da remoção do cloro com os grupos hidroxila do carbono 6 da quitosana, deixando assim, todos os grupos amino da quitosana livres. (FIG. 16)

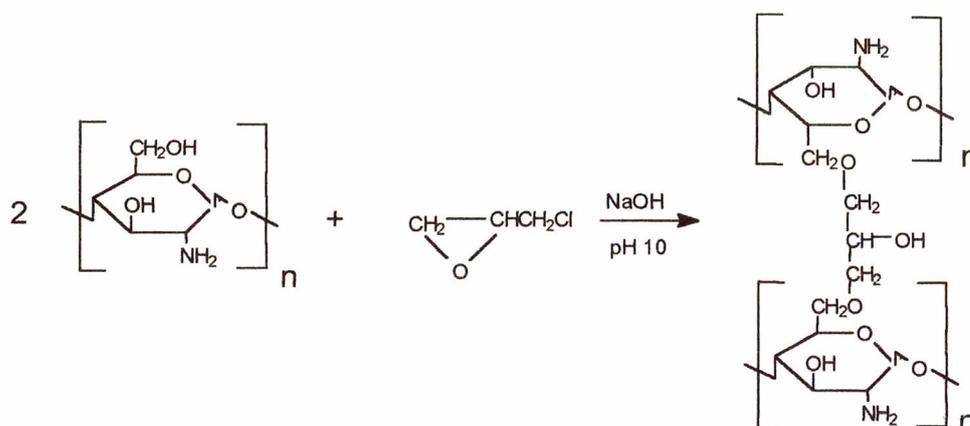


Figura 16: Representação da reticulação da quitosana com epícloridrina

#### 4.4. GRAU DE INTUMESCIMENTO

O estudo do grau de intumescimento das microesferas MRE e MRG foi realizado conforme o item 3.2.8., página 46.

Fatores tais como o grau de reticulação e hidrofiliicidade / hidrofobicidade do polímero influenciam no grau de intumescimento e na sensibilidade ao pH, isto é, na importância da resposta às mudanças no pH. <sup>21,44</sup>

A TAB. 1 apresenta os valores obtidos para as microesferas MRE e MRG no período total de 120 minutos em diferentes valores de pH.

Tabela 1 : Grau de intumescimento das microesferas MRE e MRG variando pH

pH	MRE	MRG
1,2	3,02	1,10
6,8	1,68	0,466
8,0	0,631	0,377
9,0	0,651	0,783
9,77	0,791	0,734

As microesferas MRE incham, em meio ácido, cerca de três vezes mais que as reticuladas com glutaraldeído, pois há maior número de  $\text{NH}_2$  disponível.

Geralmente o processo de intumescimento em  $\text{pH} < 6$  acarreta a protonação dos grupos amino no gel e processo de relaxamento da estrutura de quitosana. Apesar da protonação necessitar de pouco tempo, o processo pode ser muito mais complexo. Os grupos amino são protonados conduzindo a dissociação das ligações de hidrogênio, as quais induzem ao intumescimento do gel.<sup>44, 73</sup>

Os GRAF. 1 e 2 são exemplos do efeito do grau de reticulação sobre o intumescimento das microesferas em valores de pH diferentes.

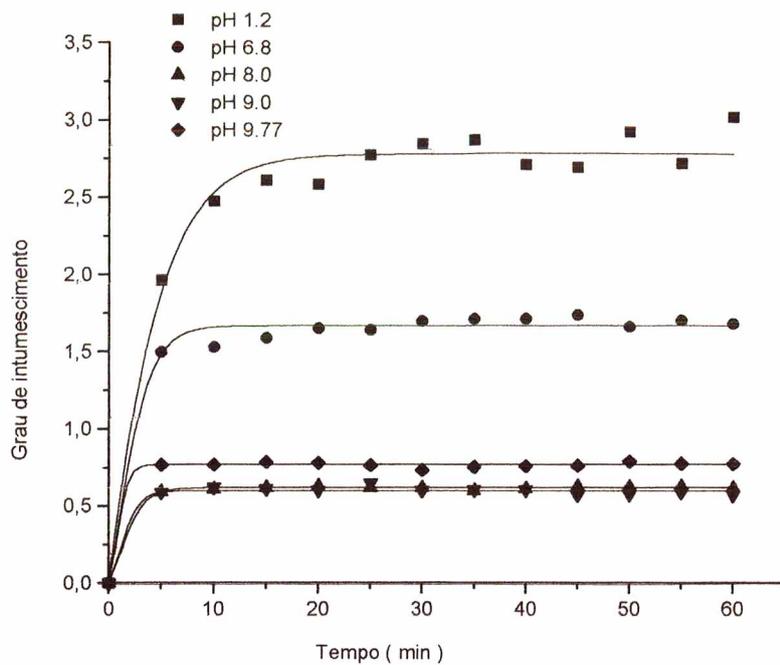


Gráfico 1 : Grau de intumescimento das MRE em diferentes valores de pH

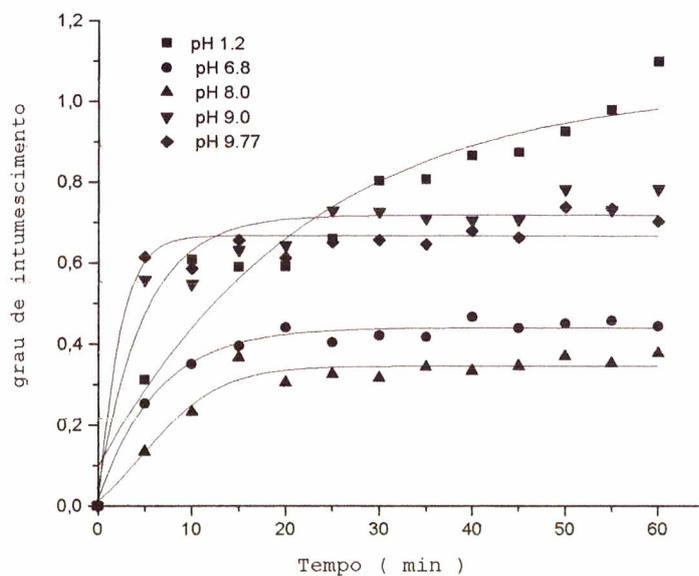


Gráfico 2: Grau de intumescimento das MRG em diferentes valores de pH

Observou-se que o maior grau de intumescimento ocorreu em pH 1,2 em ambos os casos.

Isto reflete o efeito da natureza do agente reticulante sobre o grau de intumescimento. À medida que o número de grupos  $\text{NH}_2$  livres é maior para MRE o número de interações entre a água e o suporte aumenta havendo um maior intumescimento da esfera.

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DA MASSA DE DS IMPREGNADO NAS MICROESFERAS

Após impregnação as microesferas foram tratadas como mencionado no item 3.2.5.2., página 43.

As microesferas intumescidas foram colocadas em solução metanol-água 2:1 na presença de DS para impregnação deste fármaco.

Os resultados obtidos da quantidade de massa impregnada de DS para cada microesfera, foram 441 mg/ g seca para MRG e 200 mg / g seca para MRE. Cerca de 90% do peso das microesferas úmidas é perdido após a secagem.

O dobro de valor obtido para a impregnação do DS nas microesferas MRG em relação a impregnação nas microesferas MRE é devido, provavelmente, a maior porosidade das microesferas MRG obtida pelo artifício da liberação de hidrogênio na reação do pó de alumínio com o NaOH.

A influência da porosidade sobre a impregnação do DS em microesferas de quitosana, obtida pelo artifício descrito anteriormente, foi confirmado em experimentos de impregnação do DS em microesferas de quitosana (solução inicial de 5% p/v) porosas e não porosas, ambas reticuladas com epicloridrina. Sendo que, para as microesferas não porosas foi observado um valor de impregnação de 170 mg / g seca enquanto para as microesferas porosas o valor foi de 470 mg / g seca.

A determinação da massa de DS foi realizada por leitura espectrofotométrica UV.

Segundo Córdova e colaboradores, métodos espectrofotométricos oferecem vantagens práticas e significativa economia frente a outros métodos. Porém, em casos de preparações farmacêuticas, que contém outros excipientes além do DS, interferências significantes ocorrem. Assim, foi desenvolvido um método mais sensível e seletivo usando absorção UV de fase sólida; para a determinação do DS em vários produtos comerciais, tais como tabletes, cápsulas e ampolas. É descrito como a fixação de DS em resina em pH 7,0 e a medida direta da absorbância na fase sólida a 281 e 400nm.<sup>82</sup>

A literatura destaca a contração do encapsulado, após secagem no processo de microesferas e microcápsulas, como um fenômeno de grande importância para a área farmacêutica, de forma que medicamentos em soluções podem ser convertidos em sólidos, evitando incompatibilidades e disfarçando odores desagradáveis.<sup>60</sup>

#### 4.6. LIBERAÇÃO IN VITRO DO DICLOFENACO DE SÓDIO

Objetivando o estudo da liberação do DS impregnado em um meio próximo do fisiológico, o estudo foi realizado por controle da liberação isolada do DS e controle da liberação seqüencial do DS. Ambos em valores de pH fisiológicos simulados, a 37°C.

#### 4.6.1. Controle da liberação isolada de DS

O GRAF. 3 representa uma curva do processo de liberação do DS ,das MRG nos valores de pH 1,2, 6,8 e 9,0, no total de 12 horas. Os valores de porcentagem de liberação do DS estão relatados na TAB. 2.

Tabela 2. Valores da porcentagem de liberação isolada de DS das MRG

Tempo (horas)	pH 1,2 (%)	pH 6,8 (%)	pH 9,0 (%)
0,33	0	-	-
0,66	0	-	-
1	0	-	-
1,33	0	-	-
1,66	0	-	-
2	0	-	-
3	-	8,4	-
4	-	10,4	-
5	-	14	-
6	-	13,7	-
7	-	-	8,0
8	-	-	10
9	-	-	12,7
10	-	-	13,7
11	-	-	13,4
12	-	-	14,3

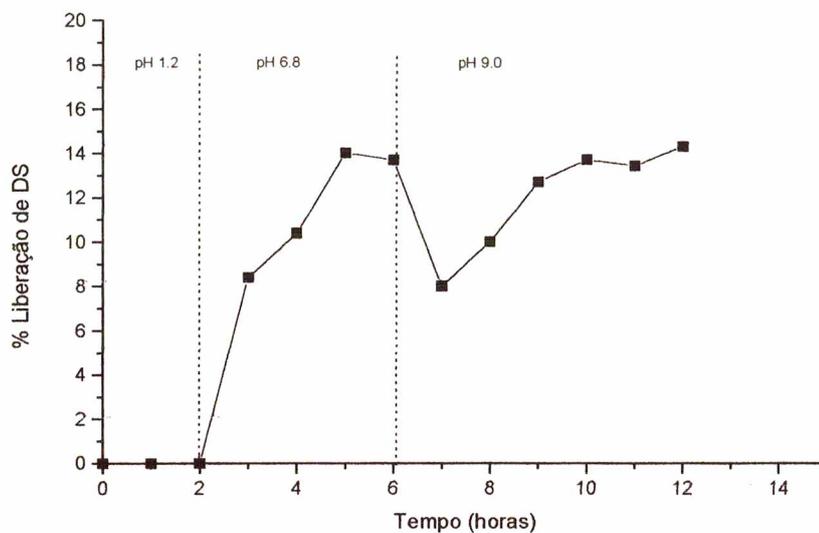


Gráfico 3: Liberação isolada de DS das MRG

Para as microesferas MRE, os mesmos procedimentos foram tomados. O GRAF. 3 representa uma curva de liberação de DS nos valores de pH 1,2, 6,8 e 9,0 , totalizando 12 horas. Os valores de DS liberada estão mencionados na TAB. 3.

Tabela 3. Valores da porcentagem de liberação isolada de DS das MRE

Tempo (horas)	pH 1,2 (%)	pH 6,8 (%)	pH 9,0 (%)
0,33	0	-	-
0,66	0	-	-
1	0	-	-
1,33	0	-	-
1,66	0	-	-
2	0	-	-
3	-	22,5	-
4	-	33,1	-
5	-	29,7	-
6	-	34,4	-
7	-	-	28,3
8	-	-	33,1
9	-	-	32,4
10	-	-	31,8
11	-	-	33,7
12	-	-	30,4

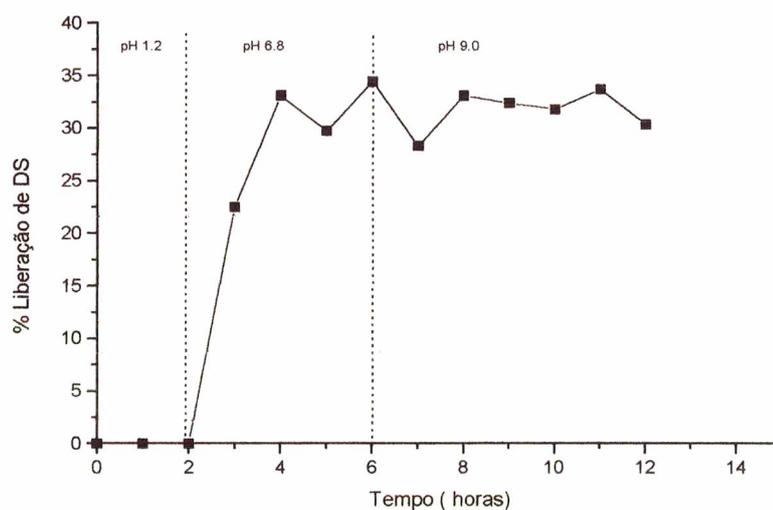


Gráfico 4: Liberação isolada de DS das MRE

A liberação isolada, em ambos os casos, não reflete a realidade fisiológica, mas dá a idéia da influência da natureza do agente reticulante e do grau de intumescimento que MRE e MRG apresentam. Além desses dois fatores, deve-se considerar as propriedades da droga, tais como tamanho, carga e hidrofiliçidade. Sendo assim, ocorre o intumescimento, facilitando a liberação da droga, mas dependendo do meio. É bem exemplificado no meio ácido (pH 1,2) onde para ambas microesferas há o maior grau de intumescimento mas a liberação é zero.

O intumescimento inicial serve para facilitar a permeação do DS no meio em que ele é solúvel. Esta é uma das vantagens do uso da quitosana como suporte para a liberação do DS, pois ao chegar ao lugar de ação da droga, o veículo já está pronto para a liberação.

Uma menor liberação em pH ácido também foi observado no estudo da liberação da teofilina a partir de microesferas de caseína em fluidos gástrico e intestinal simulados, a pH 1,5 e pH 7,4, respectivamente .<sup>26</sup>

#### **4.6.2. Controle da liberação seqüencial de DS**

Esta liberação foi realizada utilizando-se apenas uma batelada de MRE e MRG secas, que foram transferidas pelos valores de pH 1,2, 6,8 e 9,0.

O GRAF.5 mostra uma curva de liberação de DS para MRG .Os valores obtidos no período total de 12 horas estão listados na TAB. 4.

Tabela 4. Valores da porcentagem de liberação seqüencial de DS das MRG

Tempo (horas)	pH 1,2 (%)	pH 6,8 (%)	pH 9,0 (%)
1	0	-	-
2	0	-	-
3	-	8,4	-
4	-	9,95	-
5	-	12,7	-
6	-	13,7	-
7	-	-	16,8
8	-	-	18,5
9	-	-	19,2
10	-	-	20,3
11	-	-	20,6
12	-	-	20,5

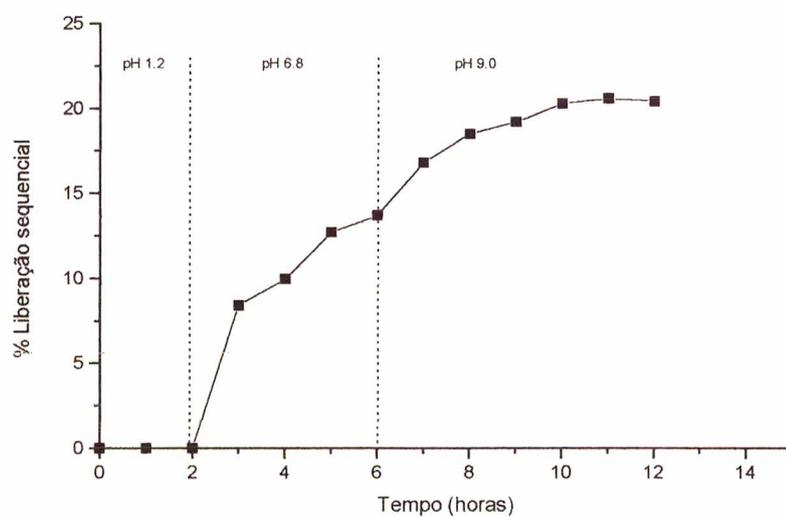


Gráfico 5: Liberação seqüencial de Ds das MRG

As microesferas MRE apresentam a curva de liberação seqüencial representada no GRAF.6. Os valores obtidos estão listados na TAB. 5.

Tabela 5. Valores da porcentagem de liberação seqüencial de DS das MRE

Tempo (horas)	pH 1,2 (%)	pH 6,8 (%)	pH 9,0 (%)
1	0	-	-
2	0	-	-
3	-	22,5	-
4	-	33,1	-
5	-	32,4	-
6	-	37,0	-
7	-	-	38,9
8	-	-	38,9
9	-	-	38,8
10	-	-	38,8
11	-	-	38,7
12	-	-	38,7

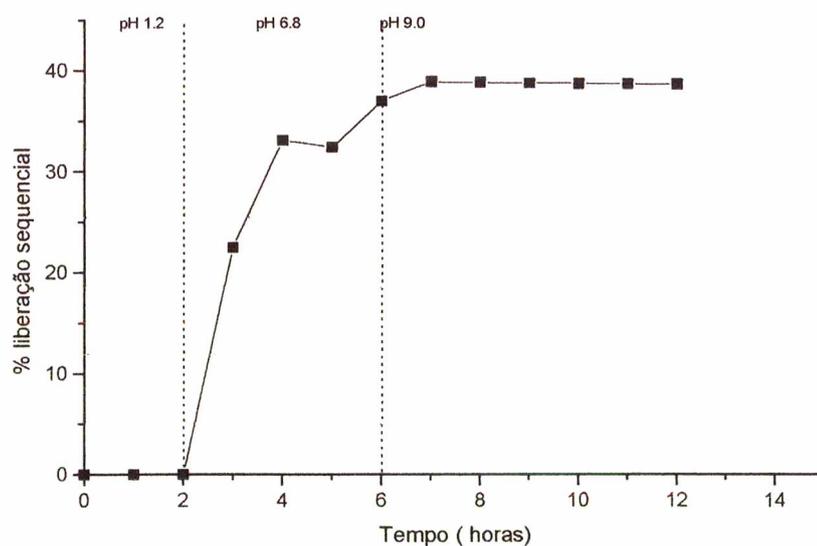


Gráfico 6: Liberação seqüencial de DS das MRE

A quantidade de DS foi calculada a partir da absorvância nos intervalos de tempo de 1 hora. Através dos gráficos obtidos pode-se observar que a liberação para MRG ocorre até aproximadamente 10 horas e após este tempo, a liberação alcança um platô.

Observando os gráficos 5 e 6, verifica-se que quanto maior o número de grupos  $\text{NH}_2$  livres maior o intumescimento e a liberação de DS, pois 38,7% de DS foi liberado de microesferas MRE e 20,5% das microesferas MRG após 12 horas.

Após este estudo *in vitro* é sugerido que as microesferas MRE oferecem vantagens tanto na sua formação como na liberação do DS, pois o tempo de preparo é menor, são mais resistentes e a liberação é maior, quando comparada com às microesferas MRG.

Microesferas de caseína reticuladas com glutaraldeído liberaram somente 20% de 5- fluoracil incorporada no suporte. A liberação ocorreu em tampão fosfato na ausência de protease.<sup>40</sup>

A seqüência de fotomicrografias apresenta as microesferas MRE e MRG após a liberação isolada nos diferentes valores de pH. (FIG. 17,18 e 19) e (FIG.20, 21 e 22)

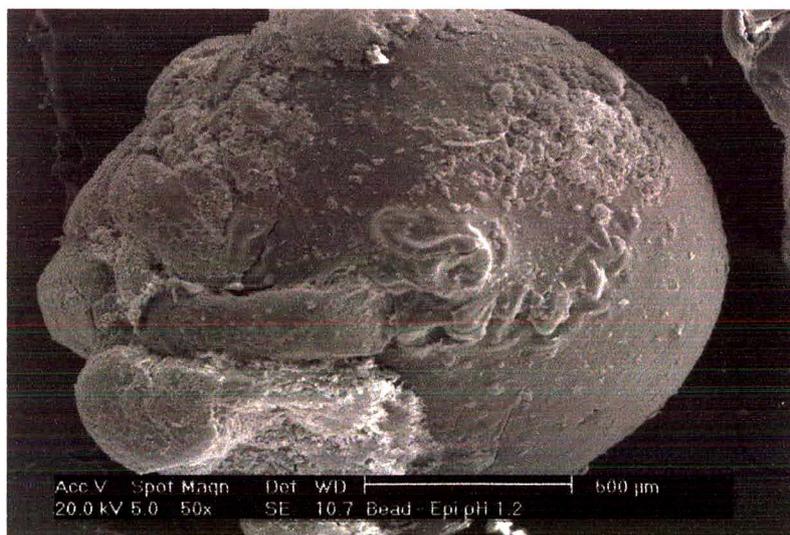


Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura da microesfera MRE após 2 horas em pH 1,2

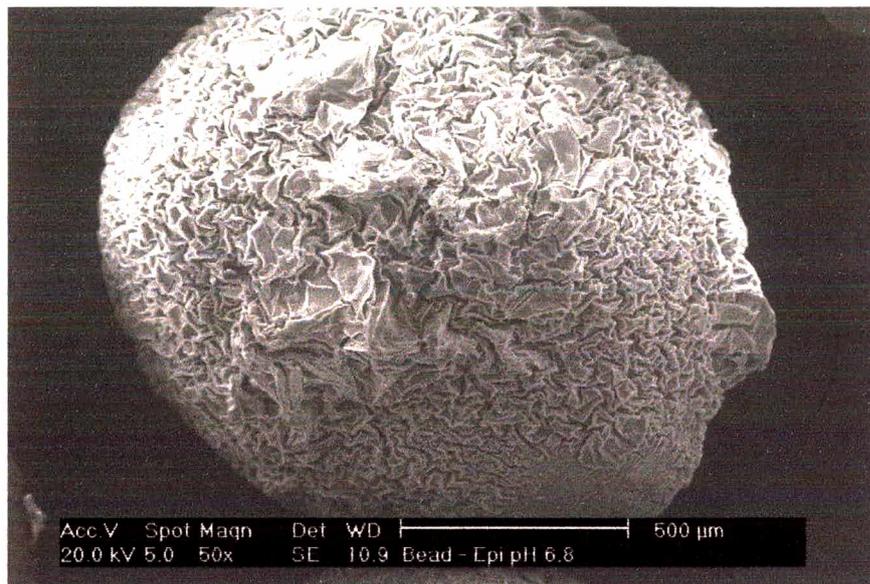


Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura da microesfera MRE após 4 horas em pH 6,8



Figura 19 : Microscopia eletrônica de varredura da microesfera MRE após 6 horas em pH 9,0

A quitosana é um suporte catiônico com alta densidade de carga positiva. Com materiais carregados negativamente, a quitosana interage fortemente levando a uma neutralidade elétrica. A curva de titulação da quitosana nos indica que esta possui um ponto de equivalência em  $\text{pH} \sim 6.3$ .<sup>81</sup>

Por outro lado, como o DS apresenta  $\text{pK}_a$  de 4,0, estaria presente na forma desprotonada, enquanto o suporte de quitosana estaria na forma protonada neste  $\text{pH}$ , apresentando assim uma interação iônica entre as espécies, diminuindo a porcentagem de liberação do fármaco. Acima de  $\text{pH} 4,0$ , o suporte estaria mais desprotonado, onde os grupos amino,  $\text{NH}_2$ , da quitosana exerceriam uma menor atração sobre o fármaco facilitando assim, a sua liberação.

A microesfera MRE após 2 horas em  $\text{pH} 1,2$  está representada na FIG. 20.

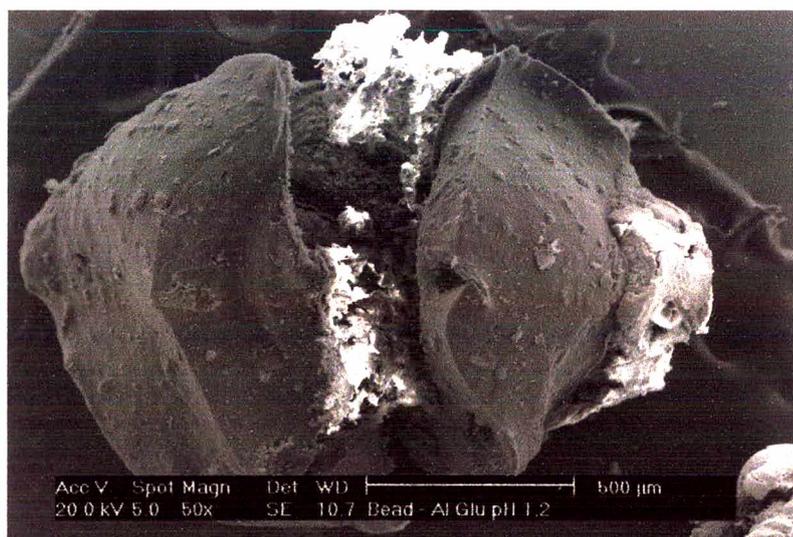


Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura da microesfera MRG após 2 horas em  $\text{pH} 1,2$

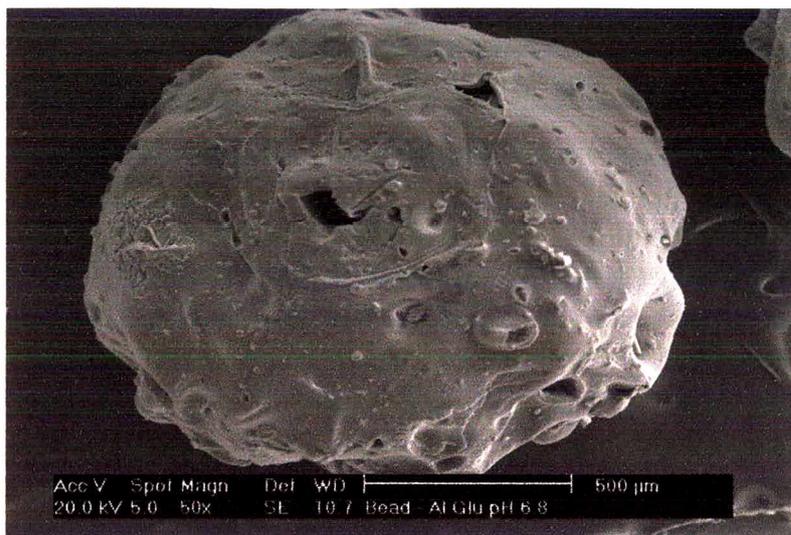


Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura da microesfera MRG após 4 horas em pH 6,8

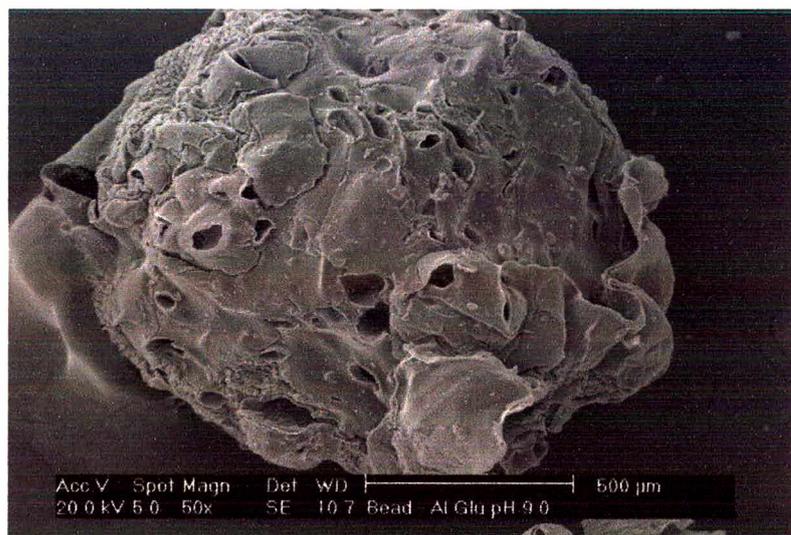


Figura 22 : MEV da microesfera MRG após 6 horas em pH 9,0

Nas FIG. 21 e 22, observa-se grande modificação da superfície externa, com processo de erosão da parede mais acentuado no pH 9,0, onde as microesferas permaneceram mais tempo.

Comparando-se as FIG. 19 e 22, observa-se que há diferença em relação a parede externa, a microesfera MRG apresenta maior erosão e modificação, provavelmente por apresentar maior porosidade.

Por análise de microsonda de energia dispersiva (EDX), foi verificado a presença significativa de sódio e cloro na superfície da microesfera MRG em pH 1,2 , FIG. 23, porém foi observado que não ocorre a liberação neste meio, devido a atração do DS pela quitosana e pela insolubilidade do fármaco em meio ácido.

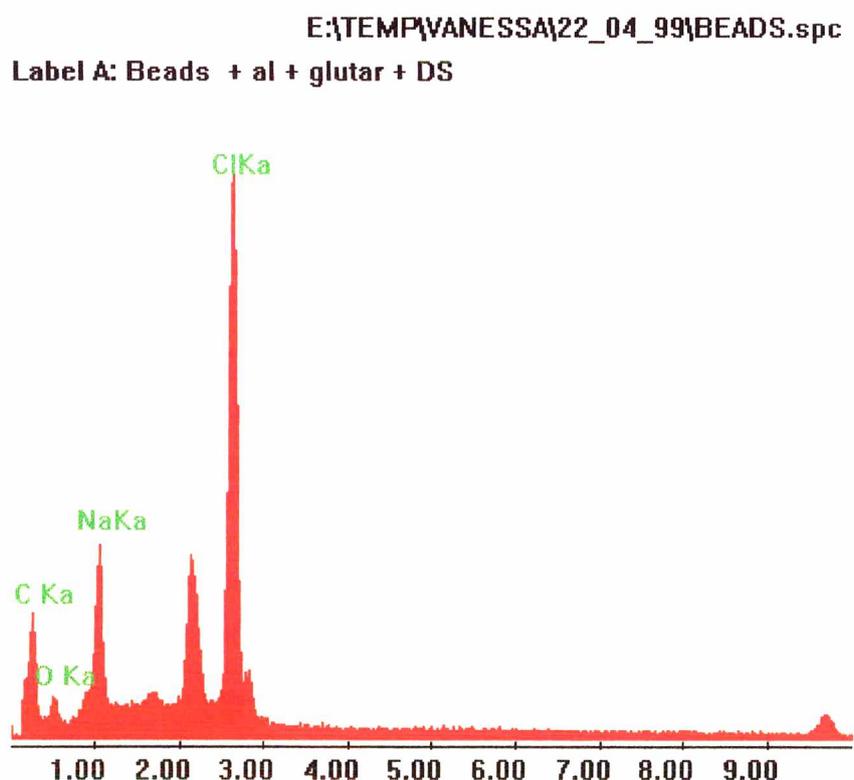


Figura 23: Análise por microsonda de energia dispersiva de raio-X, presença significativa de cloro e sódio nas microesferas MRG

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados encontrados neste trabalho pode-se concluir que:

- a matéria-prima quitosana, com grau de desacetilação de 85%, obtida da quitina proveniente da casca do camarão, mostra ser excelente constituinte do veículo para o processo de liberação do DS, tanto no que se refere a produção das microesferas como na liberação controlada do fármaco;
- o processo de reticulação das microesferas com dois agentes reticulantes diferentes, epícloridrina e glutaraldeído, permite a obtenção de microesferas mais resistentes e com variação no grau de reticulação e no grau de intumescimento;
- microesferas MRG, com maior grau de reticulação apresentam menor grau de intumescimento;
- o perfil de liberação apresentado pelo DS frente a variação do pH e do tempo, mostrou-se adequado pois a ingestão oral do medicamento tem como consequência a passagem deste por diferentes valores de pH no TGI;
- a menor liberação de DS, para ambas microesferas, em pH 1,2 é significativa tendo em vista que o estômago apresenta este pH e é onde ocorre a menor absorção do fármaco;
- a maior liberação do fármaco em pH intestinal simulado é um resultado significativo pois é neste pH que ocorre a maior absorção do fármaco;
- microesferas com maior grau de intumescimento liberam maior porcentagem de DS;
- microesferas MRE com maior grau de intumescimento apresentam maior porcentagem de liberação de DS após 12 horas em valores de pH fisiológico simulado;

- microesferas MRG, com maior porosidade apresentam maior grau de impregnação;
- o pó de alumínio, utilizado na preparação das microesferas MRG, é um artifício eficaz na formação de poros e no conseqüente aumento na porcentagem de impregnação;
- as microesferas MRE apresentam menor tempo de preparação, maior grau de intumescimento e apesar de obter menor porcentagem de impregnação, cerca de 40% do DS impregnado é liberado, enquanto que as microesferas MRG impregnam mais porém a liberação do DS é aproximadamente 20% o que sugere perda de fármaco.

De acordo com os resultados, as microesferas MRE e MRG, mostram-se com boas perspectivas para a liberação controlada de fármacos.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 368.
2. ISSELBACHER, J., BRAUNWALG, E., WILSON, J. et al. **Harrison's Principles of internal medicine**. 13ª ed. New York: McGraw-Hill, Inc, 1994. 2 v. V.1.
3. KOROLKOVAS, A. R. J., BURCKHALTER, J. H., **Química Farmacêutica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 732-33.
4. SALLMANN, A. R. The history of Diclofenac. **The American Journal of Medicine**, v. 80 (4B), p. 29-33, april 1986.
5. GIOVANNETTI, M., MACHADO, M., BORRELLI, M. et al. Necrose tecidual: Efeito colateral do diclofenaco de sódio, relato de casos e discussão da fisiopatologia. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Uni. S. Paulo**, v. 48, n. 1 p. 39-42, 1993.
6. LIU, C., KAO, Y., CHEN, S. et al. In vitro and in-vivo studies of the diclofenac sodium controlled- release matriz tablets. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, n. 5, p. 360-364, may 1995.
7. \_\_\_\_\_. **The merck index: na encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. Windholz, editor [et al.] 9 th. ed. Rahway, Merck, 1976.
8. PALOMO, M. E., BALLESTEROS, M. P., FRUTOS, P. Diclofenac sodium Microcapsules: In vitro Testing Considerations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, n. 3, p. 273-283, 1997.
9. ACIKGÖZ, M., KAS, K. S., ORMAN, M. et al. Chitosan microspheres Diclofenac sodium: I. application of factorial design and evaluation of release kinetics. **J. Microencapsulation**, v. 13, n. 2, p. 141-160, 1996.
10. PILLANS, P. I., O'CONNOR, N. Tissue necrosis and necrotizing fasciitis after intramuscular administration of diclofenac. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 29, p. 264-266, march 1995.
11. LIMA, E. M., OLIVEIRA, A. G., Atenuação da toxicidade tissular de fármacos antiinflamatórios não esteróides administrados, via intramuscular, pela encapsulação em transportadores coloidais. **Pharmacia Brasileira**, v. 7, n. 1 / 4, p. 5-9, março-abril 1999.
12. KRAJEWSKA, B., LESZKO, M., ZABORSKA, W. Urease Immobilized on Chitosan Membrane: Preparation and Properties. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 48, p. 337-350, 1990.

13. SANDFORD, P. A., HUTCHINGS, G. P. Chitosan- A natural, cationic biopolymer: commercial applications. In: YALPANI, M. **Industrial Polysaccharides: genetic engineering structure / property relations and applications**, p. 363-376, 1987.
14. KAS, H. S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. **Journal of Microencapsulation**, v. 14, n. 6, p. 689-711, 1997.
15. TOZAKI, H. KOMOIKE, J., TADA, C. et al. Chitosan Capsules for Colon-Specific Drug Delivery: Improvement of Insulin Absorption from the Rat Colon. **Journal of Pharmaceuticals Science**, v. 86, n. 9, p. 1016-1021, 1997.
16. FÁVERE, V. T. **Adsorção dos íons Cu (II), Cd (II), Ni (II), Pb (II) e Zn (II) pelos biopolímeros quitina e quitosana e pelas quitosanas modificadas**. Florianópolis, 1994. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
17. CHANDY, T., SHARMA, C. Chitosan matriz for oral sustained delivery of ampicilin. **Biomaterials**, v. 12, n. 12, p. 939-943, 1993.
18. RATKE, T. D., HUDSON, S. M. Review of Chitin and Chitosan as Fiber and Film Formers. **J.M.S.- Ver. Macromol. Chem. Phys.**, C34, n. 3, p. 375-437, 1994.
19. HIRANO, S., OHE, Y., ONO, H. Selective N-acylation of chitosan. **Carbohydrate research**, v. 47, p. 315-320, 1976.
20. OUNGBHO, K., MÜLLER, B. W. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 156, p. 229-237, 1997.
21. THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. Cross-linked Chitosan Microspheres Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44, p. 283-286, 1991.
22. MUZZARELLI, R., BALDASARRE, V., CONTI, F. et al. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. **Biomaterials**, v. 9, p. 247-252, 1988.
23. MACHIDA, Y., NAGAI, T., ABE, M. et al. Use of chitosan and hidroxypropylchitosan in drug formulation to effect sustained release. **Drug Design and Delivery**, v. 1, p. 119-130, 1986.
24. HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical uses. **Prog. Polym. Sci.**, v. 19, p. 663-702, 1994.
25. CHEN, R. H., TSAIH, M. L., LIN, W. C. Effects of Chain Flexibility of Chitosan Molecules on the Preparation, Physical and Release Characteristics of the Prepared Capsule. **Carbohydrate Polymers**, n. 31, p. 141-148, 1996.

26. LATHA, M. S., JAYAKRISHNAN, A. Glutaraldehyde Cross-linked Bovine casein Microspheres as a matrix for the Controlled Release of Theophylline: In vitro studies. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 8-13, 1994.
27. ZENG, X., RUCKENSTEIN, E. Control of Pore Sizes in Macroporous Chitosan and Chitin Membranes. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 35, p. 4169-4175, 1996.
28. AGUIAR, A. J., WHEELER, S. F., ZELMER, J. E. Evaluation of Physical and Pharmaceutical Factors Involved in Drug Release and Availability from-chloramphenicol Capsules. **J. Pharm. Sc.**, v. 57, n. 11, p. 1844-1849, 1968.
29. STORPIRTIS, S. Avaliação Biofarmacotécnica de medicamentos – aspectos tecnológicos e de garantia de qualidade. **Revista Racine**, n. 47, p. 53-57, novembro / dezembro, 1998.
30. ZANOWIAK, P. Pharmaceuticals, Controlled release, In: SPARKS, R. E. **Encyclopedia of technology**. New York: John Wiley & Sons, v. 17, p. 290-295, 1982.
31. BIDAHA, D., VERGNAUD, J.M. Dosage forms with a polymer matrix and a swelling polymer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 77, p. 81-87, 1991.
32. LANGER, R. New Methods of Drug Delivery. **American association for the Advance**, v. 249, p. 1527-1533, 1990.
33. FILIPOVIĆ- GRČIČ, J., JALŠENJAK, I. Microspheres of human serum albumin with barbiturates: effects of drugs partition coefficient on preparation and drug release. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, p. 394-399, 1993.
34. VASUDEV, S. C., CHANDY, T., SHARMA, C. P. Development of Chitosan / Polyethylene Vinyl Acetate Co-Matrix: Controlled Release of Aspirin-Heparin for Preventing Cardiovascular Thrombosis. **Biomaterials**, v. 18, n. 5, p. 375-381, 1997.
35. AKIYAMA, Y. et al. Anti- hypertensive Effect of oral Controlled – release Microspheres Containing an ACE Inhibitor (Delapril Hydrochloride) in Rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 661-665, 1994.
36. MACHIDA, Y. Development of topical Drug Delivery Systems Utilizing Polymeric Materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 5, p. 356-368, 1993.
37. KOST, J., LANGER, R. Responsive polymeric delivery systems. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 6, p. 19-50, 1991.
38. VISOR, G.C., BAJKA, E., BENJAMIN, E. Intranasal delivery of Nifedipine in the Rat. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 75, n. 1, p. 44-46, 1986.

39. FILHO, N. A., Oliveira, A. G. Sistemas de micro / nano encapsulação de fármacos. **Pharmacia Brasileira**, v. 9, n. 1 / 5, p. 18-21, maio- junho 1999.
40. LATHA, M. S., JAYAKRISHNAN, A., RATHINAM, K. et al. Casein as a Carrier Matrix for 5- Fluoracil: Drug Release from Microspheres, Drug-protein conjugates on In-vivo Degradation of Microspheres in Rat Muscle. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 858-862, 1994.
41. IENGER, G., KNOCH, A., MERKLE, H. P. Modeling and Numerical Computation of Drug Transport in Laminates: Model Case evaluation of Transdermal delivery System. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 1, p. 9-15, January 1986.
42. RITSCHER, W. A. Microemulsions for Improved Peptide absorption from the Gastrointestinal Tract. **Meth. Finds. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 13, n. 3, p. 205-220, 1991.
43. CHIEN, Y. W. Potential Developments and New Approaches in Oral Controlled-Release Drug Delivery Systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9, n. 7, p. 1291-1330, 1983.
44. BRONSTED, H., KOPEČEK, J. pH-Sensitive Hydrogels: Characteristics and Potential in Drug delivery. In: HARLAND, R. S. **Polyelectrolyte gels: Properties, Preparation and Applications**. 1992, p 285-303.
45. SKAVEN, D. M., ZENTNER, G. M. Phonophoresis. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 20, p.235-245, 1984.
46. NAKATSUKA, S., ANDRADY, A. L. Permeability of Vitamin B-12 in Chitosan Membranes. Effect of Crosslinking and Blending with Poly (vinyl alcohol) on Permeability. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 44, p. 17-28, 1992.
47. LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 488
48. KNUTH, K., AMIJI, M., ROBINSON, J. R. Modern Hydrogel Delivery Systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, p. 137-167, 1993.
49. NARAYANI, R., RAO, K.P. pH-Responsive Gelatin Microspheres for Oral Delivery of Anticancer Drug Methotrexate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 58, p. 1761-1769, 1995.
50. PHIPPS, W. J., LONG, B. C. et al. **Medical Surgical Nursing: Concepts and clinical practice**. 14<sup>a</sup> ed. USA: Mosby Year Book, 1991. p.1233-1234.
51. AGYILIRAH, G. A., BANKER, G. S. Polymer for Enteric Coating Applications. In: TARCHA, P. J. **Polymer of Controlled Drug Delivery**, cap. 3, p. 39-66, Boston: CRC Press, 1991.
52. LUI, C. Y., AMIDON, G. L., BERARDI, R. R. et al. Comparison of Gastrointestinal pH in Dogs and Human: Implications on the use of the Beagle Dog as a Model for oral Absorption in Humans. **Journal of Pharmaceuticals Science**, v. 75, n. 3, p. 271-271, 1986.

53. FUJIMORI, J., MACHIDA, Y., TANAKA, S. et al. Effect of magnetically controlled gastric residence of sustained release tablets on bioavailability of acetaminophen. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 119, p. 47-55, 1995.
54. THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. Oral Sustained – release Drug Delivery Systems using Polycarbonate Microspheres Capable of floating on the Gastric Fluid. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, p. 21-24, 1993
55. GENÇ, L., DEMIREL, M., GÜLER, E. et al. Microencapsulation of keratolac tromethamine by means of a coacervation-phase separation technique induced by the addition of non-solvent. **J. Microencapsulation**, v. 15, n. 1, p. 45-53, 1998.
56. FINCH, C. A. Microencapsulation. In: \_\_\_\_\_ **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**, Weinheim: VCH verlagsgesellschaft, 1990. V. A16, p. 575-588.
57. CHANG, T. M. S., MACINTOSH, F. C., MASON, S. G. Semipermeable aqueous microcapsules. I. Preparation and properties. **Can. J. Physiol. Pharm.**, v. 44, p. 115-129, 1996.
58. SPARKS, R. E. Microencapsulation. In: OTHEMER, K. **Encyclopedia of chemical technology**. New York: J. Wiley, 1990. V. 15, p. 470-493.
59. NEWTON, D. W. Coacervations: Principles and applications. In: TARCHA, P. J. **Polymers for controlled drug delivery**. Boston: CRC Press, 1991. Cap.4, p.67-82.
60. VOIGT, R., MANFRED, B. Cápsulas. In: **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**. Espanha: Acribia Zaragoza, 1982, p. 259-269.
61. THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. Controlled Release of Oral Drugs from Cross-linked Polyvinyl Alcohol Microspheres. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, p. 16-20, 1993.
62. BJÖRK, E., EDMAN, P. Characterization of Degradable Starch Microspheres as a Nasal Delivery System for Drugs. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 62, p. 187-192, 1990.
63. VANDENBOSSCHE, G. M. R., BRACKE, M. M., CUVELIER, A. C. et al. Host reaction against empty alginate-polylysine microcapsules. Influence of preparation produce. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, p. 115-120, 1993.
64. RAO, S. S., RITSCHER, W. A. Development and in vitro/in vivo evaluation of a colonic release capsule of vasopressin. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 86, p. 35-41, 1992.
65. POMMERSHEIM, R., SCHREZENMEIR, J., VOGT, W. Immobilization of enzymes by multilayer microcapsules. **Macromol. Chem. Phys.**, v. 195, p. 1557-1567, 1994.

66. WHALEN, R. L., DEMPSEY, D. J., THOMPSON, L. M. et al. Microencapsulated Vaccines ti Provide Prolonged Immunity with a Single Administration. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 94, p. 649-654, 1997.
67. RABISKOVA, M., SONG, J., OPAWALE, F. O. et al. The influence of Surface Properties on Uptake of Oil into Complex Coacervate Microcapsules. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 631-635, 1994.
68. YANG, T. T., SWARBRICK, J. Sustained-Release Delivery Systems, II: In Vitro Dissolution of 4,4 - Sulfonylbisbenzamine (Dapsone) - N-Dodecanoyl- 4,4 - Sulfonylbisbenzamine Comelts. **Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 75, n. 3, p. 264-270, 1986.
69. GIUNCHEDI, P., MAGGI, L., LA MANNA, A. et al. Modification of the Dissolution Behaviour of a Water- insoluble Drug, Naftazone, for zero-order Release Matrix Preparation. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 476-480, 1993.
70. SCHIERHOLZ, J. Physico-chemical properties of a rifampicin- releasing polydimethyl-silicone shunt. **Biomaterials**, v. 18, p. 635-641, 1997.
71. KOHRI, N., MORI, K., MIYAZAKI, K. et al. Sustained release of Nifedipine from Granules. **Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 75, n. 1, p. 57-61, 1986.
72. MUZZARELLI, R. A. A. Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. **Enzy. Microb. Technol.**, v. 2, p. 177-184, 1980.
73. YAO, K., PENG, T., FENG, H. B. et al. Swelling Kinetics and release Characteristics of Cross-linked Chitosan: Polyether Polymer Network (Semi-IPN) Hydrogels. **Journal of Polymer Science**, v. 32, p. 1213-1223, 1994.
74. RODRIGUES, B. C. **Microencapsulação e liberação controlada do fármaco rifampicina utilizando o sistema polimérico quitosana-PVA.** Florianópolis: 1999. 84p. Dissertação (Mestrado em Química)- Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
75. INOUE, K., MACHIDA, Y., SANNAN, T. et al. Buoyant Sustained Release Granules Based on Chitosan. **Drug design and Delivery**, v. 4, p. 55-67, 1989.
76. AÇIKGÖZ, M., HAS, H. S., HASÇELIK, Z. et al. Chitosan microspheres of diclofenac sodium, II: In vitro and in vivo evaluation. **Pharmazie**, v. 50, H.4, p. 275-277, 1995.
77. GOHEL, M. C., AMIN, F. Formulation Design and Optimization of Modified-Release Microspheres of Diclofenac Sodium. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 2, p. 247-251, 1999.
78. MORITA, T., ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação e purificação.** 2ª ed. São Paulo: E. Blücher, 1983. 627.

79. BROUSSIGNAC, J. Un hault polymère naturel per connum dans l'industrie le chitosane. **Chim. Ind.-Gèn. Chim.**, v. 99, n. 9, p. 1211-1247, 1970.
80. MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. New York: Pergamon Press, 1977. p.124.
81. STOLBERG, J., LARANJEIRAS, M. C. M., SANCHEZ, M. N. M. et al. Microspheres of chitosan/poly (vinylalcohol) incorporating tetrasulphonated cooper (II) phthalocyanine: preparation e characterization. **J. microencapsulation**, v. 16, n.4, p. 431-438, 1999.
82. CORDOVA, M. L. F., BARRALES, P. O., DÍAS, A. M. Sensitive and selective determination od diclofenac sodium in pharmaceutical preparation by solid phase ultraviolet absorptiometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p. 263-268, 1998.