

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE MATERIAIS E NANOTECONOLOGIA

CAMILA PARAISO MONÇÃO

LIBERAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS REVESTIDOS COM BIOSISTEMAS
POLIMÉRICOS

São Paulo

2018

CAMILA PARAISO MONÇÃO

LIBERAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS REVESTIDOS COM BIOSISTEMAS
POLIMÉRICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais e Nanotecnologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais e Nanotecnologia.

ORIENTADORA: PROF. DR. LEILA FIGUEIREDO DE MIRANDA

São Paulo
2018

M737L

Monção, Camila Paraiso

Liberação de princípios ativos revestidos com biosistemas poliméricos /
Camila Paraiso Monção – São Paulo, 2018.

69 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Nanotecnologia) -
Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo, 2018.

Bibliotecária Responsável: Marta Luciane Toyoda – CRB 8/ 8234

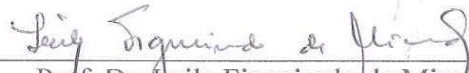
CAMILA PARAISO MONÇÃO

LIBERAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS REVESTIDOS COM BIOSISTEMAS
POLIMÉRICOS

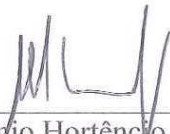
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais e Nanotecnologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais e Nanotecnologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Leila Figueiredo de Miranda – Orientador
Universidade Presbiteriana Mackenzie



Prof. Dr. Antonio Hortêncio Munhoz Júnior
Universidade Presbiteriana Mackenzie



Prof. Dr. Leonardo Gondim de Andrade e Silva
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

Aos meus pais, meu marido e mentores
dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus.

À Profa. Dra. Leila Figueiredo de Miranda, pela paciência, pelo conhecimento e orientações no decorrer dos estudos e realização deste trabalho.

Aos meus pais, Rita e Francisco, que sempre estiveram ao meu lado.

Ao Henry Okigami, meu marido e companheiro, por me apoiar e me incentivar nas horas de fraqueza e também por me auxiliar com informações técnicas.

Não importa o quanto você bate,
mas sim o quanto aguenta apanhar e continuar lutando.

Rocky Balboa.

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas as principais características, aplicações, potencialidades e limitações dos sistemas de liberação controlada de fármacos, bem como os mecanismos que influenciaram diretamente a cinética de liberação do agente ativo. Os sistemas micro e nanoestruturados apresentam grande potencial para a liberação controlada e encapsulação de moléculas bioativas. Os diversos sistemas poliméricos biodegradáveis representam uma nova estratégia para a veiculação de ingredientes ativos. Um sistema de liberação controlada possibilita que o perfil de concentração da droga se mantenha constante dentro da faixa terapêutica promovendo dessa forma, aumento do índice terapêutico e da resposta imunológica ao paciente e evitando efeitos colaterais adversos quando comparado aos métodos convencionais de administração. Neste trabalho foram obtidas membranas formadas por biosistemas poliméricos para aplicação em liberação controlada de proteína concentrada do soro de leite WPC. Foram obtidos 4 sistemas de liberação: cera de abelha/proteína/lecitina; cera de abelha/proteína/alginato/lecitina e cera de abelha/alginato/quitosana/lecitina pelos métodos de coacervação complexa e *spray drying*. Com a simulação do pH do sistema gastrointestinal (pH 1,2 e pH 6,8) pode-se observar o tempo em que cada membrana liberou a proteína. Com esta informação concluímos o local teórico da liberação da proteína e quais membranas não são compatíveis com o local de ação escolhido. Os resultados mostraram que o sistema mais efetivo foi o de cera de abelha/proteína/alginato/quitosana com liberação em pH 6,8 nas duas concentrações de proteína utilizadas 40% e 60% de proteína m/m.

Palavras chave: Liberação controlada. Encapsulação de moléculas bioativas. Coacervação complexa. *Spray drying*.

ABSTRACT

In this work the main characteristics, applications, potentialities and limitations of the controlled release systems were studied, as well as the mechanisms that directly influenced the release kinetics of the active agent. Micro and nanostructured systems have great potential for the controlled release and encapsulation of bioactive molecules. The various biodegradable polymer systems represent a new strategy for the delivery of active ingredients. A controlled release system enables the drug concentration profile to remain constant within the therapeutic range thereby promoting increased therapeutic index and immune response to the patient and avoiding adverse side effects when compared to conventional methods of administration. In this work were obtained membranes formed by polymeric biosystems for application in controlled release of drugs and other assets. Four release systems were obtained: beeswax / protein / lecithin; beeswax / protein / alginate / lecithin and beeswax / alginate / chitosan / lecithin by methods of complex coacervation and spray drying. The results show that the most effective system was bee / protein / alginate / lecithin.

Keywords: Controlled release. Encapsulation of bioactive molecules. Complex coacervation. Spray drying.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1:	Perfil de liberação em função do tempo: convencional e controlada.....	19
Quadro 1:	1- Natureza concha-corpo; 2,3,4- Graus crescentes de subdivisão dos domínios; 5- esfera.....	22
Quadro 2:	a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco incorporado na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....	22
Quadro 3:	Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação.....	25
Quadro 4:	Modelo esquemático de microencapsulação por coacervação complexa.....	26
Quadro 5:	Polímeros utilizados em sistema de liberação controlada.....	28
Quadro 6:	Estrutura química da goma guar.....	29
Quadro 7:	Segmento repetitivo na molécula de pectina (a) e grupos funcionais carboxila (b); éster (c); amida (d) na cadeia de pectina.....	31
Gráfico 2:	Concentração do ativo na região da lesão utilizando-se o tratamento convencional de injeções e utilizando-se um sistema de liberação controlada.....	34
Quadro 8:	Exemplos de polímeros sintéticos utilizados na fabricação de sistemas de liberação controlada.....	35
Quadro 9:	Exemplos de polímeros naturais e seus derivados utilizados na preparação de sistema de liberação controlada.....	37
Fotografia 1:	Agitador Ultra Turrax IKA (T25N).....	44
Fotografia 2:	Sonicador SONIC	44
Fotografia 3:	Concentrador de amostras	44
Fotografia 4:	pHmetro digital de bancada Quimis.....	48
Fotografia 5:	Espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453.....	48

Quadro 10:	Amostras obtidas coacervação complexa.....	49
Quadro 11:	Amostras obtidas no <i>Ribbon</i> <i>Blander</i>	49
Quadro 12	Cápsulas de WPC 40% e 60% (m/v) em pH 1,2.....	50
Quadro 13:	Cápsulas de WPC 40% e 60% (m/v) em pH 6,8.....	51
Gráfico 3:	Granulometria das amostras de WPC 40% e 60% (m/v).....	55
Micrografia 6:	Microscopia eletrônica de varredura das amostras da formulação contendo amostras tipo A.....	56
Micrografia 7:	Microscopia eletrônica de varredura das amostras da formulação contendo amostras tipo B.....	56
Micrografia 8:	Microscopia eletrônica de varredura das amostras da formulação contendo amostras tipo C.....	56
Micrografia 9:	Microscopia eletrônica de varredura das amostras da formulação contendo amostras tipo D.....	57
Gráfico 4:	Curva Analítica WPC.....	58
Gráfico 5:	Concentração de Proteína WPC.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Variação do pH e tempo de trânsito no trato gastrointestinal.....	39
Tabela 2:	Características gerais de cada biopolímero.....	40
Tabela 3:	Materiais a serem utilizados neste trabalho.....	41
Tabela 4:	Tratamentos obtidos durante a produção das microcápsulas por coacervação complexa.....	46
Tabela 5:	Avaliação de estabilidade para WPC. Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8 e 7,4), à 37°C.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos Específicos.....	15
1.2	JUSTIFICATIVA.....	15
1.3	METODOLOGIA.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	INÍCIO DA TECNOLOGIA.....	18
2.2	LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ATIVO.....	20
2.2.1	Técnicas de liberação controlada.....	21
2.2.1.1	Sistema coloidal.....	23
2.2.1.2	Lipossomas.....	24
2.2.1.3	Microencapsulação.....	24
2.2.1.3.1	<i>Microencapsulação por meio do processo de coarcevação complexa.....</i>	25
2.2.1.3.2	<i>Microencapsulação por Spray drying.....</i>	27
2.3	BIOPOLÍMEROS.....	27
2.3.1	Goma Guar.....	29
2.3.2	Goma Arabica.....	30
2.3.3	Pectina.....	30
2.3.4	Gelatina.....	32
2.3.5	Quitosana.....	32
2.3.6	Alginatos.....	32
2.4	INCORPORAÇÃO DE ATIVOS.....	33
2.5	LIBERAÇÃO DE ATIVOS.....	34
2.5.1	Libertação controlada de base polimérica.....	35
2.6	POLÍMEROS DE ORIGEM NATURAL.....	37
2.7	POLÍMEROS FILMOGÊNICOS.....	37
2.8	FISIOLOGIA DO TRATO GASTRINTESTINAL: PH E TEMPO DE	

	ESVAZIAMENTO.....	38
2.9	REVESTIMENTO DE ATIVOS EM MEMBRANAS.....	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1	MATERIAIS.....	40
3.1.1	Matéria prima e Reagentes.....	40
3.1.2	Equipamentos utilizados.....	41
3.2	MÉTODOS.....	42
3.2.1	Coacervação Complexo.....	42
3.2.2	Obtenção das micropartículas compostas a partir da técnica de spray drying.....	4 .
3.2.3	Caracterização das Amostras.....	44
3.2.3.1	Análise do tamanho e distribuição do tamanho de partícula.....	45
3.2.3.2	Testes de estabilidade em função do pH.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	ANÁLISE VISUAL.....	48
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	49
4.2.1	Interferência da concentração da proteína encapsulada.....	49
4.2.2	Revestimento com camada de alginato, com quitosana-alginato e celulose microcristalina.....	53
4.2.3	Caracterização granulométrica das partículas de proteína.....	53
4.2.4	Morfologia das amostras.....	54
4.2.5	Concentração de proteína.....	56
5	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

Geralmente os consumidores no momento da compra de um suplemento ou medicamento indicado por um profissional da saúde levam em consideração as propriedades funcionais a que ele se destina, sabor, forma, número de administrações, fato que tem impulsionado a indústria alimentícia, farmacêutica e de suplementos nos últimos anos a procurar inovar com produtos com potenciais cada vez mais otimizados para serem utilizados pela medicina preventiva e mesmo curativa.

Várias vias são usadas para administrar um medicamento/suplemento no organismo, mas a via oral é uma das mais utilizadas, principalmente pela facilidade de uso. Quando se deseja um efeito sistêmico por meio do uso da via oral, é necessário que o fármaco ou suplemento seja liberado em um local específico como no trato gastrointestinal que precisa se dissolver nos fluidos gastrintestinais para ser, em seguida, absorvido (passagem do fármaco do local administrado até atingir a circulação sistêmica) (MACEDO, 2013).

As alternativas para o estabelecimento de sistemas que tornem os fármacos mais eficientes num determinado local, onde devem exercer seu efeito terapêutico, têm sido bastante estudados e fundamentados principalmente na liberação controlada (SILER-MARINKOVIC et al., 1997; LIMA, 2008).

Uma das principais dificuldades encontradas no combate a doenças que exigem tratamentos longos (maiores que um mês), é que as administrações de formas farmacêuticas convencionais resultam em picos de concentração de fármaco no local de ação seguidos de diminuições, ocasionando respostas fisiológicas indesejáveis (DILLOW; LOWMAN, 2002).

Na liberação controlada as principais formas farmacêuticas podem ser agrupadas em glóbulos revestidos, matrizes de desintegração lenta, bombas osmóticas, adesivos transdérmicos, géis, implantes poliméricos, microemulsões, lipossomos, microesferas, nanoesferas, nanofibras, nanocápsulas, nanotubos de carbono, nanopartículas lipídicas sólidas e, mais recentemente, carreadores lipídicos nanoestruturados (GIBAUD; ATTIVI, 2012; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Várias das formas farmacêuticas citadas anteriormente constituem um sistema multiparticulado. Os métodos de microencapsulação incluem técnicas de fluidização, atomização (*spray dryer*), de evaporação de solvente, microextrusão, polimerização interfacial, e coacervação simples e complexa.

As micropartículas são sistemas sólidos, geralmente esféricos, com dimensões que vão desde 1 a 1000 μm até alguns milímetros. Podem ser constituídas por matrizes

poliméricas (microesferas) nas quais o fármaco pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à rede tridimensional formada pelo polímero, ou por sistemas reservatórios (microcápsulas) nas quais o fármaco representa um núcleo sólido, líquido ou gasoso, separado do meio externo por uma membrana polimérica (UCHEGBU; SCHÄTZLEIN, 2006; SILVA-JUNIOR, 2008; ROSSANEZI, 2008).

Diversos sistemas de liberação controlada têm sido estudados utilizando biopolímeros como carreadores para liberação de vários tipos de fármacos, incluindo antibióticos (SILVA-JUNIOR, 2008), agentes antineoplásicos, antiinflamatórios esteróides (McCARRON; WOOLFSON; KEATING, 2000; SILVA-JUNIOR, 2008), peptídeos e proteínas (TAN; CHOONG; DASS, 2010) entre outros.

Biopolímeros são aqueles que sofrem metabolismo dando origem a substâncias fisiologicamente inertes, que são eliminadas pelo organismo. Além de serem biodegradáveis os biopolímeros também podem ser biocompatíveis, ou seja, não iniciam processos imunes ou inflamatórios, são estáveis durante o seu tempo de ação no corpo e completamente metabolizados pelo organismo (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

Os trabalhos tratando de liberação controlada têm fornecido as seguintes evidências (LANGER; TIRRELL, 2004; HAMMAN; ENSLIN; KOTZE, 2005):

- a) Aumento na eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz e maior tempo de permanência na circulação;
- b) Diminuição significativa da toxicidade, devido ao uso de doses menores;
- c) Não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bio-inativação prematura), sendo sua administração segura (sem causar reações inflamatórias locais) e conveniente ao paciente (menor número de doses);
- d) Possibilidade de direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas e tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Obter membranas biopoliméricas para serem utilizadas na proteção e liberação controlada de ativos.

1.1.2 Objetivos Específicos

Obter e caracterizar biosistemas poliméricos microemcapsulados solúveis produzidos por diferentes técnicas.

Determinar o tipo de técnica mais eficaz para obtenção do sistema de liberação controlada.

Avaliar a distribuição de tamanho e a morfologia das microcápsulas em função da fração volumétrica do ativo e da taxa de agitação.

Estudar a liberação do ativo em diferentes períodos de tempo.

1.2 JUSTIFICATIVA

Grande parte dos medicamentos e suplementos são administrados por via oral, onde concentrações elevadas do fármaco ou alta frequência de dosagem devem ser administradas. Com isso, efeitos colaterais exacerbados, resposta imune intensa, o sabor e a textura podem levar o paciente a um grande desconforto e em alguns casos a desistência do tratamento (AYUKAWA et al., 2010).

Como limitações desta via tem-se: inativação do medicamento pelo suco digestivo, incerteza da quantidade absorvida e possibilidade de ação irritante sobre a mucosa (MAGALHÃES, BOELTER, SILVA, 1985).

Os métodos convencionais de administração são desenvolvidos para liberar rapidamente o agente ativo (moléculas bioativas) ou terapêutico (fármaco ou droga). Geralmente são empregados sistemas diluentes solúveis com o intuito de favorecer a dissolução do agente embora manter os níveis de sua concentração dentro da faixa terapêutica ainda seja um grande desafio (AZEVEDO, 2005). Em terapias convencionais de administração, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta até atingir o nível

máximo de dissolução e então declina, sendo requerida a administração de nova dose para manter os níveis de concentração.

Elevadas concentrações acima da faixa terapêutica podem conduzir a toxicidade, enquanto concentrações subterapêuticas são ineficazes e podem, em alguns casos, causar resistência ao fármaco (GRAHAM, 1978).

Determinados sistemas transportadores de drogas apresentam ainda a capacidade de proteção para fármacos, que são instáveis in vivo e que normalmente exigem dosagens em intervalos frequentes (DASH, CUDWORTH, 1998). A integridade da forma farmacêutica é outro fator determinante a ser considerado para se evitar uma degradação prematura.

Com os comprimidos de liberação controlada é possível obter-se a diminuição do número de doses diárias levando-se a um tratamento ininterrupto e, conseqüentemente, ao desaparecimento de picos plasmáticos com aumento das concentrações eficazes. Obtêm-se, também, menor acúmulo de fármaco no organismo e proteção do mesmo à degradação por fluidos biológicos.

Deve-se também levar em conta que custos mais elevados que o das fórmulas farmacêuticas convencionais ocorrem em função dos materiais e repetições das doses, com a liberação controlada ocorre a diminuição do número de doses reduzindo assim o custo.

Em virtude do exposto, torna-se importante estudar sistemas biosistemas poliméricos para liberação de princípios ativos.

Com o propósito de minimizar esse efeito, este projeto visa trazer mais um avanço no desenvolvimento de sistemas biopoliméricos de liberação controlada para modular a liberação de fármacos/ativos na faixa terapêutica por tempo prolongado utilizando-se dosagem única.

1.3 METODOLOGIA

Inicialmente foi realizado uma revisão bibliográfica em livros, sites específicos, periódicos, anais de congresso entre outros, sobre o tema com o objetivo de verificar as diferentes técnicas, identificando os biopolímeros mais adequados para viabilizar a produção das amostras com liberação controlada do ativo e técnicas analíticas para quantificar a liberação do ativo.

Na parte experimental foram produzidas amostras individuais com diferentes técnicas e biopolímeros e posteriormente, as amostras foram selecionadas para o protótipo.

As amostras foram submetidas a testes de estabilidade forçada, liberação do ativo e suas características resultaram em um protótipo com a soma das diferentes técnicas e polímeros. Os diferentes tipos de amostras obtidos foram analisados por meio de ensaios de resistência e liberação do ativo, dissolução e encapsulamento.

Foi realizado um estudo de liberação controlada por 12h.

Os procedimentos de preparação das membranas, variaram conforme o tipo de polímero usado, sendo adaptados baseando-se no método descrito por Veiga e Moraes (2012) para membranas de quitosana-xantana.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo foi feita uma revisão bibliográfica sobre os principais conceitos de liberação controlada de fármacos e os sistemas envolvidos neste processo.

2.1 INÍCIO DA TECNOLOGIA

As primeiras tentativas para a obtenção de um sistema transportador eficaz tiveram como base o encapsulamento das biomoléculas em vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos. Contudo, esta abordagem mostrou-se totalmente inadequada, uma vez que estes polímeros não são biodegradáveis e se acumulavam no organismo (CHANG; POZNANSKY, 1968).

Em 1965, um trabalho de investigação da difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, sem qualquer ligação com estudos de sistemas transportadores de fármacos, realizou a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas que futuramente foi chamado de lipossomas. Após este trabalho, os lipossomas impuseram-se como um modelo de sistema simples para o estudo de membranas biológicas (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965).

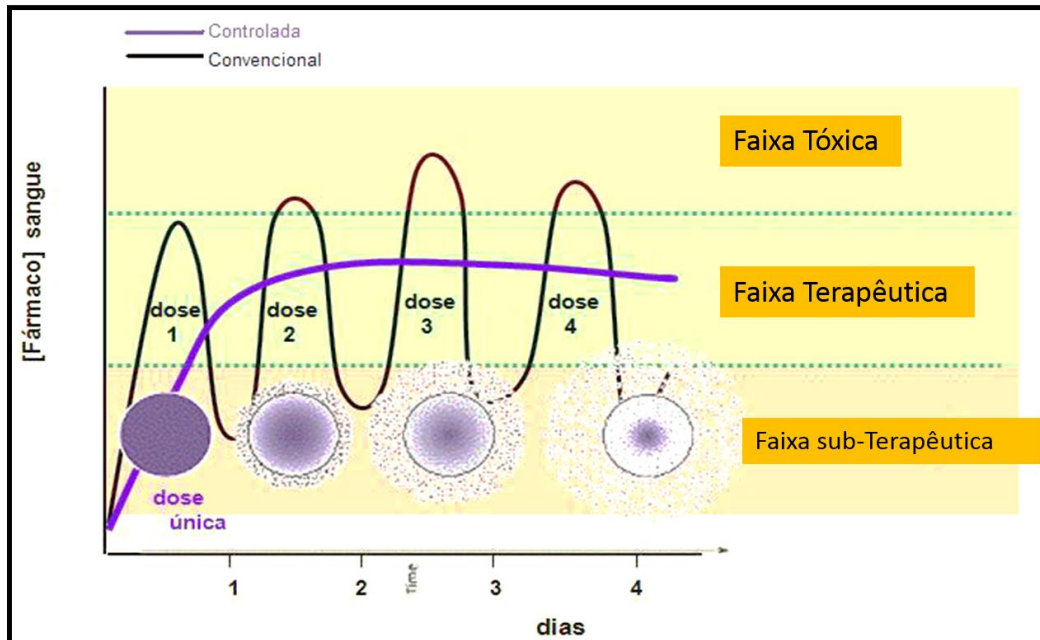
A incorporação de enzimas em lipossomas despertou também o interesse da comunidade científica para a sua aplicação médica e farmacológica na utilização dos lipossomas como sistemas transportadores de fármacos, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área (GREGORIADIS; LEATHWOOD; RYMAN, 1972; SANTOS; CASTANHO, 2002).

As formas convencionais de administração de fármacos podem ser comparadas com os sistemas de liberação controlada. Nas formas convencionais (*spray*, injeção, pílulas) a concentração do ativo na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina, os ativos possuem uma faixa de ação terapêutica onde acima é tóxica e abaixo ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica e/ou houver o acúmulo de fármaco e/ou metabólitos também tóxicos a administração deste ativo se torna problemática.

O objetivo de um sistema de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis (ou seja, na faixa terapêutica) por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (DUMITRIU, 1994; ALLEN; CULLIS, 2004). A

diferença da variação de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, está apresentada no Gráfico 1.

Gráfico 1: Perfil de liberação em função do tempo: convencional e controlada (Adaptada de EVANGELISTA, 1998).



A utilização das microcápsulas poliméricas na liberação de fármacos está se tornando um importante meio na encapsulação de agentes terapêuticos já que estas oferecem uma administração fácil e não-invasiva, além de formar com estas micropartículas uma camada que pode proteger e sustentar sua liberação por períodos que vão de horas até anos (EVANGELISTA, 1998; LIU et al. 2002). Em um trabalho prepararam micropartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) e encapsularam o fármaco Huperzine A, utilizado no tratamento de pacientes com a doença de Alzheimer. Nos testes *in vivo*, estas micropartículas mostraram a capacidade de liberar o fármaco encapsulado durante duas semanas, mantendo a concentração plasmática de Huperzine A praticamente constante (LIU et al., 2005).

O nível de distribuição espacial do sistema de liberação é muito importante para a efetividade, já que qualquer sistema farmacológico necessita ser absorvido, distribuído, atingir o alvo específico e interagir com o tecido e sua população celular, ocorrendo a interação com várias barreiras anatômicas (ALLEN; CULLIS, 2004).

Trabalhos de liberação controlada têm fornecido numerosas evidências das possibilidades desta técnica como um aumento na eficácia terapêutica a partir da degradação da matriz, maior tempo de permanência na circulação; diminuição significativa da toxicidade, devido ao uso de doses menores; a natureza e composição dos veículos é muito variada e, ao

contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco, sendo sua administração segura e com a possibilidade de direcionamento a alvos específicos (LANGER; TIRRELL, 2004; HAMMAN; ENSLIN; KOTZE, 2005).

2.2 LIBERAÇÃO CONTROLADA DO ATIVO

Em todos os tratamentos tenta-se adequar a administração dos medicamentos conforme as necessidades, procurando utilizar quantidades ótimas e mínimas para curar ou manter sob controle um estado patológico (RABASCO, 1997), as concentrações sanguíneas efetivas nos locais de ação e pelo maior tempo possível dentro da janela terapêutica (RABASCO, 1997; COLLETT; MORETIN, 2005; CHIAO; ROBINSON, 1999; AÏACHE; DEVISSAGUET; GUYOT-HERMANN, 1982).

A dose única com elevada concentração do fármaco em um comprimido comum, resultaria em níveis acima dos terapêuticos, ou seja, níveis tóxicos, para que isto não ocorra usa-se administrar repetidamente o medicamento, o que, muitas vezes, leva ao descumprimento do tratamento por parte do paciente, e conseqüentemente, a uma terapia falha (RABASCO, 1997; AÏACHE; DEVISSAGUET; GUYOT-HERMANN, 1982).

Com o propósito de minimizar esse efeito, o avanço científico tornou possível o desenvolvimento de sistemas estruturados de liberação controlada com o objetivo de modular a liberação do fármaco na faixa terapêutica por tempo prolongado utilizando-se uma dosagem única (AZEVEDO, 2005). Os sistemas poliméricos de liberação controlada representam uma nova estratégia para incorporação de substâncias ativas (BRUSCHI et al., 2006; ROSSI-BERGMAN, 2008; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996).

Algumas vantagens deste sistema são, além do maior controle da liberação do princípio ativo, a redução de doses tóxicas e subterapêuticas, o monitoramento dos níveis de fármaco no sítio de aplicação, a obtenção de altas concentrações de fármaco no local a ser tratado, quando comparadas com os níveis plasmáticos após administração oral e direcionamento do princípio ativo a alvos específicos. Além disso, diminui o intervalo de dosagem e reduz efeitos colaterais indesejados uma vez que utiliza uma menor quantidade do princípio ativo, resultando em menor custo (BRUSCHI et al., 2006; ROSSI-BERGMAN, 2008; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996; DASH; CUDWORTH, 1998).

2.2.1 Técnicas de liberação controlada.

Os principais sistemas utilizados para carregamento de fármacos utilizam micro e nanopartículas poliméricas, lipossomas, ciclodextrinas e dendrímeros. As micro e nanopartículas são classificadas em dois tipos de estruturas diferentes: nanocápsulas e nanoesferas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

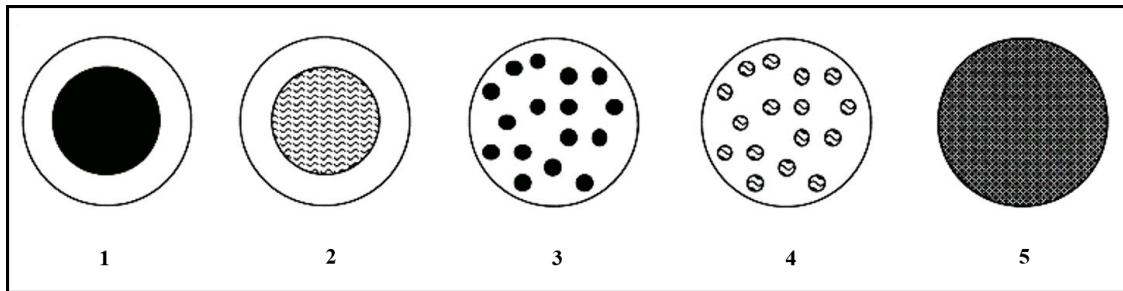
Segundo a IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) uma esfera polimérica está na faixa de diâmetro de 0,1 a poucos milímetros. Na faixa de 0,1 a 100µm serão chamadas micropartículas poliméricas (não têm forma definida) e microesferas poliméricas (têm forma esférica). Na escala nanométrica, valem as definições análogas: nanopartícula polimérica não tem forma definida enquanto a nanoesfera tem forma esférica e o diâmetro para classificação é de poucas unidades a centenas de nanômetros (EVERETT; KOOPAL, 2001).

As micro e nanocápsulas são partículas do tipo concha-corpo, com mesma ordem de grandeza considerada para as esferas (BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2003).

As micro e nanocápsulas são formadas por multicomponentes, ou seja, é uma partícula não homogênea quanto à composição química. Estes sistemas multicomponentes dão origem à partícula do tipo “concha-corpo” (*core-shell*), compreendendo pelo menos dois domínios: o núcleo individualizado rodeado por uma “concha” sendo o outro domínio.

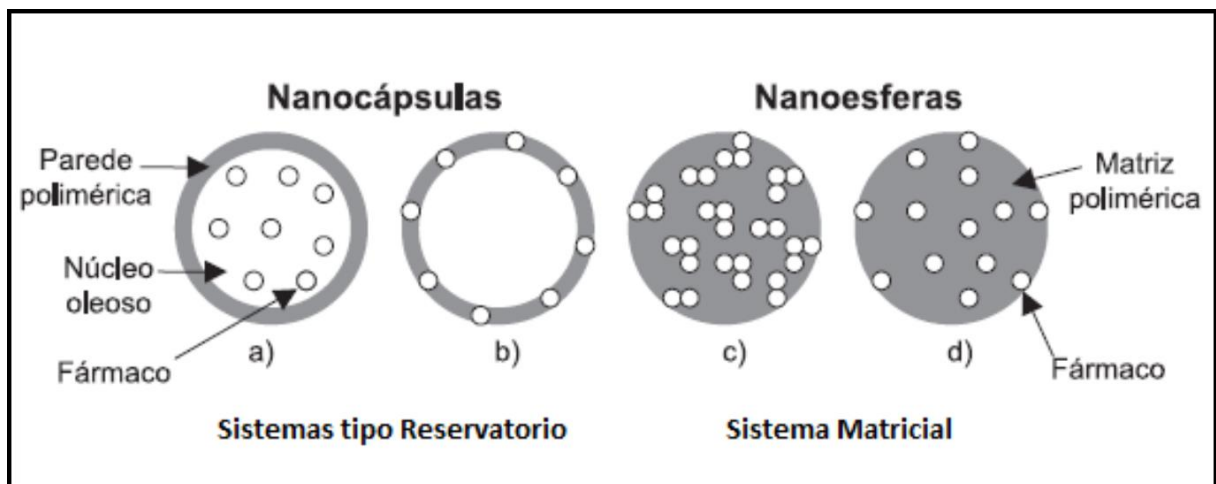
As micro e nanopartículas aplicadas à liberação controlada de fármacos refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, microesferas e nanoesferas e microcapsulas e nanocápsulas, onde as esferas são sistemas em que o fármaco se encontra homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica, obtendo-se um sistema “monolítico” onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. As micro e nanopartículas apresentam um sistema do tipo reservatório, onde é possível identificar-se um núcleo diferenciado, que pode ser sólido, líquido ou gasoso. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo e contendo pelo menos um subdomínio discreto contendo um ativo, as cápsulas tornam-se esferas, mas ainda heterogêneas, conforme ilustrado no Quadro 1.

Quadro 1: 1- Natureza concha-corpo; 2,3,4- Graus crescentes de subdivisão dos domínios; 5- esfera (BUSCALL; CORNER; STAGEMAN, 1985).



O Quadro 2 apresenta uma representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.

Quadro 2: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco incorporado na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (Adaptado de Schaffazick et al., 2003).



Para a preparação de micro e nanoesferas de polímeros biodegradáveis é importante escolher um processo de encapsulação apropriado, que preencha alguns requisitos como: manutenção da estabilidade química e atividade biológica durante e após o processo de encapsulação; melhor eficiência de encapsulamento e rendimento possíveis; faixa de diâmetro compatível com a via de administração; a formulação deve ter pequena distribuição no diâmetro das partículas e ser facilmente dispersa em água (FUKUSHIMA et al., 2000; PARK; YE; PARK, 2005).

2.2.1.1 Sistema coloidal

A liberação controlada está intimamente relacionada ao conhecimento da química de colóides, cujas leis determinam seu comportamento e o sucesso nas aplicações médicas e farmacêuticas.

A matéria pode ser apresentada nos estados sólidos, líquidos e gasosos, em que se pode associar a cada um deles características bem determinadas, como rigidez, volumes fixos e transições de fase, em condições conhecidas. No entanto a fronteira que engloba colóides e interfaces que ocorre entre os diferentes estados da matéria e em nível molecular ainda necessita de compreensão (“The Twilight Zone”). De maneira geral, o domínio coloidal envolve um sistema no qual um ou mais componentes tem pelo menos uma dimensão da ordem de nanômetros (10^{-9} m) até micrômetros (10^{-6} m), em que estes componentes podem ser moléculas grandes ou pequenas partículas (fase descontínua) dispersas em uma fase contínua (MYERS, 2004).

No campo médico-farmacêutico, a estabilidade coloidal é um fator sempre buscado, principalmente no tocante aos métodos de preparação dos sistemas de liberação controlada, que determinam a viabilidade das aplicações. Esta estabilidade pode ser entendida quando se estuda as forças de interação entre as partículas no meio de dispersão: efeitos eletrostáticos (originados de grupos ionizados na superfície) usualmente são forças repulsivas e dependem da concentração de eletrólito; efeitos estéricos, referem-se à geometria e conformação das moléculas adsorvidas ou ligadas à superfície; efeitos atrativos, relativo às forças de dispersão devidas à densidade e polarizabilidade das moléculas constituintes da partícula, diferente das moléculas do meio; efeitos de solvatação originados da organização das moléculas de solvente e constituintes do *bulk*, próximos à interface (BUSCALL; CONER; STAGEMAN, 1985).

As forças de *van der Waals* são dipolos flutuantes e devem ser balanceadas por interações estéricas ou repulsivas para se atingir o grau desejado de estabilidade coloidal. No caso de partículas de polímeros biodegradáveis, que são neutras, e por isso flocculam quando suspensas em água, as saídas para se regular a estabilização podem ser a adição de uma fração de volume de nanopartículas carregadas que promove a estabilização. As medidas do potencial zeta mostraram que as microesferas exibiram uma carga efetiva na presença das espécies carregadas, porém, análises de refletometria indicaram a não adsorção das espécies carregadas na superfície das microesferas. Neste caso as nanopartículas carregadas segregam

as regiões próximas às microesferas, por ter forte interação eletrostática entre as partículas (Lei de Coulomb) (TOHVER et al., 2001).

2.2.1.2 Lipossomas

Os lipossomas são definidos como vesículas microscópicas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as lipofílicas inseridas ou adsorvidas na membrana (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno sendo, portanto, classificados em unilamelar e multilamelar, respectivamente. Esse tipo de estrutura permite a encapsulação de compostos de naturezas hidrofílicas, hidrofóbicas e anfifílicas, e a liberação controlada do conteúdo encapsulado por difusão e/ou por erosão da vesícula. A farmacocinética e a distribuição *in vivo* podem ser controladas pelo tamanho e pela composição lipídica dos lipossomas. Os parâmetros como o tamanho da vesícula determinam a penetração e a meia-vida dessas partículas, enquanto a taxa de encapsulamento da droga a ser veiculada é determinada pelo número de bicamadas e tamanho da vesícula (FIALHO; CUNHA, 2007).

Os lipossomas convencionais são compostos de fosfolipídios e colesterol, além de um lipídio com carga negativa ou positiva para evitar a agregação das vesículas, aumentando a estabilidade em suspensão. Os lipossomas polimórficos são aqueles que se tornam reativos devido à mudança na sua estrutura desencadeada por uma alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática. Por outro lado, os lipossomas sítio-específicos utilizam ligantes acoplados em sua superfície que conferem seletividade para distribuir o fármaco encapsulado no sítio de ação desejado (SAPRA; ALLEN, 2003).

2.2.1.3 Microencapsulação

A microencapsulação é um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas, que liberam o conteúdo de forma controlada, sob condições específicas (FAVARO- TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

O modelo usado para a microencapsulação é o modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável, que protege o conteúdo do meio

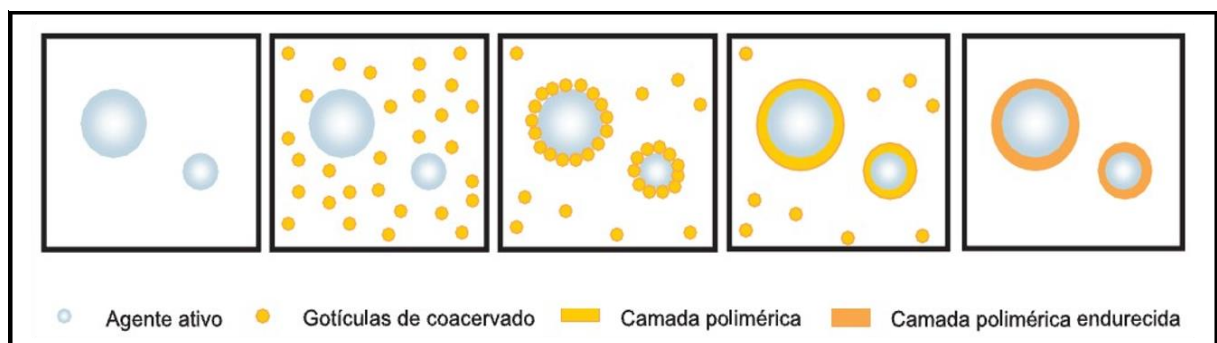
externo, permitindo trocas pela membrana, modulando a entrada e a saída de substâncias na célula. A microcápsula é similar a uma parede que isola o material ativo e controla a liberação, sob estímulo específico (JIZOMOTO et al., 1993).

As microcápsulas podem ser definidas como embalagens extremamente pequenas, compostas por um polímero conhecido como material de parede, revestimento ou encapsulante e um material ativo chamado de núcleo, fase interna ou recheio (GHARSALLAOUI et al., 2007). Enquanto as embalagens convencionais normalmente são empregadas para facilitar transporte, armazenagem e manipulação, as microcápsulas são geralmente empregadas para melhorar o desempenho do material ou criar novas aplicações. O ingrediente ativo pode ser, por exemplo, um aditivo alimentício ou um medicamento (ARSHADY, 1993). As partículas devem apresentar um tamanho entre 0,2 e 500 μm para serem consideradas microcápsulas. Abaixo de 0,2 μm são consideradas nanocápsulas e acima de 500 μm , macrocápsulas (RÉ, 1998).

2.2.1.3.1 Microencapsulação por meio do processo de coarcevação complexa

A coarcevação é uma tecnologia de microencapsulação única e promissora devido às possibilidades de liberação controlada baseada no estresse mecânico, temperatura ou liberação modulada (GOUIN, 2004). É geralmente utilizada para encapsular óleos aromáticos (NORI et al., 2011; DUCCEL et al., 2004), mas também pode ser adaptada para encapsulamento de óleos de peixe, vitaminas, conservantes e enzimas. O Quadro 3 apresenta uma representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coarcevação.

Quadro 3: Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coarcevação.
Fonte: SUAVE et al., 2006



Como ilustrado na Quadro 3 as etapas da coarcevação que é utilizado por diversos segmentos, incluindo o farmacêutico, alimentício, agropecuária, químico e cosmético

para a veiculação de diversos tipos de material ativo (aromas, enzimas, fármacos e tintas) com aplicações variadas (SCHMITT et al., 1998; KRUIF; WEINBRECK; VRIES, 2004).

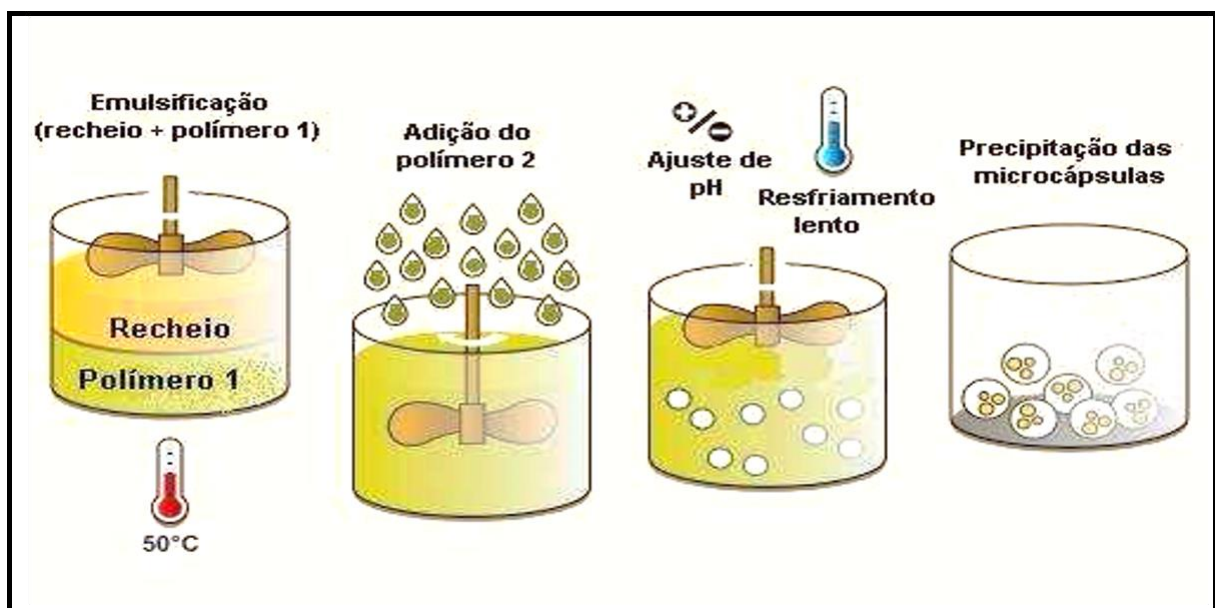
A coacervação é baseada em mecanismos físico-químicos complexos por envolver muitas variáveis como: taxas de agitação, relação núcleo/parede, características do polímero e do núcleo, taxas de adição e resfriamento. Existem poucas informações sobre o mecanismo de formação ou sobre a estrutura dos coacervados, o que restringe a predição das propriedades tecnofuncionais dos encapsulados e de seu processamento (SCHMITT et al., 2000).

Em geral o processo de coacervação complexa consiste em três estágios (DESAI; PARK, 2005):

- a- Formação de um sistema trifásico quimicamente imiscível: um solvente, um material de cobertura e um material de recheio. O material de parede é dissolvido no veículo e o material do núcleo é disperso nessa solução, com a qual é imiscível;
- b- Deposição do material polimérico líquido, carregado com carga oposta ao da espécie coloidal, que formará a cobertura;
- c- Solidificação da cobertura. As cápsulas podem então serem secas, obtendo-se um pó, ou serem usadas diretamente como uma suspensão no líquido carregador.

O Quadro 4 apresenta um esquema geral do processo de coacervação complexa, onde a gelatina é utilizada como um dos constituintes do sistema.

Quadro 4: Modelo esquemático de microencapsulação por coacervação complexa (SCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003; DESAI; PARK, 2005).



Os complexos precipitados pela coacervação ocorrem por interações eletrostáticas, a partir da mistura de soluções de substâncias com cargas opostas. Assim, há a formação de duas fases distintas: uma rica em polímeros, que contém o coacervado precipitado, e outra pobre em polímeros, na qual permanece o solvente da solução (SCHMITT et al., 1998; WANG et al., 2007; FITZSIMONS; MULVIHILL; MORRIS, 2008).

2.2.1.3.2 Microencapsulação por *Spray drying*

O método *spray drying*, é um processo de transformação de soluções ou suspensões em partículas secas, formadas a partir da atomização destas no meio aquecido (LIMA, 2008). Este processo pode ser descrito como o bombeamento da solução ou da suspensão até o atomizador onde as partículas são aspergidas pelo *spray* até a câmara de secagem entrando em contato com um gás pressurizado criando uma névoa, na qual ocorre a evaporação do solvente transformando a solução em partículas sólidas e são recolhidas em um separador que as mantém em movimento cíclicos, como um ciclone, separando-as do ar da exaustão.

2.3 BIOPOLÍMEROS

Os polímeros são macromoléculas que apresentam em sua estrutura molecular unidades relativamente simples que se repetem, ligadas entre si por ligações covalentes do tipo sp^3 . Este tipo de ligação favorece uma grande estabilidade físico-química, formando longas cadeias e, portanto, resultando em compostos de alta massa molar (SPINACÉ; PAOLI, 2005).

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias primas de fontes renováveis, como: milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina e outras (NBR 15448-1). As fontes renováveis são assim conhecidas por possuírem um ciclo de vida mais curto comparado com fontes fósseis como o petróleo que leva milhares de anos para se formar.

As características dos polímeros empregados para a liberação controlada formam um complexo que influencia a eficiência da microencapsulação. Fatores como tensão superficial do sistema, capacidade de adsorção dos polímeros ao recheio, polaridade do recheio e viscoelasticidade do complexo têm grande importância na formação da parede das microcápsulas e, por esta razão, influenciam a eficiência do complexo em reter o ativo.

Normalmente, compostos líquidos ou particulados hidrofóbicos e partículas sólidas com baixa solubilidade são microencapsulados com sucesso pela técnica de coacervação complexa. No caso de microencapsulação de ativos hidrossolúveis, essa técnica é dificilmente aplicada, uma vez que o ativo ficaria dissolvido na solução polimérica (SCHMITT et al., 1998; KRUIF; WEINBRECK; VRIES, 2004). Algumas condições físicas como temperatura, velocidade e tempo de agitação e pressão podem influenciar na formação e estabilidade dos coacervados produzidos (SCHMITT et al., 1999; GOUIN, 2004).

Os biopolímeros mais indicados para a utilização na coacervação complexa são aqueles que apresentam propriedades coloidais hidrofílicas, densidades de cargas adequadas e cadeias lineares. Alguns exemplos de biopolímeros passíveis de serem utilizados são: gelatinas, alginatos, albuminas, caseína, ágar, gomas e pectinas (THIES, 1995; JACOBS; MASON, 1993). Diversos sistemas de materiais de parede já foram avaliados no processo de coacervação complexa, mas o mais estudado e compreendido é o sistema gelatina-goma arábica (GOUIN, 2004; QV; ZENG; JIANG, 2011).

O Quadro 5 apresenta alguns polímeros utilizados em sistemas de liberação controlada.

Quadro 5: Polímeros utilizados em sistema de liberação controlada (BIZERRA; SILVA, 2006).

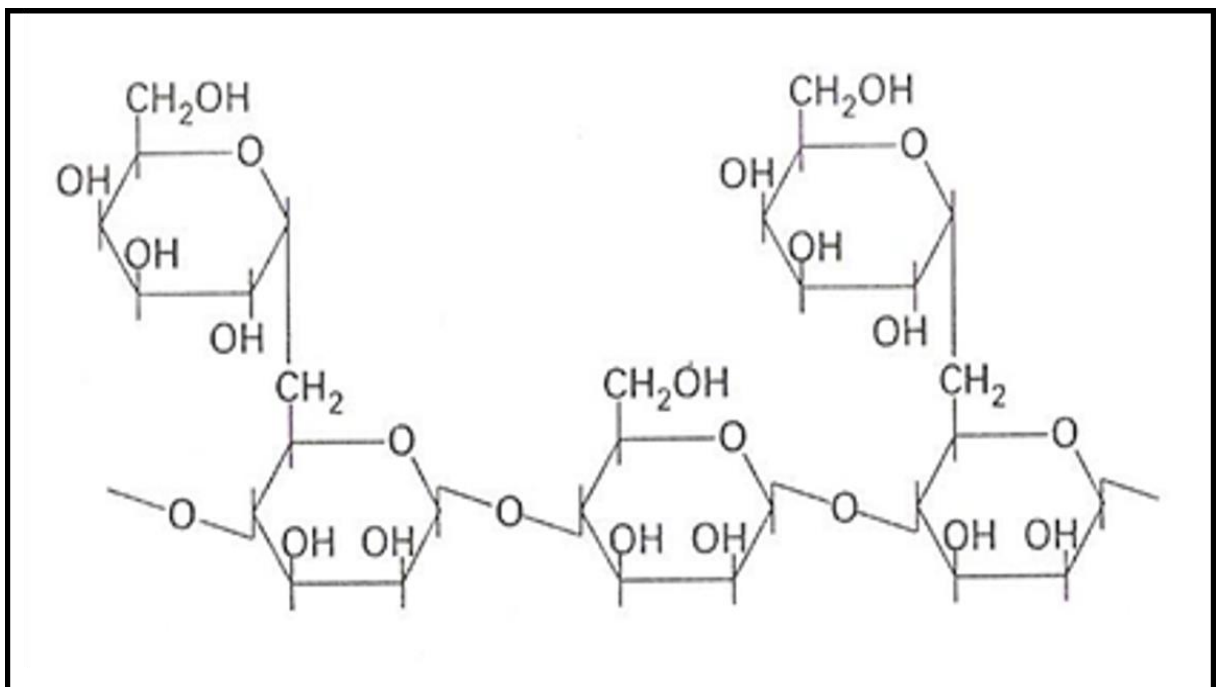
Classificação	Polímeros
Polímeros Naturais Polímeros a base de Proteínas	Colágeno, albumina, gelatina
Polissacarídeos	Agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextran, quitosana, ciclodextrinas
Polímeros Sintéticos Biodegradáveis Poliésteres	Poli(ácido lático), poli(ácido glicólico), poli(hidroxibutirato), poli(ϵ -caprolactona), poli(ácido β -málico), poli(dioxanonas)
Polianidridos	Poli(ácido sebácico), poli(ácido adípico), poli(ácido tereftálico) e vários copolímeros
Poliamidas	Poli(imino carbonatos), poliaminoácidos
Outros	Poli(ciano acrilatos), poliuretanos, éster poliorto, polidihidropirans, poliacetais
Polímeros Sintéticos - Não Degradáveis	
Derivados de Celulose	Carboximetil celulose, etilcelulose, celulose acetato, celulose acetato propionato, hidroxipropil metilcelulose
Silicones	Polidimetilsiloxano, sílica coloidal
Polímeros Acrílicos	Polimetacrilatos, poli(metilmetacrilato), poli hidro(etilmetacrilato)

2.3.1 Goma Guar

Sendo um polissacarídeo de alta massa molar, a goma guar é obtida do isolamento do endosperma da semente da planta guar. Como outras galactomanas, ela não forma géis físicos verdadeiros e é empregada como espessante, principalmente na indústria de alimentos, além de ser um material promissor na obtenção de plásticos biodegradáveis. Sua estrutura consiste em uma cadeia principal de (1-4)- β -D-manopiranosila parcialmente substituída na posição 0-6 por grupos de α -D-galactopiranosila (DASH et al., 2011; MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2011). As moléculas de goma guar são capazes de reter grandes quantidades de água em uma larga faixa de temperatura (0 - 78°C).

No câncer de cólon, filmes de quitosana e goma guar foram estudados como sistemas de liberação controlada tópica do anti-inflamatório Celecoxib, resultando em redução da proliferação de células tumorais (HAUPT et al., 2006). Estes filmes, formados provavelmente pela interação entre os grupos amino da quitosana e os grupos hidroxila da goma guar, apresentaram boas propriedades mecânicas, além de possibilitarem a incorporação do fármaco durante o preparo da microcápsula. O Quadro 6 apresenta a estrutura química da goma guar.

Quadro 6: Estrutura química da goma guar (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2011).



2.3.2 Goma Arábica

Extraída de árvores como a *Acacia senegal* e *Acacia seyal*, a goma arábica é uma das gomas mais antigas e importantes industrialmente. É utilizada, principalmente, como emulsificante, mas também como espessante e estabilizante em alimentos e cosméticos, além de ter uso na indústria de tintas. Composta de macromoléculas (250-2000kDa) formadas predominantemente por carboidratos, entre eles D-galactose, L-arabinose, L-ramnose e alguns derivados ácidos como os ácidos D-glicurônico e 4-O-metil-D-glicurônico e seus respectivos sais metálicos, responsáveis pelo caráter aniônico da goma. Encontram-se também presentes em sua estrutura proteínas (cerca de 2% em massa), compostas principalmente de resíduos de hidroxiprolina, prolina e serina. Estudos sugerem que a estrutura desta goma seja globular, com unidades polissacarídicas ligadas a uma cadeia polipeptídica comum e que esta característica seja responsável por sua atividade superficial e capacidade de formação de filmes. A abertura da estrutura globular depende da dissociação das unidades de ácido úrico e seus respectivos sais (cálcio, magnésio e potássio) (NISHI; JAYAKRISHNAN, 2005; YADAV et al., 2007; LI et al., 2011).

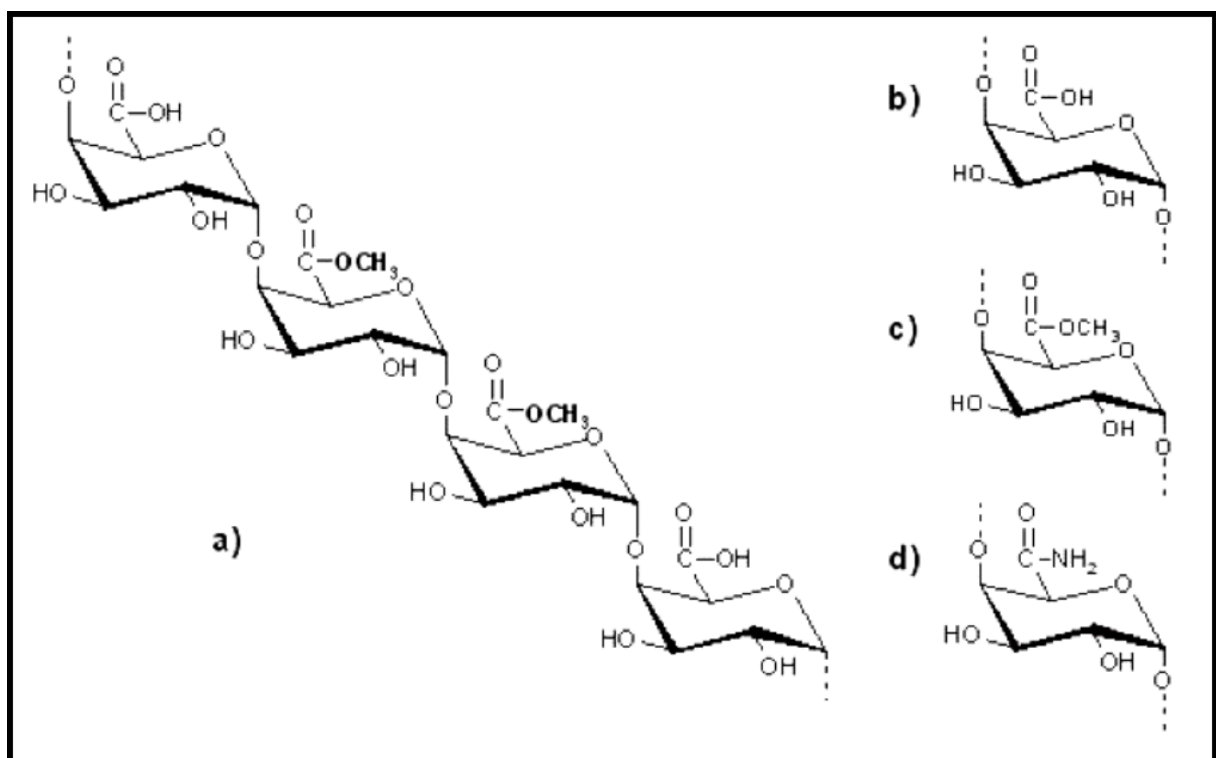
A goma arábica é muito solúvel em água, podendo-se preparar soluções com concentrações acima de 50% em massa, formando uma solução de baixa viscosidade em comparação com outras gomas. Ela apresenta um comportamento tipicamente Newtoniano em concentrações maiores que 40% em massa. Próximo ao pH neutro, os grupos carboxila estarão desprotonados portanto, com carga elétrica negativa, resultando em sua repulsão, o que ocasiona a abertura da molécula, expandindo sua estrutura, que pode facilitar a complexação com polímeros positivamente carregados facilitando assim o *crosslink* (YADAV et al., 2007; LI et al., 2011).

2.3.3 Pectina

A pectina extraída da parede celular de algumas plantas e do albedo de frutas cítricas (o albedo é a parte branca e fibrosa que se encontra internamente a casca das frutas, sendo rico em pectina) a pectina é um polissacarídeo composto de segmentos galacturônicos metilados, separados por resíduos de ramnose, sendo usualmente classificada quanto ao grau de metoxilação. Apresenta baixa metoxilação quando o grau estiver abaixo de 50% em massa e de alta metoxilação quando o grau estiver acima de 50% em massa (FELLAH et al., 2009; HAGESAETHER; HIORTH; SANDE, 2009).

A formação de gel é dependente do grau de metoxilação. As pectinas muito metoxiladas formam gel na presença, por exemplo, de açúcar como co-soluto, e esta gelificação ocorre, provavelmente, por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. As pectinas com baixa metoxilação formam gel na presença de íons divalentes como o cálcio, que são capazes de formar pontes entre dois grupos carboxílicos pertencentes a cadeias diferentes de pectina próximas fisicamente (CHANG; LIN, 2000; HIORTH et al., 2005). O Quadro 7 apresenta o segmento repetitivo na molécula de pectina.

Quadro 7: Segmento repetitivo na molécula de pectina (a) e grupos funcionais carboxila (b); éster (c); amida (d) na cadeia de pectina (SRIAMORNSAK, 2003).



Existem trabalhos que avaliaram o potencial de filmes de pectina, quitosana e hidroxipropil metilcelulose como sistema de revestimento para comprimidos (MACLEOD; COLLET; FELL, 1999). Uma formulação adequada do filme é capaz de produzir sistemas que liberam o fármaco a diferentes taxas no trato gastrointestinal (GHAFARI et al., 2007). A razão mássica ótima entre os polímeros para formação do complexo foi de 2:1 Pectina : Quitosana. Os filmes com menor proporção de pectina (1:3 Pectina : Quitosana) geralmente apresentam maior absorção de tampão fosfato salino, maior permeabilidade ao fármaco e maior força mucoadesiva, o que confirma a relação direta entre mucoadesividade e

permeabilidade a fármacos, uma vez que ambos tendem a aumentar quando a capacidade de intumescimento do material também aumenta.

2.3.4 Gelatina

Existem inúmeras aplicações da gelatina na indústria de alimentos e farmacêutica e é obtida a partir do colágeno encontrado na pele e ossos de animais abatidos e aprovados para consumo humano (KALMAN, 2004).

Sendo principalmente composta pelos aminoácidos glicina (cerca de 33% em massa) e prolina/hidroxiprolina (22% em massa), sendo o restante da sua estrutura constituído por 17 aminoácidos, onde a alanina é a mais abundante na gelatina, seguida por ácido glutâmico, arginina e ácido aspártico. As gelatinas comerciais possuem em torno de 84-90% em massa de proteína, 8-12% em massa de água e 2-4% em massa de sais minerais, não contém gordura ou carboidratos, e seu valor calórico é em torno de 3,6 calorias/g (KALMAN, 2004).

2.3.5 Quitosana

É um polissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração do exoesqueleto de insetos e crustáceos. A cadeia polimérica da quitosana é formada principalmente por unidades de β -(14)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (BAZZO; LEMOS – SENNA; PIRES, 2009).

A quitosana apresenta uma propriedade mucoadesiva, devido à força atrativa molecular formada pela interação eletrostática entre a quitosana positivamente carregada e mucosas do corpo humano negativamente carregadas esta propriedade estimula a elaboração de trabalhos de micropartículas e nanopartículas de quitosana para liberação controlada de fármacos (DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004).

Vários trabalhos mostraram que quando se utiliza quitosana de alta massa molar, tem-se um efeito *burst* (romper/estourar) menos pronunciado e um maior prolongamento da liberação de ativos quando comparada às de baixa e média massa molar (GAN; WANG, 2007). A quitosana por ser um polímero hidrofílico, não é capaz de prolongar a liberação de ativos por longos períodos de tempo, havendo a necessidade de ser reticulada para que a matriz de quitosana torne-se mais compacta.

2.3.6 Alginatos

São polímeros extraídos de algas marrons, geralmente são utilizados na microencapsulação de células. Esses polímeros pertencem a uma família de polissacarídeos lineares não ramificados, e são constituídos por duas unidades monoméricas, o ácido D-manurônico e o ácido L-gulurônico (GOMBOTZ; WU, 1998).

A composição e extensão das sequências e a massa molar determinam as propriedades físicas dos alginatos.

Ligados a cátions multivalentes, tais como Ca^{2+} (cálcio) ou Ba^{2+} (bário) as micropartículas de alginato de cálcio são preparadas por dois métodos: por gotejamento de uma solução de alginato de sódio em uma solução de um sal de cálcio e por gelificação do alginato em uma emulsão água/óleo (GOMBOTZ; WU, 1998).

O gel de alginato é suscetível à quebra na presença de excesso de agentes quelantes de íons de Ca^{2+} (cálcio) e ambiente com pH muito baixo (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). Os policátions, tais como quitosana ou ácidos poli-amino, formam um complexo forte com alginatos que são estáveis na presença de agentes quelantes de Ca^{2+} (SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1990; GOMBOTZ; WU, 1998).

2.4 INCORPORAÇÃO DE ATIVOS

A incorporação de ativos em matrizes poliméricas vem sendo explorada com o objetivo de melhorar a aplicação dos mesmos. A liberação controlada ocorre quando o sistema polímero/ativo é projetado para liberar o ativo de uma maneira previamente determinada. Um dos objetivos é atingir perfis de liberação adequados durante um longo período, evitando flutuações da concentração e reduzindo a necessidade de administrações frequentes (DUARTE et al., 2006).

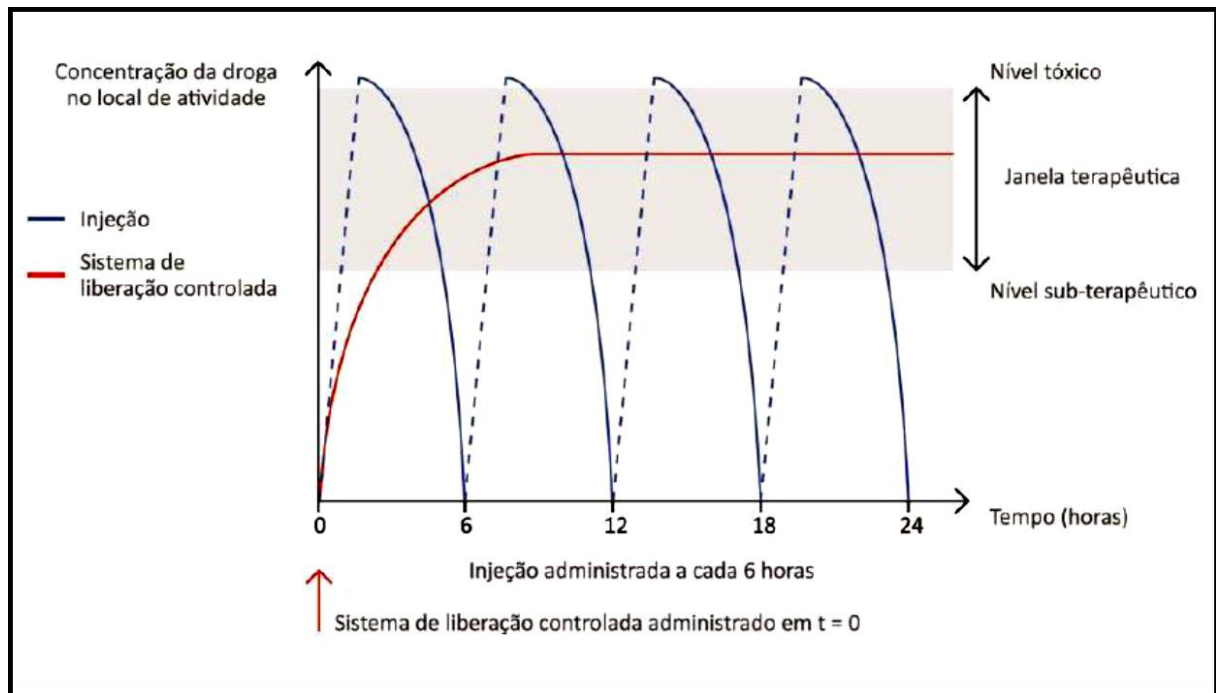
Alguns sistemas de liberação de drogas, nos quais o agente ativo a ser incorporado pode estar quimicamente ligado, disperso ou dissolvido na estrutura dos filmes (OLIVEIRA et al., 2004; WANG et al., 2007). De forma geral, o ativo pode ser incorporado às membranas durante sua preparação, se adicionados à mistura resultante das soluções dos constituintes do filme, ou por impregnação após a preparação do filme usando solventes aquosos ou orgânicos. A escolha do método utilizado depende diretamente das características do ativo escolhido e do tipo de matriz a ser formada (LIN; METTERS, 2006).

2.5 LIBERAÇÃO DE ATIVOS

Depois da incorporação do ativo, o sistema deve ser capaz de liberá-lo em doses controladas. Frente a isto, o estudo da liberação da molécula ativa da matriz polimérica é de grande importância para o desenvolvimento do sistema.

A liberação controlada tem como vantagem a presença contínua de uma determinada dosagem do medicamento no corpo do paciente, permanecendo acima dos limites mínimos de eficácia requeridos e não excedendo valores altos que podem ser nocivos ao paciente como ilustrado no Gráfico 2.

Gráfico 2: Concentração do ativo na região da lesão utilizando-se o tratamento convencional de injeções (-) e utilizando-se um sistema de liberação controlada (-) (adaptado de UHRICH et al., 1999).



O controle da liberação do ativo é atribuído à permeabilidade do dispositivo polimérico estes dispositivos são classificados em dois tipos, reservatório ou matriz. No primeiro tipo, o ativo fica armazenado em um reservatório recoberto por uma membrana polimérica, enquanto que no segundo tipo, o ativo se encontra dissolvido ou disperso homogeneamente na forma de partículas sólidas na matriz polimérica (COMYN, 1985).

A escolha do polímero ou polímeros utilizados nos dispositivos de liberação controlada é influenciada, não só por aspectos como biocompatibilidade e segurança, mas também pelas suas características de solubilidade e estabilidade. A degradação e dissolução

do polímero afetam diretamente a liberação do fármaco durante a utilização do dispositivo (COMYN, 1985).

2.5.1 Liberação controlada de base polimérica

Os materiais poliméricos são a classe de materiais mais investigada no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada por ser versátil e por suas propriedades. Atualmente os novos sistemas de liberação controlada mais eficientes evoluem simultaneamente com o desenvolvimento de novos polímeros, desenvolvidos para ter propriedades cada vez mais específicas (KIM et al., 2009).

Existe uma grande variedade de polímeros, sintéticos, naturais ou semi-sintéticos que apresentam aplicações no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, alguns exemplos são apresentados no Quadro 8.

Quadro 8: Exemplos de polímeros sintéticos utilizados na fabricação de sistema de liberação controlada (UCHEGBU; SCHATZLEIN, 2006; SALTZMAN, 2001).

Polímeros não biodegradáveis	Polímeros biodegradáveis
- Acrilatos: poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA)	- Poliésteres: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli-ε-caprolactona (PLC), poli(diaxanona) (PDS)
- Acrilamidas: poliacrilamida, poli(N-isopropilacrilamida)	- Poliortoésteres
- Polidimetilsiloxano (PDMS)	- Polifosfazenos
- Polietilenoglicol (PEG)	- Polianidridos
- Copolímeros de acetato de etilenovinil (EVA)	- Poliuretanas
- Polivinilpirrolidona (PVP)	- Poliaminoácidos sintéticos

Um requisito fundamental para que os materiais poliméricos possam ser utilizados na preparação de um sistema de liberação controlada é que estes e os seus produtos de degradação não sejam tóxicos, e que apresentem uma boa biocompatibilidade com os tecidos que vão ter contato direto. Como os sistemas vivos são compostos em sua maioria por água, as propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas dos polímeros são também um aspecto fundamental a ser considerado ao escolher para uma aplicação específica.

Outra importante propriedade de um polímero para uma determinada aplicação é a forma como este se degrada, ou seja, se este é biodegradável ou não biodegradável. Um

polímero biodegradável pode ser definido como um polímero que sofre degradação química *in vivo*, por hidrólise ou ação enzimática, originando produtos não tóxicos e bicompatíveis capazes de ser metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais (SALTZMAN, 2001).

Os sistemas de liberação controlada preparados a partir de materiais poliméricos podem ser classificados em três grandes categorias, de acordo com o mecanismo de liberação do ativo (JAIN , 2004): (i) sistemas de liberação controlados por difusão; (ii) sistemas de liberação ativados pelo solvente; (iii) sistemas de liberação controlados por ação química.

Os sistemas de liberação controlada por difusão encontram-se divididos em dois tipos: sistemas de reservatório e sistemas matriciais.

Um sistema de liberação controlada de reservatório consiste num dispositivo constituído por um núcleo do ativo, no estado líquido ou sólido, rodeado por uma membrana polimérica não biodegradável, através da qual o fármaco se difunde lentamente. Em sua maioria estes dispositivos assumem uma geometria esférica, cilíndrica ou na forma de disco. As propriedades do ativo e da membrana polimérica determinam a taxa de difusão e, conseqüentemente, a taxa de liberação do ativo. Num sistema matricial o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, sendo a taxa de liberação controlada pela taxa de difusão do ativo através dessa mesma matriz. Os sistemas de liberação ativados pelo solvente encontram-se também divididos em dois tipos - sistemas de liberação controlados pela pressão osmótica e sistemas controlados pela absorção de água (*swelling*). Nos sistemas de liberação controlados pela absorção de água o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido numa matriz polimérica constituída por um polímero hidrofílico reticulado (hidrogel). Estas matrizes têm a capacidade de absorver uma grande quantidade de água sem se dissolver, nestes sistemas, a taxa de liberação do ativo é essencialmente controlada pela taxa de absorção de água da matriz polimérica (COIMBRA, 2010).

Os sistemas de liberação controlados por ação química são normalmente divididos em sistemas de cadeias pendentes e em sistemas biodegradáveis.

Na prática, alguns sistemas de liberação controlada não encaixam em nenhuma das categorias citadas, pois compartilham seu mecanismo de liberação do ativo por uma combinação de vários mecanismos como por exemplo alguns sistemas matriciais

biodegradáveis em que a liberação controlada do fármaco é controlada tanto pela difusão do ativo como pela biodegradação do polímero.

2.6 POLÍMEROS DE ORIGEM NATURAL

Os polímeros produzidos por organismos vivos são considerados polímeros naturais. Estes incluem as proteínas, os ácidos ribonucleicos (RNA) e ácidos desoxirribonucleicos (DNA), os polissacarídeos, e outros polímeros como a borracha natural e alguns poliésteres. Os derivados de polímeros naturais, também designados por semi-sintéticos, são polímeros naturais modificados quimicamente (SOUZA, 2013).

No Quadro 9 encontram-se alguns dos polímeros naturais e derivados mais utilizados e estes podem ser divididos em três grandes classes: polímeros de base proteica, polissacarídeos e polihidroxialcanoatos.

Quadro 9: Exemplos de polímeros naturais e seus derivados utilizados na preparação de sistema de liberação controlada.

Polímeros de base proteica	Polissacarídeos	Polihidroxialcanoatos
- Gelatina, albumina, colagénio, fibrina, proteína de soja, entre outros	- Quitosana, dextrano, alginato, agarose, carragenina, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, pectina, amido, derivados de celulose, entre outros	Poli(3-hidroxi butirato), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato), entre outros

2.7 POLÍMEROS FILMOGÊNICOS

Inúmeros avanços nas áreas de tecnologia farmacêutica e bioengenharia têm permitido o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos cada vez mais específicos e seletivos, obtidos a partir de materiais que podem ser mantidos em contato com sítios orgânicos sem causar qualquer dano tecidual e, possibilitando liberação adequada do fármaco (RATNER, 1981; LINHARDT, 1989; UHRICH et al., 1999).

Os polímeros formadores de filmes conhecidos como filmógenos visam envolver uniformemente partículas ou a forma farmacêutica que se pretende revestir. A obtenção de medicamentos sólidos orais de liberação entérica baseia-se, principalmente, no princípio da separação da substância ativa do meio de dissolução por meio de um revestimento ou membrana na forma farmacêutica contendo o fármaco e os excipientes quando necessário. O objetivo deste revestimento é conferir à preparação uma resistência à

desagregação no meio gástrico. (VEIGA, 2012; LINHARDT, 1989; CHIAO; ROBINSON et al., 1999).

Os principais polímeros filmógenos possuem grupos carboxil, os quais são insolúveis em água na sua forma protonada (meio ácido) e se solubilizam na faixa de pH fracamente ácida a neutra, entre 5,0 - 7,0, por meio da formação de sais. Os fabricantes destes polímeros oferecem produtos que apresentam uma variedade de perfis de liberação, uma vez que as características de liberação podem ser direcionadas em certas faixas de pH por meio do número de grupos carboxilas e da natureza dos ácidos na molécula, uma das formas possíveis para escolher um polímero com um menor ou maior pH de dissolução para influenciar o início da desagregação da forma farmacêutica e liberação do fármaco em diferentes partes do intestino (VEIGA, MORAES; 2012).

2.8 FISIOLOGIA DO TRATO GASTRINTESTINAL: PH E TEMPO DE Esvaziamento

Durante todo o percurso do trato gastrointestinal o pH fisiológico e o tempo de esvaziamento do trato gastrointestinal variam, sofrendo influência da alimentação. A compreensão da fisiologia do sistema digestivo é fundamental para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada. A Tabela 1 é apresentada a variação fisiológica do pH e o tempo de trânsito no trato gastrointestinal.

Tabela 1: Variação do pH e tempo de trânsito no trato gastrointestinal.

Região do trato digestivo	pH médio	Tempo médio de permanência
Boca e esôfago	6,7 - 7,0	2 - 10 segundos conforme a consistência
Estômago	1,0 - 2,0 em jejum; 3,0 (dependendo da refeição)	Pequenos volumes de líquido em jejum: 10 minutos a 1 hora. Refeições de 1 - 8 horas Primeira passagem em cerca de minutos
Duodeno	4,0 - 6,0	5 - 15 minutos
Jejuno	6,0 - 7,0	2 - 3 horas e 30 minutos
Íleo	7,0 - 8,0	3 - 6 horas
Cólon	7,0 - 8,0	Ceco e cólon ascendente 1 hora Cólon transversal de 3 - 4 horas Cólon descendente 3 horas

		Cólon pélvico é atingido em aproximadamente 18 horas
--	--	--

Fonte: Aiache et al., 1982.

Ao decorrer do trato gastrointestinal o pH se eleva continuamente do duodeno, onde está próximo a 6,0, para o cólon onde se encontra próximo a 7,5. Conseqüentemente, a liberação em locais específicos pode ser obtida utilizando agentes de revestimento que se dissolvem nesta faixa em função do pH, revestimentos com dissolução em pH acima de 6,0 são de particular interesse em preparações de liberação entérica (BAUER et al., 1998).

2.9 REVESTIMENTO DE ATIVOS EM MEMBRANAS

O revestimento de ativos em sistemas poliméricos é um aspecto importante da tecnologia farmacêutica, facilitando a administração do agente bioativo ao paciente, interferindo em seu perfil de biodisponibilidade, ou modificando sua estabilidade (OLIVEIRA et al., 2004), além de controlar a velocidade de liberação sem alterar a estrutura química do composto ativo. A Tabela 2 apresenta as características gerais de cada biopolímero.

Tabela 2: Características gerais de cada biopolímero

Polímero	Fonte	Grupo ionizável	pKa	Massa molar média (Da)
Quitosana	Carapaça de crustáceos	-NH ₂	6,3	5,49 × 10 ⁵ A
Xantana	Produto de <i>X. campestris</i>	-COOH	2,9	2,65 × 10 ⁶ B
Pectina	Frutas cítricas	-COOH	3,5-4,1	0,66 × 10 ⁵ C
Goma Guar	Planta guar	-OH	NE	1,45 × 10 ⁶ B
Goma Arábica	Planta acácia	-COOH	2,2	3,82 × 10 ⁵ D

NE: Não encontrado; A: YEN et al. (2009); B: KHOURYIEH et al. (2007); C: GUO et al. (2012); D: YANG et al. (2012)

O revestimento em matrizes poliméricas vem sendo explorado a fim de melhorar a aplicação dos ativos. A liberação controlada ocorre quando o sistema polímero/ativo é projetado para liberar de uma maneira previamente determinada. Um dos objetivos é atingir perfis de liberação adequados durante um longo período, evitando flutuações da concentração e reduzindo a necessidade de administrações frequentes (DUARTE et al., 2006).

São descritos na literatura inúmeros sistemas de liberação, nos quais o agente ativo a ser incorporado pode estar quimicamente ligado, disperso ou dissolvido na estrutura dos filmes (OLIVEIRA et al., 2004; WANG et al., 2007). No geral, os ativos podem ser incorporados às membranas durante sua preparação, se adicionados à mistura resultante das soluções dos constituintes do filme, ou por impregnação após a preparação do filme usando solventes aquosos ou orgânicos. A escolha do método utilizado depende diretamente das características do ativo escolhido e do tipo de matriz a ser formada (LIN; METTERS, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão apresentados os materiais e métodos utilizados para a produção das microcápsulas.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Processamento e Caracterização de Materiais da Universidade Mackenzie e no laboratório de Tecnologia e Processamento da empresa Science Solution.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matéria prima e reagentes.

O nome dos reagentes utilizados, bem como o seu grau de pureza, fornecedor, e outras informações, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Materiais a serem utilizados neste trabalho.

Reagente	Pureza	Marca	Características
Gelatina	Não se aplica (NA)	Gelita South América (Mococa, Brasil)	240 Bloom Viscosidade 34 à 45mPs pH 5,0 à 6,0
Celulose microcristalina MC 101	NA	Blanver Farmoquimica	Pó branco, não fibroso pH 5,0 à 7,0
Goma arábica	NA	Tovani Benzaquen (São Paulo, Brasil)	Viscosidade: 30000 min. pH em solução aquosa a 1% em massa: 6,0 – 8,5
Cera de abelha	NA	CerasMel Relumay (Bauru, SP.)	Tabletes; Ponto de fusão 60° - 65° C
Lecitina de soja	NA	Solae Company (Esteio, RS, Brasil)	Insolúvel em acetona 54,5% em massa Viscosidade 2600CPOISE Umidade 0,6% em massa
Proteína WPC 60	68,60% utilizado	Performance	pH 6,2 à 6,8

	≥ 60% em massa	Nutrition (Santo André, SP, Brasil)	densidade aparente 40,0 – 60,0 g/100mL teor de gordura ≤5,0% em massa
Sulfato de sódio	98,5% em massa	Mapric (Mooca, SP, Brasil)	Ponto de fusão : 844°C (1551°F) pH: 5,2 – 9,2
Ácido clorídrico		Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)	Temperatura de ebulição: 75°C PH: < 1

Tabela 3: Materiais a serem utilizados neste trabalho (cont).

Reagente	Pureza	Marca	Características
Hidróxido de sódio	97,0% em massa	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)	pH Sol. 5% em massa: ~14 Temperatura de fusão: 323°C
Propilenoglicol	≥ 99,80% em massa	Mapric (Mooca, SP, Brasil)	Líquido incolor Densidade relativa 1,036g
Alginato de sódio FD 175	NA	Danisco	Pó de coloração creme produzido a partir de algas marrons pH (solução 1% em massa) 5,5 à 7,5 viscosidade 350 à 550 mPa's
Quitosana	desacetilação 98,15%, em massa	Valdequímica (São Paulo, Brasil)	Pó amarelado
Glicerina bi destilada	Glicerol ≥ 99,50% em massa	Mapric (Mooca, SP, Brasil)	Líquido viscoso e transparente Densidade à 25° C 1,2500 g/cm ³
Álcool 70°	76,9 - 81,4% em massa	CALLAMARYS INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE COSMÉTICOS E SANEANTES LTDA	pH do produto (puro) - 5,0 - 10,0 Densidade (g/ml/ 20°C) 0,860 - 0,880
Metabissulfito de sódio	Pureza como Na ₂ S ₂ O ₅ 97,2% em massa	Casa da Química (Diadema, SP, Brasil)	Aparência Pó Cristalino pH, solução 5% em massa, 20°C 3,5 – 5,0
Corante azul brilhante	NA	Química Credie Ltda	Pó Azul Odor inodoro

3.1.2 Equipamentos utilizados

Lista de equipamentos utilizados neste trabalho:

- Balança BG 400 – GEHAKA

- Aquecedor com agitação magnética C-MAG HS 4 S1 – IKA
- PHmetro Q400AS – QUIMIS
- Sonicador VCF 1500 – SONICS
- Ultra Turrax T25 digital – IKA
- Concentrador de amostra 78100-00 B - LABCONCO
- Ribon Blander – CONSOLID
- Espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453 – AGILENT
- Tamis mesh 10 à 500 – BERTEL INDUSTRIA METALURGICA

3.2 MÉTODOS

Foram propostos quatro tipos de encapsulação:

- a) cera de abelha, proteína e posteriormente lecitina de soja;
- b) cera de abelha, proteína, alginato e posteriormente lecitina de soja;
- c) cera de abelha, alginato, quitosana e posteriormente recoberto com lecitina de soja ;
- d) cera de abelha, proteína, celulose microcristalina e recoberto com lecitina de soja.

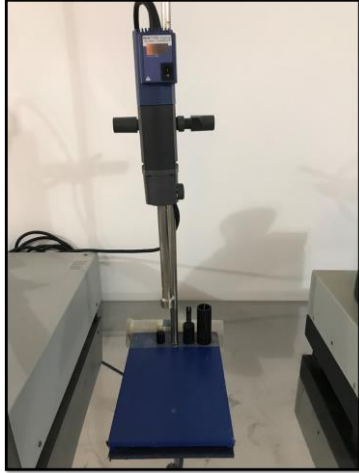
Além de avaliar o tipo de encapsulação, foi testada a veiculação de duas concentrações diferentes da proteína (40% e 60% (m/v)). Foi realizado em todas as etapas, testes em duplicatas, uma parte da proteína foi coradas com corante azul brilhante antes de formar as esferas para a realização de um teste preliminar de rompimento de membrana, enquanto a outra parte sem o corante foi utilizada para o teste de absorbância após o tratamento para liberação.

3.2.1 Coacervação Complexa

As microesferas foram preparadas por meio da técnica de coacervação complexa conforme descrito na revisão bibliográfica.

O equipamento utilizado foi o agitador UltraTurrax IKA (T25N) (Fotografia 1) na temperatura de 40°C, depois utilizou-se o sonicador (Fotografia 2), VCF 1500 – SONICS, na temperatura de 45°C pelo tempo de 10 minutos por 3 ciclos.

Fotografia 1: Agitador UltraTurrax IKA (T25N).



Fonte: Acervo do Autor

Fotografia 2: Sonicador SONIC.



Fonte: Acervo do Autor

Em um béquer de vidro derreteu-se a cera de abelha (40°C) e adicionou-se a proteína para adsorção.

Em um outro béquer foi suspenso os polímeros em água a 40°C, sob agitação em um agitador UltraTurrax. A seguir foi adicionado o produto da mistura proteína/cera de abelha. Após 5min esta emulsão foi colocada em sonicador onde sofreu 2 ciclos, no total de 5 minutos cada. Posteriormente, com o auxílio de um concentrador de amostras (Fotografia 3) separou-se as microcápsulas do solvente, e deixou-se secar por 24h.

Fotografia 3: Concentrador de amostras.



Fonte: Acervo do Autor

Foram obtidas duas amostras: uma sem corante e a outra com corante azul brilhante.

Na amostra contendo corante, o mesmo foi adicionado na primeira etapa na incorporação da cera.

3.2.2 Obtenção das micropartículas compostas a partir da técnica de *spray drying*.

As microcápsulas foram obtidas utilizando um *ribon blander* com lecitinador. As microcápsulas foram revestidas por etapas, ou seja, cada revestimento foi adicionado em diferentes momentos. As microcápsulas foram obtidas desta forma para um controle da liberação da proteína.

A atomização foi obtida segundo Dhawans e colaboradores (2004) colocando a solução pulverizada em contato com o ar quente, com temperaturas abaixo da degradação dos polímeros e do ativo, ocorrendo uma rápida evaporação do solvente. As partículas foram removidas após total secagem, usando a técnica adaptada (DHAWANS et al., 2004).

A primeira etapa de incorporação da cera foi realizada como descrito anteriormente. Em um *ribon blander* de bancada, foi acrescentado o produto obtido anteriormente e com o auxílio do *spray* de lecitinação incorporou-se os polímeros utilizando uma solução de álcool 96%. As amostras foram obtidas logo após a aspersão dos polímeros.

Foram obtidas duas amostras: uma sem corante e a outra com corante azul brilhante.

Na amostra contendo corante, o mesmo foi adicionado na primeira etapa na incorporação da cera.

3.2.3 Caracterização das Amostras

Foram obtidas 16 amostras, onde 8 foram obtidas pelo processo de coacervação complexa (A1, B1, C1, D1 e A1, B1, C1, D1 com corante) e 8 amostras pelo processo de *spray-drying* (A2, B2, C2, D2 e A2, B2, C2, D2 com corante).

Na Tabela 3 é apresentado um resumo das condições operacionais, durante a coacervação complexa.

Tabela 4: Tratamentos obtidos durante a produção das microcápsulas por coacervação complexa. Resumo das condições operacionais, durante a coacervação complexa

ETAPAS	CONDIÇÕES
Primeira etapa de emulsificação	Ultraturrax - 12000 rpm/ 4 minutos
Segunda etapa de emulsificação	Ultraturrax - 10000 rpm/ 3 minutos
Agitação durante o <i>crosslinking</i>	Ultraturrax - 06000 rpm/ 2 minutos
Temperatura de resfriamento	10°C ± 0,1
pH de coacervação	3,5 à 6,3
Decantação das micropartículas	Temperatura ambiente por 24 horas

3.2.3.1 Análise da distribuição do tamanho de partícula

A distribuição granulométrica das partículas foi determinada preliminarmente com a utilização de peneiras e um agitador magnético (Bertel). Posteriormente foi realizado uma microscopia eletrônica de varredura (MEV). A morfologia das partículas foram recuperadas pelos diferentes protocolos de recuperação descritos anteriormente, utilizando um potencial elétrico de excitação de 10 kV. As amostras foram fixas em suportes metálicos, por meio de fita adesiva de dupla face, secas ao ar e revestidas com ouro, sob vácuo, de modo a tornarem-se eletricamente condutoras.

3.2.3.2 Testes de estabilidade em função do pH

A estabilidade da proteína nas amostras foram determinada por meio da determinação da quantidade de proteína detectada após permanência em diferentes meios reacionais.

Para esta determinação foram colocados em um balão volumétrico de 25 mL, 22,5 mL de água destilada, sendo o balão avolumado com a respectiva amostra. A estabilidade e a liberação da proteína foi verificada em três condições experimentais diferentes:

- a) pH 1,2 que simulou o suco gástrico;
- b) pHs 6,8 e 7,4 que simularam o suco entérico (intestinal e intestinal colônico, respectivamente).

Todos os testes foram efetuados à 37°C.

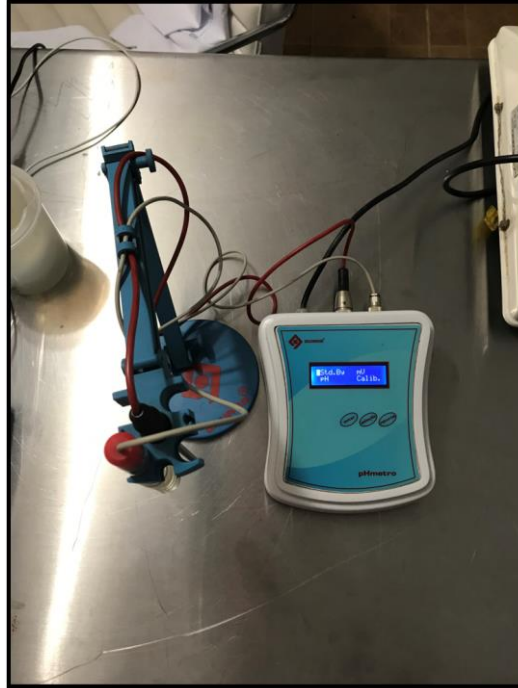
Foram realizadas leituras de absorvência a 280 nm para quantificação direta de proteína já que a mesma absorve neste comprimento de onda, devido à presença de cadeias laterais aromáticas do triptofano, da tirosina e da fenil alanina. As medidas foram realizadas em intervalos de tempo de 10 min, num total de 50 min em cada meio. Para cada teste, foram montadas as respectivas curvas padrão. As leituras foram realizadas nas amostras não contendo o corante azul brilhante. As amostras contendo o corante azul brilhante ligado a proteína, também sofreram a simulação do suco entérico, como descrito anteriormente.

Para esta determinação, preparou-se 1 litro das soluções tampão usadas nas análises de estabilidade, onde se utilizou HCl 12 mol L⁻¹ (37%) (Synth, São Paulo, Brasil), KCl (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), NaOH e KH₂PO₄ (Fisher Scientific, Loughborough, Inglaterra).

Todas as soluções foram preparadas com água destilada produzida no dia do teste.

O suco gástrico, pH 1,2 foi preparado com solução de HCl 0,2 mol L⁻¹ e solução de KCl 0,05 molL⁻¹. Para pH 6,8, foi utilizada solução de KH₂PO₄ 0,17 mol L⁻¹ e solução de NaOH 0,045 mol L⁻¹. A solução de pH 7,4 foi preparada com solução de KH₂PO₄ 0,2 mol L⁻¹ e solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹. Para todos os casos, foram misturadas as soluções em balão de 1000 mL. O pH das soluções foi ajustado com soluções de NaOH e HCl 1 mol L⁻¹. O tampão de acetato pH 4.5 foi obtido conforme literatura (YU, et al., 2010), onde foram utilizados acetato de sódio (Synth) e ácido acético glacial (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, França). A proteína usada para os testes foi a Whey Protein – proteína do soro do leite (Performance Nutrition, Santo André SP). Todos os reagentes usados eram de grau analítico ou superior. As medidas de pH foram realizadas com o auxílio de um pHmetro digital de bancada Quimis (Fotografia 4).

Fotografia 4: pHmetro digital de bancada Quimis.



Fonte: Acervo do Autor

As leituras de absorvância foram efetuadas em um espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453 (Agilent Technologies Deutschland GmbH) (Fotografia 5).

Fotografia 5: Espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453 (Agilent Technologies Deutschland GmbH)



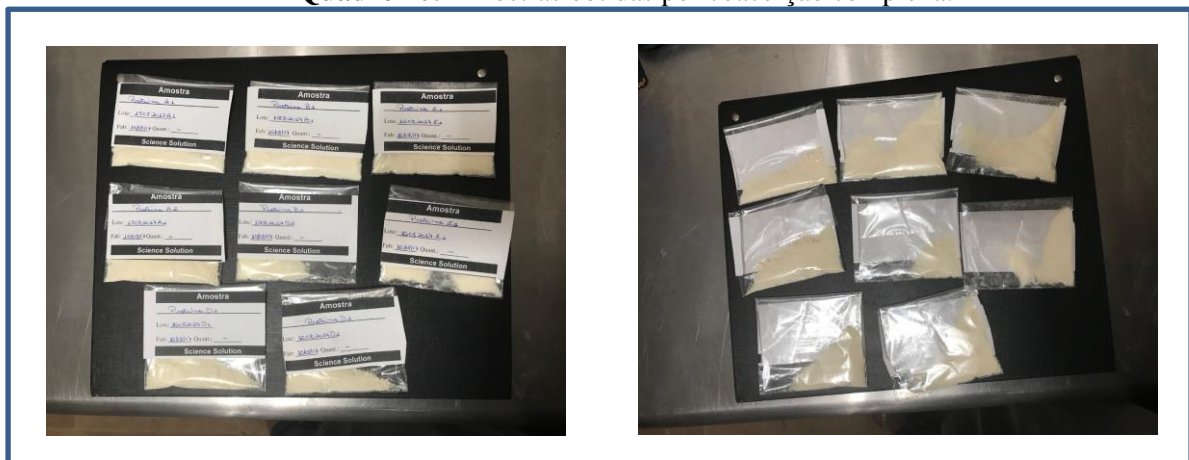
Fonte: Acervo do Autor

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE VISUAL

As microcapsulas foram produzidas pelos métodos descritos anteriormente. Acredita-se que o aspecto esférico das partículas foi devido a velocidade de agitação. No Quadro 10 e 11 são apresentados as amostras obtidas após secagem.

Quadro 10: Amostras obtidas por coacervação complexa.



Quadro 11: Amostras obtidas no *Ribbon Blander*.

Conforme pode ser observado nos Quadros 10 e 11 as amostras apresentam-se na forma de pó, adequada à complementos alimentícios que podem ser adicionadas a sucos e outros alimentos.

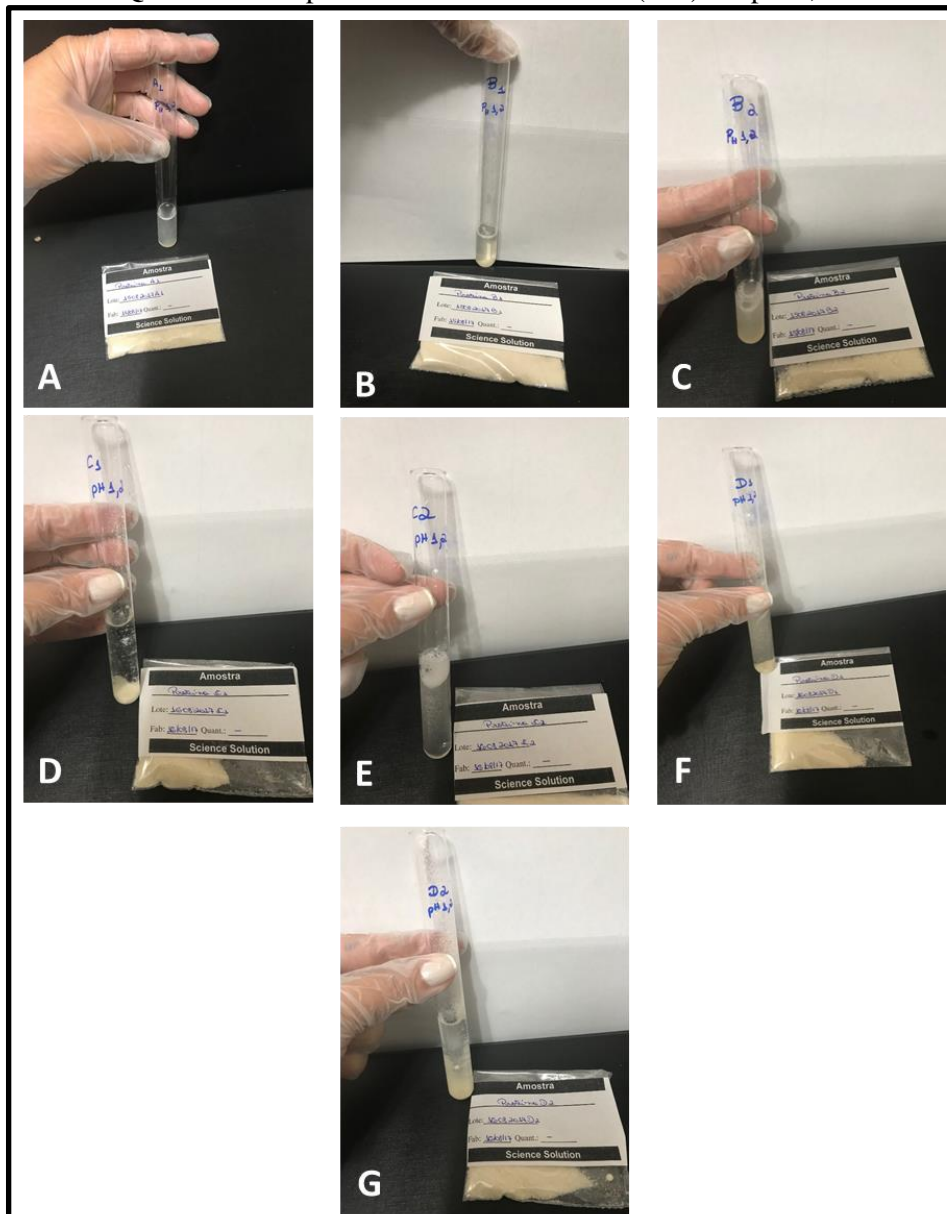
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.2.1 Interferência da concentração da proteína encapsulada

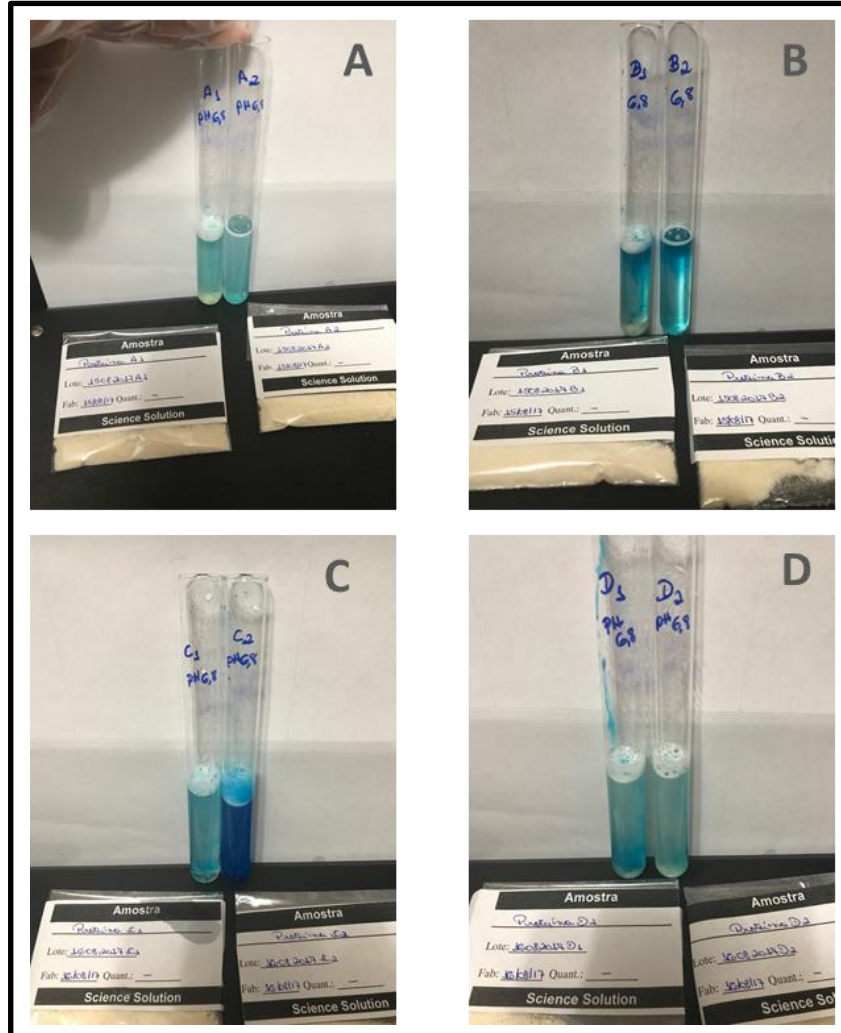
Para as cápsulas de WPC 40% e 60% (m/v), a análise morfológica foi auxiliada pela coloração das esferas com corante azul brilhante, conforme fotografias a seguir.

O Quadro 12 (a; b; c; d; e; f e g) e o Quadro 13 (a; b; c; d; e; f e g) representam o perfil de libertação da proteína, a partir das partículas contendo corante azul brilhante e proteína, em gradiente de pH semelhante ao do trato gastro intestinal (TGI). Porém, este ensaio foi realizado na ausência das enzimas gástricas e intestinais.

Quadro 12: Cápsulas de WPC 40% e 60% (m/v) em pH 1,2.



Quadro 13: Cápsulas de WPC 40% e 60% (m/v) em pH 6,8.



Conforme pode ser observado, nos Quadros 12 e 13 as amostras apresentam-se na forma de esferas (grânulos), sendo que estas apresentaram certa resistência quando aplicada uma força de compressão.

Os resultados obtidos para os ensaios de liberação e estabilidade estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Avaliação de estabilidade para as capsulas de WPC. Resultados obtidos após interação das cápsulas nos meios que simularam o suco gástrico (pH 1,2) e entéricos (pH 6,8), à 37°C.

A - Proteína + Cera				
Concentrações (m/v)	Tempo	pH 1,2	Tempo	pH 6,8
40% (A1)	40min	Não liberou	40min	Início de liberação em 29min, não liberou tudo
60% (A2)	40min	Início de liberação	40min	Início de liberação em 26min, liberou tudo
B- Proteína + Cera+ Alginato				
Concentrações	Tempo	pH 1,2	Tempo	pH 6,8
40% (B1)	40min	Não liberou	40min	Início de liberação em 37min, não liberou tudo
60% (B2)	40min	Não liberou	40min	Início de liberação em 37min, não liberou tudo
C- Proteína + Cera+ Alginato+ Quitosana				
Concentrações	Tempo	pH 1,2	Tempo	pH 6,8
40% (C1)	40min	Não liberou	2h20min	Início de liberação em 1h03min, não liberou tudo
60% (C2)	40min	Não liberou	2h20min	Liberou tudo
D- Proteína + Cera+ Celulose Microcristalina				
Concentrações	Tempo	pH 1,2	Tempo	pH 6,8
40% (D1)	40min	Não liberou	40min	Início de liberação 33min
60% (D2)	40min	Não liberou	40min	Início de liberação 21min

Por meio dos resultados pode-se observar que:

- Todas as amostras em pH 1,2 não liberaram a proteína encapsulada. A única amostra que apresentou início de rompimento foi a amostra do tipo A2 na concentração de 60%(m/v).
- As amostras A, B e D em pH 6,8 tiveram início de liberação da proteína revestida, após 40 minutos.
- As amostras C em pH 6,8 tiveram início de liberação da proteína na concentração de 40% e liberação total na concentração de 60%.

Foi realizado o teste em pH 7,4 mas não ocorreu nenhuma liberação da proteína revestida.

Uma alternativa anteriormente testada, envolvendo o teste com azul brilhante, permitiu a determinação de proteínas pela liberação da cor. Este teste é subjetivo, pois, a proteína utilizada nas amostras foi encapsulada e revestidas junto com o corante azul brilhante.

Neste caso, pode ser obtido um falso resultado negativo para a presença de proteínas pois caso haja a liberação de alginato, este pode reticular novamente a proteína e o corante.

O ativo pode ser liberado no organismo basicamente, a partir de dois diferentes mecanismos: difusão ou erosão.

No primeiro, o agente bioativo encontra-se envolvido por um filme ou membrana polimérica (sistema reservatório), ou disperso uniformemente em uma matriz (sistema matricial). Em ambos os casos, a difusão ocorre por meio de gradiente de concentração. Alguns polímeros, entretanto, não são adequados para a veiculação de substâncias hidrossolúveis e de baixa massa molar, uma vez que elas se difundem através da rede polimérica, independente da velocidade de degradação matricial. No processo de erosão, o controle químico ocorre por meio da degradação da matriz, sendo a taxa de liberação dependente da escolha do polímero. Um terceiro tipo de mecanismo envolve o processo de ativação por solvente. Neste caso as cadeias poliméricas são quebradas pela clivagem de suas ligações intermoleculares, de modo que durante essa degradação ocorre a liberação do agente ativo (FIALHO; CUNHA, 2007 e SOUZA, 2007).

O fármaco também pode estar ligado covalentemente ao polímero e ser liberado pela ação de enzimas específicas. Nos sistemas controlados por solvente, o agente ativo está dissolvido ou disperso na matriz polimérica e não se difunde. A matriz pode ser hidrofílica ou hidrofóbica, e a liberação do fármaco pode envolver processos de

intumescimento (expansão) do polímero tornando o material mais plástico. A temperatura também pode influir promovendo a expansão ou contração da matriz liberando a substância ativa (DASH et al., 1998 e SCHAFFAZICK et al., 2003).

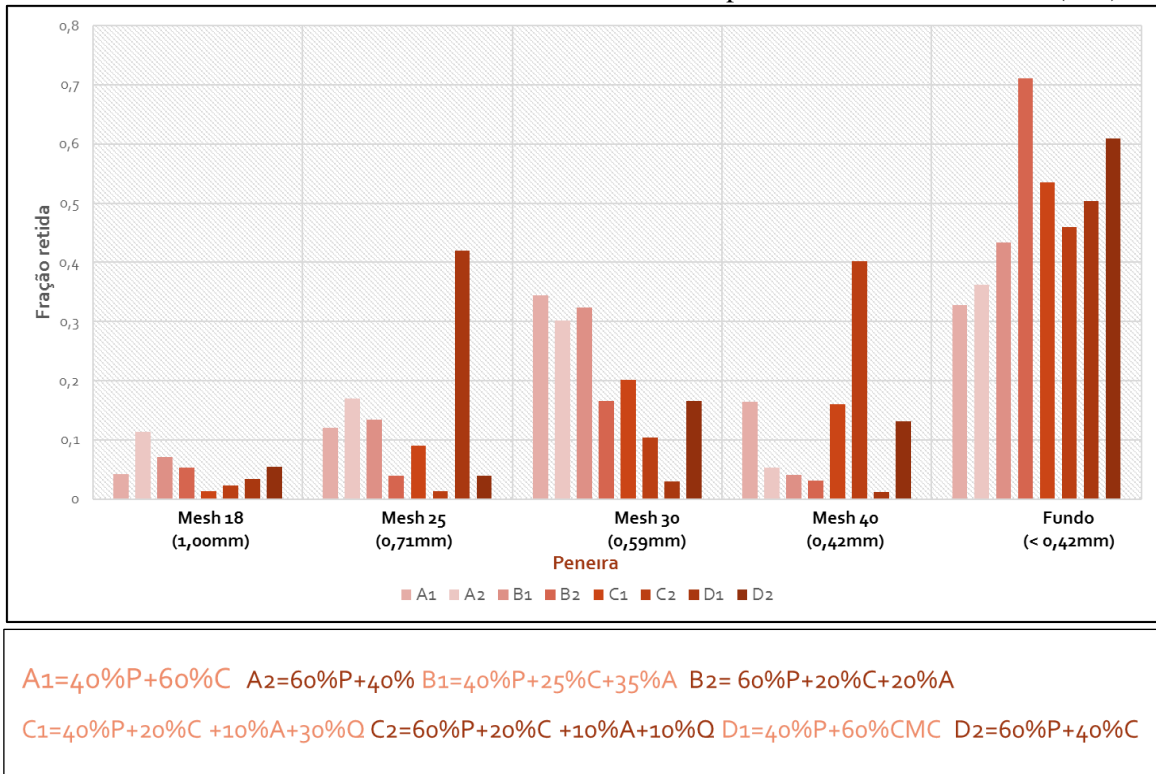
4.2.2 Revestimento com camada de alginato, com quitosana-alginato e celulose microcristalina

Na obtenção das amostras com alginato/quitosana/celulose microcristalina as camadas do polímero externo foram adicionadas à proteína com cera em temperatura de 60° C, sendo que nas amostras obtidas por coacervação complexa ocorreu o aglutinamento impossibilitando alguns testes. Verificou-se que a adição da solução de alginato de sódio (NaAlg) tornou a solução mais viscosa conforme o aumento da concentração, não sendo possível sua filtração, o que tornou inviável trabalhar-se com concentrações mais elevadas.

Desta forma, esta formulação foi descartada.

4.2.3 Caracterização granulométrica das partículas de proteína

A granulometria das partículas foi estudada para todas as amostras (A, B, C e D) inicialmente com o uso do tamis e do agitador magnético. Observou-se que, para os diferentes protocolos, a curva da distribuição granulométrica foi idêntica (Gráfico 3) onde pode-se observar que o tamanho médio das partículas das amostras estudadas concentrou-se no último tamis com abertura de malha de 42 mm. Observou-se, ainda, que a polidispersividade de todas as amostras apresentaram valores muito semelhantes entre si.

Gráfico 3: Granulometria das amostras de capsulas de WPC 40% e 60% (m/v).

4.2.4 Morfologia das amostras

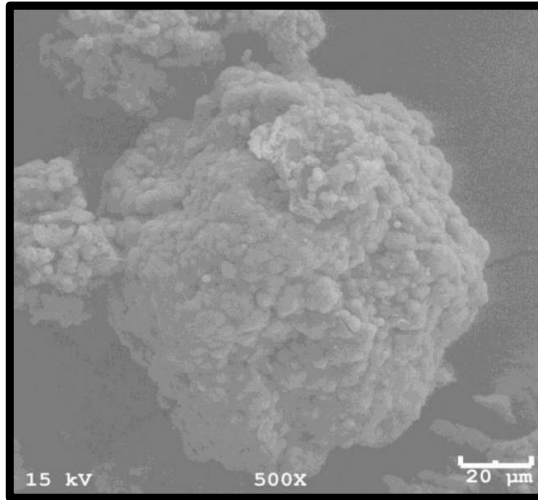
As micrografias mostradas de 6 a 9 apresentam a morfologia das amostras. Conforme pode ser observado os granulos obtidos apresentam forma esférica para todas as amostras obtidas.

A amostra A além de apresentar partículas com maior diâmetro, apresenta uma superfície mais rugosa, sendo a amostra que apresentou a menor solubilidade (pH=6,8).

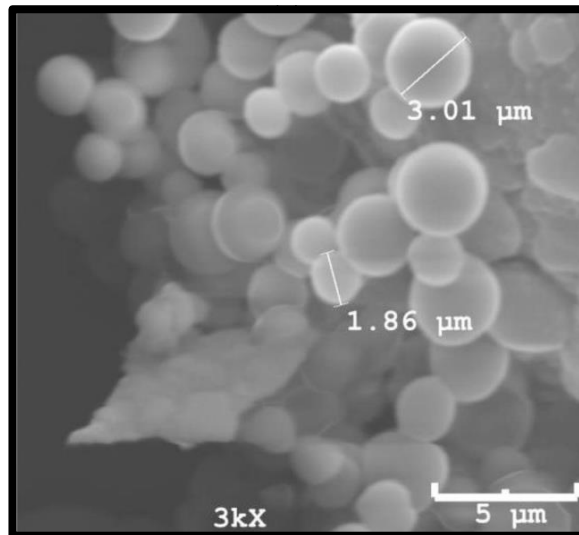
As demais amostras apresentaram uma superfície mais uniforme e lisa.

Conforme pode ser observado as amostras B, C e D foram as que apresentam os menores diâmetros de partícula, sendo as amostras B e C as que apresentam os menores diâmetros de partícula em pH 6,8.

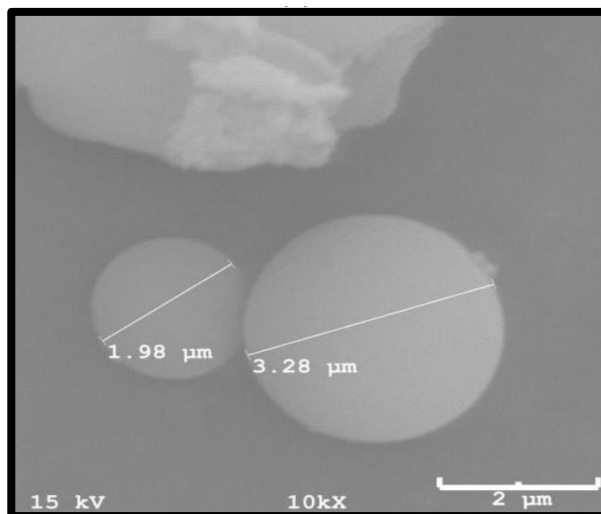
Micrografia 6: Microscopia eletrônica de Varredura da formulação contendo amostra tipo A.



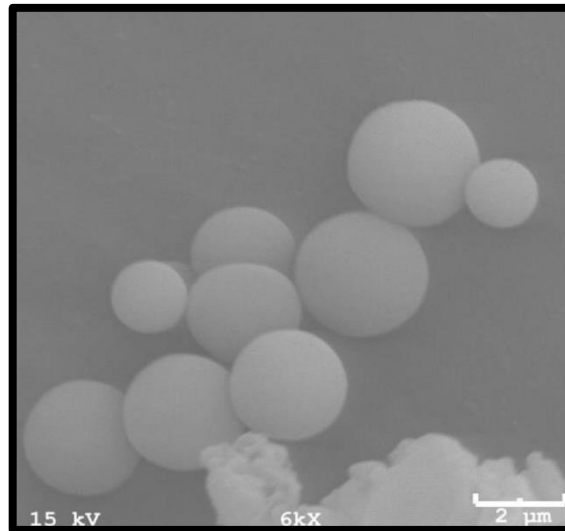
Micrografia 7: Microscopia eletrônica de Varredura da formulação contendo amostra tipo B.



Micrografia 8: Microscopia eletrônica de Varredura da formulação contendo amostra tipo C.



Micrografia 9: Microscopia eletrônica de Varredura da formulação contendo amostra tipo D.



4.2.4 Concentração de Proteína

De acordo com as formulações descritas as amostras foram submetidas ao meio ácido com pH 1,2 posteriormente ao pH 6,8 e em seguida testadas no espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453 em absorvância de 280. Foi realizado uma curva de calibração e todas as materias primas foram testadas neste mesmo comprimento de onda para eliminar qualquer contaminação proveniente das matérias primas.

A curva analítica da proteína em absorvancia de 280 (Gráfico 4).

Gráfico 4: Curva de calibração WPC

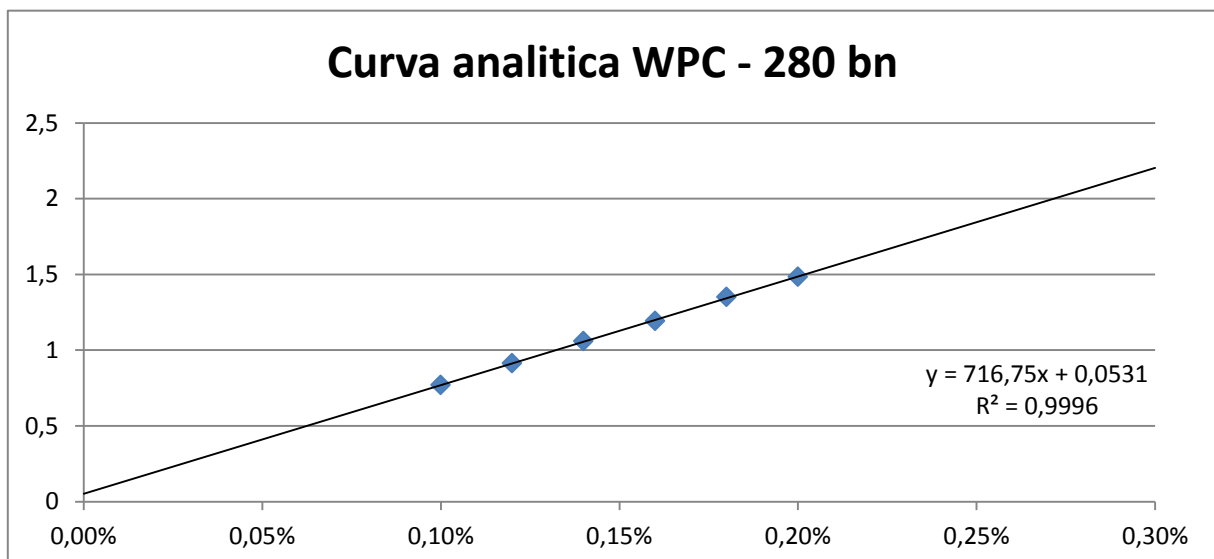
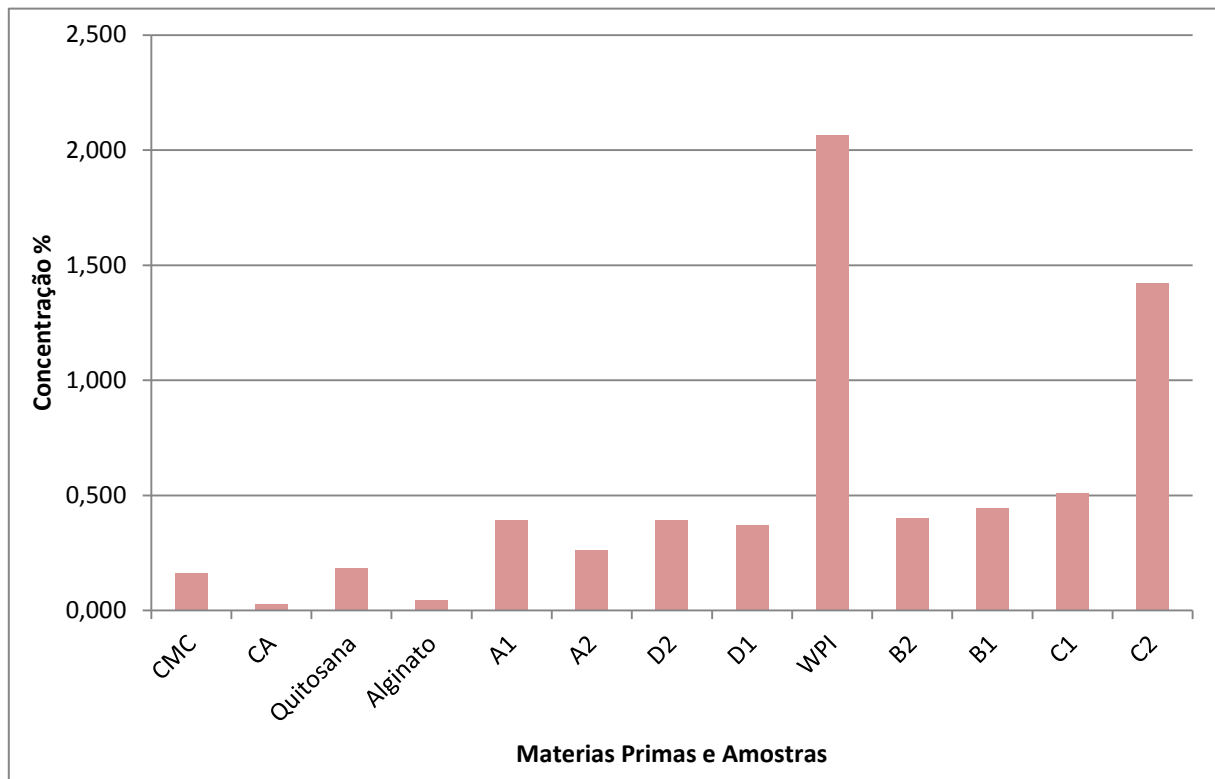


Gráfico 5: Concentração de proteína WPC.

Por meio do Gráfico 5 é possível verificar que o perfil de liberação *in vitro* (mecanismo de liberação da proteína) é dependente do pH.

A liberação gradual da proteína no pH 6,8 acontece porque, neste pH, o gel formado pela camada de polímeros externa se encontra estruturalmente desestabilizado. A rede polimérica expande-se e promove a liberação da proteína para o meio. Esta expansão do gel é ainda reforçada pela presença de íons de fosfato e contra-íons como o íon de sódio (Ramdas et al., 1999).

5 CONCLUSÕES

Os métodos de encapsulação abordados neste trabalho (coacervação complexa e *spray drying*) permitiu obter microcapsulas com uma distribuição granulométrica unimodal, em que a maioria das capsulas apresentaram diâmetro inferior a 4 μm e com forma esférica. Além disso, este método permitiu encapsular eficazmente a proteína em microcapsulas. O perfil de libertação *in vitro* demonstrou que o mecanismo de libertação da proteína, a partir das microcapsulas, foi dependente do pH. Em meio ácido, a libertação da proteína foi praticamente nula. Pelo contrário, em pH 6,8, os polímeros escolhidos encontraram-se estruturalmente instáveis, promovendo a libertação da proteína para o meio.

O objetivo de manter a proteína ativa para absorção do organismo foi alcançada pois as amostras resistiram a simulação do pH 1,2 que simula o suco gástrico iniciando sua libertação em pH 6,8 que simula o pH do intestino onde a proteína é absorvida.

A amostra de melhor resultado foi a de composição proteína + cera+ alginato+ quitosana apresentando sua libertação total após 2h20 minutos.

O produto desta pesquisa foi utilizado como base para um novo suplemento alimentar que já se encontra em fase comercial.

Em trabalhos futuros podem ser testados outros ativos com as mesmas membranas e realizar o teste sensorial, com a finalidade de aperfeiçoar as membranas com o intuito de obter a libertação em 24h.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR 15448-1. Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis Parte 1: Terminologia.

AÏACHE, J. M.; DEVISSAGUET, J.; GUYOTHERMANN, A. M. *Biofarmacia*. 2. ed. México: El Manual Moderno México, p. 276-319, 1982.

ALLEN, T. M., CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, p. 1818-1822, 2004.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. *Journal of Microencapsulation*, v. 10, n. 4, p. 413-435, 1993.

AYUKAWA, Y.; OGINO, Y.; MORIYAMA, Y.; ATSUTA, I.; JINNO, Y.; KIHARA, M.; TSUKIYAMA, Y.; KOYANO, K. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 37, p. 123-130, 2010.

AZEVEDO, M. M. M. Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas [tese]. Campinas: Universidade estadual de Campinas. Instituto de Química. Departamento de Físico-Química, 2005.

BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M., WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, v. 13, p. 238, 1965.

BATISTA C. M, CARVALHO C. M. B., MAGALHÃES N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, n. 43, n. 2, p. 167- 179, 2007.

BAUER, K. H. LEHMANN KLAUS, OSTERWALD HERMANN P., GERHART ROTHGANG. Coated pharmaceutical dosage forms. Boca Raton: Medpharm Scientific Publishers, p. 280, 1998.

BAZZO, G. C.; LEMOS-SENNA, E. M. T.; PIRES, A. T. N. Poly (3-hydroxybutyrate)/chitosan/ ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 839-844, 2009.

BIRNBAUM, D.T., BRANNON-PEPPAS, L. “Drug Delivery Systems in Cancer Therapy”, Humana Press, New Jersey, 2003.

BIZERRA A.; SILVA V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações, RESMA, Três Lagoas, v, 3, n. 2, p. 1-12, ISSN: 2447-8822, 2016.

BRUSCHI M.L.; PANZERI, H.;FREITAS, O.; LARA, E.H.G.; GREMIÃO, M. P. D. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1 p. 29-47, 2006.

BUSCALL, R., CORNER, T., STAGEMAN, J. F., *Polymer colloids*. Elsevier Applied Science Publishers, London, New York, 1985.

CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT – Food science and Technology*, v. 44, p. 429-435, 2011.

CHANG, K. L. B.; LIN, J. Swelling behavior and the release of protein from chitosan-pectin composite particles. *Carbohydrate Polymers*, v. 43, p. 163-169, 2000.

CHANG, T. M. S., POZNANSKY, M. J. Semipermeable Microcapsules containing Catalase for Enzyme Replacement in Acatalasaemic Mice. *Nature*, p. 218, p. 243, 1968.

CHIAO, C. S. L.; ROBINSON, J. R. Sistemas de liberación sostenida de drogas. In: GENNARO, A. R. (Org.). Remington: farmacia. 19. ed. Buenos Aires: Panamericana, p. 2.535-2.559, 1999.

COIMBRA, P. M. A., Preparação e Caracterização de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2010.

COLLETT, J.; MORETIN, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, Michael E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed., p. 298-313, 2005.

COMYN, J. *Polymer Permeability*, 1st Ed, Elsevier Applied Science, London, 1985.

DASH A. K., CUDWORTH G. C. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; n. 40, n. 41: p. 1-12, 1998.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DHAWAN S.; SINGLA K.; SINHA V. ; University Institute of Pharmaceutical Sciences, Panjab University, Chandigarh, India 160014. Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. May 17, 2004.

DILLOW, A. K.; LOWMAN, A. M. *Biomimetic Materials and Design*. Biointerfacial strategies, tissue engineering and targeted drug discovery. Marcel Dekker, Inc, New York, 2002.

DUARTE, A. R. C.; COSTA, M. S.; AGUIAR R. A.; SIMPLÍCIO, A. L.; CARDOSO, M. M.; DUARTE, C. M. M. Preparation of controlled release microspheres using supercritical fluid technology for delivery of anti-inflammatory drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 308, p. 168-174, 2006.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and

characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 232, p. 239–247, 2004.

DUMITRIU, S. *Polymeric Biomaterials*. Marcel Dekker, New York, 1994.

EVANGELISTA, R. C. Tecnologia farmacêutica para produção de medicamentos de liberação controlada. Encontro Técnico Científico para as Indústrias Farmacêuticas e Cosméticas. *Racine Qualificação e Acessória*, p. 01-80. São Paulo, 1998.

EVERETT, D. H., KOOPAL, L. K., “Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units”, IUPAC Council, Washington DC, 2001.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, p. 510-523, 2010.

FAVARO- TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of food Technology*, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

FELLAH, A.; ANJUKANDI, P.; WATERLAND, M. R.; WILLIAMS, M. A. K. Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 847-853, 2009.

FIALHO S. L, CUNHA Jr. A. S. Sistemas de transporte de drogas para o segmento posterior do olho: bases fundamentais e aplicações. *Arq. Bras. Oftalmol*, v. 70 n. 1, p. 173-79, 2007.

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Large enhancements in thermogelation of whey protein isolate by incorporation of very low concentrations of guar gum. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 576-586, 2008.

FUKUSHIMA, S.; KISHIMOTO, S.; TAKEUCHI, Y.; FUKUSHIMA, M. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, p. 45, p. 65, 2000.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier— Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf., B*, v. 59, p. 24-34, 2007.

GHAFFARI, A.; NAVAE, K.; OSKOUI, M.; BAYATI, K.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit® RS intended for sigmoidal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 175–186, 2007.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A. ; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients : An overview. *Food Research International*, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GIBAUD, S.; ATTIVI, D. Microemulsions for oral administration and their therapeutic

applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 9, n. 8, p. 937- 951, 2012

GOMBOTZ W. R.; W. U, S. F. Protein release from alginate. *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 31, p. 67-285, 1998.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing Technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, v. 15, p. 330-347, 2004.

GRAHAM N. B. Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs. *British Polymer Journal*, v. 10, n. 4, p. 260-266, 1978.

GREGORIADIS, G., LEATHWOOD, P. D., RYMAN, B. E. Lysosomal localization of enzyme-containing liposomes injected into rats. *Biochem J.* Jul; v. 128,n. 4, p. 142–143, 1972.

GUO, X.; HAN, D.; XI, H.; RAO, L.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J. Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 441-448, 2012.

HAGESAETHER, E.; HIORTH, M.; SANDE, S. A. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 325-331, 2009.

HAMMAN J. H., ENSLIN G. M., KOTZE, A. F. Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments. *BioDrugs*, v. 19, p.165-77, 2005.

HAUPT, S.; ZIONI, T.; GATI, I.; KLEINSTERN, J.; RUBINSTEIN, A. Luminal delivery and dosing considerations of local celecoxib administration to colorectal câncer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 28, p. 204-211, 2006.

HIORTH, M.; KJØNIKSEN, A. L.; KNUDSEN, K. D.; SANDE, S. A.; NYSTRÖM, B. Structural and dynamical properties of aqueous mixtures of pectin and chitosan. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 1718–1728, 2005.

JACOBS, I. C.; MASON, N. S. Polymer delivery systems concepts. In *Polymeric Delivery Systems*; El-Nokaky; M. A., Piatt, D. M., Charpentier, B. A. Eds.; American Chemical Society: Washington, p. 1-17, 1993.

JAIN, K. K., Ed. *Drug Delivery Systems*. CRC Press: Boca Raton, 2004.

JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. *Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 8, p. 115-122, 1993.

KALMAN, D. S. Gelatin. *Nutritional Ergogenic Aids*. CRC Press LLC, p. 105-113, 2004.

KHOURYIEH, H. A.; HERALD, T. J.; ARAMOUNI, F.; BEAN, S.; ALAVI, S. Influence of deacetylation on the rheological properties of xanthan-guar interactions in dilute aqueous solutions. *Journal of Food Science*, v. 72, p. C173-C181, 2007.

KIM, S.; KIM, J. H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K., Engineered polymers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 420-430, 2009.

KRASAEKOOPT W; BHANDARI; DEETH. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt: a review. *Internacional Dairy Journal* v.13, p. 3-13, 2003.

KRUIF, C. G.; WEINBRECK, F.; VRIES R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 9, p. 340–349, 2004.

LANGER, R., TIRRELL, D. Designing materials for biology and medicine, review Nature p. 428, p. 487-492, April 2004.

LI, X.; FANG, Y.; ZHANG, H.; NISHINARI, K.; AL-ASSAF, S.; Phillips, G. O. Rheological properties of gum arabic solution: From Newtonianism to thixotropy. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 293-298, 2011.

LIMA, F.; Emprego de Nanopartículas sólidas na liberação de fármacos pouco solúveis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LIN, C. C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 1379-1408, 2006.

LINHARDT, R. J. Biodegradable polymers for controlled release of drugs. In: ROSOFF, M. Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems. New York: VCH, p. 53-77, 1989.

LIU, W. H., Song J. L, Liu K., Chu D. F., Li Y. X. Preparation and in vitro and in vivo release studies of Huperzine A loaded microspheres for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, v. 107, p. 417-427, 2005.

LIU, X. D., BAO, D. C., XUE, W. M., XIONG, Y. Preparation of uniform calcium alginate gel beads by membrane emulsification coupled with internal gelation. *J. Appl. Polym. Sci.* v.87, p. 848-852, 2002.

MACEDO, C. L. Medicamentos de liberação controlada. Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba, João Pessoa, 15/07/2013. Disponível em: <http://www.cienciasmedicas.com.br/artigos/2013/07/15/medicamentos-de-liberacao-controlada> Acesso em: 18/09/2016.

MACLEOD, G. S.; COLLETT, J. H.; FELL, J. T. The potencial use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p. 303-310, 1999.

MAGALHÃES, H. M.; BOELTER, R.; SILVA, A. M. *Elementos de farmacologia veterinária* 3ed. Porto Alegre: Sulina, Pag 14-17, 1985.

McCARRON, P. A.; WOOLFSON, A. D.; KEATING, S. M. Sustained release of 5-

fluorouacil from polymeric nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 52, p. 1451-1459, 2000.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Guar gum: processing, properties and food applications - A Review. *Journal of Food Science and Technology*, 2011.

MYERS, D. Surfaces, Interfaces and Colloids – Principles and Applications. Wiley-VCH, New York 2004.

NISHI, K. K.; JAYAKRISHNAN, A. Preparation and In Vitro Evaluation of Primaquine-Conjugated Gum Arabic Microspheres. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 18, p. 191-197, 2005.

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT – Food science and Technology*, v. 44, p. 429-435, 2011.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Química Nova*, v. 27 (1), p.131-138, 2004.

ORÉFICE, R.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polimeros: Ciencia e Tecnologia*, Minas Gerais, v. 20, n.1, p. 51-64, 2010.

PARK, J. H., YE, M., PARK, K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, v.10, p.146, 2005.

QV, X. Y.; ZENG, Z. P.; JIANG, J. G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, v. 25, p. 1596-1603, 2011.

RABASCO, A. M. Novas formas de administración de medicamentos. In: VILA JATO, Jose Luis (Ed.). Tecnología farmacéutica: formas farmacêuticas. Madri: *Sintesis*, p. 379-445. V. 2, 1997.

RAMDAS, M., DILEEP, K. J., ANITHA, Y., PAUL, W. e SHARMA, C. P. Alginate encapsulated bioadhesive chitosan microspheres for intestinal drug delivery. *J. Biomater. Appl.* V. 13, p. 290-296, 1999.

RATNER, B. D. Biomedical applications of synthetic polymers. In: WILLIAM, D. F. (Ed.). Biocompatibility of clinical implant materials. Boca Raton: CRC Press, v. 2, p.145, 1981.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, v.16, p.1195-1236, 1998.

ROSSANEZI, G. Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada de Cetorolaco de trometamina obtidas por Spray drying. 2008, 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

ROSSI-BERGMAN B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. *Ciência e Cultura*, n. 60, p.54-57, 2008.

SALTZMAN, W., *Drug Delivery - Engineering principles for drug therapy*. Oxford University Press: NY, 2001.

SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A. R. B. LIPOSSOMAS: A BALA MÁGICA ACERTOU? *Quím. Nova* v. 25 n. 6b, 2002.

SAPRA P., ALLEN T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog. Lipid Res.*; v. 42, p. 439-462, 2003.

SCHAFFAZICK, S. REZENDE; G., SÍLVIA S.; FREITAS L. L. P., RAFFIN A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanopartículas para administração de fármacos. *Química Nova*. V. 5, p. 726-737, 2003.

SCHERI, D. P. R.; MARQUEZ, M. O. M.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v. 23, p. 1-6, 2003.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C., DESOBRY-BANON, S., HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v. 38, p. 689-753, 1998.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; THOMAS, F.; HARDY, J. Complex coacervation between lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 483 – 496, 1999.

SCHMITT, C; SANCHEZ, C; DESPOND, S; RENARD, D.; THOMAS, F.; HARDY, J. Effect of protein aggregates on the complex coacervation between lactoglobulin and acacia gum at pH 4.2. *Food Hydrocolloids*, v. 14, p. 403-413, 2000.

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. 3. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1993. p. 225-264.

SILER-MARINKOVIC, S.; MOJOVIC, L.; DAVINIC, V.; BUGARKY, B. Liposomes as carriers of antimicrobial drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v. 23, n. 5, 1997.

SILVA-JUNIOR, A. A. Micropartículas de ácido poli-lático-co-glicólico obtidas por Spray drying para liberação prolongada intra-ocular de fármacos, p. 179, Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SMIDSROD, O; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* v. 8, n. 3, p. 71-78, 1990.

SOSKOLONE W. A., FREIDMAN M. F. Intra-periodontal pocket drug delivery systems. In: Rathbone MJ, editor. *Oral mucosal drug delivery*. New York: Marcel Dekker: v. 74, p. 359-79, 1996.

SOUSA I., Estudo, caracterização e desenvolvimento de sistemas de libertação controlada para as quinolonas e seus derivados. 2013, Universidade do Porto, Porto;

SOUZA, K. C. Síntese e caracterização de nanocompositos de sílica mesoporosa com partículas magnéticas para dispositivos de libertação controlada de fármacos [dissertação]. Belo Horizonte: Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear. Ciência e Tecnologia da Radiações, Minerais e Materiais, 2007.

SPINACÉ, M. A. S; PAOLI, M. A. A Tecnologia da Reciclagem de Polímeros, *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, p. 65-72, 2005.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutica Uses: A Review. *Silpakorn University International Journal*, v. 3, n. 2, p. 206-228, 2003.

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

TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C. R.. Recent developments in liposome, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*, v. 31, p. 184-193, 2010.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Informa Healthcare- Collection-Drugs and Pharmaceutical Sciences, Taylor & Francis Group, Boca Raton, v. 166, 2007.

THIES, C. How to make microcapsules. Lecture and Laboratory Manual. St. Louis. Missouri. 1995.

TOHVER, V., SMAY, J.E., BRAEM, A., BRAUN, P.V., LEWIS, J.A. *Proc. Nat. Acad. Sci.* v. 98, p. 8950, 2001.

UCHEGBU, I. F.; SCHÄTZLEIN, A. G. Polymers in Drug Delivery. 1st ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006.

UHRICH, K. E., CANNIZZARO, S. M., LANGER, R. S., SHAKESHEFF, K. M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews*, v. 99, p. 3181-3198, 1999.

VEIGA, I. G.; MORAES, Â. M. Study of the Swelling and Stability Properties of Chitosan-Xanthan Membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 124, p. E154-E160, 2012.

WANG, Q.; DONG, Z.; DU, Y.; KENNEDY, J. F. Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films. *Carbohydrate Polymers*, v. 69 n. 2, p. 336-343, 2007.

YADAV, M. P.; IGARTUBURU, J. M.; YAN, Y.; NOTHNAGEL, E. A. Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. *Food*

Hydrocolloids, v. 21, p. 297-308, 2007.

YANG, Y.; ANVARI, M.; PAN, C. H.; CHUNG, D. Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions. *Food Chemistry*, v. 135, p. 555–561, 2012.

YEN, M. T.; YANG, J. H.; MAU, J. L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, p. 15–21, 2009.

YU, W.; ANVARI, M.; PAN, C. H.; CHUNG, D. Quantitative characterization of membrane formation process of alginate-chitosan microcapsules by GPC. *Journal of Membrane Science*, p. 346, p. 296-301, 2010.