MICROENCAPSULAMENTO DE PENICILINA G PARA TRATAMENTO PROFILÁTICO DA FEBRE REUMÁTICA

GIZELE CARDOSO FONTES SANT'ANA

TESE APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

> Orientadores: Prof^a. Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D. Sc. Dr. Alexandre Malta Rossi, D. Sc.

ESCOLA DE QUÍMICA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO 2013

MICROENCAPSULAMENTO DE PENICILINA G PARA TRATAMENTO PROFILÁTICO DA FEBRE REUMÁTICA

Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana

Tese submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em ciências.

Aprovada por:

Orientadores

Prof^a. Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D. Sc.

Prof. Alexandre Malta Rossi, D.Sc.

Banca Examinadora

Prof^a. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, D.Sc.

Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva, D.Sc.

Prof. Marcio Nele de Souza, D. Sc.

Prof^a. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D. Sc.

Prof^a. Priscilla Vanessa Finotelli, D. Sc.

Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Sant'Ana, Gizele Cardoso Fontes.

Microencapsulamento de penicilina G para tratamento profilático da febre reumática / Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana. – 2013.

171 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadora: Maria Helena Miguez da Rocha Leão

1. Microencapsulamento. 2. Antibiótico. 3. *Drug delivery*. 4. Biopolímeros. I. Rocha-Leão, Maria Helena Miguez. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Título. "O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é. Se insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa, é possível que acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la. Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la, certamente adquirirei a capacidade de realizá-la, mesmo que não a tenha no começo."

Mahatma Gandhi

Dedico

Ao meu amor Alexandre; Aos meus pais e irmã; Ao meu avô Luis (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

É com um enorme sentimento de reconhecimento que expresso aqui, os meus agradecimentos a todos aqueles que, sendo pessoas ou instituições, de modo direto ou indireto, contribuíram decisivamente para a realização deste trabalho. Em especial:

Primeiramente agradeço a Deus pela vida maravilhosa que me foi destinada, cujo amor infinito me encoraja e me enche sempre de esperança. Obrigado Senhor!

Aos meus queridos pais, Maria Rita e Divino, por todo amor, amparo, incentivo e pelos esforços que realizaram para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu avô Luis (*in memorian*) pelo exemplo de vida e pelo amor. A saudade é inevitável, mas sei que está sempre presente na minha vida.

Ao meu marido Alexandre pelo incentivo aos meus ideais, encorajamento nas horas de dúvida, pela compreensão da longa jornada de trabalho e constante participação em minha luta, a reafirmação do meu amor.

A minha querida irmã Jacqueline e meu cunhado Marcos Paulo, casal que admiro muito, agradeço pelo apoio e amizade de sempre.

A minha segunda família, Sr. Rui, D. Graça, Viviane, Cláudio, Rui Jr e Marisa (que hoje carrega a minha primeira afilhadinha, Lara!), agradeço pelo carinho, orações e pela torcida em todos os momentos.

A minha orientadora Maria Helena, pela oportunidade oferecida, pela confiança, incentivo e amizade. Agradeço pelos ensinamentos essenciais, sempre com sua postura pragmática diante dos problemas e da vida. Admiro muito a sua pessoa, competência e a sua preocupação na formação profissional de todos seus orientandos.

Ao meu segundo orientador Prof. Alexandre Rossi, por ter aceitado, pelo incentivo e por sempre estar disposto a me ajudar, sempre com muita inteligência e empenho.

Ao Laboratório de Biomateriais do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) pela realização das análises de difração de raios X e FTIR, em especial a Silvia pela ajuda.

À professora Etyene Castro Dip (UFF), por ter me ajudado nas análises de hipernocicepção no analgesímetro. Agradeço pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade.

A professora Aline M. Oliveira (UFF), pela ajuda na cirurgia dos ratinhos durante as análises no analgesímetro.

v

A professora Priscila Finotelli pelas dicas, por me receber muito bem neste novo trabalho e por sempre estar disposta a me ajudar.

A professora Priscila Amaral por ter me acolhido no laboratório, pelos ensinamentos, por me ajudar a co-orientar e permitir que o meu trabalho de mestrado dê continuidade e mais frutos.

A professora Maria Alice pelas oportunidades, por disponibilizar toda a infraestrutura do laboratório de enzimologia para realização deste trabalho.

A professora Ana Paula Vieira Colombo (IM-UFRJ) e aluna Renata Martins pela ajuda na realização da atividade antimicrobiana.

Ao Professor Marcelo Prado (IME) por ter disponibilizado o uso do microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de Microscopia Eletrônica e o Joel pela realização das análises.

A professora Verônica Calado pelo apoio nas análises térmicas

A professora Anna Paola Trindade Rocha Pierucci (Instituto de nutrição-UFRJ) e a aluna Camila Costa por ter gentilmente cedido o isolado protéico de ervilha.

As meninas do lab. 123: Kelly, Roberta, Tatiana, Luana e Patrícia, agradeço pelo ambiente agradável de trabalho, pelo companheirismo, debates científicos, incentivos e os vários momentos de alegria e descontração.

A turma do laboratório 103: Fernanda, Etel, Marcelle (pela carona e amizade), Caê, Verônica, Rose, Jéssica, Bernardo, Clara, Lívia, Yang, Mariana, Naíra, Pedro, Aline, Raísa, Luiza, Raquel e todos os outros que freqüentaram o laboratório de Enzimologia Industrial, pela ajuda e amizade.

Ao apoio financeiro da FAPERJ, CNPq e da CAPES.

Resumo da proposta de pesquisa apresentada à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ) como parte integrante da tese de doutorado.

FONTES, Gizele Cardoso. Microencapsulamento de penicilina G para tratamento profilático da febre reumática. Rio de Janeiro, 2013. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Febre reumática é uma doença inflamatória, de base imunológica, que surge como complicação de uma faringoamigdalite mal tratada, causada pelo S. pyogenes. A penicilina G (penG) tem sido recomendada pela OMS como tratamento através da administração intramuscular na forma injetável a cada 21 dias até a idade adulta. Devido à grande inconveniência provocada pela dor no local de aplicação, tal tratamento, conduz os pacientes ao abandono da terapêutica. A proposta deste trabalho foi desenvolver um sistema de liberação prolongada a partir de microesferas de PenG em matriz de alginato para futura aplicação em implantes subdérmicos. As esferas foram preparadas por gotejamento de solução de alginato de sódio contendo penG em solução de CaCl₂ ou ZnCl₂. Inicialmente, foram avaliados diferentes biopolímeros em combinação com o alginato. Os melhores resultados foram alcançados com alginato/amido OSA e alginato/isolado proteico de ervilha (IPE), com retenção de 51,66% 35,31%, respectivamente. Planejamentos de experimentos foram realizados a fim de otimizar a retenção da PenG nas esferas. Primeiramente foi otimizada a retenção da PenG em esferas de alginato/ Ca^{2+} /amido OSA. Para isso, dois planejamentos foram utilizados: um fatorial fracionado 2^{4-1} e um fatorial completo 2^3 visando avaliar os efeitos da concentração dos materiais de parede, concentração de cloreto de cálcio e tempo de reticulação na variável de resposta porcentagem de retenção. O melhor resultado (95,13 %) foi obtido quando se utilizou alginato (4,5%), amido OSA (2%), cloreto de cálcio de 0,35 M e penG 10% p/v. Com intuito de substituir os íons cálcio por zinco, foi realizado outro planejamento de experimentos. Os resultados mostraram que a porcentagem de retenção foi semelhante; porém usando o zinco como agente reticulante, o diâmetro das microesferas diminuíu. Posteriormente, as microesferas de alginato/Zn²⁺/amido OSA contendo penG foram recobertas com os policátions quitosana e polilisina, obtendo uma porcentagem de retenção de 90,5 e 91,4%, respectivamente. Para otimização da retenção de penG em matriz de alginato/IPE, foi utilizado um delineamento composto central rotacional 2⁴ para analisar a interação da concentração de alginato, IPE, pen G e cloreto de cálcio. Foi alcançada uma condição ótima para a retenção de PenG (81%) com concentração de alginato a 4% e IPE a 4,5%, e cloreto de cálcio a 0,2M. Sob as condições ótimas obtidas acima, o efeito do pH da solução formadora de esferas foi investigado. As maiores retenções de penG ocorreram em pH abaixo de 5,0, com retenção máxima de 87,77% no pH 4,0. O microencapsulamento da penG também foi otimizado com íons zinco, obtendo resultados da porcentagem de retenção de penG semelhante aos íons cálcio. Nos ensaios de liberação in vitro, a PenG encapsulada em matriz de alginato/Ca²⁺/IPE foi liberada de forma gradual até chegar a 53% em 96 horas. As microesferas de alginato e IPE reticulados com íons zinco apresentara

m um perfil de liberação mais lento da PenG, até chegar a 50% em 144 horas, atingindo o seu valor máximo. Em matriz de alginato e amido OSA, reticulados com cálcio a penG também foi liberada de forma gradual até atingir 65% em 432 h, em ambos os casos o modelo que mais se ajustou foi o de ordem zero. Ao recobrir as esferas com

quitosana, o perfil de liberação da PenG se tornou mais lento e prolongado, aumentando o tempo máximo de liberação para 528 horas. O modelo de Korsmeyer-Peppas foi o que retratou mais adequadamente a liberação da PenG. As microcápsulas contendo penG em matriz de alginato, amido OSA e quitosana foram encapsuladas em diferentes nanomembranas para avaliação do perfil de liberação da penG. O melhor resultado foi obtido com a membrana da marca DSS e em meio biológico simulado (SBF), onde a liberação foi gradual, com liberação máxima de 52,5% em 600 h (25 dias) de ensaio. O teste de intumescimento indicou que as esferas de alginato/amido OSA intumesceram 25%, enquanto as esferas de alginato/IPE, 34% após 30 dias em imersão em água. O grau de erosão das esferas foi de 22% para as esferas de alginato/IPE e 5% para as esferas de alginato/amido OSA, ao longo de 30 dias de experimentos. A análise morfológica monstrou que as esferas e cápsulas apresentaram formas regulares, esféricas e superfície rugosa. O padrão de difração de raios X (DRX) das esferas contendo PenG demonstrou características semicristalina. Foi avaliado o potencial analgésico dos biopolímeros e microesferas. O modelo experimental usado para avaliação da hipernocicepção foi o teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). Os biopolímeros alginato, amido OSA e quitosana, assim como os íons zinco apresentaram potencial analgésico. Além disso, as microesferas de alginato/Zn²⁺/amido OSA, contendo penG também apresentaram um importante efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção em ratos. As análises da atividade antimicrobiana da PenG mostraram que a atividade da penG foi preservada após o microencapsulamento em diferentes matrizes poliméricas. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o alginato, amido OSA, IPE e quitosana são materiais de paredes apropriados para o microencapsulamento da PenG e com potencial de aplicação em implantes subdérmicos.

Abstract of the research proposition presented to the Escola de Química of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ) as one of the requirements to fulfill the Doctorate.

FONTES, Gizele Cardoso. **Microencapsulamento de penicilina G para tratamento profilático da febre reumática.** Rio de Janeiro, 2013. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Rheumatic fever is an inflammatory disease, immunologically based, that can be developed as a complication of inadequately treated pharyngotonsillitis, caused by S. pyogenes. OMS has recommended penicillin G (penG) as treatment by intramuscular injection every 21 days to adulthood. Frequently patients abandon treatment due to the local pain associated with the injection. The purpose of this study was to develop a system for sustained release from PenG microbeads in alginate matrix for future application in subdermal implants. The beads were prepared by sodium alginate solution containing PenG dripping in to a solution of CaCl₂ or ZnCl₂. Initially, different biopolymers were evaluated in combination with alginate. The best results were obtained with alginate/OSA starch and alginate/pea protein isolate (PPI), with entrapment of 51.66% and 35.31%, respectively. Experiments were designed to improve PenG entrapment in microbeads. Initially, the retention of PenG in alginate/Ca²⁺/OSA starch microbeads was optimized through two different designs using a 2^{4-1} fractional factorial and a 2^3 full factorial aiming at assessing the effects of concentration of wall materials, calcium chloride concentration and cross-linking time on the response variable entrapment percentage. The best result (95.13 %) was obtained using alginate (4.5%), OSA starch (2%), calcium chloride 0.35 M and penicillin G 10% w/v. In order to replace the calcium ions by zinc, another experiment design was performed. The results showed that the retention percentage was similar, but using zinc as a crosslinking agent, the microspheres diameter decreased. After, the alginate/ Zn^{2+}/OSA starch microspheres containing penG were coated with poly-L-lysine and chitosan, obtaining a percent retention of 90.5 and 91.4%, respectively. To optimize PenG entrapment in the alginate /PPI matrix a four-factor central composite design was used to examine the interaction of alginate, PPI, PenG and calcium chloride concentrations. An optimum PenG entrapment condition (81%) was obtained with 4% alginate 4.5% PPI, and 0.2M calcium chloride. The effect of pH of the bead forming solution was investigated under the optimal conditions above. The highest retentions of penicillin G occurred at pH below 5.0 with maximum entrapment efficiency of 87.77% at pH 4.0. The penG microencapsulation was also optimized with zinc ions, obtaining results of penG percentage retention similar to calcium ions. In in vitro release studies, penG encapsulated in the alginate/PPI matrix was gradually released reaching 53% in 96 hours. The alginate/IPE/penG microbeads crosslinked with zinc ions showed a slower release profile of PenG, reaching 50% in 144 hours. In alginate/ OSA starch matrix, it was also released gradually until reaching 65% in 432 hours, in both cases the model that best fitted was of zero order. By coating the microbeads with chitosan, the release profile of PenG became slower and prolonged, increasing the maximum release for 528 hours. The release kinetics of PenG was found to be better described by Korsmeyer-Peppas model. Microcapsules containing penG in alginate/OSA starch/ chitosan matrix were encapsulated in different nanomembranes for evaluating the release profile of penG. The best result was obtained with the membrane DSS. When used simulated biological fluid (SBF), the release was gradual, with maximum release of 52.5% at 600

h (25 days) test. The analgesic effects of biopolymers and microbeads were evaluated. The intensity of hypernociception was measured with an electronic pressure-meter test (von Frey filaments) in rats. The biopolymers alginate, chitosan and OSA starch, as well as zinc ions showed analgesic potential. Furthermore, alginato/Zn²⁺/OSA starch microbeads containing penG also exhibited a significant antinociceptive effect. Swelling studies indicated 25% swelling for alginate/OSA starch beads and 34% swelling for alginate/PPI beads, after 30 days of water immersion. The degree of erosion of the beads was 22% for alginate/PPI beads and 5% for alginate/ OSA starch beads, over 30 days of experiments. The morphological analysis showed that the beads had regular, spherical shape and rough surface. The X-ray diffraction pattern (DR-X) of the beads containing PenG showed semi-crystalline characteristics. The results obtained in the present study indicate that alginate, OSA starch and PPI are wall materials suitable for the microencapsulation of PenG and that can be used in subdermal implants.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 – OBJETIVO	3
CAPÍTULO 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Febre reumática	4
3.2. Penicilina G	9
3.2.1. Propriedades	9
3.2.2. Estrutura química	10
3.2.3. Farmacocinética	11
3.2.4. Mecanismo de ação das penicilinas	11
3.3. Microencapsulação de fármaco	13
3.4. Biopolímeros	15
3.4.1. Alginato	16
3.4.2. Amido OSA	21
3.4.3. Carboximetilcelulose	22
3.4.4. Pectina	23
3.4.5. Maltodextrina	25
3.4.6. Isolado protéico de ervilha	25
3.4.7. Polilisina	27
3.4.8. Quitosana	28
3.5. Estado da arte: encapsulamento de penicilina G	30
3.6. Sistemas de liberação controlada de fármaco	32
3.7. Conceitos gerais e bioquímica da Dor	36
CAPÍTULO 4 –METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS	41
4.1. Materiais	41
4.2. Equipamentos	41
4.3. Avaliação de diferentes materiais de parede para encapsulamento da penicilina G	42
4.4. Otimização da retenção de penicilina G nas esferas de alginato/amido OSA reticulados com cálcio	43

4.4.1. Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}	43
4.4.2. Planejamento fatorial completo 2 ³	44
4.4.3. Avaliação da porcentagem de retenção penicilina G em matriz de alginato e Amido OSA contendo diferentes concentrações do antibiótico	45
4.5. Otimização da retenção da penicilina G nas esferas de alginato/amido OSA reticulados com zinco	45
4.6. Formulação das microcápsulas de PenG em matriz de alginato/ amido OSA/ quitosana e alginato/ amido OSA/ polilisina	46
4.7. Otimização da retenção de penicilina G nas esferas de alginato/IPE reticulados com cálcio	46
4.7.1. Delineamento composto central rotacional (DCCR)	46
4.7.2. Estudo da influência do pH na retenção da penicilina G nas esferas de alginato/IPE	48
4.8. Otimização da retenção de penicilina G nas esferas de alginato/IPE reticulados com zinco	48
4.9. Determinação da concentração de penicilina G nas esferas	49
4.9.1. Espectrofotometria	49
4.9.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	50
4.10. Determinação da porcentagem de retenção da penicilina G nas esferas	50
4.11. Preparação das esferas de penicilina G para os ensaios de liberação	51
4.12. Encapsulamento das microesferas e microcápsulas em membranas nanoporosas e biocompatíveis	52
4.13. Avaliação <i>in vitro</i> do perfil de liberação da penG das esferas de alginato/ amido OSA encapsuladas em diferentes membranas	54
4.14. Modelagem cinética das curvas de liberação	54
4.15. Avaliação <i>in vivo</i> da hipernocicepção mecânica	55
4.15.1. Animais	55
4.15.2. Procedimento cirúrgico	56
4.15.3. Teste da hipernocicepção mecânica	57
4.16. Avaliação da atividade antimicrobiana	58
4.17. Caracterização das microesferas e microcápsulas	59
4.17.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59
4.17.2. Difração de raios X	59
4.17.3. Estudo de intumescimento das esferas	59
4.17.4. Estudo do grau de erosão (GE) das matrizes	60
4.17.5. Potencial zeta	60

4.17.6. Análise de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	61
4.17.7. Análises térmicas	61
4.17.7.1. Análise Termogravimétrica (TGA)	61
4.17.7.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	61
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1. Avaliação de diferentes materiais de parede para encapsulamento da penicilina G	62
5.2. Otimização da retenção da penicilina G nas esferas de alginato/amido OSA	64
5.2.1. Planejamento fatorial fracionado 2 ⁴⁻¹	64
5.2.2. Planejamento fatorial completo 2 ³	68
5.2.3. Avaliação da porcentagem de retenção penicilina G em matriz de alginato e amido OSA contendo diferentes concentrações do antibiótico	74
5.3. Otimização da retenção da penicilina G nas esferas de alginato/ amido OSA reticulados com zinco	75
5.4. Análise comparativa dos resultados obtidos nas diferentes etapas do processo de produção das microesferas e microcápsulas	79
5.5. Avaliação <i>in vitro</i> do perfil de liberação da penicilina G das esferas de alginato/ amido OSA	82
5.6. Avaliação <i>in vitro</i> do perfil de liberação da penicilina G das esferas de alginato/ amido OSA encapsuladas em diferentes membranas nanoporosas	90
5.7. Otimização da retenção de PenG em esferas de alginato/IPE reticulados com cálcio	94
5.7.1. Delineamento composto central rotacional (DCCR)	94
5.7.2. Avaliação da influência do pH	99
5.8. Otimização da retenção de PenG em esferas de alginato/IPE reticulados com zinco	101
5.9. Avaliação in vitro do perfil de liberação da penG das esferas de alginato/ IPE	105
5.10. Avaliação <i>in vivo</i> da hipernocicepção	108
5.11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	117
5.12. Potencial Zeta	123
5.13. Grau de intumescimento (GI%) E Grau de erosão das esferas (GE%)	126
5.14. Análise de difração de raios X	130
5.15. Análises térmicas	134
5.15.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	134
5.15.2. Análise Termogravimétrica (TGA)	138

5.16. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	140
5.17. Avaliação da atividade antimicrobiana	144
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES	147
CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	150
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	151
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
3.1	Estrutura básica de uma molécula de penicilina. A: Anel tiazolidínico B: Anel betalactamico e R: cadeia lateral (BRUNTON <i>et al</i> , 2007).	10
3.2	Estrutura da penicilina G (benzil penicilina)	10
3.3	Estrutura da parede celular dos microorganismos Gram-positivos	12
3.4	Ação dos antibióticos betalactamicos sobre S. aureus (BRUTON et al, 2007).	13
3.5	Diferença estrutural entre microesferas (A) e microcápsulas (B). Fonte: Bazzo, 2009.	14
3.6	Estrutura química do alginato (A) resíduos de ácido L-gulurônico (B) resíduo ácido D – manurônico	17
3.7	Modelo de "egg-box" da gelificação do alginato de cálcio.	19
3.8	Esquema representativo do método de microencapsulação baseado na propriedade de gelificação do alginato em presença cations di e trivalentes. (FINOTELLI, 2006)	19
3.9	Reação de obtenção do amido OSA (FINOTELLI, 2002)	22
3.10	Fórmula estrutural da carboximetilcelulose de sódio (CMCNa) (WARING & PARSONS, 2001).	23
3.11	Estrutura química da cadeia da pectina.	24
3.12	Polímero de maltodextrina.	25
3.13	Estrutura molecular tridimensional da vicilina de ervilhas amarelas <i>Pisum sativum</i> (PIERUCCI, 2005).	26
3.14	Fórmula estrutural da molécula de lisina	27
3.15	Sistema alginato/polilisina	28
3.16	Estrutura da quitosana	29
3.17	Concentração de uma droga modelo no sangue com (a) dosagem tradicional da droga e (b) dosagem com liberação controlada.	34
3.18	Mecanismo da dor.	39
4.1	Curva padrão de penicilina G em água Milli-Q a 220 nm realizado em espectrofotômetro. Barra: desvio padrão (triplicata).	49
4.2	Curva padrão de penG em água Milli-Q a 220 nm no HPLC. Barra: desvio padrão (triplicata).	50
4.3	Ensaio de liberação in vitro da PenG	52
4.4	Esquema representativo do encapsulamento das esferas e cápsulas em membranas nanoporosas e biocompatíveis. Dimensões do cilindro: diâmetro 4 mm x altura 60 mm.	53
4.5	Esquema das três camadas que compõe a membrana DSS	53
4.6	Procedimento de implantação das esferas.	56
4.7	Procedimento de avaliação da hipernocicepção mecânica.	57
5.1	Porcentagem de retenção da penG em matriz de alginato de cálcio em	62

combinação com diferentes materiais de parede. IPE – isolado protéico de ervilha. Barra: desvio-padrão (triplicata).

- 5.2 Representação esquemática da interação do íon cálcio com as unidades 64 galacturônicas da pectina.
- 5.3 Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do 66 planejamento fatorial facionado 2^{4-1} .
- 5.4 Porcentagem de retenção da penG em relação a diferentes concentrações de 67 alginato.

70

77

- 5.5 Diagrama de Pareto para a porcentagem de retenção.
- 5.6 Curvas de contorno da variável porcentagem de retenção em relação ao 73 tempo de reticulação e amido OSA.
- 5.7 Porcentagem de penG retida nas esferas de alginato/Amido OSA em função 74 de diferentes quantidades do antibiótico.
- 5.8 Diagrama de Pareto
- 5.9 Superfície de resposta em função da concentração de zinco e o tempo de 79 reticulação para a porcentagem de retenção de PenG.
- 5.10 Estrutura cristalina dos íons Ca^{2+} (1a) e Zn^{2+} (2a) (Crystal Structure of 81 Calcium, 2013; Crystal Structure of Zinc, 2013). Representação esquemática da orientação estrutural dos íons cálcio (1b) e zinco (2b) quando em contato com o alginato (PILLAY et al, 2005).
 - 5.11 Perfil de liberação de penG a partir de esferas de alginato/Ca²⁺/amido OSA 83 em água destilada.
 - 5.12 Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de alginato/amido
 83 OSA, em água destilada (■) e solução de cloreto de cálcio 0,35M (●).
 - 5.13 Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de 84 alginato/Ca²⁺/amido OSA (\bullet), alginato/Zn²⁺/amido OSA (\bullet) e alginato/Zn²⁺/amido OSA/quitosana (\blacktriangle), em água destilada.
 - 5.14 Cinética de liberação da penG encapsulada em alginato/Ca²⁺/amido OSA 88 (I), alginato/Zn²⁺/amido OSA (II), em alginato/Zn²⁺/amido OSA/quitosana (III).
 - 5.15 Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de 91 alginato/Zn²⁺/amido OSA, encapsuladas em diferentes nanomembranas, utilizando água destilada como meio de dissolução.
 - 5.16 Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de alginato/Zn^{2+/}
 91 amido OSA, encapsuladas em membrana DSS, utilizando água destilada e SBF como meio de dissolução.
 - 5.17 Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de alginato/Zn^{2+/}
 92 amido OSA/Quitosana, encapsuladas em membrana DSS, utilizando água destilada e SBF como meio de dissolução.
 - 5.18 Cinética de liberação da penG a partir da microesfera (alginato/Zn²⁺/amido 93 OSA) e microcápsula (alginato/Zn²⁺/amido OSA/quitosana), encapsuladas em membranas DSS. Meio de dissolução: SBF.
 - 5.19 Diagrama de Pareto para a variável de resposta porcentagem de retenção. 95
 - 5.20 Curvas de contorno da porcentagem de retenção de penG em relação às 98 concentrações de alginato e IPE.

5.21	Porcentagem de penG retida nas esferas de alginato (4%)/ IPE (4,5%) em função do tempo de reticulação com solução de cloreto de cálcio (0,2M).	99
5.22	Efeito do pH na porcentagem de retenção da penG nas esferas de alginato/IPE.	100
5.23	Esferas de alginato e IPE contendo penicilina G encapsulada.	101
5.24	Diagrama de pareto	102
5.25	Superfície de resposta para a porcentagem de retenção da PenG em relação as variáveis concentração de zinco e tempo e reticulação.	103
5.26	Efeito do pH na porcentagem de retenção da penG nas esferas de alginato/IPE.	104
5.27	Concentração (a) e porcentagem (b) acumulativa de penG liberada a partir de esferas de alginato/ Ca^{2+} /IPE alginato / IPE (\blacklozenge), alginato/ Zn^{2+} /IPE reticulados (\blacktriangle).	106
5.28	Cinética de liberação da penG encapsulada em alginato/Ca $^{2+}$ /IPE (V) alginato/Zn $^{2+}$ /IPE (VI), modelo de ordem zero.	107
5.29	Efeito de diferentes biopolímeros (\circ) sobre o limiar da dor, estimulação mecânica nocipectiva. (a) Maltodextrina (b) pectina (c) Carboximetilcelulose – CMC (d) IPE (e) amido OSA (f) alginato e (g) Quitosana. A avaliação da atividade antinociceptiva foi determinada antes (PRE) e 30, 60, 90 e 120 minutos após o procedimento cirúrgico. O controle (\bullet) foi realizado na pata direita com um corte e sutura.	109
5.30	Liberação de mediares químicos após a lesão tecidual. *Potencial alvo de ação dos biomateriais sobre a nocicepção.	111
5.31	Efeito das microesferas de alginato/amio OSA (a) e alginato/IPE (b) sobre o limiar da dor (\circ), estimulação mecânica nocipectiva. A avaliação da atividade antinociceptiva foi determinada antes (PRE) e 30, 60, 90 e 120 minutos após o procedimento cirúrgico. O controle (\bullet) foi realizado na pata direita com um corte e sutura.	113
5.32	Efeito das microesferas de alginato/amido OSA e alginato/IPE, com e sem penG (reticulados com o íon zinco), sobre o limiar da dor, através da estimulação mecânica nocipectiva.	115
5.33	(A) Seção transversal de um canal iônico mostrando as características importantes do filtro de seletividade iônico. (B) Sítios de ligação para o cátion no poro de seleção do canal.	117
5.34	Micrografia eletrônica de varredura dos materiais de parede: IPE (A), Amido OSA (B), alginato de sódio (C) e da quitosana (D).	118
5.35	Micrografia eletrônica dos cristais de penG	118
5.36	Micrografia de esferas de alginato e amido OSA contendo penG, aumento de 50 x (A) e $500x$ (B).	119
5.37	Micrografia de esferas de alginato e amido OSA, sem penG.	120
5.38	Micrografia das esferas de alginato/IPE contendo penG aumento de 50x (A), 1000x(B) e esferas sem retenção da penG (C).	121
5.39	Micrografia das microcápsulas contendo PenG em matriz de alginato/ amido OSA /quitosana. Aumento de 70x (A), 1000x (B) e 10000x (C).	122
5.40	Micrografia das microcápsulas contendo PenG em matriz de alginato/	123

amido OSA /polilisina. Aumento de 65x (A), 1000x (B) e 5000x (C).

- 5.41 Potencial zeta das microesferas de PenG em matriz de alginate/amido OSA, 124 reticulados com cálcio(♦) e reticulados com zinco(■) em função do pH.
- 5.42 Potencial zeta das microesferas contendo PenG em matriz de 125 alginato/amido OSA/quitosana (♦) e alginato/amido OSA/Polilisina (●), reticulados com cálcio (a) e zinco (b).
- 5.43 Representação esquemática de um hidrogel interagindo com moléculas de 126 água.
- 5.44 Foto das esferas úmidas logo após a produção (a) e após a secagem a 37°C
 (b) das esferas de alginato/Ca²⁺/IPE (1) alginato/Ca²⁺/amido OSA e (2) alginato /Zn²⁺/amido OSA (3)
- 5.45 Perfis de intumescimento das esferas de alginato /Ca²⁺/IPE (\blacksquare) alginato/ 128 Ca²⁺/ amido OSA (\bullet), alginato/Zn²⁺/amido OSA(\blacktriangle), alginato/Zn²⁺/amido OSA/ quitosana (\bullet) e alginato/Zn²⁺/amido OSA/ polilisina (\blacklozenge).
- 5.46 Micrografia das microcápsulas de alginato/amido OSA/Quitosana (A) e 129 alginato/ Amido OSA/polilisina (B) após 30 dias em imersão em água.
- 5.47 Difração de raios X dos materiais de parede: alginato (A), IPE (B), amido 132 OSA (C) e quitosana (D).
- 5.48 Difração de raios X da PenG (a) e PenG solubilizada em H₂O destilada e 132 posteriormente liofilizada (b).
- 5.49 Difratogramas das esferas de Alginato /Amido OSA (A) e Alginato /IPE 133 (B) contendo penG.
- 5.50 Difratogramas das microcápsulas contendo PenG em matriz de alginato 134 /amido OSA /Quitosana (A) e alginato/amido OSA/Polilisina (B)
- 5.51 Curva de TGA da PenG (—) e dos biopolímeros alginato (—), amido OSA 138 (—) e quitosana (—).
- 5.52 Curva de TGA das microesferas de penicilina em matriz de alginato /Amido
 139 OSA, reticuladas com cálcio (a) e zinco (b). Microesferas recobertas com quitosana (--), com polilisina (--) e sem recobrimento com policátion (--).
- 5.53 Espectro do IR do amido OSA (--), alginato (--), microesfera de 141 alginato/amido OSA/Zn²⁺ sem PenG (--).
- 5.54 Espectro do IR das microesferas de alginato/amido OSA/Zn²⁺ sem PenG 142 (--), com PenG (--) e PenG pura (--).
- 5.55 Espectro do IR da quitosana (--), microesfera de PenG em matriz de 143 alginato/amido OSA/Zn²⁺(--), microesferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA/Zn²⁺ recobertas com quitosana (--).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela		Página
3.1	Dados hospitalares referentes à febre reumática e cardiopatia reumática crônica no Brasil de 2005-2007	7
3.2	Vantagens potenciais da utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos.	35
3.3	Desvantagens potenciais da utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos	35
4.1	Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2 ⁴⁻¹	43
4.2	Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 para o planejamento fracionado.	43
4.3	Variáveis independentes e níveis estudados no planejamento fatorial 2 ³	44
4.4	Matriz com valores codificados estudados no Planejamento Fatorial 2 ³ .	44
4.5	Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2 ⁴	45
4.6	Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 para o planejamento fatorial completo 2^2	46
4.7	Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 para o planejamento fatorial completo 2^4	47
4.8	Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2 ⁴	48
4.9	Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2 ⁴	48
4.10	Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 para o planejamento fatorial completo 2^2	49
4.11	Condições experimentais das microesferas e microcápsulas	52
4.12	Especificações das nanomembranas biocompatíveis.	53
4.13	Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e a solução "SBF".	54
4.14	Condições experimentais das microesferas e microcápsulas utilizadas no teste antimicrobiano	58
5.1	Matriz do planejamento experimental com os valores reais e respectivos resultados para a porcentagem de retenção da penG.	65
5.2	Matriz do planejamento fatorial com os valores reais e os resultados experimentais.	69
5.3	ANOVAs com modelo completo (A) e ajustado (B) para variação da porcentagem de retenção da penG.	72
5.4	Matriz do planejamento fatorial com os valores codificados, os valores reais e os resultados experimentais.	75
5.5	Coeficientes de regressão para a porcentagem de retenção de penG.	77
5.6	ANOVA com modelo completo para variação da porcentagem de retenção da penG.	78
5.7	Comparação dos resultados da porcentagem de retenção de PenG e relação teórica e real entre a massa de PenG e a massa de microcápsulas, utilizando	80

alginato e amido OSA como matriz.

- 5.8 Parâmetros cinéticos calculados para avaliação do processo de liberação da penG a partir das micresferas e microcápsulas de alginato/amido OSA.
 5.9 Tabela 5.9. Expoente n da Equação de Korsmeyer-Peppas e mecanismo de liberação de Fármaco.
 5.10 Equações obtidas a partir das análises de regressão linear, o coeficiente de determinação ajustado (R²) e a taxa de dissolução do modelo de ordem zero (K).
- 5.11 Parâmetros cinéticos calculados para avaliação do processo de liberação da 92 penG a partir das micresferas e microcápsulas de alginato/amido OSA.
- 5.12 Matriz do planejamento fatorial com os valores reais e os resultados 94 experimentais
- 5.13ANOVA para a porcentagem de retenção de penG97
- 5.14 Matriz do planejamento fatorial com os resultados experimentais, valores reais 101 e codificados.
- 5.15 ANOVA para a porcentagem de retenção de penicilina G 103
- 5.16 Coeficientes lineares dos ajustes das curvas de liberação com os modelos 107 matemáticos testados.
- 5.17 Equações obtidas a partir das análises de regressão linear, o coeficiente de 108 determinação ajustado (R²) e a taxa de dissolução do modelo de ordem zero (K).
- 5.18 Grau máximo de intumescimento das microesferas e microcápsulas produzidas. 127
- 5.19 Temperaturas e variações de entalpia para as amostras analisadas por DSC 136
- 5.20 Atividade antimicrobiana por difusão em ágar da PenG presente nas 144 microesferas e microcápsulas produzidas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-APA	ácido-6-aminopenicilânico
AL	alginato
Amido OSA	Amido octenilsuccinato
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CRC	Cardiopatia reumática crônica
DRX	Difração de raios X
EBHGA	Streptococcus β hemolítico do Grupo A de Lancefield
FR	Febre reumática
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPE	Isolado protéico de ervilha
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OMS	Organização mundial da saúde
PAMAM	poli(amidoamina)
PBA	Poli butil adipato
PEG	polietilenoglicol
PenG	Penicilina G benzatina
PLGA	poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
SUS	Sistema Único de Saúde
PG	Prostaglandinas

1. INTRODUÇÃO

A febre reumática (FR) é uma doença auto-imune, inflamatória, que surge como complicação de uma infecção de garganta (faringoamigdalite). A infecção é de origem bacteriana, causada pelo *Streptococcus* β *hemolítico do Grupo A de Lancefield* ou *Streptococcus pyogenes* (EBHGA). Nos indivíduos com predisposição genética, a FR acomete preferencialmente os tecidos articular, cardíaco, neurológico, cutâneo e subcutâneo, podendo causar graves seqüelas cardíacas, responsáveis pelos importantes índices de morbi-mortalidade desta enfermidade (WHO, 2004).

A população mais acometida são crianças e adolescentes entre 5 e 15 anos, que desenvolvem a FR aguda, quando a infecção estreptocócica não é tratada, ou é tratada de forma inadequada. O quadro clínico predominante é o do acometimento articular (reumatismo) mas ocorre o envolvimento inflamatório do coração (cardite reumática) em 50% dos casos. Tal quadro, pode evoluir para a cura, óbito ou, mais freqüentemente, em até 72% dos casos, para seqüelas nas válvulas cardíacas (MEIRA *et al*, 2005), denominada de Cardiopatia Reumática Crônica (CRC).

A penicilina G benzatina (penG) tem sido recomendada como primeira escolha neste tratamento, mostrando-se efetiva em reduzir a incidência de FR aguda após o episódio de faringite estreptocócica (WHO, 1999; ROBERTSON *et al*, 2005). Para os indivíduos que já apresentaram o surto inicial da doença, é indicada a profilaxia secundária – para evitar a ocorrência de recidivas.

A profilaxia secundária da FR é realizada através da administração de penicilina G benzatina na forma injetável a cada 21 dias até a idade adulta (DAJANI *et al* 1995; MOTA *et al* 2004). A administração de 600.000 UI/dose (criança) ou de 1.000.000 UI/dose (adulto) forma um depósito de penicilina G no músculo causando um processo extremamente doloroso que promove grande sofrimento ao paciente. Devido à grande inconveniência provocada pela dor no local de aplicação, tal tratamento, embora plenamente recomendado pela OMS, conduz os pacientes ao abandono da terapêutica. Garantir a adesão do paciente a esse tratamento doloroso tem se constituído num grande desafio no Brasil e no mundo, resultando na sua falha e conseqüente ocorrência de recidivas. A não adesão à profilaxia acarreta altos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS), sendo responsável por um custo anual de tratamento de 19 milhões de reais para atender uma população de 18.500 casos.

Estimativas da OMS apontam para em torno de 400.000 óbitos anuais em conseqüência desta doença. Pelo menos 12 millhões de pessoas estão afetadas por ela e em torno de dois milhões necessitando de internações freqüentes. Estima-se que um

milhão de cirurgias deverão ser realizadas nos próximos 5 anos em pacientes reumáticos, que geralmente vem de famílias pobres, com dificuldades até para comprar a penG. Ásia, África, América Latina e o leste do Mediterrâneo são as 4 regiões geográficas mais afetadas e nelas quase 1% das crianças em idade escolar demonstram sinais da doença.

Com base no acima exposto, acreditamos que a técnica de microencapsulamento aplicada a fármacos para liberação controlada, associada a enxertos subdérmicos, é uma solução tecnológica que visa solucionar o dramático problema enfrentado pela clínica médica no que tange a adesão dos pacientes ao tratamento de doenças que exigem tratamento prolongado e dolorido. O modelo experimental escolhido para o desenvolvimento deste trabalho foi o microencapsulamento de PenG utilizando matérias primas biotecnológicas, como as oriundas de algas marinhas (alginato), amido modificado (amido OSA), isolado protéico de ervilha (IPE), dentre outros.

O objetivo deste trabalho é desenvolver um dispositivo para implante subdérmico com liberação controlada da penG, que permita um aumento na adesão à profilaxia secundária dos pacientes acometidos de FR, diminuindo a freqüência das administrações profiláticas.

A proposta deste trabalho foi induzida pelo cardiologista e atual secretário de saúde do município do Rio de janeiro, Dr. Hans Fernando Rocha Dohmann, que em 2009, solicitou ao nosso grupo de pesquisa solução tecnológica para aumentar a adesão dos pacientes acometidos de FR ao tratamento profilático. O projeto desta forma apresenta a co-participação ao "Programa Saúde Presente" da prefeitura do Rio de Janeiro, que pretende estender a cobertura do Programa Saúde da Família, vislumbrando desta forma a atenção primária da cidade do Rio de Janeiro.

2. Objetivos

O objetivo geral deste projeto consiste no desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica de liberação controlada de penG para uso em implante subdérmico. O intuito é reduzir a freqüência das administrações intramusculares profiláticas em pacientes acometidos por FR.

O objetivo específico deste projeto é desenvolver um sistema de liberação prolongada a partir de nanomembranas contendo esferas de penG em matriz de alginato. A otimização desses carreadores medicamentosos permitirá a melhor afabilidade do paciente, no decorrer do seu tratamento.

Para alcançar o objetivo geral do projeto, investigações estão previstas nas seguintes áreas:

- Investigação de diferentes materiais de parede para encapsulamento da penG;
- Otimização da retenção da penG utilizando planejamento experimental;
- Produção de microcápsulas, utilizando os policátions quitosana e polilisina;
- Verificação da liberação *in vitro* da penG;
- Caracterização das microesferas e microcápsulas de penG com relação à morfologia, potencial zeta, cristalinidade, análise térmica e espectroscopia no infravermelho;
- Determinação do grau de intumescimento e erosão das esferas;
- Avaliação da atividade antimicrobiana da penicilina encapsulada e livre frente ao *S. pyogenes*;
- Encapsulamento das esferas e microcápsulas de penG em diferentes nanomembranas;
- Verificação da cinética de liberação *in vitro* das nanomembranas contendo penG;
- Modelagem cinética das curvas de liberação;

O trabalho está estruturado em quatro partes básicas:

A primeira parte apresenta a revisão bibliográfica, como forma de embasamento aos objetivos propostos neste capítulo, procurando fornecer base teórica bem como os resultados obtidos na literatura referentes ao tema deste trabalho. A segunda parte apresenta os materiais e métodos utilizados para alcançar os objetivos propostos. Na terceira parte são apresentados os resultados e as discussões. Para finalizar, conclusões e sugestões para trabalhos futuros, são apresentados na quarta parte.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Febre reumática (FR)

A FR é uma afecção aguda, recidivante, que frequentemente se manifesta após uma infecção faríngea por estreptococos do grupo A. Os indícios sugerem fortemente que FR seja resultado de uma resposta imunológica aos antígenos estreptocócicos que ensejam uma reação cruzada aos antígenos tissulares, principalmente no coração, ou uma reação auto-imune aos antígenos tissulares (STEER & CARAPETIS, 2009).

Com respeito aos possíveis alvos antigênicos, a cápsula de hialuronato do estreptococo é idêntica ao hialuronato humano, e os anticorpos reagem a esses alvos de forma cruzada com as glicoproteínas das valvas cardíacas. Além disso, antígenos da membrana estreptocócica evocam anticorpos que fazem reações cruzadas com o sarcolema do miocárdio e muscular liso. Mais recentemente, epitopes compartilhados de proteína M estreptocócica e miosina cardíaca foram demonstrado. A doença aguda caracteriza-se principalmente por febre, poliartrite migratória das grandes articulações, cardite, nódulos subcutâneos, eritema marginado da pele e coréia de Sydenham (distúrbios neurológicos com movimentos rápidos e involuntários) (ABBAS *et al.* 2010).

Pelas características de alta transmissibilidade e rapidez de disseminação do EBHGA, as incidências de faringoamigdalite e de FR aguda são mais elevadas em situações de aglomerações humanas e condições socioeconômicas adversas. Estudos epidemiológicos demonstram que 0,3 a 3% dos indivíduos com faringoamigdalite estreptocócica desenvolvem FR (WHO, 1988; TARANTA E MARKOWITZ, 1989).

A doença possui um caráter recidivante e sempre que o indivíduo tiver contato com a bactéria, na ausência de prevenção e tratamento da nova infecção, reinicia-se o ciclo, caracterizando as recidivas, ou novos surtos da doença, que ocorrem principalmente nos dois primeiros anos após o surto inicial (ROTH *et al*, 1937). A maioria das manifestações nas recidivas mimetiza o primeiro surto, observando-se agravamento progressivo das lesões cardíacas valvares. O surto agudo é autolimitado, variando de seis a 12 semanas, podendo se estender até seis meses ou mais nos casos de cardite grave (TARANTA E MARKOWITZ, 1989).

As lesões cardíacas típicas da fase aguda da doença são as lesões de regurgitação ou insuficiência das válvulas, em geral iniciando-se na válvula mitral, e acometendo em ordem de freqüência as válvulas: mitral, aórtica e tricúspide. As lesões podem evoluir de forma assintomática durante anos, ou evoluir para insuficiência cardíaca e/ou

4

disfunção progressiva do miocárdio, necessitando da realização de cirurgia cardíaca de reparação (plastia) da válvula ou troca valvar com implante de próteses artificiais.

Essas lesões, entretanto, tendem a melhorar ao longo do tempo, quando é instituída a profilaxia, sendo que 50% dos sopros desaparecem nos primeiros 5 anos após o surto inicial e o restante posteriormente, podendo ocorrer até 10 anos após o primeiro surto (VASAN e SELVARAJ, 1999). Já as lesões crônicas graves determinam sintomas, e podem propiciar o aparecimento de arritmias cardíacas, e devem ser tratadas através de procedimentos de hemodinâmica intervencionista como valvuloplastia com cateter balão ou de cirurgia cardíaca.

Quando a opção cirúrgica for de implante de prótese mecânica, o paciente tem indicação de fazer uso de anticoagulantes orais para toda a vida, o que constitui um risco adicional, principalmente quando se consideram as condições socioeconômicas desfavoráveis e o acesso inadequado aos cuidados médicos (DIÓGENES E CARVALHO, 2005). Por outro lado, o implante de próteses biológicas nesta faixa etária leva à rápida calcificação e disfunção protética (SNITCOWSKY, 1983).

A penicilina G benzatina tem sido recomendada como primeira escolha neste tratamento, mostrando-se efetiva em reduzir a incidência de FR aguda após o episódio de faringite estreptocócica (WHO, 1999; ROBERTSON et al, 2005). Para os indivíduos que já apresentaram o surto inicial da doença, é indicada a profilaxia secundária – para evitar a ocorrência de recidivas.

A profilaxia secundária da FR é realizada através da administração de penicilina benzatina na forma injetável a cada 21 dias até a idade adulta (DAJANI et al 1995; MOTA et al 2004), e garantir a adesão do paciente a esse tratamento doloroso têm se constituído num grande desafio no Brasil e no mundo (SNITCOWSKY, 1996; CARAPETIS, 2007), resultando frequentemente na sua falha e conseqüente ocorrência de recidivas em grande parte da população acompanhada.

Borges e colaboradores relataram 69% de surtos de recidivas, ao analisarem 99 episódios de FR aguda na Amazônia, com uma taxa de falha na profilaxia de 61%. Nesta população estudada, 69% apresentaram cardite (BORGES *et al*, 2005). Müller e colaboradores estudaram 95 pacientes com cardite aguda no Instituto Nacional de Cardiologia (INC), e encontraram 64% de taxa de recidiva, sendo que 25% dos pacientes relatavam mais de dois surtos agudos anteriores. Neste estudo, apenas 11,5% dos pacientes referiram estar em uso da profilaxia regular com penicilina benzatina (MÜLLER *et al*, 2008).

Desde o início do século XXI, a FR, assim como a cardiopatia reumática crônica (CRC), persistem como problemas de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos

quanto nos países em desenvolvimento, com seus efeitos mais devastadores observados nas crianças, adolescentes e nos adultos jovens durante seus anos mais produtivos de vida (WHO, 2004).

Trata-se de uma doença de distribuição universal, mas com marcada diferença nas taxas de incidência e prevalência entre os diversos países, constituindo a principal causa de cardiopatia adquirida em crianças e adultos jovens nos países em desenvolvimento (WHO, 2004). Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam, em 2005, para: 15,6 milhões de portadores de cardiopatia reumática crônica; cerca de 300.000 novos casos/ano; e 233.000 mortes diretamente atribuíveis à CRC a cada ano no mundo (CARAPETIS *et al.*, 2005a).

Em 2007, Marijon e colaboradores publicaram estudo baseado em 3677 e 2170 escolares no Cambodja e em Moçambique respectivamente, em que identificou, através de exame de ecocardiografia, cerca de dez vezes mais crianças com FR do que o sugerido por diagnóstico clínico. Isto sugere que a magnitude desta doença é subestimada não só pelo sub-registros dos casos identificados, mas também pela dificuldade de identificar os casos sub-clínicos (MARIJON *et al*, 2007). Carapetis comenta, a respeito desse mesmo estudo, que: "*Estes dados confirmam que a FR e a doença reumática do coração são suficientemente importantes para garantir atenção urgente da saúde pública internacional bem como da comunidade de pesquisa*" (CARAPETIS, 2007).

Seguindo o modelo epidemiológico da OMS, e de acordo com o último censo do IBGE, estima-se que anualmente no Brasil ocorram cerca de 10 milhões de amigdalites estreptocócicas, perfazendo o total de 30.000 novos casos de FR, dos quais 15.000 evoluem com acometimento cardíaco (MOTA e MÜLLER, 2008).

No Brasil, a notificação da FR não é compulsória como, por exemplo, na Austrália. No entanto sabemos através do sistema de informações do Ministério da Saúde, que tanto no que se refere a internações como à mortalidade, que a FR ainda constitui importante problema de saúde pública. Os dados disponíveis, através do sistema DATASUS, não correspondem à totalidade dos casos diagnosticados no país, especialmente, se considerado a baixa oferta de leitos hospitalares para a faixa etária da adolescência em nosso país. Mesmo assim, observa-se um significativo número de internações e intervenções devido à FR e CRC, registrando-se em 2005 uma taxa de mortalidade por CRC de 6,8% e um custo de tratamento clínico e dos procedimentos intervencionistas - cirurgia valvar e valvuloplastia com cateter balão – nos anos de 2005 a 2007 de 393,5 milhões de reais (DATASUS, 2007), conforme demonstrado na Tabela 3.1.

No entanto, a manutenção da profilaxia secundária com administração de penicilina benzatina a cada 21 dias tem um custo para a farmácia hospitalar de menos de R\$ 30,00 por paciente por ano, enquanto que a realização de uma cirurgia cardíaca com implante de prótese artificial tem um custo de pelo menos R\$ 7.000,00 (tabela SUS). Existe ainda o impacto social e econômico, que são relevantes, quando analisados os custos indiretos, como o nível de repetência escolar e perda de dias de trabalho pelos pacientes e seus familiares, chegando esses a atingir 1,3% da renda familiar anual (TERRERI *et al.*, 2002).

Tabela 3.1. Dados hospitalares referentes à FR e cardiopatia reumática crônica no Brasil de 2005-2007

-	Internações Febre Reumática Aguda	6.349
-	Internações Cardiopatia Reumática Crônica	23.482
-	Cirurgias valvares	29.126
•	Taxa de mortalidade por CRC (2005)	6,8%
-	Custo internações Febre Reumática Aguda 1,5	milhões
-	Custo internações Cardiopatia Reumática Crônica 160	milhões
-	Custo cirurgias valvares	milhões
	Custo internações clínicas/ procedimentos 393,5	milhões

Fonte: DATASUS 2005-2007

É reconhecido também, que fatores socioeconômicos e ambientais influenciam a gravidade da FR e da CRC. De acordo com a OMS são determinantes da magnitude da doença na comunidade: a escassez de recursos para prover assistência médica adequada, a falta de conhecimento sobre a doença na comunidade e a falta de treinamento das equipes de saúde (WHO, 2004).

A cardiopatia reumática crônica reflete altos índices de morbidade e mortalidade por se tratar de uma doença incapacitante, ocasionando grande impacto social, uma vez que atinge indivíduos em fase de crescimento e desenvolvimento. A vida escolar e a inserção no mercado de trabalho tornam-se mais difíceis. Freqüentemente fazem-se necessárias internações repetidas, intervenções cirúrgicas cardiovasculares complexas, tratamento medicamentoso de difícil manejo, como o uso de anticoagulantes pelo resto da vida, influindo na capacidade laborativa dos pacientes e seus responsáveis e levando a altos custos sociais, direta ou indiretamente (TERRERI *et al.*, 2002). Na análise de morbidade, o cálculo do índice *DALYs¹*— *disability-adjusted life years* (anos potenciais de vida perdidos ajustados para incapacidade) - demonstrou o total de 55.000 anos de vida perdidos em decorrência da FR, ou seja, 26 anos por paciente por ano no Brasil, baseado em dados do ano 2000.

Embora a FR seja considerada como uma das doenças de mais fácil prevenção e sua profilaxia tenha sido considerada como prioridade para a OMS em 1999 (WHO, 1999), o seu controle permanece um desafio para muitos países em desenvolvimento (CARAPETIS, 2005b). Os programas de profilaxia secundária da FR, implementados nos Estados Unidos da América a partir da década de 50, mostraram-se efetivos no controle da doença e iniciativas desse tipo foram realizadas em vários países ao longo desses últimos 55 anos.

No Brasil, cardiologistas e reumatologistas pediátricos têm atuado desde a década de 80, no desenvolvimento de programas de prevenção (TORRES, 1994; SNITCOWSKY, 1996), que buscam incentivar os pacientes a manterem a adesão aos esquemas de profilaxia secundária. No entanto, a falta de uma política governamental efetiva faz com que as bem-intencionadas ações desses grupos isolados de profissionais, que vêm trabalhando nos últimos 20 anos em programas regionais de prevenção, não logrem resultados efetivos a longo prazo (GRACIE e SBAFFI, 1996; MÜLLER e GOLDENZON, 2006).

Também o Instituto Nacional de Cardiologia, centro de referência do Ministério da Saúde para o diagnóstico e tratamento das enfermidades cardiovasculares, vem participando desses esforços através do Programa PREFERE (Programa de Prevenção à Febre Reumática), que tem por objetivo principal disseminar o conhecimento sobre o diagnóstico, tratamento e prevenção primária da FR nas escolas de ensino fundamental e entre os profissionais da rede básica de saúde. Para isso é utilizado a estratégia de formação de multiplicadores após treinamento e capacitação específicos (XAVIER *et al*, 2004).

Embora existam pesquisas em fase bastante avançada, ainda não foi elaborada vacina eficaz contra o estreptococo disponível comercialmente no mundo. No momento, várias estão em fase de desenvolvimento pré-clínico, mas somente com perspectiva de serem aprovadas e disponibilizadas para uso nos próximos 10 a 20 anos (GUILHERME *et al*, 2006; CARAPETIS, 2007).

¹ Disability-adjusted life years (DALYs) – em português: Anos Potenciais de Vida Ajustados para Incapacidade – refere-se à soma dos anos de vida perdidos devido à morte prematura, acrescentado dos anos vividos com incapacidade ajustados à gravidade da incapacidade. O DALY foi constituído de forma a possibilitar, através de uma única medida, a realização de estudo de âmbito mundial denominada Burden of Disease (Carga de Doenças) (Murray, 1994).

Com os conhecimentos atuais, a profilaxia primária e secundária parecem constituir as únicas opções de controle da doença, sendo que somente a profilaxia secundária tem demonstrado ser custo-efetiva até o presente momento, inclusive nos países em desenvolvimento (MICHAUD *et al.*, 1999; WHO, 2004). O desenvolvimento de uma outra forma de penicilina, de liberação lenta, que possibilite maior adesão aos esquemas de profilaxia secundária trará grande alento aos pacientes portadores de FR e um novo horizonte para o controle desta enfermidade em todo o mundo.

3.2. Penicilina G

As penicilinas constituem um dos grupos mais importantes entre os antibióticos. Apesar da produção de numerosos outros agentes antimicrobianos desde a introdução da primeira penicilina, as penicilinas continuam sendo antibióticos importantes e amplamente utilizados, e ainda estão sendo produzidos novos derivados do núcleo básico da penicilina. Muitos desses fármacos apresentam vantagens peculiares, de modo que os membros desse grupo de antibióticos constituem, hoje, os fármacos de escolha para o tratamento de um grande número de doenças infecciosas.

3.2.1. Propriedades

A PenG é o derivado benzílico do 6-APA (ácido-6-aminopenicilânico) apresentado sob forma de sal alcalino sódico ou potássico. Os sais alcalinos da penicilina apresentam-se como um pó cristalino, branco, inodoro, facilmente solúvel em água, muito higroscópico e intável em solução aquosa devido ao seu anel lactâmico. Funde-se a 215°C com decomposição (MENEZES, 2000). A penG possui um pka de 2,74. Sua solubilidade em água é de 0,1g/mL. É um ácido orgânico fraco. A concentração da sua forma ionizada (polar) varia com o pH e, conseqüentemente, varia sua solubilidade em água. A variação da concentração da forma iônica de penG com o pH determina também sua absorção pelo organismo. No estômago, onde o pH é 2,0 tem-se 15,4% das moléculas de penG na forma iônica e 84,60% na forma neutra. No duodeno onde o pH é 6,0 tem-se 99,95% das moléculas ionizadas. Somente a forma neutra, apolar, consegue atravessar a barreira lipídica da membrana celular. O mesmo fenômeno explica a eficiência da extração de penG em solvente apolar nos baixos valores de pH utilizados na indústria e faz prever a viabilidade de sua adsorção eficiente em resinas hidrofóbicas.

3.2.2. Estrutura química

A estrutura básica das penicilinas, mostrada na Figura 3.1, consiste em um anel de tiazolidina (A) ligado a um anel betalactâmico (B), ao qual se fixa uma cadeia lateral (R). O próprio núcleo da penicilina, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), constitui o principal requisito estrutural para a atividade biológica; a transformação metabólica ou a ocorrência de uma alteração química nessa porção da molécula levam à perda de toda a atividade antibacteriana significativa (ROGER, 2000).

A cadeia lateral determina muitas das características antibacterianas e farmacológicas de um tipo particular de penicilina. É possível produzir várias penicilinas naturais, dependendo da composição química do meio de fermentação utilizado na cultura do *Penicillium*. A penicilina G (benzilpenicilina) é, entre essas penicilinas, a que possui maior atividade antimicrobiana, sendo a única penicilina natural utilizada clinicamente. Na penG, a cadeia lateral R é um substituinte do fenilmetil (FIG 3.2) (BRUNTON *et al*, 2007).



Figura 3.1. Estrutura básica de uma molécula de penicilina. A: Anel tiazolidínico B: Anel betalactamico e R: cadeia lateral (BRUNTON *et al*, 2007).



Figura 3.2. Estrutura da penG (benzil penicilina)

A unidade internacional da penicilina é a atividade específica de penicilina contida em 0,6 µg do sal sódico cristalino da penG. Um miligrama de penG sódica pura

equivale, portanto, a 1.667 unidades; 1,0 mg de penG potássica pura representa 1.595 unidades (CHAIN, 1998).

3.2.3. Farmacocinética

Na administração oral de penG, cerca de 33% de uma dose de penG administrada sofre absorção pelo trato intestinal em condições favoráveis, pois o suco gástrico em pH 2 inativa o antibiótico. A absorção é rápida e são alcançadas concentrações máximas no sangue dentro de 30 a 60 min. O valor máximo é de cerca de 0,5 U/mL (0,3 μ g/mL) após uma dose oral de 400.000 U (cerca de 250 mg) no adulto (STEER & CARAPETIS, 2009).

Na administração parenteral de penG, logo após a injeção intramuscular, as concentrações máximas no plasma são alcançadas de 15 a 30 min. Esse valor declina rapidamente, visto que a meia-vida da penG é de 30 min. Foram estudados diversos meios de prolongar a permanência do antibiótico no corpo e assim reduzir a freqüência das injeções. A probenecida bloqueia a secreção tubular renal da penicilina, mas é raramente usado para esse propósito devido aos efeitos colaterais (BRUNTON, 2007)

Segundo Sousa (2008) os dois compostos mais utilizados para injeção intramuscular são a penG procaína e penilina G benzatina, com mais freqüência encontra-se a penilina G benzatina. A suspensão de penG é a suspensão aquosa do sal obtido pela combinação de 1 mol de uma base amônio com 2 moles de PenG, produzindo N, N-dibenziletilenodiamina dipenicilina G. O sal tem uma solubilidade de apens 0,02 % em águas. A penG é absorvida muito lentamente dos depósitos intramuscular e proporciona a mais longa permanência de antibiótico detectável. Em adultos a administração intramuscular de uma dose de 1.200.000U produz concentrções plasmáticas de 0,09 µg/mL no primeiro dia, de 0,02µg/mL no décimo quarto dia e de 0,002 µg/mL no trigésimo segundo dia após a injeção. A duração média da atividade antimicrobiana no plasma é de cerca de 26 dias (MANDELL E PETRI, 1978).

3.2.4. Mecanismo de ação das penicilinas

Os antibióticos batalactâmicos têm a capacidade de eliminar as bactérias sensíveis. A penG tem atividade contra uma variedade de espécies de cocos Grampositivos e Gram-negativos. Os estreptococos são em sua maioria, muito sensíveis a penG, e concentrações inferiores a 0,01 µg/mL são efetivas (BAYLES, 2000)

Embora o conhecimento do mecanismo dessa ação ainda seja incompleto, numerosos pesquisadores forneceram informações que possibilitam uma compreensão do fenômeno básico (GHUYSEN, 1991).

A parede celular das bactérias é essencial para o seu crescimento e seu desenvolvimento normais. O peptideoglicano é um componente heteropolimérico da parede celular que proporciona uma estabilidade mecânica rígida em virtude da sua estrutura reticulada com elevado número de ligações cruzadas (Figura 3.3).



Figura 3.3. Estrutura da parede celular dos microorganismos Gram-positivos.

Nos microrganismos Gram-positivos, a parede celular tem uma espessura constituída por 50 a 100 moléculas, enquanto a das bactérias Gram-negativas tem uma espessura constituída por apenas 1 ou 2 moléculas. O peptidoglicano é constituído de cadeias de glicano que consistem em filamentos lineares de dois aminoaçúcares alternados (N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico), unidos por meio de ligações cruzadas por cadeias peptídicas (BAYLES, 2000).

A biossíntese do peptidoglicano envolve cerca de 30 enzimas bacterianas e pode ser dividida em três estágios. O primeiro estágio, que consiste na formação do precursores, ocorre no citoplasma. O produto, o difosfato de uridina (UDP)acetilmuramil-pentapeptídio, acumula-se nas células quando os estágios subseqüentes de síntese são inibidos. A última reação na síntese desse composto consiste na adição de dipeptídio, a D-alanil-D-alanina. A síntese do dipeptídio envolve racernização prévia da L-alanina e condensação catalisada pela D-alanil-D-sintetase. A D-ciclosserina é um análogo estrutural da D-alanina, que atua como inibidor competitivo da racemase e da sintetase (Figura 3.4).



Figura 3.4. Ação dos antibióticos betalactamicos sobre *S. aureus* (BRUTON *et al*, 2007).

Durante as reações do segundo estágio, ocorre ligação do UDP-acetilmuramilpentapeptídio e da UDP-acetilglicosamina (com liberação dos nucleotídios de uridina) para formar um longo polímero.

O terceiro e último estágio envolve o término da ligação cruzada. Essa etapa é efetuada por uma reação de transpeptidação, que ocorre fora da membrana celular. A própria transpeptidase está ligada à membrana. O resíduo de glicina terminal da ponte de pentaglicina liga-se ao quarto resíduo do pentapeptídio (D-alanina), liberando o quinto resíduo (também D-alanina). Essa última etapa na síntese do peptidoglicano é que é inibida pelos antibióticos betalactâmicos. Os estereomodelos revelam que a configuração da penicilina é muito semelhante à da D-alanil-D-alanina. A transpeptidase provavelmente é acilada pela penicilina; ou seja, forma-se aparentemente uma enzima peniciloil, com clivagem da ligação —CO—N— do anel betalactâmico (BRUNTON *et al*, 2007).

3. 3. Microencapsulamento

O microencapsulamento é uma tecnologia em expansão com diversas aplicações, não somente na indústria farmacêutica, como também em outras áreas, como a indústria alimentícia (WISE, 2000; UDDIN, 2001). O microencapsulamento é definido como o embalamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em minúsculas cápsulas, as quais podem liberar seu conteúdo a taxas controladas em condições

específicas (DZIEZAK, 1988). O material revestido é denominado núcleo ou material encapsulado. Já o material que forma o revestimento, é conhecido como matriz, material de parede ou encapsulante (RISH, 1995).

O termo microencapsulamento abrange a obtenção de diferentes produtos, como microcápsulas, microesferas, micropartículas e aprisionamento de substâncias ativas, as quais diferem entre si quanto à distribuição do ativo na matriz encapsulante. Suave *et al.* (2006) definem microesferas como sendo partículas compactadas constituídas por uma rede polimérica na qual a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular. Já as microcápsulas são as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (Figura 3.5); micropartícula é um termo que pode ser aplicado em ambas situações.

O tipo de distribuição do núcleo também pode variar de acordo com a técnica de microencapsulamento (ZELLER *et al.*, 1999).



Figura 3.5. Diferença estrutural entre microesferas (A) e microcápsulas (B). Fonte: Bazzo, 2009.

As partículas formadas podem ser classificadas quanto ao tamanho, sendo denominadas macrocápsulas (>5000 μ), microcápsulas (0,2-5000 μ) ou nanocápsulas (<0,2 μ). O formato das mesmas pode ser esférico, alongado, monolíticos ou agregados, com paredes simples ou múltiplas (KING, 1995).

O material polimérico de revestimento forma uma rede tridimensional, onde o fármaco pode ser adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à superfície da partícula, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos (CECHINEL FILHO, BRESOLIN, 2003). A obtenção de um tipo de estrutura ou outro depende das

propriedades físico-químicas da substância ativa e do material de revestimento, assim como do processo tecnológico utilizado (JATO, 1997).

As principais aplicações do microencapsulamento na indústria farmacêutica incluem: melhor penetração intracelular do fármaco, proteção contra a inativação enzimática antes de atingir seu local de ação no organismo, direção do fármaco através da corrente sanguínea ou do trato gastrointestinal permitindo maior especificidade acompanhada por distribuição corporal mais restrita, separação de incompatibilidades nas preparações, melhora da estabilidade de produtos por conferir proteção ambiental, conversão de líquidos em sólidos, redução da volatilidade ou inflamabilidade de líquidos, mascaramento de sabor desagradável, redução de toxicidade de fármacos, melhora da manipulação de insumos durante a preparação, controle do tamanho das partículas, controle da liberação de insumos em geral (MAGILL, 1991; GASPAR, 1991; DUCHÊNE, WOUESSIDJEWE, GILLES, 1999).

Nesse contexto, são formados então vetores farmacêuticos, visto que a vetorização pode ser considerada como uma operação visando modular e, se possível, dominar totalmente a distribuição de um princípio ativo no organismo, associando-o a um sistema apropriado chamado vetor da substância em questão (LE HIR, 1997)

Os vetores tornam a distribuição da substância no organismo o mais independente das suas propriedades, porém submetida às propriedades do vetor, em função do alvo a ser atingido. Didaticamente, os vetores podem ser classificados em: (a) Vetores de primeira geração, capazes de liberar progressivamente seu conteúdo, apresentando tamanho de cerca de 200 µm, como por exemplo as microesferas e as microcápsulas; (b) Vetores de segunda geração, capazes de atingirem o alvo independentemente da forma como são administradas, apresentam tamanho coloidal (menos de 1 nm), e como exemplos podem ser citados as nanoesferas e nanocápsulas, assim como os lipossomas; (c) Vetores de terceira geração, capazes de reconhecer o alvo desejado, destacando-se neste grupo os vetores coloidais dotados de proteínas ou substâncias passíveis de reconhecimento por receptores contidas em seu revestimento, como por exemplo nanoesferas, nanocápsulas ou lipossomas pilotados por um anticorpo monoclonal (LE HIR, 1997).

3.4. Biopolímeros

Os biopolímeros são produzidos por organismos vivos, como plantas e microorganismos. Celulose e amido, proteínas e peptídeos e DNA e RNA, são exemplos de biopolímeros, no qual as unidades monoméricas são, respectivamente, açúcares,
aminoácidos e nucleotídeos (SINGH, 2011). O emprego de polímeros biodegradáveis na indústria vem sendo muito estudado, em razão da necessidade cada vez maior da substituição de materiais sintéticos convencionais, que causam grande impacto ao meio ambiente (LIMA *et al.*, 2007).

A melhoria no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada depende estritamente da seleção de um agente encapsulante apropriado capaz de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e/ ou de liberar o fármaco ao nível de um determinado tecido ou órgão alvo. Dentro das várias opções, os biopolímeros são agentes versáteis e promissores para exercer tal função, pois apresentam vantagens de serem biocompativeis e biodegradáveis. Além do que, podem ser modulados para conter uma informação que será responsável pela cinética de liberação (BANSODE *et al.*, 2010).

O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas. Segundo Santos *et al.* (2000), o encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo; possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado; ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral; e ser econômico.

A estrutura das micropartículas depende do material e métodos envolvidos na sua preparação. Dentre os biopolímeros, os mais utilizados são: polissacarídeos naturais (amido, dextrinas) ou modificados (carboximetilcelulose, etilcelulose, metilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose), gomas (arábica, carragena, alginato de sódio), materiais protéicos (glúten, caseína, gelatina, albumina, quitosana), ceras, lipídios (parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos) (SILVA, FERREIRA, 1998; SANTOS, FERREIRA, GROSSO, 2000).

3.4.1. Alginato de sódio

Alginatos de sódio são polissacarídeos lineares solúveis em água, extraído de algas marrons (GEORGE; ABRAHAM, 2006). Os alginatos são extraídos

principalmente de três espécies de algas marrons, que incluem: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*.

É um copolímero constituído de dois tipos de resíduos de uronatos, β -D manurônico (M) e α -L gulurônico (G) (Figura 3.6), unidos por ligações glicosídicas (1,4) (BRESOLIN *et al.*, 2003; DRAGET; SKJAK-BRAEK; SMIDSROD, 1997).

As formas dos monômeros e seu modo de ligação no polímero são diferentes, assim como, a geometria das regiões (G) e (M) e sua alternância, sendo que a composição e a extensão destas seqüências e a massa molecular são fatores que determinam as propriedades físico-químicas dos alginatos (GEORGE; ABRAHAM, 2006; DENTINI *et al.*, 2007). De acordo com Amici e colaboradores (2008), as propriedades físicas de AL dependem da composição do ácido urônico e da quantidade relativa das três seqüências, M, G e MG. A biocompatibilidade e/ou imunogeneticidade dos alginatos variam com a proporção dos resíduos M/G, sendo que geralmente o alginato rico em G possui uma mais alta biocompatibilidade do que polímeros ricos em M (TONNESEN; KARLSEN, 2002).



Figura 3.6. Estrutura química do alginato (A) resíduos de ácido L-gulurônico (B) resíduo ácido D – manurônico

Devido a suas várias propriedades, tais como imunogenecidade, bioadesão, biodegradabilidade e biocompatibilidade, as indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos têm investido no alginato como excipiente (MIYAZAKI; KUBO; ATTWOOD, 2000; TONNESEN; KARLSEN, 2002; BAJPAI; TANKHIWALE, 2006).

Suas aplicações geralmente dependem da espessura do gel formado e das propriedades estabilizantes do mesmo, como por exemplo, o alginato de sódio pode ser utilizado como aglutinante e agente desintegrante em comprimidos, como agente suspensor e espessante em géis miscíveis em água, loções e cremes e como um agente estabilizante para emulsões. Entretanto o maior potencial do alginato refere-se ao desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos (TONNESEN; KARLSEN, 2002), sendo amplamente empregado para liberar materiais bioativos como insulina, imunoglobulina G, enzimas (lactases), fator necrose tumoral, entre outros (BRESOLIN *et al.*, 2003; BAJPAI e TANKHWALE, 2006).

Uma das propriedades mais importante dos alginato é a sua capacidade de formar gel ou precipitado (TONNESEN; KARLSEN, 2002; AMICI *et al.*, 2008) pela reação com cátions divalentes, tais como Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺ (BAJPAI; SHARMA, 2004) ou Zn (CHAN; JIN; HENG, 2002) e cátions trivalentes como Al³⁺ que induzem a gelificação (TONNESEN; KARLSEN, 2002; GEORGE; ABRAHAM, 2006).

Partículas de alginato de cálcio são produzidas pelo método de gelificação ionotrópica e, segundo Peniche e colaboradores (2004), a reticulação do alginato com íons cálcio é estabelecida pelas unidades gulurônicas, sendo que a força e a porosidade das partículas formadas dependem da origem do alginato, da massa molar do mesmo, da concentração do cloreto de cálcio e da dispersão de alginato.

Quando íons polivalentes, como o cálcio, entram em contato com a dispersão de alginato uma membrana inicial é formada na superfície da mesma, separando a solução do eletrólito. Os íons sódio produzidos pela dissociação das macromoléculas da solução de AL migram para a solução de eletrólito através da membrana, por outro lado, os íons cálcio ocupam o espaço dos íons sódio dentro das macromoléculas de alginato (KHAIROU; AL-GETHAMI; HASSAN, 2002), formando então, uma estrutura tridimensional descrita como modelo "egg box" (Figura 3.7) (BAJPAI; TANKHIWALE, 2006).

O sistema geralmente empregado para a obtenção de esferas de alginato de cálcio consiste no método de extrusão, no qual uma solução de alginato de sódio é gotejada através de uma seringa em uma solução de cloreto de cálcio. A microencapsulação exige a utilização de uma agulha de diâmetro bastante pequeno para a produção de cápsulas em dimensões micrométricas, além disso, a substância ativa deve ser misturada à solução de alginato de sódio. A Figura 3.8 exibe um esquema deste processo.



Figura 3.7. Modelo de "egg-box" da gelificação do alginato de cálcio.

No momento em que a gota encontra a solução de cálcio, ocorre o inicio da troca dos íons sódio pelos íons cálcio na estrutura do alginato, processo denominado de gelificação ionotrópica (Figura 3.8). O processo difusional dos íons cálcio para o interior da esfera se dá num tempo chamado de tempo de cura e não é uniformemente distribuído, apresentando uma alta concentração da superfície que gradualmente decresce para o centro da esfera. Isso pode ser explicado pela barreira difusional formada logo na superfície da esfera fazendo com que os íons tenham mais resistência ao atravessar para o centro (DRAGET *et al*, 1997 apud FINOTELLI, 2006).



Figura 3.8. Esquema representativo do método de microencapsulação baseado na propriedade de gelificação do alginato em presença cations di e trivalentes. (FINOTELLI, 2006)

A transformação de solução de alginato em gel é acompanhada pela formação de capilares na direção da difusão entre a troca dos íons. Esses capilares apresentam finos poros, cujos diâmetros dependem de vários fatores, tais como, raio iônico da interdifusão do íon metálico, da concentração da dispersão do alginato, do pH do eletrólito, da orientação das moléculas de água e das cadeias das macromoléculas de alginato, em relação aos íons metais quelados (KHAIROU; AL-GETHAMI; HASSAN, 2002).

Segundo Lucinda-Silva e Evangelista (2005) e Chan, Jin e Heng (2001) a afinidade dos íons cálcio pelo alginato é devido sua capacidade de se ligar a dois monômeros adjacentes de ácido glucorônico na parte interna da cadeia polimérica. Essa ligação se faz necessária para o alginato de cálcio funcionar como uma estrutura para as cápsulas.

Segundo Bajpai e Tankhiwale (2006), quando o alginato é reticulado, através do método de gelificação ionotrópica, com íons bivalentes como cálcio ou bário, este forma partículas mais resistentes e estáveis em condições ácidas, que podem transportar diretamente estes fármacos até o local desejado ou transportar outros sistemas de liberação de fármacos, tal como, os sistemas denominados lipossomas.

Para o desenvolvimento de partículas de alginato para liberação controlada devem-se levar em consideração alguns aspectos que envolvem a estrutura e o mecanismo de ação dos mesmos, como a investigação do comportamento do grau de intumescimento e a subseqüente degradação da matriz em condições gástricas e nos fluídos intestinais (BAJPAI; SHARMA, 2004).

Segundo George e Abraham (2006) estudos demonstram que o tamanho molecular, a estrutura química, a cinética de formação de gel e a presença do íon cátion, como citado anteriormente, promovem um impacto nas várias propriedades funcionais do gel, que incluem comportamento de intumescimento, porosidade, biodegradabilidade, estabilidade, força do gel, características imunológicas do mesmo e biocompatibilidade.

Os diferentes graus de viscosidades dos alginato também parecem influenciar o processo de intumescimento, erosão e o perfil de dissolução do fármaco, demonstrando que alginato de baixa viscosidade provoca uma maior erosão e liberação do fármaco da matriz, ao contrário de formulações contendo alginato de alta viscosidade que exibem uma menor erosão e subseqüente menor liberação do fármaco da matriz (BRESOLIN *et al.*, 2003).

Estudos demonstram que a taxa de liberação de formas farmacêuticas de matrizes de alginatos também é influenciada pela proporção dos resíduos de uronatos

M/G (BRESOLIN *et al.*, 2003), ou seja, segundo Tonnesen e Karlsen (2002) a conformação do ácido gulurônico tem uma alta afinidade com o cálcio formando géis mais firmes, diminuindo então, o grau de intumescimento e erosão do mesmo. Do contrário aumentando o conteúdo do ácido manurônico, o gel se torna mais elástico, mas menos poroso dissolvendo-se muito facilmente (TONNESEN; KARLSEN, 2002). Portanto, assim como a proporção de fármaco/alginato, a concentração do cloreto de cálcio, o pH, a solubilidade do fármaco, seu caráter iônico, a composição do meio e a MM do alginato são fatores que afetam a taxa de liberação das partículas de alginato (BRESOLIN *et al.*, 2003).

3.4.2. Amido octenilsuccinato (amido OSA)

O amido OSA é um amido de milho ceroso enzimaticamente modificado, desenvolvido pela *National Starch and Chemical Corporation* dos Estados Unidos (FINOTELLI, 2002).

A produção de amidos modificados tem se tornando cada vez mais importantes ao desenvolvimento de vários setores industriais, incluindo o setor farmacêutico, o setor têxtil e a indústria alimentícia. A necessidade de materiais biodegradáveis tem influenciado a pesquisa de amidos com novas propriedades funcionais com vistas à substituição de derivados de petróleo em muitas aplicações, tais como em plásticos (DEMIATE, 1999).

As modificações nos amidos podem ser genéticas (ex. amido de milho de alto teor de amilose) ou físico-químicas (ex. amido hidroxipropilado); de modo a proporcionar amidos com propriedades funcionais distintas, para melhor atender as características requeridas nas diversas aplicações em que é usado (SAKANAKA, 2007).

A modificação do amido OSA consiste em acrescentar um componente lipofílico - Succinato de octanil - o que, nas formulações, aumenta a capacidade e a estabilidade de emulsões. A modificação é obtida pela esterificação do amido com o ácido octenilsuccinato anidro resultando, com isso, num amido hidrofobicamente modificado. A Figura 3.9 exemplifica a reação de obtenção do amido OSA (FINOTELLI, 2002; MAIA, 2004; SILVA, 2008).



Figura 3.9. Reação de obtenção do amido OSA (FINOTELLI, 2002).

A presença de grupos hidrofóbicos na estrutura do amido OSA torna este amido menos sensível à água. Além disso, a habilidade de formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias deste amido é reduzida, resultando assim na formação de um filme mais flexível e, apesar de constituir-se em um amido modificado, a biodegradabilidade do amido é mantida (MAIA, 2004).

O amido OSA é utilizado pelas indústrias farmacêutica e alimentícia com aprovação do FDA como um aditivo alimentar desde que o conteúdo de octenilsuccinato não exceda 3% (MAIA, 2004; BASTO,2007). Dentre os polímeros utilizados em dispositivos de liberação de fármacos, o amido ocupa posição de destaque, por apresentar baixo custo e ser um biopolímero natural que pode ser metabolizado pelo corpo humano. Além disso, é relativamente inerte e não reage com muitas substâncias ativas medicamentosas. Estas propriedades favorecem sua utilização na obtenção de produtos farmacêuticos (CASAS *et al.*, 2009).

3.4.3. Carboximetilcelulose

O carboximetilcelulose sódico é um polímero derivado da celulose, sendo esta um polímero natural abundante, basicamente composto por unidades de glicose unidas por ligações β (1-4), sem ramificações. Os derivados iônicos da celulose como a carboximetil celulose sódica (CMCNa) vem se destacando na preparação de sistemas microparticulados para liberação controlada.

A CMCNa é um carboximetil éter de celulose, apresenta elevada solubilidade em água, seu pKa é 4,52 e pode ser degradado por celulases (DARVARI e HASIRCI, 1996), presentes em abundância na natureza. Devido a estas características, a CMCNa é uma ótima alternativa para formação de matrizes biodegradáveis (DARVARI e HASIRCI, 1996). A carboximetilcelulose (CMC) é obtida a partir da modificação da celulose por meio de reação com álcali e ácido cloroacético, havendo a substituição de grupos funcionais por grupamentos carboximetílicos (FEDDERSEN & THORP, 1993). Dependendo do grau de substituição e de polimerização, são produzidos materiais com variada solubilidade e viscosidade (WARING & PARSONS, 2001). Na Figura 3.10 é demonstrada a estrutura de CMC.



Figura 3.10. Fórmula estrutural da carboximetilcelulose de sódio (CMCNa) (WARING & PARSONS, 2001).

A CMC é largamente utilizada em diversas indústrias, como a têxtil, farmacêutica, química e de alimentos. Sua aplicabilidade se dá em função de suas propriedades funcionais gelificante, emulsificante, estabilizante e formadora de filmes. Na indústria farmacêutica, é normalmente utilizada para promover maior solubilidade a drogas hidrofóbicas (FEDDERSEN & THORP, 2007). Além disso, existem relatos sobre seu uso na imobilização de células (ULUDAG, DE VOS & TRESCO, 2008) e enzimas (DALLA-VECCHIA et al, 2005).

3.4.4. Pectina

A pectina constitui um grupo complexo de polissacarídeos aniônicos que ocorre em diversas espécies vegetais, principalmente nas paredes celulares e nas camadas intercelulares das plantas terrestres. Geralmente, encontra-se associada à celulose, hemicelulose e lignina em frutos e tecidos jovens e macios, contribuindo para a manutenção da estrutura, textura e sustentação das plantas (MAY, 1999).

Entre as diversas fontes comerciais de pectina existentes, destacam-se o bagaço das frutas cítricas (25% da matéria seca) e o bagaço seco da maçã (15-18% da matéria

seca), nos quais a extração é conduzida sob condições ácidas ou básicas com posterior deslignificação pelo tratamento com cloreto de sódio (MARUDOVA et al., 2004).

A aplicação mais conhecida desta matéria-prima é como agente espessante e gelificante na produção de diversos alimentos como geléias, sucos de frutas e produtos lácteos (THAKUR et al., 1997). Entretanto, características como biocompatibilidade e a não-toxicidade também permitem que a pectina esteja sendo crescentemente utilizada nas áreas farmacêutica e biotecnológica, com destaque para o uso em sistemas de liberação controlada de princípios ativos (LIU et al., 2007).

Quimicamente, a pectina apresenta-se como um complexo heterogêneo e sua composição, assim como o alginato, varia com a fonte, com as condições em que a planta esteve exposta e com as condições aplicadas durante sua separação e purificação.

Suas moléculas são constituídas de uma cadeia principal linear de resíduos do ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas do tipo a (1,4), cujos grupos carboxílicos podem estar parcialmente esterificados por metoxilas (Figura 3.11). As cadeias de resíduos galacturonato são, porém, interrompidas por unidades de L-ramnose, às quais estão ligadas cadeias laterais, formadas por açúcares neutros. Estas cadeias laterais são responsáveis pela união das moléculas da pectina à matriz da parede celular vegetal e sua presença depende principalmente da fonte e do método de extração utilizado. Embora o ácido D-galacturônico seja o principal constituinte das pectinas, outros açúcares como D-galactose, D-xilose, L-arabinose, L-fucose, também podem ser encontrados em proporções variáveis (WILLATS *et al.*, 2006).



Figura 3.11. Estrutura química da cadeia da pectina.

3.4.5. Maltodextrina

A maltodextrina tem sido utilizada para o microencapsulamento de diferentes compostos. A associação da maltodextrina com outros materiais, como proteínas, amidos e gomas, na composição de matrizes, demonstrou melhor retenção dos compostos encapsulados pela formação de cápsulas mais homogêneas e lisas do que quando a mesma foi utilizada de forma isolada (ROSENBERG *et al.*, 1985; CARDELLO & CELESTINO, 1996; SHEU & ROSENBERG, 1998).

Maltodextrinas são polímeros de D-glicose (Figura 3.12), produzidas por hidrólise ácida ou enzimática de amido de milho. São conectadas, primariamente, por ligações α 1,4, tendo DE inferior a 20. O termo DE (equivalente de dextrose) é uma medida do conteúdo de açúcares redutores, expressa como glicose. A dextrose possui DE 100 e o amido, DE 0 (zero). À medida que aumenta o DE, aumenta a redução do ponto de congelamento, higroscopicidade, osmolaridade, solubilidade, doçura relativa e habilidade de promover escurecimento ("browning"). Por outro lado, dextrinas de menor DE promovem inibição de cristalização, aumentam a viscosidade (corpo) e a adesividade (CHRONAKIS, 1998).



Figura 3.12. Polímero de maltodextrina.

3.4.6. Isolado protéico de ervilha (IPE)

As proteínas oriundas de sementes de leguminosas, têm sido amplamente investigadas no que diz respeito as propriedades funcionais e bioativas, importantes para desenvolvimento de novos produtos alimentíceos e para a saúde humana (ZAPATA-REVILLA et al., 2008).

As propriedades funcionais presentes nas proteínas de leguminosas, como soja, lentilha, ervilha e feijão-caupi, entre outros, inclui o elevado peso molecular, a solubilidade numa vasta intervalo de pH, a viscosidade, a gelificação, potente ação emulsificante e boa capacidade de formação e estabilidade de espumas. Essas propriedades caracteriza as proteínas como de grande aplicabilidade na indústria de alimentos (RANGEL *et al*, 2003)

O isolado protéico de ervilhas é um material obtido a partir de ervilhas amarelas (*Pisum sativum*), que possui alto teor em proteínas. Devido ao seu baixo conteúdo em fatores antinutricionais e à sua propriedade não alergênica, o IPE tem sido utilizado como alternativa para a fortificação em diversos tipos de alimentos e produtos farmacêuticos (SCHWENKE, 2001).

Dentre as proteínas que compõem o IPE, a vicilina é a mais abundantemente encontrada, sendo também conhecida por globulina 7S. Com pK 5,5, a vicilina possui estrutura formada por três subunidades de 50 kDa unidos entre si por interação polar, sendo que cada subunidade possui dois domínios β -preguedos conectados por α -hélices (PIERUCCI, 2005). A estrutura tridimensional da vicilina pode ser observada na Figura 3.13.



Figura 3.13. Estrutura molecular tridimensional da vicilina de ervilhas amarelas *Pisum sativum* (PIERUCCI, 2005).

O potencial da vicilina, como agente microencapsulante de substâncias ativas na área de alimentos, já esta sendo explorado. Pereira et al. (2009) utilizou isolado proteico obtido das ervilhas *Pisum sativum* e *Vigna unguiculata* em combinação com maltodextrina como material de parede para microencapsulamento de ácido ascórbico. As micropartículas foram obtidas por *spray drying* e a eficiência de encapsulamento foi de 69%.

Pierucci et al (2006 e 2007) utilizaram o concentrado proteico de ervilha (com 82% de proteína) obtido a partir de ervilhas amarelas (*Pisum sativum*) e maltodextrina como material de parede para o encapsulamento por *spray drying* do ácido ascórbico e tocoferol. Foi obtido uma porcentagem de retenção de 95,88% para o ácido ascórbico nas micropartículas e 77,8% para o tocoferol.

3.4.7. Polilisina

A polilisina é um polímero formado de lisinas (Figura 3.14), um aminoácido com cadeias laterais carregadas positivamente (grupo amina) em pH neutro (KADLECOVA et al., 2013)



Figura 3.14. Fórmula estrutural da molécula de lisina.

A polilisina pode ser usada para a preparação de vários complexos polieletrólitos com poliânions naturais como carboximetilcelulose, heparina, alginato, carragenana e hialuronato (SANTOS et al, 2012).

O complexo polilisina/alginato é estabelecido pela forte interação eletrostática dos grupos amino da polilisina com os grupos carboxilas do alginato (Figura 3.15). Devido à protonação do grupo amino da polilisina e a ionização do grupo ácido carboxílico do alginato, a estabilidade do complexo polilisina/alginato pode ser influenciada por parâmetros como pH e força iônica.

Complexos polilisina/poliânion têm sido investigados para aplicações em liberação de fármacos, transplante de células, imobilização de enzimas. A principal aplicação do complexo polilisina/alginato, descrito na literatura, é no microencapsulamento de células (MA et al., 2012), como estratégia terapêutica no tratamento de diversas doenças como: diabetes (ELLIOT et al., 2007), regeneração de ossos (ENDRES et al., 2010), lesão de medula espinhal (TOBIAS et al, 2005), dentre outras.



Figura 3.15. Sistema alginato/polilisina.

3.4.8. Quitosana

A quitosana (Figura 3.16) é um polissacarídeo constituído de copolímeros de glicosamina e N-acetilglicosamina e pode ser derivado da desacetilação parcial da quitina proveniente da casca de crustáceos (SOUZA, 2009). A quitosana é considerada uma base fraca e é insolúvel em água, bases, álcool e acetona, porém dissolve-se em soluções ácidas diluídas de ácidos orgânicos, como o acético, fórmico e cítrico, além de ácidos inorgânicos como o ácido clorídrico diluído, resultando em soluções viscosas. A solubilidade da quitosana em soluções ácidas converte a unidade glicosamina em grupos protonados (-NH³⁺) (NGAH et al., 2005).



Figura 3.16. Estrutura da quitosana

A utilização da quitosana é interessante devido a ela ser um produto natural, de baixo custo e renovável, além de ser biocompatível, biodegradável e atóxica. A quitosana pode ser quimicamente modificada e ser processada em diferentes formas como soluções, filme, blendas e como sistemas de liberação controlada de fármacos (AZEVEDO et al., 2007).

O emprego da quitosana e a pesquisa por novas aplicações têm aumentado em diversas áreas, como na agricultura e indústria de alimentos, além das indústrias farmacêuticas e no desenvolvimento de vacinas. O polímero é vastamente utilizado na literatura como meio complexante de íons metálicos, na formação de coberturas com ação antifúngica e bactericida, como elemento básico para a confecção de matrizes de liberação controlada de drogas e como um agente ativo no emagrecimento humano, pois interage com gorduras (GULIYEVA et al., 2010).

A quitosana, da mesma forma que a polilisina também pode formar um complexo com o alginato, sendo o complexo quitosana/alginato o mais utilizado para sistemas de liberação de fármacos (FRIEDE e AGUADO, 2005).

Sua maior aplicação, atualmente, está na área biomédica, a qual tem evoluído muito nas últimas três décadas, como biomateriais, em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, liberação controlada de fármacos em animais e humanos (PARK et al., 2012).

A utilização como sistemas de liberação de fármacos (Drug-delivery systems) surgiu desde a década de 1980 e representa biomateriais utilizados como agente facilitador na entrega de drogas sistêmicas e locais, capaz de proporcionar uma taxa de liberação controlada e prolongada da droga com o mínimo de efeito colateral. A quitosana, por ser um material seletivamente permeável, surgiu como bom candidato a meio de liberação controlada de medicamentos no meio gastrintestinal e na mucosa oral.

Foi proposto utilizá-la como material para a liberação de antibióticos para a redução bacteriana local em aplicações orais (RAVI KUMAR, 2000; TAKEUCHI et al., 2003).

3.5. Estado da arte: Encapsulamento de penicilina G

Desde a sua descoberta na década de 20, diversos estudos vêm sendo realizado na tentativa de aprimorar a administração da penicilina, em suas diversas formas farmacêuticas (BENTLEY, 2005).

Em 1949, Hinds e Oreg avaliaram uma forma oral de administração da penicilina. Estes autores avaliaram diferentes óleos e ceras como carreadores da penicilina para o encapsulamento em cápsulas de gelatina. Os resultados mostraram que a cera de jojoba foi mais efetiva em proteger a penicilina contra oxidação e demais desintegração antes da administração. Com o mesmo objetivo, Khan et al., (1978) avaliaram o encapsulamento da penicilina por leito fluidizado, obtendo grânulos para administração oral. Materiais como sacarose, carboximetilcelulose e amido foram utilizados como excipientes.

Apesar de diversos esforços para formular uma composição para encapsulamento da penG para administração oral, a penicilina apresenta baixa absorção no trato gastrintestinal. Segundo Brunton et al (2007) cerca de 33% de uma dose de penG por via oral sofrem absorção pelo trato intestinal em condições favoráveis. O suco gástrico com pH 2,0 destrói rapidamente o antibiótico. Embora a administração oral apresente maior conveniência, essa via só deve ser utilizada em infecções nas quais a experiência clinica tenha comprovado a sua eficácia.

A penicilina V (fenoximetilpenicilina), uma forma semi-sintética da penicilina, foi desenvolvida com intuito de aumentar a estabilidade da penicilina ao meio ácido e aumentar a porcentagem de absorção em 2 a 5 vezes mais que a penicilina convencional. Além da penicilina V outras formas foram desenvolvidas como a amoxicilina, ampicilina, oxacilina (BRUTON et al, 2007). Em 2006, a COMARE (Comissão Técnica e Multidisciplinar de Atualização da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais) recomendou a exclusão de fenoximetilpenicilina potássica, levando em conta o critério de conveniência para o paciente, pois apesar do uso por via oral, seu esquema de administração exige quatro administrações diárias, a intervalos de 6 horas, em cursos de tratamento de 10 dias, acarretando em abandono de tratamento (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/fenoximetilpenicilina_potassica.pdf, 2011).

A penG vem sendo administrada em dose única através de injeções desde 1953, quando foi desenvolvido uma suspensão aquosa intramuscular de penG (GAUNT *et al*, 1953). Porém, o desconforto associado à inconveniência deste tipo de dispositivo de administração tem levado pacientes a negligenciarem e até mesmo desistirem da terapia.

Trabalhos recentes sugerem a encapsulação de penG em matrizes biodegradáveis. Microesferas contendo PenG vêm sendo preparadas a partir de diferentes polímeros, como o copolímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), (PLGA) (SANTOS-MAGALHÃES et al, 2000); o dendrímero *poli(amidoamina)* (PAMAM) (YANG e LOPINA, 2003), *Poli butil adipato* (PBA) (KHOEE e YAGHOOBIAN, 2008); poliacrilato (TUROS et al, 2007); fosfolipídeo (SCHAEFFER & KROHN TUROSA e REDDY, 2006)

Santos-Magalhães et al. (2000) prepararam nanocápsulas de penG em matriz de PLGA, e analisaram as características físico-químicas, estabilidade e cinética de liberação *in vitro*. As nanocápsulas de PLGA foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado. Foram obtidas nanocápsulas com diâmetro de 224 ± 58 nm, mantendo a estabilidade por 120 dias a 4°C. A eficiência de encapsulação atingida para a penG nessa matriz foi de 85%. Os estudos de liberação *in vitro* mostraram que a penicilina foi 100% liberada em 150 minutos, seguindo cinética de ordem zero.

Dendrímeros de polietilenoglicol (PEG) e PANAM (Starburst[®]) contendo penicilina V foram desenvolvidas por Yang e Lopina (2003). O sistema de liberação baseado em PEG-PANAM como polímero apresentou uma eficiência de retenção da penicilina V de 41%.

Khoee e Yaghoobian (2008) avaliaram o papel de diferentes surfactantes no tamanho de partícula de nanocápsulas de polibutil adipato contendo penG pelo método da dupla emulsão e evaporação do solvente, usando diclorometano como solvente orgânico e tween e span como surfactantes. Neste processo, mistura de glicerina e água foi usado como sistema de preparação da dupla emulsão. O diâmetro médio das nanocápsulas de penG variou de 75 nm a 638 nm, dependendo do tipo e quantidade de surfactante. A eficiência de encapsulação foi de 76,8% com o aumento da quantidade de span e tween. Os estudos de cinética de liberação mostraram que 75% da penG foi liberada em 40 horas em meio de dissolução.

TUROS et al. (2007) prepararam e caracterizaram nanopartículas de poliacrilato contendo penG covalentemente ligado ao polímero. As nanopartículas foram preparadas em água pelo método da polimerização em emulsão com um análogo de penG acrilada pré-dissolvida em uma mistura (7:3) de butilacrilato e estireno na presença de dodecil de sódio. Análises pela técnica de espalhamento de luz dinâmico e microscopia de força atômica mostraram que a emulsão continha nanopartículas de aproximadamente 40 nm

de diâmetros. Testes antimicrobianos mostraram que as nanopartículas contendo penicilina foram capazes de inibir espécies de *Staphylococcus aureus*.

Schaeffer e Krohn (1999) desenvolveram lipossomas de fofatidil colina em conjugação com colesterol contendo penG, com o objetivo de aumentar a penetração do antibiótico nas córneas. Os lipossomas foram preparados de acordo com o método modificado de Anselem et al., (1993), baseado na formação do filme lipídico obtido com a evaporação em fase reversa. A porcentagem de encapsulamento foi de 70%.

3.6. Sistemas de liberação controlada de fármaco

Historicamente, as primeiras tentativas de se modificar a liberação de um fármaco foram realizadas quando se revestiam pílulas para mascarar o sabor desagradável dos fármacos. Entre 1940 e 1950, surgiram os primeiros sistemas de liberação modificada, representados por formas farmacêuticas que permitiam a liberação de parte do fármaco no estômago e parte no intestino. Tais medicamentos eram sensíveis à variáveis fisiológicas.

Em 1952, surgiu uma das primeiras formas farmacêuticas de ação prolongada, o Spansule®, da empresa Smithkline Beecham (RATNER, 1996). O medicamento consistia de uma cápsula gelatinosa dura, contendo grânulos esféricos de colorações diferentes, correspondendo a revestimentos diferentes. Usando revestimentos de espessuras diferentes, tempos de dissolução poderiam variar, prolongando a ação do agente terapêutico. Estes revestimentos permitiram a liberação inicial da dose terapêutica necessária, seguida da liberação de doses menores, por um período de 10-12 horas. Entretanto, a funcionalidade de tais produtos depende do ambiente externo que varia muito de paciente para paciente. Por esta razão a partir da década de 60, muitos esforços foram realizados com o objetivo de desenvolver produtos que são capazes de liberar drogas por cinéticas reproduzíveis e previsíveis. Idealmente, tais produtos não são significativamente afetados pelo ambiente externo, de modo que a variabilidade de paciente para paciente é reduzida.

Ao longo das últimas décadas, o campo de liberação controlada de drogas experimentou um acelerado desenvolvimento, com diversas organizações (como a CRS, Controlled Release Society) e jornais científicos (como o Advanced Drug Release) especificamente dedicados a este tema. Além disto, alguns textos cobrindo este tópico são encontradas na literatura (CHIEN, 1992, RANADE, 2003, ANSEL, 1999). Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas e aplicadas para se promover uma liberação controlada do fármaco, com o objetivo de regular a sua velocidade de liberação, manter

seu nível terapêutico constante por um maior período de tempo (processo conhecido como liberação de ordem zero), além de direcionar sua ação a um tecido específico.

À parte da clara vantagem terapêutica dos produtos deliberação controlada, há também outras razões convincentes para o desenvolvimento de tais dispositivos. Os regulamentos da U.A. Food and Drug Administration (FDA) estão cada vez mais rigorosos e, dessa forma, o custo para introduzir novas drogas no mercado é de aproximadamente 150 milhões de dólares para cada droga. Além disso, o tempo necessário para o desenvolvimento de tais drogas é longo e requer aproximadamente dez anos de pesquisa e desenvolvimento de trabalho. Assim, é razoável para as companhias farmacêuticas tentar maximizar seu retorno financeiro para cada droga pesquisada, estendendo o tempo de vida da droga. Uma maneira de fazer isto é desenvolver uma formulação de liberação controlada de fármacos (RATNER, 1996).

Por definição, o termo "sistema de liberação de fármacos" refere-se à tecnologia utilizada para otimizar a liberação de um fármaco, onde o princípio ativo deve ser liberado e/ou absorvido, melhorando a resposta terapêutica (ANSEL, 1999). Os tratamentos convencionais utilizados para combater processos infecciosos (soluções, suspensões, pílulas, entre outros) requerem uma administração por um longo período de tempo, visando manter os níveis terapêuticos do fármaco no organismo. Muitas vezes, tais níveis não são alcançados, pois o tratamento não exibe resultados ou apresenta efeitos colaterais devido à alta concentração do fármaco. A manutenção da concentração do medicamento na corrente sangüínea, dentro da faixa terapêutica do medicamento, leva à redução no número de doses requeridas e ao aumento na eficácia do tratamento, pois desta forma diminui a possibilidade de alcançar níveis tóxicos ou subterapêuticos (MISHRA *et al*, 2010).

A Figura 3.17 ilustra a comparação entre o método convencional de multidosagem e o sistema de liberação controlada. Com sistemas convencionais tais como comprimidos ou injeções, o nível da droga no sangue segue o perfil mostrado na Figura 3.17 (a), no qual a concentração aumenta após cada administração da droga e então diminui até a próxima administração, proporcionando variações consideráveis na concentração do fármaco no plasma sangüíneo, podendo não haver efeito farmacológico ou ocasionar intoxicação, pois há uma faixa de concentração efetiva para a ação no organismo. Em sistemas com liberação controlada de drogas, projetado para administração por um período maior, o nível da droga no sangue segue um perfil mostrado na Figura 3.17 (b), permanecendo constante entre o máximo e mínimo desejado por um longo período de tempo e proporcionando uma pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, impossibilitando, dessa forma, inefetividade ou toxicidade.



Figura 3.17. Concentração de uma droga modelo no sangue com (a) dosagem tradicional da droga e (b) dosagem com liberação controlada.

As Tabelas 3.2 e 3.3 apresentam, respectivamente, vantagens e desvantagens na utilização dos sistemas para liberação controlada de fármacos (ANSEL et al., 1999).

Dentro do sistema de liberação controlada, a liberação do fármaco pode ocorrer por diferentes mecanismos: a) Sistemas difusivos, onde a liberação do fármaco é feita pela sua difusão através da membrana polimérica; b) Sistemas erosivos, onde a liberação se baseia na degradação do polímero; c) pela combinação dos dois sistemas, onde pode ocorrer a difusão e a biodegradação do polímero. Em ambos mecanismos, o polímero tem um papel-chave na disponibilidade e liberação do fármaco. Esses mecanismos podem ocorrer por ação de hidrólise ou de enzimas (MAIA, 2004).

Em situações ideais, a liberação de agentes ativos pode seguir cinética de orem zero, de primeira ou segunda ordem. Na prática, nem sempre as condições ideais são observadas, demonstrando a complexidade da questão (POTHAKAMURY & BARBOSA-CÁNOVAS, 1995). Por isso, variados modelos matemáticos foram desenvolvidos com o propósito de caracterizar o perfil cinético de liberação de diversas formas de dosagem farmacêuticas. O primeiro modelo proposto foi o de Higuchi (1963), o qual descreve a liberação do ativo como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Este modelo, até hoje, é o mais utilizado para modelagem cinética da liberação de

fármacos, podendo ser aplicado para avaliação de sistemas matriciais homogêneos esféricos, granulosos planos ou granulosos esféricos. Baker & Lonsdale (1974) incorporaram ao modelo de Higuchi (1963) parâmetros geométricos de matrizes esféricas, e seu modelo tem sido utilizado para linearizar resultados de ensaios de liberação de microesferas e microcápsulas.

VANTAGENS	COMENTÁRIOS
Comodidade para paciente	Dessa forma não é responsabilidade do paciente a administração de sua medicação evitando, assim na administração do medicamento.
Melhor eficiência do tratamento	Controlando a taxa de liberação do fármaco, as flutuações da concentração sangüínea são reduzidas.
	Tratamento mais rápido e eficaz.
Econômico	Embora o custo inicial do sistema de liberação controlada de fármaco seja mais elevado que o das formas convencionais, o custo médio do tratamento em períodos prolongados é menor. Com a menor freqüência das doses, o benefício terapêutico é ampliado e os efeitos colaterais reduzidos, o tempo dispensado pelos profissionais de saúde no atendimento, administração e monitorização dos pacientes fica reduzido.
Menor quantidade de fármaco utilizado	Redução dos efeitos colaterais, pois o fármaco estaria sempre na faixa terapêutica.
	Redução do acúmulo de fármaco em tratamentos prolongados.

Tabela 3.2. Vantagens potenciais da utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos.

Tabela 3.3. Desvantagens potenciais da utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos

DESVANTAGENS

- Risco de acumulação, se a velocidade de eliminação é lenta

- Dificuldade de interromper o tratamento rapidamente no caso de intoxicação grave ou intolerância

- Custos iniciais mais elevados que os das formas convencionais.

- Variabilidade biológica relativa às velocidades de absorção, biotransformação ou eliminação gerando efeitos tóxicos.

- A cinética de liberação depende da integridade da forma farmacêutica.

Outro modelo baseia-se na equação semiempírica proposta por Korsmeyer *et al.* (KORSMEYER; PEPPAS, 1981; KORSMEYER *et al.*, 1983). Essa equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas).

Recentemente, outros modelos cinéticos foram desenvolvidos com a inclusão de parâmetros estruturais específicos obtidos experimentalmente, como a medida de porosidade. Contudo, muitos destes modelos ainda encontram-se em fase de validação (LAMAIRE, BÉLAIR & HILDGEN, 2003).

3.7. Conceitos gerais e bioquímica da dor

Em 1986, após sucessivas tentativas, a *International Association for the Study of Pain* (IASP) definiu a dor como "uma experiência sensorial e emocional desagradável, que é associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões" (MENEZES, 2004). A dor, portanto é uma experiência complexa que envolve não somente a transdução de um estímulo ambiental nocivo como também seu processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (JULIUS E BASBAUM, 2001).

Apesar de existir uma tendência a se imaginar a dor como uma entidade sensorial homogênea, ela existe como diferentes tipos: nociceptiva, inflamatória, neuropática e funcional. A dor nociceptiva é uma sensação fisiológica vital, com a função de proteção. Contudo, se um dano tecidual vem a ocorrer a despeito do sistema defensivo nociceptivo, torna-se imperativo que o corpo priorize a promoção da cura do tecido lesionado em detrimento à proteção contra os estímulos nocivos. A dor inflamatória surge de forma complementar a esse objetivo. Nesse estado, a sensibilidade no local afetado é aumentada, de modo que estímulos que antes não provocariam dor, agora provocam. Como resultado, há tendência de se prevenir o contato ou movimentação do tecido lesionado, minimizando danos adicionais até que o processo de reparo esteja finalizado. Assim, a dor inflamatória tipicamente se reduz conforme a lesão e a resposta inflamatória também diminuem. A dor pode ser ainda, oriunda da lesão ou disfunção de um nervo (dor neuropática) ou da atividade anormal do sistema nervoso (dor funcional) (WOOLF, 2004).

A experiência sensorial da dor aguda, causada por um estímulo nocivo é mediada por um sistema sensorial especializado de alto limiar, o sistema nociceptivo. Esse sistema se estende desde a periferia, passando através da medula espinhal (ME), tronco central e tálamo até o córtex cerebral, onde a sensação é percebida (WOOLF, 2004).

Em 1906, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário que é ativado por estímulos capazes de causar dano tecidual. De acordo com esse modelo, nociceptores possuem limiares ou sensibilidades características que os distinguem de outras fibras nervosas sensoriais (JULIUS & BAUSBAUM, 2001). O termo nocicepção, por sua vez, foi introduzido por Sherrington com o intuito de diferenciar a percepção de estímulos nocivos da sensação de dor propriamente dita.

Nesse sentido, a dor é uma sensação complexa e, muitas vezes subjetiva, incluindo componentes afetivos, culturais e psicológicos, enquanto que a nocicepção é caracterizada pela estimulação das fibras aferentes primárias que transmitem o impulso nociceptivo até o sistema nervoso central (SNC) (DUBNER & BENNETT, 2006).

No que se refere ao emprego de animais como modelo experimental de dor, é mais adequada a utilização do termo nocicepção, visto serem eles incapazes de verbalizar os componentes subjetivos da experiência dolorosa. Assim, tem sido proposto que termos como dor e analgesia sejam mais apropriadamente empregados para seres humanos, enquanto nocicepção e antinocicepção sejam mais adequados para animais (KLAUMANN et al., 2008). Todavia, por convenção, o termo "dor" é usualmente empregado tanto para pacientes humanos quanto animais (HELLEBREKERS, 2002).

O componente fisiológico da dor, ou seja, a nocicepção compreende os processos de transdução, transmissão, percepção e modulação dos sinais neurais gerados em resposta ao estímulo nocivo. De forma simplificada, é um sistema que pode ser considerado como uma cadeia de três neurônios: o neurônio de primeira ordem se origina na periferia e se projeta a ME; o neurônio de segunda ordem ascendente pela ME; e o neurônio de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral (TRANQUILLI, 2004) (Figura 1).

O ponto inicial da seqüência de eventos que desencadeia o fenômeno sensitivo doloroso é a transformação dos estímulos ambientais físicos ou químicos intensos em potenciais de ação, que das fibras nervosas periféricas são transferidos para o SNC (BASBAUM, 2009).

A percepção da dor inicia-se na periferia pela ativação dos nociceptores, a qual ocorre por diferentes fatores: estimulo por substancias algogênicas, liberadas pelas células dos tecidos lesados ou inflamatórias – mastócito, macrófago e linfócitos – em situações de trauma, isquemia ou inflamação; liberação retrógada de neutransmissores pelas fibras nervosas; e influencias noradrenergicas, procedentes de eferencias simpáticas, resultando em atividade generalizada das fibras nervosas envolvidas (MENEZES, 2004).

De forma geral, os canais iônicos de cálcio ou sódio transdutores presentes nas fibras aferentes de primeira ordem são controlados por voltagem, por temperatura, substâncias químicas ou forças mecânicas. Uma vez ativados, os canais se abrem, permitindo o influxo de sódio e cálcio no terminal do nociceptor periférico, produzindo, dessa forma, uma corrente que despolariza a membrana (MOURA, 2011).

Segundo Costigan & Woolf (2000), as fibras aferentes de primeira ordem podem ser classificadas de acordo com sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução. As fibras A β são mielinizadas, com diâmetro maior que 10 µm e velocidade de condução de 30-100 m.s⁻¹. As fibras aferentes A δ , por sua vez, são pouco mielinizadas, variando em seu diâmetro entre 2,0-6,0 µm e tem velocidade de condução de 12-30 m.s⁻¹. Fibras não mielinizadas do tipo C possuem diâmetro entre 0,4-1,2 µm e mostram uma velocidade de condução de 0,5-2,0 m.s⁻¹ (Figura 3.18).

Uma vez liberada a energia química, mecânica ou térmica é convertida pelos nociceptores em impulsos neurais, em um processo conhecido como transdução. Substancias químicas e enzimas são liberadas pelos tecidos afetados, aumentando a transdução do estímulo doloroso (FERREIRA, et al., 2005). Bradicininas, acetilcolina, prostaglandinas (PGs), histamina, serotonina, leucotrienos, substancias P, tromboxano, fator de ativação plaquetária, radicais ácidos, íons potássio e citocinas são algumas destas substancias até o momento identificadas que, em contato com os nociceptores, reduzem seu limiar aos estímulos nociceptivos nos locais de libração (MENEZES, 2004). Adicionalmente, as células lesadas liberam enzimas em seu interior que, através da ativação de diferentes substancias, levam a uma intensa dilatação arteriolar e ao aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para que o processo inflamatório se perpetue.

Como resultado da liberação destes fatores químicos e sensibilização dos nociceptores, estímulos de baixa intensidade passam a ser interpretados como dolorosos. Esta série de eventos que se segue a uma lesão tecidual é conhecida como sensibilização periférica. O resultado final da sensibilização dos nociceptores é o aparecimento de hiperalgesia, ou seja, uma resposta exagerada aos estímulos dolorosos e alodínia, dor em resposta a um estímulo mecânico ou térmico, normalmente não doloroso. Os dois principais trajetos sensoriais ascendentes da medula espinhal envolvidos na transmissão da dor são o sistema espinotalâmico e o sistema espinoreticular (GUYTON & HALL, 2002). De acordo com Gozzani (2004), as fibras aferentes nociceptivas sintetizam uma diversidade de substâncias potencialmente envolvidas na transmissão central e na modulação da informação. Essas incluem o glutamato e outros aminoácidos excitatórios; neuropeptídeos, como a substancia P e o

peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); adenosina trifosfato (ATP); óxido nítrico (NO), os metabólitos fosfolipídicos, PGs e neurotrofinas.



Figura 3.18. Mecanismo da dor. ¹trato neoespinotalamico; ²trato paleoespinotalamico; ³tratoespinoreticular; ⁴nucleo talâmico intralaminar; ⁵ nucleo talâmico ventroposterolateral. **A**. a estimulaão das fibras C produz dor espontânea e hiperalgesia primária. Adicionalmente, uma área de alodinia e hiperalgesia secundária fora da região d lesão primária é produzida no SNC, como consequência do trafego de impulsos aferentes nociceptivos. **B**. Quando ativados, os nociceptores conduzem os impulsos até a ME via fibras A δ e C. Fibras A β podem se tornar sensibilizadas por mecanismos específicos do SNC para produzir alodinia. **C**. Quando áreas o tálamo e córtex cerebral são ativados, projeções secunárias no trato espinotalamico, no trato a coluna orsa e outras vias nociceptivas levam a percepção consciente da dor. (MOURA, 2011)

O processo através do qual os neurônios do CDME se tornam sensibilizados por estímulos nocivos prévios é frequentemente referidos como *Wind-up* ou sensibilização central. Tal fenômeno implica alterações dos impulsos periféricos, com adaptações

positivas ou negativas. Ocorre, assim, redução do limiar e aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do CDME (GOZZANI, 2004).

Quanto a modulação da dor, o próprio organismo lança mão de artifícios a fim de superar a sensação dolorosa. É o que ocorre com os glicocorticóides produzidos pelas supra-renais, que inibem vários eventos do processo inflamatório como a produção e ação de citocinas, produção de eicosanaóides e de componentes do complemento no plasma (RANG et al., 2004).

Outro exemplo é a modulação por peptídeos opióides, que ativam receptores específicos produzindo antinocicepção, e quando experimentalmente bloqueados, aumentam a hiperalgesia inflamatória em ratos (SUN *et al.*, 2003). A ligação dos opióides aos neurônios provoca analgesia de duas formas: causando a hiperpolarização das membranas, devido ao aumento da condutância ao K⁺ ou diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios, devido à inibição de canais de Ca²⁺ ativados por voltagem (RANG et al., 2004).

4. METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

4.1. Materiais

Os materiais utilizados no trabalho foram:

• Penicilina G sódica, Sigma-Aldrich; (Fluka e Science Lab, US);

• Alginato de sódio (Keltone[®] LV) - Apresenta uma proporção de ácido manurônico e ácido gulurônico (M/G) entre 0,4 e 1,9. Segundo o fabricante, uma solução de alginato de sódio 2 % (m/v) em água tem uma viscosidade a 25°C e 60 rpm (spindle no. 2) de 100-300 mPa.s determinado pelo viscosímetro Brookfield modelo LV.;

- Maltodextrina (Mor Rex 1910, da Corn Products Brasil[®]);
- Carboximetilcelulose (Latinoquímica Argentina[®]);
- Amido octenilsuccinato (OSA) Capsul[®] (National Starch[®]);
- Cloreto de cálcio e cloreto de zinco (Vetec[®]);
- Pectina (GENU[®] tipo USP, grau de esterificação de 68%).
- Quitosana, Sigma-Aldrich; (Fluka e Science Lab, US);
- Polilisina 0,1% Sigma-Aldrich;
- Ácido acético e acetato de sódio –VETEC;
- Fosfato de potássio monobásico (KH2PO4) Quimibrás;
- Ester de Cianocrilato (Super Bonder[®]);
- Membrana de acetato e nitrato de celulose, Millipore[®];
- Membrana Danish Separation System[®](DSS).

O isolado protéico de ervilha (IPE) foi gentilmente cedido pela Professora Anna Paola Trindade Rocha Pierucci do Instituto de Nutrição da UFRJ.

4.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente trabalho estão relacionados a seguir:

• Centrífugas Fanem modelo 204-NR e Eppendorf modelo 5804R;

- Espectrofotômetros Hach modelo DR/4000 UV e Shimadzu modelo UV-1800;
 - Ultrafreezer CL120-80V;
 - Liofilizador Terroni Enterprise I;
 - Balança analítica Ohaus Adventurer;
 - Banho termostatizado Tecnal TE-2005;
 - Sistema de água ultrapura Millipore Simplicity;
 - Banho de ultrassom Odontobras 2840D (40 kHz);
 - Estufa de secagem Quimis;
 - Difratômetro modelo X'Pert PRO (PANalytical);
 - Microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JSM-5310;
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Waters 1525 HPLC
 - Analgesímetro digital (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil).

4.3. Avaliação de diferentes materiais de parede para encapsulamento da penicilina G

Nesta etapa inicial, foram avaliados seis diferentes biopolímeros como materiais de parede para encapsulamento da penG. Dentre os biopolimeros utilizados estão a maltodextrina, amido OSA, carboximetilcelulose (CMC), isolado protéico de ervilha (IPE), pectina e alginato de sódio.

As esferas contendo penG foram preparadas em matriz de alginato de sódio, pelo método de extrusão, em combinação com diferentes materiais de parede. Para isso, foram preparados 3 mL de solução contendo 3% de alginato de sódio, 4% de material de parede. A suspensão de polímeros foi autoclavada a 121°C por 15 min. Posteriormente, 10% em peso de penG foi acrescentado. A suspensão foi gotejada em 10 mL de solução de cloreto de cálcio 0,3M à temperatura ambiente. Uma seringa de 5 mL com uma agulha 0,55x20 24 G3/4 foi usada como instrumento de produção das esferas.

Após formação das esferas, estas permaneceram em solução de cloreto de cálcio por 10 minutos, sendo coletadas por filtração e lavadas em seguida com água destilada. Uma amostra da solução de cloreto de cálcio foi retirada para determinação da porcentagem de retenção da penicilina nas esferas, segundo item 4.9. As esferas foram pesadas úmidas e posteriormente secas a 37°C em estufa de secagem, durante 12 horas. O diâmetro das esferas foi medido com paquímetro (Brasfort[®]).

4.4. Otimização da retenção de penicilina G nas esferas de alginato/amido OSA reticulados com cálcio.

4.4.1. Planejamento fatorial fracionado $2^{4.1}$

Para otimizar a retenção da penG nas esferas, foi aplicada uma seqüência de dois delineamentos fatoriais, com o uso do programa de computação Statistica 7.0. Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹, sendo os parâmetros fixados e adotados como variáveis independentes: concentração de alginato, amido OSA, cloreto de cálcio e tempo de reticulação. A Tabela 4.1 apresenta os limites para cada parâmetro estudado. A porcentagem de penG utilizada em todos os experimentos foi de 10% (m/v). As esferas foram preparadas como descrito no item 4.3.

A variável de resposta utilizada foi a porcentagem de retenção. A Tabela 4.2 mostra os experimentos a serem realizados no planejamento experimental. Os experimentos foram realizados aleatoriamente.

		Nível (g/L)	
Variáveis independentes	- 1	0	+ 1
Alginato (% m/v)	1,5	3	4,5
Amido OSA (%m/v)	2	4	6
Concentração CaCl ₂ (M)	0,15	0,2	0,45
Tempo de reticulação (min)	3	10	17

Tabela 4.1. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2⁴⁻¹

Tabela 4.2. Exp	perimentos gera	los pelo software	Statistica 7.0) para o p	lanejamento	fracionado
-----------------	-----------------	-------------------	----------------	------------	-------------	------------

N⁰ Exper.	Alginato	Amido OSA	Concentração de CaCl ₂	Tempo de reticulação
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1

6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

4.4.2. Planejamento fatorial completo 2³

Posteriormente ao planejamento fatorial fracionado, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 . Os parâmetros fixados e adotados como variáveis independentes foram: concentração de amido OSA, cloreto de cálcio e o tempo de reticulação, como apresentado na Tabela 4.3, cujos valores mostrados representam os limites para cada parâmetro estudado. A Tabela 4.4 mostra a matriz com os valores codificados.

Tabela 4.3. Variáveis independentes e níveis estudados no planejamento fatorial 2³

	Nível (g/L)				
Variáveis	-1,68	- 1	0	+ 1	+1,68
independentes					
Amido OSA (%m/v)	0,32	1,00	2,00	3,00	3,68
Concentração CaCl ₂ (M)	0,35	0,45	0,60	0,75	0,96
Tempo de reticulação	8,00	17,00	30,00	43,00	52,00
(min)					

N° Exper.	Amido OSA	Concentração de CaCl ₂	Tempo de reticulação
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tabela 4.4. Matriz com valores codificados estudados no Planejamento Fatorial 2³.

4.4.3. Avaliação da porcentagem de retenção penicilina G em matriz de alginato e Amido OSA contendo diferentes concentrações do antibiótico.

Com a finalidade de se verificar o comportamento da retenção de penG pelas esferas, amostras contendo diferentes concentrações de penicilina foram produzidas em triplicata. As esferas de penicilina em matriz de alginato/amido OSA foram preparadas a partir de 3 mL de solução de alginato de sódio 4,5% e 2% de Amido OSA contendo diferentes quantidades de penG (10, 12, 14 e 16% m/v). O procedimento para a obtenção segue o mesmo apresentado no subitem 4.3.

4.5. Otimização da retenção da penicilina G nas esferas de alginato/amido OSA reticulados com zinco

Foi realizado um DCCR fatorial completo 2^2 para avaliar a influencia da concentração de zinco e o tempo de reticulação na porcentagem de PenG nas esferas. As esferas foram preparadas a partir de 5 mL de solução de alginato de sódio 4,5%, 2% de Amido OSA e 10% m/v de PenG. A suspensão foi gotejada em soluções com diferentes concentrações de cloreto de zinco e em diferentes tempos de reticulação. O procedimento para a obtenção segue o mesmo apresentado no subitem 4.3.

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.6, respectivamente.

		Nível			
Variáveis	-1,41	- 1	0	+ 1	+1,41
independentes					
Zinco (M)	0,06	0,20	0,30	0,40	0,44
Tempo de reticulação	8,00	15,00	30,00	45,00	52,00
(min)					

Tabela 4.5. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2⁴

N° Exper.	Concentração zinco	Tempo de reticulação
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Tabela 4.6. Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 para o planejamento fatorial completo 2^2

4.6. Formulação das microcápsulas de PenG em matriz de alginato/ amido OSA/ quitosana e alginato/ amido OSA/ polilisina

As microesferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA foram recobertas com quitosana e polilisina. As microesferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA foram preparadas de acordo com o item 4.3. As esferas de alginato/amido OSA contendo PenG foram adicionadas a 10 mL de solução de quitosana 3 mg/mL e mantidas sob agitação magnética e à temperatura ambiente por uma hora. A quitosana foi dissolvida em tampão acetato pH 5,0; previamente preparada a partir de acetato de sódio 0,02 mols/L com o pH ajustado pela adição de ácido acético 1%. Para finalizar, as esferas foram coletadas por filtração e secas em estufa a 37°C por 24 horas.

Processo semelhante foi utilizado para formulação das microcápsulas de PenG em matriz de alginato/amido OSA recobertas com polilisina (0,05% m/v).

4.7. Otimização da retenção de penicilina G nas esferas de alginato/IPE reticulados com cálcio

4.7.1. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Para maximizar a retenção da penG nas esferas de alginato/IPE, foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR) fatorial completo 2⁴, constituído de

27 experimentos, como mostrado na Tabela 4.7. Os resultados foram analisados através do *software* STATISTICA 7.0.

Tabela 4.7. Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 para o planejamento fatorial completo 2^4

N°	Alginato	IPE	Penicilina	[CaCl ₂]
Exper.				
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

Os parâmetros fixados e adotados como variáveis independentes foram: concentração de alginato, IPE, penG e concentração de cloreto de cálcio, como apresentado na Tabela 4.8, cujos valores mostrados representam os limites para cada parâmetro estudado. A variável de resposta foi a porcentagem de retenção da penG.

Após a realização do planejamento experimental foi avaliado se o tempo de reticulação da solução de alginato (4%, m/v), IPE (4,5%, m/v) e penG (12%, m/v) em solução de cloreto de cálcio (0,2 M) influenciam na porcentagem de retenção do antibiótico. As esferas foram preparadas como descrito no item 4.5. Foram realizados 5

experimentos, com triplicata cada, variando o tempo de contato das esferas com a solução de cloreto de cálcio em 8, 17, 30, 43 e 52 minutos.

		Nível (g/L)			
Variáveis	-2	- 1	0	+ 1	+2
independentes					
Alginato (%)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
IPE (%)	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Penicilina (%)	6,0	8,0	10,0	12,0	14,0
$[CaCl_2](M)$	0,2	0,25	0,3	0,45	0,5

Tabela 4.8. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2⁴

4.7.2. Estudo da influência do pH na retenção da penicilina G nas esferas de alginato/IPE

Para este fim, as esferas de penG em matriz de alginato/IPE foram preparadas a partir de 3 mL de solução de alginato de sódio 4,0 % (m/v), IPE 4,5 % (m/v) contendo 12,0 % (m/v) de penG. O procedimento para a obtenção segue o mesmo apresentado no item 4.3. Para avaliar o efeito do pH na retenção de penG, variou-se o pH da solução inicial em 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8. Otimização da retenção de penicilina G nas esferas de alginato/IPE reticulados com zinco

Com intuito de otimizar a retenção da penG em microesferas de alginato e IPE, utilizando o zinco como agente reticulante, foi realizado um DCCR fatorial completo 2^2 . As esferas foram produzidas com alginato (4%, m/v), IPE (4,5%, m/v) e PenG (12%, m/v) pelo método de extrusão, conforme item 4.3.

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais deste planejamento estão apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.10, respectivamente.

		Nível			
Variáveis	-1,41	- 1	0	+ 1	+1,41
independentes					
Zinco (M)	0,06	0,10	0,20	0,30	0,35
Tempo de reticulação	8,00	15,00	30,00	45,00	52,00
(min)					

Tabela 4.9. Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2^4

N° Exper.	Concentração zinco	Tempo de reticulação
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Tabela 4.10. Experimentos gerados pelo software Statistica 7.0 para o planejamento fatorial completo 2^2

4.9. Determinação da concentração de penicilina G nas esferas

4.9.1. Espectrofotometria

Foi realizada inicialmente uma varredura em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 para verificação do comprimento de onda de absorbância máxima para a penG utilizada no trabalho. Verificou-se que em 220 nm ocorria um pico de absorvância máxima, e a partir de então, estabeleceu-se este comprimento de onda para as análises da penG. Foi feita uma curva padrão de penG em água Milli-Q em diferentes concentrações (0,01; 0,02; 0,03 e 0,04 g.L⁻¹), que forneceu uma equação de reta que foi posteriormente, utilizada para cálculos das concentrações de penG nas amostras (Figura 4.1).



Figura 4.1. Curva padrão de penG em água Milli-Q a 220 nm realizado em espectrofotômetro. Barra: desvio padrão (triplicata).

4.9.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises foram realizadas em cromatógrafo liquido da marca Waters 1525 HPLC system 14.6×150 mm (5 µm), equipado com bomba quaternária, degaseificador on line, detector de UV-Visível e sistema de aquisição de dados ChemicalStation.

As condições cromatográficas empregadas foram coluna de fase reversa C18 com fase móvel de tampão fosfato 0,025M KH₂PO₄ (pH 3) e acetonitrila na proporção 40:60 v/v, fluxo de 1mL/min, volume de injeção de 10 μ L, temperatura da coluna de 40°C, comprimento de onda de detecção de 220 nm.

Foi utilizado padrão de PenG com pureza maior que 98% (Sigma) para construção da curva padrão, sendo realizadas cinco injeções em duplicata para cada diferente concentração. A Figura 4.2 apresenta a curva padrão e a equação da reta que posteriormente foi utilizada para cálculos das concentrações de penG nas amostras.



Figura 4.2. Curva padrão de penG em água Milli-Q a 220 nm no HPLC. Barra: desvio padrão (triplicata).

4.10. Determinação da porcentagem de retenção da penicilina G nas esferas

A porcentagem de retenção da penG nas esferas foi determinada indiretamente, por espectrofotometria e diretamente por HPLC. A forma indireta de determinação da

porcentagem foi realizada, dosando-se a concentração de penG não encapsulada na solução de cloreto de cálcio. Para isso, uma alíquota da solução de CaCl₂ contendo as esferas de penG foi retirada para análise por espectrofotometria (220 nm). A massa (M) da PenG retida nas esferas foi determinada segundo a equação (4.1).

Para a dosagem direta, por HPLC, uma massa de esferas de alginato contendo PenG foi tratada com tampão fosfato pH 7,4 até completa dissolução das mesmas. Para obtenção do tampão fosfato pH 7,4 foi preparada uma solução de KH₂PO₄ 0,1 mol/L cujo pH foi ajustado pela adição de solução de NaOH 0,1 mols/L. Para determinação da porcentagem de retenção foi utilizado a equação (4.2).

$$M_{PEN G encapsulad a} = M_{PENG teórica} - M_{PEN G não encapsulad a}$$
(4.1)

% de Retenção =
$$\frac{massa de penicilinaG encapsulada}{massa de penicilinaG teórica} x100$$
 (4.2)

4.11. Preparação das esferas de penicilina G para os ensaios de liberação

Os estudos do perfil de liberação *in vitro* foram conduzidos após a otimização da retenção da penG em matriz de alginato/amido OSA e alginato/IPE. Foi avaliado o perfil de liberação da PenG apartir de diferentes microesferas e microcápsulas. A Tabela 4.11 mostra as condições experimentais das microesferas e microcápsulas avaliadas. Os procedimentos de produção das microesferas e microcápsulas estão descritos nos itens 4.3 e 4.6, respectivamente.

Ao final da produção, as esferas ou microcápsulas foram divididas em três partes de 0,4 g cada, sendo os experimentos realizados em triplicata. Esferas ocas, sem a presença de penG, foram produzidas para verificar a liberação do material de parede no meio de dissolução.

Para a realização dos ensaios de liberação de penG *in vitro*, uma quantidade de esferas ou microcápsulas foram colocadas em um tubo Falcon contendo 20 mL de água destilada (Figura 4.3). Os tubos foram acondicionados a 37 °C e mantidos de forma estática, sem agitação. Alíquotas de 0,7 mL foram retiradas para análise periodicamente,
havendo reposição do mesmo volume de água, em intervalos determinados até que sua concentração na solução atingisse um valor constante, o que correspondia ao final do processo de liberação da penG pelas esferas. O mesmo ensaio foi realizado colocando as amostras em solução de cloreto de cálcio 0,35M e com reposição da mesma solução.

Amostra	PenG (%)	IPE (%)	Alginato (%)	Amido OSA (%)	CaCl ₂ (M)	ZnCl ₂ (M)	Tempo de reticulação (min)	Quitosana (mg/mL)	Polilisina (%)
Ι	10		4,5	2	0,35		30		
II	10		4,5	2		0,35	30		
III	10		4,5	2		0,35	30	3	
IV	10		4,5	2		0,35	30		0,05
V	12	4,5	4		0,2		17		
VI	12	4,5	4			0,2	17		

Tabela 4.11 – Condições experimentais das microesferas e microcápsulas



Figura 4.3. Ensaio de liberação in vitro da PenG

4.12. Encapsulamento das microesferas e microcápsulas em membranas nanoporosas e biocompatíveis

As microesferas e microcápsulas produzidas, de número II e III (Tabela 4.11) foram encapsuladas, conforme mostra a Figura 4.4, em diferentes membranas nanoporosas e biocompatíveis. Para a selagem das membranas em formato cilíndrico (diâmetro 4 mm x altura 60 mm) foi utilizado éster de cianocrilato (Super Bonder, Loctite[®]). As membranas utilizadas e suas características, fornecidas pelo fabricante, estão apresentadas na Tabela 4.12. A nanomembrana DSS é composta por três camadas: uma de poliamida, uma intermediária de polisulfona e uma terceira de poliéster e polipropileno (Figura 4.5), sendo que os tamanhos do poro das camadas são de 0,25; 40 e 100 µm, respectivamente.



Figura 4.4. Esquema representativo do encapsulamento das esferas e cápsulas em membranas nanoporosas e biocompatíveis. Dimensões do cilindro: diâmetro 4 mm x altura 60 mm.



Figura 4.5. Esquema das três camadas que compõe a membrana DSS

Mem brana	Composição	Marca	Tamanho do poro (nm)	Porosida de (%)	Espessura (µm)	Fluxo de água (mL/min /cm ²)
Ι	Polisulfona, poliamida, poliéster e polipropileno	Danish Separation System (DSS) Silkeborg AS [®]		68	250	0,22
II	Acetato e nitrato de celulose	Millipore [®]	50	72	150	0,30
III	Acetato e nitrato de celulose	Millipore®	100	74	150	0,4
IV	Acetato e nitrato de celulose	Millipore®	220	75	150	16

Tabela 4.12. Especificações das nanomembranas biocompatíveis.

4.13. Avaliação *in vitro* do perfil de liberação da penG das esferas de alginato/ amido OSA encapsuladas em diferentes membranas

Para a realização dos ensaios de liberação de penG *in vitro*, o cilindro contendo as microesferas ou microcápsulas, descrito no item 4.12, foram colocadas em um tubo Falcon contendo 40 mL de água destilada. Os tubos foram acondicionados a 37 °C e mantidos de forma estática, sem agitação. Alíquotas de 0,7 mL foram retiradas para análise periodicamente, havendo reposição do mesmo volume de água, em intervalos determinados até que sua concentração na solução atingisse um valor constante, o que correspondia ao final do processo de liberação da penG pelas esferas. O mesmo ensaio foi realizado colocando as amostras em meio biológico simulado. Essa solução, chamada "simulated body fluid" (SBF), foi tamponada com tris-hidroximetil-aminometano (6,1 g.L⁻¹), sendo livre de proteínas e apresenta pH 7,4 (KOKUBO et al, 1990). Sua composição é comparada à composição iônica do plasma sanguíneo (Tabela 4.13). Como controle negativo foram encapsulados esferas e cápsulas sem penG nas diferentes nanomembranas, para avaliar uma possível liberação dos biopolímeros e do ester de cianocrilato no meio de dissolução que possam influenciar na dosagem da penG liberada nos experimentos.

			-	_	-	-	-	-
	Na ⁺	\mathbf{K}^+	Mg ⁺²	Ca ⁺²	Cl-	HCO ₃ -	HPO ₄ ⁻²	SO ₄ ⁻²
Plasma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

Íons: concentração mM

Tabela 4.13. Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e a solução "SBF".

4.14. Modelagem cinética das curvas de liberação

As equações de cinética de reação de ordem zero (equação 4.3), primeira ordem (equação 4.4) e os modelos cinéticos de Higuchi (1963) (equação 4.5), Baker-Lonsdale (1974) (equação 4.6) e Korsmeyer Peppas (1983) (equação 4.7) foram utilizados para o ajuste das curvas de liberação.

$$\frac{Q_t}{Q_{\infty}} = K_0 t + Q_0 \tag{4.3}$$

$$\log Q_t = \log Q_0 - \frac{k_1 t}{2,303} \tag{4.4}$$

$$\frac{Q_t}{Q_m} = K_h \sqrt{t} \tag{4.5}$$

$$\left(\frac{3}{2}\right)\left[1-\left(1-\left(\frac{Q_t}{Q_{\infty}}\right)\right)^{\frac{2}{3}}\right]-\left(\frac{Q_t}{Q_{\infty}}\right)=K_bt$$
(4.6)

$$\frac{Q_t}{Q_{\infty}} = K_k t^n + Q_0 \tag{4.7}$$

Onde, Q_t/Q_{∞} é a quantidade de ativo liberada no tempo t em horas, Q_0 é a quantidade de fármaco no tempo zero, k_0 a constante de reação de zero ordem, k_1 a constante de reação de primeira ordem, K_h a constante de liberação de Higuchi, K_b a constante de liberação de Baker-Lonsdale e K_k a constante de Korsmeyer Peppas.

A escolha do melhor modelo matemático de liberação pode ser baseada no valor do coeficiente de determinação R^2 . No entanto, este valor tende a tornar-se maior com a adição de mais parâmetros. Por isso, quando se compara modelos com vários parâmetros, é mais correto utilizar o coeficiente de determinação ajustado $R^2_{ajustado}$ (CARBINATTO, 2010).

4.15. Avaliação in vivo da hipernocicepção mecânica

4.15.1. Animais

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos adultos, com peso corporal de 180-200g, gentilmente cedidos pela professora Aline M. de Oliveira da Universidade Federal Fluminense. Durante o período prévio ao estudo, os animais foram alojados em caixas plásticas retangulares (40x30x15cm), sob temperatura controlada (21-24°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Ração comercial e

água foram fornecidas *ad libitum*. Uma vez por semana as caixas foram higienizadas, e diariamente as condições clínicas de todos os animais foram avaliadas, a fim de que quaisquer alterações de saúde pudessem ser detectadas e adequadamente tratadas. A avaliação da hipernocicepção mecânica foi desenvolvida no núcleo de animais e laboratório (NAL) da Universidade Federal Fluminense.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos conscientes dos tratamentos com fármacos, tenho sido o tamanho amostral calculado por análise estatística.

4.15.2. Procedimento cirúrgico

Após a obtenção da medida basal, os animais foram anestesiados com éter etílico e posteriormente realizado incisão na região plantar nas patas posteriores direita e esquerda. A pata esquerda foi tratada com simples corte e sutura, como controle. Na pata direita foi realizado um corte, a implantação dos biomateriais ou microesferas e posterior sutura (Figura 4.6). A hipernocicepção foi avaliada 30, 60, 90 e 120 minutos após a cirurgia. Para cada grupo foram utilizados 3 ratos.



Figura 4.6. Procedimento de implantação das esferas. **A**) Realização da incisão na região plantar nas patas posteriores direita e esquerda e implantação das esferas e biomateriais. **B**) Aspecto final após a sutura.

4.15.3. Teste da hipernocicepção mecânica

A avaliação da hipernocicepção mecânica foi realizada pelo método do teste da pressão da pata dos ratos descrito por Cunha et al. (2004). O equipamento utilizado foi o analgesímetro digital (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). Este aparelho é constituído por um transdutor de força, em cuja extremidade foi fixada uma ponteira de polipropileno de 0,7 mm², ligado a um aparelho que fez a leitura da força aplicada convertendo-a em gramas. Neste modelo, o limiar da dor é representado como força (g) necessária para indução da reação (Figura 4.7).



Figura 4.7. Procedimento de avaliação da hipernocicepção mecânica. A) Ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar foram utilizados. Ração comercial e água foram fornecidas *ad libitum*. B) Acomodação dos animais em caixas acrílicas com fundo de tela aramada. C) Visão ventral dos animais acomodados para a realização dos testes. D) Aplicação de força mecânica sobre a região intraplantar até a obtenção da resposta aversiva. E) Detalhe da ponteira de polipropileno de 7 mm² acoplada ao transdutor de pressão utilizado para estimulação mecânica.

Os animais foram colocados em caixas acrílicas com compartimentos individuais e assoalho de tela aramada não-maleável (12 x 20 x 17 cm altura) para

ambientar-se durante 20 minutos. Durante este período, com o animal em estado de alerta e posicionado em decúbito esterno-abdominal, aplicou-se a ponteira no coxim metatársico de forma perpendicular e em movimento progressivo ascendente até que o reflexo de retirada do membro fosse obtido, para obtenção da medida basal (Figura 4.7).

O resultado lido no analgesímetro foi validado apenas quando o animal apresentasse três marcações semelhantes. A média aritmética das três leituras válidas gerou o IH (intensidade de hipernocicepção). Para as análises estatísticas e representações gráficas de alguns gráficos foram foi considerada a variação (Δ) da reação de retirada obtida pela diferença entre a IH da medida basal – antes da administração de qualquer substância – e a IH tomada após o procedimento cirúrgico de implantação dos biopolímeros e microesferas. Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e em diversos tempos após a implantação dos biomateriais e microesferas na região plantar da pata direita dos ratos.

4.16. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - IMPG/UFRJ. Foram avaliadas diferentes microesferas e microcápsulas previamente otimizadas em matriz de alginato, amido OSA, IPE, recobertas ou não com os policátions quitosana e polilisina. A Tabela 4.14 mostra as diferentes amostras investigadas. O controle positivo foi um disco de filtro de papel com PenG 10% e para o controle negativo foram utilizados microesferas e microcápsulas puras, sem o antibiótico. O método utilizado foi o teste de difusão em ágar, onde as amostras foram colocadas no centro de cada placa de Petri com meio de cultura agar infusão de cérebro e coração (BHI - "brain heart infusion"), previamente inoculadas com *Streptococcus pyogenes*, e incubadas a 30°C por até 72 h. A cada 12h o diâmetro de inibição de crescimento foi medido em mm (Hili *et al*, 1997).

Amostra	PenG (%)	IPE (%)	Alginato (%)	Amido OSA (%)	CaCl ₂ (M)	ZnCl ₂ (M)	Tempo de reticulação (min)	Quitosana (mg/mL)	Polilisina (%)
Ι	12	4,5	4		0,2		17		
II	10		4,5	2	0,35		30		
III	10		4,5	2		0,35	30		
IV	10		4,5	2		0,35	30	3	
V	10		4,5	2		0,35	30		0,05

Tabela 4.14. Condições experimentais das microesferas e microcápsulas utilizadas no teste antimicrobiano

4.17. Caracterização das microesferas e microcápsulas

4.17.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos biopolímeros, das microesferas e microcápsulas foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca Jeol, modelo JSM-5310. A aceleração de voltagem utilizada foi 15 ou 20 kV. As esferas secas foram fixadas em suportes cilíndricos metálicos com diâmetro de 10 mm usando uma fita adesiva de carbono dupla face. As amostras foram subseqüentemente revestidas com ouro e analisadas. As análises foram realizadas no Instituto Militar de Engenharia (IME) no Laboratório de Microscopia eletrônica.

4.17.2. Difração de raios X

Os ensaios de difração de raios x foram realizados no Laboratório de Raios X do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). O equipamento usado foi um difratômetro modelo X'Pert PRO, da PANalytical, dotado de fonte de radiação monocromática KáCu (1,54184 Å). As amostras foram analisadas no modo è/2è acoplado e a identificação dos padrões de difração foi feita com a ajuda do programa X'Pert HighScore da PANalytical.

4.17.3. Estudo de intumescimento das esferas

Os ensaios de intumescimento foram realizados para examinar a capacidade de hidratação de cada polímero ou sistemas de polímeros e avaliar o efeito complementar da influencia que este fenômeno pode ter na cinética de liberação do fármaco a partir das esferas de alginato/amido OSA e alginato/IPE. As esferas, após produzidas, eram lavadas com água Milli-Q, cujo excesso de água era retirado com papel de filtro para determinação de sua massa inicial. As microesferas eram secas á 37°C, até que a massa não variasse; logo após, a massa seca era anotada e a água de hidratação determinada pela equação 4.8.

$$GI(\%) = \left(\frac{m_u - m_s}{m_s}\right) x \, 100 \tag{4.8}$$

Foi também realizado estudos de intumescimento das esferas secas ao longo do tempo após a imersão em água destilada. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, retirou-se a água em excesso das esferas com o auxílio de um papel absorvente e realizou-se a pesagem, caracterizando a massa úmida (m_u) A análise foi realizada com quatro repetições. O grau de intumescimento em porcentagem foi determinado pela equação 4.3.

4.17.4. Estudo do grau de erosão (GE) das matrizes

Essa determinação foi baseada no trabalho de Efentakis *et al* (2000), com algumas modificações. As esferas secas foram colocadas em tubo falcon contendo 20 mL de água Milli-Q. Após o intervalo de tempo selecionado, uma amostra de 4 esferas eram retiradas e ligeiramente secas em estufa para remoção da água e, em seguida, pesada para registrar a diferença da massa comparada à amostra que não foi submetida ao teste. A perda de peso (GE%) foi determinada seguindo a equação 4.9:

$$Grau \ deeros \tilde{a}o(GE\%) = \frac{Pi - Pf}{Pi} x100 \tag{4.9}$$

Onde, GE, é a porcentagem do grau de erosão, Pi é o peso inicial da matriz seca e Pf é o peso da matriz após secagem em estufa, depois de determinado período de tempo no meio de dissolução.

4.17.5. Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado no equipamento DT 1200 fabricado pela *Dispersion Technology*. As suspensões foram preparadas com 0,1 mg de esferas em água destilada. As medidas de potencial zeta foram efetuadas nos valores de pH no intervalo de 2,0 a 8,0. O pH foi ajustado com soluções diluídas de KOH e HCl. As análises foram realizadas no laboratório de Sistemas Particulados, sob responsabilidade do professor Márcio Nele de Souza.

4.17.6. Análise de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para identificar a presença de grupos funcionais, modos vibracionais da molécula e possíveis tipos de interação entre os biopolímeros e a PenG, utilizou-se o equipamento de infravermelho (IR) (FT–IR Prestige – 21/ Shimadzu), no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). Usaram-se pastilhas transparentes de KBr preparadas em um mistura de proporção 1:10 (amostra/ KBr), seguida de uma pressão uniaxial do pó sob vácuo. Todos os espectros foram obtidos entre 4100 e 500 cm⁻¹ e na resolução de 4 cm⁻¹.

4.17.7. Análises térmicas

4.17.7.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos biocompósitos foi determinada pelo uso de analisador termogravimétrico Pyris 1 TGA Perkin-Elmer, sob atmosfera de nitrogênio (N2). A massa de cada amostra foi em torno de 6-10 mg. As curvas registradas, no decorrer do aquecimento da temperatura ambiente até 700 °C em uma razão de 10 °C/min.

4.17.7.2. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As medidas de DSC foram conduzidas em um Pyris Diamond DSC Perkin-Elmer (LADEQ/EQ/UFRJ), sob atmosfera de N₂. As amostras de 4-10 mg foram aquecidas de -20 °C até 300°C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. A temperatura de transição vítrea (Tg) foi obtida no ponto de inflexão entre as linhas bases pela variação da capacidade calorífica da amostra. As análises térmicas foram realizadas no laboratório da Prof. Verônica Maria de Araújo Calado (LADEQ/UFRJ).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de diferentes materiais de parede para encapsulamento da penicilina G

Inicialmente, foram avaliados diferentes materiais de parede para encapsulamento da penG, pelo método de extrusão, utilizando matriz de alginato de sódio. Dentre os biopolímeros avaliados estão o amido modificado (amido OSA), a carboximetilcelulose (CMC), maltodextrina e IPE (isolado protéico de ervilha - com 90% de vicilina). A Figura 5.1 mostra a porcentagem de retenção da penG, em cada sistema matricial.



Biopolímeros

Figura 5.1. Porcentagem de retenção da penG em matriz de alginato de cálcio em combinação com diferentes materiais de parede. IPE – isolado protéico de ervilha. Barra: desvio-padrão (triplicata).

Pode-se observar que as esferas de alginato/Amido OSA apresentaram maiores porcentagens de retenção de penG, com 51,66% de retenção. Esse resultado pode ser devido às interações intermoleculares favorecidas entre o amido modificado e a penG. A presença de grupos lipofílicos na estrutura do amido OSA, o succinato de octanil, pode interagir com a porção apolar da penG, o anel benzila, formando interações hidrofóbicas, aumentando, dessa forma, o conteúdo da penG dentro das esferas. Interações entre o amido OSA e o alginato também podem ser estabelecidas, como

ligações de hidrogênio, entre as diversas hidroxilas presentes no ácido manurônico e gulurônico do alginato e o oxigênio presente no amido OSA. Também podem contribuir as interações de van der Walls.

Além disso, o amido representa um polímero com habilidade para o aprisionamento de moléculas em tecnologias de liberação controlada de substâncias bioativas. Essa habilidade encontrada no carboidrato ocorre devido a sua fração amilose, que é capaz de formar estruturas helicoidais e, com isso, complexos muito estáveis.

Como mostra a Figura 5.1, as esferas contendo alginato e IPE como agentes encapsulantes apresentaram uma porcentagem de retenção da penG de 35,31%. Esse resultado deve-se ao principal constituinte do IPE, que é a proteína vicilina, também conhecida por globulina 7S (SANCHEZ-MONGE *et al.*, 2004).

A vicilina como proteína apresenta aminoácidos carregados, os quais podem fazer interação iônica com a penG, mantendo-a na esfera. Além disso, a vicilina pode formar interações hidrofóbicas com a penG através de resíduos de aminoácidos apolares, aumentando dessa forma os pontos de ancoramento da penG na matriz de alginato/IPE. A vicilina é formada por três subunidades de 50 kDa unidos entre si por interação polar, sendo que cada subunidade possui dois domínios β -pregueados conectados por α -hélices (PEDROZA; FERREIRA, 1994). Essa estrutura complexa de hélices pode favorecer a reticulação da matriz de alginato de cálcio, mantendo-a estável.

Entretanto, a combinação do alginato com CMC e maltodextrina não favorece a retenção da penG nas esferas, apresentando 8,44% e 4,32% de retenção, respectivamente. A baixa retenção na matriz de alginato/CMC pode estar associada às características da penG, como a elevada densidade eletrônica em virtude dos anéis aromáticos em sua estrutura e a ionização da CMC em meio aquoso. Esse ânion pode ter contribuído para afastar a penG durante o processo de encapsulamento, reduzindo o teor de fármaco nas esferas. Buzzi (2009), ao avaliar o microencapsulamento de piroxicam em matriz de alginato e CMC pelo método de emulsão-reticulação, verificou que apenas 1,5% do piroxicam se manteve retido nas micropartículas.

A baixa porcentagem de retenção da PenG (4,30%) em matrizes de alginato/maltodextrina, apresentado na Figura 5.1, pode estar relacionada à ausência de compostos hidrofóbicos nesses polímeros, diminuindo o contato da PenG com o material de parede e, desta forma, aumentando sua liberação para o meio externo.

Apesar de a pectina ser um polímero altamente hidrofílico, a porcentagem de retenção foi de 20,37%, valor cinco vezes maior que ao se utilizar a maltodextrina. A solubilidade da pectina é reduzida durante o encapsulamento através da formação de

sais de cálcio, como o pectinato de cálcio, que tem sua estrutura representada na Figura 5.2. A interação do cálcio com a pectina, de acordo com Fang *et al.* (2008), sugere que as cadeias estão alinhadas e apresentam conformação na forma de hélices com três unidades galacturônicas por cada ciclo (ou volta). Os íons cálcio são coordenados por três átomos de oxigênio em uma cadeia e dois átomos de oxigênio pertencente à outra cadeia, enquanto as posições remanescentes na camada de coordenação com o cálcio são ocupadas por moléculas de água.

O modelo "egg-box", proposto inicialmente para a sequência dos resíduos G do alginato de sódio, foi adotado para a sequência galacturônica, sem a participação das unidades esterificadas (Figura 5.2). Na pectina, o alinhamento das cadeias ocorre na forma de hélices, sendo que as cadeias são mantidas pela coordenação com o cálcio.

Outro fator que possivelmente favoreceu a retenção da penG é a interação hidrofóbica entre a penG e os grupos metoxilas da pectina. Madziva *et al.* (2005) utilizaram como material de parede a mistura de alginato e pectina para o encapsulamento do ácido fólico, alcançando uma porcentagem de retenção de 78%.

Como os melhores resultados nesta etapa foram aqueles obtidos com os biopolímeros alginato/amido OSA e alginato/IPE, optou-se em otimizar a porcentagem de retenção da penG nessas matrizes, utilizando a ferramenta de planejamento experimental, como segue no próximo item.



Figura 5.2. Representação esquemática da interação do íon cálcio com as unidades galacturônicas da pectina.

5.2. Otimização da retenção da penicilina G nas esferas de alginato / Amido OSA

5.2.1. Planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹

3

3

4

4

10

11

Após o estudo do encapsulamento da PenG em diferentes materiais de parede e ter obtido a maior porcentagem de retenção da penG em esferas de alginato/amido OSA, procurou-se nesta etapa otimizar a retenção da penG nas esferas. Contudo, foi realizado um planejamento fatorial fracionado 24-1 para avaliar a influência da concentração de alginato, amido OSA, cloreto de cálcio e tempo de reticulação na porcentagem de retenção da penG nas esferas, como descrito no item 4.4.

Os resultados obtidos na realização do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} são apresentados na Tabela 5.1, junto com as condições para cada um dos experimentos.

Os dados indicam que a porcentagem de retenção variou de 40,17 a 95,34% com os diferentes níveis das variáveis independentes. É possível observar que as maiores retenções, aquelas acima de 70%, foram obtidas quando a maior concentração de alginato foi utilizada (experimentos 2, 4, 6 e 8).

N⁰ Exper.	Alginato (% m/v)	Amido OSA (%m/v)	Concentração de CaCl ₂ (M)	Tempo de reticulação (min)	Porcentagem de retenção de PENG (%)
1	1,5	2	0,15	3	40,17
2	+4,5	2	0,15	17	94,97
3	1,5	6	0,15	17	45,0
4	+4,5	6	0,15	3	70,12
5	1,5	2	0,45	17	60,32
6	+4,5	2	0,45	3	95,34
7	1,5	6	0,45	3	47,55
8	+4,5	6	0,45	17	80,68
9	3	4	0,2	10	52,9

0,2

0,2

Tabela 5.1. Matriz do planejamento experimental com os valores reais e respectivos resultados p

Os dados apresentados na Tabela 5.1 não podem ser interpretados de forma direta, porque se faz necessária uma avaliação da significância dos parâmetros estudados por bases estatísticas. Na análise de variância pela ANOVA existe um parâmetro estatístico denominado *p-level*, que permite avaliar quais fatores são estatisticamente relevantes. Quando os valores do p-level para cada um dos fatores e interações são menores ou iguais a 0.05, estes apresentam significância ou relevância

10

10

52,81

51,34

estatística, quando são maiores que 0,05, os fatores e interações não apresentam relevância estatística (NETO *et al.*, 1995; MONTGOMERY, 1999).

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável é apresentada nos diagramas de Pareto (Figura 5.3), fornecendo o efeito quantitativo estimado que cada uma das variáveis possuem sobre a porcentagem de retenção, e estabelecendo quais desses efeitos encontram-se dentro do grau de confiança estabelecido para a análise (95%).



Figura 5.3. Diagrama de Pareto para o efeito estimado de cada variável do planejamento fatorial facionado 2^{4-1} .

Com os resultados da análise estatística, confirmou-se então que a variável com maior efeito sobre a porcentagem de retenção foi a concentração de alginato, com um efeito de magnitude de 5,33 vezes maior ao correspondente para o tempo de reticulação. Contudo, o efeito da concentração de alginato é positivo, indicando que níveis maiores de alginato levariam a maiores porcentagens de retenção, enquanto a contração de amido OSA apresentou um efeito negativo, ou seja, uma diminuição da concentração deste levaria a um aumento da porcentagem de retenção.

Esse resultado corrobora os estudos de Yu *et al.* (2010) que, ao avaliarem a variação da concentração de alginato no microencapsulamento de proteína do soro (BSA) como fármaco modelo em matriz de alginato, quitosana e pectina, observaram que, quanto maior a concentração de alginato, maior a eficiência de encapsulamento. Resultados similares também foram encontrados nos trabalhos de Anjani *et al.* (2007).

Com o intuito de avaliar o efeito negativo do amido OSA, foi realizado um estudo apenas com alginato como material encapsulante em diferentes concentrações (3;

O objetivo do estudo foi verificar se o amido OSA realmente contribuía para o aumento da porcentagem de retenção. Como se pode observar na Figura 5.4, um aumento na concentração de alginato de 3 para 4,5%, permitiu um aumento na porcentagem de retenção de 33 para 70,41%, respectivamente, corroborando com os dados anteriores. Porém, ao comparar a retenção de penG nas esferas contendo alginato (4,5%) na presença de Amido OSA (2%), este apresenta uma porcentagem de retenção de 95,34%. Verifica-se, assim, a importância do Amido OSA na retenção da penG nas esferas, demonstrando mais uma vez a interação favorável entre o amido OSA e o fármaco em estudo. Quando a obtenção das esferas foi realizada com 5% de alginato, houve um decréscimo na retenção devido a essa concentração de alginato ser o limite de viscosidade que permite a extrusão da solução pela agulha. Houve a formação de esferas imperfeitas, permitindo a rápida liberação da penG na solução de cloreto de cálcio. Portanto, nos estudos posteriores, a concentração de alginato foi mantida a 4,5%.



Figura 5.4. Porcentagem de retenção da penG em relação a diferentes concentrações de alginato.

Fundueanu *et al.*(1999) relatam que, devido à alta viscosidade do alginato de sódio, a obtenção de esferas pela técnica de gotejamento é crítica. Ao entrar em contato com a solução de cloreto de cálcio, a gota sofre a influência da diferença de tensão superficial, podendo formar esferas imperfeitas. De acordo com essa observação, a concentração de alginato de sódio adequada é de 1 a 8 %, dependendo do peso molecular do alginato. Entretanto, neste trabalho, observou-se que 5% já é uma concentração crítica para o processo. Segundo Oliveira (2008), as propriedades

reológicas do alginato de sódio são dependentes da concentração. A 2,5% (m/v) uma solução de alginato é considerada um fluido pseudoplástico, enquanto a 0,5% é considerada Newtoniano. Porém, esse autor concluiu que o aumento na concentração de alginato de 1 a 2% não influenciou na eficiência de encapsulação das substâncias D-Pantenol e Extrato de Camomila. Para Onsoyen (1997), a viscosidade é determinada pelo comprimento das moléculas de alginato envolvidas. A velocidade de agitação também influencia a viscosidade. Quando a solução é submetida a condições de baixo cisalhamento, as moléculas de alginato se dispõem randomicamente, enquanto que, com o aumento da taxa de cisalhamento, as moléculas começam a se alinhar em forma paralela, oferecendo menor resistência ao escoamento e diminuindo a viscosidade aparente.

5.2.2. Planejamento fatorial completo 2³

Buscando atingir uma máxima retenção da penG nas esferas, optou-se por um segundo delineamento fatorial. Para isso foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , para avaliar a influência das variáveis independentes: concentração de amido OSA, concentração de cloreto de cálcio e o tempo de reticulação.

A Tabela 5.2 mostra os resultados do planejamento fatorial completo 2^3 , assim como os valores reais dos níveis estudados em cada experimento.

Os valores obtidos da variável de resposta porcentagem de retenção variaram de 65,41% a 96,42%, nas condições estudadas, para os 17 experimentos realizados. É válido ressaltar que a diferença entre esses pontos de máximo e mínimo é bem maior do que a variação do valor da porcentagem de retenção para as condições do ponto central, em que se estuda a reprodutibilidade dos experimentos ($\Delta = 3,01$), indicando que as variações observadas nos valores da variável de resposta são decorrentes dos parâmetros estudados. Apesar de o ponto central (exp. 15,16 e17) se tratar do mesmo método com os mesmos parâmetros de formulação, há uma variação nos valores de retenção, devido à dificuldade de reprodutibilidade das condições, tais como pressão no êmbolo da seringa, distância da agulha para a solução de CaCl₂, perda de material nas paredes da seringa, velocidade de gotejamento etc.

N⁰ Exper.	Amido OSA (%m/v)	Concentraçao de CaCl ₂ (M)	Tempo de reticulação (min)	Porcentagem de retenção de PENG
1	1,00	0,45	17,00	89,21
2	3,00	0,45	17,00	79,36
3	1,00	0,75	17,00	90,11
4	3,00	0,75	17,00	86,74
5	1,00	0,45	43,00	80,22
6	3,00	0,45	43,00	65,41
7	1,00	0,75	43,00	70,12
8	3,00	0,75	43,00	73,49
9	0,32	0,6	30,00	88,40
10	3,68	0,6	30,00	80,13
11	2,00	0,35	30,00	93,54
12	2,00	0,96	30,00	94,32
13	2,00	0,60	8,00	86,54
14	2,00	0,60	52,00	70,44
15	2,00	0,60	30,00	93,40
16	2,00	0,60	30,00	95,60
17	2,00	0,60	30,00	96,41

Tabela 5.2. Matriz do planejamento fatorial com os valores reais e os resultados experimentais.

As maiores porcentagens de retenção (em média 95,42%) foram obtidas nos experimentos 11, 12, 15, 16 e 17, quando se utilizou concentração de Amido OSA no ponto central (2%). Entretanto, os ensaios que foram realizados utilizando os maiores tempos de reticulação e maiores concentrações de Amido OSA apresentaram as menores porcentagens de retenção.

A Figura 5.5 apresenta o diagrama de Pareto do planejamento experimental, calculado considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis. Analisando-se o diagrama, observou-se que a variável tempo de reticulação foi a que apresentou um maior efeito significativo sobre a variável de resposta ($\alpha = 95\%$), seguido pela concentração de Amido OSA, sendo que ambas as varáveis apresentaram um efeito negativo, ou seja, um aumento no tempo de reticulação ou na concentração de Amido OSA não favorece a retenção da penG nas esferas.

A concentração de cloreto de cálcio não foi estatisticamente significativa, mostrando que na faixa estudada a concentração de cloreto de cálcio não influenciou na porcentagem de retenção. Resultados semelhantes foram obtidos por Buzzi (2009), constatando que, ao variar de 3 a 5% a concentração de cloreto de cálcio, este não influenciou na eficiência de encapsulamento do anti-inflamatório piroxicam em matriz de alginato e CMC. Resultados similares também foram obtidos por OLIVEIRA *et al.*, 2004.



Figura 5.5. Diagrama de Pareto para a porcentagem de retenção.

Embora a concentração de cloreto de cálcio não seja estatisticamente significativa, é de grande importância para a gelificação, processo que ocorre devido à afinidade entre o alginato e o cálcio. Porém, neste estudo, a concentração de cloreto de cálcio foi maior do que a necessária para a formação das interações coesivas entre o cálcio e o alginato. Mammarella *et al.*(2003) determinaram um coeficiente estequiométrico *b*, que significa a quantidade mínima de cátions necessária para a formação do gel. No caso da gelificação do alginato de cálcio, o valor do coeficiente *b* foi de 24,26 g de alginato de sódio por grama de cálcio, ou seja, foi necessário um grama de cálcio para gelificar 24,26 g de alginato de sódio. No presente trabalho, a concentração de CaCl₂ no menor nível avaliado foi suficiente para manter a penG retida nas esferas. Portanto, a concentração de 0,35 M foi utilizada nos experimentos posteriores.

O efeito negativo do amido OSA (Figura 5.5) pode ser explicado pela forte interação entre o alginato e Amido OSA, diminuindo desta forma a possibilidade de interação entre o alginato e o cálcio, sendo essa interação fundamental para a integridade das esferas e retenção do fármaco. Wang *et al.* (2010) utilizaram os

polímeros alginato e amido como material de parede para encapsulamento do ácido acetil salicílico para liberação controlada. Neste trabalho utilizou-se espectroscopia de absorção atômica para determinar a quantidade de cálcio reticulado na matriz polimérica após o encapsulamento em diferentes concentrações de amido. Foi observado que o aumento da concentração de amido levou ao decréscimo da quantidade de cálcio reticulado na matriz, consequentemente a uma maior liberação do fármaco e à diminuição da porcentagem de retenção.

Reis (2009) produziu cápsulas de liberação controlada de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) para fins de biorremediação. Para formulação do encapsulado, foram utilizados os polímeros alginato (3% p/v) e amido OSA (4,1% p/v), obtendo-se uma porcentagem de retenção de 31% de fósforo e 45% de nitrogênio nas cápsulas. Bastos (2007) também usou os mesmos polímeros nas concentrações de 3% de alginato e 4% de amido OSA e obteve filmes alimentícios com retenção da vitamina C de 25,64%.

Outra variável que influenciou negativamente na porcentagem de retenção foi tempo de gelificação. Esse tempo, também chamado de tempo de cura, é o tempo necessário para o processo de difusão dos íons cálcio para o interior da esfera. Segundo Draget et al. (1997), essa difusão não é uniformemente distribuída, apresentando uma alta concentração na superfície que gradualmente decresce para o centro da esfera. Isso pode ser explicado pela barreira difusional formada logo na superfície da esfera, fazendo com que os íons tenham mais resistência ao atravessar para o centro.

O tempo de contato das esferas com a solução de $CaCl_2$ deve ser suficiente para que as zonas de junção disponíveis sejam reticuladas, promovendo ligações efetivas entre o alginato e o cálcio. Após esse tempo, como demonstrado neste trabalho há uma perda significativa da penG encapsulada para a solução de cloreto de cálcio. Isso pode ser observado nos experimentos 13 e 14 (Tabela 5.2) que ao aumentar o tempo de reticulação de 8 para 52 minutos, a porcentagem de retenção passou de 86,54 para 70,44%.

Sartori *et al.* (1997) verificaram, para filmes com diferentes tipos de alginato imersos em solução de 0,8% de CaCl₂, que o processo de troca iônica é muito rápido, e que mais da metade da conversão entre o sódio e o cálcio ocorre nos primeiros 30 segundos, sendo que após 30 minutos praticamente não há mais variação no conteúdo de íons cálcio. Em outro trabalho semelhante, Roger *et al.* (2006) relatam que mais da metade da conversão acontece nos primeiros 5 minutos, e, após 10 minutos, a concentração de cálcio no filme permanece constante. Nos instantes iniciais, todos os sítios ativos presentes nas cadeias do alginato estão disponíveis, já em tempos maiores, há uma resistência da difusão devido às ligações já existentes na superfície, fazendo com que o processo seja mais lento nos instantes finais. Al-Musa *et al.* (1999) também citam em seu trabalho que a reação de reticulação do alginato com o cálcio é rápida e não apresenta efeito em imersões acima de 30 minutos.

A Tabela 5.3 apresenta a análise de variância, em que mostra que o modelo estatístico selecionado (nesse caso, possui termos lineares, quadráticos e a interação dos termos lineares) para a variável de resposta porcentagem de retenção é altamente significativo, como foi evidenciado pelo teste F. Desta forma podem-se gerar superfícies de resposta. A tabela de ANOVA (Análise de Variância Univariável) fornece duas informações principais: o R² (coeficiente de determinação), que permite verificar o ajuste do modelo; e o p-valor (probabilidade de significância). O p-valor é em função de alguns parâmetros da tabela da ANOVA como SS (soma dos quadrados da variação dos termos), df (grau de liberdade), MS (quadrados médios), MS Pure Error (quadrado médio devido aos erros de ajuste) e F (parâmetro relacionado à distribuição de Fisher-Snedecor), e indica quais termos são relevantes (estatisticamente significativos), assim como o gráfico de Paretto.

Com a tabela de ANOVA gerada (Tabela 5.3.A), e percebidos quais termos são estatisticamente significativos, um ajuste ao modelo foi realizado, retirando os termos irrelevantes, e, por consequência, uma nova tabela (Tabela 5.3.B) foi produzida com R² mais próximo de 1 do que o anterior.

(A) R-sqr=	,90828; Ad	j:,79	9036 MS	Pure Error	=2,426033
Factor	SS	df	MS	F	р
(1)Capsul (L)	108,921	1 1	108,9214	44,896	9 0,021556
Capsul (Q)	292,954	4 1	292,954	3 120,754	4 0,008180
(2)Concentração de CaCl ₂ (L)	4,198	8 1	4,198	0 1,7304	4 0,318922
Concentração de CaCl ₂ (Q)	31,840	0 1	31,840	1 13,124	4 0,068462
(3)Tempo de reticulação(L)	507,562	2 1	507,5624	4 209,214	9 0,004746
Tempo de reticulação(Q)	574,628	5 1	574,625	1 236,857	9 0,004195
1L by 2L	76,014	4 1	76,014	4 31,332	8 0,030465
1L by 3L	0,396	5 1	0,396	1 0,163	3 0,725291
2L by 3L	13,261	1 1	13,261	2 5,466	2 0,144356
Lack of Fit	137,665	5 5	27,533	0 11,349	0,082953
Pure Error	4,852	2 2	2,426	0	
Total SS	1553,868	8 16	i		
(\mathbf{P}) $\mathbf{P}_{-sor} = 97$	083: Adi: 0	706		re Error=2	426033
Easter	cc	df 00	MSTU		420033
(1)Cancul (L)	108 509	1	108 5089	44 7269	0.021635
Cansul (Q)	326 714	1	326 7145	134 6702	0.007344
(3)Tempo de reticulação(L)	506.060	1	506.0596	208,5955	0.004760
Tempo de reticulação(Q)	636.524	1	636.5239	262.3723	0.003790
1L by 2L	75,891	1	75,8912	31,2820	0,030512
Lack of Fit	25,765	9	2,8627	1,1800	0,539959
Pure Error	4,852	2	2,4260		
Total SS	1517,756	16			

Tabela 5.3. ANOVAs com modelo completo (A) e ajustado (B) para variação da porcentagem de retenção da penG.

Com o objetivo de analisar a influência da concentração de Amido OSA *versus* o tempo de reticulação na retenção de penG, a Figura 5.6 apresenta a curva de contorno. Fixou-se a concentração de cloreto de cálcio no nível mínimo estudado.



Figura 5.6. Curvas de contorno da variável porcentagem de retenção em relação ao tempo de reticulação e amido OSA.

Com o modelo ajustado, podemos definir a expressão relativa à porcentagem de retenção da penG a partir dos coeficientes da curva de regressão, em termos das variáveis originais. Na equação 5.1, T é o tempo de reticulação, C é a concentração de Amido OSA e B é a concentração de cloreto de cálcio.

Retenção de PENG (%) =
$$94,65 - 2,81C - 5,14C^2 - 6,08T - 7,17T^2 + 3,08$$
 (CxB) (5.1)

A melhor retenção de penG foi de 95,13 % (\pm 1,55), quando se utilizou alginato (4,5%), Amido OSA (2%) e concentração de cloreto de cálcio de 0,35 M e penG 10% p/v.

5.2.3. Avaliação da porcentagem de retenção penicilina G em matriz de alginato e amido OSA contendo diferentes concentrações do antibiótico.

Para entender como a variação de concentração de penG afetou a eficiência de encapsulamento, foram preparadas quatro amostras com diferentes concentrações de penG. A Figura 5.7 mostra a porcentagem de retenção nas esferas de alginato/amido OSA da penG em função da concentração.



Figura 5.7. Porcentagem de penG retida nas esferas de alginato/Amido OSA em função de diferentes quantidades do antibiótico.

A porcentagem de retenção da penG variou de 94,19 a 44,41% para concentração de penicilina, que variou de 10 a 16%. Portanto, a quantidade de penicilina retida nas esferas foi inversamente proporcional à quantidade de antibiótico utilizado.

Resultados similares foram obtidos por Finotelli (2006), que, ao encapsular insulina em matriz de alginato e quitosana, observou que a eficiência de encapsulamento diminuiu 43% ao aumentar a carga de insulina no meio. Entretanto, Yoo (2006) não detectou diferença significativa na eficiência de encapsulamento ao variar a razão fármaco / polímero (α -tocoferol/alginato).

As esferas que foram preparadas com a maior porcentagem de penG apresentaram somente 44,41% de retenção. No entanto, conforme a porcentagem de penG diminui no preparo, o alginato consegue aprisioná-la com mais eficácia, provavelmente direcionando o antibiótico para o centro desta. Esse fato pode ser devido à diminuição da relação fármaco/polímero, e desta forma o alginato consegue manter todo o antibiótico nas esferas. Um aumento na quantidade de penG pode favorecer o aparecimento de poros nas esferas, permitindo a difusão da penicilina durante o processo de gelificação. Diversos fatores podem influenciar a porcentagem de retenção da penicilina nas esferas de alginato/amido OSA, dentre estes estão a relação fármaco/polímero, como observado no presente trabalho.

5.3. Otimização da retenção da penicilina G nas esferas de alginato/ amido OSA reticulados com zinco

Após a obtenção das melhores condições do microencapsulamento da PenG em matriz de alginato e amido OSA, reticulados com cálcio, foi otimizada a retenção de PenG na mesma matriz porém reticulada com zinco. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2², com intuito de avaliar a concentração de cloreto de zinco e o tempo de reticulação. A concentração de alginato, amido OSA e penicilina utilizados no planejamento experimental foi a melhor condição obtida no planejamento com cloreto de cálcio. A Tabela 5.4 mostra os resultados da influência da concentração de zinco e tempo de reticulação na porcentagem de retenção da PenG.

N° Exper.	Concentração zinco (M)	Tempo de reticulação (min)	Retenção de penG (%)
1	-1(0,2)	-1(15)	61,41
2	+1 (0,4)	-1(15)	75,31
3	-1(0,2)	+1 (45)	87,11
4	+1 (0,4)	+1 (45)	73,21
5	-1,41 (0,06)	0 (30)	65,21
6	+1,41 (0,35)	0 (30)	87,89
7	0 (0,3)	-1,41 (8)	84,97
8	0 (0,3)	+1,41 (52)	74,97
9	0 (0,3)	0 (30)	90,53
10	0 (0,3)	0 (30)	93,55
11	0 (0,3)	0 (30)	92,74

Tabela 5.4. Matriz do planejamento fatorial com os valores codificados, os valores reais e os resultados experimentais.

Pode-se observar na Tabela 5.4 que os melhores resultados da porcentagem de retenção da PenG (em média 92,27%) foram obtidos no ponto central (exp. 9, 10 e 11). Os valores apresentaram uma pequena variação, indicando uma boa repetibilidade do

processo. O valor de porcentagem de retenção de PenG utilizando zinco foi semelhante ao valor de retenção utilizando cálcio como agente reticulante.

A magnitude dos efeitos estimados de cada variável é apresentada no diagrama de Pareto (Figura 5.8). Observa-se que a variável concentração de zinco foi a que apresentou um maior efeito significativo sobre a porcentagem de retenção da PenG (α = 90%). Sendo que esta varável apresentou um efeito positivo, ou seja, um aumento na concentração de zinco favorece a retenção da penG nas esferas.

Bogéa (2009) produziu micro e nanopartículas de zinco em matriz de alginato com objetivo de obter um novo produto para fortificação de alimentos com zinco. O autor variou a concentração de zinco (0,15; 0,2 e 0,3 M) e os resultados mostram que ao aumentar a concentração de zinco a retenção deste também aumentou na matriz de alginato, obtendo uma retenção final de 124,19 µg de zinco por mg de amostra. Segundo De Boisseson et al (2004), o alginato apresenta também grande afinidade com íons de zinco, sendo este ainda menos seletivo que o cálcio para estabelecer ligações, não dependendo exclusivamente das unidades de ácidos l-gulurônicos (GG), e por conta disso realizando ligações cruzadas mais extensas com o alginato.

Aslani & Kennedy (1996), avaliaram a difusão do acetaminofeno (paracetamol) em filmes de alginato contendo diferentes concentrações de íons cálcio e zinco. Para ambos os íons, ao aumentar a concentração dos cátions de 0,1 a 0,7 M, a permeabilidade do acetoaminofeno diminuiu seis vezes. Segundo os autores, quanto maior a concentração de cátions mais densamente ocorre a reticulação entre com o alginato, diminuindo a permeabilidade. Chan et al (2002) obtiveram resultados semelhantes, ao avaliar diferentes proporções de zinco e cálcio na formação de esferas de alginato, pelo método de emulsão. Os resultados mostraram que quanto maior a quantidade de íons zinco mais extensamente ocorre a reticulação do zinco com a matriz de alginato.

Como mostra a Figura 5.8, o tempo de reticulação também foi estatisticamente significativo. Porém, este apresentou um efeito negativo em relação à variável de resposta, ou seja, quanto maior o tempo de contato das esferas com a solução de cloreto de zinco, menor é a porcentagem de retenção da PenG. Resultados semelhantes foram obtidos nos experimento s com cloreto de cálcio, item 5.2.2.



Figura 5.8. Diagrama de Pareto

Para a verificação de um modelo quadrático para a retenção de penG, considerando as variáveis concentração de zinco e tempo de reticulação foram calculados os coeficientes de regressão e realizada a análise de variância (ANOVA). Os resultados estão apresentados, nas Tabela 5.5 e 5.6, respectivamente.

Tabela 5.5. Coeficientes de regressão para a porcentagem de retenção de penG.

	Regressn	Std.Err.	t(2)	р	-90,%	+90,%
Factor	Coeff.	Pure Err			Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	92,27333	0,902484	102,2437	0,000096	89,6381	94,90857
(1)Concentracao de Zn ²⁺ (M)(L)	6,96066	0,552656	12,5949	0,006245	5,3469	8,57441
Concentracao de Zn ²⁺ (M)(Q)	-8,86167	0,657793	-13,4718	0,005465	-10,7824	-6,94092
(2)Tempo de reticulacao(L)	-1,76777	0,552656	-3,1987	0,085403	-3,3815	-0,15402
Tempo de reticulacao(Q)	-7,15167	0,657793	-10,8722	0,008354	-9,0724	-5,23092
1L by 2L	-6,95000	0,781574	-8,8923	0,012412	-9,2322	-4,66781

(vermelho) valores estatisticamente significativos a 90% de confiança (p < 0,1) L – linear, Q – quadrático

Observando a Tabela 5.5 é possível perceber que os termos dos coeficientes de regressão obtidos foram estatisticamente significativos a 90% de confiança, exceto o termo linear do tempo de reticulação, sendo estes incorporados à falta de ajuste para cálculo da ANOVA apresentado na Tabela 5.6.

	R-sqr=,94319 Pure Error=2,44								
Factor	SS	df	MS	F	р				
(1)Concentracao de Zn ²⁺ (M)(L)	387,606	1	387,6063	158,6318	0,006245				
Concentracao de Zn ²⁺ (M)(Q)	443,459	1	443,4587	181,4900	0,005465				
(2)Tempo de reticulacao(L)	25,000	1	25,0000	10,2315	0,085403				
Tempo de reticulacao(Q)	288,826	1	288,8264	118,2051	0,008354				
1L by 2L	193,210	1	193,2100	79,0732	0,012412				
Lack of Fit	66,000	3	22,0000	9,0037	0,101605				
Pure Error	4,887	2	2,4434						
Total SS	1247,876	10							

Tabela 5.6. ANOVA com modelo completo para variação da porcentagem de retenção da penG.

Pelos resultados mostrados na Tabela 5.4, observa-se que o valor do teste F calculado foi maior do que o valor tabelado $F_{0,90;3;7} = 3,07$, indicando que o modelo de 2º ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo para a variável estudada. Dessa forma, a porcentagem de retenção da PenG pode ser predita em função da concentração de cloreto de zinco e o tempo de reticulação através da Equação codificada 5.2.

Retenção de PENG (%) = $92,27 + 6,96 \text{ C} - 8,86 \text{ C}^2 - 1,76\text{T} - 7,15\text{T}^2 - 6,95 (CxT)$ (5.2)

A variação explicada (\mathbb{R}^2) pelo modelo foi cerca de 95% e o coeficiente de correlação (\mathbb{R}) foi de 0,97, o que também mostra que o modelo obtido é adequado para explicar o processo estudado.

A partir do modelo obtido foi então possível obter as superfícies de resposta para analisar as melhores condições de concentração de cloreto de zinco e tempo de reticulação para a retenção de penG. A superfície de resposta obtida está apresentada na Figura 5.9. Observa-se que foi alcançada uma condição ótima para a porcentagem de retenção com concentração de cloreto de zinco de 0,3 M e tempo de reticulação de 30 minutos, utilizados no ponto central.



Figura 5.9. Superfície de resposta em função da concentração de zinco e o tempo de reticulação para a porcentagem de retenção de PenG.

5.4. Análise comparativa dos resultados obtidos nas diferentes etapas do processo de produção das microesferas e microcápsulas

A Tabela 5.7 apresenta um resumo dos resultados obtidos com maior porcentagem de retenção de PenG em matriz de alginato, amido OSA, reticulados com cálcio e zinco. A quantidade de PenG encapsulada por massa de microesferas ou microcápsulas e a relação teórica esperada entre a massa de PenG e a massa de microcápsulas também encontram-se na Tabela 5.7. Desta forma, é possível concluir que a eficiência de encapsulamento, ou seja, o quanto de PenG ficou retida na matriz após o processo de microencapsulamento, foi em média 95,13% quando utilizado matriz de alginato e amido OSA reticulados com cálcio. Nota-se que a porcentagem de retenção aumentou 1,85 vezes após o processo de otimização e o diâmetro diminuiu.

A baixa eficiência de encapsulamento nos testes preliminares é justificada por perdas de PenG durante o processo de gelificação. Diversos fatores podem influenciar as propriedades das microesferas de alginato e amido OSA e a liberação de PenG a partir delas. Esses fatores incluem concentração de cálcio, tempo de reticulação para formação da esfera, parâmetros de secagem, relação antibiótico/polímero, entre outros. Assim, experimentos envolvendo essas variáveis são importantes para o aumento da porcentagem de retenção e aperfeiçoamento do processo, até mesmo, para posterior comercialização do produto. Anal et al (2005), reportaram que ao encapsularem ampicilina em alginato, também obtiveram uma baixa eficiência de encapsulação (15 %) e atribuíram às insuficientes ligações cruzadas e à difusão durante e após gelificação permitida pela presença de poros.

annuo OSA como matriz	•			
Amostras (microesferas e microcápsulas)	mg PenG teórica /g microesferas	mg PenG real / g microesferas	Porcentagem de retenção da PenG (%)	Diâmetro das esferas secas (mm)
Teste preliminar : PenG/ Alginato/Ca ²⁺ / amido OSA ^a	300,00	$154,98 \pm 0,50$	51,66 ± 4,21	1,20 ± 0,09
Após otimização: PenG/ Alginato/Ca ^{2+/} amido OSA ^b	300,00	285,39 ± 0,42	95,13 ± 3,55	1,00 ± 0,10
PenG/Alginato/ Zn ²⁺ / amido OSA ^c	300,00	$276,81 \pm 0,60$	92,27 ± 3,60	$0,70 \pm 0,12$
PenG/Alginato/ Zn ²⁺ / amido OSA/ quitosana ^d	300,00	$271,5\pm0,55$	$90,50 \pm 2,90$	$0,70 \pm 0,10$
PenG/Alginato/amido OSA/ Zn ^{2+/} polilisina ^e	300,00	274,2 ± 1,02	91,40 ± 3,41	$0,70 \pm 0,13$

Tabela 5.7. Comparação dos resultados da porcentagem de retenção de PenG e relação teórica e real entre a massa de PenG e a massa de microcápsulas, utilizando alginato e amido OSA como matriz.

Condições experimentais:

^a Microesfera de PenG 10%, alginato 3,0 %, amido OSA 4%, CaCl₂ 0,3M, tempo de reticulação 10 min.

^b Microesfera de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, CaCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min.

^c Microesferas de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min.

^d Microcápsula de Pen G 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação 30 min, quitosana 3 mg/mL.

^e Microcápsula de Pen G 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação 30 min, polilisina 0,05%.

Ao substituir o cálcio por zinco, como agente reticulante, nota-se que ambas as matrizes proporcionaram uma eficiência de encapsulamento similar. Portanto, vale ressaltar que o diâmetro das microesferas reticuladas com zinco diminuiu. Essa diminuição no diâmetro pode ser explicada pela diferença no raio iônico do cálcio e zinco. O raio dos íons zinco (88 pm) é menor do que o raio dos íons cálcio (144 pm), apresentando uma carga nuclear efetiva maior, portanto o zinco se liga mais fortemente aos resíduos gulurônicos do alginato. De acordo com Pillay et al (2005), a interação dos íons zinco é menos seletiva e desta forma produz reticulações mais extensas com o alginato, quando comparado com o cálcio. Além do menor raio iônico, o zinco apresenta geometria cristalina distorcida (Figura 5.10.2a), favorecendo um melhor encaixe e ajuste das interações entre os íons zinco e os grupamentos carboxílicos dos resíduos manurônicos e gulurônicos. O cálcio apresenta estrutura geométrica compacta e rígida, não se ajustando. A Figura 5.10 apresenta a estrutura cristalina dos íons cálcio

e zinco e um esquema proposto por Pillay et al (2005), referente as interações do íons cálcio e zinco com o alginato.



Figura 5.10. Estrutura cristalina dos íons Ca^{2+} (1a) e Zn^{2+} (2a) (Crystal Structure of Calcium, 2013; Crystal Structure of Zinc, 2013). Representação esquemática da orientação estrutural dos íons cálcio (1b) e zinco (2b) quando em contato com o alginato (PILLAY et al, 2005).

Após a confecção e otimização das esferas de PenG em matriz de alginato, amido OSA, reticulados com cálcio e zinco, foi realizada a produção de microcápsulas. Apenas as microesferas reticuladas com zinco foram recobertas com os policátions quitosana e polilisina, pois apresentaram menor diâmetro. O procedimento foi executado em duas etapas: a primeira, gotejamento da solução de alginato/amido OSA/PenG em solução de ZnCl₂ por 10 min; a segunda, tratamento com a quitosana ou polilisina por uma hora. As microcápsulas permaneceram em solução de CaCl₂ por um período de 10 minutos enquanto que em solução de policátion, elas permaneceram por uma hora. Essa diferença nos tempos de tratamento é justificada pelas respectivas taxas de difusão dos íons cálcio e quitosana para o interior da esfera. A quitosana atua como um policátion se ligando ao alginato exatamente nas porções gulurônicas, assim como ocorre com os íons cálcio.

Os resultados mostraram (Tabela 5.7) que a porcentagem de retenção da PenG nas microcápsulas foram similares a das microesferas. Este resultado comprova que a maior perda de PenG ocorreu na primeira etapa do processo, a do gotejamento em solução de CaCl₂, já que não consta diminuição do teor de antibiótico nas microcápsulas após tratamento com os policátions.

As microcápsulas preparadas com quitosana e polilisina apresentaram uma tendência a formarem aglomerados. Este fato pode ser atribuído às propriedades

adesivas dos policátions. Uma agitação constante foi mantida para que as esferas ficassem separadas. Observações similares foram feitas por Fernandez-Hervas et al, 1998.

5.5. Avaliação *in vitro* do perfil de liberação da penicilina G das esferas de alginato/ amido OSA

O estudo do perfil de liberação *in vitro* visa avaliar a quantidade do fármaco liberado de uma forma farmacêutica por unidade de tempo, sendo utilizado após o desenvolvimento de uma forma farmacêutica. As informações obtidas permitem um controle qualitativo do sistema de liberação de um fármaco fornecendo informações para a realização de etapas posteriores como o estudo *in vivo* em animais e estudos clínicos. Esta etapa é muito importante e reduz o número de amostras necessárias para os testes *in vivo* (GORDON *et al.*, 1995; LAZARUS; COOPER, 1961).

A Figura 5.11 apresenta o perfil de liberação da penG. A capacidade total de carregamento das esferas por volume de água usada neste teste foi de 4,78 mg/mL de penG. Verificou-se que 5% da penicilina foi liberado nos primeiros minutos, o que provalvelmente corresponde à porção de penicilina adsorvida na superfície da esfera, e 8% foi liberado nas primeiras 24 horas. A penicilina foi liberada de forma gradual até atingir 65% em 432 horas, atingindo o seu valor máximo, e sua concentração se manteve constante até o tempo final do estudo (960 horas).

A liberação de um fármaco a partir de sistemas poliméricos é dependente das propriedades do polímero carreador e resulta, em sua maior parte, da interação complexa de três mecanismos: a dissolução, a difusão e a erosão. A liberação sustentada ocorre, pois a erosão da matriz polimérica é lenta e responsável pela formação de poros e canais por onde a água entra, então o fármaco é liberado por difusão.

O comportamento da liberação da penG em matriz de alginato e amido OSA também foi avaliado em solução de cloreto de cálcio 0,35 M com o intuito de avaliar se o aumento da força iônica pela presença dos íons cálcio iria influenciar na liberação da penG. A Figura 5.12 compara o perfil de liberação da penG em solução de cloreto de cálcio 0,35 M.



Figura 5.11. Perfil de liberação de penG a partir de esferas de alginato/ Ca^{2+} /amido OSA em água destilada.

Verifica-se na Figura 5.12 que não há diferença significativa no perfil de liberação da penG nos diferentes meios. Resultados semelhantes foram obtidos por Finotelli (2006), que avaliou o comportamento de liberação da insulina em matriz de alginato/quitosana em meio contendo cloreto de cálcio 2% e da mesma forma não observou diferença significativa no perfil de liberação. Acreditava-se que os íons cálcio fizessem uma pressão nas esferas de alginato, de maneira que elas retivessem o material encapsulado por mais tempo. Entretanto, isso não foi observado e a liberação em solução de cloreto de cálcio foi similar à liberação em água destilada.



Figura 5.12. Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de alginato/amido OSA, em água destilada (■) e solução de cloreto de cálcio 0,35M (●).

A Figura 5.13, mostra o comportamento de liberação da penG em matriz de alginato e amido OSA, reticulados com íons cálcio e zinco e também a liberação da PenG a partir das microcápsulas de alginato, amido OSA, reticulados com íons zinco e recobertas com quitosana. Pode-se observar que as microesferas de alginato e amido OSA reticulados com íons zinco apresentaram um perfil de liberação mais lento da PenG, quando comparado com a liberação da PenG em microesferas reticuladas com íons cálcio. Esse resultado mostra que os íons zinco são mais eficientes em manter a PenG dentro as esferas, prolongando a liberação máxima da PenG de 18 para 20 dias.

Ao recobrir as esferas com quitosana, pode-se observar na Figura 5.13, que o perfil de liberação da PenG se torna ainda mais lento e prolongado, aumentando o tempo máximo de liberação para 22 dias. A quitosana formou uma membrana ao redor das esferas, diminuindo a liberação da PenG. Entretanto ao recobrir as esferas com polilisina, não foi observada a diminuição da liberação da PenG, sendo o perfil de liberação da PenG das microcápsulas recobertas com polilisina semelhante ao perfil de liberação da PenG nas microesferas de alginato/Zn²⁺/amido OSA (dados não mostrados). Esse resultado mostra que não houve a formação de uma membrana uniforme de polilisina ao redor das microesferas. Vários fatores podem ter contribuído para não formação da membrana de polilisina, como por exemplo, a concentração de policíation.



Figura 5.13. Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de alginato/ Ca^{2+} /amido OSA (\blacklozenge), alginato/ Zn^{2+} /amido OSA (\blacklozenge) e alginato/ Zn^{2+} /amido OSA/quitosana (\blacktriangle), em água destilada.

A liberação do fármaco a partir de sistemas de liberação imediata e modificada tem sido descrita por várias teorias/modelos cinéticos, sendo f_t uma função de t (tempo) relacionada com a quantidade de fármaco liberada a partir do sistema terapêutico considerado. Existem vários modelos para representar os perfis de liberação dos fármacos, que incluem cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem, modelo de Higuchi, Korsmeyer-Peppas, entre outros (MANADAS *et al.*, 2002).

O modelo de ordem zero baseia-se na liberação lenta da substância ativa a partir de formas farmacêuticas que não se desagregam e que não atingem condições de equilíbrio, ou seja, a velocidade de difusão do fármaco, do interior para o exterior da matriz, é menor que a respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada, que permite a cedência constante do fármaco (LOPES *et al.*, 2005). Este modelo pode ser expresso pela seguinte expressão (5.3):

$$\frac{Q_t}{Q_{\infty}} = K_0 t + b \tag{5.3}$$

Onde:

 Q_t = quantidade absoluta de fármaco liberada no tempo *t*; Q_{∞} = quantidade total de fármaco liberado num tempo infinito; K_0 = constante cinética; *b* = quantidade inicial de fármaco na solução.

O modelo cinético de primeira ordem, proposto primeiramente por Garibaldi e Feldman (1967) e posteriormente por Wagner (1969), descreve a liberação nos sistemas em que a taxa de dissolução é dependente da concentração de substâncias dissolvida e diminui à medida que a concentração destas substâncias vai diminuindo, com o passar do tempo. A equação (5.4) utilizada foi:

$$\log Q_t = \log Q_0 - \frac{kt}{2,303}$$
(5.4)

Outro modelo proposto baseia-se na equação de Higuchi (1961), frequentemente utilizada para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial. A Equação 5.5 representa a equação de Higuchi expressa como fração de massa liberada.

$$\frac{Q_t}{Q_{\infty}} = K_H \sqrt{t} + b \tag{5.5}$$

 $K_{\rm H}$ corresponde à constante de liberação de Higuchi, que reflete as características do desenho da formulação. Higuchi descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo. Porém, o uso dessa relação em sistemas que intumescem pode tornar-se insuficiente, pois sistemas desse tipo podem ser erodíveis, devendo-se atender ao atributo do relaxamento das cadeias poliméricas para o transporte do fármaco. Assim, a equação de Higuchi apresenta fortes limitações na interpretação dos mecanismos de liberação controlada. Baker & Lonsdale (1974) incorporaram ao modelo de Higuchi (1963) parâmetros geométricos de matrizes esféricas, e seu modelo tem sido utilizado para linearizar resultados de ensaios de liberação de microesferas e microcápsulas.

Outro modelo baseia-se na equação semiempírica proposta por Korsmeyer *et al.* (KORSMEYER; PEPPAS, 1981; KORSMEYER *et al.*, 1983). Essa equação é utilizada para descrever a liberação do soluto quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas). Nesse modelo, a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é expressa na equação 5.6.

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = Kt^n + b \tag{5.6}$$

em que K é uma constante cinética e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco.

A Tabela 5.8 apresenta os diferentes modelos aplicados no estudo da cinética de liberação da penG. Os valores dos coeficientes de determinação ajustados foram comparados, e o modelo matemático de ordem zero apresentou o maior R²ajustado, ajustando-se melhor à cinética de liberação da penG a partir das microesferas de alginato/amido OSA, tanto reticulado com íons cálcio e zinco (Figura 5.14). As formas farmacêuticas que seguem esse perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, o qual é o modelo ideal para as formas farmacêuticas de liberação controlada, como é o caso dos comprimidos matriciais, sistemas osmóticos e das formas revestidas (VIER, 2008).

Amostra	Orden	1 zero	Primeira ordem		Hig	Higuchi		meyer - I	Peppas	Bac	ker
	% libe tempo	rada x (dias)	Log % li tempo	iberada x (dias)	% liberada x tempo (dias) ^{1/2}		Log % liberada x log tempo (dias)				
	R^2	K	R^2	K	\mathbb{R}^2	K	R^2	<i>n*</i>	K	R^2	K
I*	0,99	3,24 ± 0,07	0,83	0,12 ± 0,01	0,97	12,60 ± 0,39	0,97	0,82	5,63 ± 0,71	0,92	0
II*	0,99	$2,69 \pm 0,05$	0,88	$0,09 \pm 0,02$	0,92	10,88 ± 0,22	0,98	0,79	1,18 ± 0,65	0,87	0
III*	0,97	1,18 ± 0,08	0,94	0,09 ± 0,03	0,87	8,69 ± 0,14	0,98	0.86	0,94 ± 0,44	0,95	0

Tabela 5.8. Parâmetros cinéticos calculados para avaliação do processo de liberação da penG a partir das micresferas e microcápsulas de alginato/amido OSA.

*n: Expoente da equação de Korsmeyer-Peppas

*I: Microesfera de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, CaCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min.

*II: Microesferas de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min. *III: Microcápsula de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação 30 min, quitosana 3 mg/mL.

O modelo que retratou mais adequadamente a liberação da PenG a partir das microcápsulas de alginato/amido OSA/Quitosana foi o de Korsmeyer-Peppas (1983). Esse modelo baseia-se na Lei das Potências, que relaciona exponencialmente a liberação do fármaco com o tempo (Equação 5.6) (KORSMEYER, PEPPAS, 1981; KORSMEYER et al., 1983, SERRA et al., 2006). O modelo deve ser aplicado para os primeiros 60% de fármaco liberado (Figura 5.14). Além do modelo de Korsmeyer-Peppas, os perfis de liberação da PenG a partir das microcápsulas também se ajustaram ao modelo de cinética de ordem zero.

De acordo com Kiortsis et al (2005), a liberação controlada de polímeros hidrofílicos, devem seguir três passos. O primeiro passo é a penetração de água na matriz (hidratação). O segundo passo é o intumescimento com concomitante ou subsequente dissolução e erosão da matriz. O terceiro passo é o transporte do fármaco dissolvido através da matriz hidratada até o meio de dissolução.

O modelo proposto por Korsmeyer-Peppas é muito utilizado para vários tipos de sistemas de liberação modificada e o valor do expoente n é utilizado para caracterizar diferentes mecanismos de liberação (PEPPAS, 1985). Os diferentes valores de n para diferentes formas geométricas e os respectivos mecanismos de liberação são apresentados na Tabela 5.9 (SIEPMANN, PEPPAS, 2001).


Figura 5.14. Cinética de liberação da penG encapsulada em alginato/Ca²⁺/amido OSA (I), alginato/Zn²⁺/amido OSA (II), em alginato/Zn²⁺/amido OSA/quitosana (III).

Tabela 5.9. Expoente n da Equação de Korsmeyer-Peppas e mecanismo de liberação	o de
Fármaco.	

	Mecanismo de		
Filme fino	Cilindro	Esfera	liberação
0,5	0,45	0,43	Difusão Fickiana
0,5 < n < 1,0	0,45 < n <0,89	0,43 < n <0,85	Transporte anômalo
1,0	0,89	0,85	Transporte Caso II

Os valores do expoente *n*, obtidos de acordo com a Equação 5.6, para todas as amostras estudadas estão apresentados na Tabela 5.8. Os valores de n para as microesferas ficaram no intervalo de 0,43 < n < 0,85, indicando que o mecanismo de liberação é o transporte anômalo, sugerindo que a liberação da PenG se deve a mais de um mecanismo de liberação, como a erosão e o intumescimento, já que se trata de um mecanismo geralmente observado para formas farmacêuticas matriciais intumescíveis (MARTÍNEZ et al., 2009). O valor de n para as microcápsulas foi de 0,86, caracterizando um processo de transporte Caso II para a liberração de PenG, indicando que a liberação do antibiótico ocorre segundo um mecanismo complexo, no qual estão envolvidos a difusão, o intumescimento, a erosão e a relaxação das cadeias poliméricas.

Com o objetivo de calcular a taxa de liberação da PenG, os dados obtidos a partir da liberação da PenG foram plotados como concentração de PenG (mg.L⁻¹) versus o tempo (h). A Tabela 5.10, mostra as equações obtidas a partir das análises de regressão linear, o R^2 e a taxa de dissolução da penG (K₀).

Amostras	Equação	R ²	K ₀ (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Taxa de liberação (mg.h ⁻¹)
I*	c = 6,50t + 190,67	0,99	6,50	0,30
II* III*	c = 5,30t + 53,3 c = 4,40t - 25,4	0,99 0,98	5,30 4,40	0,18 0,07

Tabela 5.10. Equações obtidas a partir das análises de regressão linear, o coeficiente de determinação ajustado (R^2) e a taxa de dissolução do modelo de ordem zero (K).

Onde c é a concentração de penG e t é o tempo

*I: Microesfera de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, CaCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min.

*II: Microesferas de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min. *III: Microcápsula de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação 30 min, quitosana 3 mg/mL.

Assumindo que a taxa de liberação (Tabela 5.10) se mantêm constante através do processo de liberação, a duração da liberação de 100 mg de PenG encapsulada em matriz de alginato/Ca²⁺/amido OSA, alginato/Zn²⁺/amido OSA e alginato/Zn²⁺/amido OSA /quitosana é calculado como 769,23 h (32 dias), 909,09 h (37 dias), 1010,10 h (42 dias), respectivamente. Dessa forma, as microesferas e microcápsulas produzidas permitiram uma gradual liberação da PenG, com possível aplicação em implantes subdérmicos.

5.6. Avaliação *in vitro* do perfil de liberação da penicilina G das esferas de alginato/ amido OSA encapsuladas em diferentes membranas nanoporosas

Após a verificação da liberação de PenG a partir das microesferas e microcápsulas, foi avaliado o perfil de liberação colocando uma segunda barreira difusional, as membranas nanoporosas. A Figura 5.15 mostra o perfil de liberação da PenG em matriz de alginato/ Zn^{2+} /amido OSA encapsuladas em diferentes nanomembranas. A capacidade total de carregamento das esferas por volume de água usada neste teste foi de 18,55 mg.mL⁻¹ de penG. Vale ressaltar que a penG só começou a ser liberada após 2; 1,5; 1,0 e 0,5 horas após o contato com a água quando se utilizou a membrana DSS, a de 50, 100 e 220 nm, respectivamente. Esse tempo é necessário para a entrada da água, intumescimento das esferas e posterior liberação do antibiótico.

Verifica-se na Figura 5.15 que ao utilizar a membrana DSS, a penG foi liberada de forma mais lenta, quando comparado às outras membranas. A penG foi liberada de forma gradual até atingir 52,45% em 792 horas (33 dias), atingindo o seu valor máximo, e sua concentração se manteve constante até o tempo final do estudo (960 horas). O melhor resultado foi obtido com a membrana DSS provavelmente devido a sua composição em três camadas, o que faz com que a porcentagem de porosidade seja menor do que com as outras membranas. Pode-se observar na Figura 5.15 que quanto maior a porosidade da membrana mais rápido foi a liberação da penG.

A Figura 5.16, mostra o perfil de liberação da PenG em matriz de alginato/Zn²⁺/amido OSA encapsuladas em membrana DSS, utilizando meio biológico simulado (SBF) e água destilada. Verifica-se que a penG foi liberada de forma gradual, porém quando se utiliza o SBF, ocorreu uma liberação mais rápida da penG. A liberação da penG em meio SBF ocorreu após 50 min de contato inicial, enquanto que com a água a liberação inicial ocorreu após 2 horas de contato. Esse resultado pode ser atribuído a presença dos íons fosfato no meio SBF. Assim como os íons zinco se difundem para o interior da esfera para formar alginato de zinco no processo de gelificação, os mesmos íons zinco vão se difundindo para o exterior da esfera para se ligarem aos íons fosfato. Este processo inverso de "desgelificação" é muito lento, pois a rigidez intrinseca da cadeia polimérica não permite a entrada de uma grande quantidade de meio SBF. Na presença do meio SBF a liberação também foi gradual, porém a liberação máxima de 52,5% ocorreu em 600 h (25 dias) de ensaio. Portanto, quando se utiliza meio biológico simulado ao invés de água destilada, a liberação máxima passa de 33 dias para 25 dias de liberação controlada do antibiótico.



Tempo (h)

Figura 5.15. Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de alginato/ Zn^{2+} /amido OSA, encapsuladas em diferentes nanomembranas, utilizando água destilada como meio de dissolução.



Figura 5.16. Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de alginato/ Zn^{2+} / amido OSA, encapsuladas em membrana DSS, utilizando água destilada e SBF como meio de dissolução.

Ao avaliar a liberação da penG a partir das microesferas recobertas com quitosana, pode-se observar que o tempo de liberação máxima da penG aumentou de 25 para 28 dias, quando em meio SBF (Figura 5.17). A presença de um filme de quitosana

na superfície das esferas dificulta a liberação da penG. Outro fator que possivelmente influenciou a liberação de penG é que a quitosana é pouco solúvel no pH 7,4. Nota-se também que houve diferença na liberação utilizando diferentes meios de dissolução.

A Tabela 5.11 apresenta os valores dos coeficientes de determinação ajustado (\mathbb{R}^2), assim como as constantes de liberação (\mathbb{K}) dos diferentes modelos aplicados no estudo da cinética de liberação da penG, em meio SBF. Os valores \mathbb{R}^2 foram comparados, e o modelo matemático de ordem zero apresentou o maior \mathbb{R}^2 ajustado, ajustando-se melhor à cinética de liberação da penG (Figura 5.18).



Tempo (h)

Figura 5.17. Comparação dos perfis de liberação da penG em matriz de alginato/ Zn^{2+} / amido OSA/Quitosana, encapsuladas em membrana DSS, utilizando água destilada e SBF como meio de dissolução.

Tabela 5.11. Parâmetros cinéticos calculados para avaliação do processo de liberação da penG a partir das micresferas e microcápsulas de alginato/amido OSA.

Amostra	Orden	n zero	Primeira ordem		Higuchi		Korsmeyer - Peppas		Backer	
	% libe temp	rada x o (h)	Log % 1 temp	Log % liberada x tempo (h)		perada x po $(h)^{1/2}$	Log % lib temp	erada x log oo (h)		
	\mathbf{R}^2	K	\mathbf{R}^2	K	\mathbf{R}^2	K	\mathbf{R}^2	K	\mathbf{R}^2	K
Microes	0,98	$0,08 \pm$	0,82	0,12 ±	0,93	9,47 ±	0,97	$0,58 \pm$	0,9	0
fera*		0,02		0,01		0,44		0,71		
Microcá	0,99	$0,07 \pm$	0,83	0,00	0,93	7,56±	0,95	$0,59 \pm$	0,89	0
psula*		0.01				0.22		0.06		

*Microesferas de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min.

* Microcápsula de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação 30 min, quitosana 3 mg/mL.



Figura 5.18. Cinética de liberação da penG a partir da microesfera (alginato/ Zn^{2+} /amido OSA) e microcápsula (alginato/ Zn^{2+} /amido OSA/quitosana), encapsuladas em membranas DSS. Meio de dissolução: SBF.

A taxa de liberação da penG foi de 0,61 mg.h⁻¹ e 0,57 mg.h⁻¹, para a microesfera (alginato/ Zn^{2+} /amido OSA) e microcápsula (alginato/ Zn^{2+} /amido OSA/quitosana), encapsuladas em membranas DSS, respectivamente. Assumindo que a taxa de liberação se mantêm constante através do processo de liberação, a duração da liberação de 742 mg de PenG encapsulada é calculado como 1.204,54 h (50 dias) e 1,297,20 h (54 dias) para a microesfera e microcápsula, respectivamente.

A medicação comercial utilizada atualmente, para tratamento profilático da febre reumática é uma injeção intramuscular de penG benzatina. Essa formulação contém uma massa de penG de 715,85 mg e o tempo de liberação controlada é de 21 dias. Portanto, no presente trabalho foi desenvolvido um sistema de liberação controlada da penG, com potencial de liberação até 54 dias, com possível aplicação em implantes subdérmicos.

Os estudos de liberação *in vitro* constituíram um passo importante, considerando que o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial da utilização do sistema matricial como veículo para liberação controlada da penG. Porém, o estudo *in vivo* é necessário para predizer o tempo de sustentação no organismo, avaliando a biodisponibilidade e a biodistribuição.

5.7. Otimização da retenção de PenG em esferas de alginato/IPE reticulados com cálcio

5.7.1. Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Com o intuito de maximizar a quantidade de penG nas esferas de alginato/IPE, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2⁴. Os resultados da influência de fatores como concentração de alginato, IPE, penG e cloreto de cálcio sobre a retenção de penG nas esferas podem ser visualizados na Tabela 5.12.

N°	Alginato	IPE	Penicilina G	[CaCl ₂]	% de
Exper.	(%)	(%)	(%)	(M)	retenção
1	2	3,5	8	0,2	23,32
2	4	3,5	8	0,2	51,33
3	2	4,5	8	0,2	41,58
4	4	4,5	8	0,2	68,20
5	2	3,5	12	0,2	14,67
6	4	3,5	12	0,2	51,65
7	2	4,5	12	0,2	25,63
8	4	4,5	12	0,2	81,30
9	2	3,5	8	0,45	25,03
10	4	3,5	8	0,45	52,65
11	2	4,5	8	0,45	42,59
12	4	4,5	8	0,45	68,81
13	2	3,5	12	0,45	16,18
14	4	3,5	12	0,45	52,76
15	2	4,5	12	0,45	26,43
16	4	4,5	12	0,45	78,02
17	1	4	10	0,3	8,02
18	5	4	10	0,3	32,03
19	3	3	10	0,3	29,99
20	3	5	10	0,3	57,11
21	3	4	6	0,3	60,31
22	3	4	14	0,3	44,47
23	3	4	10	0,2	38,49
24	3	4	10	0,5	45,61
25 (C)	3	4	10	0,3	34,78
26 (C)	3	4	10	0,3	35,64
27 (C)	3	4	10	0,3	36,11

Tabela 5.12. Matriz do planejamento fatorial com os valores reais e os resultados experimentais

As maiores porcentagens de retenção (81,30% e 78,02%) foram obtidas nos experimentos 8 e 16, quando se utilizaram as variáveis alginato, IPE e concentração de

penG no nível +1 do planejamento de experimentos. Além disso, os ensaios que foram realizados com menores níveis de IPE e alginato resultaram em uma menor retenção da penG nas esferas.

A Figura 5.19 apresenta o diagrama de Pareto do planejamento experimental, com cálculo considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis. Analisando o diagrama, observa-se que a variável concentração de alginato foi a que apresentou um maior efeito significativo sobre a variável de resposta ($\alpha = 95\%$), com uma magnitude duas vezes maior que aquela observada para a concentração de IPE, ambas com um efeito positivo.



Figura 5.19. Diagrama de Pareto para a variável de resposta porcentagem de retenção.

No entanto, as variáveis concentração de penG e cloreto de cálcio apresentaram um efeito negativo sobre a variável de resposta.

O efeito positivo do alginato corrobora com os resultados anteriormente observados na retenção da penG em matriz de alginato/amido OSA. Vários trabalhos na literatura reportam o efeito positivo do alginato no encapsulamento de substâncias. ARICA *et al.* (2002) utilizaram alginato em diferentes concentrações para encapsular o 5-fluoracil, fármaco utilizado para o tratamento do câncer de mama. O autor alcançou uma eficiência de encapsulamento de 10% de fluoracil em alginato (2%).

Possivelmente, ao aumentar a concentração de alginato, há maior viscosidade, e o papel da viscosidade parece exercer forte influência sobre a retenção de materiais encapsulados. Segundo RÉ (1998), quando a viscosidade é baixa em pequenas concentrações de alginato, pode ocorrer uma mixagem interna dos componentes durante a gelificação, o que retarda a formação de uma superfície semipermeável, produzindo

baixa retenção. Se a viscosidade é aumentada, a retenção também se eleva. Entretanto, um aumento adicional da viscosidade pode causar a redução de retenção, resultante de dificuldades na formação das gotículas durante a extrusão. Os dados aqui apresentados estão em acordo com tais citações, ou seja, à medida que a viscosidade foi elevada, houve o aumento da retenção, até o ponto em que ocorreu o decréscimo desta.

O efeito positivo do isolado proteico de ervilha (IPE) frente à porcentagem de retenção pode ser atribuído a sua interação com o alginato. Como mostra o gráfico de Pareto, a interação entre estes foi estatisticamente significativa e positiva. Além dos íons cálcio, as proteínas apresentam forte interação com as cadeias de alginato, pela presença de cargas positivas dos aminoácidos.

Na literatura, existem trabalhos de micro e nanoesferas de alginato associadas com proteínas. Interações entre albumina e alginato foram descritos por Neiser *et al.* (1999) e Leonard *et al.* (2004). Estudos de encapsulamento de insulina foram realizados por Finotelli (2006), Silva *et al.* (2006) e Sarmento *et al.* (2006). Camilo (2007) utilizou uma combinação de pectina e caseína, um complexo de carboidrato e proteína para encapsulamento do fármaco aciclovir por *spray drying*, obtendo uma eficiência de encapsulamento de 68%.

Pierucci *et al* (2006 e 2007) utilizaram o concentrado proteico de ervilha (com 82% de proteína) obtido a partir de ervilhas amarelas (*Pisum sativum*) e maltodextrina como material de parede para o microencapsulamento por *spray drying* do ácido ascórbico e tocoferol. O autor alcançou uma porcentagem de retenção de 95,88% para o ácido ascórbico nas micropartículas e 77,8% para o tocoferol. Pereira *et al.* (2009) utilizaram o isolado proteico de ervilha (composto por 90% de proteína) em combinação com a maltodextrina para o microencapsulamento do ácido ascórbico por *spray drying*, resultando em uma eficiência de encapsulamento de 69%.

A concentração de penG apresentou um efeito negativo, ou seja, quanto maior a concentração de penG, menor a porcentagem de retenção. Resultados similares foram obtidos na otimização das esferas de alginato/ amido OSA. O melhor resultado foi obtido com 12% de penG (exp. 8), porém, ao aumentar a concentração para 14%, a porcentagem de retenção foi para 44,47% (exp.22). O aumento da relação polímero/fármaco possibilita um maior envolvimento do fármaco pelos polímeros encapsulantes, agindo como barreira protetora, prevenindo a difusão para a solução de cloreto de cálcio durante a gelificação, aumentando a eficiência de encapsulamento à medida que aumenta essa relação.

O termo linear da concentração de cloreto de cálcio não foi estatisticamente significativo, mostrando que na faixa estudada esse termo não promove alterações significativas na porcentagem de retenção da penG.

Para verificação de um modelo quadrático para a porcentagem de retenção da penG, considerando as concentrações alginato, IPE e penG e cloreto de cálcio, foram calculados os coeficientes de regressão e realizada análise de variância (Tabela 5.13).

Tubera etter fille etter para a porcentagem de retenção de pene									
Fator	SS	df	MS	F	р				
(1) Alginato (L)	6577,5	1	6577,5	14459,4	0,000069				
(2) IPE (L)	1653,6	1	1653,6	3635,2	0,000275				
IPE (Q)	113,6	1	113,6	249,8	0,003978				
(3) Penicilina G (L)	142,7	1	142,7	313,9	0,003171				
Penicilina G (Q)	461,7	1	461,7	1015,0	0,000984				
[CaCl2] (Q)	141,2	1	141,2	310,7	0,003204				
1L x 2L	59,6	1	59,6	131,1	0,007537				
1L x 3L	327,0	1	327,0	718,9	0,001388				
Falta de ajuste	273,5	16	17,0	2,21	0,076214				
Erro Puro	0,9	2	0,4						
Total SS	9559,9	26							

Tabela 5.13. ANOVA para a porcentagem de retenção de penG

 $F_{0.05; Tab} = 6,59$; Coeficiente de correlação: R² = 97%; p-valor < 0,005

Pelos resultados mostrados na Tabela 5.13, observa-se que o valor do teste f calculado foi cerca de 37 vezes maior do que o valor tabelado, indicando que o modelo de 2^{a} ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo para a variável estudada. Dessa forma, a porcentagem de retenção da penG nas esferas pode ser predita em função da concentração de alginato, IPE, penG e cloreto de cálcio através da equação 5.7. A variação explicada (R²) pelo modelo foi muito boa, cerca de 97%, o que mostra que os modelos obtidos são adequados para explicar o processo estudado.

Onde: x₁: concentração de alginato x₂: concentração de IPE x₃: concentração de penG x₄: concentração de cloreto de cálcio

A partir do modelo obtido foi então possível obter as curvas de contorno para analisar as melhores condições da concentração de alginato e IPE, que levam aos maiores valores de porcentagem de retenção. As curvas de contorno obtidas estão apresentadas na Figura 5.20.



Figura 5.20. Curvas de contorno da porcentagem de retenção de penG em relação às concentrações de alginato e IPE.

É possível verificar que tanto para a concentração de alginato quanto para a de IPE, uma faixa restrita localizada nos maiores níveis de concentração proporcionou um incremento na retenção de penG. Estudos com aumentos na concentração desses materiais de parede favoreceriam a retenção de penG nas esferas, porém um aumento desses materiais elevaria a viscosidade da solução e, desta forma, dificultaria a extrusão da solução pela agulha da seringa, impedindo a formação das esferas.

Observa-se que foi alcançada uma condição ótima para a retenção de penG (81%) com concentração de alginato a 4%, IPE a 4,5%, e cloreto de cálcio a 0,2M.

Após a obtenção da condição ótima, foi realizado cinco experimentos com intuito de avaliar a influência do tempo de reticulação da solução de alginato/IPE/PenG com a solução de cloreto de cálcio.

A Figura 5.21 mostra que ao variar o tempo de reticulação, não houve aumento da porcentagem de retenção da PenG em relação aos 81% obtidos no planejamento de experimentos. Pode-se observar que ao aumentar o tempo de contato das esferas de 30 para 43 e 52 minutos a retenção de PenG nas esferas diminuiu. Resultados semelhantes foram obtidos com as esferas de alginato e amido OSA, item 5.2.



Figura 5.21. Porcentagem de penG retida nas esferas de alginato (4%)/ IPE (4,5%) em função do tempo de reticulação com solução de cloreto de cálcio (0,2M).

5.7.2. Avaliação da influência do pH

O estudo da influência do pH na retenção da penG nas esferas de alginato/IPE é determinante para as interações entre o alginato/IPE e IPE/penG, principalmente no que se refere ao IPE, sendo este constituído predominantemente pela vicilina, uma proteína de armazenamento da ervilha.

Tipicamente, as proteínas possuem em sua superfície grupos carregados e polares que favorecem termodinamicamente as interações eletrostáticas e polares com a água. A carga líquida de uma proteína é a soma das cargas individuais dos grupos dos resíduos de aminoácidos que, por sua vez, dependem do pH do meio, uma vez que possuem comportamento ácido-base fraco (LEHNINGER *et al.* 2006). A modificação do pH da solução altera a carga elétrica das proteínas, favorecendo ou desfavorecendo as interações eletrostáticas com o alginato e a penG.

Para avaliar a influência do pH na retenção de penG, as condições otimizadas no planejamento (4% de alginato, 4,5% de IPE, 12% de penG e 0,3 M de cloreto de cálcio) foram utilizadas, variando-se o pH inicial de 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0.

A Figura 5.22 apresenta a porcentagem de retenção da penG nas esferas em função do pH. Pode-se verificar que as menores retenções de penG ocorreram em pH acima de 5,5, com retenção mínima de 34,66% no pH 9,0. Esse resultado pode ser atribuído ao ponto isoelétrico da vicilina, que ocorre em pH 5,5. No ponto isoelétrico, a

carga líquida da proteína se iguala a zero e a repulsão entre as moléculas é mínima, a solubilidade da proteína tende a ser mínima e as interações eletrostáticas são desfavorecidas. O decréscimo da solubilidade no ponto isoelétrico reflete o fato de que as moléculas individuais da proteína, que teriam cargas similares, cessam de repelir uma a outra e precipitam, tornando-se dificultosa a interação com outras moléculas. Na medida em que se aumenta o pH da solução, as cargas líquidas das proteínas vão se tornando negativas, devido à desprotonação dos grupos ionizáveis. Essa condição não favorece a interação do IPE com o alginato, pois há repulsão eletrostática entre os grupos carboxílicos do alginato e as cargas negativas da vicilina, diminuindo a retenção para 45,27%, no pH 6,0, e 34,66%, no pH 9,0.



Figura 5.22. Efeito do pH na porcentagem de retenção da penG nas esferas de alginato/IPE.

As maiores retenções de penG ocorreram em pH abaixo de 5,0, com retenção máxima de 87,77% no pH 4,0. Em pH abaixo do ponto isoelétrico há predominância de cargas positivas na proteína, favorecendo a interação destas com o alginato e a penG. Da mesma forma, Pierrucci *et al.* (2007) observaram que a retenção de ácido ascórbico foi favorecida em pH ácido ao se utilizar concentrado proteico de ervilha como material de parede.

A combinação dos polímeros alginato e IPE permitiu a obtenção de esferas de aparência esférica e bastante regular, com cerca de 2.4 ± 0.2 mm de diâmetro (Figura 5.23).



Figura 5.23. Esferas de alginato e IPE contendo penicilina G encapsulada.

Logo após a secagem em estufa a 37°C, as esferas assumiram um diâmetro de 0,8 mm com a perda de água. A massa de penG encapsulada em 430 esferas no presente trabalho foi de 804,92 mg, sendo 0,73 mL o volume ocupado pelas esferas.

5.8. Otimização da retenção de PenG em esferas de alginato/IPE reticulados com zinco

Com intuito de maximizar a retenção de PenG em matriz de alginato e IPE reticulados com zinco, foi realizado um DCCR 2^2 . A Tabela 5.14 mostra os resultados experimentais, assim como os valores reais e codificados das variáveis independentes.

N° Exper.	Concentração zinco (M)	Tempo de reticulação (min)	Retenção de penicilina G (%)
1	-1 (0,1)	-1 (15)	68,67
2	+1 (0,3)	-1 (15)	62,69
3	-1 (0,1)	+1 (45)	72,67
4	+1 (0,3)	+1 (45)	66,69
5	-1,41 (0,06)	0 (30)	66,12
6	+1,41 (0,35)	0 (30)	77,00
7	0 (0,2)	-1,41 (8)	69,21
8	0 (0,2)	+1,41 (52)	60,75
9	0 (0,2)	0 (30)	78,50
10	0 (0,2)	0 (30)	80,30
11	0 (0,2)	0 (30)	81,20

Tabela 5.14. Matriz do planejamento fatorial com os resultados experimentais, valores reais e codificados.

Observa-se na Tabela 5.14 que os melhores resultados foram obtidos no ponto central, em média 80% de retenção de PenG. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando o cálcio como agente reticulante, item 5.7.

Pillay et al (2005), produziu microesferas de alginato e pectina reticulados com Zn^{2+} contendo o anti-inflamatório ibuprofeno. A porcentagem de retenção do ibuprofeno em matriz de alginato foi de 69,36% enquanto que em matriz de pectina foi de 52,58%.

A Figura 5.24 apresenta o diagrama de Pareto do planejamento experimental. Analisando o diagrama, observa-se que a variável tempo de reticulação foi a que apresentou um maior efeito significativo sobre a variável de resposta ($\alpha = 95\%$). O tempo de reticulação apresentou um efeito negativo, indicando que um aumento no tempo de gelificação de 8 para 52 minutos, diminui a porcentagem de retenção. Para a concentração de cloreto de zinco o efeito foi positivo, mostrando que um aumento na concentração de zinco leva a um aumento da porcentagem de reticulação. Entretanto a interação da concentração de cloreto de zinco e tempo de reticulação não foi estatisticamente significativos.



Figura 5.24. Diagrama de pareto

Através dos resultados obtidos foi possível obter os coeficientes de regressão de um modelo de segunda ordem. Ignorando os fatores não-significativos (p < 0,05), obtemos o modelo com as variáveis codificadas, como mostra a equação X.

% Retenção PenG =
$$80,00 + 2,92 x_1 - 4,36 x_1^2 - 2,99 x_2 - 7,65 x_2^2$$
 (5.8)

Onde:

x₁: Concentração de cloreto de zinco

x₂: Tempo de reticulação

Verifica-se pela tabela de análise de variância (Tabela 5.15) que os modelos são adequados para descrever os dados e construir a superfície de resposta.

Fator	SS	df	MS	F	р
(1) Concentração de cloreto de zinco (L)	68,36	1	68,36	36,17	0,0265
Concentração de cloreto de zinco (Q)	107,71	1	107,71	56,99	0,0170
(2)Tempo de reticulação (L)	71,52	1	71,52	37,84	0,0254
Tempo de reticulação (Q)	331,12	1	331,12	175,20	0,0056
1L x 2L	0,00	1	0,00	0,00	1,0000
Falta de ajuste	7,51	3	2,50	1,32	0,4572
Erro Puro	3,78	2	1,89		
Total SS	509,97	10			

Tabela 5.15. ANOVA para a porcentagem de retenção de penicilina G

 $F_{0.05; Tab} = 5,41$; Coeficiente de correlação: $R^2 = \overline{97\%}$; p-valor < 0,005

Através da análise de superfície de resposta (Figura 5.25), verifica-se que o máximo valor da porcentagem de retenção de PenG, dentro da faixa estudada, foi obtido no ponto central. Portanto a retenção de PenG foi otimizada utilizando o tempo de reticulação de 30 minutos e a concentração de cloreto de zinco de 0,2M.



Figura 5.25. Superfície de resposta para a porcentagem de retenção da PenG em relação as variáveis concentração de zinco e tempo e reticulação.

Após a otimização da concentração de cloreto de zinco e o tempo de reticulação foi realizado um estudo avaliando a influência do pH na retenção da penG nas esferas de alginato/IPE.

Para avaliar a influência do pH na retenção de penG, as condições otimizadas no planejamento (4% de alginato, 4,5% de IPE, 12% de penG e 0,2 M de cloreto de zinco e tempo de reticulação de 30 min) foram utilizadas, variando-se o pH inicial de 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0.

A Figura 5.26 apresenta a porcentagem de retenção da penG nas esferas em função do pH. Pode-se verificar que as maiores retenções de penG ocorreram em pH abaixo de 5,5, com retenção máxima de 85,25 % no pH 4,5. Esses resultados foram semelhantes ao obtido com solução de cloreto de cálcio como agente reticulante, mostrando que a variação de pH influencia na porcentagem de retenção.



Figura 5.26. Efeito do pH na porcentagem de retenção da penG nas esferas de alginato/IPE.

A combinação dos polímeros alginato e IPE contendo PenG , reticulados com zinco permitiu a obtenção de esferas de aparência esférica e bastante regular, com cerca de 2.5 ± 0.3 mm de diâmetro. Resultados similares foram obtidos com o cálcio como agente reticulante. Porém logo após a secagem em estufa a 37°C, as esferas assumiram um diâmetro de 0,7 mm com a perda de água. A massa de penG encapsulada em 430 esferas no presente trabalho foi de 804,92 mg, sendo 0,55 mL o volume ocupado pelas esferas.

5.9. Avaliação *in vitro* do perfil de liberação da penG das esferas de alginato/ IPE.

Após a otimização da retenção da penG nas esferas de alginato/IPE, reticulados com íons cálcio e zinco, foi realizado o teste de avaliação do perfil de liberação *in vitro* da PenG. Esse teste serve para avaliar a quantidade de substâncias ativas liberadas por unidade de tempo. O ensaio de liberação foi realizado em água como meio de dissolução. O ensaio não foi realizado em tampão fosfato, pois nesse meio as esferas se rompem.

A Figura 5.27 apresenta o perfil de liberação da penG. A capacidade total de carregamento das esferas por volume de água usada nesse teste foi de 5,22 mg/mL de penG. Verifica-se na Figura 5.18 que 17% da PenG em matriz de alginato/Ca²⁺/IPE foi liberada nos primeiros minutos, o que corresponde à porção de PenG adsorvida na superfície da esfera, e 21 % foi liberado nas primeiras 24 horas. A PenG foi liberada de forma gradual até chegar a 53% em 96 horas, atingindo o seu valor máximo, e sua concentração se manteve constante até o tempo final do estudo (600 horas).

Ao analisar o perfil de liberação da PenG apartir das microesferas de alginato/IPE reticulados com íosn zinco, observa-se que 10% da PenG foi liberada nos primeiros minutos e apenas 15% nas primeiras 24 horas. Esse resultado mostra que os íons zinco também foram mais efetivos em reter a PenG em relação aos íons cálcio, resultados similares foram obtidos com a matriz alginato/amido OSA. Pode-se observar na Figura 5.27 que a PenG foi liberada de forma gradual até chegar a 50% em 144 horas, atingindo o seu valor máximo, e sua concentração se manteve constante até o tempo final do estudo (552 horas).

Vários trabalhos na literatura relatam o efeito de liberação inicial brusca, também denominado *burst effect*, a partir de matriz alginato. Esse efeito é frequentemente encontrado em liberação de substâncias a partir de hidrogéis formados por matrizes poliméricas incháveis, como é o caso do alginato. Esse efeito é motivado ou pela liberação do fármaco existente à superfície do sistema matricial ou por alterações que se verificam na estrutura do sistema com consequente liberação imediata do fármaco seguida de liberação mais lenta (LOPES *et al.*, 2005).

Leonard et al.(2004) afirmaram que, em geral, biomoléculas que não interagem ionicamente com as cargas negativas do alginato são rapidamente liberadas (em algumas horas), e os perfis de liberação são frequentemente caracterizados por um efeito brusco de saída, o qual não foi observado no trabalho.



Figura 5.27. Concentração (a) e porcentagem (b) acumulativa de penG liberada a partir de esferas de alginato/ Ca^{2+} /IPE alginato / IPE (\blacklozenge), alginato/ Zn^{2+} /IPE reticulados (\blacktriangle).

A interpretação quantitativa dos valores obtidos em um ensaio de liberação é facilitada pelo uso de equações que traduzem matematicamente a curva de liberação em função de alguns parâmetros relacionados à forma farmacêutica e devem, assim, contribuir para o esclarecimento do mecanismo de liberação do fármaco.

Na Tabela 5.16 são apresentados os diferentes modelos matemáticos e os parâmetros cinéticos calculados para avaliação do processo de liberação da penG a partir das micresferas de alginato/IPE, reticulados com zinco e cálcio. O modelo que retratou mais adequadamente a liberação da penG de ambas as matrizes poliméricas foi o de ordem zero, com o coeficiente de correlação da equação de 0,98 (Figura 5.28).

O modelo de ordem zero é geralmente utilizado para descrever a liberação por vários tipos de formas farmacêuticas de liberação controlada, como no caso de comprimidos matriciais, dos sistemas osmóticos, das formas revestidas e de micropartículas poliméricas (VARELAS *et al.*, 1995). De maneira ideal, as preparações destinadas a veicular substâncias ativas segundo liberação prolongada apresentam um perfil de liberação de ordem zero, verificando-se que a velocidade de difusão do fármaco, do interior para o exterior da matriz, é menor que a respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada, que permite a cedência constante do fármaco.

Amostra	Orde % lib temj	Ordem zero % liberada x tempo (h)		meira dem liberada npo (h)	Higuchi % liberada x tempo (h) ^{1/2}		Kors Pe Log % x log t	meyer - ppas liberada empo (h)	Bacl	ker
	R^2	K	\mathbb{R}^2	K	R^2	K	R^2	K	R^2	K
V*	0,98	0,38 ± 0,10	0,97	0,0055 ±0,01	0,91	3,76 ± 0,39	0,85	0,26 ± 0,71	0,94	0
VI*	0,98	$0,29 \pm 0,08$	0.96	0,0059 ± 0,02	0,90	2,75 ± 0,22	0,85	$0,12\pm 0,65$	0,88	0

Tabela 5.16. Coeficientes lineares dos ajustes das curvas de liberação com os modelos matemáticos testados.

*V: Microesferas de PenG 12%, alginato 4%, IPE 4.5 %, CaCl₂ 0,2 M, tempo de reticulação de 17 min.

*VI: Microcápsula de PenG 12%, alginato 4,5%, IPE 4.5 %, ZnCl₂ 0,2 M, tempo de reticulação 17 min.



Figura 5.28. Cinética de liberação da penG encapsulada em alginato/ Ca^{2+} /IPE (V) alginato/ Zn^{2+} /IPE (VI), modelo de ordem zero.

A Tabela 5.17 mostra as equações, o R^2 e a taxa de dissolução (K₀), obtidas a partir das análises de regressão linear dos gráficos plotados como concentração de PenG (mg.L⁻¹) versus o tempo (h). Assumindo que a taxa de liberação (Tabela 5.17) se mantêm constante através do processo de liberação, a duração da liberação de 100 mg de PenG encapsulada em matriz de alginato/Ca²⁺/IPE e alginato/Zn²⁺/IPE é calculado como 250 h (10 dias), 333,33 h (14 dias), respectivamente. Dessa forma, as microesferas e microcápsulas produzidas permitiram uma gradual liberação da PenG, com possível aplicação em implantes subdérmicos.

Amostras	Equação	R ²	K ₀ (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Taxa de liberação (mg.h ⁻¹)
V*	c = 20,1t + 850,0	0,98	20,1	0,40
VI*	c = 15,2t + 542	0,98	15,2	0,30

Tabela 5.17. Equações obtidas a partir das análises de regressão linear, o coeficiente de determinação ajustado (R^2) e a taxa de dissolução do modelo de ordem zero (K).

Onde c é a concentração e t é o tempo

*V: Microesferas de PenG 12%, alginato 4%, IPE 4.5 %, CaCl₂ 0,2 M, tempo de reticulação de 17 min.

*VI: Microcápsula de PenG 12%, alginato 4,5%, IPE 4.5 %, ZnCl₂ 0,2 M, tempo de reticulação 17 min.

5.10. Avaliação in vivo da hipernocicepção

A avaliação da hipernocicepção foi realizada no intuito de investigar o potencial analgésico dos biopolímeros utilizados no trabalho, assim como o potencial das microesferas produzidas.

Atualmente, é dada grande ênfase a estudos de substâncias naturais que possam potencialmente apresentar atividade analgésica, e claramente venham representar uma alternativa eficaz, segura e menos onerosa à população. A administração de alguns medicamentos como, por exemplo, a injeção intramuscular de penG benzatina, frequentemente provoca dor no local da administração. A grande inconveniência provocada pela dor no local de aplicação, induz os pacientes ao abandono da terapêutica (Oliveira et al., 2005). Acredita-se que o microencapsulamento de fármacos utilizando materiais de parede com capacidade analgésica é uma alternativa para o problema enfrentado pela clínica médica no que tange a adesão dos pacientes ao tratamento de doenças que exigem tratamento dolorido.

Inicialmente foi avaliada a atividade antinociceptiva de diferentes biopolímeros. A Figura 5.29 mostra o efeito de diferentes biopolímeros sobre o limiar da dor por meio da estimulação mecânica nocipectiva. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada em diferentes tempos após incisão intraplantar. Os resultados são relacionados à pressão mecânica (g) aplicado na superfície intraplantar. Quanto menor for a força (g) necessária para produzir a reação da retirada da pata, maior é a intensidade de hipernocicepção. Os resultados monstraram que os biopolímeros maltodextrina, pectina, CMC e o IPE não foram capazes de suprimir a resposta hipernociceptiva.



Tempo após a cirurgia (min)

Figura 5.29. Efeito de diferentes biopolímeros (\circ) sobre o limiar da dor, estimulação mecânica nocipectiva. (a) Maltodextrina (b) pectina (c) Carboximetilcelulose – CMC (d) IPE (e) amido OSA (f) alginato e (g) Quitosana. A avaliação da atividade antinociceptiva foi determinada antes (PRE) e 30, 60, 90 e 120 minutos após o procedimento cirúrgico. O controle (\bullet) foi realizado na pata direita com um corte e sutura.

Pode-se observar na Figura 5.29 que os biomateriais amido OSA, alginato e quitosana foram capazes de suprimir a resposta hipernociceptiva mecânica, provocando um efeito analgésico após 30 minutos de implantação nos ratos.

Experimentalmente, o controle farmacológico periférico da dor inflamatória é baseado em duas estratégias principais: a primeira é o uso de drogas que previnem a sensibilização dos nociceptores, tal como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), conhecidos como *aspirin-like*. O mecanismo de ação destas drogas está ligado à inibição da síntese de prostaglandinas (PGs) por inibição da enzima responsável por sua produção, a ciclooxigenase (COX). Desta forma, por inibirem a formação de mediadores hiperalgésicos finais, essas drogas previnem a sensibilização dos nociceptores e, consequentemente, bloqueiam a hiperalgesia inflamatória. A segunda estratégia é o bloqueio da sensibilização dos nociceptores já instalada. Entre essas drogas, podemos destacar as de ação periférica, como a morfina (opióides), dipirona e diclofenaco. Estes fármacos revertem a hipernocicepção já estabelecida, previamente induzida pelos mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (Dip et al., 2012).

A Figura 5.30 mostra o possível alvo de ação dos biomateriais sobre a nocicepção. Após a lesão tecidual, os nociceptores são sensibilizados. Os mecanismos envolvidos na sensibilização dos nociceptores aferentes primários, que possivelmente poderiam ser bloqueados pelos biomateriais, podem ser divididos em duas fases: A primeira fase envolve os eventos não neuronais, na qual tanto células imunes migratórias (neutrófilos e linfócitos) como células residentes (macrófago, mastócito, etc) produzem diferentes mediadores nociceptivos, incluindo citocinas pró-nociceptivas (fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL) e quimiocinas, leucotrienos (LTB4), fator de crescimento neural, além de endotelinas, substância P, cininas, prostaglandinas e aminas simpatomimética que sensibilizam diretamente os nociceptores (VERRI et al., 2006). A segunda fase inclui eventos neuronais que envolvem a participação principalmente de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas. Estas atuam preferencialmente em receptores metabotrópicos da membrana neuronal de fibras C e nociceptores silenciosos, desencadeando a ativação das vias de mensageiros secundários como AMP cíclico (AMPc), proteína quinase A (PKA) e da proteína quinase C (PKC). Tais vias de sinalização resultam na subseqüente fosforilação dos canais de sódio de pendentes de voltagem (WOOD et al., 2004).



Figura 5.30. Liberação de mediares químicos após a lesão tecidual. *Potencial alvo de ação dos biomateriais sobre a nocicepção.

Supõe-se que a redução da hipernocicepção observada pelo alginato, quitosana e amido OSA seja pelo bloqueio da sensibilização dos nociceptores já instalada. Visto que o alginato e quitosana apresentam grande densidade de cargas negativas, acredita-se que o efeito analgésico pode estar relacionado à adsorção de íons e moléculas carregadas positivamente, assim como os prótons e alguns mediadores inflamatórios da mesma maneira que a bradicinina e histamina, evitando que esses estimulem os nociceptores e desencadeiem a resposta dolorosa. Corroborando com a hipótese, Okamoto et al (2002) observaram em animais que a quitosana e quitina apresentam propriedades antinociceptivas. Os autores usaram o método das contorções abdominais induzidas por ácido acético para estudos da quantificação da nocicepção por estímulos químicos. O ácido acético atua indiretamente por induzir a liberação de mediadores endógenos, tais como prostaglandinas que estimulam os neurônios nociceptivos (SULAIMAN et al., 2008). Os resultados sugeriram que o efeito analgésico da quitosana é pela absorção de prótons, enquanto que o efeito da quitina é pela absorção de bradicinina, um mediador inflamatório. A presença de prótons extracelular no local da inflamação ativa canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs). A estimulação dos ASICs gera potenciais de ação que são conduzidos pelas fibras dos neurônios sensoriais primários, gerando a hipernocicepção (PETROFF et al., 2008).

O alginato é conhecido por ser biocompatível, não tóxico e apresentar propriedade anti-inflamatória quando administrado na forma oral. Mirshafiey and Rehm (2009) mostraram que o monômero β -D-manurônico, componente do alginato, representa um novo anti-inflamatório não-esteroidal. Segundo Jeong et al (2006), a administração oral de alginato em ratos inibiu a expressão de algumas citocinas envolvidas no processo inflamatório, como a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF-α). De acordo com os autores, a inibição ocorreu pela inativação do fator de transcrição nuclear (NF)-KB, suprimindo assim a produção de vários mediadores pró-inflamatórios. O NF-kB é um fator nuclear (NF) que uma vez ativado possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora de alguns genes. Estes genes determinam o aumento da expressão das citocinas próinflamatórias, fatores de crescimento, ciclooxigenases (COX-2), proteínas de fase aguda, moléculas de adesão e outros elementos envolvidos na resposta inflamatória. O mecanismo de ação que envolve a inativação do NF-kB pelo alginato ainda não está bem esclarecido.

A literatura apresenta outros polissacarídeos com potencial efeito analgésico e/ou anti-inflamatório, como os polissacarídeos sulfatados (PS) isolados de alga (COURA, 2011) e β -glucana (SMIDERLE et al., 2008).

A alga marinha vermelha *Bryothamnion seaforthii* possui polissacarídeos sulfatados com efeitos antinociceptivos. Nos ensaios de contorções abdominais utilizando animais tratados com PS, os resultados mostraram uma diminuição da resposta ao estímulo químico inflamatório produzido pelo ácido acético (VIANA et al., 2002). Assreuy et al (2008) também constatou o efeito antinociceptivo dos PS obtidos da alga marinha *Champia feldmannii*, utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Coura (2011) avaliou o efeito antinociceptivo dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha *Gracilaria cornea*, os resultados sugeriram que os polissacarídeos apresentam efeitos analgésicos por mecanismo de ação central e periférica, dependendo da dose utilizada,todavia o mecanismo específico de ação ainda está em estudos.

A β -glucana, um polissacarídeo isolado do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius*, apresenta uma variedade de efeitos biológicos como propriedades antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatória e antinociceptiva (SMIDERLE et al., 2008).

Baggio et al (2012) avaliou a participação de receptores de potencial transitório (TRP) e proteína quinase C (PKC) no efeito antinociceptivo da β-glucana em ratos. Os TRPs são os maiores grupos de detectores de estímulos nocivos. Estes canais participam na geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos (LEVINE & ALESSANDRI-HABER, 2007). Já a proteína quinase C é uma família de quinases de serina/treonina presente nas fibras aferentes primárias periféricas. A PKC é ativada por um grande número de substâncias que são liberadas em resposta a uma lesão, entre elas estão bradicinina, endotelina-1, prostaglandinas, citocinase e

outras. Uma vez ativada, a PKC pode fosforilar os canais TRPs e os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), desencadeando o processo de nocicepção. Quando um ativador da PKC é injetado intraplantarmente, ocorre a translocação das isoformas α e ϵ da PKC do citoplasma para a membrana. Baggio et al (2012) observou por análises de western blot que a administração oral e intraperitoneal da β -glucana provoca analgesia pela inibição da proteína quinase C, prevenindo a translocação da PKC ϵ do citoplasma para a membrana.

Após a avaliação do efeito antinociceptivo dos biomaterais, foram avaliados os efeitos das microesferas de alginato/amido OSA e alginato/IPE contendo penicilina, sendo a reticulação das esferas realizado com CaCl₂ (Figura 5.31).

Pode-se observar que as esferas não foram capazes de suprimir a resposta hipernociceptiva mecânica após 30 minutos. O resultado pode ser devido a diminuição da exposição das cargas negativas do alginato, que durante a produção das esferas é reticulado com o cálcio. Os íons cálcio formam uma reticulação através de interação eletrostática com os grupamentos carboxilas das unidades gulurônicas do alginato. Outro fator que pode favorecer a hipernocicepção é a presença dos íons cálcio. O cálcio assim como os íons sódio contribui para a propagação do impulso nervoso. De forma geral, os canais iônicos transdutores uma vez ativados por temperatura, substancias químicas, força mecânicas ou voltagem se abrem permitindo o fluxo de cálcio no terminal nociceptor periférico, produzindo desta forma uma corrente que despolariza a membrana (WOOLF, 2004).



Figura 5.31. Efeito das microesferas de alginato/amio OSA (a) e alginato/IPE (b) sobre o limiar da dor (\circ), estimulação mecânica nocipectiva. A avaliação da atividade antinociceptiva foi determinada antes (PRE) e 30, 60, 90 e 120 minutos após o procedimento cirúrgico. O controle (\bullet) foi realizado na pata direita com um corte e sutura.

No intuito de substituir o cálcio, foram produzidos microesferas utilizando zinco como agente reticulante, conforme descrito no item 4.5. Desta forma, foi avaliado o potencial antinocicetivo das microesferas de alginato/amido OSA e alginato/IPE, contendo penG (Figura 5.32). A hipernocicepção foi avaliada 30 minutos após a incisão cirúrgica, tempo que caracteriza a dor inflamatória. Pode-se observar que as microesferas de alginato/IPE, com e sem penG não foram capazes de alterar a resposta hipernociceptiva quando comparadas com os animais tratados com corte e sutura.

A penicilina G benzatina, cujo nome comercial é Benzetacil[®], aumentou a nocicepção, diminuindo o limiar de dor (Figura 5.32). Corroborando com os resultados, há vários relatos na literatura afirmando que a administração da penG benzatina por via intramuscular tem sido associada à dor intensa, eritema, enduração local, entre outras reações (MIRANDA, 2002), porém não há trabalhos na literatura relacionados à quantificação da hipernocicepção em animais provocados pela injeção intramuscular de penG.

Oliveira et al (2005) após a injeção intramuscular de penG em 58 pessoas, avaliou a dor conforme a escala de dor unimedicional numérica graduada de zero a dez, na qual zero significa ausência de dor e dez, a pior dor imaginável. Os resultados mostraram que 85% das pessoas relataram uma grande dor no local da aplicação. Segundo Cassiani & Rangel (1999), durante a administração, a infusão da solução no espaço intersticial do músculo é dolorosa devido a vários fatores, como a presença dos cristais de benzilpenicilina e/ou pH da solução fisiológica.

A Figura 5.32 mostra que as microesferas de alginato/amido OSA, com ou sem penG, apresentararam atividade antinociceptiva. Pode-se observar que houve aumento da grama força necessária para a retirada da pata após o estímulo mecânico, quando comparado com o controle, corte e sutura. A intensidade hipernociceptiva foi semelhante à pré-incisão, mostrando o potencial analgésico das microesferas produzidas.

O potencial analgésico foi atribuído ao zinco, íon utilizado para a reticulação dos biopolímeros. Acredita-se que o mecanismo de ação do zinco, como anestésico local, seja pelo bloqueio dos canais de cálcio, sódio e potássio. Esses canais iônicos são responsáveis pelas alterações da permeabilidade iônica na membrana plasmática dos neurônios, durante a transdução do sinal no nociceptor.



Figura 5.32. Efeito das microesferas de alginato/amido OSA e alginato/IPE, com e sem penG (reticulados com o íon zinco), sobre o limiar da dor, através da estimulação mecânica nocipectiva. A avaliação da atividade antinociceptiva foi determinada antes (Pré-incisão) e 30 minutos após o procedimento cirúrgico. O controle foi realizado na pata direita com um corte e sutura. * P < 0,05 comparado com a pré-incisão (one-way Anova seguido pelo teste de Tuckey).

Os canais são proteínas complexas que possuem sítios de translocação, poros que atravessam as membranas para íons específicos, os quais podem ser abertos ou fechados por alterações na conformação da proteína. Os canais possibilitam a passagem de um grande número de íons, sempre a favor de um gradiente de potencial eletroquímico e funcionam como um portão. Segundo Otton (2005) os canais iônicos apresentam um filtro de seletividade iônica, com especificidade a determinados cátions.

A especificidade iônica do canal pode ser entendido a partir da estrutura do canal. Nas superfícies internas e externas da membrana plasmática, as entradas ao canal possuem vários resíduos de aminoácidos carregados negativamente, aue presumivelmente aumentam a concentração local dos cátions como o cálcio, potássio e sódio (Figura 5.33). A via iônica através da membrana começa (na superfície interna) como um canal largo e cheio de água onde o íon pode reter sua capa esférica de hidratação. Uma estabilização adicional é fornecida pelas α -hélices curtas na região do poro de cada subunidade com as cargas negativas parciais associadas a seus dipolos elétricos apontando para o cátion no canal. A aproximadamente dois terços do caminho do canal através da membrana, o mesmo estreita-se na região do filtro de seletividade, forçando os íons a abandonar suas moléculas de água de hidratação. Os átomos de oxigênio das carbonilas no esqueleto do filtro de seletividade substituem as moléculas de água da esfera de hidratação, formando uma série de camadas de coordenação

perfeitas através da qual o potássio se move (Figura 8b). O tamanho do poro e a densidade das cargas na superfície interior do canal determinam a afinidade do íon a ser transportado (LEHNINGER et al., 2006).

O raio iônico também determina o íon a ser transportado, pois o íon deve fazer contato com todos os oxigênios do filtro de seleção. Entretanto, essa interação favorável com o filtro não é possível com íons muito pequenos, como por exemplo o Zn^+ , que por ser muito pequeno não faz os contatos com todos os potenciais oxigênios ligantes dos canais de sódio e cálcio, não sendo portanto transportado através do canal (Busselberg et al., 2000). De acordo com Kang et al (2010), os canais de cálcio apresentam sítios de alta afinidade pelo zinco; entretanto o zinco diminuí a atividade do canal e diminui a transmissão do impulso nervoso, pois não é facilmente transportado ao longo o canal. Os autores realizaram estudos de mutações, alterando a posição do resíduo de histidina na posição 191 presente na superfície extracelular do canal iônico de cálcio por glicina. Os resultados mostraram que a His¹⁹¹ apresenta papel crítico na ligação do zinco com os canais de cálcio. Segundo Busselberg (2000), o Zinco compete com os íons cálcio por um sítio de ligação dentro do canal, no entanto como o raio iônico do zinco (88 pm) é menor que o raio dos íons cálcio (144 pm), apresentando uma carga nuclear efetiva maior, esse se liga mais fortemente aos sítios impedindo a ligação do Ca²⁺ e a transmissão do impulso nervoso.

O zinco apresenta também propriedades anti-inflamatória (SRISKANTHARAJAH e LEY, 2010). O Zn^{2+} está associado à proteína A20, um regulador negativo da inflamação. A proteína A20 degrada as ubuquitinas ligadas a TRAF6 e IKK (inibidor Kappa β quinases), são quinases que quando ubiquitinadas ativam uma cascata de fosforilação que resulta na liberação e translocação para o núcleo do fator de transcrição NF-kB responsável pela transcrição de vários genes de citocinas inflamatórias (PRASAD, 2008). As citocinas, como as interlucinas e FNT, desempenham importante papel na dor, agindo através de diferentes mecanismos em vários locais das vias de transmissão da dor.

Assim, neste trabalho, vislumbrou-se o potencial analgésico dos biopolímeros alginato e amido OSA, assim como dos íons zinco. Além disso, as micoresferas de alginato/Zn²⁺/amido OSA, contendo penG também apresentaram um importante efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção em camundongos com possibilidade de aplicação futura em implantes subdérmicos.



Figura 5.33. (A) Seção transversal de um canal iônico mostrando as características importantes do filtro de seletividade iônico. (B) Sítios de ligação para o cátion no poro de seleção do canal. Os oxigênios da carbonila (em vermelho) pertencentes ao esqueleto peptídico do filtro de seleção, interagindo com o cátion (LEHNINGER et al., 2006).

5.11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos materiais de paredes utilizados, assim como das esferas e cápsulas produzidas, foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O MEV tem sido utilizado em diversos estudos envolvendo esferas e cápsulas como uma ferramenta que permite correlacionar as propriedades físico-químicas com a estrutura morfológica, sendo possível visualizar imperfeições, presença de poros e separações de fase.

A morfologia dos materiais de parede (IPE, alginato, amido OSA e quitosana) e do fármaco penG foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual forneceu informações sobre a forma e a integridade dos mesmos, conforme Figura 5.34.

O IPE é constituído por partículas com variado grau de esfericidade e superfície lisa invaginada, conforme pode ser observado na micrografia com aumento de 1000 x (Figura 5.34.A). Foram observadas partículas de menor tamanho, adsorvidas na superfície de partículas maiores, apesar disso, não foi observada a formação de aglomerações. A superfície apresentou-se íntegra, isenta de falhas ou orifícios.

O amido OSA (Figura 5.34.B), o alginato (Figura 5.34.C) e a quitosana (Figura 5.34.D), visualizadas com aumento de 1000, 10000 x e 65 x, respectivamente, possuem partículas com formatos irregulares. O amido OSA apresentou um aspecto arredondado com camada superficial rugosa, enquanto que o alginato são observadas partículas em forma de lâminas e rugosas. A micrografia da quitosana apresenta tamanho e forma

irregulares, com aspecto fibroso. Segundo Chaves *et al.* (2009), a quitosana denota um aspecto rugoso em sua estrutura.

A micrografia da penG revelou a presença de partículas facetadas geométricas, com diferentes tamanhos, com a formação de aglomerados (Figura 5.35).



Figura 5.34. Micrografia eletrônica de varredura dos materiais de parede: IPE (A), Amido OSA (B), alginato de sódio (C) e da quitosana (D).



Figura 5.35. Micrografia eletrônica dos cristais de penG

A morfologia das esferas de alginato (4,5% p/v) e amido OSA (2% p/v) contendo penG (10% p/v) está representada na Figura 5.36.



Figura 5.36. Micrografia de esferas de alginato e amido OSA contendo penG, aumento de $50 \ge (A) = 500 \le (B)$.

Observando as micrografias, verificam-se esferas imperfeitas, com deformidades e superfícies extremamente rugosas. As deformações e rugosidades das esferas podem ser devido ao processo de secagem, uma vez que se verifica visivelmente a redução de volume das esferas. Segundo Pothakamury *et al.*(1995), a superfície rugosa de micropartículas pode provocar maior aceleração na liberação da biomolécula encapsulada do que a superfície lisa, devido à maior área superficial. Contudo, o grau de integridade e porosidade das microcápsulas é que indicarão a eficiência do polímero como matriz encapsulante.

Analisando mais detalhadamente a superfície da esfera exibida na Figura 5.36, verifica-se a existência de trincas que são indesejáveis para aplicações cujo objetivo seja reter e proteger biomoléculas. Não foi constatada a presença de macroporos, sugerindo que a concentração de cloreto de cálcio e o tempo de formação das esferas foram suficientes para garantir um suficiente grau de ligações cruzadas do alginato com os íons cálcio. Gray et al. (1988) evidenciaram que o tamanho dos poros no gel de alginato de cálcio era dependente da concentração de alginato usada na preparação e do tempo de formação da esfera.

Como se pode verificar na Figura 5.36, há cristais de penG aderidos à superfície, identificados por meio da comparação com as imagens obtidas pela observação dos componentes de revestimento sem a presença do fármaco (Figura 5.37), assim como do fármaco purificado (Figura 5.35). Na Figura 5.36, pode-se observar uma coesão da

matriz alginato/amido OSA. Esse fato sugere que o amido OSA foi capaz de incorporarse fortemente à matriz de alginato de cálcio. Essa coesão pode ser atribuída às interações iônicas entre os íons cálcio e as unidades G, assim como às interações existentes entre as unidades do alginato de cálcio (G e M) e as de glicose presentes no amido OSA que, juntas, provavelmente contribuíram para reforçar a matriz da esfera. Além disso, destaca-se o fato de que a alta coesão observada na matriz das esferas de alginato de cálcio e amido OSA pode justificar o resultado elevado para a porcentagem de retenção da penG.

O aprisionamento do antibiótico, apesar de provavelmente ter interferido nas ligações cruzadas entre os grupamentos carboxílicos das unidades G e os íons Ca⁺⁺, permitiu, todavia, que a morfologia da penG se mantivesse ainda bastante coesa, tal como verificado nas esferas sem a retenção de penG.

A Figura 5.38 apresenta a morfologia das esferas de alginato (4% p/v), IPE (4,5 % p/v) e penG (12% p/v). A micrografia das esferas permitiu a identificação de superfície irregular, com depressões e rugosidade em grau acentuado. Pode-se observar também a presença de macroporos e fissuras ao longo das esferas (Figura 5.38.A). Ameri *et al.*(2006) descrevem o processo de formação de macroporos em cápsulas. Segundo os autores, no início do processo de secagem das esferas há uma rápida evaporação do solvente, com formação de um filme de polímero na superfície externa. Essa barreira de polímeros dificulta a saída de água para o meio externo e leva a um aumento da pressão de vapor de água dentro das esferas, até o ponto em que rompe, resultando em macroporos nas esferas. Esses macroporos não são desejáveis, pois aumentam a velocidade de liberação da penG no meio de dissolução.



Figura 5.37. Micrografia de esferas de alginato e amido OSA, sem penG.

A natureza dos materiais de parede e sua modificação pelo processo de secagem podem influenciar na morfologia das esferas. De acordo com as citações de Walton e Munford (1999), partículas revestidas com materiais de origem protéica possuem a superfície externa constituída, basicamente, por proteínas desnaturadas, as quais são irreversivelmente modificadas pelo calor, sendo desenoveladas e precipitadas, enquanto que partículas constituídas por materiais glicídicos formam estruturas bem ordenadas.

A Figura 5.38.B mostra as esferas de alginato/IPE contendo penG em aumento de 1000x, e observa-se a presença de pequenos cristais de penG aderidos na superfície. A Figura 5.38.C apresenta a morfologia das esferas de alginato/IPE na ausência do fármaco.



Figura 5.38. Micrografia das esferas de alginato/IPE contendo penG aumento de 50x (A), 1000x(B) e esferas sem retenção da penG (C).

A Figura 5.39 apresenta as micrografias das microcápsulas de PenG em matriz de alginato /amido OSA /quitosana. Nota-se, pela Figura 5.39.A, que as microcápsulas apresentaram-se com boa esfericidade. A estrutura externa das microcápsulas mostrou-se bastante rugosa e sem porosidade aparente, indicando a formação de um filme contínuo na parede. A estrutura foi semelhante a obtidas nas microesferas de PenG em matriz de alginato e amido OSA, porém não houve presença de cristais de PenG na superfície, mostrando que houve o recobrimento das esferas pela quitosana. Pela Figura 5.39.C pode-se verificar a presença de fissuras na superfície das microcápsulas, estas fissuras podem ocasionar uma liberação rápida do fármaco. E podem ter se formado devido à rápida complexação entre alginato e quitosana que enrijeceria de imediato as cadeias dos polímeros, não tendo tempo suficiente para as mesmas se acomodarem. Assim, cavidades que se formam servem como facilitadores de escoamento rápido do fármaco (efeito "burst") para o ambiente externo. A análise das secções transversais das microcápsulas.

A Figura 5.40 mostra a morfologia das microesferas de PenG recobertas com polilisina. A morfologia das cápsulas foi semelhante às cápsulas recobertas com quitosana. A superfície apresentou-se esférica com bastante rugosidade e presença de vales e depressões. Observa-se na análise da secção transversal (Figura 5.40.D), a presença de fissuras no interior das microcápsulas.



Figura 5.39. Micrografia das microcápsulas contendo PenG em matriz de alginato/ atrido OSA /quitosana. Aumento de 70x (A), 1000x (B), 10000x (C) e 65x (D).



Figura 5.40. Micrografia das microcápsulas contendo PenG em matriz de alginato/ amido OSA /polilisina. Aumento de 65x (A), 1000x (B) e 5000x (C).

5.12. Potencial Zeta

O Potencial zeta das microesferas produzidas foi analisado com intuito de avaliar a densidade da carga superficial em função do pH. O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Inicialmente foram avaliados o potencial zeta das microesferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA, reticulados com cálcio e zinco (Figura 5.41).

Os resultados mostraram que a superfície das microesferas apresentou carga negativa. Essa carga é resultado dos grupos carboxílicos presente no alginato e amido OSA. Ao aumentar o pH de 2 para 8, a carga superficial passou de -3 para -35 mV, respectivamente. Em soluções de baixo valor de pH (pH 2) a maioria dos grupos carboxílicos do alginato e amido OSA estão na forma protonada (–COOH), apresentando uma menosr carga negativa. Isso é devido aos valores de pKa do alginato
estarem em torno de 3,4 a 4,4 (SHINDE E NAGARSENKER, 2009) e o pKa do amido OSA ser aproximadamente 4,76 (Huber and BeMiller, 2009).



Figure 5.41. Potencial zeta das microesferas de PenG em matriz de alginate/amido OSA, reticulados com cálcio(♦) e reticulados com zinco(■) em função do pH.

À medida que o pH do meio foi aumentando, os grupos carboxílicos foram se ionizando (perdendo o hidrogênio), resultando no aumento das cargas negativas. Para o poliânion alginato Carneiro-da-Cunha et al. (2011) obtiveram valores de potencial zeta de -52 a -82,2 mV, os quais foram dependentes do pH e da concentração de cada amostra de polissacarídeo.

Observa-se na Figura 5.41 que microesferas reticuladas com cálcio apresentaram valores mais negativos que as microesferas reticuladas com zinco. Esse resultado pode ser atribuído a maior ligação do zinco aos biopolímeros. Segundo De Boisseson et al (2004), o zinco é menos seletivo que o cálcio para estabelecer ligações com o alginato, não dependendo exclusivamente das unidades de ácidos l-gulurônicos, e por conta disso realizando ligações cruzadas mais extensas com o alginato.

Os resultados vislumbraram o potencial de aplicação de um segundo biopolímero carregado positivamente nas microesferas, formando uma cápsula. Portanto, foram produzidas esferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA recobertas com quitosana e polilisina, de acordo com item 4.6. A Figura 5.42 mostra o potencial zeta das microcápsulas de PenG em matriz de alginato/amido OSA/Quitosana e alginato/amido OSA/Polilisina reticulados tanto com cálcio, como com zinco.

Após o recobrimento das microesferas com os policátions, quitosana e polilisina o potencial zeta passou de negativo para positivo. A densidade de carga positiva é devido à presença de grupamento amino presente tanto na quitosana quanto na polilisina. Ao variar o pH de 2 para 8, o potencial zeta das esferas diminuiu. Em baixos valores de pH, o grupamento carboxílico do alginato não está ionizado, não fazendo interação eletrostática com o policátion, sendo a ligação de hidrogênio o tipo de força intermolecular estabelecido entre os biopolímeros. Com isso, o grupamento amino dos policátions fica mais exposto, mantendo a carga superficial com altos valores positivos. Com o aumento do pH, o grupo carboxílico sofre ionização e mantêm interação eletrostática com os policátions, diminuindo a carga superficial positiva. O pKa da quitosana está compreendido entre 6,2 e 7,0 (MANSOURI et al, 2004), pelo que , em meio ácido, os grupos amina são protonados e a quitosana adquire carga positiva. Para valores de pH superiores ao seu pka, a quitosana adquire carga negativa e torna-se insolúvel.

Pode-se observar que as microesferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA/polilisina apresentaram menores valores de potencial zeta. Segundo Vargas et al (2009) a polilisina apresenta um menor valor de potencial zeta, quando comparado com a quitosana, pois a polisina apresenta menor massa molar. Valenga (2011) avaliou o potencial zeta da polilisina e quitosana em pH 6,7, os valores encontrados foram de + 7,3 mV e + 32,7 mV respectivamente.

Abreu (2008) avaliou o potencial zeta de hidrogéis contendo o peptídeo tirosinafenilalanina em matriz de alginato e quitosana. Os valores do potencial zeta variaram de + 39 a -9.7 mV ao variar o pH de 3,0 a 9,0 respectivamente.



Figura 5.42. Potencial zeta das microesferas contendo PenG em matriz de alginato/amido OSA/quitosana (\blacklozenge) e alginato/amido OSA/Polilisina (\bullet), reticulados com cálcio (a) e zinco (b).

5.13. Grau de intumescimento (GI%) e Grau de erosão das esferas (GE%)

Polímeros reticulados quimicamente não se dissolvem em nenhum solvente, uma vez que as cadeias estão ligadas covalentemente umas às outras. A presença dos solventes em que as respectivas cadeias lineares são solúveis, os polímeros reticulados intumescem, incorporando solvente enquanto as cadeias puderem ser distendidas.

Quando o hidrogel desidratado é imerso em água, ocorre o intumescimento absorvendo água até atingir um equilíbrio entre as forças favoráveis à entrada de água para dentro da estrutura polimérica (potencial osmótico, ligações de hidrogênio entre água e polímero, flexibilidade da cadeia etc.) e as forças de coesão da rede (reticulações) (FLORY; REHNER, 1943).

A pressão osmótica favorece a entrada de água para ocupar os espaços livres dentro da rede polimérica. As fortes interações atrativas entre as estruturas químicas no polímero e a água também contribuem para o aumento do intumescimento. À medida que a água entra, ocupando os espaços entre as cadeias poliméricas, estas se estendem buscando uma nova configuração, pois a presença da água no sistema requer a expansão e reordenação das cadeias (Figura 5.43). À medida que as cadeias são alongadas para uma configuração entropicamente menos favorável, existe uma força resistiva, que aumenta com a densidade de ligações cruzadas. O equilíbrio é atingido quando essas forças se igualam (ANSETH *et al.*, 1996).



Figura 5.43. Representação esquemática de um hidrogel interagindo com moléculas de água.

A Tabela 5.18 apresenta o grau máximo de intumescimento das microesferas e microcápsulas produzidas. Pode se observar que o maior grau de intumescimento foi obtido nas esferas de alginato/amido OSA. Ao substituir os íons cálcio por zinco, o grau de intumescimento diminuiu, tal resultado pode ser devido às extensas reticulações dos íons zinco com o alginato, quando comparado com os íons cálcio. O recobrimento das esferas com os policátions, quitosana e polilisina diminuiu ainda mais o grau de

intumescimento. O resultado pode ser explicado pela formação das interações eletrostática entre o alginato e os policátions.

Tabela 5.18. Grau máximo de intumescimento das microesferas e microcápsulas produzidas.

Amostra	Grau de intumescimento (%)	
Microesferas PenG/alginato/Ca ²⁺ /IPE	546,2	
Microesferas alginato/Ca ²⁺ /amido OSA	637,8	
Microesferas alginato/Zn ²⁺ /amido OSA	580,2	
Microcápsulas alginato/Zn ²⁺ /amido OSA/Quitosana	485,4	
Microcápsulas alginato/Zn ²⁺ /amido OSA/Polilisina	490,6	

Para melhor visualização, a Figura 5.44 mostra as esferas úmidas logo após a produção e as esferas livres de água, após a secagem a 37°C. Porém, ao colocar as esferas secas em imersão em água nos ensaios de intumescimento, estas não apresentaram o intumescimento máximo após 30 dias (Figura 5.45). Os experimentos foram realizados até 960 horas, porém não foi observado aumento no grau de intumescimento.



Figura 5.44. Foto das esferas úmidas logo após a produção (a) e após a secagem a 37° C (b) das esferas de alginato/Ca²⁺/IPE (1) alginato/Ca²⁺/amido OSA e (2) alginato /Zn²⁺ /amido OSA (3).



Figura 5.45. Perfis de intumescimento das esferas de alginato / Ca^{2+} /IPE (**■**) alginato/ Ca^{2+} / amido OSA (**●**), alginato/ Zn^{2+} /amido OSA(**▲**), alginato/ Zn^{2+} /amido OSA/ quitosana (**●**) e alginato/ Zn^{2+} /amido OSA/ polilisina (**♦**).

Analisando os diferentes perfis de intumescimento (Figura 5.45), foi possível observar que as matrizes não apresentaram capacidade notória em absorver água e, consequentemente, um grau de intumescimento muito baixo. Essa baixa capacidade em absorver água possivelmente é devido à extensão da reticulação entre o cálcio e alginato. Outro fator que limita a penetração de água é a rigidez intrínseca do polissacarídeo, pelas associações intra ou intermoleculares. (SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2008).

As microesferas de alginato/IPE e alginato/amido OSA reticulados com cálcio apresentaram grau de intumescimento máximo de 34% e 25,74%, respectivamente. Pode-se esperar que as esferas contendo maior teor de alginato são capazes de ligar-se de forma mais eficiente aos íons cálcio, apresentando menor intumescimento. As microesferas de alginato/amido OSA reticulados com zinco apresentaram menor grau de intumescimento (20%), isso possivelmente devido a maior e mais extensa ligação dos íons zinco com os resíduos gulurônicos do alginato, quando comparado com os íons cálcio. Pode-se observar que o grau de intumescimento das microcápsulas foi menor ainda, com grau máximo de 15%, após duas horas em imersão com água. O resultado pode ser explicado pela formação de uma capa de quitosana e polilisina que diminui ainda mais a penetração da água. A Figura 5.46 mostra a morfologia das microcápsulas de alginato e amido OSA, recobertas com quitosana e polisina, após 30 dias em imersão em água destilada.

A capacidade das esferas de alginato de intumescer é facilitada pelos grupos carboxílicos, que se associam fortemente às moléculas de água. Um aumento no grau de reticulação diminui a disponibilidade desses grupos e, consequentemente, a hidrofilicidade do sistema. O grau de intumescimento é uma propriedade importante na predição do comportamento de esferas e cápsulas que serão utilizados em liberação controlada, pois modificações na estrutura da matriz polimérica causadas pelo intumescimento influenciarão na difusividade do antimicrobiano através do matriz (ZACTITI, 2006).

Verifica-se uma alteração na morfologia das esferas (Figura 5.46), pois há uma perda da rugosidade extrema quando comparado com as micrografias das Figuras 5.38 e 5.39. Fissuras e poros irregulares são observados nas esferas, devido provavelmente a erosão da matriz polimérica.



Figura 5.46. Micrografia das microcápsulas de alginato/amido OSA/Quitosana (A) e alginato/ Amido OSA/polilisina (B) após 30 dias em imersão em água.

Outro parâmetro avaliado foi o grau de erosão das esferas. A perda de massa das esferas ocorreu após 24 horas de ensaio, quando o grau de hidratação máximo foi atingido. Provavelmente a hidratação provocou o afastamento e a solubilização das cadeias poliméricas, com uma pequena perda na massa de polímeros. Vale ressaltar que visualmente não foram observados fragmentos dos polímeros nos ensaios de erosão, porém verificou-se um pequeno aumento da absorbância (220nm) do meio de dissolução (dados não mostrados). No caso das esferas de alginato/amido OSA, o aumento da absorbância é devido ao succinato de octanil liberado no meio e nas esferas de alginato/IPE devido à liberação dos fragmentos da proteína encapsulante. O grau de erosão das esferas foi de 22% para as esferas de alginato/IPE e 5% para as microesferas de alginato/amido OSA reticulados com cálcio e zinco e resultado semelhante também foi observado para as microcápsulas, ao longo de 30 dias de experimentos. O maior grau de erosão das esferas alginato/IPE pode explicar a maior liberação da penG no início do experimento de liberação *in vitro*, uma vez que a erosão da camada externa gelificada contribui para o processo de liberação do fármaco.

5.14. Análise de difração de raios X

A difratometria de raios X tem sido muito utilizada na investigação de estruturas poliméricas, já que o princípio da difração depende do fenômeno de interferência que ocorre quando uma onda em movimento é espalhada a partir de um número de centros e esses têm relação direta com os domínios cristalinos e amorfos presentes em sua estrutura (BILLMEYER Jr., 1984).

Os compostos sólidos são considerados cristalinos, amorfos ou com domínios cristalinos e amorfos (semicristalinos) e difratam facilmente a radiação X. Em difratogramas originados por polímeros, é possível observar uma acentuada banda amorfa e também partes bem-definidas, que correspondem aos domínios cristalinos, ou seja, às regiões ordenadas presentes na amostra (CANEVAROLO Jr., 2004). Neste trabalho, as análises de difração de raios X foram realizadas nos materiais de parede utilizados no trabalho: alginato, IPE e amido OSA, assim como nas esferas contendo a penG.

O padrão de difração de raios X dos materiais de parede encontra-se na Figura 5.48. O alginato apresentou três bandas amorfos em 2θ igual a 18° , 23° e 40° . Porém a literatura indica que o alginato de sódio apresenta dois picos cristalinos: um a $13,7^\circ$ e outro a 23° (WANG et al., 2010; YANG et al., 2000).

O amido OSA apresentou três picos cristalinos em 16°, 18° e 22°, com uma característica semicristalina. Segundo Sakanaka (2007), o amido apresenta-se parcialmente cristalino. A amilose e as regiões ramificadas da amilopectina formam a região amorfa do amido, responsável por absorver água mais prontamente em temperaturas inferiores à temperatura de gelatinização. As regiões cristalinas são constituídas pelas estruturas em dupla hélice formada pelas cadeias lineares mais externas das moléculas de amilopectina e apresentam domínios compostos por lamelas cristalinas e amorfas alternadas. Segundo Cheetham e Tao (1998), o grau de cristalinidade do amido é inversamente proporcional ao conteúdo de amilose, confirmando que a cristalinidade é um aspecto mais próprio da amilopectina do que da amilose. Porém, o isolado protéico de ervilha mostrou um difratograma bastante amorfo.

O DRX da polilisina pura, não foi realizado, mas segundo Krikorian et al (2002) o padrão de difração da polilisina pura apresenta dois picos largos cristalinos de baixa intensidade em 7,42° e 12,76°, que evidenciam a parte cristalina e uma ampla faixa amorfa.

No difratograma da quitosana, (Fig. 5.47D), observa-se uma banda de alta intensidade em 20°, o que evidencia a parte cristalina e uma faixa abaixo dos picos, onde predomina a forma amorfa do material. Costa e Mansur (2008) observaram duas bandas no difratograma da quitosana, uma de alta intensidade em 19,8° e um de menor intensidade em 37,7°. A cristalinidade calculada a partir da relação de áreas entre os picos e a área total sobre a curva do gráfico foi de aproximadamente 17%, essa porcentagem varia de acordo com o grau de desacetilação.

A penG pura apresentou um difratograma clássico de substâncias cristalinas (Figura 5.48), com bandas bastante intensas e bem definidas entre 17° e 40°. Após a hidratação e liofilização da PenG, observou-se uma mudança da estrutura da PenG, de cristalina para semi-cristalina, com aumento da porção amorfa. Segundo Pikau et al., 2000, em geral, as formas amorfas possuem maior reatividade que as formas cristalinas (PIKAL et al., 1978). As formas amorfas da penG sódica e potássica possuem menor estabilidade que as formas cristalinas. Por exemplo, cristais da forma sódica podem ser submetidos à secagem por calor por várias horas, sem que haja decomposição. Já a forma amorfa, nas mesmas condições, apresenta significante queda de atividade (MACEK, 1965).



Figura 5.47. Difratogramas de raios X dos materiais de parede: alginato (A), IPE (B), amido OSA (C) e quitosana (D).



Figura 5.48. Difratogramas de raios X da PenG (a) e PenG solubilizada em H₂O destilada e posteriormente liofilizada (b).

Os padrões de difração de raios X para as esferas de alginato/amido OSA e alginato/IPE contendo penG são mostrados na Figura. 5.49. Verifica-se que há uma diminuição na intensidade na cristalinidade dos picos da penG após o encapsulamento em matriz de alginato/amido OSA e alginato/IPE. Essa mudança pode ser devido à dispersão do fármaco na matriz polimérica. Pode-se observar que há também a perda de cristalinidade do amido OSA, fato que pode ser explicado pela forte interação entre o alginato e amido OSA pelas ligações de hidrogênio e interações iônicas. Wang *et al.* (2010) observaram o mesmo efeito ao misturar alginato e amido, corroborando com o trabalho.

Foi analisado o padrão de difração de raios X das microcápsulas de PenG em matriz de alginato/amido OSA/Quitosana e alginato/amido OSA/Polilisina. O padrão de de difração foi semelhante em ambas microcápsulas (Figura 5.50), apresentando duas bandas amorfas. A primeira banda no ângulo de 20°, correspondente aos biopolímeros quitosana, alginato e amido OSA e uma segunda banda de menor intensidade em 48°. O padrão amorfo mostra a boa dispersão dos biopolímeros e antibiótico nas microcápsulas produzidas.



Figura 5.49. Difratogramas das esferas de Alginato /Amido OSA (A) e Alginato /IPE (B) contendo penG.



Figura 5.50. Difratogramas das microcápsulas contendo PenG em matriz de alginato /amido OSA /Quitosana (A) e alginato/amido OSA/Polilisina (B)

5.15. Análises térmicas

5.15.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As análises térmicas foram realizadas para avaliar possíveis interações entre os biopolímeros e a penG e para conhecer o comportamento térmico, como por exemplo, a temperatura de transição vítrea dos biopolímeros assim como das microesferas e microcápsulas produzidas. A Tabela 5.19 apresenta os picos endotérmicos e exotérmicos e as entalpias associada com cada pico para os biopolímeros e as microesferas e cápsulas produzidas.

De acordo com a Tabela 5.19, o Alginato e amido OSA apresentaram um pico endotérmico largo, correspondente ao processo de remoção de água (umidade) presente nas amostras. Segundo Segato (2007), essa água seria do tipo não–congelável, pois não é observada sua fusão nas curvas de DSC. Este tipo de água fica preso na estrutura polimérica, sendo muito difícil de ser removida, sem decomposição do biopolímero.

Chung et al (2010) obteve um perfil de DSC do amido de milho modificado um pico endotérmico que variou de 70,5 a 74°C, dependendo das condições de pH e aquecimento utilizado na reação de modificação do amido com octenilsuccinato. Entretanto o pico endotérmico do amido OSA obtido do feijão *Phaseolus lunatus* foi a

64°C (SEGURA-CAMPOS et al., 2008). Segundo Thirathumthavorn e Charoenrein (2006) o pico endotérmico tem sido relacionado ao grau de perfeição dos cristais nos grânulos do amido, quanto menor a temperatura, menor é o grau de cristalinidade do amido.

O pico exotérmico do alginato a 237 °C é resultado da decomposição do polímero devido a reação de despolimerização, as quais são provavelmente devido à descarboxilação parcial dos grupos carboxílicos protonados e as reações de oxidação dos polieletrólitos. Segundo Chung et al (2010) quando um material reage quimicamente, uma quantidade de calor é liberada no processo.

Segato (2007) encontrou ao analisar o alginato nas mesmas condições, picos térmicos próximos aos encontrados no presente estudo, apresentando pico endotérmico em 86,6 °C, e pico exotérmico a 247,8 °C. Sarmento (2006) ao analisar alginato de baixa viscosidade, observou pico endotérmico em 86,6 °C, e pico exotérmico em 257,8 °C. Gazori *et al.* (2009), encontraram em atmosfera inerte e sob fluxo de calor de 10 °C/min, pico endotérmico em 78,94 °C na desidratação do alginato e pico exotérmico em 246,13 °C na decomposição do alginato.

Observa-se para a quitosana e polisina, através da análise de DSC, um pico endotérmico por volta de 70 – 80,41 °C e 70,66°C, respectivamente, correspondente ao processo de desidratação, cuja área depende do histórico de secagem da amostra. Verifica-se um pico exotérmico em 308,41 e 253,20 °C correspondente a decomposição da quitosana. Esses mesmos picos endo e exotérmicos da quitosana também foram encontrados por Zohurian & Shokrolahi (2004) e Santos et al (2003), em seus estudos térmicos com quitosana. Krikorian et al (2002), obteve resultados semelhantes ao avaliar o DSC da polilisina.

PenG apresentou também dois picos térmicos, um endotérmico a 210,52°C e outro exotérmico a 226,53°C, correspondente ao processo de desidratação e decomposição do antibiótico, respectivamente. Rodante et al (2002) ao realizar análise térmica em diferentes antibióticos, observou na curva de DSC da PenG a presença do pico endotérmico a 287,8 °C e pico exotérmico a 480,5 °C, mostrando que a PenG apresenta grade estabilidade térmica.

Ao analisar a curva de DSC das microesferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA, reticulados tanto com cálcio e com zinco, não foi observado a presença de eventos térmicos. As microcápsulas de algianto/amido OSA recobertas com quitosana, não apresentaram também evento térmico. Portanto até 350 °C nenhum evento de decomposição foi observado, mostrando a boa interação estabelecida entre os biopolímeros e o antibiótico.

Amostras

Alginato

Amido OSA

ções de entalpia para as amostras analisadas por DSC						
Temperatura (°C)			ΔH (J/g)	Tg		
Início	Pico	Fim				
80,65	90,32	150,33	332,98	52,10		
209,59	237,36	263,35	-359,40			
75,62	80,63	150,32	125,03	67,06		
65,23	76,40	80,41	130,25	30		

Quitosana	65,23	76,40	80,41	130,25	30
	302,22	308,41	315,26	-315,14	
Polilisina	55,23	70,66	103,23	15,00	57
	235,45	251,00	253,20	-265,02	
Pen G	189,31	210,52	224,82	-70,69	_
	224,82	226,63	250,00	226,63	
PenG/alginato/ Amido OSA/Ca	-	-	_	-	80,51
PenG/alginato/ Amido OSA/Zn	-	-	-	-	90,32
PenG/alginato/ Amido OSA/Ca /Quitosana	-	-	-	-	70,56
PenG/alginato/ Amido OSA/ Ca / Polilisina	289,21	290,23	312,11	-96,00	69,32
PenG/alginato/ Amido OSA/ Zn / Quitosana	-	-	-	-	80,65
PenG/alginato/ Amido OSA/ Zn / Polilisina	295,64	310,41	312,78	-152,56	74,13

As microcápsulas de alginato/amido OSA, reticulados com cálcio e zinco recobertas com polisina, apresentaram pico exotérmico a 290,23 e 310,41 °C, respectivamente. Esse pico exotérmico corresponde a decomposição da polilisina presente na superfície. A temperatura de decomposição das microcápsulas reticuladas com zinco foi superior as microcápsulas reticuladas com cálcio, mostrando a melhor interação dos polímeros e fármaco com o zinco.

A temperatura de transição vítrea (Tg) dos biopolímeros e microesferas foi também determinado. Esse parâmetro é importante, pois indica a mudança do estado vítreo (estado configuracional altamente emaranhado) para um estado mais maleável, o

que está associado com o processo de relaxamento das cadeias poliméricas. A temperatura de transição vítrea varia de polímero para polímero e depende das interações termodinâmicas do sistema polímero-polímero, podendo influenciar na liberação do fármaco (LOPES et al., 2005).

A Tg do alginate e amido OSA foram 52,10 e 67,06° C, respectivamente (Tabela 1). Segura-Campos et al (2008) avaliou a Tg do amido OSA, encontrando uma Tg de 64,4°C. Na literatura existem diversos valores de Tg para o alginato, pois a Tg varia de acordo com a quantidade de resíduos manurônicos e gulurônicos (SOARES et al., 2004).

A quitosana e polilisina apresentaram Tg de 30 e 57° C. Krikorian et al (2002) produziu nanocompósitos a base de polilisina e observou uma Tg de 50°C para a polilisina. A Tg da quitosana ainda é objeto de controvérsia no meio científico, pois, por se tratar de um polímero natural, algumas propriedades como cristalinidade, massa molar e grau de desacetilação, podem apresentar variações conforme a fonte e/ou método de extração e isto certamente irá influenciar no valor da Tg. Para Ratto et al. (1995), a Tg obtida para uma amostra de quitosana foi de 30° C. Já para Sakurai et al. (2000), o valor da Tg encontrado foi de 203°C, enquanto para Kittur et al. (2002) e Netto et al. (2005) não foram encontradas evidências de Tg, sugerindo, assim, que a Tg da quitosana poderia estar próxima da faixa de temperatura de degradação térmica.

A PenG não apresentou Tg, o qual é explicado pela sua estrutura cristalina. As microesferas de Peng em matriz de alginato/amido OSA reticulados com cálcio e zinco, apresentaram Tg em 80,51 e 90,32 °C, respectivamente. Essas temperaturas foram maiores que as obtidas pelos biopolímeros puros, indicando uma forte interação entre esses e o fármaco. O aumento da Tg é devido ao denso empacotamento dos polímeros, diminuindo a mobilidade e o volume livre entre as cadeias poliméricas. Brekner et al. (2007) sugeriram que a temperatura de transição vítrea de misturas de polímeros compatíveis depende da distribuição de volume livre e da mobilidade conformacional, a qual é controlada pela interacções específicas dos componentes. Pode-se observar que a Tg das microesferas reticuladas com zinco é maior do que as reticuladas com cálcio, o que se deve as maiores interações entre o zinco e os polímeros, devido ao raio iônico do zinco ser menor que o do cálcio.

Em 2006, Nakamura et al., investigaram a Tg, usando DSC de filmes de alginatos, contendo diversos cátions di e trivalentes. Os resultados mostraram que a TG dos alginatos decresceu na seguinte ordem: $Al^{+3}>Ca^{+2}>Fe^{+2}>Cu^{+2}>Na^{+}$. Os autores concluíram que os valores de Tg dependem do raio iônico dos cátions.

A Tg das microesferas recobertas com quitosana e polisina foram obtidas em temperaturas intermediárias, as do policátion puro e das microesferas. Segundo Quental et

al (2010) um dos critérios aceitos e utilizados para a avaliação da miscibilidade e interação em uma mistura de polímeros é a detecção de uma única transição vítrea, a temperaturas situando entre as transições vítreas dos componentes que constituem a mistura.

5.15.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

A TGA baseia-se no estudo da variação de massa de uma determinada amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função da temperatura. Possibilitando investigar a estabilidade térmica dos polímeros e conhecer o limite de temperatura na qual os polímeros podem ser trabalhados (MANO et al., 2003).

A Figura 5.51 mostra o resultado da análise térmica dos biopolímeros utilizados no presente trabalho, assim como o da penG.

O alginato de sódio sofreu uma perda de 19% de sua massa proveniente da desidratação, sendo que esse processo ocorreu entre 40,5 °C e 222,5 °C. A perda de massa total proveniente da decomposição foi de 31,80% para o alginato. Esse processo ocorreu a partir de 173,04 °C. SOARES *et. al.* (2004) encontraram, em atmosfera oxidante, com fluxo de calor de 20 °C/ min perda igual na desidratação do alginato de sódio (19,5%) que ocorreu entre 24,8 a 200,9 °C. A perda de massa por decomposição foi de 46,2%, que foi maior que a encontrada no presente estudo, sendo o produto de decomposição ao redor de 400° C caracterizado como material carbonáceo.



Figura 5.51. Curva de TGA da PenG (—) e dos biopolímeros alginato (—), amido OSA (—) e quitosana (—).

A perda de massa inicial do amido OSA, correspondente a desidratação ocorreu logo após 25 °C até 110,41°C. A perda de massa por degradação ocorreu após 200 °C com perda de 85% da massa total ao atingir 700°C. A quitosana também apresentou dois eventos térmicos de desidratação, com perda de 11% de massa. E degradação após 270 °C com massa residual de 28%.

A PenG não apresentou perda de massa por desidratação, apresentado apenas perda por degradação após 200°C, com uma massa residual de 25% ao atingir 700°C. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodante et al (2002).

Figura 5.52 mostra as curvas termogravimétricas das microesferas e microcápsulas produzidas. Pode-se observar que todas as micropartículas produzidas apresentaram dois eventos térmicos, corroborando com os dados de DSC. O primeiro de desidratação, com perda de massa de aproximadamente 15% e outro de decomposição, com perda de massa de 49% para as microesferas de PenG em matriz de alginato/ amido OSA, reticuladas tanto com cálcio quanto com zinco e recobertas com pollisina, com perda total de massa de 65% aproximadamente. As microesferas recobertas com quitosana apresentaram uma massa residual maior, com perda total de 54%, mostrando que a interação da quitosana estabelecida com a microesfera de alginato/amido OSA é mais forte quando comparado com a interação da polilisina.



Figura 5.52. Curva de TGA das microesferas de penicilina em matriz de alginato/Amido OSA, reticuladas com cálcio (a) e zinco (b). Microesferas recobertas com quitosana (--), com polilisina (--) e sem recobrimento com policátion (--).

A massa residual, após 700°C de todas as micropartículas produzidas foram maiores que as obtidas pelos biopolímeros, mostrando a forte interação entre os biopolímeros e a PenG. Segundo Rodante et al (2002) a capacidade de interação entre

polímeros pode ser avaliada pela massa residual obtida, ou seja, quanto maior a quantidade de massa no final do processo, maior é a interação entre os polímeros e o fármaco. Pode-se observar que as microesferas recobertas com quitosana apresentaram maior massa residual.

Os resultados mostraram também a estabilidade térmica das microesferas entre 100-120°C, (temperatura usada para preparação das microesferas), mostrando a viabilidade do método de preparação das microesferas.

5.16. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A análise dos biopolímeros e das microesferas por espectroscopia na região do infravermelho é importante para avaliar as possíveis interações químicas entre os biopolímeros e o fármaco.

A Figura 5.53 mostra os espectros de FTIR dos biopolímeros alginato e amido OSA, assim como o espectro das microesferas de alginato/amido OSA e zinco sem PenG. O espectro das microesferas de alginato/Zn²⁺/amido OSA apresentou informação estrutural tanto do alginato quanto do amido OSA.

O alginato contém em sua estrutura três grupos funcionais diferentes, carboxila (–COO-), éter (–C–O–C–) e álcool (–OH). Mesmo modificando parcialmente sua estrutura em função de ligações com cátions divalentes, estes grupos são identificados ao se analisar amostras na região do infravermelho (STODOLAK *et al.*, 2009).

Nesta técnica, observa-se que as amostras analisadas apresentaram grupos hidroxila (OH) responsáveis pela banda forte, larga e arredondada na faixa de 3480 a 3505 cm-1. Pode-se identificar ainda um estiramento médio na faixa de 2820 a 2980 cm⁻¹, característicos da ligação carbono / hidrogênio. Foi observado um estiramento forte e simétrico na faixa de 1550 a 1650 cm⁻¹, associado à presença do grupo carboxila (COO⁻). Observam-se ainda picos assimétricos na faixa de 1410 cm⁻¹ correspondentes ainda as carboxilas presentes nas amostras.

O espectro apresenta um estiramento na faixa 1000 a 1130 cm⁻¹, causado pela presença de grupamento éter (COC). De acordo com Sakugawa *et al.* (2004), o teor de ácido manurônico na amostra seria proporcional a intensidade deste pico. A análise destas amostras demonstrou alinhamento com os resultados encontrados por Li *et al.* (2008) e Sankalia *et al.* (2004).

O Amido OSA apresentou bandas no espectro de FTIR semelhantes ao alginato. Além de picos entre 1014 e 1150 cm⁻¹ que são atribuídos aos estiramentos das ligações glicosídicas C-O, característico do amido. E pico em 1662 cm⁻¹ referente aos grupos ésteres presente no amido OSA. Os resultados foram semelhantes ao encontrado por Song et al (2006) e Fang et al (2004).

A Figura 5.54 mostra o espectro da PenG pura e das microesferas de alginato/ Zn^{2+} /amido OSA com e sem PenG. Analisando o espectro da PenG pura, observa-se diversos picos entre os números de onda de 800 a 1500 cm⁻¹,indicando a presença de grupos carboxil e carboxilatos. O pico a 3350 cm⁻¹ corresponde ao estiramento da ligação N-H. Os picos entre 1700 e 1800 cm⁻¹ são atribuídos ao grupamento carbonila. O pico a 1502 e 1701 cm⁻¹ são característicos de estrutura de amida primária e secundária, respectivamente (TALEBPOUR et al., 2010).



Figura 5.53. Espectro do IR do amido OSA (—), alginato (—), microesfera de alginato/ $Zn^{2+}/amido$ OSA sem PenG (—).

No espectro das microesferas de Pen G em matriz de alginate/ Zn^{2+/}amido OSA, pode-se observar que os picos apresentados corresponderam a dos biopolímeros alginato e amido OSA, assim como os picos da PenG. Não apresentando, nenhum pico adicional ao espectro, indicando que não existe interação química entre os biopolímeros e o fármaco. Apesar dos resultados de DSC, mencionados anteriormente no item 5.15.1, mostrarem interação física entre os polímeros, os resultados de FTIR não revelou a formação de novos grupos químicos. Esses resultados confirmam a estabilidade química do antibiótico, a manutenção da atividade biológica e a possibilidade de um sistema de liberação controlada.

A Figura 5.55 mostra o espectro de FTIR da quitosana pura, das microesferas de PenG em matriz de alginato/Zn²⁺/amido OSA recobertas com quitosana. A análise de FTIR da quitosana revelou a presença de três picos: 1080, 1414, 1674 cm⁻¹, possivelmente relacionados com a elongação C=O da amida (banda amida I), grupo amônia (-NH₃⁺) e elongação do grupo C-O, respectivamente. É possível que o pico da ligação N-H da amida (II), normalmente visível a 1500-1600 cm⁻¹, esteja sobreposta com a ligação N-H do íon amônia. Na região *fingerprint*, entre 1400-1000 cm⁻¹, a quitosana apresentou picos característicos da sua estrutura celulósica, geralmente atribuídos a ligações C-O, C-C e C-N. A quitosana apresenta grupos amino protonados (NH₃⁺) em solução ácia, que apresentam uma banda de absorção larga em torno de 3300 cm⁻¹. A presença de grupos amida resulta no fato da quitosana ser obtida por desacetilação parcial da quitina (PAWLAK & MUCHA, 2003).



Figura 5.54. Espectro do FTIR das microesferas de alginato/amido OSA/Zn²⁺ sem PenG (—), com PenG (—) e PenG pura (—).

A espectroscopia na região do infravermelho foi empregada para confirmar a presença dos grupos funcionais em amostras de alginato e quitosana bem como as mudanças destes grupos após a formação das microesferas, avaliando a ocorrência de interação iônica entre os grupos funcionais do alginato e da quitosana. A Figura 5.55 mostra o espectro das microesferas recobertas com quitosana. A interação entre o alginato e a quitosana leva a formação do complexo alg-qui, cuja interação entre os polieletrólitos pode ser observada pela modificação dos modos vibracionais dos grupamentos principais da quitosana e do alginato.

As microesferas de PenG em matriz de alginato/Zn²⁺/amido OSA, recobertas com quitosana apresentaram redução e deslocamento na banda de absorção em 1257 e 1456 cm⁻¹, correspondente ao grupamento COO⁻. Bem como se observa a redução da banda de absorção dos grupos amino em 1674 cm⁻¹. No entanto, devido à sobreposição dos modos vibracionais dos polissacarídeos, não foi possível constatar a interação entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxílicos do alginato.



Figura 5.55. Espectro do FTIR da quitosana (---), microesfera de PenG em matriz de alginato/amido OSA/Zn²⁺(---), microesferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA/Zn²⁺ recobertas com quitosana (---).

5.17. Avaliação da atividade antimicrobiana

O ensaio microbiológico teve o objetivo de confirmar a atividade antimicrobiana da PenG associada a matriz polimérica. O método de difusão em ágar empregado na análise é um método qualitativo, que correlaciona a atividade antimicrobiana com um diâmetro da zona de inibição de crescimento microbiano. A Tabela 5.20 apresenta os valores do halo de inibição microbiano em diferentes tempos. O controle positivo foi um disco de filtro de papel com PenG 10% e para o controle negativo foram utilizados microesferas e microcápsulas puras, sem o antibiótico. Pode-se observar, na Tabela 5.20, que nos ensaios microbiológicos com as microesferas e microcápsulas contendo PenG foram observados halos de inibição do crescimento do *Streptococcus pyogenes* para todas as amostras testadas. Não houve formação de halos de inibição nas microesferas sem o antibiótico, controle negativo. O controle positivo apresentou halo de inibição em 24 horas, com diâmetro médio de inibição de 20,5 mm. As microesferas de PenG (amostras I, II e III) apresentaram halo de inibição do *S. pyogenes* menor que o controle positivo. Esse resultado, provavelmente ocorreu devido a não exposição direta da penG no meio de cultivo sólido quando microencapsulada na matriz polimérica.

Amostras*	Halo de inibição (mm) 24h
Controle negativo	-
Controle positivo	$20,5 \pm 1,68$
I	$14,54 \pm 1,10$
II	13,00 ± 1,99
III	$12,04 \pm 1,22$
IV	$7,55 \pm 1,04$
V	12,67 ± 1,10
VI	19,08 ± 2,01

Tabela 5.20. Atividade antimicrobiana por difusão em ágar da PenG presente nas microesferas e microcápsulas produzidas

(-) não houve inibição no crescimento microbiano. *Condições experimentais das amostras:

I: Microesfera de PenG 12%, alginato 4,0 %, IPE 4,5 %, CaCl₂ 0,2 M, tempo de reticulação de 17 min.

II: Microesfera de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, CaCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min.

III: Microesferas de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação de 30 min.

IV: Microcápsula de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação 30 min, quitosana 3 mg/mL.

V: Microcápsula de Pen G 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação 30 min, polilisina 0,05%.

VI: Microcápsula de PenG 10%, alginato 4,5%, amido OSA 2%, ZnCl₂ 0,35M, tempo de reticulação 30 min, quitosana 3 mg/m. Dissolvida em tampão fosfato e posteriormente liofilizada.

Verifica-se na Tabela 5.20, que a penG presente nas microcápsulas de alginato/amido OSA/quitosana apresentou uma halo de inibição do *S. pyogenes* ainda menor. As microcápsulas apresentam duas barreiras difusionais para a penG chegar até ao meio de cultivo, portanto o tempo para alcançar o diâmetro máximo de inibição é maior. Entretanto, o halo de inibição das microcápsulas de alginato/amido OSA/polilisina foi semelhante ao das microesferas, mostrando que o filme de polilisina não foi formado adequadamente, permitindo dessa forma uma liberação mais rápida da penG.

Gaspari (2006) avaliou a atividade antimicrobiana da streptomicina livre e encapsulada frente à *Escherichia coli*. O encapsulamento da streptomicina foi realizado a partir dos polímeros poli(ε -caprolactona e do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato), pela técnica de emulsificação seguida da evaporação do solvente. Os resultados mostram que o halo de inibição da *E. coli* foi menor com a streptomicina encapsulada do que livre, corroborando com os dados do presente trabalho.

Ao dissolver as microcápsulas de alginato/amido OSA/quitosana/penG (amostra VI) em tampão fosfato, pode-se observar que o halo de inibição foi semelhante ao controle positivo. Esse resultado mostrou que a atividade antimicrobiana da penG foi preservada após o processo de microencapsulamento desenvolvido no presente trabalho.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- ✓ Ao avaliar diferentes biopolímeros, os melhores materiais de parede para encapsulamento da penG foram a combinação de alginato e amido OSA e alginato e IPE, reticulados com cálcio, com retenção de 51,66% e 35,31%, respectivamente;
- ✓ Com o planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹ e planejamento fatorial completo 2³, foi possível otimizar a retenção de penG e avaliar alguns parâmetros que afetam a retenção da penG na matriz alginato/Ca²⁺/amido OSA. O alginato foi a variável que apresentou maior influência positiva sobre a variável de resposta. Desta forma, a combinação de alginato (4,5%), amido OSA (2%) e concentração de cloreto de cálcio de 0,35 M e penG (10%), propiciou uma retenção de 95,13 % de penG nas esferas;
- ✓ O microencapsulamento da penG também foi otimizado em matriz de alginato e amido OSA, reticulado com íons zinco. Com porcentagem de retenção de 92,27%. Ao substituir o cálcio por zinco, o diâmetro das esferas diminuiu, mostrando que o zinco foi um bom agente reticulante;
- ✓ As microesferas de alginato/Zn²⁺/amido OSA contendo penG, foram recobertas com os policátions quitosana e polilisina, obtendo uma porcentagem de retenção de 90,5 e 91,4%, respectivamente;
- ✓ O estudo de liberação *in vitro* da penG em matriz de alginato/ amido OSA, mostrou um perfil cinético de ordem zero. A penG foi liberada de forma gradual até atingir 65% em 432 horas (18 dias), atingindo o seu valor máximo. Não houve diferença significativa no perfil de liberação da penG quando realizado em meio contendo cloreto de cálcio, mostrando que a força iônica não influencia no perfil de liberação;
- ✓ Ao recobrir as esferas com quitosana, o perfil de liberação da PenG se tornou mais lento e prolongado, aumentando o tempo máximo de liberação para 22 dias. Sendo o modelo de Korsmeyer-Peppas que retratou mais adequadamente a liberação da PenG;
- ✓ Com o delineamento composto central rotacional foi possível aumentar a retenção da penG em matriz de alginato/IPE de 35,31% para 87,77% variando a concentração de alginato, IPE, cloreto de cálcio e penG;

- ✓ Ao substituir os íons cálcio por zinco, a porcentagem de retenção foi semelhante, porém usando o zinco como agente reticulante as esferas diminuíram de diâmetro;
- ✓ A liberação da pencilina G das esferas de alginato/Ca²⁺/IPE foi lenta e gradual até atingir 53 % em 96 horas (4 dias), atingindo o seu valor máximo. O modelo que retratou mais adequadamente a liberação da penG foi o de ordem zero, com o coeficiente de determinação da equação de 0,98;
- ✓ Os íons zinco foram mais eficientes em reter a penG em matriz de alginato/IPE, aumentando o tempo máximo de liberação da penG de 4 dias para 6 dias;
- ✓ Os biopolímeros alginato, amido OSA e quitosana, assim como os íons zinco apresentaram potencial analgésico. Além disso, as micoresferas de alginato/Zn²⁺/amido OSA, contendo penicilia G também apresentaram um importante efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção em camundongos.
- ✓ A morfologia das esferas de alginato/amido OSA e alginato/ IPE foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentando deformidades e superfícies rugosas devido ao processo de secagem, porém mostrando a forte coesão dos materiais de parede;
- ✓ As superfícies das microesferas apresentaram carga negativa, segundo os estudos de potencial zeta, vislumbrando o potencial de aplicação de um segundo biopolímero carregado positivamente nas microesferas, formando uma cápsula.
- Após o recobrimento das microesferas com os policátions, quitosana e polilisina o potencial zeta passou de negativo para positivo.
- ✓ Os estudos de intumescimento e erosão mostraram que as esferas não apresentaram capacidade notória de intumescimento e erosão. As esferas de alginato/IPE intumesceram 34%, enquanto que as esferas de alginato/ amido OSA, reticuladas com íons cálcio e zinco, intumesceram 25 e 20%, respectivamente. Ao recobrir as esferas com quitosana o grau de intumescimento diminuiu para 15%;
- ✓ O grau de erosão das esferas foi de 22% para as esferas de alginato/IPE e 5% para as esferas de alginato/amido OSA, ao longo de 30 dias de experimentos;
- As esferas apresentaram característica semicristalina, baseado nos estudos de difração de raios X e as microcápsulas apresentaram características amorfa. O padrão amorfo mostra a boa dispersão dos biopolímeros e antibiótico nas microcápsulas produzidas;

- ✓ Ao analisar a curva de DSC das microesferas de PenG em matriz de alginato/amido OSA, reticulados tanto com cálcio e com zinco, não foi observado a presença de eventos térmicos. As microcápsulas de algianto/amido OSA recobertas com quitosana, também não apresentaram evento térmico. Portanto até 350 °C nenhum evento de decomposição foi observado, mostrando a boa interação estabelecida entre os biopolímeros e o antibiótico;
- ✓ Os resultados de TGA mostraram também a estabilidade térmica das microesferas entre 100-120°C, (temperatura usada para preparação das microesferas), mostrando a viabilidade do método de preparação das microesferas;
- ✓ Os resultados de FTIR não revelou a formação de novos grupos químicos na formulação desenvolvida por alginato, amido OSA e penG . Esses resultados confirmam a estabilidade química do antibiótico, a manutenção da atividade biológica e a possibilidade de um sistema de liberação controlada;
- ✓ Os espectros obtidos por FTIR mostraram que houve interação entre as cadeias de quitosana e alginato, comprovando que ocorreu a formação de um filme de quitosana na superfície das esferas;
- A atividade antimicrobiana da PenG foi preservada após o microencapsulamento em diferentes matrizes poliméricas.

Portanto, o presente trabalho otimizou e caracterizou o processo de retenção da penG em matriz de alginato/amido OSA e alginato/IPE, obtendo um produto tecnológico com possibilidade de aplicação futura em implante subdérmico para tratamento profilático da febre reumática.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliação econômica do processo de produção das microesferas e microcápsulas;
- ✓ Ampliação de escala da produção das microesferas e microcápsulas;
- ✓ Avaliação da citotoxicidade dos materiais de parede, das microesferas e microcápsulas;
- ✓ Avaliação da atividade antinociceptiva das microcápsulas;
- ✓ Análise histopatológica das patas dos ratos winstar, submetidas ao implante subdérmico dos biomateriais e microesferas;
- ✓ Realizar experimentos no analgesímetro para comparar o mecanismo de analgesia da formulação desenvolvida neste trabalho com dois grupos de fármaco : Dipirona e Valdecoxib;
- ✓ Avaliação da liberação *in vivo* da penG;
- ✓ Avaliação da atividade antimicrobiana da penG em diferentes tempos de armazenamento da formulação;
- ✓ Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) da PenG microencapsulada;
- ✓ Realização de testes pré-clínicos.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo completo publicado em periódico

1. FONTES, G. C., FINOTELLI, P. V., ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M. "Optimization of Penicillin G Microencapsulation with OSA starch by Factorial Design". *Chemical Engineering Transactions*, v. 27, p. 85-90, 2012.

2. FONTES, G. C., CALADO, V. M. A., ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M. "Characterization of Antibiotic-loaded alginate-OSA starch microbeads produced by ionotropic pre-gelation." BioMed Research International, v. 2013, p. 1-11, 2013.

Publicação em Anais de Congressos (Trabalho completo)

3. FONTES, G. C. ; ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M. "Estudo da cinética de liberação controlada in vitro de penicilina G a aprtir de microesferas de alginato e capsul". In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012, Búzios. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012.

4. FONTES, G. C. ; DIP, E. C. ; MUNIZ, A. ; ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M. "Avaliação in vivo da atividade antinociceptiva de diferentes bioolímeros e microesferas de alginato e amido OSA contendo penicilina G." In: 7th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2012, Natal. Book of 7th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2012.

5. FONTES, G. C., ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M. "Encapsulação de Penicilina G em Diferentes Substratos Poliméricos Naturais." In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM 2011, 2011, Caxias do Sul. Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.

Publicação em Anais de Congressos (Resumo expandido)

6. FONTES, G. C., DOHMANN, H. F. R., ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M. "Partial characterization of polyssacharides microbeads loaded with antibiotic". In: *X Encontro da SBPMat*, 2011, Gramado. Program book - X Encontro da SBPMat, 2011.

7. FONTES, G. C., FINOTELLI, P. V., ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M "Morphological analyses and in vitro release of penicillin G entrapped in polysaccharide matrix." In: 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011, Ribeirão Preto. 8th CIFARP, 2011.

8. FONTES, G. C., FINOTELLI, P. V., ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M. "Penicillin G entrapped in different wall materials." In: *11th Internatiol Chemical and Biological Engineering Conference*, 2011, Lisboa. Book of the abstract of the 11th Internatiol Chemical and Biological Engineering Conference, 2011.

9. FONTES, G. C., Calado, V. M. A., ROSSI, A. M., ROCHA-LEAO, M. H. M. Characterization of antibiotic-loaded alginate microbeads produced by ionotropic pregelation by dsc and ftir studies. In: *South American Symposium on Microencapsulation*, 2012, Limeira. Book of abstracts of South American Symposium on Microencapsulation, 2012.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; KUMAR, V.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. Robbins & Cotran: Patologia bases patológicas das doenças. 8. ed. São Paulo: Elsevier, 2010.
- ABREU, F.O.M.S. Síntese e caracterização e hidrogéis biodegradáveis a bases de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos. Tese de doutorado em engenharia, área de concentração de ciências e tecnologia os matérias. Universidade Federal do Rio Grane o Sul, Porto Alegre, Brasil, 182 p., 2008.
- AL-MUSA, S.; FARA, D. A.; BADWAN, A. A. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *Journal of Controlled Release*, v. 57, p. 223-232, 1999.
- AMERI, M.; YUH-FUN, M. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. *Drying Technology*, v. 24, n. 6, p. 763-768, 2006.
- ANAL, A.K.; STEVENS, W.F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicilin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 290, pp. 45-54, 2005.
- ANJANI, K.; KAILASAPATHY, K.; PHILLIPS, M. Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 79-86, 2007.
- ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN JR., L. V., Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas E Sistemas De Liberação De Fármacos. São Paulo: Editorial Premier, p. 484 1999.
- ARICA, B.; ALIS, S. C.; KAS, H. S.; SARGON, M. F.; HINCAL, A. A. 5-Fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, pp. 267-269, 2002.
- ASLANI, P.; KENNEDY, R. A. Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross linking with calcium or zinc ion on diffusion of acetaminophen. *Journal of Controlled Release*, v. 42, pp.75-82, 1996.
- ASSREUY, A. M. S., GOMES, D. M., SILVA, M.S. J., TORRES, V.M; SIQUEIRA, R.C. L., PIRES, A.F., CRIDDLE, D. N; CAVADA, B.S., ALENCAR, N.M., SAMPAIO, A. H., FARIAS, W. R. L. Biological effects of a sulphated polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v. 31 (4), pp. 691-695, 2008.

- ATIK, F. A.; DIAS, A. R. POMERANTZEFF, P. M. A.; BARBERO-MARCIAL, M.; STOLF, N. A. G.; JATENE, A. D. Evolução imediata e tardia das substituições valvares em crianças menores de 12 anos de idade. *Arq. Bras. Cardiol*, v. 73, n. 5, pp. 410-423, 1999.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A.
 C. Quitina e quitosana: Aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2, pp. 27 – 34, 2007.
- BAJPAI, S.K.; SHARMA, S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca2p and Ba2p ions. *Reactive & Functional Polymer*, v. 59, pp.129-140. 2004.
- BAJPAI, S.K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1. *Reactive & Functional Polymer*, v. 66, n. 6, pp. 645-658, 2006.
- BAKER, R. W., LONSDALE, H. S. Controled release: mechanisms and rates. Em: Taquary, A. C., Lacey, R. E., eds. Controlled Release of Biologically Active Agents. New York: Plenum Press, pp. 15-17, 1974.
- BANSODE, S.S; BANARJEE, S.K.; GAIKWAD, D.D., JADHAV. S.L, THORAT, R.M. Microencapsulation : a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.1, pp. 38-43, 2010.
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.
- BASTOS, D. S. Produção e caracterização de filme alimentício com antioxidante aprisionado. Dissertação (Mestrado) – Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- BAYLES, K. W. The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends* in *Microbiology*, v. 8, pp. 274-278, 2000.
- BAZZO, C.G; SENNA, L.E; PIRES, N.T.A. Poly (3 hydroxybutyrate)/ chitosan/ ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. Carbohydrate Polymers.v. 77, pp. 839–844, 2009.
- BILLMEYER Jr., F. W. *Textbook of polymer science*. 3^{rd.} ed. New York: John Wiley & Sons, 1984.
- BOGÉA, C.P. Desenvolvimento de nanopartículas de alginato de zinco para fortificação de alimentos. Tese (doutorado) Programa de pós-graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

- BORGES, F.; BARBOSA, M. L. A.; BORGES, R. B.; PINHEIRO, O. C.; CARDOSO, C.; BASTOS, C.; ARAS, R. Características clínicas demográficas em 99 episódios de febre reumática no Acre, Amazônia Brasileira. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 84, n. 2, p. 111-114, 2005.
- BREKNER, M. J., SCHNEIDER, H. A., CANTOW, H. J. Approach to the composition dependence of the glass transition temperature of compatible polymer blends, *Polymer*, v. 29, no. 1, pp. 78-85, 2007.
- BRESOLIN, T.M.B.; RODRIGUES, C.A.; ANDREAZZA, I.F.I.; LUCINDA, R.M.; ANDREAZZA, R.C.S.; FREITAS, R.A.; MOURÃO, S.C. Sistemas de liberação de fármacos. In: BRESOLIN, B.M.T.; CECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Univali, p. 192-214, 2003.
- BRUNTON, L. L., LAZO, J.S, PARKER. K.L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11a Ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana, 2007.
- BUSSELBER, D., MICHAEL, D., EVAAS, M. L., CARPENTER, D. O. AND HAAS H. L. Zinc (Zn²⁺) blocks voltage gated calcium channels in cultured rat dorsal root ganglion cells. Brain Research, v. 593, pp. 77-81, 2000.
- BUZZI, V. Microesferas de polissacarídeos por redes poliméricas interpenetrantes (RPI) para o estudo e modulação do perfil de liberação do Piroxicam. Dissertação (Mestrado) Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2009.
- CANEVAROLO Jr., S. V. *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2004.
- CARAPETIS, J. R. Rheumatic heart disease in developing countries. *NEJM*, v. 357, n. 5, pp. 439-441, 2007.
- CARAPETIS, J. R.; McDONALD, M.; WILSON, N. J. Acute rheumatic fever. *Lancet*, 2005(b), v. 366, pp. 155-168.
- CARDELLO, H. M. A. B. & CELESTINO, E. M. Encapsulação de aromas e sabores: utilização de amidos como agentes encapsulantes. *Boletins da SBCTA*, v. 30, pp.166-171, 1996.
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., CERQUEIRA, M. A., SOUZA, B. W. S., TEIXEIRA, J. A., VICENTE, A. A. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multinanolayered films production. Carbohydrate polymer, v. 85, n. 3, pp. 522-528, 2011.

- CASAS, M.; FERRERO, C.; PAZ, M. V.; CASTELLANOS, M. R. J. Synthesis and characterization of new copolymers of ethyl methacrylate grafted on tapioca starch as novel excipients for direct compression matrix tablets. *European Polymer Journal.*, v.45, pp. 1765-1776, 2009.
- CASSIANI, S.H.B., RANGEL, S.M. Complicações locais pós-injeções intramusculares em adultos: revisão bibliográfica. Medicina, Ribeirão Preto, v. 32, pp. 444-450, 1999.
- CHAIN, E. The chemistry of penicillin. Annual Review of Biochemistry, v. 17, pp. 657-704, 1998.
- CHAN, L. W.; JIN, Y.; HENG, P. W. S. (2002). Cross- linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres. International Journal of Pharmaceutics, v. 242, pp. 255–258.
- CHAVES, J.A.P. Adsorção de corantes têxteis sobre a quitosana: condições, modelagem e otimização. Tese de doutorado. Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 96p, (2009)
- CHOI, W. S. & HAN, J. H. Physical and mechanical properties of pea-proetin-based edible films. *Journal of Food Science*,v. 66, pp.319-322, 2001.
- CHRONAKIS, I. S. On the molecular characteristics, compositinal properties, and structural functional mechanisms of maltodextrins: a review. *Critical Reviews in Food Science*, v. 38, pp.599-637, 1998.
- CHUNG, H.-J., LEE, S.-E., HAN, J.-A., LIM, S.-T. Physical properties of dry-heated octenyl succinylated waxy corn starches and its application in fat-reduced muffin. *Journal of Cereal Science*, v. 52, pp. 496 501, 2010.
- COSTA, C. J. P. Avaliação *in vitro* da lioequivalência de formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 2, abr./jun. 2002.
- COSTIGAN, M., WOOLF, C.J, Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain*, v. 1, n.3, pp. 35-44, 2000.
- COURA, C.O. Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* J.Agardh. Dissertação (mestrado) Curso de pós-graduação em bioquímica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- CRYSTAL STRUCTURE OF CALCIUM. http://www.webelements.com/webelements/ elements/text/Ca/xtal.html 2013.

- CRYSTAL STRUCTURE OF ZINC. http://www.webelements.com/webelements/ /elements/text/Zn/xtal.html 2013.
- CUNHA, T.M., VERRI, W.A., VIVANCOS, G.G., MOREIRA, I.F., REIS, S., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q. AND FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Brazillian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, pp. 401-407, 2004.
- DAJANI, A. S. Rheumatic fever. In: BRAUNWALD, E.; ZIPES, D. P.; LIBBY, P. *Heart disease*. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p. 2192-2198.
- DALLA-VECCHIA, R., SABRÃO, D., NASCIMENTO, M. G. & SOLDI, V. Carboxymethylcellulose and poly (vinyl alcohol) used as a film support for lípases immobilization. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2677-2682, 2005.
- DARVARI, R.; HASIRCI V. Pesticide and model drug release from carboxymethylcellulose microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v.13, p.9-24, 1996.
- DATASUS. Ministério da Saúde Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Disponível em: http://www.datasus.gov.br/. Acesso em: 24 nov. 2010.
- DE BOISSESON, M. R.; LEONARD, M.; HUBERT, P.; MARCHAL, P.; STEQUERT, A.; CASTEL, C.; FAVRE, E.; DELLACHERIE, E. Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interations: Bead formation, structure, and stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 273, n. 1, p. 131-139, 2004.
- DEMIATE, I.M. Desenvolvimento de fécula de mandioca auto-expansível. 149p. Tese de Doutorado em Agronomia Faculdade de ciências agronômicas da Universidade Estadual Paulista, 1999.
- DIP, C. E., LUZ, D., CASTRO-SILVA, I., PIRES, A., LINHARES, A., GRANJEIRO, M. Hypernociception and wound healing after application of cyanoacrylate ester as a tissue adhesive in rats. *Oral And Maxillofacial Surgery*, v. 114, n. 5, pp. 579-585.
- DRAGET, K. I.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 2, p. 47-55, 1997.
- DUBNER, R.; BENNETT, G.J. Spinal mechanisms of nociception. *Annual review of neuroscience*, v. 112, n.5, pp.1216-1224, 2006.
- DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, v. 7, pp. 126-151, 1988.

- ELLIOT, R. B, ESCOBAR, L., TAN, P.L., MUZINA, M., ZWINE, S., BUCHANAN, C. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 year after xenotransplantation. *Xenotransplantation*, v. 14, pp. 157-161, 2007.
- ENDRES, M., WENDA, N., WOEHLECKE, H., NEUMANN, K., RINGE, J., ERGGELET, C., et al. Microencapsulation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal progenitor cells from subchondral bone marrow in Ca-alginate for cell injection, *Acta Biomaterials*, v. 6, pp. 436-444, 2010.
- FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; NISHINARI, K.; FUNAMI, T.; WILLIAMS, P. A. Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, v. 72, pp. 334-341, 2008.
- FEDDERSEN, R.L., THORP, S.N. Sodium Carboxymethylcellulose. In: Whistler, R.L. and BeMiller, J.N. (Ed.), Industrial Gums Polysaccharides and their Derivatives. Academic Press, London, p.537-577, 2007.
- FERNANDEZ-HERVAS, M.J.; HOLGADO, M.A.; FINI, A.; FELL, J.T. In vitro evaluation of alginate beads of a diclofenac salt. *International Journal of Pharmaceutics*, 163, 23–34, 1998.
- FERREIRA, J.; TRICHES, K. M.; MEDEIROS, R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain*, v. 117, n. 1-2, p. 171-81, 2005.
- FINOTELLI, P. V. Microcápsulas de alginato contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de insulina. Tese (Doutorado) – Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- FINOTELLI, P. V. *Microencapsulação de vitamina antioxidante*. Dissertação (Mestrado) Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- FRIEDE, M.; AGUADO, M. T. Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 325 – 331, 2005.
- GASPARI, P.D.M. Preparação e caracterização de micro e nanopartículas poliméricas contendo streptomicina. Dissertação (Mestrado) Química na área de Físico-Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.
- GAZORI, T.; KHOSHAYANDB, M. R.; AZIZIC, E.; YAZDIZADED, P.; NOMANIA, A.; HARIRIAN, I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, n. 3, pp. 599-606, 2009.

- GEORGE, M.; ABRAHAM, E.T. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.
- GHUYSEN, J.M. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual Review of Microbiology*, v.45, pp.37-67, 1991.
- GOODMAN & GILMAN As Bases Farmacológicas da Terapêutica 11ª Ed. 2007
- GORDON, L. A.; LENNERNÃS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, New York, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- GOZZANI, J.L. Analgesia pós-operatória. In: Manica, J.M. Anestesiologia princípios e técnicas. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, pp. 1263-1270.
- GRACIE, E. S. L.; SBAFFI, F. Epidemiologia da febre reumática e o Programa de Erradicação e Profilaxia da Febre Reumática no Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Socerj*, v. 9, p. 111, 996.
- GRAY, C. J.; DOWSETT, J. Retention of Insulin in Alginate Gel Beads. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 31, p. 607-612, 1988.
- GUILHERME, L. et al. Towards a vaccine against rheumatic fever. Clinical & Developmental Immunology, v. 13, n. 2-4, p. 125-132, June-Dec. 2006.
- GULIYEVA, V.; ONER, F.; OZSOY, S.; HAZIROGLU, R. Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system. *Euro. J. Pharm. and Biopharm.*, v. 62, pp. 17 25, 2010.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. Controle local do fluxo sanguineo pelos tecidos. In: Tratao de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, pp. 166-173, 2002.
- HELLEBREKERS, L.J. Fisiopatologia da dor em animais. In: Dor em animais. São Paulo: Mannole, pp.69-79, 2002.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, New York, v. 52. p. 1145-1149, 1963.
- HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, New York, v. 50, n. 10, p. 874-875. 1961.
- HIGUCHI, T.; DAYAL. S.; PITMAN. I. H. Effects of solute-solvent complexation reactions on dissolution kinetics: testing of a model by using a concentration jump

technique. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, New York, v. 61, n. 5, p. 695-700, 1972.

- HILI, P.; EVANS, C.S.; VENESS R.G.; Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 269-275, 1997.
- HTTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/fenoximetilpenicilina_potassica.pdf, acessado em 10/10/2010.
- J. M. FANG, P. A. FOWLER, C. SAYERS AND P. A. WILLIAMS, The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions, *Carbohydrate Polymers*, vol. 55, pp. 283–289, 2004.
- JEONG, H.J., LEE, S.A., MOON, P.D., NA, H.J., PARK, R.K., UM, J.Y., KIM, H.M., HONG, S.H. (2006) Alginic acid has anti-anaphylactic effects and inhibits inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation . *Clinical & Experimental Allergy*, v. 36, pp. 785 – 94, 2006.
- JULIUS, D; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 6852, pp. 203-210, 2001.
- K. C. HUBER AND J. N. BEMILLER, "Modified starch" in Starches: Characterization, Properties, and Applications, A. Bertolini, Eds., pp. 145–203, CRC Press, New York, NY, USA, 2009.
- KADLECOVA, Z., RAJENDRA, Y., MATASCI, M., BALDI, L., HACKER, D.L., WURM, F.M., KLOK, H.A. DNA delivery with hyperbranched polylysine: A comparative study with linear and dendritic polylysine. Journal of Control Release, v. 13, pp. 46-56, 2013
- KANG, H., VITKO, L., LEE, S., PEREZ-REYES, E., LEE, J. Structural Determinants of the High Affinity Extracellular Zinc Binding Site on Cav3.2 T-type Calcium Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 5, pp. 3271–3281, 2010.
- KHAIROU, S.K.; AL-GETHAMI, M.W.; HASSAN, M.R. Kinetics and mechanism of solgel transformation between sodium alginate polyelectrolyte and some heavy divalent metal ions with formation of capillary structure polymembranes ionotropic gels. *Journal of Membrane Science*, v. 209, p. 445-456. 2002.
- KIORTSIS, S., KACHRIMANIS, K., BROUSSALI., T., MALAMATARIS, S. Drug release from tableted wet granulations comprising cellulosic (HPMC or HPC) and hydrophobic component. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, pp. 73-83, 2005.
- KITTUR, F. S.; PRASHANTH, K. V. H.; UDAYA, S. K.; THARANATHAN, R. N.; Characterization of chitin and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, v.49, pp. 185-193, 2002.
- KLAUMANN, P.R. et al. Patofisiologia da dor. *Archives of Veterinary Scince*, v. 13, n. 31, pp. 1-12, 2008.
- KOKUBO T., KUSHITANI H., SAKKA S., KITSUGI T. and YAMAMURO T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glassceramic. A-W. J Biomed Mater Res, v. 24, pp. 721-734, 1990.
- KORSMEYER, R. W. ; PEPPAS, N. A. Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled systems. In: ROSEMAN, T.J.; MANSDORF, S.Z., (Eds.). Controlled release delivery systems. New York: Marcel Dekker, pp. 77-90, 1981.
- KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm*, Amsterdam, v. 15, n. 1, pp. 25-35, 1983.
- KRIKORIAN, V., KURIAN, M., GALVIN, M. E., NOWAK, A. P., DEMING, T. J., POCHAN, D. J. Polypeptide-Based Nanocomposite: Structure and Properties of Poly(L-lysine)/Na_-Montmorillonite. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, v. 40, pp. 2579–2586, 2002.
- LAMAIRE, V., BÉLAIR, J., & HILDGEN, P. Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 258, p. 95-107, 2003.
- LARAUS, J.; COOPER. J. Absorption. Testing and clinical evaluation of oral prolonged action drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, New York, v. 50, p. 215-232, 1961.
- LE HIR, A. Noções de Farmácia Galênica. 6 ed. São Paulo : Organização Andrei Editora Ltda. pp. 224-227, 1997.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D. L; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D.L; COX, M. M. Princípios de bioquímica, 4° ed. Editora Sarvier, São Paulo, Brasil, 2006.
- LEONARD, M.; RASTELLO DE BOISSESON, M.; HUBERT, P.; DALENÇON, F.; DELLACHERIE, E. Hidrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *J. Control. Release*, Amsterdam, v. 98, p. 395-405, 2004.

- LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1772, n. 8, pp. 989-1003, 2007.
- LI, X.; KONG, X.; SHI, S.; ZHENG, X.; GUO, G.; WEI, Y.; QIAN, Z. (2008). Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. BMC Biotechnology, v. 8, n. 89, 2009.
- LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V.; BORSALI, R. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. *Quimica Nova*, v. 30 (4), pp. 832-837, 2007.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrifílicos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, p. 143-154, 2005.
- MA, Y., ZHANG, Y., LIU, Y., CHEN, L., LI, S., ZHAO, W., SUN, G., LI, N., WANG. Y., GUOJUN, X.G.L. Investigation of alginate–L-poly-L-lysine microcapsules for cell microencapsulation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 101, pp. 1265–1273, 2013.
- MAIA, L. H. Microencapsulamento de lactoferrina bovina (bLF) por Spray Drying. 2004.170p. Tese (Doutorado em ciencias de alimentos) Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.
- MANO, J. F., KONIAROVA, D. REIS, R. L. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potencial biomedical applicability. *Journal of materials science: Materials in medicine*, v. 14, pp. 127–135, 2003.
- MANSOURI, S., LAVIGNE, P., CORSI, K., BENDERDOUR, M., BEAUMONT, E., FERNANDES, J.C. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy : strategies to improve transfection efficacy. *Europe Journal of Pharmacutics Biopharmaceithics*, v. 57, pp. 1-8, 2004.
- MANYEMBA, J.; MAYOSI, B. M. Penicillin for secondary prevention of rheumatic fever (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*. Oxford: Update Software, 2003, Issue 3.
- MARIJON, E.; PHALLA, Ou; CELERMAJER, D. S.; FERREIRA, B.; MOCUMBI, A. O.; DINESH, A.; PAQUET, C.; JACOB, S.; SIDI D.; JOUVEN, X. Prevalence of rheumatic heart disease detected by echocardiographic screening. *N Engl J Med*, v. 357, n. 5, p. 470-476, 2007.

- MARTÍNEZ, L.; VILLALOBOS, R.; SÁNCHES M.; CRUZ, J.; GANEM, A.; MELGOZA, L. M. Monte Carlo simulations for the study of drug release from cylindrical matrix systems with an inert nucleus. Int. J. Pharm., v.369, pp.38-46, 2009.
- MATEOS-APARICIO, I., CUENCA, A. R., VILLANUEVA-SUAREZ, M. J., & ZAPATA-REVILLA, M. A. Soybean, a promising health source. Nutrición Hospitalaria, v. 23, pp. 305–312, 2008.
- MEIRA, Z. M. A.; GOULART, E. M. A.; COLOSIMO, E. A.; MOTA, C. C. C. Long term follow up of rheumatic fever and predictors of severe rheumatic valvar disease. In: Brazilian children and adolescents. *Heart*, v. 91, n. 8, p. 1019-1022, 2005.
- MENEZES, J.C.; ALVES, T.P.; CARDOSO, J.P.; Biotecnologia Microbiana:
 A Produção de Penicilina. *Biotecnologia. Fundamentos e Aplicações.*Cap. 12. pp. 15. N. Lima e M. Mota (eds.), DIFEL. 2000.
- MENEZES, M.S. Anatomia e fisiologia da dor. In: MANICA, J.M. Anestosiologia princípios e técnicas. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, PP.1251-1257, 2004.
- MICHAUD, C.; RAMMOHAN, R.; NARULA, J. Cost-effectiveness analysis of intervention strategies for reduction of the burden of rheumatic heart disease. In: NARULA, J.; VIRMANI, R.; REDDY, K. S.; TANDON, R. (eds). *Rheumatic fever*. Washington: American Registry of Pathology,1999. p. 485-497.
- MIRANDA, M. C. C. Reações adversas não alérgicas à suspensão injetável de benzilpenicilina benzatina: uma revisão sistemática. Dissertação (mestrado) Curso de pós-graduação em saúde pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.
- MIRSHAFIEY, A., REHM, B.H.A. Alginate and Its Comonomer Mannuronic Acid: Medical Relevance as Drugs. IN: Alginates: Biology and Applications, v. 13, 2009.
- MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 6, p. 9–24, 2010.
- MONTGOMERY, D. C. *Design and analysis of experiments*. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 704p.
- MOTA, C. C. C.; MÜLLER, R. E. Febre reumática. In: CROTI, U. A.; MATTOS, S.S.; PINTO Jr., V. C.; AIELLO, V. D. *Cardiologia e cirurgia cardiovascular pediátrica*. São Paulo: Roca, 2008. p. 594-602.
- MOURA, L. F. L. Efeito antinociceptivo mecânico e neurotoxicidade o meloxicam aministrado por via subracnóidea em ratos wistar. Dissertação (mestrado) Curso de pós-graduação em Ciências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

- MÜLLER, R. E.; GOLDENZON, A. V. Grupo de trabalho sobre febre reumática. Documento final dos grupos de trabalhos do CONSOPERJ – Congresso da Sociedade de Pediatria do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- NAKAMURA, K., NISHIMURA, Y., HATAKEYAMA, H., HATAKEYAMA, T. Thermal properties of water insoluble alginate films containing di and trivalent cátions. *Thermochimica Acta*, v. 267, pp. 343-353, 1995.
- NAVARRO, P.G.; BLÁSQUEZ, I.H.; OSSO, B.Q.; GARCIA, A.A.M.; DE LAS PARRAS, P.L.M.; PUENTEDURA, M.I.M. Penicillin degradation catalvzed by Zn²⁺ íon in methanol. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 33. p. 159-166. 2003.
- NEISER, S.; DRAGET, K. I.; SMIDSDORT, O. Interactions in bovine serum albumincalcium alginate gel systems. *Food Hidrocol.*, Oxford, v. 13, p. 445-458, 1999.
- NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora Unicamp, 1995. 299p.
- NETTO, C. G. T.; GIACOMETTI, J. A.; JOB, A. E.; FERREIRA, F. C.; FONSECA, J. L. C.; PEREIRA, M. R.; Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, pp. 97-103, 2005.
- NGAH, W. S. W.; GHANI, S. A.; KAMARI, A. Adsorption behaviour of Fe (II) and Fe (III) ions in aqueous solution on chitosan and cross linked chitosan beads. *Bioresourse Technology*, v. 96, pp. 443 450, 2005.
- OKAMOTO, Y., KAWAKAMI, K., MIYATAKE, K., MORIMOTO, M., SHIGEMASA, Y., MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, pp. 249-52, 2002.
- OLIVEIRA, A. P. C. *Produção e caracterização de partículas de hidrogéis para aplicações em cosméticos*. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2004.
- OLIVEIRA, L. F., PEDROSO, H. S., PINEIRO, R. S., TELES, S. A; MATOS, M. A., JUNQUEIRA, A. L. N. Avaliação da aceitação da injeção intramuscular de penicilina aplicada na região ventro glúteo em unidade de emergência em Goiânia-GO. Monografia de final de curso, Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, 2005.
- ONSONYEN, E. Alginates. In: IMESON, A. *Thickening and gelling agents for food*. 2. ed. New York: Aspen Publishers, 1997. Cap. 2: p. 22-244.

- PARK, I. K.; PARK, Y. H.; SHIN, B. A.; CHOI, E. S.; KIM, Y. R.; AKAIKE, T. Galactosylated chitosan-graft-dextran as hepatocyte-targeting DNA Carrier. *Journal of Control Release*, v. 69, pp. 97-108, 2012.
- PAWLAK, A., MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, v. 396, pp. 153–166, 2003.
- PEREIRA, H. V. R.; SARAIVA, K. P.; CARVALHO, L. M. J.; ANDRADE L. R.; PEDROSA, C.; PIERUCCI, A. P. T. R. Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Research International*, v. 42, p. 115-121, 2009.
- PETROFF, E. Y.; PRICE, M. P.; SNITSAREV, V.; GONG, H.; KOROVKINA, V.; ABBOUD, F. M.; WELSH, M. J. Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K+ channels. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 105, n. 8, pp. 3140-4, 2008.
- PIERUCCI, A. P. T. R. Microencapsulamento de vitaminas antioxidantes para fortificação de um suplemento energético para atletas. Dissertação (Mestrado) – Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- PIERUCCI, A. P. T. R., ANDRADE, L. R., BAPTISTA, E. B., VOLPATO, N. M., & ROCHA-LEÃO, M. H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation*, v. 23, p. 654–662. 2006.
- PIERUCCI, A. P. T. R., ANDRADE, L. R., FARINA, M., PEDROSA, C., & ROCHA-LEÃO, M. H. M. Comparison of a-tocopherol microparticles produced with different wall materials: Pea protein a new interesting alternative. *Journal of Microencapsulation*, v. 24, 201–213, 2007.
- PILLAY, V., DANCKWERTS, M. P., MUHIDINOV, Z. FASSIHI, R. Novel Modulation of Drug Delivery Using Binary Zinc-Alginate-Pectinate Polyspheres for Zero-Order Kinetics Over Several Days: Experimental Design Strategy to Elucidate the Crosslinking Mechanism. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 31, pp. 91– 207, 2005.
- POTHAKAMURY, U. R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends Food Sci. Tech.*, v. 6, n. 12, p. 397-406, 1995.
- PRASAD, A.S., Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Experimental Gerontology*, v. 43, n. 53, pp. 370-7, 2008.

- QUENTAL, A. C., CARVALHO, F. P., TADA, E. S., FELISBERTI, M. I. Blendas de phb e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade. *Quimica Nova*, v. 33, no. 2, pp. 438-446, 2010.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Farmacologia. Rio de Janeiro: 5 ed., Elsevier, 2004.
- RANGEL, A., SARAIVA, K., SCHWENGBER, P. NARCISO, M. S., DOMONT, G. B., FERREIRA, S.T., PEDROSA, C., 2004. Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Food Chemistry*, v. 87, p. 491-499, 2004.
- RATINER, B. D., Biomaterials Science: An Introduction To Materials In Medicine. San Diego: Academic Press, p. 484, 1996.
- RATTO, J.; HATAKEYAMA, T.; BLUMSTEIN, R. B., Differential scanning calorimetry investigation of phase transition in water/chitosan systems. *Polymers*, v.36, p. 2915-2919, 1995.
- RAVI KUMAR, N. M. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reative and Funtional Polymers*, v. 46, pp. 1 27, 2000.
- RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, v. 16, n. 6, p.1195-1236, 1998.
- REIS, A. Produção de cápsulas de liberação controlada para fins de biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos do petróleo. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- ROBERTSON, K. A.; VOLMINK, J. A.; MAYOSI, B. M. Antibiotics for the primary prevention of acute rheumatic fever: a meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders*, v. 5, p. 11, 2005. Disponível em: http://www.biomedcentral.com/1471-2261/5/11>. Acesso em: 10 mar. 2009.
- RODANTE, F., VECCHIO, S., TOMASSETTI, M. Kinetic analysis of thermal decomposition for penicillin sodium salts Model-fitting and model-free methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 29, pp. 1031–1043, 2002.
- ROGER, D.; TALBOT, D.; BEE, A. Preparation and effect of Ca2+ on water solubility, particle release and swelling properties of magnetic alginate films. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 305, p. 221-227, 2006.
- ROSENBERG, M., KOLPELMAN, I.J., TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 1288-1294, 1990.

- ROTH, I. R.; LINGG, C.; WHITTEMORE, A. Heart disease in children. A rheumatic group I. Certain aspects of the age at onset and of recurrences in 488 cases of juvenile rheumatism ushered in by major manifestations. *Am Heart J*, v. 13, p. 36-60, 1937.
- SAKANAKA, L. S. Confecção de filmes biodegradáveis por extrusão de blendas de amido termoplástico e poolibutileno succinato co-adipato (PBSA). Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.
- SAKUGAWA, K.; IKEDA, A.; TAKEMURA, A.; ONO, H. (2004). Simplified Method for Estimation of Composition of Alginates by FTIR. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 93, p. 1372-1377.
- SAKURAI, K.;MAEGAWA, T. T.; TAKAHASHI, T., Glass transition temperature of chitosanand miscibility of chitosan/poly (n-vinyl pyrrolidone)blends. *Polymer*, v. 40, p. 19-56, 2000.
- SANCHEZ-MONGE, R., LOPEZ-TORREJÓN, G., PASCUAL, C. Y., VARELA, J., MARTIN-ESTEBAN, M. & SALCEDO, G.. Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clinnical Experiments in Allergy*, v. 34, pp. 1747-1753, 2004.
- SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA V. B. (2005). Papain Entrapment in Alginate Beads for Stability Improvement and Site-Specific Delivery: Physicochemical Characterization and Factorial Optimization Using Neural Network Modeling. AAPS PharmSciTech, v. 6, n. 2, article 31, pp. E209- E222.
- SANTOS, E., ORIVE, G., CALVO, A., CATENA, R., FERNÁNDEZ-ROBREDO, P., LAYANA, A.G., HERNÁNDEZ, R.M., PEDRAZ, J.L. Optimization of 100 μm alginate-poly-L-lysine-alginate capsules for intravitreous administration. *Journal of Control Release*, v.158, pp. 443-450, 2012.
- SANTOS, J., SOARES, J. P., DOCKAL, E. R. FILHO, S. P. C, CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, nº 4, pp. 242-249, 2003.
- SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulinloaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr. Polym.*, Barking, v. 66, p. 1-7, 2006.
- SARTORI, C.; FINCH, D. S.; RALPH, B.; GILDING, K. Determination of the cation content of alginate thin films by *FTIR* spectroscopy. *Polymer*, v. 38, p. 43-51, 1997.
- SCHWENKE, K. D. Reflections about the functional potential of legume proteins. *Review*. *Nahrung*, v. 45, p. 377-381,2001.

- SEGATO, M. P. Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalinos-terrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio. Dissertação de mestrado, Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 112 p., 2007.
- SEGURA-CAMPOS, M., CHEL-GUERRERO L., BETANCUR-ANCONA D. Synthesis and partial characterization of octenylsuccinic starch from Phaseolus lunatus. *Food Hydrocolloids*, v. 22, pp. 1467–1474, 2008.
- SERRA, L.; DOMÉNECK, J.; PEPPAS, N. A. Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. *Biomaterials*, v.27, p.5440-5451, 2006.
- SHEU, T.Y., & ROSENBERG, M. J. Microencapsulation by spray drying ethyl caprylate in whey protein and carbohydrate wall systems. *Food Science*. v. 60, p. 98-103,1995.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, pp.139-157, 2001.
- SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 29, p. 148-159, 2006.
- SINGH A.V. Biopolymers in Drug Delivery: A Review. *Pharmacologyonline*, v.1, pp. 666-674, 2011.
- SMIDERLE, F.R., OLSEN, L.M., CARBONERO, E.R., BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., MARCON, R., SANTOS, A.R.S., GORIN, P.A.J., IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodentmodel of a (1-3),(1-6)-linked β-glucan isolated from Pleurotus pulmonarius. Immunopharmacolgy and Inflammation. *European Journal of Pharmacology*, v. 597, pp. 86–91, 2008.
- SNITCOWSKY, R. Evolução tardia do implante de prótese de dura-mater em posição mitral. Estudo de pacientes em idades inferiores a 16 anos. Tese (Doutorado) – São Paulo: Universidade de São Paulo, 1983.
- SOARES, J. P., SANTOS, J. E., CHIERICE, G. O., CAVALHEIRO, E. T. G., Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt, v.29, no. 2, pp. 57-63, 2004.
- SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. Revista Saúde e Ambiente (UNIVILLE), v. 7, p. 12-20, 2006.
- SONG, X.; HE, G.; RUAN, H., CHEN, Q. Preparation and Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Early Indica Rice Starch. *Starch*, v. 58, pp. 109-117, 2006.

- SOUZA, K. V. Desenvolvimento de espécies de ferro imobilizadas em matrizes poliméricas e sua utilização na remediação de resíduos industriais. 2009. 192 f. Tese (Doutorado em química orgânica) Instituto de química, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R. A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 358, p. 205-213, 2008.
- STEER, A. C. CARAPETIS, J. R. Acute Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease in Indigenous Populations. *Pediatrics clinics of north Americans*, 56, 1401–1419, 2009.
- STODOLAK, E.; PALUSZKIEWICZ, C.; BOGUN, M.; BLAZEWICZ, M. Nanocomposite fibres for medical applications. *Journal of Molecular Structure*, v. 924–926, pp. 208–213, 2009.
- SUAVE, J.; DALLAGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.;
- SULAIMAN, M.R. et al. Evaluation of the antinociceptive activity of Ficus deltoidea aqueous extract. *Fitoterapia*, 5 pp., 2008.
- SUN, Y.G.; LUNDENBERG, T.; YU, L.C. Involvement of endogenous beta-endorphin in nociception in the arcuate nucleous of hypothalamus in rats with inflammation. *Pain*, v.104, pp. 55-63, 2003.
- TAKEUCHI, H.; MATSUI, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. *Journal of Control Release*, v. 86, pp. 42 235, 2003.
- TALEBPOUR, Z., TAVALLAIE, R., AHMADI, S. H., ABDOLLAHPOUR, A. Simultaneous determination of penicillin G salts by infrared spectroscopy: Evaluation of combining orthogonal signal correction with radial basis function-partial least squares regression. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 76, pp. 452–457, 2010.
- TARANTA, A.; MARKOWITZ, M. *Rheumatic fever*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. pp. 103.
- TERRERI, M. T.; LEN, C.; HILÁRIO, Moe; GOLDENBERG, J.; FERRAZ, M. B. Utilização de recursos e custos de pacientes com febre reumática. *Rev Bras Reumatol*, v. 42, n. 4, pp. 211-217, 2002.
- THIRATHUMTHAVORN, D., CHAROENREIN, S. Thermal and pasting properties of native and acid-treated starches derivatized by 1-octenyl succinic anhydride. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, pp. 258–265, 2006.

- TOBIAS, C.A., HAN, S.S.W., SHUMSKY, J.S., KIM, D., TUMOLO, M., DHOOT, N.O, et al., Alginate encapsulated BDNF producing fibroblast grafts permit recovery of function alter spinal cord injury in the absence of immune suppression, Journal of Neurotrauma, v. 22, pp. 138-156, 2005)
- TONNESEN, H.H.; KARLSEN, J. Alginate in drug delivery systems. *Drug development and industrial pharmacy*, v. 28, pp. 621-630, 2002.
- TRANQUILLI, W.J. FISIOLOGIA DA OR AGUDA. In:GRENE, S.A. Segreds em anestesia veterinária e manejo da dor. Porto Alegre: Artmed, pp.399-402, 2004.
- U. A. SHINDE AND M. S. NAGARSENKER, "Characterization of Gelatin-Sodium Alginate Complex Coacervation System." Indian Journal of pharmaceutical Sciences, vol. 71, no. 3, pp. 313-317, 2009.
- UDDIN, M. S.; HAWLADER, M. N. A.; ZHU, H. J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. *Journal of. Microencapsulation*, v. 18, n. 2, pp. 199-209, 2001.
- ULUDAG, H., DE VOS, P. & TRESCO, P. A. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 42, pp. 29-64, 2008.
- VASAN, R. S.; SELVARAJ, N. Natural history of acute rheumatic fever. In: NARULA, J.; VIRMANI, R.; REDDY, K. S.; TANDON, R. *Rheumatic fever*. Washington: American Registry of Pathology, 1999. pp. 347-358.
- VERRI, W.A., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? Pharmacology & Therapeutics, v.112, n. 1, pp.116-38, 2006.
- VIANA, G.S.B., FREITAS, A.L.P., LIMA, M.M.L., VIEIRA, L.A.P., ANDRADE, M.C.H. BENEVIDES, N.M.B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae Bryothamnion seaforthii (Turner) Kütz. and B. triquetrum (S.G. Gmel.) M. Howe. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.35, n.6, pp. 713-22, 2002.
- VICTOR, S. Dilemmas in the management of rheumatic heart disease. *J Indian Med Assoc*, v. 97, n. 7, pp. 265-270, Jul. 1999.
- VIER, N. V. Otimização de sistemas multiparticulados de quitosana-alginato para liberação colônica de fármacos. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.
- VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. *Tratado de tecnologia farmacéutica*. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982. pp. 265-268.

- WALTON, D. E.; MUMFORD, C. J. Spray dried products-characterization of particle morphology. *Trans IChemE*, v. 77(a), pp. 21-38,1999.
- WANG Q.; HU, X.; DU, Y.; KENNEDY, J. F. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, pp. 842-847, 2010.
- WARING, M. J. & PARSONS, D. (2001). Physico-chemical characterization of carboxymethylated spun cellulose fibres. *Biomaterials*, v. 22, pp. 903-012, 2001.
- WILLATS, W. G. T., KNOX, J. P., MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, v.17, pp.97-104, 2006.
- WISE, D. L. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000.
- WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specif pharmacologic management. Annals of Internal Medicine, v. 140, n.6, pp. 441-51, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Rheumatic fever and rheumatic heart disease*. Report of a WHO Expert Consultation. Geneva, 29th Oct - 1st Nov. 2001. WHO technical report series, 923. Geneva, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Who model prescribing information*. Drugs used in the treatment of streptococcal pharyngitis and prevention of rheumatic fever. Geneva, 1999.
- YANG, G.; ZHANG, L. N.; PENG, T.; ZHONG, W. Effects of Ca2+ bridge cross-linking on structure and pervaporation of cellulose/alginate blend membranes. *Journal of Membrane Science*, v. 175, pp. 53-60, 2000.
- YOO, S. H.; SONG, Y. B.; CHANG, P. S.; LEE, H. G. Microencapsulation of αtocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 38, pp. 25-30, 2006.
- YU, C. Y.; YIN, B. C.; ZHANG, W.; CHENG, S. X.; ZHANG, X. Z.; ZHUO, R. X. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. *Colloids and Surfaces B*: Biointerfaces, v. 68, pp. 245-249, 2009.
- ZACTITI, E. M.; KIECKBUSCH, T. G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, v. 77, pp. 462-467, 2006.

- ZELLER, B. L.; SALEEB, F. Z.; LUDESCHER, R. D. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, n. 11-12, pp. 389-394, 1999.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, pp. 109-10, 1983.
- ZOHURIAN, M. J.; SHOKROHALI, F. Thermal studies on natural and modified gums. Polymer Testing, v. 23, n. 5, pp.575-579, 2004.