

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

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA DO FÁRMACO ENROFLOXACINA A PARTIR DE
MICROESFERAS DE MALONILQUITOSANA A SER APLICADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

SALÉTE VALGAS

Tese apresentada no curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do Título de doutora em Química.
Área de concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Mauro C.M. Laranjeira.

Florianópolis
2005

AGRADECIMENTOS

- Ao Nosso Pai Maior, pela oportunidade do conhecimento.
- Ao Professor Mauro, pela sua capacidade de orientação, pela confiança em mim depositada e pelo companheirismo demonstrado.
- A Professora Rozangela, pelo grande apoio na fase experimental.
- Ao Professor Valfredo pela contribuição durante este trabalho.
- Aos amigos de laboratório: Alexandre, Viviane, Vanessa, Karin, Amauri, Amarildo, Inês, Elder. Enfim, a todos os amigos com os quais eu convivi nestes anos.
- À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade da conclusão do curso.
- À universidade Tecnológica do Paraná - campus Ponta Grossa, pelo apoio institucional.
- Especialmente ao meu pai Ernani e as minhas filhas Juliana e Luciana que dividiram comigo momentos de alegria e dúvidas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Reviso Bibliográfica.....	5
2.1 Antimicrobianos.....	5
2.1.1 Antimicrobianos da classe das quinolonas.....	5
2.1.2 Aspectos biológicos dos antibióticos.....	6
2.1.3 Evolução da quinolonas.....	7
2.2 Enrofloxacina: Uma fluoroquinolona de uso exclusivo em veterinária.	12
2.2.1 Aspectos biológicos e químicos da enrofloxacina.....	13
2.2.2 Mecanismo de ação das quinolonas.....	18
2.2.3 Propriedades farmacocinéticas.....	19
2.2.4 Biodisponibilidade das fluoroquinolonas.....	21
2.2.5 Propriedades farmacodinâmicas.....	23
2.2.6 Efeitos toxicológicos.....	26
2.3 Polímero quitosana.....	30
2.4 cido malônico.....	34
2.5 Microcápsulas e microencapsulação.....	35
2.6 Sistemas de liberação controlada de fármacos.....	38
2.7 Mecanismos de liberação de fármacos.....	44
2.8 Sistema gastrintestinal das espécies animais.....	48
2.9 Condições fisiológicas para a liberação controlada de fármacos.....	51
2.10 Liberação controlada de fármacos na medicina veterinária.....	54
3. Objetivos.....	57
3.1 Objetivo geral.....	57
3.2 Objetivos específicos.....	57
4. Metodologia.....	59
4.1 Reagentes e soluções.....	59

4.2 Animais.....	59
4.3 Métodos.....	60
4.3.1 Preparação das microesferas de quitosana (QT).....	60
4.3.2 Caracterização das microesferas de quitosana (QT).....	60
4.3.2.1 Grau de desacetilação da quitosana (%GD).....	60
4.3.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN ¹³ C das microesferas de quitosana.....	62
4.3.2.3 Espectroscopia no infravermelho (IV) das microesferas de quitosana....	62
4.3.2.4 Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG) das microesferas de quitosana.....	63
4.3.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) das microesferas de quitosana.....	64
4.4 Preparação da microesferas de malonilquitosana (MLQT).....	65
4.5 Reticulação das microesferas de malonilquitosana (MLQT).....	65
4.6 Caracterização das microesferas de malonilquitosana (MLQT).....	67
4.6.1 Determinação de grupos amino livres (-NH ₂) por titulação condutimétrica.	67
4.6.2 Determinação do grau de substituição do grupo malonil por análise elementar (CHN).....	67
4.6.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN ¹³ C.....	68
4.6.4 Espectroscopia no infravermelho (IV) das microesferas de malonilquitosana.....	68
4.6.5 Análise termogravimétrica (TGA) das microesferas de malonilquitosana...	68
4.6.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) das microesferas de malonilquitosana.....	69
4.6.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	69
4.6.8 Determinação do grau de intumescimento (GI%) da malonilquitosana água.....	70
4.6.9 Determinação do grau de intumescimento (GI%) seqüencial das microesferas da malonilquitosana em diferentes pH.....	71
4.7 Processo de impregnação da enrofloxacina.....	71
4.7.1 Determinação da quantidade máxima de enrofloxacina impregnada em microesferas da malonilquitosana.....	72

4.8 Estudo de liberação <i>in vitro</i> da enrofloxacin impregnada em microesferas da malonilquitosana (MLQT).....	73
4.9 Estudo de liberação <i>in vivo</i> da enrofloxacin impregnada em microesferas da malonilquitosana (MLQT).....	74
5. Resultados e Discussão.....	76
5.1 Titulação condutimétrica e análise elementar.....	76
5.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN ¹³ C.....	78
5.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	80
5.4 Análise termogravimétrica (TGA) da microesferas de quitosana e da malonilquitosana.....	82
5.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	83
5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas da malonilquitosana sem enrofloxacin e das contendo a enrofloxacin.....	85
5.7 Grau de intumescimento (GI%) da MLQT em água e em soluções tampão simulando o TGI animal.....	87
5.8 Liberação <i>in vitro</i> da enrofloxacin impregnada nas microesferas de malonilquitosana.....	89
5.9 Estudo cinético de liberação da enrofloxacin em solução tampão pH 6,8.....	91
5.10 Liberação <i>in vivo</i> da enrofloxacin impregnada em microesferas da malonilquitosana.....	94
6. Perspectivas de trabalho.....	96
7. Conclusões.....	98
8. Referências Bibliográficas.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ácido nalidíxico.....	8
Figura 2. Estrutura do ácido oxolínico.....	09
Figura 3. Estrutura do ácido piromídico.....	09
Figura 4. Estrutura do ácido pipemídico.....	10
Figura 5. Estrutura da norfloxacin.....	11
Figura 6. Estrutura molecular da enrofloxacin.....	14
Figura 7. Espectro de absorção no UV da enrofloxacin em 4 pH's.....	16
Figura 8. Distribuição das quatro possíveis espécies: cátion ácido (C); espécie neutra não-ionizada (N); intermediário zwitterion (Z) e íon básico (A).....	16
Figura 9. Equilíbrio protolítico da enrofloxacin e análogos.....	17
Figura 10. Perfil da solubilidade x pH da concentração enrofloxacin.....	18
Figura 11. Estrutura molecular da quitosana.....	31
Figura 12. Estrutura molecular do ácido malônico.....	34

Figura 13. (A) microesfera onde o material ativo (cor cinza) está preso na matriz polimérica; (B) microesfera onde o material ativo está envolto pelo agente encapsulante (cor amarela).....	36
Figura 14. Porções gástricas do estômago dos monogástricos (cão).....	49
Figura 15. Obtenção das microesferas da malonilquitosana (MLQT).....	66
Figura 16. Curva padrão da concentração da enrofloxacina em solução de KOH 1 mol/L.....	73
Figura 17. Curva padrão da concentração da enrofloxacina no soro plasmático..	75
Figura 18. Titulação condutimétrica da malonilquitosana, 36 horas.....	77
Figura 19. Espectro de RMN ¹³ C das microesferas de quitosana.....	79
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C das microesferas da malonilquitosana.....	79
Figura 21. Espectro no infravermelho da quitosana (a) e da malonilquitosana (b)	80
Figura 22. Estrutura da quitosana quimicamente modificada com ácido malônico.....	81
Figura 23. Curvas de TGA e DTG da quitosana (—) e da malonilquitosana (—).....	82
Figura 24. Curva DSC da quitosana (a); malonilquitosana (b); malonilquitosana contendo enrofloxazina (c); mistura física fármaco-polímero (d) 1: 2 ; enrofloxacina livre (e).....	83

Figura 25. Fotomicrografias (A, C) da superfície externa das microesferas; (B) da secção transversal da microesfera da MLQT ampliação (2000x) ; das secções transversais da microesfera da MLQT com enrofloxacina (D, E, e F) com ampliação (100x ; 400x ; 800x respectivamente).....	86
Figura 26. Curva cinética de intumescimento das microesferas da MLQT em soluções tampão.....	89
Figura 27. Curva de liberação da enrofloxacina impregnadas nas microesferas da MLQT.....	90
Figura 28. Perfil da liberação da enrofloxacina em tampão pH 6,8.....	92
Figura 29. Curva cinética de liberação da enrofloxacina nas microesferas de MLQT em função do tempo em solução tampão 6,8.....	93
Figure 30. Liberação <i>in vivo</i> das microesferas malonilquitosana impregnadas com enrofloxacina (- - MLQT-ER); enrofloxacina-livre (-o- F-ER) e microesferas da malonilquitosana (▼-MLQT) em ratos tratados com 520 mg/Kg (V.O). Todos os valores são expressos como médias ±SEM, n=6; (*) e (***) denota diferença significativa com relação a F-ER ($P < 0,001$ $P < 0,05$).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fármacos usados como antimicrobianos.....	7
Tabela 2. Classificação das Quinolonas em: primeira, segunda, terceira e quarta geração.....	12
Tabela 3. Dados microbiológicos comparativos para patógenos comuns CMI das bactérias (listada em µg/ml).....	24
Tabela 4. Estudos de toxicidade aguda da enrofloxacin.....	27
Tabela 5. Teor de Enrofloxacin e Ciprofloxacina em algumas espécies animais.....	30
Tabela 6. Comparação do esvaziamento gástrico e tempo de trânsito Intestinal entre o homem e o cão.....	54
Tabela 7. Grau de intumescimento das microesferas da MLQT em diferentes pH.....	88
Tabela 8. Liberação da enrofloxacin impregnadas nas microesferas de MLQT.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ADI	Dose diária aceitável
CHN	Análise elementar
C_{max}	Concentração máxima
CMI	Concentração mínima inibitória
<u>CMI</u>	Complexo motor interdigestivo
CMM	Complexo motor migrante
DL ₅₀ e DL ₉₀	Dose letal (dose mínima que mata 50% ou 90% dos animais) tratados
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA – girase	Enzima
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Termogravimetria derivada
ER	Enrofloxacina
FQs	Fluoroquinolonas
% GI	Grau de intumescimento (%)
% GD	Grau de desacetilação (%)
I V	Espectroscopia no infravermelho

LC	Liberação controlada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MLQT	Malonilquitosana
MLQT-ER	Malonilquitosana impregnada com enrofloxacina
MLQTR	Malonilquitosana reticulada
QT	Quitosana
RMN ¹³ C	Espectroscopia de ressonância magnética de carbono
SNC	Sistema nervoso central
TGA	Análise termogravimétrica
TGI	Trato gastrintestinal
UV	Espectroscopia na região do ultravioleta
Vd	Volume de distribuição
V. O.	Via oral

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de liberação controlada de enrofloxacin, fármaco antimicrobiano de uso exclusivo em veterinária, a partir de matriz de malonilquitosana. As microesferas de quitosana foram preparadas pelo método de coacervação por separação de fases, com NaOH. Em seguida, foram caracterizadas pelo grau de desacetilação; titulação condutimétrica; espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C); espectroscopia no infravermelho (IV); análise elementar (CHN), análise termogravimétrica (TGA) e análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC). As microesferas de malonilquitosana (MLQT) foram obtidas através da reação de amidação da quitosana na presença de ácido malônico. O produto de amidação foi reticulado e depois caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C), espectroscopia no infravermelho (IV), análise termogravimétrica (TGA); análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC); microscopia eletrônica de varredura (MEV). A enrofloxacin foi impregnada nas microesferas da malonilquitosana e a massa foi determinada por espectroscopia no ultravioleta. Neste trabalho verificou-se que o grau de intumescimento (GI) das microesferas de malonilquitosana em água foi de 188%, enquanto os polieletrólitos formados pelas microesferas de MLQT se comportaram como géis apresentando um intumescimento acumulativo nos pH's do TGI simulado, atingindo o valor de 83,0%. O grau de intumescimento elevado do hidrogel malonilquitosana é um importante parâmetro associado ao mecanismo e à cinética de liberação da enrofloxacin. As análises termogravimétricas revelaram um comportamento estável das microesferas de MLQT perante a ação da temperatura. Os estudos *in vitro* de liberação da enrofloxacin a partir da MLQT dependeram do tempo de trânsito gastrointestinal simulado, do pH do TGI e do alto grau de intumescimento da matriz polimérica. Na avaliação do estudo *in vivo*, a microencapsulação da enrofloxacin na matriz polimérica possibilitou uma cinética de liberação prolongada. Desta forma, é indicada uma aplicação diária do fármaco. O perfil da liberação da enrofloxacin impregnada nas microesferas da MLQT foi interpretado pela Lei de Potência ou equação de Peppas. Para este caso,

admite-se que o mecanismo foi apenas por difusão, independente de fatores tais como solubilidade e intumescimento.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop a controlled release system of enrofloxacin, an antimicrobial drug used specifically on veterinary, from the malonylchitosan matrix. The chitosan microspheres were prepared by phase separation method using the coacervation with NaOH. Then, these microspheres were characterized by deacetylation degree; conductimetric titration; NMR ^{13}C ; infrared spectroscopy (IR); elemental analysis (CHN); thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetric (DSC). The malonylchitosan microspheres were obtained by amidification reaction of crosslinked chitosan using malonic acid. The amidified product was crosslinking with glutaraldehyde and later characterized by NMR ^{13}C , IR, TGA, DSC and scanning electronic microscopy (SEM). Enrofloxacin was impregnated on malonylchitosan microspheres (MLCT) in order that weight was determined by ultraviolet spectroscopy. In this work could also determined a percentage of 188% on swelling degree, meanwhile, polyelectrolytes, made by MLCT microspheres acted out as gels when they absorbed some water as well as showed an accumulative swelling on pH from simulated gastrointestinal transit (GT) reaching 83%. This high level of swelling from malonylchitosan hydrogel is a very important parameter, which is associated to the mechanism and kinetics from enrofloxacin release. The thermogravimetric analysis revealed a stable behaviour of the MLCT in the presence of temperature action. In vitro studies of enrofloxacin release from MLCT depended on the simulated gastrointestinal transit time, on GT pH and on the high degree of swelling from polymeric matrix. Regarding in vivo studies evaluation, the enrofloxacin micro-encapsulation on polymeric matrix assisted on prolonged release kinetic. So, a daily drug use is indicated. The profile of enrofloxacin release, impregnated in MLCT microspheres, was understood by the Power Law or by the Peppas equation. Lastly, it can be admitted from this trial that the mechanism was only for diffusion, despite factors such as solubility and swelling. Lastly, it can be admitted from this trial that the mechanism was only for diffusion, despite factors such as solubility and swelling.

1. Introdução

Os animais e os seres humanos são expostos a múltiplos agentes químicos potencialmente tóxicos (ANADON, 2003). Muitas doenças bacterianas que ocorrem nos animais são potencialmente fatais, enquanto que outras causam dor e aflição.

Os fármacos antimicrobianos usados em animais são produtos que afetam as bactérias inibindo seu crescimento ou matando-as completamente. Estes fármacos também são usados para tratar doenças bacterianas nos seres humanos e desde sua descoberta têm prevenido incontáveis números de mortes (FDA - CVM, 1999).

O uso apropriado de fármacos antimicrobianos cura determinadas doenças, acelera a recuperação de outras, e melhora o bem-estar dos animais tratados, reduzindo a propagação da infecção a outros animais. No exemplo de doenças zoonóticas, a propagação em seres humanos pode também ser reduzida (MCKELLAR, 1998).

Em paralelo com a introdução do uso de antimicrobianos na medicina humana (1930), o uso veterinário forneceu controle similar em animais de fazenda e em animais domésticos. Historicamente, muitos dos antimicrobianos, aqueles que são importantes na terapia humana, pela sua eficácia, também são usados na medicina veterinária (FDA-CVM, 1999), isto contribuiu extremamente para o bem-estar animal e permitiu a melhoria na produção de animais domésticos.

Em humanos, como também na medicina veterinária, as fluoroquinolonas têm provado ser um grande grupo de agentes bacterianos sintéticos de alto valor

antimicrobial e com propriedades farmacocinéticas únicas (SCHEER, 1987.; BROWN, 1996).

As fluoroquinolonas aprovadas para uso em medicina veterinária de pequenos animais incluem a enrofloxacin, difloxacin, orbifloxacin e marbofloxacin. A danofloxacin, enrofloxacin e sarafloxacin são aprovadas para uso em gado e avicultura. As fluoroquinolonas, rotuladas para humanos, de potencial interesse veterinário, incluem a ciprofloxacina, enoxacin, lomefloxacina e ofloxacina. Os nomes comerciais patenteados e companhias licenciadas para produzir ou vender estes antibióticos variam bastante de país para país (PARADIS et al., 1990).

As fluoroquinolonas foram utilizadas, durante os últimos 10 anos, na dermatologia veterinária, para o tratamento da piodermite canina (PARADIS et al., 1990; IHRKE.,1996). Alguns estudos mostram o uso da enrofloxacin em muitas formulações orais e parenterais para o tratamento de várias doenças infecciosas (BAUDITZ, 1990; CINQUINA et al., 2003), por exemplo, do trato urinário, respiratório e da pele (BOOTHE, 1994).

Estudos realizados com ciprofloxacina, o principal metabólito da enrofloxacin, mostrou que a concentração no soro, em pacientes saudáveis, com uma única dose de 400 mg a meia-vida de eliminação é de 3,5 horas e que somente 14-25% da ciprofloxacina do soro se liga às proteínas, o que facilita a penetração no tecido e o acesso ao sítio alvo (CHAMBERLAIN, 1997).

Todas as fluoroquinolonas apresentam um número reduzido de ligações com as proteínas plasmáticas, portanto não há interações de ligações às proteínas de significado clínico e nem limitação à distribuição nos tecidos. Outro estudo provou que a absorção oral da ciprofloxacina é aproximadamente metade da enrofloxacin, em cães. Além disso, as fluoroquinolonas freqüentemente são os fármacos

escolhidos para as otites caninas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (IHRKE, 1998).

A enrofloxacin é um agente antibacteriano sintético da classe das fluoroquinolonas desenvolvida exclusivamente para ser usada em medicina veterinária (OTERO et al 2001a). Este fármaco se caracteriza por uma boa atividade antimicrobiana e um amplo espectro de ação contra uma extensa classe de bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo aquelas resistentes aos antibióticos β -lactâmicos e sulfonamidas (SCHEER, 1987a). Apresentam efeitos colaterais que vão desde desconforto gástrico, náuseas, vômitos, cefaléia até efeitos tóxicos no sistema nervoso central (SNC). Apresenta ainda sabor desagradável dificultando sua administração via oral em animais.

A indústria farmacêutica, nos últimos anos, se destacou no uso e aproveitamento de matérias-primas de baixo custo e fácil obtenção para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, permitindo com isto o uso de técnicas para a encapsulação de compostos em sistemas de multipartículas, como microesferas e microcápsulas, com a intenção de estabilizar, proteger e mascarar os sabores indesejáveis ou ainda de modificar as propriedades de liberação de fármacos (KAZUHIRO et al., 1987 , 1989).

Estes sistemas de multipartículas têm despertado grande interesse nas formulações orais, pois apresentam vantagens, tais como, redução do número das doses, variabilidade do tempo de trânsito no trato gastrointestinal e a possibilidade de mistura de fármacos com diferentes propriedades de liberação (FLORENCE & Jani, 1994). O encapsulamento de fármacos para o tratamento de diferentes patologias vem sendo usado com muita eficiência. O desenvolvimento de um método de liberação controlada nos quais o agente ativo pode ser liberado

independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida, oferece vantagens sobre os métodos convencionais (ATCHE et al., 2000).

Neste contexto, a quitosana um polímero biocompatível, biodegradável, de baixa toxicidade, vem sendo pesquisada como uma matriz potencial para a liberação controlada de fármacos na forma de microesferas (AMANO & ITO, 1978; NAKAMURA et al., 1992).

Esta pesquisa procura desenvolver um sistema de liberação controlada em que modificações nas características das microesferas de quitosana com outros compostos como ácido malônico produz um derivado com elevado grau de intumescimento na faixa de pH neutro (BROWN, 1996).

Esta nova matriz de quitosana permitiu a liberação entérica da enrofloxacina *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que com o seu uso poderão ser diminuídos os efeitos colaterais adversos do fármaco, mantendo o efeito terapêutico desejado.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Antimicrobianos

2.1.1 Antimicrobianos da classe das quinolonas

Entre os antimicrobianos que atuam na inibição da síntese de ácidos nucleicos incluem-se as quinolonas, que inibem a DNA-girase, essencial para a síntese do DNA bacteriano (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004; VANCUTSEM et al., 1990). A enrofloxacin é um agente da classe das quinolonas e a primeira fluoroquinolona desenvolvida para aplicação em medicina veterinária (OTERO et al., 2001b). É usada em muitas formulações parenterais para o tratamento de várias doenças infecciosas (BAUDITZ, 1990; CINQUINA et al., 2003), por exemplo, do trato urinário, respiratório e da pele (BOOTHE, 1994). Esta fluoroquinolona tem mostrado ter rápida ação bactericida, com espectro de atividade, contra uma extensa classe de bactérias gram-positivas e gram-negativas (RYAN & RIJKSTRA, 1991), incluindo aquelas resistentes aos outros agentes antimicrobianos (BAUDITZ, 1987; SCHEER, 1987a).

A grande maioria dos ensaios disponíveis das quinolonas avalia amostras em fluídos biológicos, tais como soro e urina. Nestes ensaios microbiológicos, a determinação da enrofloxacin no plasma, está bem descrito (ELSHEIKH et al., 2002)

2.1.2 Aspectos biológicos dos antibióticos

Vírus, bactérias e outros microrganismos que existem no meio ambiente, também podem viver dentro do corpo humano. Esta relação organismo-hospedeiro pode produzir respostas biológicas desejáveis bem como indesejáveis no hospedeiro. Estas respostas indesejáveis são chamadas de infecções. As abordagens terapêuticas no tratamento das doenças infecciosas geradas por essa invasão são duplas: (1) destruição ou remoção dos organismos invasores e (2) alívio dos sintomas. A disponibilidade de agentes farmacológicos que podem erradicar organismos invasores varia muito com o tipo e o local dos organismos no hospedeiro humano (BRODY et al., 1999).

Muita abordagem química e farmacológica tem sido usada para a produção de fármacos que destroem bactérias específicas ao mesmo tempo em que produzem o mínimo de efeitos adversos no hospedeiro humano. Os muitos fármacos antimicrobianos e a ampla variedade de microrganismos existentes exigem uma seleção destes fármacos para que a terapia seja mais eficaz. Para isto, encontra-se a disposição uma grande variedade de substâncias químicas chamadas quimioterápicos ou antibióticos (RANG et al., 2001) que por definição são substâncias químicas específicas produzidas por organismos vivos, bem como seus análogos estruturais obtidos por sínteses ou semi-sínteses, capazes de inibir, em concentrações baixas, processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos. São utilizados para combater infecções, incluindo as gastrintestinais (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004).

Os principais fármacos usados como antimicrobianos e sua classificação estão sumarizados na tabela abaixo:

Tabela 1. Fármacos usados como antimicrobianos.

Quimioterápicos	Antibióticos	Fármacos Bactericidas	Fármacos Bacteriostáticos	Fármacos que Interferem na Duplicação do DNA
Sulfonamidas	Penicilinas	Aminoglicosídeos	Sulfonamidas	Quinolonas
Trimetoprim	Cefalosporinas	Quinolonas	Macrolídeo	Novobiocina
Ácido nalidíxico	Tetraciclina	Penicilinas	Trimetoprim	Grisofulvina
Ácido pipemídico		Cefalosporinas	Cloranfenicol	
Nitrofurano			Acido nalidíxico / pipemídico	

(BAYER, S.A. 1993)

2.1.3 Evolução das quinolonas

A quinoleína é uma substância conhecida há muito tempo, sua estrutura faz parte de vários alcalóides e fármacos antimaláricos sintéticos entre os quais a cloroquinona. A síntese da cloroquinona (1962) dos laboratórios Sterling-Winthrop produzia a partir de uma substância halogenada, a 7-cloroquinolona, que

apresentou pequena ação antibacteriana contra bacilos gram-negativos. Este fato deu início às pesquisas para obtenção de derivados das 7-quinolona com melhor atividade antimicrobiana. O resultado foi à descoberta do ácido nalidíxico, o precursor das atuais quinolonas de uso clínico. O ácido nalidíxico apresenta no núcleo central uma naftiridina, e no início de sua utilização era conhecido como sendo um derivado 1,8-naftiridina, com uma função cetona no carbono 4 (TAVARES, 1996).

Esta substância mostrou-se ativa contra bactérias gram-negativas, sem ação contra *Pseudomonas aeruginosa*, e pequena atividade contra bactérias gram-positivas.

Os centros de pesquisas viram no ácido nalidíxico, (Figura 1) um promissor agente antimicrobiano e deram início às pesquisas para obtenção de substâncias com características químicas semelhantes e que tivessem melhor atividade antimicrobiana e farmacocinética mais favorável.

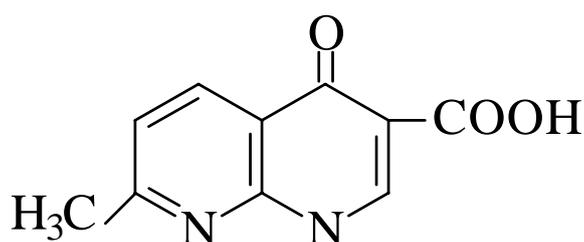


Figura 1. Estrutura do ácido nalidíxico.

Assim, encontramos entre os vários derivados, o ácido oxolínico (Figura 2), que se mostrou com maior potência antimicrobiana. Este ácido representa uma verdadeira quinolona, por apresentar estrutura central de quinoleína contendo uma cetona ligada ao C₄. O ácido oxolínico foi o protótipo para esta classe de antimicrobianos.

Em 1970 foi sintetizado outro análogo do ácido nalidíxico. Tratava-se do ácido piromídico (Figura 3), uma substância bicíclica, cujo núcleo é uma piridopirimidina com função ceto no C₄. Sua vantagem era administração oral em duas ou três doses diárias. Subseqüentemente, novas substâncias foram sintetizadas. Em 1977 mais de 1000 derivados já haviam sido descobertos.

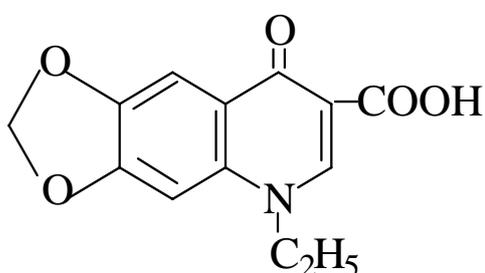


Figura 2. Estrutura do ácido oxolínico

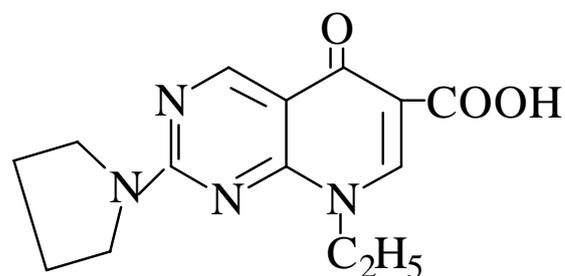


Figura 3. Estrutura do ácido piromídico

A introdução, em 1974, da piridopirimidina-ona ou ácido pipemídico (Figura 4), que contém um anel piperazínico na posição 7 do núcleo central, veio dar a esta substância a propriedade de agir contra enterobactérias e também contra *Pseudomonas aeruginosa*. Sua farmacocinética permite a obtenção de níveis elevados no aparelho renal e na próstata e administração a cada 12 horas.

Ademais, este fármaco também se revelou útil no combate à flora gram-negativa intestinal. Devido a estas características, o ácido pipemídico foi nomeado como uma quinolona de segunda geração, enquanto que o ácido nalidíxico e substâncias afins tornaram-se conhecidos as quinolonas de primeira geração.

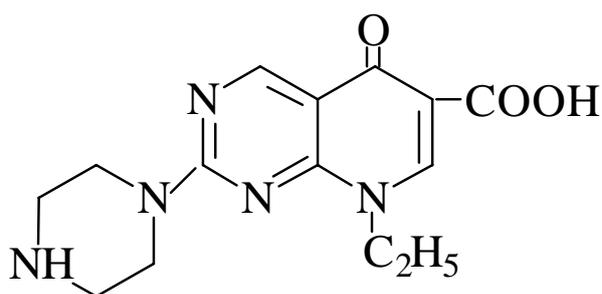


Figura 4. Estrutura do ácido pipemídico.

Em 1980, a descoberta da norfloxacin (Figura 5) deu grande impulso a família das quinolonas.

Foi à primeira das quinolonas fluoradas e que apresentava elevada potência contra os *Pseudomonas aeruginosa* (por conter o anel piperazínico), atividade inibitória para *Estafilococos coagulase* positivo e hemófilos.

Possui a vantagem de ser administrada a cada 12 horas para o tratamento de infecções das vias urinárias e das vias intestinais (ALBRECHT, 1996).

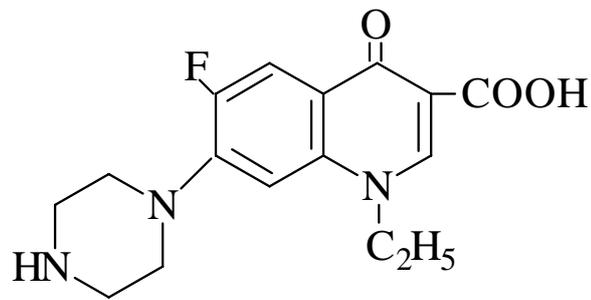


Figura 5. Estrutura da norfloxacin

A síntese da norfloxacin marcou o início do descobrimento de diversas quinolonas fluoradas como tais como a pefloxacin e a enoxacin (1980), ciprofloxacina (1983) entre outras (TAVARES, 1996)

Com o advento da norfloxacin, outras mudanças estruturais foram propostas nas fórmulas das quinolonas. Isto garantiu o conhecimento da importância de determinadas posições na configuração estrutural das novas quinolonas fluoradas.

As quinolonas também são classificadas por gerações, por apresentarem propriedades farmacocinéticas e antimicrobianas diferentes entre si. A tabela 2 mostra esta classificação (TAVARES, 1996).

Tabela 2. Classificação das Quinolonas em: primeira, segunda, terceira e quarta geração.

Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração	Quarta geração
Ácido nalidíxico	Ácido pipemídico	Ciprofloxacina	Temafloxacina
Ácido oxolínico	Norfloxacina	Pefloxacina	Tosufloxacina
Rosoxacina		Ofloxacina	Esparfloxacina
Cinoxacina		Lomefloxacina	
Ácido piromídico		Enrofloxacina	

(TAVARES, 1996).

2.2 Enrofloxacina: Uma fluoroquinolona de uso exclusivo em veterinária

A enrofloxacina é um ácido carboxílico quinoleínico, de peso molecular 359,40 g/mol e de fórmula molecular $C_{19}H_{24}FN_3O_3$, que apresenta cor amarela cristalina pálida com um grau elevado de pureza. Na água em pH 7, é ligeiramente solúvel. Entretanto, por conter grupos ácidos e básicos, pode ser identificada na solução, quando os valores de pH são alcalinos ou ácidos. Desta forma a absorção máxima no espectro UV-Vis desta molécula em pH neutro é de 276 a 318nm, com absortividades molares de 58.500 e 17500 respectivamente (LIZONDO et al., 1997).

2.2.1 Aspectos biológicos e químicos da enrofloxacin

Na América Latina, assim como em outras partes do mundo, a 3ª geração de fluoroquinolonas como enrofloxacin, danofloxacin e sarafloxacin gozam de excelente reputação por apresentarem potencial efetivo contra a maioria dos agentes patogênicos veterinários (BARROS et al., 1996).

A enrofloxacin, a primeira fluoroquinolona desenvolvida para aplicação veterinária em diversas formulações, oral e parenteral, é usada no tratamento de algumas doenças infecciosas em animais domésticos. Tem utilização terapêutica em bovinos, suínos, ovinos e caprinos no tratamento de infecções, por exemplo, do trato urinário, do trato respiratório e da pele. Este medicamento também pode ser usado em cães ou em gatos para combater tipos diferentes de infecções, especialmente aquelas que envolvem *Pseudomonas aeruginosas*, são também ativas contra *Staphylococcus aureus*, sendo usado geralmente para infecções de pele (PARADIS et al., 1990).

A enrofloxacin é um antimicrobiano de amplo espectro de ação contra uma extensa classe de bactérias como rickétsias, clamídeas, micoplasmas como também para as bactérias gram-negativas e gram-positivas, incluindo aquelas resistentes aos antibióticos β -lactâmicos e sulfonamidas (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004)

Quimicamente, a enrofloxacin é 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolínico carboxílico (BUDAVARI et al., 1996).

A enrofloxacin é uma 6-fluoroquinolona sintética (Figura 6). A estrutura do núcleo é idêntica ao ácido nalidíxico. Devido a mudanças graduais na estrutura básica, os potenciais farmacocinéticos e antimicrobiais foram melhorados.

Os grupos coplanares do carbonil (C=O) nas posições 3 e 4 são os responsáveis pelas atividades antimicrobiana das fluoroquinolonas. O átomo de flúor na posição 6, é eficaz contra as bactérias gram-negativas e aumentam o espectro de ação para as bactérias gram-positivas. O anel piperazínico aumenta a atividade antimicrobiana na posição 7, especialmente para os pseudomonas. O grupo C₂H₅, unido ao anel piperazínico aumenta a capacidade de absorção pelos tecidos (BARROS et al., 1996).

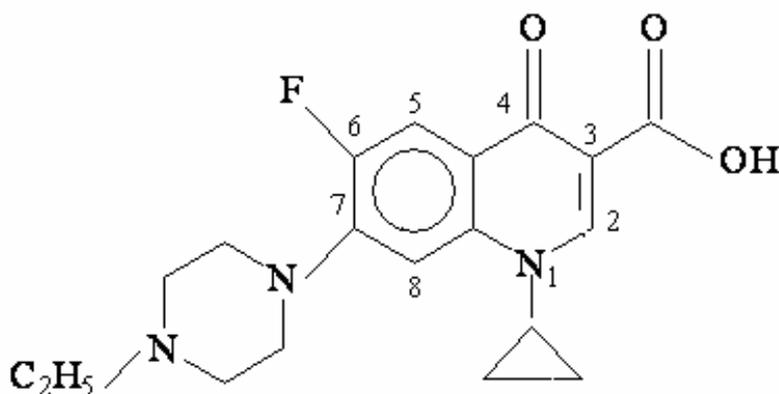


Figura 6. Estrutura da enrofloxacin.

As propriedades espectroscópicas de absorção de radiação UV-Vis da enrofloxacina foram determinadas em água, tampão acetato pH 4,7, metanol, etanol e clorofórmio e foi verificado que os valores máximos são influenciados pela polaridade dos solventes. Também sofre um leve deslocamento batocrômico com a diminuição da polaridade do solvente. Entretanto a absorção desta molécula é pH-dependente (Figura 7). Um aumento de pH produz um deslocamento hipsocrômico do pico de maior intensidade enquanto que o menor sofre deslocamento batocrômico. Ainda nesta figura observam-se dois pontos isobésticos a 270 ± 1 e 314 ± 2 nm (RILEY et al., 1989).

Segundo Lizondo (1997), o conhecimento das constantes de dissociação desta fluoroquinolona é importante, pois elas definem o estado de ionização em todos os pHs. Isto é importante uma vez que a habilidade da quinolona de ser absorvida pelo trato gastrintestinal ou através de membrana biológica é determinada pela fração da quinolona e em particular pelo estado iônico. As análises mostraram $pK_{a1} = 5,94 \pm 0,09$ e $pK_{a2} = 8,70 \pm 0,44$.

Estes valores correspondem ao grupo ácido carboxílico na posição 3 e ao grupo piperazinil na posição 7. De modo geral para as fluoroquinolonas o pK_a correspondente ao grupo carboxílico está ao redor de $6,0 \pm 0,3$ sendo relativamente independente da substituição na posição 7 (LIZONDO et al., 1997).

A enrofloxacina pode ser encontrada em quatro formas dependentes do pH: como cátion ácido (C); espécie neutra não-ionizada (N); um intermediário zwitterion (Z) e como um íon básico (A) (Figura 8).

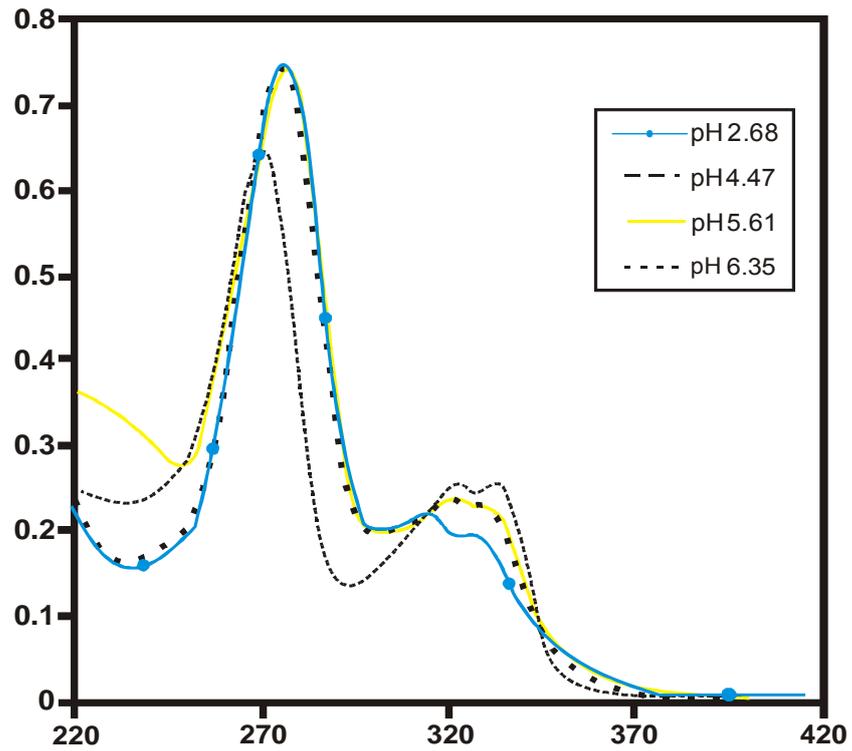


Figura 7. Espectro de absorção no UV da enrofloxacin em 4 pH's.(LIZONDO et al., 1997).

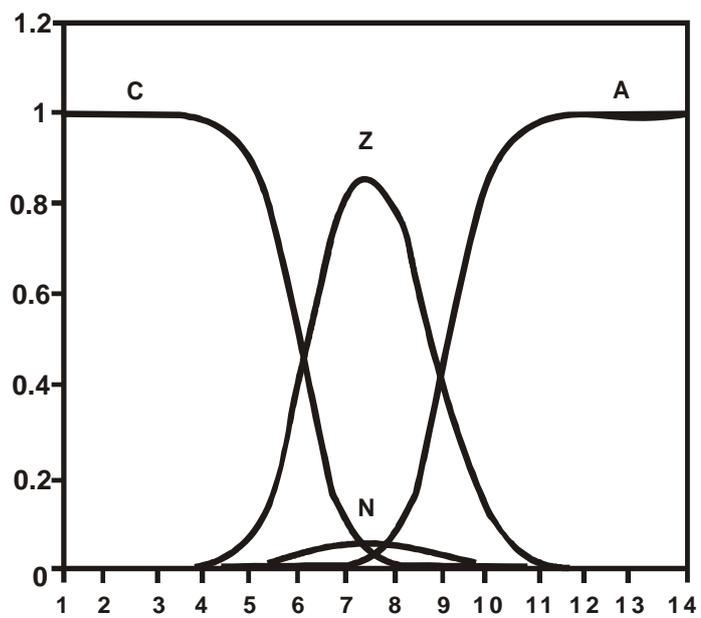


Figura 8. Distribuição das quatro possíveis espécies da enrofloxacin: cátion ácido (C); espécie neutra não-ionizada (N); intermediário zwitterion (Z) e íon básico (A). (LIZONDO et al., 1997).

As frações das quatro possíveis formas da enrofloxacinina podem variar em função do pH. Na solução, as espécies catiônica e aniônica se aproximam da concentração total da enrofloxacinina em valores de pH elevados e baixos, respectivamente, e a espécie neutra alcança um máximo no pH isoeletrico. A constante de dissociação para o ácido carboxílico é maior do que para a amina, a forma neutra é principalmente o zwitterion. As espécies neutras sem cargas estão em proporções extremamente baixas.

A Figura 9 expressa o equilíbrio protolítico da enrofloxacinina e análogos. Nesta figura, K_{CN} , K_{CZ} , K_{NA} , e K_{ZA} representam as constantes de dissociação, que foram determinadas pelas mudanças de absorvância causada pela variação de pH (1,0 a 10,0 à 25°C) na solução de enrofloxacinina (LIZONDO et al., 1997).

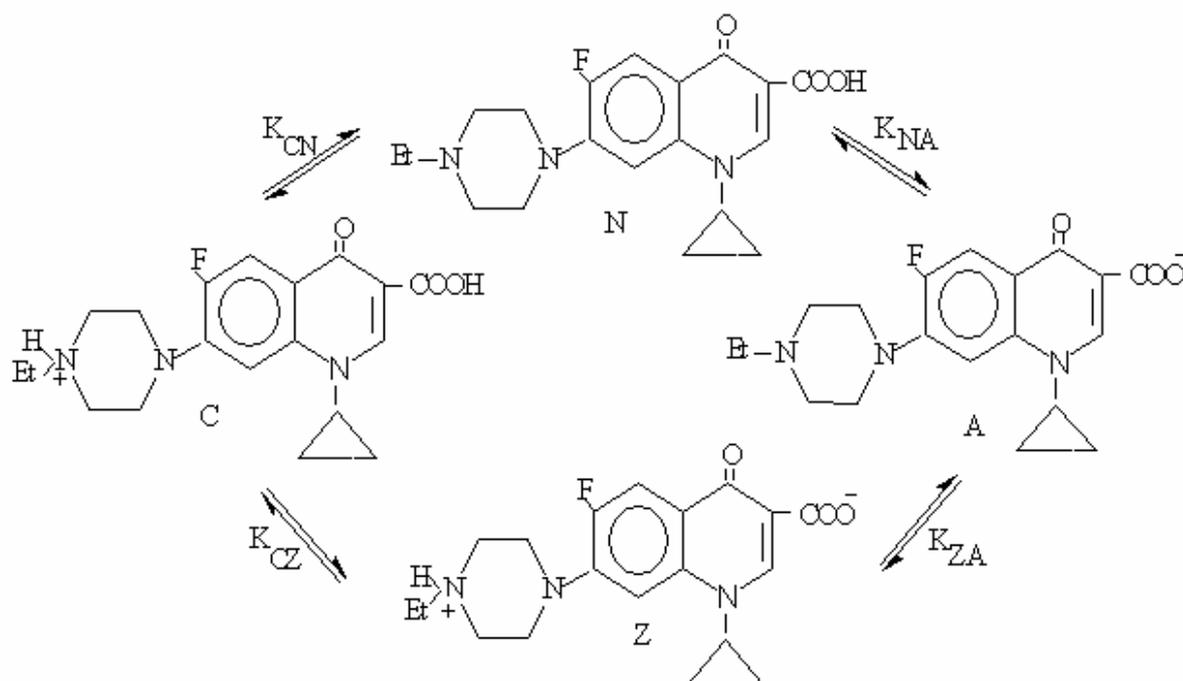


Figura 9. Equilíbrio protolítico da enrofloxacinina e análogos (Levison & Jawetz, 1998).

A solubilidade também foi determinada por Lizondo (1997) em amostras à 25°C por 48 horas, e variou de pH 5,05 a 8,83. A Figura 10 mostra o perfil pH-solubilidade da enrofloxacin, onde aparece uma zona de baixa solubilidade nas vizinhanças do ponto isoelétrico. A solubilidade máxima foi encontrada em pH 5,02.

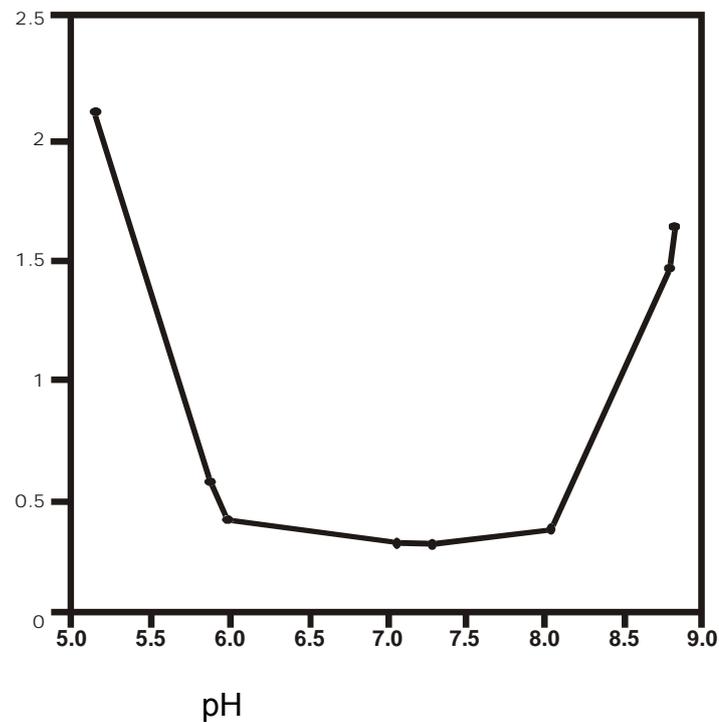


Figura 10. Perfil da solubilidade x pH da concentração enrofloxacin.

2.2.2 Mecanismo de ação das quinolonas

A atividade bactericida das quinolonas, incluindo a enrofloxacin, é atribuída a sua habilidade de inibir a DNA-girase (MANDELL & SANDE, 1990).

As quinolonas interferem com a síntese de DNA inibindo a DNA-girase, (topoisomerase II) uma enzima bacteriana essencial para a replicação do DNA. As

fluoroquinolonas inibem a super-helicoidização do DNA *in vitro* e provem ruptura do DNA de dupla fita em locais específicos (OTERO et al., 2001a).

O cromossomo bacteriano é formado por uma longa e única molécula de DNA que procura ocupar um espaço mínimo no interior da célula e por isto acha-se dobrado sobre si mesmo e enrolado em espirais. Este estado é mantido por meio de enzimas denominadas de topoisomerase, entre as quais a topoisomerase II, chamada de DNA-girase. A DNA-girase é constituída por duas subunidades A e duas subunidades B. As primeiras são responsáveis pela divisão de cada uma das duplas cadeias de DNA cromossômico e seu agrupamento e enrolamento da nova cadeia formada. As subunidades B introduzem os elementos necessários à formação da nova cadeia do DNA em replicação e mantêm o superespiralamento.

As quinolonas inibem a ação das subunidades A da DNA-girase. Com isto, o DNA tem relaxado suas espirais e passa a ocupar um espaço maior que o contido nos limites do corpo bacteriano, conduzindo a morte celular (TAVARES, 1996).

2.2.3 Propriedades farmacocinéticas

Os estudos farmacocinéticos envolvem a cinética de absorção, a distribuição e eliminação do fármaco, incluindo excreção e metabolismo (SHARGEL & YU 1999).

A enrofloxacin é altamente lipofílica, conforme demonstrado pelo seu alto coeficiente de partição octanol:água e ela se comporta como um zwitterion em vários valores de pHs. Estudos conduzidos em laboratório demonstraram que a enrofloxacin é bastante estável quando misturada com água, solução salina e vários fármacos, devido às suas propriedades químicas estáveis. A enrofloxacin em comprimido ou solução injetável foi reformulada de várias formas para produzir

uma formulação oral de dosagem conveniente devido à sua alta lipossolubilidade, sendo bastante absorvida após a injeção intramuscular ou administração oral (PAPICH et al., 2002).

A enrofloxacin, como todas as quinolonas, tem uma estrutura baseada no anel 4-quinolônico. A modificação fundamental das quinolonas mais antigas, como os ácidos nalidíxico e oxolínico foram à introdução de um flúor no C₆, o qual proporcionou um aumento na penetrabilidade tissular e celular, o que poucas substâncias antimicrobianas podem alcançar. Isso dá lugar a uma farmacocinética especial vinculada à sua distribuição (BROWN, 1996).

As fluoroquinolonas são bem absorvidas após ingestão oral e completa absorção parenteral; apresentam meia-vida sérica longa que vai de 3 até 8 horas permitindo uma posologia de 12 ou 24 horas. Sendo que a eliminação se faz fundamentalmente por excreção renal e metabolismo hepático (SUMANO, 1993; NEER, 1988; MARTINEZ et al., 1997)

Este antimicrobiano é bem absorvido e bastante distribuído em quase todos os animais examinados. A absorção oral varia de 40% em cavalos para quase 100% em cães e gatos. Nas espécies em que estão disponíveis comparações, a enrofloxacin é absorvida em maior extensão do que a ciprofloxacina. Penetram bem em tecido pulmonar, fluido de revestimento, resultando em maiores concentrações séricas (ALTREUTHER, 1987; ALTREUTHER & KLOSTERMANN, 1994).

Na maioria das espécies em que foi examinada a eliminação, a enrofloxacin mostra metabolismo variável. Em cães, gatos, cavalos adultos, bovinos e alguns répteis, a enrofloxacin é metabolizada parcialmente para o metabólito ativo ciprofloxacina (ANADON et al., 1995).

Em outros animais, tais como porcos, potros, lagartos e crocodilos, pouca ou nenhuma ciprofloxacina é detectável no plasma depois da administração de enrofloxacin (IHRKE et al., 1999).

Os fármacos com os menores volumes de distribuição (V_d) se diluem menos no fluido corpóreo e produzem concentrações plasmáticas mais altas em comparação com fármacos com um V_d mais alto. A consequência clínica dessa diferença é refletida na administração das doses.

Para ilustrar a relação do V_d com a dose, pode-se examinar a seguinte equação geral: $Dose = V_d \times C_{max}$. Para atingir a mesma C_{max} , os fármacos com alto V_d requerem uma dose maior, que é uma das razões para a maior variação de doses para a enrofloxacin em comparação com a orbifloxacin e a marbofloxacin (IHRKE, 1996).

O volume de distribuição da enrofloxacin varia de 2 a 4L/kg (OTERO, 2001a) na maioria das espécies estudadas, sendo muito maior que o alcançado pelos antibióticos betalactâmicos e aminoglicosídeos (WISE, 1991). O que demonstra habilidade para penetração intracelular e para atingir altas concentrações em tecidos também chegando com rapidez às glândulas mamárias (GIGUERE & BÉLANGER, 1997; KUNG et al., 1993; KAARTINEN et al., 1997).

2.2.4 Biodisponibilidade das fluoroquinolonas

A biodisponibilidade relaciona-se à quantidade absorvida e à velocidade do processo de absorção do princípio ativo no organismo.

Em outras palavras, a biodisponibilidade é o tempo que demora a substância responsável pela ação terapêutica do medicamento (princípio ativo) entrar na corrente sanguínea (SHARGEI & YU, 1999).

Em animais as fluoroquinolonas (FQs), tem boa disponibilidade por via oral em todas as espécies animais, a exceção dos ruminantes.

Scheer (1987A) demonstrou que a enrofloxacin parenteral é rapidamente absorvida em terneiros, gatos, cães, galinhas e perus, alcançando concentrações máximas de 30 minutos a 2 horas, o que sugere boa absorção digestiva.

Em eqüinos, a enrofloxacin tem uma biodisponibilidade de 60%, alcançando concentrações eficazes em plasma e tecido em animais submetidos a jejum (LANGSTON et al., 1996; POSYNIK et al., 1999).

Em estudos realizados em ratos (espécie e número não relatadas) tratados oralmente ou intravenosamente com uma única dose de enrofloxacin (5mg/Kg) radiolábil foi determinada a bioavaliabilidade que foi calculada em aproximadamente 75%, sendo que a enrofloxacin foi rapidamente absorvida e distribuída em todos os tecidos apresentando altas concentrações no rim e fígado. A eliminação foi via urinária e fezes. A radioatividade encontrada na urina foi atribuída ao seu metabólito, ciprofloxacina (ALTREUTHER & KLOSTERMANN, 1994).

Nas espécies animais considerados de alimento, a ciprofloxacina foi o metabólito principal recuperado. O fígado é considerado sítio primário do metabolismo da enrofloxacin, nesta espécie, formando ciprofloxacina por processo de desalquilação oxidativa. Outros metabólitos concorreram com menos de 10% do resíduo total (ALTREUTHER & KLOSTERMANN, 1994).

Um estudo qualitativo investigou a influência de uma preparação de amostra de resíduos para determinação analítica de fármacos veterinários em tecido animal.

Neste estudo comparou-se a eficiência de diferentes procedimentos de

extrações da enrofloxacin e seu metabólito (a ciprofloxacina), da sarafloxacin e da difloxacina em amostras de fígado e tecidos de aves domésticas.

Os resultados mostraram que todas as fluoroquinolonas estudadas foram extraídas com alta eficácia (> 80 %) da matriz biológica e os melhores resultados ocorreram na amostra de fígado (DUREJA et al., 2001).

2.2.5 Propriedades farmacodinâmicas

A farmacodinâmica se refere à relação entre a concentração do fármaco e o sítio de ação (receptor) e a resposta farmacológica, incluindo efeitos fisiológicos e bioquímicos que influenciam a interação do fármaco com o receptor. As interações de uma molécula do fármaco com o receptor iniciam uma seqüência de eventos moleculares resultando numa resposta farmacológica ou tóxica.

Os modelos farmacocinéticos e os farmacodinâmicos são construídos para mostrar os níveis de concentração do plasma no sítio de ação e estabelecer a intensidade e tempo do curso do fármaco (SHARGEL & YU, 1999).

A concentração mínima inibitória (CMI) é a menor concentração de um antibiótico necessária para inibir o crescimento de uma bactéria em particular. A tabela 3 contém uma lista parcial do CMI para bactérias importantes na dermatologia veterinária (ASUQUO & PIDDOCK, 1993; STEGEMANN et al., 1996; SPRENG et al., 1995; MEINEN et al., 1995).

Tabela 3. Dados microbiológicos comparativos para patógenos comuns CMI das bactérias ($\mu\text{g/ml}$).

	<i>Pasteurella</i> <i>Multocida</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>intermedius</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>
Ciprofloxacina	0,015	0,03	0,25	0,5
Difloxacina	<0,05	0,11 - 0,23	0,91	0,92
Enrofloxacin	0,03	0,03 - 0,06	0,125	2
Marbofloxacina	0,04	0,25	0,23	0,94
Orbifloxacina	0,05	0,39	0,39	6,25 - 12,5

* Os valores de CMI listados representam uma média da literatura disponível publicada ou de informação técnica do fabricante. (www.bayervet.com.br).

Mesmo que existam diferenças na eficácia das fluoroquinolonas atualmente disponíveis, vale a pena observar algumas diferenças. A *Pasteurella* spp, assim como as cepas encontradas em feridas de pele, são as mais suscetíveis. Os bacilos entéricos gram-negativos como a *Entamoeba coli* têm uma CMI baixa. Os cocos gram-positivos têm uma CMI um pouco mais alta. (CAPUTO et al., 1997; WATTS, 1999).

Finalmente, a *Pseudomonas aeruginosa*, se for sensível, tem a CMI mais alta de todas as bactérias suscetíveis. Embora não listados na tabela 3, os estreptococos, enterococos e as bactérias anaeróbicas têm tipicamente uma CMI

alta o suficiente que faz com que eles geralmente figurem na categoria resistente. Informações sobre o uso da mais nova geração de fluoroquinolonas na medicina veterinária são limitadas a estudos experimentais (CAPUTO et al., 1997; WATTS, 1999).

Fármacos como a grepafloxacina, trovafloxacina e premafloxacina têm sua atividade aumentada contra cocos gram-positivos e bactérias anaeróbicas e podem ter vantagens para uso em determinadas infecções. Entretanto, estes fármacos não são tão efetivos como a ciprofloxacina contra bactérias gram-negativas, especialmente a *Pseudomonas aeruginosa* (WATTS et al., 1997).

Neste momento, o Comitê Nacional sobre padrões de Laboratórios Clínicos (CNPLC) nos EUA não tem valores de corte aprovados para as fluoroquinolonas veterinárias. Nas novas linhas gerais a serem publicadas em breve, entretanto, a categoria de "dosagem flexível" irá substituir a categoria de "sensibilidade intermediária". As novas linhas gerais para a enrofloxacina, a única fluoroquinolona veterinária sabidamente listada, será relatada como sendo sensível: $\leq 0,5$ g/ml; dosagem flexível = 1-2 g/ml e resistente = > 4 g/ml. Os valores de corte aprovados pelo CNPLC para outras fluoroquinolonas veterinárias não estão disponíveis no momento. Com base no entendimento e na interpretação dos autores sobre os dados farmacocinéticos disponíveis, as fluoroquinolonas veterinárias atualmente disponíveis devem ter atividade similar contra patógenos da pele (PARADIS et al., 1990, COMMITTEE, 1998).

Todas as fluoroquinolonas atualmente disponíveis são licenciadas para infecções dermatológicas, mas isso pode não implicar piodermite em todos os casos. Foram publicados relatos documentando a eficácia da enrofloxacina no tratamento da piodermite em cães. De acordo com o conhecimento dos autores, não foram

realizados estudos comparativos que possam mostrar diferenças na eficácia clínica entre as drogas atualmente aprovadas (IHRKE, 1996, 1998; PARADIS et al., 1990).

2.2.6 Efeitos toxicológicos

Os estudos toxicológicos são realizados para determinar a dose letal (DL_{90} ou DL_{50}) quantidade requerida de uma substância que mata 50% ou 90% da população-teste (WILEY, 2005).

Os efeitos colaterais como vômito e diarreia ocorrem quando a dose excede em dez vezes a dosagem recomendada. Em doses normais, isto não deve ser observado. Os cães vomitam após dosagens acima de 1000 mg/kg, que é 200 vezes a dosagem recomendada, sendo que uma DL_{50} não poderia ser estipulada (ALTREUTHER, 1987; GIGUERE et al., 1997).

Os cães com infecções da orelha por pseudomonas requerem doses elevadas de enrofloxacin e a náusea pode certamente transformar-se num problema. Em cães jovens (menos de 8 meses da idade) pode ocorrer dano nas articulações e cartilagem. Este fenômeno é visto somente em animais jovens em fase de crescimento não parece ser um problema nos gatos. O uso da enrofloxacin pode produzir cristais na urina (COLOMBINI & HOSGOOD, 2000; SCOTT et al., 2001).

Valores de toxicidade agudos foram determinados em diferentes espécies. Sendo que estes efeitos aparecem nas doses que excedem as doses terapêuticas (LIZONDO et al., 1997).

A toxicidade aguda da enrofloxacin em: camundongo, rato, coelho e cão estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4. Estudos de toxicidade aguda da enrofloxacin.

Espécies	Sexo	Via administração	de DL ₅₀ mg /kg
Camundongos	Macho	Via oral	> 5000
	Fêmea		4336
Ratos	Macho	Via oral	> 5000
	Fêmea		
Coelhos	Macho	Via oral	500-800
	Fêmea		
Cães	Macho	Via oral	Não
	Fêmea		Determinada*

* não determinada devido a vômito do fármaco (SCHMIDT, 1985).

Os animais estudados por Schmidt (1985) foram observados diariamente por 14 dias de pós-exposição nestes estudos de toxicidade. Os sinais clínicos associados à toxicose da enrofloxacin foram de letargia, tremores, convulsões, dispnéia e ataxia entre outros distúrbios. Os animais clinicamente afetados que não morreram recuperaram-se dentro de 15 minutos a 7 dias de pós-exposição. As lesões pós-morte revelaram congestão pulmonar e hemorragia (SCHMIDT, 1985).

Estudos toxicológicos em animais de laboratório mostraram também que, doses orais de enrofloxacin de até 100 mg/Kg, 20 vezes a dosagem recomendada, não mostraram nenhum efeito adverso significativo na composição e coagulação do sangue e na diurese. No teste local, de sensibilidade da pele, em coelhos e porcos da guinea, a enrofloxacin (Baytril) não provocou irritação após aplicação (NATIONAL COMMITTEE, 1994).

Estudos toxicológicos em longo prazo (52 semanas) e também estudo de carcinogenicidade (104) semanas da enrofloxacin foram realizados em ratos Wistar (6 grupos de 10 ratos). (MULLIGAN, 1997).

No estudo toxicológico crônico 10 ratos destes grupos receberam dieta alimentar que continham 0, 41, 103, 338 ou 856 mg/Kg doses diárias de enrofloxacin para ratos machos e 0, 58, 146, 466 ou 1000 mg/Kg doses diárias para fêmeas. Nestes estudos não foram observados efeitos adversos até 5,3 mg/Kg. Nenhum efeito teratogênico foi observado em ratos até 50 mg/Kg e em coelhos até 25 mg/Kg (MULLIGAN, 1997)

No estudo de carcinogenicidade, 6 grupos de 50 ratos receberam na dieta alimentar doses diárias de 0, 41, 103, ou 338 mg/Kg de enrofloxacin para ratos machos e 0, 58, 146, ou 466 mg/Kg na dieta alimentar diária para as fêmeas.

As taxas de mortalidade, as observações diárias, e os achados oftalmológicos em animais tratados eram comparáveis aos controles. Neste estudo o FAO/WHO conclui que a enrofloxacin não foi carcinogênica para esta espécie nas seguintes dosagens 41, 103, 338 e 856 mg/Kg (MULLIGAN, 1997).

As avaliações bioquímicas do soro após 6, 12, 18 e 24 meses, mostraram diminuição significativa das proteínas totais no macho e na fêmea neste período (BOMHARD & SCHLADT, 1991B; HALL, 1992; LESER, 1993).

Outros estudos de toxicidade foram realizados com 15 grupos de 6 ratos. Nestes animais foi administrado na dieta alimentar 36, 150, ou 577 mg/Kg de doses diárias de enrofloxacin para ratos machos e para as fêmeas 45, 182, ou 690 mg/Kg por 90 dias.

Nenhum efeito na aparência ou no comportamento foi notado nas dosagens brandas. Durante este estudo houve perda de peso de 20% para os machos e 23% para as fêmeas nas doses mais elevadas. Observaram-se também mudanças degenerativas na cartilagem auricular nas doses iguais a 150 e 577 mg/Kg diárias para os machos (KOWALSKI et al., 1985).

Os estudos revelaram uma ausência de informações sobre os efeitos da enrofloxacin nos microorganismos obtidos do intestino humano. Sendo assim, o National Committee, em 1994, estabeleceu um ADI provisório de 0,6 µg/Kg. Estes resultados foram baseados nos testes microbiológicos de atividades antimicrobiais *in vitro*, da enrofloxacin e ciprofloxacina (MULLIGAN, 1997).

Uma nova ADI (dose diária aceitável) de 0-2 µg/Kg, baseado nos efeitos microbiológicos *in vitro* da enrofloxacin e da ciprofloxacina, foi estabelecido pelo National Committee (CHAMBERLAIN, 1997).

Um outro relatório com modificação na ADI para bovinos, porcos e aves domésticas foi emitido pelo Committee for Veterinary Medicinal Products. E uma nova ADI de 6,2 µg/Kg por peso de corpo, ou seja, 372 µg/ pessoa foi estabelecida para a enrofloxacin (CHAMBERLAIN, 1997).

Neste relatório o Committee for Veterinary Medicinal Products (1998), recomenda que no Anexo I do regulamento do conselho (EEC) 2377/90 sejam feitas as seguintes emendas de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5. Teor de Enrofloxacin e Ciprofloxacin em algumas espécies animais.

Substância farmacologicamente ativa	Resíduo Marcado	Espécie Animal	* * MRLs $\mu\text{g}/\text{kg}$	Tecido Alvo
Enrofloxacin e Ciprofloxacin	Teor de	Bovino	100	Músculo
	Enrofloxacin		100	Gordura
	e		300	Fígado
	Ciprofloxacin		200	Rim
		Porcos e	100	Músculo
		*Aves	100	Gordura + pele
		domésticas	200	Fígado
			200	Rim

OBS: * (Não foi usado em animais produtores de ovos para consumo humano).

* * (limite máximo de resíduo $\mu\text{g}/\text{kg}$).

2.3 Polímero quitosana

Muito tem sido estudado e publicado sobre quitosana e seus usos na última década. Por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico, a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia e medicina (POLYMAR, 2004; PADETEC, 2004).

As aplicações mais comuns é o seu emprego como complexante de íons metálicos, (KAMIŃSKI & MODRZEJEWSKA, 1997) na formação de coberturas com

ação antifúngica e bactericida (NO et al., 2002), e como elemento básico para a formação de matrizes de liberação controlada de fármacos, (ATCHE et al, 2000). Ainda embora controverso, seu uso como agente ativo no emagrecimento humano por sua interação com gorduras e estruturas afins, entre outras possíveis aplicações sugeridas para este material (PITTLER et al., 1999; KANAUCHI et al., 1995).

Há cerca de três décadas a quitosana está sendo usada em processos de purificação de água, principalmente devido à propriedade quelante (remoção de íons metálicos), bem como no tratamento de água para remoção de óleo. Dessa forma, modificações químicas na superfície do biopolímero quitosana com a imobilização de agentes complexantes melhoram a seletividade para íons específicos de metal e podem caracterizar novos materiais adsorventes (JUSTI, et al., 2005; SPINELLI et al., 2004).

A quitosana é um polissacarídeo amino derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, sendo assim assumido como o segundo composto orgânico mais abundante da natureza (RATHKE & HUDSON, 1994), ficando atrás apenas da celulose. Enquanto a quitina é inerte e insolúvel, a quitosana é reativa e solúvel em ácidos orgânicos fracos ou diluídos como ácido acético 3% , ácido fórmico, e ácidos

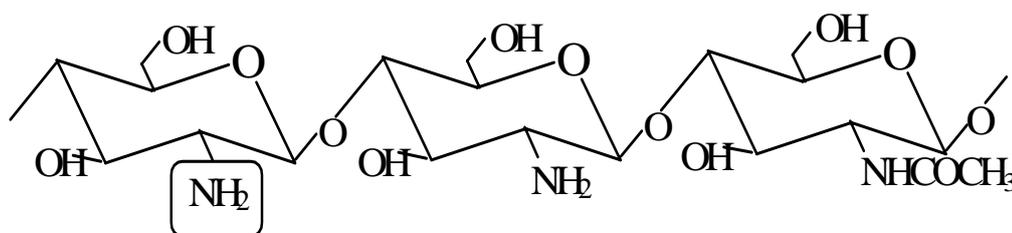


Figura 11. Estrutura molecular da quitosana

minerais, produzindo uma solução viscosa (FURLAN et al., 2000). A quitosana é insolúvel em água, podendo ser caracterizada como um polieletrólito catiônico, sendo geralmente purificada na forma neutra. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicose ou (D-glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose (exceto pela substituição dos grupos hidroxila na posição 2 por grupos acetamida). A fórmula molecular genérica pode ser expressa como $(C_6 H_{11} O_4 N)_n$.

Em pH próximo de 3, os grupos amino de sua cadeia estão todos protonados e o polímero está carregado positivamente o que facilita sua dissolução.

O pKa situa-se entre 5,9 e 6,7 e depende da dimensão da cadeia polimérica (MATHUR & NARANG, 1990). Os grupos amino na cadeia polimérica da quitosana atuam como polieletrólitos catiônicos em $pH < 6,5$ e apresentam alta densidade de carga, que se adsorve facilmente em superfícies carregadas negativamente. Podem servir como sítios quelantes para íons de metais de transição, e é o ponto de partida para muitas modificações químicas. O nitrogênio dos grupos amino e o oxigênio dos grupamentos hidroxilas podem ser acilados para obter derivados formila, acetila e benzoíla (KIMURA et al., 1999; FÁVERE, 1994).

Os ésteres de quitosana, tais como o succinato de quitosana e o ftalato de quitosana foram usados com sucesso como matrizes para a liberação oral do diclofenaco de sódio em local específico. Por conversão do grupo amino do polímero na forma de succinato, o perfil da solubilidade da quitosana muda significativamente. (AIEDEH & TAHA, 1999).

A esterificação da quitosana com ácido monocloroacético forma a carboximetilquitosana que pode formar bases de Schiff com aldeídos e cetonas com glutaraldeído e epícloridrina, através de ligações cruzadas, formando um

material reticulado insolúvel em ácidos diluídos (LONGHINOTTI et al., 1996). Este polímero tem atraído atenção como matriz polimérica para liberação controlada de fármacos.

No Departamento de Química da UFSC, as modificações químicas e as aplicações da quitosana (Figura 11) na forma de microesferas para liberação controlada de fármacos vêm sendo estudadas há vários anos (FURLAN et al., 2000; FÁVERE, 1994; VALGAS et al., 2005; GONÇALVES et al., 2005; ATCHE, 2002; NASCIMENTO, 2005).

Fatores como fácil degradação, produtos gerados não tóxicos, tem chamado atenção para a quitosana como excipiente para liberação controlada de fármacos na forma de microesferas. Mas o seu uso tem sido limitado pela sua insolubilidade em água e em alguns solventes orgânicos como dimetilformamida (DMF) e acetona entre outros (THNOO et al., 1991).

A quitosana também está sendo usada para acelerar o processo de cicatrização de feridas em humanos (KOJIMA et al., 1998). A quitosana simula a migração de células polimorfonucleares assim como células mononucleares e acelera a re-epitealização e a regeneração normal (USAMI et al., 1994). Também foi documentado que a quitosana confere considerável atividade antibacteriana contra um largo espectro de bactérias (SU et al., 1997).

A quitosana é biocompatível com tecidos vivos por não causar reações alérgicas e rejeições. Degradada sob a ação dos fermentos, facilmente removível do organismo sem causar reações colaterais. Possui a propriedade antimicrobial e habilidade de coagulação sangüínea (NICO, 1991).

Sistemas de micropartículas baseadas na quitosana foram propostos para o tratamento local de infecções gástricas, pois podem atingir uma área extensa da

mucosa e liberar o fármaco instantaneamente (PEPPAS et al., 2000; ALVAREZ-LORENZO, 2003, 2004; KO et al., 2003).

A quitosana com grupo amino, pode permitir o estabelecimento de diferentes tipos de interação com fármacos iônicos e não iônicos (KUMBAR et al., 2002) e também fornecer sistemas pH-sensíveis, que intumescem em pH gástrico permitindo uma liberação local-específica (HEJAZI & AMIJI, 2003).

2.4 Ácido malônico

O ácido malônico, $C_3H_4O_4$, é um ácido dicarboxílico orgânico com um grupo metileno que separa as duas moléculas de carbonil. É um pó cristalino, branco derivado do ácido málico. Pode também ser obtido oxidando o alileno e o propileno com solução a frio de permanganato de potássio, pela hidrólise do ácido barbitúrico com alcalóides. O ácido malônico funde à $133^\circ C$, em temperaturas mais altas decompõe-se rapidamente no ácido acético e no dióxido de carbono. Apresenta 104,6g de peso molar, é instável e tem poucas aplicações na forma livre. O éster dietil do ácido malônico é usado nas sínteses das vitaminas B_1 e B_2 , dos barbitúricos e de numerosos outros produtos farmacêuticos, agroquímico, na indústria de aromatizantes e dos compostos das fragrâncias (ALLINGER et al., 1999).

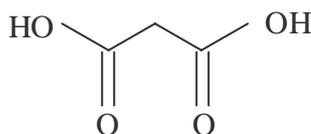


Figura 12. Estrutura molecular do ácido malônico

2.5 Microcápsulas e microencapsulação

O conceito de microcápsulas surgiu da idealização do modelo celular onde a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material na célula (RÉ, 2000).

De modo semelhante, a microcápsula consiste, em geral, em uma camada de polímero que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa (gotículas líquidas ou partículas sólidas) e evitando os efeitos de sua exposição inadequada. Essa membrana desfaz-se sob estímulo específico, liberando a substância no local ou momento ideal. O material ativo também pode estar incluso em uma matriz sólida de polímero, formando nesse caso uma microesfera (RÉ, 2000).

Na literatura, as microcápsulas são definidas como partículas de diâmetro que vão desde 1 até 1000 μm , contendo material de núcleo envolvido por membrana especial, liberando-o no tempo desejado (OLIVEIRA, 2003)

Os primeiros registros de tentativas de aplicação da idéia de microencapsulação datam dos anos 30, mas somente em 1954, surge o primeiro produto com material microencapsulado. A empresa norte-americana National Cash Register foi à pioneira, ao comercializar um papel de cópia sem carbono, que revolucionaria a indústria de formulários. Esse papel recebia uma fina camada de microcápsulas (menores que $20\mu\text{m}$) contendo uma tinta incolor. Tal camada era recoberta com um reagente também incolor. A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando a tinta incolor que, ao entrar em contato com o reagente, tornava-se colorida, produzindo em outra folha uma cópia idêntica ao que estava sendo escrito no primeiro papel (LANGER & PEPPAS, 1983).

As microcápsulas encontram inúmeras aplicações industriais. São de extrema importância na área farmacêutica, permitindo o desenvolvimento de fórmulas de liberação lenta, ou seja, aquelas com capacidade de liberar agentes ativos somente nos órgãos nos quais devem agir ou onde serão absorvidas como os anticoncepcionais injetáveis, usados uma vez ao mês. As substâncias antiinflamatórias podem ter seu tempo de atuação no plasma sanguíneo aumentado pela microencapsulação prolongando seu efeito no organismo.

Inúmeros métodos permitem microencapsular um material ativo, dependendo do tipo do material, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para sua ação. A diferença básica entre esses métodos está no tipo de aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, sendo que a combinação entre o material e o agente pode ser de natureza física, química ou físico-química (Figura 13). As técnicas de microencapsulação permitem produzir microesferas (Figura 13A), nas quais o material ativo está 'preso' em uma matriz polimérica, ou microcápsulas (Figura 13B), nos quais o material ativo está apenas envolto pelo agente encapsulante (PAVANETTO et al., 1993; RÉ, 2000). --

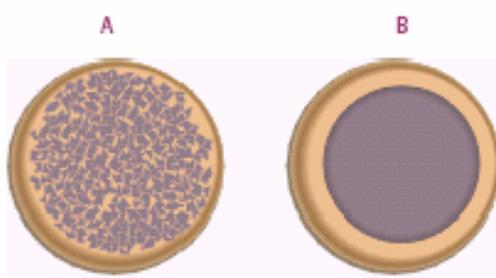


Figura 13. (A) microesfera onde o material ativo (cor cinza) está preso na matriz polimérica; (B) microesfera onde o material ativo está envolto pelo agente encapsulante (cor amarela).

Entre os métodos físicos, temos “spray drying”, (secagem de gotículas), “spray cooling” (solidificação de gotículas por resfriamento) e extrusão (modelamento de microesferas por meios mecânicos). (PAVANETTO et al., 1993; RÉ, 1998).

Nos métodos químicos, destaca-se a inclusão molecular (encapsulação de certas moléculas por outras) e polimerização interfacial (reação de polimerização no limite entre duas soluções, uma delas contendo o material ativo em suspensão). (PAVANETTO et al., 1993)

Já os métodos físico-químicos mais estudados são a coacervação ou separação de fases (separação do polímero encapsulante de um meio líquido e sua precipitação na superfície do material ativo disperso no mesmo meio) e envolvimento lipossômico (encapsulação por membranas lipídicas) (Li et al., 1991).

A substância encapsulada pode ser liberada por estímulos mecânicos (rompimento das microcápsulas através de pressão) e outros (variação da temperatura; do pH do meio), onde estejam as microcápsulas ou microesferas.

A microencapsulação oferece vantagens sobre outras formas de formulações farmacêuticas, evitando a reatividade elevada e a oxidação de vários minerais que alteram a cor e/gosto quando são incorporados aos alimentos. Nesses casos, a microencapsulação pode mascarar o sabor dos minerais nos produtos enriquecidos, reduzirem a reatividade com outros componentes e controlar sua liberação nas áreas do trato gastrointestinal que permitam melhor absorção (SHAHIDI & HAN, 1993).

Para que a mucosa do estômago seja protegida do contato com o princípio ativo e este seja liberado apenas no local exato de sua absorção (no intestino),

pode-se usar um agente encapsulante que só se dissolva em meio alcalino (como o intestinal).

Uma outra aplicação conhecida na área farmacêutica é a redução da irritação gastrointestinal conseguida pela microencapsulação de princípios ativos, como o ácido acetilsalicílico (aspirina) para a qual uma liberação constante é conseguida através do revestimento do fármaco com etilcelulose (VARMA et al., 2004).

Os produtos microencapsulados hoje à venda no Brasil (fármacos antiinflamatórios, vitaminas e suplementos minerais e cosméticos) são importados, pois poucas empresas de países desenvolvidos dominam essa tecnologia. Em todo o mundo, a falta de conhecimentos básicos sobre mecanismos de formação de partículas e sobre as possibilidades de aplicação dos vários processos de microencapsulação conhecidos ainda limita o uso destes, apesar do crescente interesse da indústria (RÉ, 2000).

2.6 Sistemas de liberação controlada de fármacos

Em 1950, iniciaram-se estudos de sistemas de liberação controlada de substâncias biologicamente ativas, pois não se conheciam materiais que pudessem liberar moléculas de alta massa molecular, como peptídeos e proteínas sem induzir inflamações (FOLKMANN, 1990).

Define-se liberação controlada, como um sistema no qual a substância ativa é liberada independentemente de fatores externos e com uma cinética bem estabelecida (BAKER, 1987).

A ciência farmacêutica atual direciona seus estudos na busca de um veículo capaz de transportar o fármaco até seu lugar de ação a fim de evitar os possíveis efeitos adversos. De acordo com este critério, tem-se desenvolvido novos sistemas de administração de fármacos, como lipossomas, nanopartículas e micropartículas, entre outras, sendo portadores coloidais particulares que se usam como sistemas de liberação de fármacos (EDMAN, 1985; VALERO et al., 1985).

Encontramos outro sistema de liberação controlada de fármacos, além da microesferas, que é constituído pelas bombas, as quais são semelhantes a seringas em miniaturas que, ao entrar em contato com o organismo, liberam as substâncias nelas inseridas. Podem-se classificar as bombas em dois tipos: a de uso externo e a implantável. (LANGER, 1990)

A bomba de uso externo, cujo esgotamento se faz através de pressão orientada, é uma seringa em miniatura, que libera o fármaco nela contido pelo cano, a velocidade constante, a qual é ajustada pela alteração da concentração do respectivo fármaco.

A bomba implantável de pressão orientada é desenvolvida utilizando-se um propulsor de fluorocarbono, como força motriz. Neste caso, a bomba controla um fole dobrável, o qual divide o seu interior em duas câmaras, uma contendo o propulsor e a outra a solução do fármaco. Na temperatura corporal, o vapor de pressão exercida pelo propulsor força a solução do fármaco através do filtro, regulando o fluxo a uma velocidade constante (LANGER, 1990).

As bombas são usadas no tratamento de câncer, em que um catéter é estendido a partir da bomba, sendo inserido no vaso sangüíneo, a fim de alimentar o órgão doente, como, por exemplo, o fígado ou o cérebro debilitado, aumentando,

dessa maneira a sua velocidade de liberação e realizando uma economia de força para o resto do corpo (LANGER, 1990).

Nos dois casos (bomba de uso externo e implantável), a força motriz é uma diferença de pressão que resulta no volume de escoamento fármaco, através de um orifício (LANGER, 1990).

Segundo LANGER (1990), as bombas implantáveis são as mais usadas e mais baratas que o sistema polimérico. Embora necessitem de uma cirurgia para a sua implantação, tem como vantagem um controle preciso do fármaco e sua liberação diretamente na corrente sangüínea. As bombas vêm sendo empregadas também para a liberação de insulina, heparina, morfina e outros fármacos (LANGER, 1990).

Para GRAHAM (1998) os sistemas de liberação controlada oferecem vantagens sobre os sistemas farmacêuticos convencionais que liberam o fármaco num curto período de tempo

- Liberação do fármaco no sítio de ação, diminuindo os efeitos colaterais sistêmicos.
- Proteção do fármaco que poderia ser destruído pelo organismo, como as proteínas que são biologicamente ativas.
- Mantém constante, o nível plasmático do fármaco no organismo, evitando as variações nas concentrações máximas e mínimas.
- Redução do número de doses, evitando efeitos tóxicos e aumentando o conforto do paciente.
- Pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, aumentando a ação terapêutica.

Sistemas de liberação controlada diferem da liberação sustentada ou liberação lenta que são as formas farmacêuticas convencionais que incluem complexos de sais ou resinas de troca iônica, suspensões, emulsões, revestimentos de diluição lenta e os comprimidos (LANGER, 1990).

Os sistemas de liberação sustentada liberam o fármaco num tempo inferior a 24 horas sendo que as condições ambientais influenciam a velocidade de liberação (LANGER, 1990).

Os sistemas de liberação controlada liberam fármacos e/ou outras substâncias, numa velocidade e num período de tempo programado, em geral, as velocidades de liberação são determinadas pelo tipo do sistema de liberação e quase independem das condições do meio e do pH. Nestes sistemas a liberação do fármaco pode demorar dias e até anos (LANGER, 1990).

Existem outros sistemas de liberação de fármacos como as vesículas que são microesferas ou transportadores coloidais, compostas de substâncias como proteínas, lipídios, carboidratos ou polímeros sintéticos (KOST & LANGER, 1991). Partilham de algumas vantagens dos fármacos macromoleculares conjugados como a farmacocinética e a biodistribuição modificada tornando assim, possível uma administração potencialmente mais alta do fármaco (LANGER, 1990).

Outros como os lipossomas, que são vesículas largamente estudadas, são constituídos por uma variedade de estruturas lipídicas, sendo atóxicos, degradáveis, embora apresentem uma baixa estabilidade na estocagem e uso. Os lipossomas estão sendo usados para liberar agentes tóxicos como o arsênio, para tratar doenças por parasitos específicos no fígado (como a esquistossomose) em animais de laboratório (LANGER, 1990).

Os sistemas de liberação de fármacos transdérmicos são designados como suporte para a passagem de fármacos da superfície da pele, através de várias camadas até atingir o sistema circulatório. Tem como vantagem evitar a passagem do fármaco pelo fígado. Outras vantagens da medicação transdérmica estão no tempo de liberação. Por exemplo, para o antipertensivo clonidina, cujo tempo de liberação é de 7 dias; 72 horas para o analgésico fentanil e de 24 horas para a liberação da nitroglicerina usada para doenças do coração (CHIEN, 1983).

Os materiais poliméricos geralmente liberam os fármacos através dos seguintes mecanismos: difusão, reação química e ativação do solvente.

O sistema polimérico de liberação mais usado é o de difusão, no qual o fármaco migra da posição inicial no polímero para a superfície e depois para o lugar onde irá agir, podendo ser em escala macroscópica (através dos poros da matriz polimérica) ou em escala molecular (passando entre as cadeias poliméricas) (BAKER, 1987).

A microencapsulação de fármacos é uma alternativa da qual se tem lançado mão para minimizar e até eliminar efeitos colaterais indesejáveis (KIM & CHOI, 2004). Desta forma microesferas ou grânulos foram preparados em um sistema sólido-lipídio para retardar a taxa de liberação da enrofloxacin e para mascarar seu gosto amargo usando o alginato de sódio ou carragena 2% como um material de proteção e manteiga de cacau como núcleo do sistema sólido-lipídio. Estes grânulos têm o potencial de mascarar o gosto amargo da enrofloxacin e estender sua taxa de liberação (KIM & CHOI, 2004).

Os hidrogéis de polímeros que combinam propriedades mecânicas adequadas com uma potencialidade elevada do carregamento do fármaco

mostraram um potencial enorme como base para sistemas de liberação controlada de fármaco (PEPPAS et al., 2000; ALVAREZ & CONCHEIRO, 2004).

No exemplo da quitosana, os grupos amino do polímero podem permitir o estabelecimento de tipos diferentes de interação com fármacos iônicos e não-iônicos (KUMBAR, 2002) e também fornecer os sistemas pH-sensíveis, que intumescem em sistema gástrico permitindo uma liberação local-específica (HEJAZI & AMIJI, 2003). Os sistemas microparticulados baseados na quitosana foram propostos para o tratamento local de infecções gástricas desde que podem cobrir uma grande área da mucosa e liberar o fármaco imediatamente (BERGER et al., 2004; BARREIRO et al., 2005).

Diversos procedimentos para preparar hidrogéis (BERGER et al., 2004, 2004a) e micropartículas (PENICHE et al., 2003; SINHA et al., 2004) de quitosana têm sido recentemente revisados. A maioria dos métodos envolve o uso de solventes orgânicos e a formação de emulsão ou de coacervação e a reticulação do polímero que ocorre em uma segunda etapa. (KOSEVA et al., 1999; KUMBAR et al., 2002).

Dados recentes da literatura mostram um procedimento em uma só etapa para se obter microesferas de quitosana com simultânea formação de ligações covalentes cruzadas com glutaraldeído e precipitação em um meio aquoso por uma simples mudança no pH. Neste procedimento usando uma proporção adequada de glutaraldeído é possível obter microesferas, que exibem um intumescimento pH-sensível e que podem liberar o fármaco rapidamente em pH ácido como o do estômago. Os resultados obtidos também destacaram a importância do pH do meio para modular a quantidade de fármaco, (metronidazol) carregado e a influência da temperatura em que os grânulos são preparados (KOSEVA et al., 1999)

Comparado aos métodos geralmente usados, este procedimento de uma única etapa que evita o uso de solventes orgânicos e de emulsão, é mais simples e mais rápido porque as ligações cruzadas ocorrem enquanto as microesferas estão sendo formadas, não sendo necessária uma segunda etapa (KOSEVA et al. 1999; KUMBAR et al., 2002).

Outro estudo envolvendo o polímero quitosana envolveu a microencapsulação da oxitetraciclina em um sistema de alginato/quitosana. Elas foram produzidas pela gelificação iônica com íons cálcio, para a liberação controlada em meio ácido, simulando o meio gástrico, e em pH 7,4 simulando o ambiente intestinal. Os resultados mostraram que esse tipo de microesfera intumescce em pH 7,4, no qual o efeito de sorção e desorção das moléculas de água promovem a liberação controlada do antibiótico tetraciclina (FLORES et al 2003).

2.7 Mecanismos de liberação de fármacos

Muitos são os esforços para elucidar o mecanismo de liberação de núcleos ativos a partir de matrizes hidrofílicas (FERRERO et al., 2000; ROY & ROHERA, 2002). Neste contexto, as cinéticas de liberação têm-se tornado alvo para entender o processo de liberação.

Tem sido mostrado, que a liberação de solutos a partir de matrizes hidrofílicas, é uma interação complexa entre intumescimento, difusão, erosão e relaxação (HARLAND et al., 1988). A penetração gradual de água produz intumescimento para formar um gel hidratado através da qual o soluto deve passar

pela dissolução e difusão para o meio aquoso (MUNDAY & COX, 2000). Portanto, na prática, matrizes poliméricas, geralmente, liberam o soluto via combinação de vários mecanismos (PEPPAS & SAHLIN, 1989).

O interesse pelo tipo da matriz de liberação é justificado completamente pelas suas vantagens biofarmacêuticas e farmacocinéticas, sobre as formulações de dosagens convencionais (LONGER et al., 1985). São sistemas de liberação que retardam o controle da liberação de um fármaco que seja dissolvido ou disperso em um suporte resistente à desintegração. Entretanto, o comportamento da liberação é de natureza inerentemente não linear, com a taxa de liberação continuamente diminuída devido à resistência difusional e/ou à diminuição na área efetiva da difusão.

De tempos em tempos, diversos autores propuseram vários tipos de mecanismos de liberação de fármacos das matrizes. A liberação de fármacos das matrizes, geralmente implicava na penetração da água na matriz (hidratação), no inchamento, na difusão do fármaco dissolvido no polímero, e/ou na erosão da camada gelatinosa. Diversos modelos matemáticos foram criados para mostrar a cinética de liberação ou como os fármacos se liberavam das matrizes (XU & SUNADA, 1995; HIGUCHI, 1963; RITGER & PEPPAS, 1987).

Entretanto, vale a pena mencionar que o mecanismo de liberação de um fármaco dependeria da seleção da dosagem, do pH, da natureza do fármaco e, naturalmente, do polímero usado (KHAN, 2001).

Idealmente, o mecanismo de liberação do fármaco deve controlar a taxa de liberação que deverá ser constante (ordem zero). Entretanto, mudanças na concentração dos gradientes podem conduzir a um efeito aumentado aditivo, mudando a porosidade, etc., que dentro dos dispositivos de liberação significa

tipicamente que a liberação do fármaco varia em função do tempo (GOHEL et al.,2000).

Estes sistemas poliméricos de liberação são importantes porque eles envolvem uma melhor administração e uma liberação prolongada dos fármacos encapsulados. Para este fim, foram desenvolvidas expressões matemáticas que descrevem a cinética de liberação das substâncias ativas encapsulados no polímero. Existem três tipos de equação que descrevem as cinéticas de liberação de fármacos microencapsulados: a difusão Fickiana; transporte não-Fickiano ou transporte anômalo e transporte do tipo II (cinética de ordem zero) (PEPPAS et al., 2001).

A equação de Ritger e Peppas (equação 1) é chamada de “power law”, ou lei das potências. É uma fórmula que abrange outras expressões matemáticas usadas para encontrar os mecanismos de liberação e que simplificadamente descreve os mecanismos de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos (PEPPAS et al., 2001; RITGER.; PEPPAS, 1987).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (\text{eq. 1})$$

Onde M_t representa a quantidade em mg do fármaco ou da substância liberada no tempo t , M_∞ é a quantidade total em mg de fármaco ou substância encapsulada, M_t / M_∞ é a fração de fármaco ou da substância no tempo t , K é a constante de difusão, dependendo do modelo cinético usado. O termo n é o

expoente da difusão que caracteriza o mecanismo de transporte da liberação do fármaco (PEPPAS, 1985; SIEPMANN & PEPPAS, 2001; RITGER & PEPPAS, 1987).

Para a cinética de liberação de solutos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, um valor do expoente de liberação de $n \leq 0,43$, indica que o mecanismo de liberação observado é de difusão do soluto através de camadas da matriz, também conhecido como mecanismo de liberação Fickiano ou “Caso I”. Um valor de $n = 0,85$, indica que a liberação do soluto é controlada apenas pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica, isto é, independente do tempo, mecanismo este, também conhecido como “Caso II” de transporte. Quando $0,43 < n < 0,85$, obtém-se um transporte não-Fickiano ou anômalo, onde ocorre a superposição dos dois fenômenos, sendo que a liberação é controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente. Para valores de $n > 0,85$ tem-se um super caso II de transporte, no qual ocorre a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica (SIEPMANN & PEPPAS, 2001; RITGER & PEPPAS, 1987).

Existem dois tipos de mecanismos de controle difusão: reservatórios e matriz. O primeiro tipo (reservatório) é efetuado por uma reação química acompanhada pela degradação do polímero ou clivagem do fármaco pelo polímero. O “Ocurset” foi um dos primeiros sistemas de liberação controlada usado clinicamente. Consiste num sistema reservatório projetado para melhorar a terapia para glaucoma, uma das principais causas mundiais de cegueira. O “Ocurset” é colocado sob a pálpebra inferior e libera pilocarpina, continuamente por 7 dias (LANGER, 1990).

O segundo tipo (matriz) é ativação de solventes, que compreende o intumescimento do polímero ou efeito osmótico. O mecanismo de difusão depende

da hidrofiliçidade e da hidrofobicidade do polímero, do tamanho dos poros, do grau de intumescimento e da hidrofiliçidade do soluto (KOST & LANGER, 1991).

Nos sistemas de reservatório a taxa de liberaçãõ é constante se houver concentraçãõ constante do fármaco no interior do reservatório. Este mecanismo é governado pela 1ª Lei de Fick (equaçãõ. 2).

$$J_i = D \frac{dc_i}{d_x} \quad (\text{eq. 2})$$

Sendo J e c_i respectivamente, o fluxo de massa e a concentraçãõ do soluto; d_x , D coeficiente de difusãõ do soluto e dc_i / d_x o gradiente de concentraçãõ à distância (THACHARODI & RAO, 1996).

Esforços estãõ sendo feitos para desenvolver novos conceitos de fármacos a fim de se conseguir cinética de ordem zero ou próxima da liberaçãõ de ordem zero. (QIU et al., 1998). Desta forma estãõ sendo pesquisadas combinações de matrizes que apresentam difusãõ, erosãõ e mecanismo de inchamento-controlados (KHAN, 2001; KHAN & ZHU, 2001a).

2.8 Sistema gastrintestinal das espécies animais

O trato gastrintestinal (TGI) é composto pela boca, laringe, esôfago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, cólon e reto) e glândulas anexas (glândulas salivares, fígado e pâncreas).

O esôfago é a ligação entre a cavidade oral e a faringe com o estômago, possuindo apenas glândulas mucosas que lubrificam e protegem o esôfago, evitando escoriações na porção superior e a ação do suco gástrico na porção inferior (DÂNGELO & FATTINI, 2000).

O estômago (Figura 14) serve de ponto de recepção e armazenamento do alimento ingerido. As funções primárias do estômago são atuar como reservatório, iniciar o processo de digestão e esvaziar seu conteúdo no duodeno de maneira controlada. O aparelho digestivo apresenta um diferente grau de especialização de acordo com a espécie animal, pois, está adaptado ao tipo de alimento e precisa ser diferente para processar a digestão e a absorção. (GETTY et al., 1986).

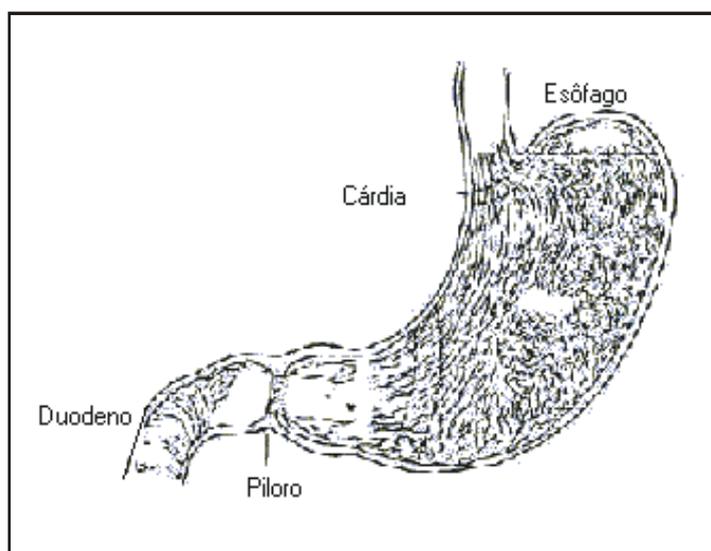


Figura 14. Porções gástricas do estômago dos monogástricos (cão).

(GETTY et al., 1986).

Por exemplo, os caninos (carnívoros) apresentam digestão enzimática, TGI curto e simples e ceco pequeno, os suínos (onívoros) digestão microbiana, ceco e cólon saculados, intestino delgado e intestino grosso compridos e os eqüinos (herbívoros) digestão por fermentação microbiana, ceco e cólon mais volumoso e saculado (GETTY et al., 1986).

O tempo do trânsito intestinal pode influenciar a absorção do fármaco, particularmente para os fármacos que são absorvidos pelo transporte ativo (por exemplo, vitaminas do complexo B), que se dissolvem lentamente como a griseofulvina, ou que é demasiado polar (lipídio-solúvel) cruzar prontamente as membranas como muitos antibióticos. Para tais fármacos, o trânsito pode ser demasiado rápido para que a absorção seja completa (WILEY, 2005).

Segundo FLORIO (2002), é na absorção via oral de medicamentos para as diferentes espécies de animais domésticos que ocorrem grandes discrepâncias. Isto tem causa na disposição anatômica do trato gastrintestinal e a na sua fisiologia digestiva. Portanto, pode haver diferenças importantes na absorção de medicamentos quando se comparam animais monogástricos e poligástricos.

FLORIO (2002) compara o reservatório gástrico dos eqüinos que é relativamente pequeno e grande o comprimento do ceco-cólon, ao dos cães que ao contrário, têm uma extensão estomacal relativamente grande e pequeno tamanho do ceco-cólon, estando os suínos em posição intermediária (FLORIO, 2002).

Também se refere ao pH estomacal dos eqüinos menos ácido (pH 5,5) do que dos cães e gatos (pH 3-4). Além disso, deve-se também considerar os contrastes entre os herbívoros (eqüinos) e os carnívoros (cães).

Desta forma, em relação às espécies animais, a disposição anatômica do trato gastrointestinal e a sua fisiologia determinam a característica de absorção do medicamento (FLORIO, 2002).

Após o esvaziamento gástrico, inicia-se a etapa interdigestiva no qual ocorrem contrações gástricas vigorosas de atividade motora apesar de o estômago estar praticamente vazio, sendo conhecida como complexo motor interdigestivo (CMI) ou complexo motor migrante (CMM) (SZURSZEWSKI, 1969; MARIK & CODE, 1975; SARNA, 1985)

A etapa interdigestiva (CMI), do cão divide-se em três fases distintas de motilidade gástrica, compondo um ciclo de 70 a 140 minutos. Ocorrendo ingestão alimentar, o CMI é abruptamente interrompido, iniciando-se o padrão prandial de motilidade, ou seja, a fase normal de digestão (MARIK & CODE, 1975; SARNA, 1985).

2.9 Condições fisiológicas para a liberação controlada de fármacos

Os meios pelo qual um fármaco é introduzido no corpo são tão importantes quanto o próprio fármaco. Os fármacos são quase sempre combinações estranhas ao corpo e ao contrário das substâncias endógenas que não são eliminadas continuamente (RANG et al., 2001).

A absorção dos fármacos é determinada pela suas propriedades físico-químicas, pelas suas formulações (tabletes, cápsulas ou solução) e pelas rotas de administração (oral, sublingual, retal, parenteral, tópica e por inalação). Outro fator muito importante é o fator fisiológico que inclui o pH gastrointestinal, tempo de

esvaziamento gástrico e o tempo de trânsito gastrintestinal (WILEY, 2005). O esvaziamento gástrico lento pode aumentar a absorção de fármacos pobremente absorvidos, mas também podem diminuir a extensão da absorção de fármacos lábeis ácidos (MEUNIER et al., 1993).

A rota mais comum para a administração de fármacos é a via oral. Entretanto, para um fármaco ser absorvido deverá atravessar membranas semipermeáveis das células epiteliais e alcançar a circulação sistêmica. Neste processo, o transporte através da membrana da célula depende do gradiente da concentração do soluto. O caso mais comum é a penetração do fármaco por difusão simples seguindo um gradiente de concentração em virtude de sua solubilidade na camada lipídica através de uma região de concentração elevada para uma de baixa concentração, por exemplo, líquidos no trato gastrintestinal (TGI) e no sangue, respectivamente.

Também, o tamanho da molécula intervém no processo de difusão, pois quanto menor a molécula mais rapidamente ela se difundirá. No entanto o elemento mais importante para a permeabilidade de uma molécula é a lipossolubilidade, pois, quanto maior ela for mais rapidamente a molécula se difundirá (WILEY, 2005).

Os animais são geralmente usados como modelos experimentais para estudar aspectos da absorção e da farmacocinética de fármacos. Como modelo animal o cão tem numerosas vantagens. O intervalo gastrintestinal do cão permite a administração da formulação de dosagem do tamanho padrão sem alterar testes padrões. Além disso, seu TGI se assemelha ao do ser humano, em teste padrão de motilidade, composição da bile, em dimensões gástricas (YOUNGGILL, 2001). As diferenças na absorção oral podem parcialmente ser explicadas por diferenças na anatomia e na fisiologia (LIN, 1995).

A comparação entre a absorção oral dos fármacos nos seres humanos contra cães foi revisada (CHIOU et al., 2000; SABNIS, 1999). Por exemplo, os cães têm uma estadia de trânsito gastrintestinal mais curta do que nos seres humanos (2 horas contra 4 horas, respectivamente). Entretanto, os cães compensam com as vilosidades intestinais mais longas, que fornece maior área de superfície para a absorção. Os cães têm secreção mais elevada de sal biliar, que aumenta a solubilidade de alguns fármacos pouco solúveis em água. Um pH mais elevado no intestino dos cães resulta uma absorção melhor dos fármacos que são bases fracas. Por outro lado, os cães (e provavelmente os gatos) têm uma secreção ácida basal mais baixa do que os seres humanos (KARARLI, 1995; DRESSMAN, 1986). As principais diferenças na atividade do estômago do homem e do cão estão no tempo de esvaziamento gástrico pós-refeição e no pH no estado em jejum: o tempo de esvaziamento gástrico dos alimentos e da forma de dosagem (DFs) no estado alimentado é significativamente maior nos cães do que nos seres humanos.

No cão, seguindo uma refeição pequena, os tabletes de fármacos de 8 mm são retidos por mais de 8 horas; e o complexo motor migrante (CMM) é anulado para aproximadamente 8 horas (KHOSLA & DAVIS, 1990; KARARLI, 1995; KLAUSNER et al., 2003).

No homem, após uma pequena refeição de 360 kcal, tabletes de fármacos de 13 mm de diâmetro foram retidos no estômago por 171 ± 29 min (KHOSLA & DAVIS, 1990; KARARLI, 1995; KLAUSNER et al., 2003). A tabela 6 mostra a comparação do esvaziamento gástrico e o tempo de trânsito intestinal entre o homem e o cão.

Tabela 6. Comparação do esvaziamento gástrico e tempo de trânsito intestinal entre o homem e o cão.

	Homem (min)	Cão (min)
Meio tempo de esvaziamento gástrico	8 - 15	4 - 5
Tempo de trânsito no intestino delgado	238	111
Tempo total do trânsito intestinal	2350	770

(YOUNGGIL, 2001)

2.10 Liberação controlada de fármacos na medicina veterinária

A tecnologia da liberação controlada de fármacos teve um papel muito importante no desenvolvimento da indústria da saúde animal desde 1980.

Esta tecnologia foi mais eficiente no ser humano do que na medicina veterinária embora essas tecnologias igualmente inovadoras e eficazes fossem desenvolvidas para ambos (BRAYDEN, 2003).

Na medicina veterinária, os dispositivos intra-ruminal, os implantes subcutâneos, os sistemas de liberação intramamaria e aplicações tópicas foram os mais bem sucedidos. Outros exemplos como, formulações que mascaram o gosto quando misturadas ao alimento são altamente comercializáveis junto aos clientes. As tecnologias de liberação nasal usada pelo homem podem ser adaptadas para doenças novas e antigas em pequenos animais (BRAYDEN, 2003).

A liberação controlada de fármaco em animais pequenos de companhia foi restrita pela maior parte ao uso de colares contra pulgas; implantes oculares e em bioadesivos dentais. O princípio nos colares de pulga é que o agente ativo (fipronil ou imidaclopride) está misturado em uma matriz do polímero. O fármaco é seqüestrado pelas glândulas sebáceas da pele do animal, então é gradualmente liberado deste reservatório em concentrações suficientes para matar os parasitos na pele (BRAYDEN, 2003). Já as gotas oftálmicas têm notadamente uma pobre bioavaliabilidade e a inserção de polímeros solúveis biodegradáveis pode ser impregnado com antibiótico a fim de aumentar o tempo de residência e não requerem a remoção (BAEYENS et al., 2002).

Outros exemplos de fármacos de liberação controlada incluem o gel, filmes-plásticos e inserções de liberação lenta dos agentes colinomiméticos tais como pilocarpina, fisostigmina que são usados no tratamento do glaucoma aberto de ângulo em seres humanos e em pequenos animais (KATSUNG, 2001).

O tratamento de doenças periodontais e da gengivite nos cães pode ser melhorado usando tabletes bioadesivos que contêm os anti-sépticos, que se unem firmemente à mucosa oral (GRUET et al., 1995).

No controle do ciclo de fertilidade em animais produtores são usados implantes intravaginais; para o tratamento de mastite são usadas microesferas biodegradáveis intramamaria. Cápsulas de fentoína estão sendo usadas para a liberação oral sustentada no tratamento de epilepsia em cães (ROTHEN et al., 2000).

Uma comparação entre a liberação controlada de fármaco na medicina humana e veterinária demonstra que na medicina veterinária a liberação controlada de fármaco, esteve à sombra dos sucessos comerciais vistos na medicina humana

nos últimos 20 anos. Contudo, segundo WOOD (2002), no mercado mundial os gastos com a saúde animal é de 11,05 bilhões de dólares, 14% destas vendas foram atribuídas aos produtos de liberação controlada. Sendo que os fármacos mostram ser uma subdivisão significativa e crescente do setor veterinário (WOOD, 2002).

Os medicamentos mais freqüentes para a liberação transdermal em animais são os fármacos antiparasíticos para o gado. Um exemplo útil é uma película transdermal colocada sobre a pele do animal e que contém um opiáceo lipofílico (produto oriundo do ópio) sintético potente, o fentanil. (RIVIERE & PAPICH, 2001). Projetado para uso em seres humanos para o tratamento da dor causada pelo câncer, também está sendo usado em hospitais veterinários nos E. U. A. (MUIJSERS & WAGSTAFF, 2001), para o controle da dor em cães. O sistema é projetado para liberar uma quantidade de fentanil por hora por três dias, conseguindo um estado constante em um dia. Este é um sistema de liberação de ordem zero, pois a taxa de liberação da película do opiáceo permanece constante.

Uma das vantagens, nas terapias da liberação controlada na medicina veterinária é que os testes podem ser realizados diretamente na espécie do alvo em contraste com a exigência para testar produtos seqüenciais de humanos inicialmente em diversas espécies (WELSLEY, 2002).

Nestas formulações, idealmente se deseja que a concentração do fármaco no plasma permaneça constante. Assim, há menor possibilidade de existir concentrações tóxicas e efeitos terapêuticos secundários (CHIEN, 1992).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver um sistema polimérico de liberação controlada *in vitro* e *in vivo* do antimicrobiano enrofloxacina impregnado em microesferas da malonilquitosana para ser usado na medicina veterinária a fim de diminuir efeitos colaterais indesejáveis.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar as microesferas de quitosana (QT) pelo método de inversão de fases.
- Caracterizar a quitosana através do grau de desacetilação por titulação condutimétrica (%GD), espectroscopia de infravermelho (IV) análise elementar (CHN), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectroscopia de RMN ^{13}C .
- Sintetizar a malonilquitosana reticulada na forma de microesferas a partir da reação de amidação entre quitosana e ácido malônico.
- Caracterizar as microesferas da malonilquitosana (MLQT) através de espectroscopia de infravermelho (IV), análise termogravimétrica

(TGA), Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise elementar, e espectroscopia de RNM ^{13}C .

- Reticular as microesferas da quitosana com glutaraldeído para aumentar sua resistência mecânica e torná-las insolúvel no meio aquoso.
- Caracterizar as microesferas da malonilquitosana contendo ou não o fármaco enrofloxacin por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Determinar o grau de intumescimento das microesferas não reticulada (MLQT) em água e das microesferas da malonilquitosana reticulada (MLQTR) em soluções tampão cujos valores de pH simulam aqueles do trato gastrointestinal (TGI).
- Impregnar com o fármaco antimicrobiano enrofloxacin as microesferas da malonilquitosana reticulada (MLQTR) e determinar a quantidade impregnada por espectroscopia no ultravioleta (UV).
- Estudar a cinética de liberação *in vitro* do fármaco enrofloxacin impregnado nas microesferas de malonilquitosana reticulada (MLQTR) por espectroscopia no ultravioleta (UV).
- Avaliar a liberação *in vivo* em ratos do fármaco enrofloxacin impregnado nas microesferas da malonilquitosana (MLQTR) estudando o tempo dependente.

4. Metodologia

4.1 Reagentes e soluções

O fármaco enrofloxacina, 90% (Baytril®;Bayer) foi gentilmente cedido pela Empresa Sementes Prezzoto Ltda. A quitosana foi obtida da Purifarma (São Paulo), com 90% de pureza. Os reagentes utilizados foram: álcool etílico, ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de potássio, hidróxido de potássio, glutaraldeído 2,5% (m/v), ácido malônico, todos de pureza analítica e obtida da Merck Chem ou da Vetec Química Fina Ltda.

As soluções tampões de pH 1,2 (solução de Clark-Lubs) foram obtidas pela mistura de 50,0 mL de KCl 0,2 mol/L e de 64,5 mL de HCl 0,2 mol/L; as soluções tampão de pH 6,8 foram obtidas pela mistura de 15,45 mL de solução de Na₂ HPO₄ 0,2 mol/L e 4,55 mL de solução de ácido acético 0,2 mol/L; as soluções tampão de pH 9.8 foram obtidas por diluição do tampão tris-(hidroximetil)-aminobutano 0,1 mol/L e ajustado com HCl 0,1 mol/L. O gás N₂ foi obtido da White Martins S.A.

4.2 Animais

Os animais usados nos experimentos *in vivo* foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Foram utilizados para os experimentos 60

ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 200 e 250g, e idade média de 2,5 meses.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparação das microesferas de quitosana (QT)

O processo para a formação das microesferas de quitosana usado foi o método de separação de fases por coacervação.

A quitosana foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético 5% (m/v) tendo sido obtido uma solução viscosa 3% (m/v). Em seguida, esta solução foi gotejada em um banho contendo solução aquosa de NaOH 2,0 mol/L através de uma bomba peristáltica da marca Ismatec, sob agitação constante para a obtenção das microesferas de quitosana gelatinizadas. Em seguida, estas microesferas foram lavadas com água destilada até alcançarem o meio neutro (RORRER et al., 1993).

4.3.2 Caracterização das microesferas de quitosana (QT)

4.3.2.1 Grau de desacetilação da quitosana (%GD)

O grau de desacetilação (% GD) ou porcentagem de grupos amino livres foi encontrado pelo método da titulação condutimétrica com o auxílio de um titulador automático Schott Gerate, modelo T802/20 e um condutivímetro Micronal, modelo B 330.

O princípio do método baseia-se na somatória das condutâncias individuais das espécies presentes na solução. Estão presentes os íons hidrogênio e hidroxila, que são os mais condutores, observa-se uma mudança na condutância destes, devido à concentração desses íons serem função do volume do titulante adicionado. (EWING, 1993).

Para isto, uma amostra de 200 mg de quitosana foi transferida para um recipiente e dissolvida em 5 mL de solução de HCl 1,0 mol/L e 450 mL de água destilada para a dissolução do polímero. Nesta titulação, foram adicionadas alíquotas de 0,2 mL de solução de NaOH 0,1 mol/L, em atmosfera de nitrogênio até a obtenção de valores estáveis de condutância. A curva de titulação mostrou dois pontos de inflexão. A diferença entre estes pontos corresponde à quantidade de NaOH necessários para protonar os grupos amino. A titulação condutimétrica foi realizada em triplicata.

O grau de desacetilação foi calculado pela média das três titulações condutimétricas, através da equação 3 (RAYMOND et al., 1993).

(eq. 3)

$$\%NH_2 = \frac{M.(V_2 - V_1).161}{W} \times 100$$

Onde %NH₂ é o grau de desacetilação da quitosana, V₁ e V₂ são os volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de ácido clorídrico e a quitosana protonada; M é a molaridade da solução de NaOH e W é a massa da amostra de quitosana usada na titulação.

4.3.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C das microesferas de quitosana

A espectroscopia de RMN de ^{13}C é uma técnica não destrutiva que possibilita realizar análises de amostras no estado sólido e fornece informações sobre a estrutura química de uma grande variedade de produtos naturais ou sintéticos tais como carboidratos, lipídios, proteínas, polímeros sintéticos e biopolímeros, princípios ativos de medicamentos entre outros. (LIU et al., 2005).

A técnica utilizada nos aparelhos de RMN ^{13}C consiste em irradiar um pulso curto e potente de radiofrequência, que excita todos os núcleos de ^{13}C existentes na amostra. Os dados são digitalizados automaticamente e guardados em computador e uma série de pulsos repetidos, que acumula os pulsos, construindo os sinais. (LIU et al., 2005).

Os espectros de RMN de ^{13}C para as microesferas de quitosana foram obtidos em um aparelho Oxford Instruments, NMR 400 MHz-Varian Model Eur 0028, através do programa Mercury NMR Spectrometer Systems.

4.3.2.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV) das microesferas de quitosana

A radiação na região do infravermelho (IV) é uma forma de identificação de compostos orgânicos e corresponde a parte do espectro situada entre as regiões do visível e microondas. A faixa espectral de maior utilidade está situada entre 2,5 – 25 μm , entre 4000-400 cm^{-1} . Todas as moléculas têm certa quantidade de energia distribuída por sua estrutura, que causa deformações

lineares e angulares das ligações. Assim, em um espectro de IV através da comparação dos valores de energia da radiação infravermelho para os quais há absorção, é possível identificar os diferentes grupos funcionais presentes num determinado composto orgânico (SILVERSTEIN, 1991).

Os espectros das microesferas de quitosana no infravermelho (IV) foram obtidos com o espectrofotômetro FT Perkin Elmer-modelo 16PC, na região de $4000-400\text{ cm}^{-1}$. As amostras foram prensadas com KBr na forma de pastilhas.

4.3.2.4 Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG) das microesferas de quitosana

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica que consiste em aquecer uma pequena quantidade de massa da substância, a fim de estabelecer a faixa de temperatura na qual o material adquire composição química definida ou a temperatura na qual inicia o processo de decomposição. Desse modo, as curvas de TGA permitem obter a composição e a estabilidade de compostos intermediários e resíduos. A análise termogravimétrica fornece informações sobre o conteúdo dos componentes voláteis como solventes ou água, da cinética das reações, sobre o comportamento de decomposição e conteúdo de cinzas em função do tempo ou da temperatura (EWING, 1993).

A termogravimetria derivada (DTA) é a técnica que fornece a derivada primeira da curva TGA em função do tempo. É utilizada para determinar as temperaturas máximas de decomposição de uma dada substância e assim identificar os diferentes estágios de decomposição.

As análises termogravimétricas das microesferas da quitosana original e da quitosana modificada foram realizadas em um analisador termogravimétrico da marca Shimadzu termogravimetric analyser (TGA 50, Kioto, Japan). Uma amostra foi submetida a uma faixa de temperatura de 0-700°C com taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio. Estes testes foram realizados em duplicata.

4.3.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) das microesferas de quitosana

A técnica de DSC é usada para detectar mudanças físicas ou químicas que são acompanhadas pelo ganho ou pela perda de calor, devidas ao aquecimento fornecido a substância. As transformações físicas ou químicas envolvem absorção (processo endotérmico) ou evolução de calor (processo exotérmico). O DSC é empregado para caracterizar materiais biológicos, orgânicos, inorgânicos, poliméricos e fornecem informações como o comportamento de fusão, cristalização, transição sólido - sólido e reações químicas (SANTOS et al., 2003).

A curva DSC foi obtida no equipamento Shimadzu DSC-50. Uma amostra de quitosana original (QT) foi submetida uma temperatura de 0-400°C com taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio. Estes testes foram realizados em duplicata.

4.4 Preparação das microesferas de malonilquitosana (MLQT)

Foram suspensas 5g de microesferas de quitosana original em 20 mL de etanol anidro e agitadas por uma hora; o etanol foi retirado por filtração. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, para a completa retirada de água das microesferas da malonilquitosana.

As microesferas de quitosana úmidas foram suspensas em 20 mL de etanol anidro com 450 mg de ácido malônico adicionados à suspensão. Esta mistura reacional foi refluxada por 36 horas à 78°C e então resfriadas e secas em temperatura ambiente. Estas microesferas permaneceram insolúveis em ácidos e solúveis em água. A Figura 15 mostra o método de obtenção da MLQT.

4.5 Reticulação das microesferas de malonilquitosana (MLQT)

As microesferas de malonilquitosana foram colocadas em contato com uma solução de glutaraldeído 2,5% (m/v), por 12 horas, sob temperatura ambiente constante para ocorrer à reação de reticulação. Após este tempo, as microesferas de quitosana foram filtradas com auxílio de uma peneira (1 mm de diâmetro) e lavadas com água destilada para a retirada do excesso do material reticulante (RAO & MURTHY, 2000).

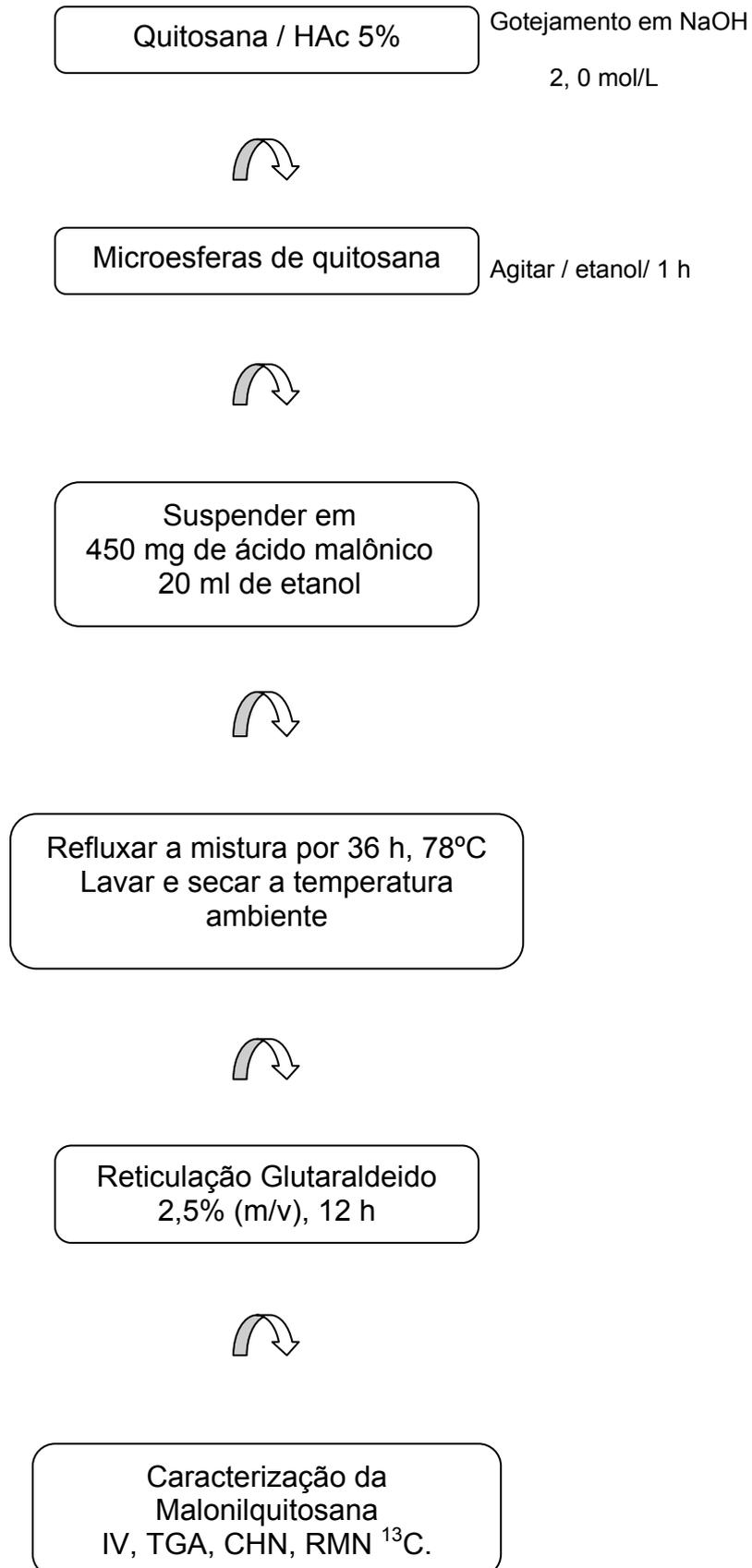


Figura 15. Obtenção das microesferas da malonilquitosana (MLQT).

4.6 Caracterização das microesferas de malonilquitosana (MLQT)

4.6.1 Determinação de grupos amino livres (-NH₂) por titulação condutimétrica

Uma amostra triturada de 150 mg de microesferas da malonilquitosana reticulada foi adicionada em 100 mL de solução padrão de HCl 0,100 mol/L e esta mistura foi deixada em contato por 24 horas, para ocorrer a protonação dos grupos amino livres. O número de grupos amino livres foi determinado por titulação condutimétrica. A titulação foi realizada em triplicata. Procedimento idêntico foi descrito no item 4.3.2.1.

4.6.2 Determinação do grau de substituição do grupo malonil por análise elementar (CHN)

O grau de substituição nas microesferas de malonilquitosana foi determinado pelo método descrito por Inukai e colaboradores de acordo com a equação 4 (INUKAI et al., 1998).

$$GS = ((C/N)_r - (C/N)_o) / 3, \quad (\text{eq. 4})$$

Sendo $(C/N)_r$, a razão C/N das microesferas de malonilquitosana resultante e $(C/N)_o$ a razão C/N das microesferas de quitosana original; o número 3, indica o número de carbonos após a quitosana modificada.

Os valores de C/N foram medidos usando um aparelho da marca Elemental Analyzer Carlo Erba EA 1110. Desta maneira, os valores experimentais percentuais de C, H e N foram determinados para ambas as microesferas da malonilquitosana e das microesferas de quitosana original.

4.6.3 Espectrometria de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C

Os espectros de RMN de ^{13}C para as amostras microesferas de malonilquitosana foram obtidos em um aparelho Oxford Instruments, NMR 400 MHZ-Varian Model Eur 0028, através do programa Mercury NMR Spectrometer Systems.

4.6.4 Espectrometria no infravermelho (IV) da malonilquitosana

As amostras das microesferas da malonilquitosana foram pulverizadas para a análise de espectroscopia na região do infravermelho. Os espectros foram obtidos utilizando-se o aparelho Perkin Elmer-Modelo FT-PC-16. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr.

4.6.5 Análise termogravimétrica (TGA) das microesferas da malonilquitosana

Para a análise de TGA, amostra de 12,76 mg da MLQT no estado sólido foi colocada dentro de uma panela de alumínio e submetida a uma temperatura de 0 –

700°C com uma taxa de 10°C/min no aparelho Shimadzu diferencial calorimeter TGA50, Kyoto, Japan. Estes testes foram realizados em duplicata.

4.6.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) das microesferas de malonilquitosana quitosana

As curvas DSC foram obtidas no equipamento Shimadzu DSC-50. Amostras no estado sólido da malonilquitosana (MLQT), da malonilquitosana impregnada com o fármaco enrofloxacin (MLQT-ER) e do fármaco livre (ER), pesando 5,4 mg; 10 mg e 7,2 mg respectivamente foram submetidas a uma temperatura de 0-400°C com taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de nitrogênio. Estes testes foram realizados em duplicata.

4.6.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a realização destas análises, amostras de microesferas da malonilquitosana sem o fármaco e amostras contendo o fármaco enrofloxacin, foram colocadas em suportes de alumínio, recobertas com uma camada de ouro para então serem microfotografadas num microscópio eletrônico de varredura (Philips-modelo XL30). As fotomicrografias das microesferas foram obtidas de sua superfície e de sua região transversal, de modo a se observar a morfologia interna e externa.

4.6.8 Determinação do grau de intumescimento (GI%) da malonilquitosana em água.

O grau de intumescimento (GI%) das microesferas (MLQT) foi estudado para medir a diferença de massa de amostra hidratada com uma outra amostra que não tenha sido submetida ao teste. Este estudo foi realizado em água deionizada.

Uma amostra de 200g de microesferas (MLQT) secas foi colocada em contato com 50 mL de água deionizada e mantidas sob agitação e termostatizada a 37°C, por 8 horas. Em intervalos de 30 minutos, as microesferas foram retiradas desta solução, secas ligeiramente em papel absorvente, para eliminar excesso de água, e pesadas para medir a diferença de massa comparada à outra amostra que não foi submetida ao teste. Este procedimento foi realizado em triplicata para obter uma média.

O grau de intumescimento (GI %) foi calculado pela equação 5.

$$GI\% = \frac{M_t - M_o}{M_o} \times 100 \quad (\text{eq. 5})$$

Sendo GI% o grau de intumescimento, M_o a massa da amostra seca (g) e M_t a massa da amostra hidratada (g).

4.6.9 Determinação do grau de intumescimento (GI%) seqüencial das microesferas da malonilquitosana em diferentes pH.

Este estudo foi realizado em soluções tampão de pH 1,2; 6,8 e 9,0 para simular as condições fisiológicas do trato gastrintestinal. Uma amostra de 200g de microesferas (MLQT) secas foi colocada em contato com 50 mL de solução tampão de pH 1,2, e mantida sob agitação e termostatizada à 37°C por 2 horas.

Em intervalos de 30 minutos, as microesferas eram retiradas da solução tampão, secas ligeiramente em papel absorvente, para eliminar excesso de solução, pesadas para medir a diferença de massa comparada à outra amostra que não foi submetida ao teste. Em seguida estas microesferas foram colocadas em contato com 50 mL de solução tampão de pH 6,8, nas mesmas condições por 2 horas, e em pH 9,0 por mais 2 horas. Este procedimento foi realizado em triplicata para se obter uma média.

O grau de intumescimento (GI %) foi calculado conforme a equação do item 4.6.8.

4.7 Processo de impregnação da enrofloxacina

As microesferas da malonilquitosana (MLQT) foram impregnadas com enrofloxacina usando a técnica de adsorção por contato como sendo o melhor meio para a impregnação deste fármaco. A solução escolhida para a impregnação foi à solução aquosa de KOH 1,0 mol/L.

Foram colocadas 1,0g de microesferas da MLQT em contato com 4,0g de enrofloxacin, numa soluçã de KOH 1,0 mol/L. A mistura reacional permaneceu em contato por 24 horas em temperatura ambiente, com agitaçã constante de 100 rpm. Apõs este perõdo, as microesferas foram lavadas rapidamente com água destilada para a retirada do excesso de material nã reagente e em seguida foram neutralizadas com soluçã aquosa de HCl 1,0 mol/L e secas à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido para uma segunda amostra das microesferas da MLQT por um perõdo de 48 horas.

4.7.1 Determinaçã da quantidade máxima de enrofloxacin, impregnada em microesferas da malonilquitosana.

O conteúdo máxmo de enrofloxacin impregnada nas microesferas de malonilquitosana (MLQT) foi determinado em 1, 2, 4 e 6 horas. Trẽs amostras de 200 mg de microesferas de MLQT-ER foram colocadas em contato com 100 mL de soluçã de KOH 1,0 mol/L. Apõs 1 hora de contato uma alõquota de 100µL foi retirada da soluçã e diluõda em 10mL de soluçã KOH 1,0 mol/L, para a determinaçã da absorvãncia. Procedimento idẽntico foi repetido para as 2, 4 e 6 horas.

A leitura da quantidade máxima de enrofloxacin impregnada nas microesferas da malonilquitosana foi realizada em um espectrofotõmetro UV-Vis, marca Hitachi-modelo U3000 λ_{max} 276 nm, a partir de uma curva padrã preparada por uma soluçã de enrofloxacin 1,2 g/L dissolvida em 50 mL de soluçã de KOH 1,0 mo/L.

4.8 Estudo de liberação *in vitro* da enrofloxacin impregnada nas microesferas da malonilquitosana (MLQT)

Amostras de 200 mg de microesferas de MLQT contendo enrofloxacin foram suspensas em 50 mL de solução tampão de pH 1,2; pH 6,8; pH 9,0 e mantidas sob agitação em um sistema termostatizado à 37°C, simulando as condições do trato gastrointestinal de um cão, em um sistema termostatizado à 37° por um período de 6 horas (AHN et al., 2001; LIN, 1995).

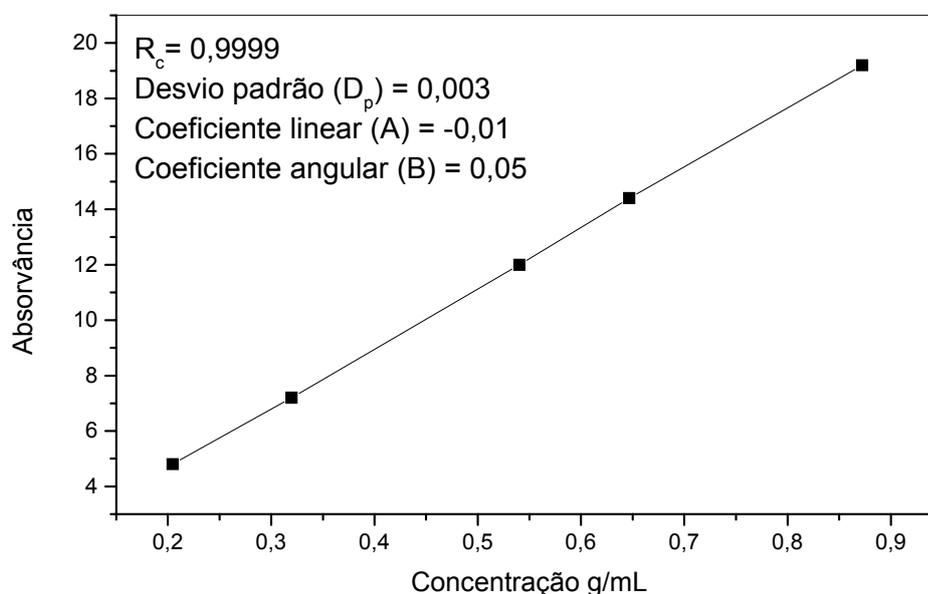


Figura 16. Curva padrão da concentração enrofloxacin em solução de KOH 1 mol/L.

A determinação da quantidade de enrofloxacin liberada das microesferas foi feita retirando um volume de 100 μ L da solução tampão de pH 1,2 contendo enrofloxacin e diluído em 10 mL de solução de KOH 1,0 mol/L. A cada 30 minutos uma alíquota foi retirada do sistema de liberação e lido a absorvância em espectrofotômetro por um período de 2 horas, para simular as condições de tempo do trânsito estomacal. Alíquotas foram retiradas no pH 6,8; de 2 até 4 horas; e no pH

9,0 de 4 até 6 horas para simular as condições de trânsito intestinal. A quantidade de enrofloxacinina foi monitorada pela leitura das absorvâncias das alíquotas em espectrofotômetro. O conteúdo de enrofloxacinina liberada foi determinado após extração com solução de KOH 1,0 mol/L a partir da curva padrão descrita no item 4.7.1. (Figura 16)

4.9 Estudo de liberação *in vivo* da enrofloxacinina impregnadas nas microesferas da malonilquitosana (MLQT)

Três lotes de ratos machos da linhagem *wistar* (n= 6, p= 250-300 g) foram abrigados sob circunstâncias controladas (ciclo de 12 horas claro-escuro; 22 ± 2°C, umidade do ar 60%). Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupos de seis com ração apropriada para roedores e *ad libitum* de água. As microesferas (MLQT) impregnadas com enrofloxacinina e ou com a enrofloxacinina na forma livre foram dissolvidos na água destilada, e administrados via oral (V.O.) na dose de 5mg/kg (dose terapêutica veterinária) (WOLFSON & HOOPER, 1991; LINNEHAN et al., 1999).

Os animais controle receberam somente microesferas da malonilquitosana sem o fármaco nas mesmas condições. O sangue foi coletado pela punctura ocular em animais anestesiados em 30 minutos, 1, 3, 6, 9, 12, 24 horas de acordo com o Guia internacional de Cuidados e Uso Adequado dos Animais de Experimentação, 2003. O sangue foi coletado centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm e o soro foi separado com ajuda da pipeta de Pasteur e feita a leitura da concentração sérica da enrofloxacinina, usando o espectrofotômetro UV-Vis, marca Hitachi em λ_{\max} 276nm.

Para a leitura do conteúdo de enrofloxacinina no soro plasmático extraídos dos animais, foram colocadas em contato alíquotas de 100µL de soro, 100µL de ácido tricloro acético (TCA) e 800 µL de solução de KOH 1,0 mol/L nos tempos determinados e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro.

A concentração sérica da enrofloxacinina foi determinada a partir de uma curva padrão (Figura 17), preparada a partir de uma solução contendo enrofloxacinina na concentração de 1,2 g/L, 100µL de soro e 25mL de etanol 50%. (YOUNGGIL, 2001)

Os dados estatísticos foram expressos como médias \pm SEM usando um programa específico de software chamado de análise de variação (ANOVA). Este programa foi aplicado para avaliar o significado da diferença entre as concentrações de enrofloxacinina no soro plasmático nos período de 30 minutos, 1, 3, 6, 9, 12, e 24 horas.

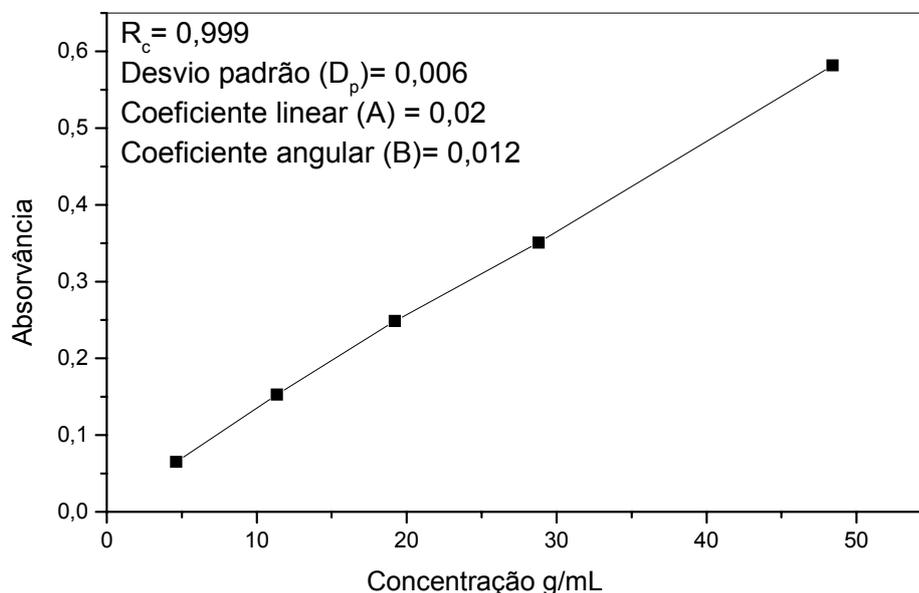


Figura 17. Curva padrão da concentração da enrofloxacinina soro plasmático.

5. Resultados e Discussão

5.1 Titulação condutimétrica e Análise elementar

A porcentagem de grupos amino livre na malonilquitosana em 36 horas, foi verificado por titulação condutimétrica com solução NaOH 0,1 mol/L. O índice dos grupos amino encontrados foi de 11 % que corresponde a 80% de substituição considerando que quitosana original apresentava-se 90% desacetilada (Figura 18).

As substituições dos grupos malonil nas microesferas de quitosana original foram também confirmadas pelo aumento do raio atômico da razão do carbono para o nitrogênio (C/N) nas microesferas da malonilquitosana (C/N= 7,77) quando comparada com as microesferas de quitosana original (C/N= 5,30). O grau de substituição (GS%) das microesferas da malonilquitosana resultantes foi de 82%, calculados a partir da análise elementar.

Os resultados encontrados na análise elementar foram: C 36,67%, H 6,71 e N 4,71% para as microesferas da malonilquitosana (36 horas), e C 38,81%, H 7,4 % e N 6,95% para microesferas de quitosana original. O grau de substituição (GS%) das microesferas da malonilquitosana resultantes foi de 82%, calculados a partir da análise elementar.

A substituição por grupos da malonil nas microesferas de quitosana original pode ocorrer para o grupo hidroxil mais reativo no C₆, e o grupo amino no C₂ da quitosana. Entretanto, a N-substituição (C₂) é relatada para ser preferida sobre a O-substituição (C₆) (KAS, 1997).

Conseqüentemente, é razoável considerar que uma N-substituição na quitosana pelos grupos malonil ocorre, visto que o índice de grupos amino substituídos foi determinado por titulação condutimétrica (Figura 18) das microesferas de quitosana modificadas antes da reticulação foi de 80 %, dado este que foi confirmado também pelos resultados da análise elementar.

É importante destacar que a utilização do método por titulação condutimétrica e de análise elementar na determinação do grau de substituição por grupos malonil na quitosana mostraram uma excelente concordância nos resultados obtidos.

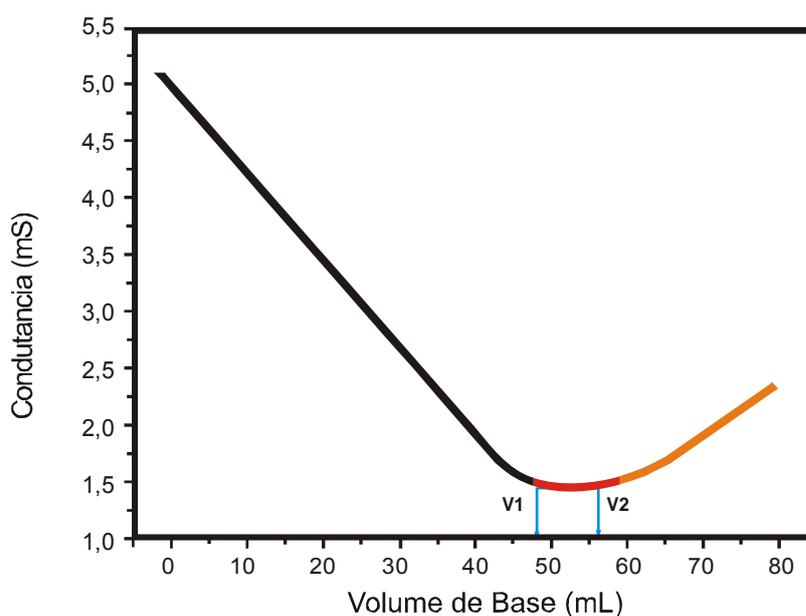


Figura 18. Titulação condutimétrica da malonilquitosana, 36 horas

5.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear RMN de ^{13}C

No espectro RMN de ^{13}C da quitosana e do produto da reação de amidação, os principais picos estão situados entre 20 e 200 ppm (Figura 19 e 20). Nesta faixa pode ser encontrado o pico correspondente ao grupo carbonila do produto amidificado em 176,47ppm (Figura 20). A análise do espectro mostra que os picos em 54,40; 71,20; 74,86 ppm são atribuídos ao C2, C6 e C5, respectivamente do anel piranose e os picos em 100,31 e 97,98 ppm correspondem aos carbonos anoméricos (Figura 20). O sinal observado em 22,93 ppm, (Figura 20) corresponde ao grupo metila da unidade N-Acetilglicosamina da quitosana, visto que a quitosana não é 100% desacetilada. Outro sinal também pode se observado em 46,05 ppm, correspondente ao grupo metileno situado entre duas carbonilas (LEBOUC et al., 2005).

Os grupos funcionais amida, de ácido, de éster ou de anidrido apresentam um sinal de carbonila na faixa de 155 a 185 ppm. O aparecimento do sinal de carbono carbonílico em δ 176,45 ppm, poderia então ser atribuído a carbonila presente no quitosana substituída com ácido malônico (Figura 20). Este sinal poderia confirmar preliminarmente a presença das funções monoamida e monoácido na estrutura proposta do produto malonilquitosana (Figura 18) (FERNANDES et al., 2000).

Entretanto, como esta técnica não pode distinguir entre um grupo amida ou ácido presente no produto, é sugerido a utilização da técnica da espectroscopia no infravermelho a qual pode fornecer informações mais reveladoras para a confirmação da estrutura molecular do produto da reação de amidação (Figura 20).

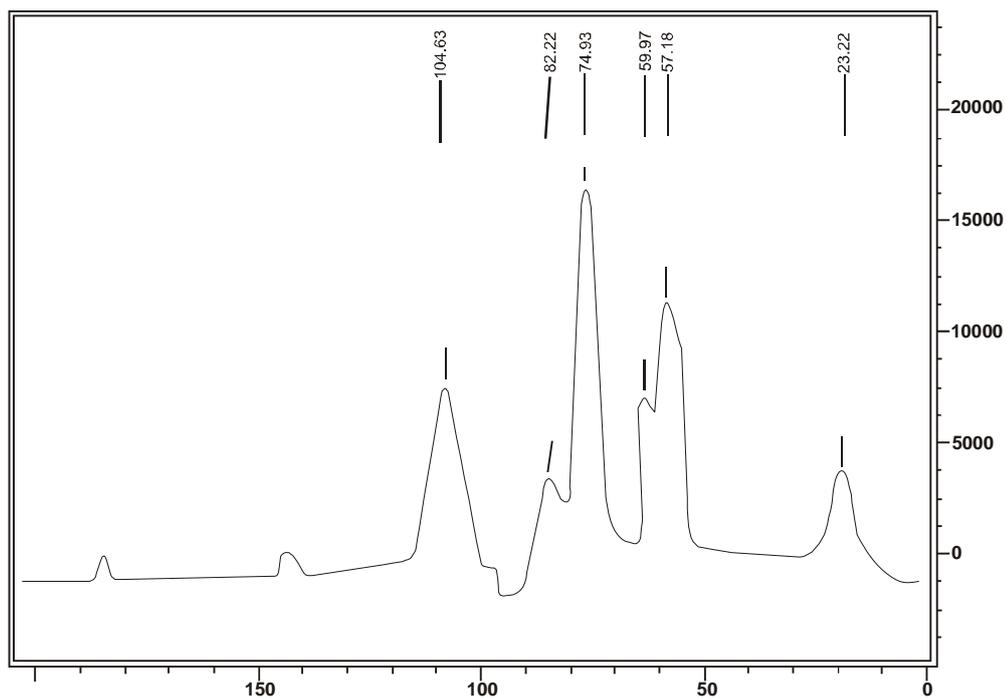


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C das microesferas de quitosana.

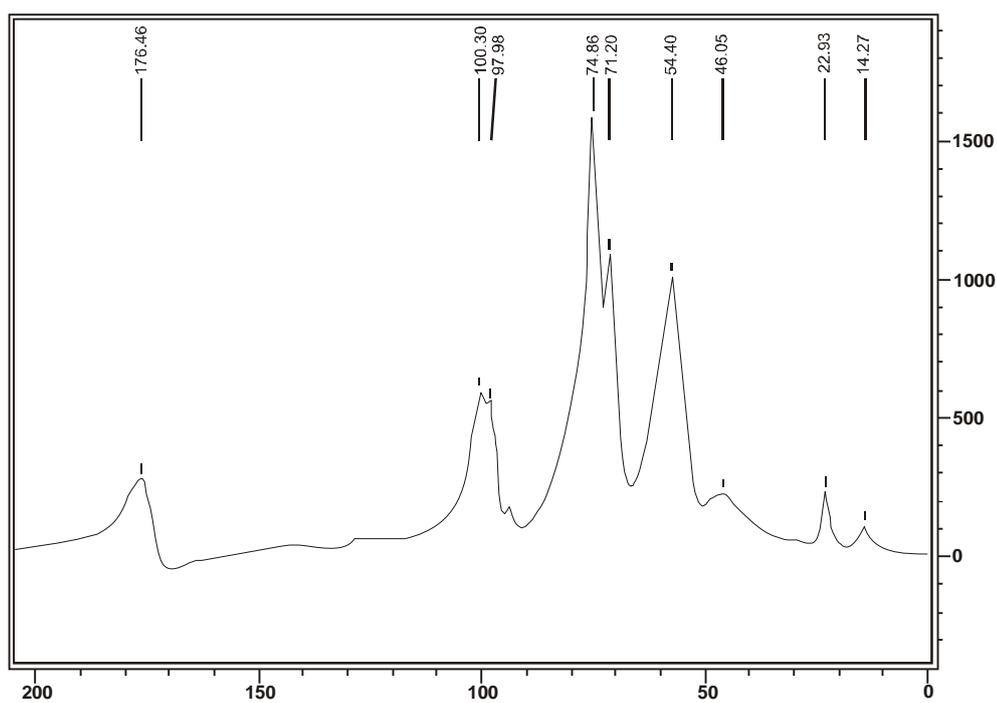


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C das microesferas da malonilquitosana .

5.3 Espectrometria na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho das microesferas de quitosana e da malonilquitosana são mostrados na Figura 21(a; b) respectivamente. As bandas de absorção em $3420\text{-}3446\text{ cm}^{-1}$ das microesferas modificadas são mais intensas como consequência das vibrações de estiramento-OH e da água. A banda em 1377 cm^{-1} observada para as microesferas de quitosana modificada pode ser atribuída às vibrações de deformação de intensidade média das ligações N-H das aminas primárias e de pouca intensidade das ligações C-H dos grupos CH_3 .

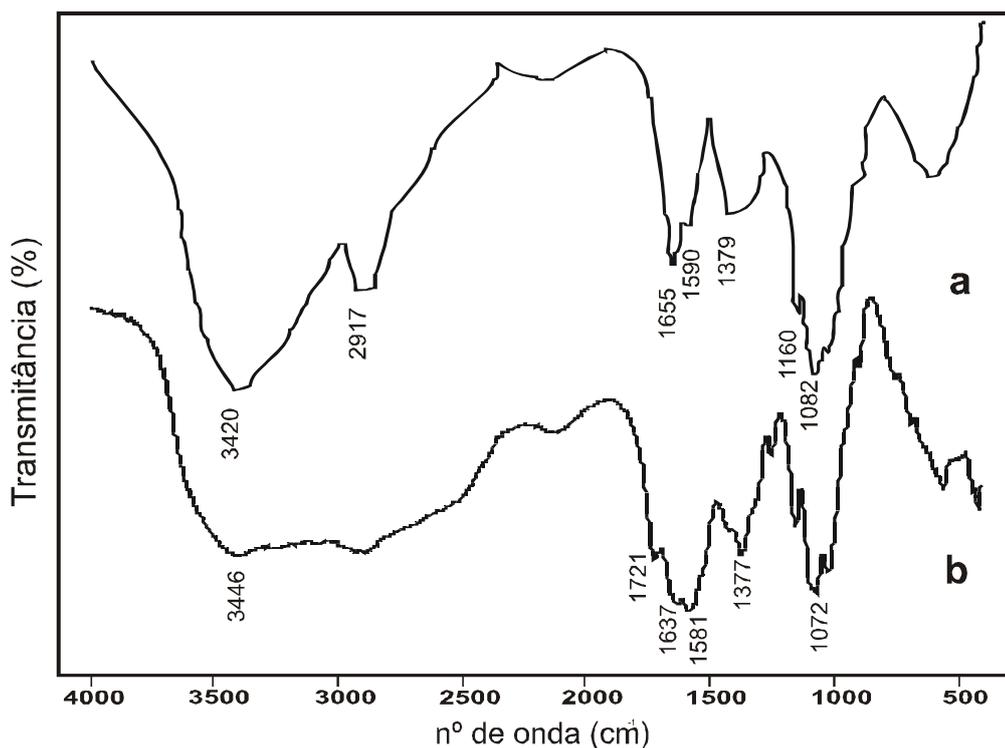


Figura 21. Espectro no infravermelho da quitosana (a) e da malonilquitosana (b).

Pequenas quantidades de resíduos do grupo da acetamida podem ser encontradas na cadeia polimérica em consequência da desacetilação incompleta da

quitosana. A banda em 1072 cm^{-1} corresponde ao estiramento vibracional das ligações C-O de álcool primário.

A banda de absorção observada em 1637 cm^{-1} para a quitosana modificada corresponde à deformação vibracional de amida primária N-H (amida II) a qual se encontra ausente nas microesferas de quitosana originais, assim como a banda de absorção em 1721 cm^{-1} atribuída ao ácido carboxílico alifático. Isto sugere a formação de um grupo monoamida e de um grupo ácido monocarboxílico após 36 horas, para o derivado resultante malonil.

Podemos concluir que os resultados de caracterização obtidos pelas técnicas de titulação condutimétrica, análise elementar, RNM de ^{13}C e de infravermelho estão de acordo com a estrutura proposta para a malonilquitosana (MLQT), monossustituída com grupos amida e ácido carboxílico (Figura 22).

O produto da reação de amidação e a sua provável estrutura está mostrado abaixo (Figura 22).

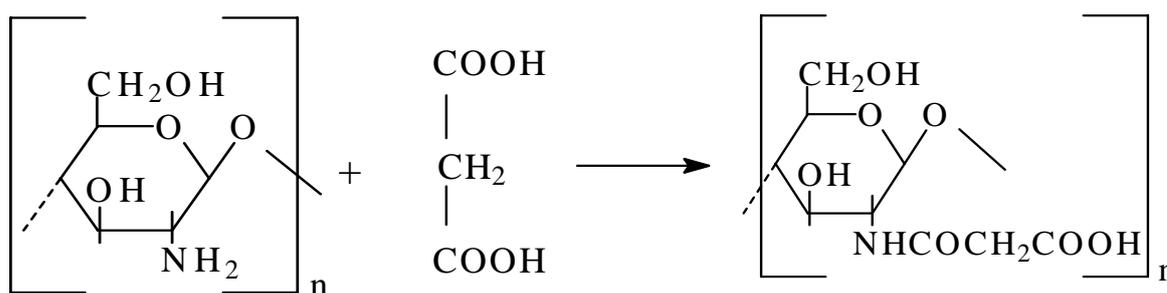


Figura 22. Estrutura da quitosana quimicamente modificada com ácido malônico

5.4 Análise termogravimétrica (TGA) das microesferas de quitosana e da malonilquitosana

Na curva termogravimétrica da quitosana se observam três etapas de perda de massa, sendo que a primeira etapa relaciona-se com perda de água e corresponde a 9,5%, a segunda e a terceira, são atribuídas perda de massa do polímero e que correspondem respectivamente a 56,2% e 5,5 %.

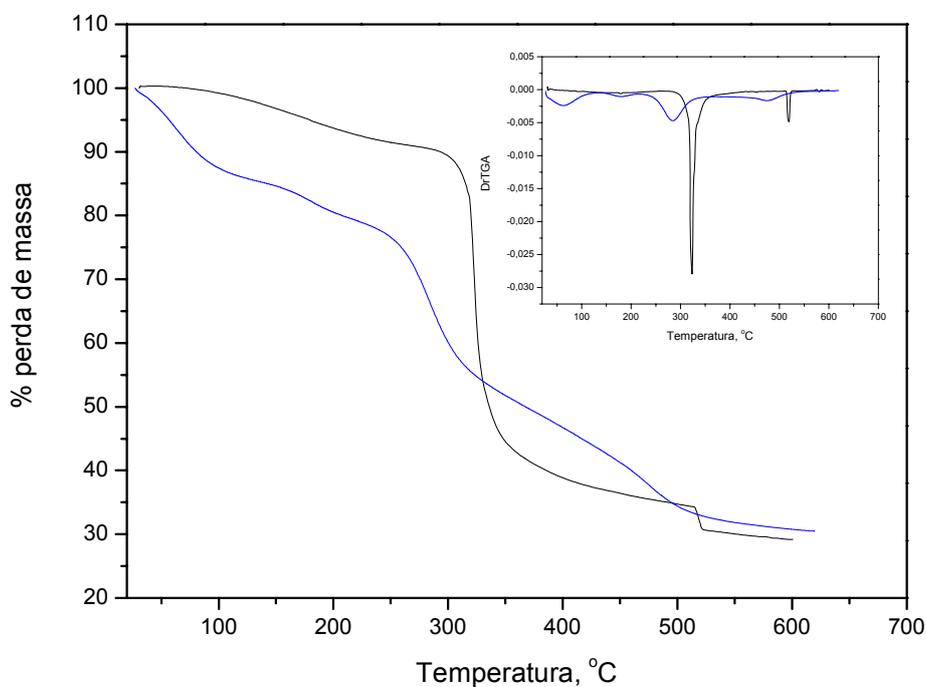


Figura 23. Curvas de TGA e DTG da quitosana (—) e da malonilquitosana (—).

As análises termogravimétricas da quitosana e das microesferas de quitosana modificadas (MLQT) (Figura 23) mostraram que a estabilidade térmica da malonilquitosana é diminuída em comparação com a quitosana, sendo que o pico de

degradação da quitosana de 323,31°C é deslocado para 284,17°C para a malonilquitosana.

Esta diminuição na estabilidade do polímero modificado é devido à presença de cadeias laterais ramificadas na cadeia polimérica (BROWN, 1988).

5.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas para compreender o comportamento do fármaco enrofloxacina impregnado nas microesferas da malonilquitosana.

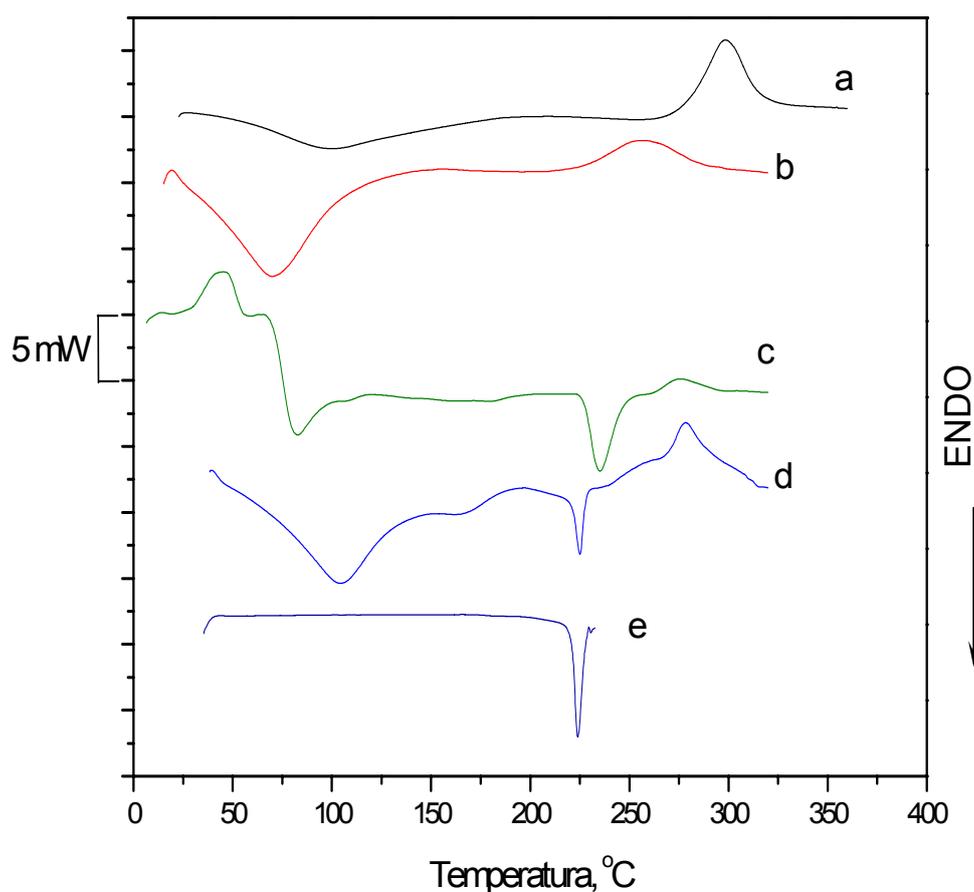


Figura 24. Curva DSC da quitosana (a); malonilquitosana (b); malonilquitosana contendo enrofloxacina (c); mistura físico polímero-fármaco (d) 2:1; enrofloxacina livre (e).

Na curva do DSC (Figura 24a) da quitosana original observam-se dois picos. O primeiro, endotérmico, a 79°C, corresponde ao processo de desidratação, e o segundo, exotérmico, a 299°C, corresponde ao processo de decomposição das cadeias do polímero quitosana.

Para a curva DSC das microesferas da malonilquitosana (Figura 24b) o pico exotérmico aparece a 257,7°C correspondente ao processo de decomposição da malonilquitosana, o qual está de acordo com a diminuição da estabilidade térmica observada na análise de TGA.

A curva DSC da enrofloxacina (Figura 23e) mostra um pico endotérmico, que correspondente ao ponto de fusão do fármaco em 224°C. Um pico semelhante aparece na mesma região do termograma da mistura física da malonilquitosana e do fármaco enrofloxacina (Figura 24d) na proporção 2:1 (MLQT e fármaco, respectivamente). Para as microesferas da malonilquitosana contendo fármaco (MLQT-ER) (Figura 24c), aparece um pico endotérmico a 235,2°C e outro exotérmico em 275,2°C.

Comparando-se o perfil endotérmico das curvas (c), (d) e (e), o pico a 235,2°C da curva (c) está ligeiramente deslocado à direita com relação às curvas (d) e (e), podendo ser atribuído à presença do fármaco nas microesferas da malonilquitosana. Ainda o aparecimento de pico em 275,7°C em (c) pode ser atribuído à decomposição da cadeia polimérica.

A presença do pico endotérmico da enrofloxacina na matriz polimérica indica que durante o processo de impregnação, o fármaco não se dissolveu na matriz polimérica. Isto sugere que tal impregnação se realizou como se fosse um processo de mistura física, durante o qual o fármaco foi armazenado nas microesferas da por

intermédio dos poros existentes (RODRIGUÈZ et al.,1998; BODMEIER & PAERATAKUL, 1994).

5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das microesferas da malonilquitosana (MLQT) sem enrofloxacina e das contendo a enrofloxacina

As fotomicrografias na figura 25(A e C) mostram respectivamente a morfologia da superfície externa das microesferas da malonilquitosana (MLQT) e malonilquitosana (MLQT-ER) contendo o fármaco enrofloxacina.

A figura 25 (A) mostra uma boa esfericidade com uma superfície lisa e com relativa porosidade para as amostras da malonilquitosana (MLQT). O tamanho médio destas partículas foi 1,05 μm , enquanto que nas microesferas da impregnadas com enrofloxacina (MLQT-ER), o tamanho médio foi de 1,45 μm .

As diferenças apresentadas na morfologia externa das microesferas podem ser atribuídas ao excesso de fármaco que ficou retido na superfície destas partículas.

A presença do fármaco enrofloxacina nas microesferas da malonilquitosana (MLQT) foi confirmada por uma camada esbranquiçada na superfície das microesferas (Figura 25 C).

As fotomicrografias na figura 25 (B, D, E, e F) mostram respectivamente as secções transversais da superfície interna das microesferas de malonilquitosana (B) e de malonilquitosana contendo o fármaco enrofloxacina (D, E, F).

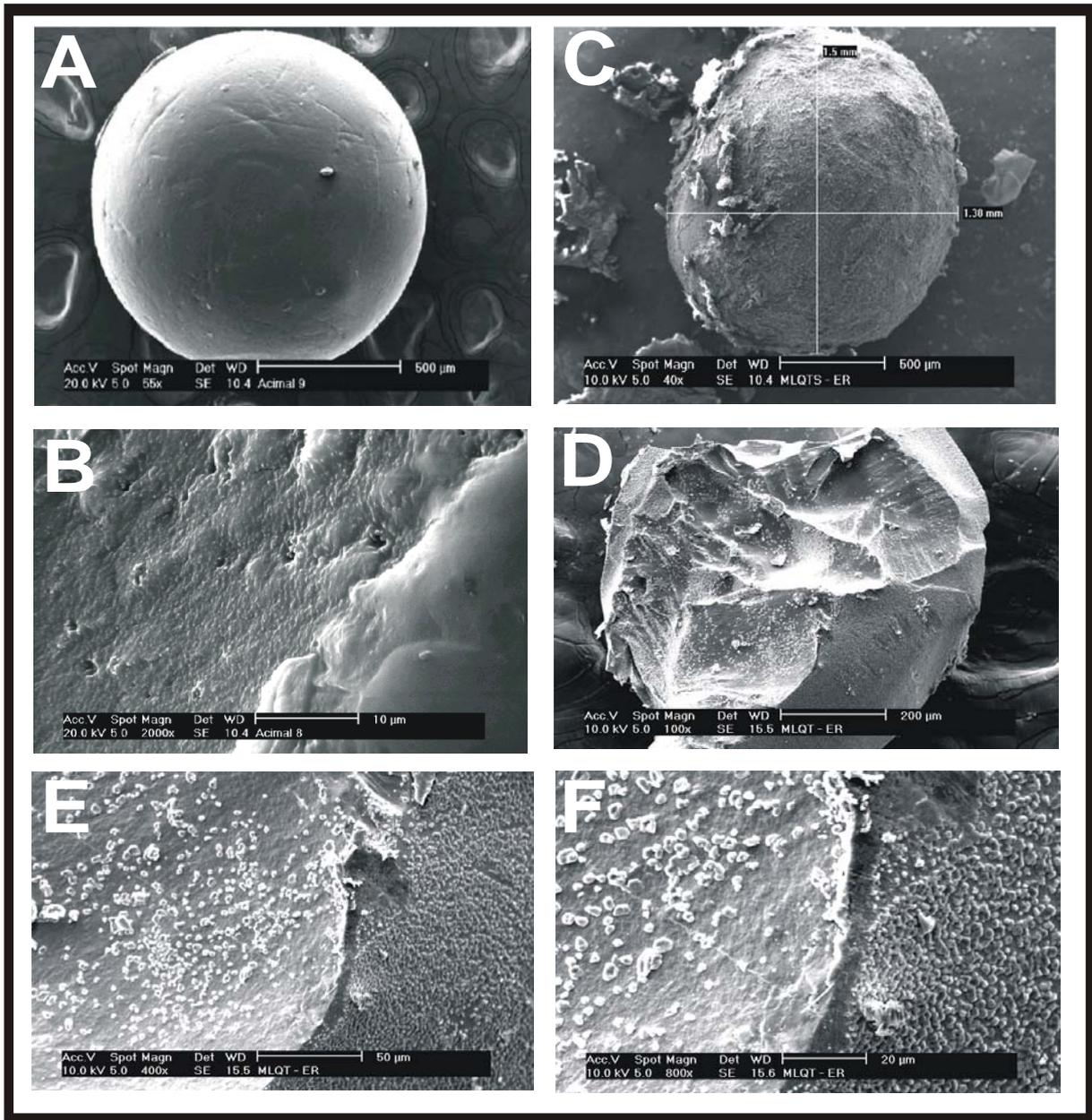


Figura 25. Fotomicrografias (A, C) da superfície externa das microesferas MLQT E MLQT-ER; (B) da secção transversal da microesfera da MLQT ampliação (2000x) ; (D, E, e F) das secções transversais da microesfera da MLQT com enrofloxacina com ampliação (100x ; 400x ; 800x respectivamente).

5.7 Grau de intumescimento (GI %) da MLQT em água e em soluções tampão simulando o TGI animal.

O grau de intumescimento (GI%) é um importante parâmetro associado ao mecanismo e à cinética de liberação de fármacos a partir de hidrogéis (LEE & KIM, 1991). Fatores tais como grau de reticulação, hidrofiliabilidade e hidrofobicidade do polímero influencia no grau de intumescimento e na sensibilidade ao pH, isto é, na importância da resposta às mudanças do pH (BRONDSTED & KOPECK, 1992; THANOO et al., 1991).

O grau de intumescimento (GI%) das microesferas da malonilquitosana em água foi de 188% determinado após ter sido removida à água em excesso da superfície das microesferas, com auxílio de papel absorvente e do peso das microesferas desidratadas em temperatura ambiente até peso constante.

As propriedades de intumescimento de hidrogéis iônicos são originalmente devido à ionização de seus grupos funcionais pendentes. Parâmetros fisiológicos tais como pH pode mudar drasticamente o grau de equilíbrio do intumescimento por diversas ordens de magnitude.

Para este estudo as microesferas de MLQT se comportaram como géis de polieletrólitos intumescendo nos pH que simulam o TGI de cães, podendo ser usadas como matriz para sistemas de intumescimento-controlados na liberação da enrofloxacin. Desta maneira, a mudança de pH no intervalo gastrointestinal age para o hidrogel como um estímulo de liberação (LOWMAN & PEPPAS, 1999).

A tabela 7 mostra que houve um intumescimento acumulativo nos pH do TGI simulado, atingindo o valor de 83% após 6 horas. Observa-se um intumescimento

acentuado em pH 1,2 para depois decrescer em pH 6,8 e novamente aumentar ligeiramente em pH 9,0.

Tabela 7. %Grau de intumescimento das microesferas da MLQT em diferentes pHs.

pH	Tempo (h)	% Grau de intumescimento médio
1,2	0 –2	41,0 ± 0,9
6,8	2– 4	20,3 ± 1,0
9,0	4 –6	21,7 ± 0,1

Estes resultados estão de acordo com o comportamento da quitosana como um polieletrólito catiônico em que os grupos amino de sua cadeia estão protonados em pH ácido o que deverá favorecer seu intumescimento. Em pH 6,8 os grupos amino e os carboxilato estão deprotonados provocando uma diminuição no intumescimento. Em pH 9.0 nota-se um leve aumento no intumescimento do polímero da MLQT. É importante ressaltar que o valor acumulativo revela um grau de intumescimento elevado (83%), porém menor do que o intumescimento em água pura, considerando o efeito de pH e um tempo maior de contato no caso da água (Figura 26).

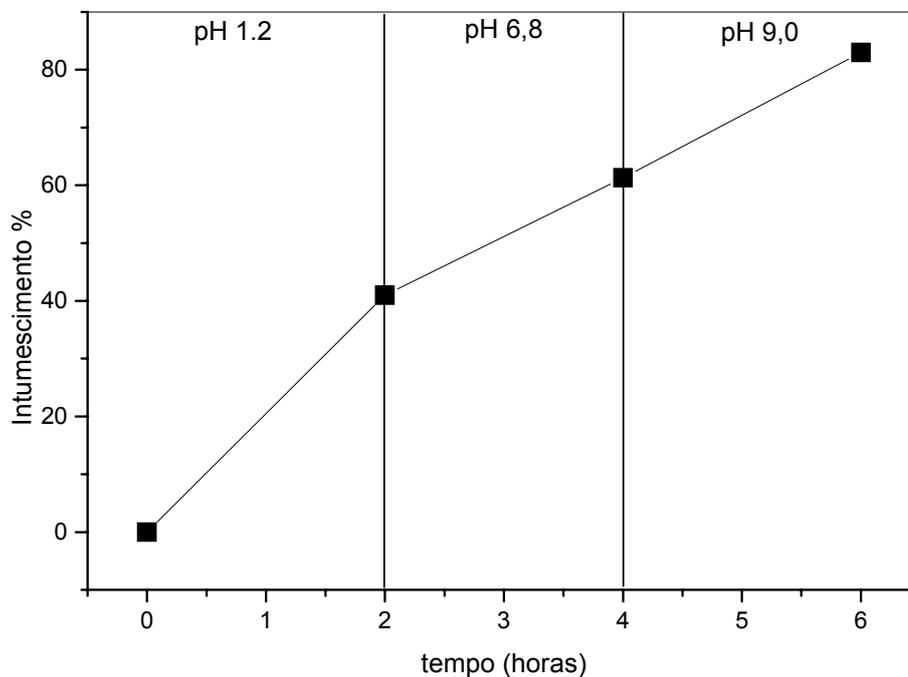


Figura 26. Curva cinética de intumescimento das microesferas da MLQT em solução tampão pH 1,2; pH 6,8; pH 9,0.

5.8 Liberação *in vitro* da enrofloxacin impregnada nas microesferas de malonilquitosana

A concentração do fármaco enrofloxacin impregnada na microesferas de malonilquitosana (MLQT-ER) obtido em 24 horas foi de 520 mg/g.

Os resultados dos estudos de liberação da enrofloxacin foram obtidos simulando o meio fisiológico. Os valores obtidos no período de 6 horas estão listados na tabela 8.

Tabela 8. Liberação da enrofloxacin impregnadas nas microesferas de MLQT-ER.

pH	Tempo (h)	Média liberação %
1,2	0 – 2	40,0 ± 0,4
6,8	2– 4	23,9 ± 1,0
9,0	4 – 6	37,1 ± 0,9

Em pH 1,2 intervalo de 0 a 2 horas, foi caracterizado por uma rápida liberação de grande parte da enrofloxacin, cerca de 40%. Enquanto que, em pH 6,8 houve uma liberação mais lenta no intervalo de 2 a 4 horas, cerca de 20%, resultando um valor acumulativo de 63% , e em pH 9,0 uma liberação igual a 37,1%, equivalendo a um valor acumulativo final de 101% (Figura 27).

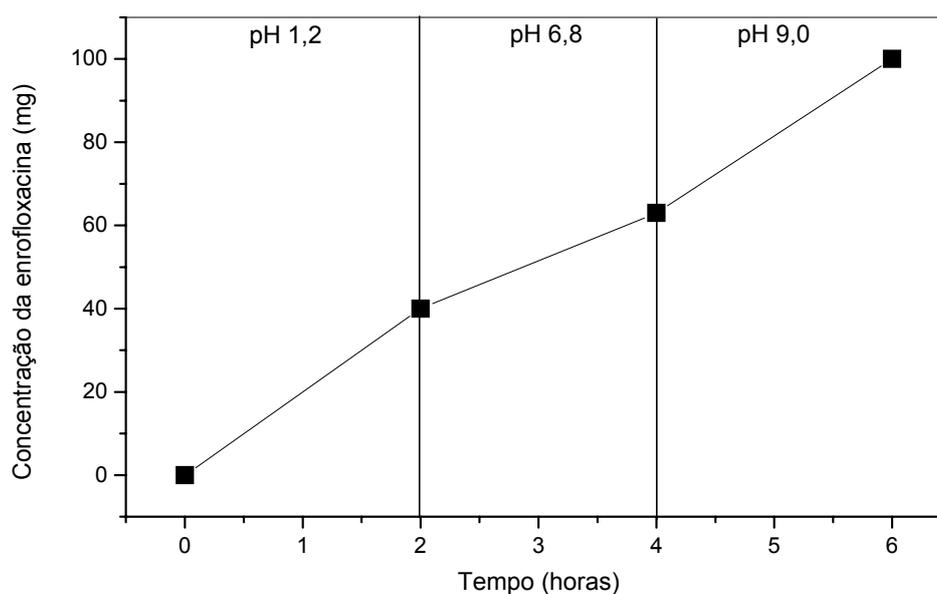


Figura 27. Curva de liberação da enrofloxacin impregnadas nas microesferas da MLQT-ER.

A liberação da enrofloxacinina das microesferas de malonilquitosana é dependente do pH do meio. O que explicaria sua maior liberação em pH ácido, pois nesta fase os grupos carboxila do fármaco estariam totalmente protonados e de acordo com o perfil da solubilidade da enrofloxacinina em função do pH (Figura 27).

Por outro lado, a malonilquitosana apresenta 11% de grupos amino, os quais neste pH estão totalmente protonados, com um máximo de intumescimento contribuindo dessa forma para o processo de liberação.

5.9 Estudo cinético de liberação da enrofloxacinina em solução tampão pH

6,8

O perfil de liberação em pH 6,8 do fármaco enrofloxacinina Figura 28 mostra uma cinética muito rápida na sua fase inicial atingindo um máximo de 45 minutos. Entretanto a alta carga de impregnação de 610 mg/g contribui para esta rápida liberação e com indicação de que o procedimento experimental foi o responsável por este efeito.

Os parâmetros cinéticos (n) podem ser determinados por um ajuste não linear aplicado à lei de potência (PEPPAS, 1985). Quando o valor de n ficar em torno de 0,45 predomina o fenômeno de difusão Fickiana. A Figura 28 mostra um padrão de comportamento não linear no seu perfil de liberação inicial e aplicando a equação simplificada de Peppas na forma logaritimada (equação 6).

$$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = \ln K + n \ln t \quad (\text{eq. 6})$$

Onde M_t é quantidade de liberação do fármaco num tempo t , M_∞ é a quantidade total de fármaco encapsulado, M_t / M_∞ é a fração do fármaco no tempo t , e K é a constante de difusão, dependendo do modelo cinético usado. O termo n é o expoente de difusão que caracteriza o mecanismo de transporte da liberação do fármaco.

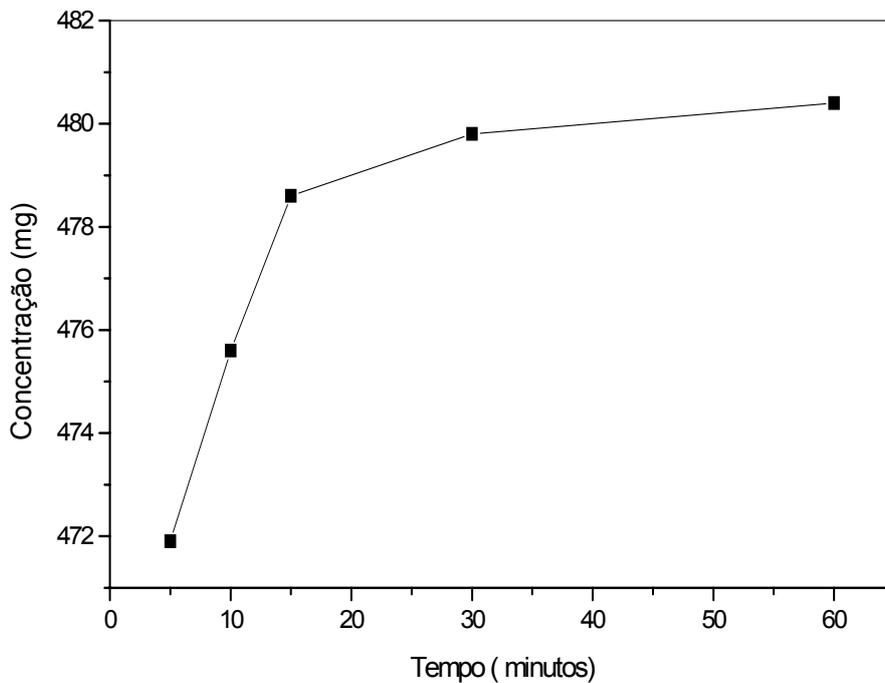


Figura 28. Perfil da liberação da enrofloxacinina em tampão pH 6,8.

Linearizando a equação 6, obtida através do gráfico de $\ln M_t / M_\infty$ em função de $\ln t$, obtém-se o expoente difusional n . Os dados de liberação da enrofloxacinina

foram avaliados para $Mt/M_\infty < 0,60$ e determinou-se o valor de $n= 0,01$ que foi considerado um valor muito pequeno.

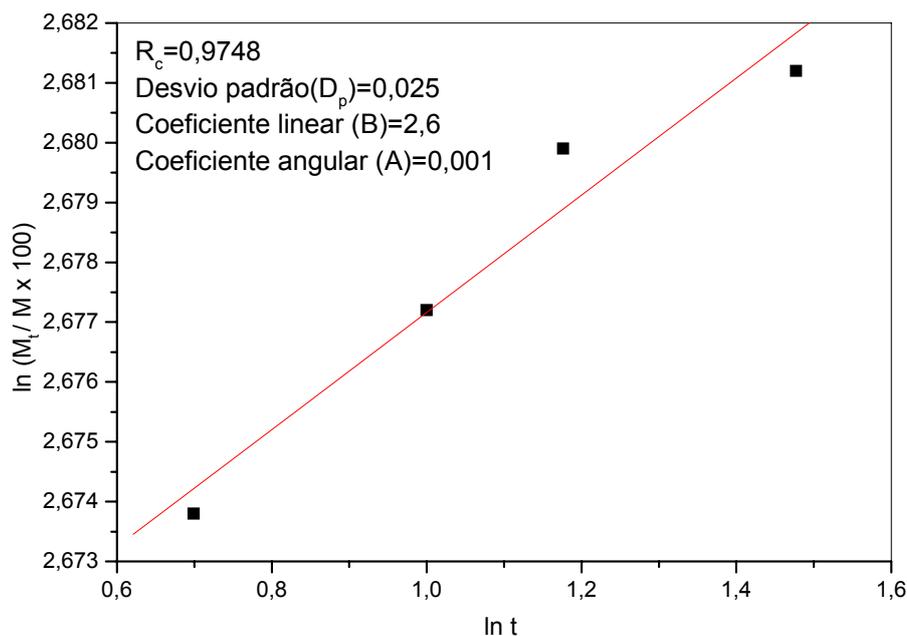


Figura 29. Curva cinética de liberação da enrofloxacinina das microesferas de MLQT em função do tempo em solução tampão 6,8

Este resultado pode ser relacionado com o alto conteúdo de fármaco presente nas microesferas da malonilquitosana, sendo ele parcialmente responsável pela rápida liberação da enrofloxacinina nos primeiros 45 minutos a partir das microesferas de MLQT.

Teoricamente com o expoente de difusão $n= 0,45$ à lei de potência pode ser aplicada para simular os primeiros 60% de liberação do fármaco. No presente caso

isto deixa somente 2 ou 3 pontos para serem usados para ajuste não linear para uma taxa de liberação rápida (Figura 29). Conseqüentemente isto resultou num ajuste inadequado o qual explicou o baixo valor de expoente de difusão encontrado para esta liberação. Neste caso admite-se que o mecanismo foi somente de difusão e outros fatores como solubilidade e intumescimento não interferiram no resultado.

Outro fator a considerar é o fato de que a formulação com o polímero apresenta alta carga de fármaco e a rápida liberação é devida provavelmente ao sistema que se torna fraco para reter o fármaco pela diminuição na concentração do polímero em relação ao fármaco (CHUN & CHOI, 2004).

5.10 Liberação *in vivo* da enrofloxacin impregnada nas microesferas de malonilquitosana

Geralmente, quando um comprimido convencional de enrofloxacin de 400 mg é administrado em animais saudáveis, via oral, a concentração no soro de enrofloxacin e da ciprofloxacina, seu maior metabólito é de 1-2 h. O pico da concentração do soro é de 1,5 µg/ml, e sua meia-vida de eliminação é de 3,5 h. (BOISSEAU, 1993).

In vivo a avaliação da liberação da enrofloxacin contida nas microesferas de malonilquitosana foi realizada em ratos saudáveis e normais. Os níveis plasmáticos do fármaco foram medidos em espectrofotômetro após a administração oral de uma dose equivalente a 520 mg/kg de enrofloxacin impregnada, comparada com o nível

plasmático da mesma dosagem oral de enrofloxacin livre. Os resultados destes estudos são mostrados na Figura 30.

A administração oral da enrofloxacin livre (F-ER) resultou em um pico de concentração máxima de 488 µg/mL em 1 hora e este nível de fármaco foi mantido por 3 horas, após este tempo produziu um declínio não exponencial da concentração do soro de acordo com os dados obtidos e relatados por Papich e Otero (PAPICH et al., 2002; OTERO et al., 2001b).

Entretanto, no exemplo as microesferas da malonilquitosana que contêm o fármaco (MLQT-ER), observou-se um nível alto da enrofloxacin no soro alcançando um pico máximo em torno de 670 µg/mL e se manteve durante o período de 6 horas a 12 horas.

Conseqüentemente, a microencapsulação da enrofloxacin representa uma mudança no parâmetro cinético e um aumento na concentração do fármaco no sangue o que poderia ser uma vantagem para o uso veterinário terapêutico deste fármaco antimicrobial.

O aumento do tempo e do efeito sustentado observado por um longo período de tempo no caso das microesferas é devido provavelmente a uma absorção e liberação mais lenta da enrofloxacin no período mais prolongado.

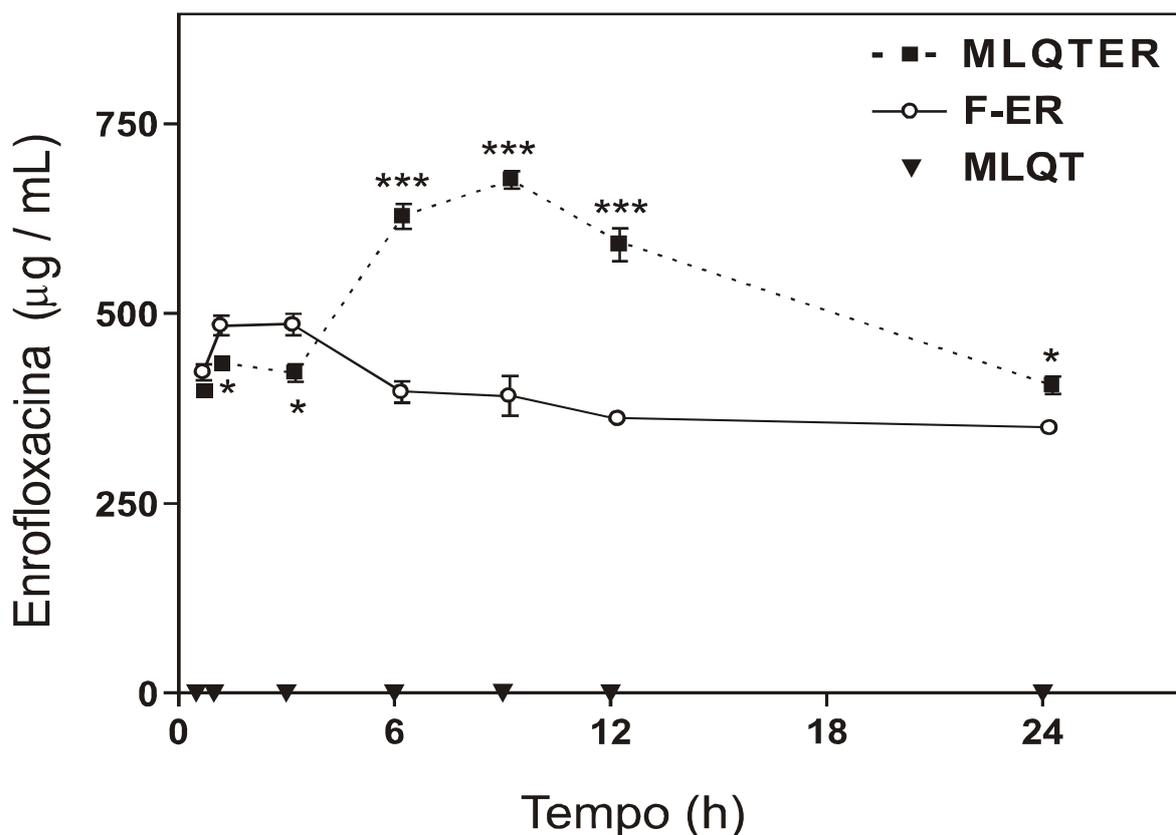


Figura 30. Liberação *in vivo* das microesferas malonilquitosana impregnadas com enrofloxacina (--- MLQTER); enrofloxacina-livre (-o- F-ER) e microesferas da malonilquitosana (▼-MLQT) em ratos tratados com 520 mg/Kg (v.o). Todos os valores são expressos como médias \pm SEM, n=6, (*) e (***) denota diferença significativa com relação a F-ER ($P < 0,001$ e $P < 0,05$).

6. Perspectivas de trabalho

A impregnação e a liberação do fármaco enrofloxacina com cargas menores do fármaco enrofloxacina, poderá possibilitar uma melhor desempenho na cinética de liberação *in vitro*, e desta forma aumentar a eficácia terapêutica nos resultados *in vivo*.

Aplicar o sistema malonilquitosana com a enrofloxacina, usando outros modelos animais, como por exemplo, o cão.

Estender o uso da malonilquitosana como matriz para o desenvolvimento de novas formulações orais de liberação controlada ampliando seu uso para outros fármacos, tanto na área veterinária como na área humana.

7. Conclusões

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados encontrados neste trabalho podem-se fazer as seguintes considerações:

- A matriz de liberação entérica de enrofloxacinina como um novo tipo de formulação farmacêutica na forma de microesfera foi desenvolvido a partir da reação de amidação da quitosana com ácido malônico.
- Os espectros no infravermelho confirmaram a modificação ocorrida na reação de amidação pelo aparecimento de bandas características de amida II e de ácido carboxílico.
- As análises de RMN de ^{13}C tiveram papel relevante na confirmação da estrutura molecular do produto da reação de amidação.
- Os estudos de intumescimento das microesferas da quitosana com ácido malônico, revelaram a formação de um hidrogel com alta capacidade de intumescimento (188%) em água. Os estudos de intumescimento em tampões de pH 1,2; 6,8 e 9,0 similares ao do TGI dos cães revelaram que as microesferas de MLQT se comportaram como hidrogéis de polieletrólitos.

- As análises termogravimétricas da QTS e da MLQT mostraram que a estabilidade térmica da malonilquitosana é diminuída, pela presença de cadeias laterais ramificadas na matriz polimérica.

- As principais vantagens apresentadas pelo sistema de liberação controlada do hidrogel malonilquitosana incluem:
 - (i) facilidade de preparação (especialmente se considerar a modificação química na superfície do biopolímero quitosana ao se introduzir grupos carboxílicos e amida em escala industrial);
 - (ii) aplicabilidade para diferentes tipos de fármacos de baixa massa molar;
 - (iii) a possibilidade de atingir níveis plasmáticos terapêuticos por um período de tempo prolongado como a enrofloxacin microencapsulada que possibilita uma só administração diária comparada ao fármaco livres contidas em comprimidos comerciais cuja administração oral é feita várias vezes ao dia.
 - (iv) Melhora da biodisponibilidade da enrofloxacin nas microesferas de malonilquitosana quando comparados com as formulações farmacêuticas tradicionais.

- O perfil de liberação da enrofloxacin mostra um comportamento não linear com uma cinética rápida na sua fase inicial atingindo um máximo de 45 minutos. Este resultado pode ser relacionado com o alto conteúdo de fármaco sendo ele parcialmente responsável pela rápida liberação. Devido a isto se admite que o mecanismo fosse de difusão independente da solubilidade e do intumescimento.

- O desempenho *in vitro* do sistema de liberação estudado na faixa do trânsito gastrointestinal simulado foi dependente da variabilidade do tempo com o pH e também do grau de intumescimento elevado da matriz polimérica.
- Estudos *in vivo* indicaram que a microencapsulação da enrofloxacin pela matriz de malonilquitosana foi a responsável pela cinética de liberação prolongada e no aumento na concentração do fármaco no sangue.
- Os resultados do presente estudo sugerem que o sistema de liberação desenvolvido pode ser uma formulação potencial para o uso veterinário terapêutico deste fármaco antimicrobiano.

8. Referências Bibliográficas

1. AHN, J.S.; CHOI, H. K.; CHO, C.S. A novel mucoadhesive polymer prepared by template polymerization of acrylic acid in presence of chitosan. **Biomaterials**. v.22, n.9, p. 923-9928, 2001.
2. AIEDEH, K.; TAHA, M.O. Synthesis of chitosan succinate and chitosan phthalate and their evaluation as suggested matrices in orally administered, colon-specific drug delivery systems. **Arch Pharm (Weinheim)**. v.332(3),103-107, 1999.
3. ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. G.; LEBEL, N. A. **Química Orgânica**, 2 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1999.
4. ALBRECHT, R. Development of antibacterial agents of the nalidixic acid type. **Progress in drugs**. Res. 21:11- 104, 1996.
5. ALTREUTHER, P. & KLOSTERMANN, L. Unpublished summary of the Enrofloxacin metabolism and residue information submitted to the FAO experts. Submitted to WHO by Bayer AG, Leverkusen, Germany. 1994.
6. ALTREUTHER, P. Data on chemistry and toxicology of Baytril. **Veterinary Medical Review**. v. 2, p. 87-89. 1987.
7. ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Effects of surfactants on gel Behavior: design implications for drug delivery systems. **Am. J. Drug Del.** v.1, p.77-101, 2003.

8. ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Molecularly imprinted polymers for drug delivery. **J. Chromatogr. B** 804, 231–245, 2004.
9. AMANO, K.; ITO, E. The action of lysozyme on partially deactyled chitin. **Eur. J. Biochem.** v. 85, p. 97-104, 1978.
10. ANADON, A. Drug interactions and clinical outcomes. **Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics.** v. 26 (s1), p. 19-55, 2003.
11. ANADON, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M. R.; DIAZ, M. J.; BRINGAS, P.; MARTINEZ, M. A.; FERNANDEZ-CRUZ, M. L. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. **Am. J. Vet. Res.** v.56, p..501–505, 1995.
12. ASUQUO, A. E.; PIDDOCK, L. J. V. Accumulation and killing kinetics of fifteen quinolones for *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of antimicrobial Chemotherapy.** v.31, p. 865-80, 1993.
13. ATCHE, J. **Desenvolvimento de Novos Sistemas de Microencapsulação de Fármacos a partir de Quitosana para Uso Oral.** 2002. 143f. Tese - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
14. ATCHE, J.; LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V. T.; KIMURA, I. Liberação controlada de eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli-(ácido acrílico). **Polímeros.** vol.10, n.3, p.116-121, 2000.
15. BAEYENS, V.; FELT-BAEYENS, O.; ROUGIER, S.; PHEULPIN, S.; BOISRAME, B. and GURNY, R. Clinical evaluation of bioadhesive ophthalmic drug inserts (BODI®) for the treatment of external ocular infections in dogs. **Journal of Controlled Release.** v.13 p.163-168, 2002.

16. BAKER, R. Controlled release of biologically active agents. **New York, Willey-Interscience**. 279 p, 1987.
17. BAYER, S.A. **Antibioticoterapia** Informe técnico. Produtos Veterinários. São Paulo, 1993.
18. BARREIRO-IGLESIAS, R.; CORONILLA R.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C. Preparation of chitosan beads by simultaneous cross-linking/insolubilisation in basic pH Rheological optimisation and drug loading/release behaviour European. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 24, p.77–84. 2005.
19. BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARMORI, M.L.; MACHADO, A. **Antimicrobianos Consulta Rápida**. 2 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 110-117, 1996.
20. BAUDITZ, R. Enrofloxacin, clinical evolution in several animal species. **Veterinary Pharmacology, Toxicology an Therapy in Food Producing Animals**. University of Veterinary Science, Unipharma, Budapest, p. 21. 1990.
21. BAUDITZ, R. Resultados obtenidos en la comprobación clinica com Baytril em terneros y cerdos. **Not. Méd. Rev.** 2, 122– 129. 1987.
22. BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R.; Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, 2004.
23. BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm**. V.57, 19–34. 2004a.

24. BODMEIER, R.; PAERATAKUL, I. **Biopharmaceutical aspects of multiparticulates**. In: *Multiparticulate oral drug delivery*. Edited by I. Ghebresellassie (New York, Basel and Hong-Kong, Marcel Dekker), p. 143-155, 1994.
25. BOISSEAU, J. Basis for the evaluation of the microbiological risks due to veterinary drug residues in food. **Vet. Microbiol.** v. 35, p.187-192, 1993.
26. BOMHARD, E. & SCHLADT, L. (1991B). BAY Vp 2674. **Study of chronic toxicity and carcinogenicity in rats after administration in feed over 2 years**. Unpublished Report No. 20306 (Study No. T8023436) from the Department of Toxicology, Bayer AG, Wuppertal, Germany. Submitted to WHO by Bayer AG, Leverkusen, Germany (report No. 74230).
27. BOOTHE, D. M. **Veterinary Medicine**. v.9, p. 744-753, 1994.
28. BRAYDEN, D. J. Novel drug delivery strategies in veterinary medicine. **Irish Veterinary Journal**. v. 56 ,(6): June, 2003.
29. BRODY M. T.; LARNER. J.; MINNEMAN.P. K.; NEU. C. H. **Farmacologia Humana**: 2. ed. Guanabara,1999.
30. BRONDSTED, H.; KOPECK, J. **pH-Sensitive hidrogels: Characteristics and potencial in drug delivery**. In:HARLAND, R. S. *Plyelectrolyte gels: Properties and Applications*. 1992, p. 285-303.
31. BROWN, M. E. **Introduction to thermal analysis techniques and application**. Published by Chapman and Hall Ltda., p.19, 1988.
32. BROWN, S.A. Fluoroquinolones in animal health. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.19, p. 1-14, 1996.

33. BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E.; KINNEARY, J.F. **The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, 12th ed. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, p. 608, 1996.
34. CAPUTO, J.F.; BROWN, S.A.; PAPICH, M.G. Pharmacokinetics of premafloxacin following single intravenous, oral solution or oral capsule dose to healthy Beagle dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. v. 20 (1), p. 60-61, 1997.
35. CHAMBERLAIN, P. L. World Health Organization, Geneva 1997. **Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food**. The forty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert, Series 39. Committee on Food Additives (JECFA) ENROFLOXACIN. Center for Veterinary Medicine Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, USA.
36. CHIEN, Y. W. Potential Developments and New Approaches in Oral Controlled-Release Drug Delivery Systems. *Drug Developments and Industrial Pharmacy*. v. 9, n.7, p.1291-1330, 1983.
37. CHIEN, Y.W. **Concepts and system design for the rate controlled drug delivery**. In: *Novel Drug Delivery*. Second edition. Edited by Y.W. Chien. New York: Marcel Dekker, p.1-42. 1992.
38. CHIOU, W. L.; JEONG, H.Y.; CHUNG, S. M.; WU, T. C. Evaluation of using dog as an animal model to study the fraction of oral dose absorbed of 43 drugs in humans. *Pharm. Res*. v.17, 135-140, p. 2000.
39. CHUN, M-K AND CHOI, H-K. Preparation and Characterization of Enrofloxacin/Carbopol Complex in Aqueous Solution. *Arch Pharm Res*. v. 27, n. 6, p. 670-675, 2004.
40. CINQUINA, A. L.; ROBERTI, P.; GIANNETTI, L.; LONGO, F.; DRAISCI, R.; FAGIOLO, A.; BRIZIOLI, N. R. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid

chromatography with diode-array detection optimization and validation. **J. Chromatogr.** v. 987, 221–226. 2003.

41. COLOMBINI, S.; HOSGOOD, G. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. **Vet Dermatol.** v. 11, p.235-239, 2000.
42. COMMITTEE for Veterinary Medicinal Products: **Enrofloxacin (modification for bovine and porcine and poultry)**. Veterinary Medicine Evaluation Unit. EMEA/MRL/388/98-Final. July, p.1-6, 1998.
43. DÂNGELO, José Geraldo; FATTINI, Carlo Américo. **Anatomia humana básica**. São Paulo: Atheneu, 2000. 395 p.
44. DRESSMAN, J.B. Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. **Pharm. Res.** v.3, p.123-131, 1986.
45. DUREJA, H.; TIWARY, A. K.; GUPTA, S. Simulation of skin permeability in chitosan membranes. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 213, p. 193-198, 2001.
46. EDMAN P. **Solid microspheres as drug delivery systems**. En: Sartoreli AC, ed. *Methods of drug delivery*. New York: Pergamon Press. v.23, 1985.
47. ELSHEIKH, H.A.; TAHA, A. A. W.; KHALAFALLAH, A. I.; OSMAN, I.A.M. Disposition kinetics of enrofloxacin (Baytril 5%) in sheep and goats following intravenous and intramuscular injection using a microbiological assay. **Res. Vet. Sci.** 73, 125– 129. 2002.
48. EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. Tradução Giora ALBANESE E JOAQUIM TEODORO DE SOUZA CAMPOS. São Paulo: Edgard Biücher, 1993.

49. FÁVERE, V. T. **Adsorção dos íons Cu (II), Cd(II), Ni(II), Pb(II) e Zn (II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas.** Florianópolis. Tese (Doutorado em Química). Dep. de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.1994.
50. FDA.**The us food and drug administration's central for veterinary medicine.** A proposed framework for evaluating and assuring the human safety of the microbial effects of antimicrobial new animal drugs intended for use in food-producing animals.1999.
51. FDA-CVM. Compliance Policy Guide: Compliance Policy Guidance for FDA Staff and Industry. Chapter 6, Subchapter 600, Sec. 608.400 – **Compounding of Drugs for Use in Animals**, July 2003. Food and Drug Administration, 5600 Fishers Lane, Rockville MD. 2003.
52. FERNANDES, J. B. VIEIRA, P. C.; FERNANDES, M. F. G.S.; FLILHO, R.E.; FRUHAUF, M.; BARANANO, A . G. Triterpenos Ursânicos e Oleanânicos Isolados do caule de Eugenia florida. Revista de Pesquisa e Pós-graduação, **Erechim, RS, Brasil**. v. 01, p. 13-30, 2000.
53. FERRERO, R. C.; BRUNEAU, N.; BARRA, J.; ALFONSO, D. AND DOELKER E. **Hydrophilic cellulose derivatives as drug delivery carriers: influence of substitution type on the properties of compressed matrix tablets.** In: Handbook of pharmaceutical controlled release technology. Wise D.L. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 1-30. 2000
54. FLORENCE, A. T.; JANI, P. U. Novel-drug Formulations-Their Potencial in Modulating Adverse- Effects. **Drugs safety**. v. 19, 233-266, 1994.
55. FLORES, E. B.; MEI, L. H. I., **Microencapsulação da oxitetraciclina no sistema alginato/quitosana.** XI Congresso de iniciação científica da UNICAMP. Faculdade de Engenharia Química – FEQ, UNICAMP. Setembro, 2003.

56. FLORIO, J.C. **Absorção, distribuição, biotransformação e eliminação.** In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. In; Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 25-40, 2002.
57. FOLKMANN, J. How the field of the controlled release technology began, and its central controlled role in the development of a angiogenesis research. **Biomaterials.** v.11, p. 615-18, 1990.
58. FURLAN, L.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M.; LEVY. M. N. **Development of New International Symposium on Natural Polymer and Composites.** v. 3, p. 227, 2000.
59. GETTY, R. SISSON AND GROSSMAN'S. **Anatomia dos Animais Domésticos.** ed. 5. v.2, capítulo 51, p. 1445-1464, 1986.
60. GIGUERE, S.; BÉLANGER, M. Concentration of enrofloxacin in equine tissues after long term oral administration. **Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v.2, p.404, 1997.
61. GOHEL, M. C.; PANCHAL, M. K.; JOGANI, V.V. Novel Mathematical Method for Quantitative Expression of Deviation from the Higuchi Model. **AAPS PharmSciTech**, 2000; 1(4) article 31. . In: Swarbrick J, ed. Novel Drug Delivery System. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.; 1982:465–574.
62. GONÇALVES, V. L.; FÁVERE, V. T; LARANJEIRA, M. C. M.; PEDROSA, R. C. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Ferro a partir de Complexos Orgânicos-Minerais a base de Quitosana a serem aplicados no tratamento de Anemia Ferropriva.** 2005. 133 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
63. GRAHAM, N. B. Br. Poly. J., v.10, p.266, 1978 apud DASH, A; K.; CUDWORTH, II, G. C. **J. Pharmacol. Toxicol. Met**, v. 40, p. 1-12, 1998.

64. GRUET, P.; CAILLARD, C.; BOISRAME, B.; DUFFAUT, D.; GRIMOUD, A.M. and CAMY, G. Use of an oral antiseptic bioadhesive tablet in dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v.12, p.87-91,1995.
65. HALL, W.D. (CHAIR) (1992). **Pathology working group on a 2-year chronic feeding study with a 1-year interim kill in rats on the compound BAY Vp 2674**. Unpublished Pathology Working Group report (Bayer ID 014379) prepared for the Center for Veterinary Medicine, U.S. Food & Drug Administration, Department of Health & Human Services, Rockville, MD, USA. Submitted to WHO by Bayer AG, Leverkusen, Germany. 1992.
66. HARLAND, R. S.; GAZZANIGA, A.; SANGALLI, M .E.; COLOMBO, P.; PEPPAS, N. A. Drug/polymer matrix swelling and dissolution. **Pharm Res**. v.5, p. 488-494. 1988.
67. HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **J. control. Rel**. v. 89, p.151-165, 2003.
68. HIGUCHI, T. Mechanism of sustained action medication, **J. Pharm. Sci**. v.52, p.1145– 1149. 1963.
69. IHRKE, P. J. **Bacterial infections of the skin**. In: Greene, C.E., ed. Infectious Diseases of the dog and cat. 2a edition. Philadelphia: W.B. Saunders, p.541-547. 1998.
70. IHRKE, P. J.; PAPICH, M. G.; DEMANUELLE, T. C. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology medicine. **Veterinary Dermatology**. v. 10 (3) p. 193. 1999.
71. IHRKE, P.J. Experiences with enrofloxacin in small animal dermatology. **Compendium of Continuing Education for the Practising Veterinarian**. v.18, 35-9, 1996.

72. INUKAI, Y.; CHINEN, T.; MATSUDA, T.; KAIDA, Y.; YASUDA, S. Selective Separation of germanium (IV) by, 3-dihydroxypropyl chitosan resin. **Analytical Chimica Acta**. v.18, n. 5, p.679-684, 1998.
73. JUSTI, K. C. ;VASCONCELOS, H. L.;LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. F. **Impregnation and Immobilization of Reactive Blue 2 Dye on Chitosan Microspheres**. In: 1st French-Brazilian Meeting on Polymers. Florianópolis, SC, Brasil, 2005.
74. KAARTINEN, L.; SALONEN, M.; ALLÍ, L.; PYÖRÄLÄ, S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.20, p. 479–482, 1997.
75. KAMIŃSKI, W. & MODRZEJEWSKA. Z. Application of Chitosan Membranes in Separation of Heavy Metal Ions, Separation. **Science and Technology**, 32(16), p. 2659-2668, 1997.
76. KANAUCHI, O.; DEUCHI, K.; IMASATO, Y.; SHIZUKUISHI, M.; KOBAYASHI, E. Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. v.59, p. 786-790,1995.
77. KARARLI, T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. **Biopharm. Drug Dispos**. v.16: 351-380. 1995.
78. KAS, H. S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate systems. **Journal of Microencapsulation**. v.14, n.6, p. 689-711, 1997.
79. KATSUNG, B.G. **Treatment of glaucoma**. In. **Basic and Clinical Pharmacology**. Eighth edition. New York, McGraw-Hill. p.15, 2001.

80. KAZUHIRO, I.; YOSHIHARU, M.; TAKANORI, S.; TSUNEJL, N. Sustained Release Tablets Basead on Chitosan and Carboxymethylcellose Sodium. **Drug Design and Delivery**. v.1, p 297-305, 1987.
81. KAZUHIRO, I.; YOSHIHARU, M.; TAKANORI, S.; TSUNEJL, N. Buoyante Sustained Release Granules Basead on Chitosan. **Drug Design and Delivery**. v.4, p. 55-67, 1989.
82. KHAN, G. M. AND ZHU, J. B. Formulation and mechanistic studies of Ibuprofen release from matrix tablets having carbopol 971P alone and in combination with carbopol 974P. Gomal Univ. **J. Res.**, p. 210-228, 2001a.
83. KHAN, G. M., Controlled Release Oral Dosage Forms: Some Advances in Matrix Type Drug Delivery Systems. **The Sciences**. v.1(5): 350-354, 2001.
84. KHOSLA, R. DAVIS, S.S. The effect of tablet size on the gastric emptying of nondisintegrating tablets. **Int. J. Pharm**, v.62, 1990.
85. KIM, E. H.; CHOI, H. K. Preparation of various solid-lipid beads for drug delivery of enrofloxacin. **Drug Delivery**. Nov-Dec:11(6):365-70. 2004.
86. KIMURA, I. Y.; GONÇALVEZ, J. A. C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M.C. M. FÁVERE, V. T. Efeito do pH e tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana- Polímeros: **Ciência e Tecnologia**. n. 3, 51-57, 1999.
87. KLAUSNER, E. A.; LAVY, E.; FRIEDMAN, M.; HOFFMAN, A. Expandable gastroretentive dosage forms. **Journal of Controlled Release**. v. 90, p.143-162, 2003.

88. KO, J. A.; PARK, H. J.; PARK, Y. S.; HWANG, S. J.; PARK, J. B. Chitosan microparticle preparation for controlled drug release by response surface methodology. **J. Microencapsul.** v. 20, 791–797, 2003.
89. KOJIMA, K. OKAMOTO, Y.; MIYATAKE, K.; KITAMURA, Y.; MINAMI, S. Collagen typing of granulation tissue induced by chitin and chitosan, Carbohydr. **Polymers**, v. 37, p. 109, 1998.
90. KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A.C. Dicionário Terapêutico Guanabara. 11. ed. Guanabara Koogan, 2004. 616 p.
91. KOSEVA, N.; MANOLOVA, N.; MARKOVA, N.; RADOUCHEVA, T.; RASHKOV, I. Chitosan gel beads as drug carriers. **Polymers Bull.** v. 43, p. 101-107, 1999.
92. KOST, J.; LANGER, R. Responsive polymeric delivery systems. **Advance Drug Delivery Reviews.** v. 6, p. 19-50, 1991.
93. KOWALSKI, R. L.; JASTY, V.; BARE, J. J.; HARTNAGEL, R. E. (1985). **Safety evaluation of BAY Vp 2674: Subchronic (13 week) feeding study in the rat.** Unpublished Report No. 63 (No. 73194) from Toxicology Department, Central Research Services, Miles Laboratories, Elkhart, IN. Submitted to WHO by Bayer AG, Leverkusen, Germany (report No. 73194).
94. KUMBAR, S.G.; KULKARNI, A. R.; AMINABHAVI, T. M. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. **J. Microencapsul.** v.19, p.173–180, 2002.
95. KÜNG, K.; RIOND, J. L.; WANNER, M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v.16, p.462-468, 1993.

96. LANGER, J.; PEPPAS, N. A. J. *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* V.23, p. 61, 1983.
97. LANGER, R. *New Methods of Drugs Delivery. American association for advance.* v.249, p. 1527-1533, 1990.
98. LANGSTON, V. C.; SEDRISH, S.; BOOTHE, D. M. Disposition of single-dose oral enrofloxacin in the horse. **Journal Veterinary and Therapeutics.** v.19: 316-319, 1996.
99. LÉBOUC, F.; DEZ, I.; MADEC, P. J. NMR study of the phosphonomethylation reaction on chitosan. **Polymer.** v.46, p.319–325, 2005.
100. LEE, P.I. AND KIM, C.J. (1991) Probing the mechanisms of drug release from hydrogels, **J. Control. Release.** v. 16, p. 229-236. 1991.
101. LESER, K.H. (1993). BAY Vp 2674. **Chronic toxicity study in rats with administration in feed over a period of 2 years.** (Supplementary study to determine the dose tolerated without damage). Unpublished Report No. 22659 (Study No. T6039950) from the Department of Toxicology, Bayer AG, Wuppertal, Germany. Submitted to WHO by Bayer AG, Leverkusen, Germany (report No. 74472).
102. LI, Y. P.; Machida, Y.; Sannan, T.; Nagai, T. Preparation of chitosan microspheres containing fluorouracil using the 'dry-in-oil' method and its release characteristics. *S. T. P. Pharma Sciences*, v.1, p. 363-368, 1991.
103. LIN, J, H. Species similarities and differences in pharmacokinetics. **Drug. Metab. Disp.** V. 23, p. 1008-1021, 1995.
104. LINNEHAN, R.M.; ULRICH, R.W.; RIDGWAY, S. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** v.22, p.170-173, 1999.

105. LIU, Y.; HONG L.; WAKAMATSU K.; ITO, S.; ADHYARU, B.; CHENG C.Y.; BOWERS C. R.; AND SIMON, J. D. Comparison of Structural and Chemical Properties of Black and Red Human Hair Melanosomes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 135–144, 2005.
106. LIZONDO, M.; PONS, M.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physicochemical properties of enrofloxacin. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v.15, p.1845-1849, 1997.
107. LONGER, M. A.; CHENG H. S.; ROBINSON, J. R. Mucoadhesive materials for CR dosage forms. **J. Pharm Sci.**, 74: 406-410, 1985.
108. LONGHINOTTI, E.; FURLAN, L.; LARANJEIRA. M.C. M.; FÁVERE. V. T. Adsorção de azul de metileno e croconato amarelo pelo biopolímero quitina. **Química Nova**. v. 19, n. 3, p. 221-224, 1996.
109. LOWMAN, A. M.; PEPPAS, N.A. Hydrogels. In: Encyclopaedia of Controlled Drug Delivery. (Mathiowitz, E., ed.), John Wiley & Sons BAYER, S.A. **Antibioticoterapia**. p. 397–418, 1999.
110. MANDELL, G.L.; & SANDE, M.A. **Antimicrobial Agents in Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**, 8th edition, Gilman, A.G.; Rall, T.W.; Nies, S. A., and Taylor, P. (eds.). Pergamon Press, Inc., Maxwell House, Fairview Park, Elmsford, New York 10523, p. 1058,1990.
111. MARIK, F.; CODE, C.H. Control of the interdigestive myoelectric activity in dogs by the vagus nerves and pentagastrin. **Gastroenterology**. v. 69, p.387-95, 1975.
112. MARTINEZ, L. M .R.; DIAS, M.J.; BRINGAS, P. Bioavailability of enrofloxacin after subcutaneous administration in cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v.20 (Suppl. 1), 23, 1997.

113. MATHUR, N, K.; NARANG, C.K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**. v.6, p.938-942, 1990.
114. MCKELLAR, Q. A. Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. **British Medical Journal**. 317: 610-611,1998.
115. MEINEN, J. B.; ROSIN, E.; MCCLURE, J. T. Pharmacokinetic of enrofloxacin in clinically normal dogs and mice with Escherichia coli and staphylococcal infections. **American Journal of Veterinary Research**. v. 56, p.1219-24. 1995.
116. MEUNIER, L. D.; KISSINGER, J.T.; MARCELLO, J. et al. A chronic access port model for direct delivery of drugs into the intestine of conscious dogs. **Lab. Anim. Sci**. v. 43p. 466-470, 1993.
117. MUIJSERS, R. B.; WAGSTAFF, A. J. Transdermal fentanyl: an updated review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in chronic cancer pain control. **Drugs**. v. 61, p.2289-2307, 2001.
118. MULLIGAN, L. T. **Enrofloxacin**. Center for Veterinary Medicine WHO/FOOD Additives series 34. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, USA. 1997.
119. MUNDAY, D. L.; COX, P. J. Compressed xanthan and karaya gum matrices: hydration, erosion and drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.** V.203, p.179-192, 2000.
120. NAKAMURA, F.; ONISCHI, H.; MACHIDA, Y. et al Lysozyme catalysed degradation properties of conjugates between chitosans having some deacetylation degrees and methotrexate. *Yakuzaigaku*, v. 52, p 59-67,1992.

121. NASCIMENTO, A. **Estudo de Liberação Controlada de Ácido Acetilsalicílico em Matrizes de Quitosana Modificada com Poli(ácido acrílico) e Anidrido Malêico**. 2005. 90 f. Tese (Doutorado em Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
122. NATIONAL Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**; Proposed Standard, Document M31-P, 1994.
123. NEER, T.M. Clinical pharmacologic features of fluoroquinolone antimicrobial drugs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.193 (5), p.577-580, 1988.
124. NICO, S. Life after death for empty shells, **New Sci**. 129 p.46–48, 1991.
125. NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **Int. J. of. Food Microbiol**, v. 74, p. 65-72, 2002.
126. OLIVEIRA, FILHO, N. A. **Sistemas de micro/nanoencapsulamento de fármacos**. Disponível em <<http://www.farmabrasil.hpg.ig.com.br/fisqui9.htm> > Acesso em julho de 2003.
127. OTERO, J. L.; MESTORINO, N.; ERRECALDE J. O. Enrofloxacin: Una fluoroquinolona de uso exclusive en veterinaria. PART I: **Analecta Veterinaria**. v. 21,1:31-41, 2001a.
128. OTERO, J. L.; MESTORINO, N.; ERRECALDE J. O. Enrofloxacin: Una fluoroquinolona de uso exclusive en veterinaria. PART II: Farmacocinética Y Toxicidad. **Analecta Veterinaria**. v. 21, 1 : 42-49, 2001b.

129. PADETEC – **Parque de Desenvolvimento Tecnológico – Universidade Federal do Ceará**. Brasil. Disponível em <www.Padetec.ufsc.br>. Acesso em 07 de dezembro de 2004.
130. PAPICH, M. G.; VAN CAMP, S. D.; COLE, J. A.; WHITACRE, M. D. Pharmacokinetics and endometrial tissue concentrations of enrofloxacin and the metabolite ciprofloxacin after i.v. administration of enrofloxacin to mares. **Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics**. v. 25 (5), p.343-350, 2002.
131. PARADIS, M.; LEMAY, S.; SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; WELLINGTON, J.; PANICH, R. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of canine bacterial pyoderma. **Veterinary Dermatology**. v.1 p.123- 7,1990.
132. PARIZE, A. L. **Microesferas de quitosana contendo corante urucum preparadas pelas técnicas de coacervação, impregnação e spray drying: estudo de liberação controlada e adsorção**, 2005, Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de QUÍMICA UFSC Florianópolis.
133. PAVANETTO, F.; GENTA, I.; GIUNCHEDI, P.; CONTI, B. Evaluation of spray-drying as method for polylactide and poly(lactide-co-glycolide) microspheres preparation. **J. Microencapsulation**. v.10, p. 487-497, 1993.
134. PENICHE, C.; ARGUELLES-MONAL, W.; PENICHE, H.; ACOSTA, N. Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. **Macromol. Biosci**. v.3, p. 511–520, 2003.
135. PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and no-fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helvetica**. v. 60, p. 110-111,1985.
136. PEPPAS, N. A.; BETTINI, R.; CATELLANI, P. L.; SANTI, P.; MASSIMO, G.; AND COLOMBO. P. Translocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate. **Journal of Controlled Release**. v.70, 23 February, p. 383-391, 2001.

137. PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **Int J Pharm.** v. 57, p. 169-172,1989.
138. PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 50, 27–46, 2000.
139. PITTLER, M. H.; ABBOT, N. C.; HARKNESS, E. F.; ERNST, E. Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. **Eur J Clin Nutr.** v.5, p. 379-381,1999.
140. POLYMAR IND.COM. IMO. E EXP. LTDA – Fortaleza – Ceará. Disponível em< www.polymar.com.br/quiotosana/quit-apli.htm> Acesso em 17 de dezembro de 2004.
141. POSYNIAK, A.; ZMUDZKI, J. SEMENIUK, S., et al., **Biomedical Chromatografic.** v.13, p. 279, 1999.
142. QIU, Y., N.; CHIDAMBARAM; FLOOD, K. Design and evaluation of layered diffusion matrices for zero-order sustain release. **J. Contr. Rel.** v.51 p.123-130,1998.
143. RANG, P.H.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. **Farmacologia.** 4. ed; Guanabara-Koogan S. A. Rio e Janeiro, p. 703, 2001.
144. RAO, B. S.; MURTHY, K. V. R. Prepararon and evaluation of chitosan matrices cross - linked by formaldehyde vapors. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 26, n.10. p.1085-1090, 2000.

145. RATHKE, T. D.; HUDSON, S. M. Review of Chitin and Chitosan as Fiber and Film Formers. J.M.S.- Ver. **Macromol. Chem. Phys. C** 34, n.3, p. 375-437, 1994.
146. RAYMOND, L.; FREDRICH, G. H.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid state NMR. **Carbohydrate Research**. v. 246, p. 331-336, 1993.
147. RÉ, M.I., '**Microencapsulation by spray drying**' in **Drying Technology**, vol. 16, n. 6, 1195-1236, Marcel Dekker Inc. 1998.
148. RÉ, M.I., **Ciência Hoje**. Microencapsulação de produtos inteligentes. v.27, n.162, p. 25-27, julho, 2000.
149. RILEY, C. M.; KINDBERG, C. G.; STELLA, V. J. IN: FERNANDES, P. B. ed 2. **Quinolones**. Prous Science Publishers. Barcelona, 1989.
150. RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release: II Fick and anomalous release from swellable devices. **J. Controlled. Release**. v.5, p. 37-42, 1987.
151. RIVIERE, J. E.; PAPICH, M.G. Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 50, p. 175-203, 2001.
152. RODRIGUÈZ, M.; VILA-JATO, J. L.; TORRES, D. Design of new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region. **J. Contr. Rel.** v. 55, p.67-77, 1998.
153. RORRER, G. L.; HSIEN, T.; WAY, J. D. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from waste water. **Ind. Eng. Chem. Res.** v.32, p.2170-2178, 1993.

154. ROTHEN-WEINHOLD, A.; GURNY, R.; DAHN, M. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. **Pharmaceutical Science and Technology Today**. v. 3, 222-231, 2000.
155. ROY, D. S.; ROHERA, B. D. Comparative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and HPC and study of drug release from their matrices. **Eur J Pharm Sci**. v.16,p.193-199, 2002.
156. RYAN, J. L.; DIJKSTRA, J. **Journal International Patent Application**. PCT/US90/07614, 1991.
157. SABNIS, S. Factors influencing the bioavailability of peroral formulations of drugs for dogs. **Vet. Res. Com**. v. 23, p. 425-447, 1999.
158. SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R. et al. Characterization of commercial chitosan from different suppliers. **Polímeros**. v.13, no.4, p. 242-249, 2003.
159. SARNA, S.K. Cyclic motor activity; migrating motor complex. **Gastroenterology**. v. 89, p.894-913,1985.
160. SCHEER, M. Concentration of active ingredient in the serum and tissue after oral parenteral administration of Baytril. **Veterinary Medicine Review**. v.2, p.104-118, 1987.
161. SCHEER, M. Studies on the antibacterial activity of Baytril. **Veterinary Medicine Review**. v.2, p. 90-99, 1987a.
162. SCHMIDT, M. (1985). **Acute toxicity of BAY Vp 2674 in the rat, mouse, rabbit and dog**. Unpublished Report No. 13223(E) from Institute of Toxicology, Bayer AG, Wuppertal, Germany. Submitted to WHO by Bayer AG, Leverkusen, Germany (report No. 73075).

163. SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Kirk's Small Animal Dermatology**, 6th ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1995: 970-87. 2001.
164. SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. **'Encapsulation of food ingredients' in Critical reviews in food science and nutrition**. v.33 (6), p.501-547, 1993.
165. SHAIKH, N. A.; ABIDI, S. E.; BLOCK, L.H. Evaluation of ethylcellulose as a matrix for prolonged release formulation Water-soluble drugs: Acetaminophen and Theophylline. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v.13, p.1345-1369, 1987b.
166. SHAIKH, N. A.; ABIDI, S. E.; BLOCK, L.H. Evaluation of ethylcellulose as a matrix for prolonged release formulation Water-soluble drugs: Acetaminophen and Theophylline. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v.13, p.1345-1369, 1987.
167. SHARGEL, L. YU, A. **Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**, 4th edition, Chapter 2, 1999.
168. SIEPMANN, J., PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems basead on hydrypropy mehylcellulose. **Advance Drug Delivery Review**. v.48, p.139-157, 2001.
169. SILVERSTEIN, R, M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora Guanabara-Koogan S. A . ed. 5a . 1994.
170. SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.;WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R. R.;KUMRIA, K. BANSAL.; DHAWAN S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **Int. J. Pharm.** v. 274 , p.1 –33, 2004.
171. SPINELLI, V. A.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Preparation and Characterization of Quaternary Chitosan Salt: Adsorption Equilibrium

of Chromium (VI) ion. *Reactive and Functional Polymer. Holanda.* v. 61, n. 3, p. 347-352, 2004.

172. SPRENG, M.; DELEFORGE, J.; THOMAS, V.; BOISRAME, B.; DRUGEON, H. Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v.18: 284-289, 1995.
173. STEGEMANN, M.; HEUKAMP, U.; SCHEER, M.; KREBBER, R. **Kinetics of antibacterial activity after administration of susceptibility of field isolates.** Compedium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. v.18, 30-34. 1996.
174. SU, C.H.; SUN C.S.; JUAN, S.W.; HU, C.H.; KE, W.T.; SHEU, M.T. Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes, **Biomaterials.** v.18 : 1169, 1997.
175. SUMANO, L. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. **Veterinaria México.** v.24(2), p. 83-92, 1993.
176. SZURSZEWSKI, J.H. A migrating electric complex of the canine small intestine. **Am. J . Physiol.** v.217, p.1757-63, 1969.
177. TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos. Editora Atheneu. - 2a ed.1996.
178. THACHARODI, D.; RAO, K. P. Rate-controlling biopolymer membranes transdermal delivery system for nifedine: development and in vitro evaluations. **Biomaterials.** v.17, n.13, p.1307-11, 1996.
179. THNOO, B. C.; SUNNY, M. C.; JAYAKRISHNAN, A. Cross-linked Chitosan Microspheres preparation and Evalution as Matrix for the

- Controlled Release of Pharmaceuticals. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 44, p. 283, 1991.
180. USAMI, Y., OKAMOTO, Y., MINAMI, S., MATSUHASHI, A., KUMAZAWA, N. H., TANIOKA, S., SHIGEMASA, Y. Chitin and chitosan induce migration of bovine polymer-phonuclear cells. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 56, p. 761, 1994.
181. VALERO, J.; EGEA, M.A.; ALSINA, M.A.; GARCÍA, M. L. **Sistemas poliméricos de administración de fármacos**. (sept-oct) p.93-100, 1985.
182. VALGAS, S.; LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T.; CURI, R. C. Malonylchitosan Microspheres as a Matrix for Oral Enrofloxacin Delivery. **Macromolecular Symposia, Weinheim**, 2005.
183. VANCUTSEM, P. M.; BABISH, J. G.; SCHWARK, W. S. The Fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. **Cornell Veterinarian**. v.80: 173-186, 1990.
184. VARMA, M.V. S.; KAUSHAL, A.M.; GARG, A.; GARG, S. Factors Affecting Mechanism and Kinetic of drug Release from Matrix-Based Oral Controlled Drug Delivery Systems. **American Journal of Drug Delivery**, v.2, n. 1, p. 43-57, 2004.
185. WATTS, J. L. (Committee Chair). **National Committee for Clinical Laboratory Standards (Performance standards) for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**; approved standard. 19 (No 11) M31-A. 1999.
186. WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; SANCHEZ, M.S.; YANCEY, R. J. In vitro activity of premafloxacin, a new extended spectrum fluoroquinolone, against pathogens of veterinary importance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, p.1190-1192, 1997.

187. WELSLEY, T. **Advances in the release veterinary of the drug**. All the text and representation in this © L P M Lloyd-Evans & BioBridge 2000-2002.
188. WILEY, J. **The Merck Manual of Diagnosis and Therapy**. 17^a Ed. Online. www.msdbrazil.com/content/patients/manual_merck. Acesso em 10 de agosto de 2005.
189. WISE, R. Comparative penetration of selected fluoroquinolones into respiratory tract fluids and tissues. **American Journal of Medicine**. v.91 (s. 6A) p.67-70, 1991.
190. WOLFSON, J.S.; D.C. & HOOPER, Eur. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**v.10, 267-274, 1991.
191. WOOD-MCKINSEY Report (2001). Communicated by Foster, T.P. Principles of veterinary release dosage forms. AAPS Workshop on Collaboration in the Research and Development of Veterinary Pharmaceuticals, St Charles, I L . May 6-8, 2002.
192. XU, G. J.; SUNADA, H. Influence of Formulation changes on drug release kinetics. **Chem. Pharm. Bull.** v. 43: 483-487, 1995.
193. YOUNGGIL, K. **Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists**. Kluwer academic/Plenum Publishers. New York, 2001.

