

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Curso de Pós-Graduação**

**MICROENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DO
FÁRMACO RIFAMPICINA UTILIZANDO O SISTEMA
POLIMÉRICO QUITOSANA-PVA.**

**Dissertação submetida a Universidade Federal de Santa Catarina para a
obtenção do grau de Mestre em Química**

BLENDA DE CAMPOS RODRIGUES

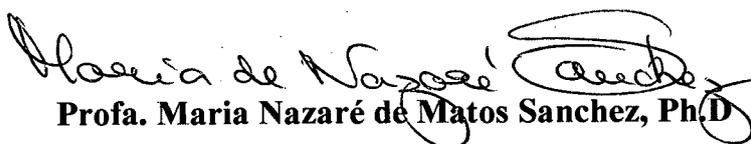
Orientadora: Profa. Maria de Nazaré de Matos Sanchez, Ph.D

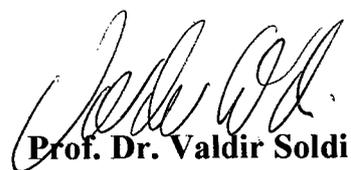
**Florianópolis, Santa Catarina – Brasil
Fevereiro de 1999**

**MICROENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DO
FÁRMACO RIFAMPICINA UTILIZANDO O SISTEMA POLIMÉRICO
QUITOSANA-PVA.**

BLENDA DE CAMPOS RODRIGUES

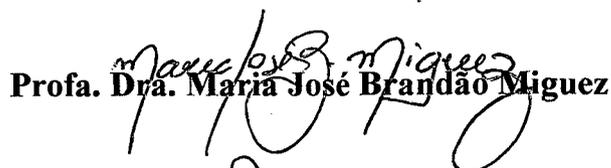
**Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pela orientadora e
membros da banca examinadora**


Prof. Maria Nazaré de Matos Sanchez, Ph.D
Orientadora

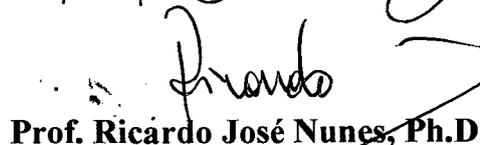

Prof. Dr. Valdir Soldi
(Coordenador do curso de Pós-Graduação)

Banca Examinadora


Prof. Maria Nazaré de Matos Sanchez, Ph.D


Prof. Dra. Maria José Brandão Miguez


Prof. Mauro César M. Laranjeira, Ph.D


Prof. Ricardo José Nunes, Ph.D

*O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.
O que for o teu desejo, assim será tua vontade.
O que for a tua vontade, assim serão teus atos.
O que forem teus atos, assim será o teu destino.*

B.V IV

Dedico este trabalho ao meu pai e à minha mãe
que é a minha melhor e grande amiga...

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos as seguintes pessoas:

Aos meus pais, Dalceu e Elisabete Rodrigues, que enchem a minha vida de amor e fé. Por nunca me deixar desanimar nos momentos difíceis e de incertezas da minha vida. Não poderei nunca expressar em palavras o tamanho do meu amor por vocês. Obrigada por me amar, por me apoiar e também por me criticar. Enfim, sou o que vocês me ensinaram e ensinam ao longo da minha vida. Obrigada pai, obrigada mãe.

Ao meu irmão, Luciano , por ser a pessoa maravilhosa que é e por ter tanta força e determinação nos seus objetivos, não desanimando nunca. Meu eterno amor.

A Maria de Nazaré de M. Sanchez que para mim é mais que uma professora. E é a grande responsável por hoje eu estar trilhando este caminho. Meu amor para você Nazaré.

A Maria José B. Miguez que tantas vezes faz o papel de mãe, amiga e professora. Que nossa amizade seja eterna. Minha dedicação e meu amor para você e também para sua família que muitas vezes tomo emprestada quanto sinto falta da minha casa.

Ao professor Ricardo J. Nunes e ao professor Mauro C. M. Laranjeira.

Aos professores e alunos do grupo QUITTECH por anos de trabalho.

Ao Departamento de Pós-Graduação de Química da UFSC, à Graça e ao Jadir.

Aos colegas de Curso de Pós-Graduação.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE EQUAÇÕES.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
RESUMO.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HIV E TUBERCULOSE.....	1
1.1.1. Histórico.....	1
1.1.2. Diagnóstico clínico e laboratorial.....	3
1.1.3. Transmissão.....	4
1.1.4. Tuberculose e Aids.....	5
1.1.5. Resistência do <i>M. tuberculosis</i> a múltiplas drogas.....	6
1.1.6. Quimioterapia antituberculose.....	7
1.1.7. Esquemas de tratamento.....	9
1.2. RIFAMPICINA	10
1.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	11
<i>Pró-fármacos.....</i>	15
<i>Microcápsulas e nanocápsulas.....</i>	15
<i>Vesículas – lipossomas e niossomas.....</i>	16
<i>Sistemas transdérmicos.....</i>	16
<i>Complexos de inclusão de ciclodextrinas.....</i>	17

<i>Bioadesivos e mucoadesivos</i>	17
<i>Formas farmacêuticas para liberação colônica</i>	17
<i>Sistemas flutuantes para liberação gástrica de fármacos</i>	18
1.4. PROCESSOS DE LIBERAÇÃO.....	18
1.5. POLÍMEROS.....	19
1.5.1. Quitina e quitosana	19
<i>Por que usar quitosana</i>	20
<i>Áreas de uso da quitosana</i>	21
<i>Usos biomédicos para quitosana</i>	21
<i>Formas físicas da quitosana e suas possíveis aplicações</i>	23
<i>Propriedades do grupamento da quitosana</i>	24
1.5.2. PVA	24
1.6. CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	24
1.6.1. pH	25
1.6.2. Esvaziamento gástrico	26
1.6.3. Atividade enzimática	27
1.7. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS MICROENCAPSULADOS.....	28
1.8. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS A PARTIR DE OUTROS SISTEMAS DE APRISIONAMENTO.....	31
1.9. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS A PARTIR DE MATRIZ DE QUITOSANA.....	2.3
1.10. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS A PARTIR DE QUITOSANA-PVA E PVA.....	36
1.11. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE RIFAMPICINA	38
1.12. EFICÁCIA DO TRATAMENTO DE TUBERCULOSE COM A	

	RIFAMPICINA.....	39
2.	OBJETIVOS.....	39
	2.1. OBJETIVO GERAL.....	39
	2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	39
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
	3.1. MATERIAIS E REAGENTES.....	40
	3.1.1. Equipamentos.....	40
	3.1.2. Reagentes.....	40
	3.1.3. Soluções.....	41
	<i>Solução coagulante.....</i>	<i>41</i>
	<i>Soluções utilizadas na liberação da rifampicina</i>	<i>41</i>
	<i>Solução de rifampicina</i>	<i>41</i>
	3.2. MÉTODO.....	42
	3.2.1. Purificação da quitosana.....	42
	3.2.2. Determinação do grau de desacetilação.....	42
	3.2.3. Preparação da blenda quitosana-pva.....	43
	3.2.4. Preparação das microcápsulas.....	45
	3.2.5. Microscopia eletrônica de varredura.....	46
	3.2.6. Microencapsulação.....	46
	3.2.6.1. Processo de microencapsulação da rifampicina.....	46
	3.2.6.2. Cálculo da rifampicina microencapsulada.....	46
	3.2.6.3 Variação da massa da rifampicina incorporada à blenda.....	47
	3.2.7. Liberação da rifampicina	47
	3.2.7.1. Controle da liberação da rifampicina	47

3.2.7.2. Cálculo da porcentagem da rifampicina liberada.....	48
3.2.8. Rifampicina	49
3.2.8.1. Influência do pH na absorbância da rifampicina	49
3.2.8.2. Determinação do coeficiente de absorção molar (ϵ).....	49
3.2.8.3 Reversibilidade da absorbância da rifampicina	50
3.2.9. Influência da espécie salina na liberação da rifampicina	50
3.2.10. Estudo da reusabilidade das cápsulas.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. RIFAMPICINA	51
4.1.1. Influência do pH na absorbância da rifampicina	51
4.1.2. Determinação do coeficiente de absorção molar.....	53
4.1.3. Reversibilidade do coeficiente de absorção molar.....	54
4.2. EFEITO DA VARIAÇÃO DA QUITOSANA NO PROCESSO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DA RIFAMPICINA	55
4.3. EFEITO DA VARIAÇÃO DO PVA NO PROCESSO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DA RIFAMPICINA.....	57
4.4. ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÁPSULAS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	60
4.5. LIBERAÇÃO CONTROLADA DA RIFAMPICINA EM SORO FISIOLÓGICO.....	65
4.6. CONTROLE DA LIBERAÇÃO DA RIFAMPICINA EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH.....	66
4.7. VARIAÇÃO DA MASSA DE RIFAMPICINA INCORPORADA À BLENDAS	68
4.8. INFLUÊNCIA DA ESPÉCIE SALINA NA LIBERAÇÃO DA RIFAMPICINA.....	70

4.9. ESTUDO DA REUSABILIDADE DAS CÁPSULAS.....	71
5. CONCLUSÃO.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural da rifampicina.....	10
Figura 2.	Fórmula estrutural da quitosana.....	19
Figura 3.	Sistema de produção de blenda polimérica.....	43
Figura 4.	Sistema utilizado na produção de cápsulas.....	45
Figura 5.	Sistema utilizado para o acompanhamento da liberação da rifampicina.....	48
Figura 6.	Absorbância da solução de rifampicina versus pH.....	52
Figura 7.	Determinação do ϵ . Absorbância versus concentração.....	53
Figura 8.	Reversibilidade do coeficiente de absorção molar em função do pH.....	54
Figura 9.	Cinética de liberação de rifampicina microencapsulada com blenda 90% de QTS.....	56
Figura 10.	Porcentagem de liberação da rifampicina em Na ₂ SO ₄ 10 % p/v em função da composição de QTS na blenda a pH 6,9.....	57
Figura 11.	Cinética de liberação de rifampicina na blenda 90 % de PVA.....	58
Figura 12.	Porcentagem de liberação da rifampicina em Na ₂ SO ₄ 10 % p/v em função da composição de PVA na blenda a pH 6,9.....	59
Figura 13.	MEV de uma microcápsula vazia e congelada antes do corte.....	60
Figura 14.	MEV de uma microcápsula seccionada sem rifampicina....	61
Figura 15.	MEV de uma microcápsula seccionada sem rifampicina microencapsulada.....	62
Figura 16.	MEV da superfície de uma microcápsula com rifampicina microencapsulada.....	62
Figura 17.	MEV da parede interna de uma microcápsula com	

	rifampicina microencapsulada.....	63
Figura 18.	MEV da parede de uma microcápsula com rifampicina.....	64
Figura 19.	Liberação da rifampicina em soro fisiológico.....	65
Figura 20.	Rifampicina liberada em função do pH.....	67
Figura 21.	Cinética de liberação de rifampicina com massa variada de rifampicina incorporada à blenda.....	69
Figura 22.	Porcentagem de rifampicina liberada variando-se a massa do fármaco incorporado a blenda polimérica.....	69
Figura 23.	Cinéticas de liberação da rifampicina em soluções de diferentes espécies salinas.....	71
Figura 24.	Reuso da microcápsula com blenda 75 % de QTS.....	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Varição da massa de quitosana na blenda QTS-PVA.....	44
Tabela 2.	Varição da massa de QTS na blenda QTS-PVA.....	45
Tabela 3.	Absorbância da solução de rifampicina liberada em função da variação da massa de rifampicina.....	52
Tabela 4.	Porcentagem de rifampicina liberada em função da variação da massa de QTS.....	56
Tabela 5.	Porcentagem de rifampicina liberada em função da variação da massa de rifampicina.....	59
Tabela 6.	Absorbância da solução de liberação em função do tempo..	66
Tabela 7.	Porcentagem de liberação em função do pH.....	68

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1.	Equação de Broussignac.....	42
Equação 2.	Equação da lei de Lambert-Beer.....	47
Equação 3.	Equação do cálculo da massa de rifampicina microencapsulada.....	47
Equação 4.	Equação do cálculo da porcentagem de rifampicina liberada.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis
RFP	Rifampicina
INH	Isoniazida
ETB	Etambutol
QTS	Quitosana
PVA	Álcool polivinílico
HLB	Balanço hidrófilo/lipófilo
LCE	Líquido céfalo raquidiano
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

ABSTRACT

The treatment of human infection caused by micobacteria has received special attention due to a great incidence of tuberculosis and its association with the AIDS. The required drugs to the quimiotherapy of tuberculosis have been developed microbiana resistance becoming a special therapeutic problem.

In order to minimize microbiana resistance new formulation have been developed to the drugs and the microencapsulation is a process which the capsules are able to provide the drug release to the surrounding media.

The rifampicin was microencapsulated in the polymeric system QTS-PVA. The mass of QTS and PVA were varied in the blend. The increasing of the amount of QTS increased the release process of RFP. The mass of PVA has a little influence in the process. The pH was varied from 6.9 to 2.0 and at the pH's 2.0 and 3.0 ocurred a smaller release of RFP. The influence of the saline solution was studied in three solutions of the same ionic strenght. The microencapsulation was observed by MEV and the drug was diffused in the wall of the microcapsules

RESUMO

O tratamento de infecções humanas causadas por micobactérias tem recebido especial atenção devido a acentuada elevação da incidência da tuberculose e de sua associação com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), onde as drogas empregadas na quimioterapia da tuberculose tem desenvolvido resistência microbiana constituindo problemas terapêuticos especiais, dentre eles, ao tratamento clássico de longa duração da doença.

Assim, uma maneira de minimizar a resistência microbiana é o desenvolvimento de novas formulações para as drogas já existentes. E a microencapsulação é um processo que origina microcápsulas capazes de liberar o material microencapsulado atuando, deste modo, como uma nova formulação para fármacos.

A microencapsulação da rifampicina foi realizada com o sistema polimérico quitosana-PVA. As variáveis estudadas foram as quantidades de QTS e PVA na blenda polimérica onde observou-se que uma maior massa de quitosana na blenda polimérica aumenta a liberação do fármaco enquanto que uma massa maior de PVA não altera significamente a liberação. Variou-se a massa de fármaco adicionado na blenda onde ocorreu um aumento da liberação de rifampicina em função do aumento da massa de fármaco, o pH da solução onde ocorria a cinética de liberação foi variado e houve uma menor liberação de rifampicina em pH's 2,0 e 3,0 ocorrendo uma maior liberação a partir do pH 4,0 e estudou-se também a influência da espécie salina na liberação da rifampicina onde não foi observado uma diferença significativa da liberação em função da espécie salina usada. A microencapsulação foi feita via o processo de separação de fase coacervação salina salting-out

A microencapsulação foi observada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) onde verificamos a presença do fármaco nas paredes da microcápsula. A rifampicina é de baixo peso molecular e não fica retida no núcleo da cápsula e sim na sua parede, sofrendo um processo de difusão ao longo da parede.

1. INTRODUÇÃO

1.1. TUBERCULOSE

1.1.1. Histórico

A tuberculose é uma das mais antigas doenças transmissíveis, afetando o homem desde sua pré-história. Existem registros arqueológicos de sua presença entre diversos povos da antigüidade. Em múmias egípcias, por exemplo, encontram-se sinais de lesões que sugerem a ocorrência, naquela civilização, da tuberculose na coluna espinhal conhecida como *mal de Pott*¹.

No passado alguns autores sugeriram a hipótese que a tuberculose alastrou-se no continente americano antes da chegada do europeu, mas há consenso em torno da idéia de que a doença ingressou nas américas com os colonizadores europeus, matando dezenas de milhares de indivíduos nas populações indígenas virgens de contato com o *Mycobacterium tuberculosis*, o agente causal da doença. Acredita-se que o padre Manuel da Nóbrega, que chegou ao Brasil em 1549, tenha sido o primeiro morador ilustre do país a morrer de tuberculose¹.

Por se tratar de uma doença que na sua forma pulmonar é transmitida principalmente pessoa a pessoa, a tuberculose encontrou condições para se disseminar nas grandes cidades européias a partir do grande ciclo de urbanização populacional que se verificou com a revolução industrial na Europa do século XIX. Assim como na Europa, foi a partir do século XIX que a tuberculose se tornou mais comum nas maiores cidades brasileiras, adquirindo a feição de *peste romântica* que a acompanhou no decorrer daquele século. Diversas personalidades ilustres de nossa história morreram de tuberculose em sua juventude no século XIX: foi o caso dos poetas Castro Alves e Álvares de Azevedo, e do ex-imperador D. Pedro I, que morreu da doença aos 36 anos, quando já vivia em território europeu^{225 1}.

Sem dispor de um tratamento eficiente, a tuberculose foi responsável no país por um elevado índice de mortalidade no século XIX e primeira metade do século XX. Ainda desconhecido seu agente etiológico, os médicos e cirurgiões da primeira metade do século XIX creditavam à tuberculose características e hábitos pessoais negativos, como o luxo excessivo, o deboche, a ingestão de alimentos deteriorados, o sedentarismo, a sífilis e o abuso da terapêutica mercurial, entre outros fatores^{1,2}.

No final do século XVII a tuberculose já era responsável por quase um terço de todas as mortes que ocorriam no Rio de Janeiro e até o início do século XX essa era provavelmente a doença que causava maior mortalidade em todo país. No Estado de São Paulo a tuberculose com certeza ainda era a principal causa individual de morte no início do século XX, deixando para trás doenças epidêmicas bem registradas pela historiografia, como a varíola e a febre amarela¹.

Em 1882 o alemão Robert Koch descobriu o agente etiológico da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*. Após a descoberta do agente etiológico começou-se a especular sobre a possível erradicação da doença².

Hoje, mais de um século depois, a tuberculose é a infecção bacteriana que ainda persiste como um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e volta a preocupar os países desenvolvidos, devido ao aumento progressivo da sua doença associada à epidemia de infecção pelo HIV (Human Immunodeficiency Virus). Estudos realizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no período de 1989 a 1990, demonstram que 1,7 bilhão de pessoas, ou seja, um terço da população mundial, está infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e que a maioria desses indivíduos carrega sua infecção sem desenvolver a doença^{2,3}.

A tuberculose é uma estranha doença: ela é causada por um bacilo mas também pela pobreza, ela reflete o que atualmente acontece e o que aconteceu décadas atrás, ela é exógena e endógena⁴. Pode-se dizer também que ela é uma doença complexa e requer uma série de condições e não somente um procedimento.

É uma doença causada por uma bactéria. Qualquer um pode tornar-se infectado com a bactéria da tuberculose mas pessoas com HIV / AIDS estão entre os maiores sujeitos a infecção. A tuberculose pode ocorrer em qualquer parte do

corpo mas somente a tuberculose-doença do pulmão (tuberculose pulmonar) ou na garganta é contagiosa⁵.

Existe uma diferença entre a infecção tuberculose e a doença tuberculose. Na tuberculose-doença ou tuberculose latente as pessoas que estão infectadas normalmente não apresentam sintomas e a maioria não o terá. Este tipo de tuberculose não é contagiosa. A tuberculose-infecção ou ativa tuberculose significa que a bactéria torna-se ativa no corpo e deixará o paciente doente. Somente pessoas com a tuberculose ativa pode transmitir a doença para outros. A tuberculose-doença pode ser prevenida ou curada, mas se não tratada, pode ser fatal⁵.

1.1.2. Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico final da tuberculose encontra diversas dificuldades. Os sinais clínicos muitas vezes não são específicos e, podem ser confundidos com outras patologias, como, por exemplo, câncer de pulmão. As alterações radiológicas aumentam a suspeita da tuberculose pulmonar e podem mostrar padrões característicos como infiltração do lobo superior com cavitação, doença miliar e presença de complexo primário. Porém, fica difícil distinguir de outras doenças como sarcoidose, histoplasmose, linfadenite mediastinal e efusão pleural².

O método básico para confirmar casos de tuberculose pulmonar continua sendo a baciloscopia⁶ pois possui alto valor preditivo positivo. Contudo, existem várias limitações a este método pois, na tuberculose, o bacilo de Koch pode estar eliminado em pequeno número, o que ocorre no início da tuberculose pulmonar. Na forma extrapulmonar e em outras formas da doença na criança necessita-se da eliminação de cerca de 5.000 a 10.000 bacilos por mL de escarro para a positividade².

Em recente estudo verificou-se que, em pacientes portadores simultâneos do vírus HIV e cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas múltiplas, o tempo de sobrevivência média após o diagnóstico era de 4 a 16 semanas³.

Para o estabelecimento da validade de qualquer teste como diagnóstico, é de extrema importância avaliar alguns critérios. Um dos principais fatores é a viabilidade de sua execução, assim como seu custo. Um teste ideal para rotina de diagnóstico da tuberculose necessita: 1) diferenciar pacientes com tuberculose baciloscopia-positiva de outras micobactérias; 2) diagnosticar paciente com tuberculose baciloscopia-negativa; 3) distinguir entre resposta imunológica natural devida a uma infecção, vacinação ao BCG e anticorpos produzidos resultantes de contatos com micobactérias ambientais; 4) auxiliar no monitoramento da quimioterapia².

Diagnosticar tuberculose em pacientes soros positivos é uma questão complexa devido à apresentação atípica da doença, com grande número de forma paucibacilares pulmonares e extrapulmonares, necessitando uso rotineiro da cultura para diagnóstico⁶.

1.1.3. Transmissão

A tuberculose é transmitida por três vias diferentes. A primeira delas relaciona-se com a ingestão de material contaminado, principalmente o leite proveniente de gado com tuberculose, situação em que a submucosa intestinal se torna foco da infecção primária. No passado o consumo de leite de vaca *in natura* e seus derivados constituiu uma via importante de disseminação da tuberculose. A pasteurização rotineira do leite elimina o bacilo (*M. bovis*), reduzindo na comunidade o risco de adquirir a tuberculose pela ingestão do produto contaminado⁷.

A segunda via de transmissão diz respeito à inoculação direta do bacilo da tuberculose. Esta via acomete particularmente os técnicos de enfermagem e pessoas de laboratório, grupos populacionais em que o maior contato com o microorganismo aumenta em cinco vezes o risco de contrair a doença, em comparação com a população em geral⁷.

A terceira via se dá por meio da transmissão aérea, por inalação de gotículas contendo *M. tuberculosis*. Essa é atualmente a forma mais importante de propagação da doença, situação que se evidencia nos relatos crescentes de microepidemias de tuberculose em ambientes restritos e populações fechadas, como prisões, albergues e hospitais⁸.

Na Grécia antiga Aristóteles já constatava a importância da via aérea na transmissão da tuberculose, escrevendo que o “ar pernicioso” era responsável pela propagação da doença. No entanto, somente em 1955 Willians Well confirmou que a propagação do *M. tuberculosis* ocorria por meio da tosse e do espirro¹.

Até que seja feito o diagnóstico e iniciado o tratamento, estima-se que cada doente infecte, em média, de três a cinco pessoas, contribuindo para a rápida disseminação da doença¹.

1.1.4. Tuberculose e Aids

O surgimento da AIDS na década de 1980 provavelmente foi, depois da Revolução Industrial na Europa do século XIX, o fator de maior relevância a afetar a relação que o homem moldou com a tuberculose ao longo dos séculos. Daí a importância do diagnóstico precoce desses dois sérios problemas de saúde pública, bem como a instituição de medidas de tratamento e profilaxia específicas a essas doenças¹.

As taxas de aumento do HIV junto com a tuberculose em países pobres pode requerer uma aproximação mais simples para o controle da tuberculose. O tratamento tradicional da tuberculose requer um complexo regimento de drogas e múltiplos testes de laboratório. Algumas pessoas com tuberculose tornam-se resistentes a terapia com drogas depois de descontínuos tratamentos. Uma terapia alternativa para o controle da tuberculose poderia visar a administração de drogas altamente efetivas. A combinação de rifampicina (RFP) e outros fármacos pode ser efetiva para pacientes infectados com o HIV⁸. Mas, com a mal absorção da

rifampicina e outras drogas antituberculose, estas drogas podem tornar-se um problema para pacientes HIV positivos⁹.

No Brasil a tuberculose apareceu como a terceira doença oportunista mais comum entre os casos de AIDS notificados até 1992, presente em 19,8% do total, só superada pela candidíase e pela pneumocistose. Agravando a situação dos doentes portadores das duas doenças, nos infectados pelo HIV aumenta a ocorrência das formas extrapulmonares de tuberculose, bem como a incidência simultânea da doença pulmonar e extrapulmonar¹.

No Brasil, ao contrário dos E.U.A., a ocorrência de tuberculose por micobactérias atípicas em indivíduos soropositivos para HIV é menos comum, o mesmo valendo para as bactérias multirresistentes. O crescimento da AIDS no país, aliado às dificuldades dos programas oficiais para o controle da tuberculose, permite aventar a hipótese, de que no futuro essa situação venha a se modificar, aumentando a incidência das formas multirresistentes da doença¹.

1.1.5. Resistência do *M. tuberculosis* a múltiplas drogas

Recentemente, devido à ocorrência de vários surtos de tuberculose por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas principalmente nos Estados Unidos da América, o termo “multidrug-resistant tuberculosis” (MDR-TB) passou a assumir grande destaque no quadro da infectologia e da epidemiologia mundial¹⁰.

A tuberculose multirresistente tem sido definida internacionalmente como *Mycobacterium tuberculosis* resistente à isoniazida e à rifampicina com ou sem resistência a outras drogas. No Brasil, os critérios definidos pelo Ministério da saúde para o diagnóstico de tuberculose multirresistente têm sido a falência aos esquemas de tratamento, ou resistência a rifampicina (RFP), isoniazida (INH), estreptomina (EPT) e ou etambutol (ETB). Como consequência, muitos pacientes têm ficado com pouca opção terapêutica medicamentosa¹¹.

Além da AIDS, outros fatores têm contribuído para o recrudescimento da tuberculose e o incremento de formas multirresistentes da doença, em especial a

manutenção de elevados índices de pessoas vivendo em condições de pobreza e exclusão social. Enquanto nos E.U.A. a multirresistência é um fenômeno de natureza primária, intimamente associado à AIDS, no Brasil a multirresistência é na maior parte dos casos adquirida ou secundária. Falhas no tratamento, em especial a irregularidade na utilização dos medicamentos, sucessivos abandonos da terapia e mesmo prescrições inadequadas são condições propícias ao aparecimento de formas multirresistentes de *M. tuberculosis*⁸.

Outro aspecto a favorecer o desenvolvimento da multiresistência são as falhas no suprimento dos medicamentos empregados nos esquemas terapêuticos indicados pelo programa oficial de controle da tuberculose. Apesar de não constituírem regra, essas falhas operacionais não raro têm se verificado no país¹.

Quanto à resistência pode-se relacionar alguns conceitos¹⁰:

Resistência primária: É caracterizada pela presença de bacilos resistentes a uma ou mais drogas em doentes que nunca receberam tratamento prévio com drogas antituberculose. Considera-se, portanto, que este foi infectado por outro paciente portador de bacilos resistentes;

Resistência adquirida ou secundária: É desenvolvida como resultado da seleção de mutantes resistentes do *M. tuberculosis* a uma ou mais drogas, em virtude de sua utilização de apenas uma droga (monoterapia) nos pacientes com tuberculose;

Resistência inicial: É definida quando há impossibilidade de se obter de um caso novo portador de cepa resistente a drogas, informações fidedignas de tratamento prévio de tuberculose.

1.1.6. Quimioterapia antituberculose

A quimioterapia antituberculose tem por fundamento quatro pilares ou áreas do conhecimento científico¹⁰:

Bases bacteriológicas e patológicas: Numa população bacteriana numerosa, existem sempre organismos naturalmente resistentes a diferentes quimioterápicos,

independentemente de uma exposição prévia às drogas (resistência natural). O fenômeno de resistência decorrente de mutação genética constitui-se na capacidade de sobrevivência e multiplicação *in vivo* ou *in vitro* dos microorganismos, mesmo em presença de determinadas concentrações de drogas. A frequência de mutantes resistentes do *Mycobacterium tuberculosis* pode variar de acordo com a concentração e o tipo de droga;

Bases farmacológicas: Além das implicações bacteriológicas e patobiológicas, deve-se considerar igualmente importante para a obtenção do êxito terapêutico da tuberculose, assim como de outras doenças infecciosas, o conhecimento da farmacodinâmica, ou seja, quais os mecanismos e sítios de ação das drogas sobre o microorganismo, e da farmacocinética, ou seja, como se processa a interação do organismo com a droga, como ela é administrada, absorvida, como se difunde, qual a sua biodisponibilidade, o seu metabolismo e excreção;

Estudos experimentais: A análise experimental tem por mérito o esclarecimento não apenas dos mecanismos de ação, mas também a elucidação de diversos aspectos importantes relacionados a associação, tempo e ritmo de administração das drogas. Os modelos *in vitro* e *in vivo*, de uma maneira geral, contribuem e fornecem subsídios importantes para as bases bacteriológicas, patológicas e farmacológicas do tratamento da tuberculose;

Ensaio terapêuticos: Os ensaios terapêuticos com drogas antituberculose têm como finalidades básicas: (1) definir as melhores associações, o tempo de uso mais adequado e o menor custo; (2) comparar o tratamento ambulatorial e hospitalar, medicação auto-administrada e supervisionada, os esquemas diários e intermitentes. Em sínteses, os ensaios terapêuticos avaliam a eficiência do tratamento, no que diz respeito ao seu custo/benefício e custo/efetividade.

A descoberta de ativos químicos contra a tuberculose tem sido associado com a rápida redução das mortes por tuberculose. A cura da tuberculose tem sido

alcançada com quimioterapia de multidrogas e em particular com a introdução da rifampicina no regime. A quimioterapia requer, entretanto, o uso de várias drogas a que as bactérias são suscetíveis e em tempo suficiente para assegurar uma cura permanente sem que a bactéria comece a resistir a algum dos medicamentos usados⁴.

1.1.7. Esquemas de tratamento

O tradicional tratamento da tuberculose foca um complexo regime de drogas⁸ que pode durar cerca de 1 ano expondo os pacientes aos efeitos tóxicos de agentes antituberculose o que ser perigoso para alguns pacientes. O recente aumento nos casos de tuberculose expõe mais os pacientes aos efeitos tóxicos de agentes antituberculose¹².

O tempo de duração do tratamento e a necessidade de tomar várias drogas é o maior impedimento do sucesso da implantação dos sistemas básicos de controle da tuberculose¹³.

Internacionalmente recomenda-se um regime de tratamento combinando as seis maiores drogas antituberculose: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol, estreptomina e tiacetazona.

Um regime simples poderia ser de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol 3 vezes por semana que tem a vantagem de ser apropriado para áreas onde o nível de resistência são incertos⁸.

A pesquisa de regime de tratamento tem mostrado que o tempo de tratamento da tuberculose pode ser diminuído em 6 meses com regimes contendo rifampicina. O uso da rifampicina ao longo do tratamento implica em um aumento de custo que pode ser compensado pelo aumento da taxa de tratamentos completados¹³.

Vários estudos da disposição e farmacocinética da rifampicina têm sido realizado. Foram realizados estudos onde os voluntários selecionados foram pacientes infeccionados com *Mycobacterium tuberculosis*. O estado clínico foi avaliado através da história completa e exame físico dos pacientes através de raio-x do tórax, eletrocardiograma, contagem sanguínea completa, e o clearance de creatinina¹⁶.

Estudos prévios em pacientes de AIDS mostraram que a concentração no soro alcança o máximo de rifampicina em 2 horas e depois o nível plasmático decai. Estes perfis podem ser devido a mal absorção da droga que resulta em um fracasso terapêutico¹⁷. A contínua administração da rifampicina leva a indução de enzimas do fígado com uma concomitante diminuição da concentração máxima do plasma.¹⁸.

A análise da farmacocinética da rifampicina tem demonstrado que a taxa de absorção intestinal aumenta com o tempo bem como a taxa e biotransformação para seu derivado 25-desacetilrifampicina. A infusão intravenosa deste fármaco em pacientes com tuberculose tem demonstrado similares valores de $C_{máx}$ e $T_{máx}$ obtidos com formas farmacêuticas de administração oral¹⁸.

1.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Robert Langer definiu diferentemente os sistemas de liberação controlada dos sistemas de liberação sustentada. Os sistemas de liberação controlada liberam fármaco a uma pré-determinada taxa por um definido período de tempo. Os sistemas de liberação sustentada são preparados que incluem complexos (sais ou resinas de troca iônica), suspensões, emulsões, revestimentos que se dissolvem lentamente¹⁹. A ação dos sistemas de liberação controlada de drogas prolongam, predizem e reproduzem as cinéticas de liberação. Os sistemas de liberação sustentada somente prolongam a liberação do fármaco²⁰.

A importância dos sistemas está na liberação da droga ocorrer a uma velocidade constante²¹. Eles podem ser um suplemento para melhorar a supervisão do tratamento do paciente com tuberculose ou com qualquer outra moléstia. Os sistemas poderiam disponibilizar uma combinação de drogas efetivas por um preço acessível e ainda diminuir a necessidade dos pacientes tomarem 3 a 4 formulações de drogas separadamente¹⁹.

Convencionais formas de administração de fármacos geralmente são na forma de pílulas, gotas, unguentos e soluções intravenosas¹⁹. A administração convencional de fármacos tem como objetivo principal tornar possível a ação a que ele se destina²².

Os sistemas poliméricos de liberação são capazes de ajustar a velocidade de liberação da droga em resposta a necessidade fisiológica²³. Alguns polímeros com uso biomédico têm sido usados para desenvolver sistemas de liberação de drogas²⁴.

Enquanto novas e poderosas drogas continuam a ser desenvolvidas há um aumento da atenção para métodos em que essas drogas são disponibilizadas no organismo. Um novo desenvolvimento, sistemas poliméricos de liberação controlada, tem evoluído da necessidade de prolongar e melhorar o controle da droga administrada. Em uma liberação convencional a concentração da droga no sangue aumenta quando o fármaco é ingerido, alcança um pico plasmático e declina para quase zero. Cada droga tem um nível plasmático acima do qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficiente²⁵. A concentração da droga no plasma de um paciente a determinado tempo depende da rotina que é prescrita²³.

Por outro lado, os verdadeiros sistemas de liberação controlada buscam uma utilização mais eficiente do agente ativo, possibilitando, por exemplo, a sua vetorização (targeting), administrações menos freqüentes e, conseqüentemente, uma redução dos efeitos colaterais. Os sistemas de liberação controlada buscam alcançar um perfil de liberação do fármaco predizível e reprodutível, relativamente independente do ambiente, gerando um grau de controle mais alto que o obtido com formulações de ação sustentada²⁶.

A encapsulação de drogas é usada para propósitos de controlar e sustentar a liberação de drogas, mascarar gosto, separar substâncias incompatíveis (como

outras drogas ou excipientes e tampões), proteção de drogas instáveis ao ambiente (umidade, calor, luminosidade, e oxidação), o seguro direcionamento de substâncias tóxicas, conversão de líquidos para sólidos, e ajuda na dispersão de substâncias insolúveis em água a se solubilizar em meio aquoso²⁷.

A função primária da encapsulação é proteger. Pode ser para proteger o estômago do efeito da droga ou para proteger a droga do efeito do conteúdo gástrico. Há drogas que se forem diretamente expostas à mucosa gástrica causará irritação e em alguns casos corrosão da parede gástrica. Tais drogas são encapsuladas para proteger indivíduos do efeito prejudicial dos efeitos colaterais. A aspirina é um importante exemplo de tais drogas. A literatura relata que pode ocorrer sangramento da mucosa gástrica após a administração de aspirina²⁸.

Para conter os efeitos colaterais várias tentativas têm sido feitas para controlar a distribuição nos tecidos e a farmacocinética das drogas. As aproximações feitas nessa direção incluem a síntese de pró-drogas monoméricas tendo atividade clínica com reduzida toxicidade^{26,29}.

Entre as vantagens que os sistemas de liberação controlada oferecem podemos citar^{25,26}:

- manutenção de índices terapêuticos com uma simples dose;
- liberação localizada da droga em uma região específica do corpo;
- diminuição sistêmica do nível de droga;
- aumento do conforto do paciente;
- menor acúmulo do fármaco no organismo;
- economia do fármaco;
- tratamento contínuo, sem administração noturna;
- proteção do fármaco contra eventual degradação nos fluidos biológicos.

Como ainda não existe um sistema de liberação ideal, podemos citar como desvantagens²⁶:

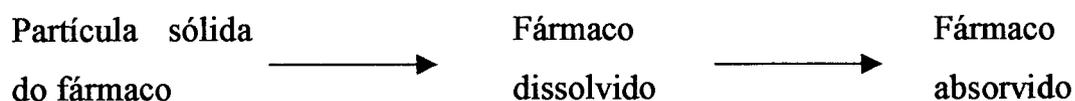
- dificuldade de interrupção rápida da ação farmacológica, caso de intoxicação ou intolerância;
- risco de acumulação do fármaco: velocidade de eliminação lenta;

- dificuldade de adaptação da posologia às diferentes farmacocinéticas interindividuais;
- cinética de liberação depende da integridade da forma farmacêutica.

Um sistema ideal de liberação controlada de fármacos deve apresentar as seguintes características²⁸:

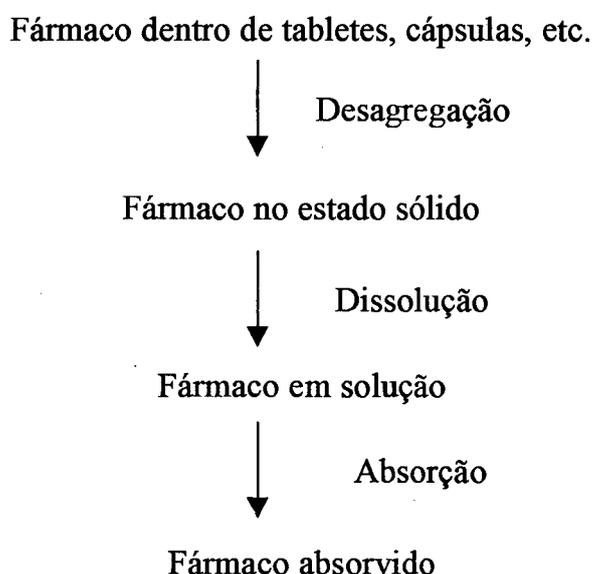
- resistir a desintegração ou dissolução no estômago;
- ser previsível por princípios físico-químicos;
- ser impermeável a fluidos gástricos e a droga enquanto no estômago;
- dissolver ou desintegrar rapidamente no intestino delgado;
- ser fisicamente e quimicamente estável durante a estocagem;
- ser não tóxico;
- ser econômico;
- finalmente, servir como um sistema otimizado do agente ativo, ou seja, garantir eficiência, segurança e confiabilidade máximas.

Deve-se dar importância às propriedades físicas das drogas em relação à sua disponibilidade farmacológica e atividade. Quando a droga é administrada em seu estado sólido é razoável assumir que a absorção da droga no meio gastrointestinal segue a seguinte seqüência²²:



Se a solubilidade intrínseca do fármaco é alta, a taxa de permeação através da barreira gastrointestinal é assumida ser o passo determinante na seqüência da absorção. Em um outro lado, quando a droga tem uma relativa baixa solubilidade, o alcance de uma efetiva concentração no sítio provavelmente irá governar a taxa de absorção²².

Através do esquema acima tem-se mostrado ser verdadeiro em alguns casos, mas parece ser inadequado para descrever a absorção de drogas de algumas formas como de tabletes e de cápsulas. Para essas formas é proposto uma versão modificada que parece ser um caminho mais realista para descrever a seqüência de absorção do fármaco²²:



Os sistemas de liberação podem ser divididos em diferentes categorias como a seguir:

Pró-fármacos

Pesquisas modernas no campo da química farmacêutica têm enveredado pelo caminho de obter maior especificidade na localização do fármaco no sítio alvo, os chamados pró-fármacos²⁶.

A droga pode ser quimicamente modificada para alterar a sua seletividade tal como propriedades de biodistribuição, farmacocinética, solubilidade ou antigenicidade. Drogas também tem sido ligadas a macromoléculas solúveis tal como proteínas, polissacarídeos ou polímeros sintéticos via ligações degradáveis. Este processo altera o tamanho da droga e outras propriedades resultando em diferentes farmacocinéticas e distribuição. Polímeros, tal como o polietilenoglicol

(PEG), podem ser ligados a drogas para aumentar a sua meia-vida ou alterar a sua imunogenicidade¹⁹.

Microcápsulas e Nanocápsulas

Microcápsulas podem ser usadas para a cultura de células mamárias e para o controle da liberação de drogas, vacinas, antibióticos e hormônios. Para prevenir a perda do material encapsulado, a microcápsula pode ser produzida com mais de um material polimérico que forma uma membrana da superfície da matriz³⁰.

A imobilização de moléculas biológicas, especialmente proteínas e enzimas, é de particular interesse para proteger, separar, estabilizar e ou controlar a liberação do material microencapsulado³¹.

Vesículas - Lipossomas e Niossomas

As vesículas são micropartículas ou suportes coloidais compostos de substâncias tais como proteínas, lipídios (como exemplos temos os lipossomas), carboidratos ou polímeros sintéticos. As vesículas compartilham algumas das vantagens dos conjugados macromolécula-droga que alteram a farmacocinética e a distribuição.

Os lipossomas e niossomas são vesículas esféricas submicroscópicas (25-5000 nm), cujas membranas formam uma (unilamelar) ou várias duplas camadas (multilamelar) de moléculas anfifílicas²⁶. São amplamente estudados e podem ser formulados com uma variedade de composição de lipídios e estruturas e são potencialmente não tóxicos, degradáveis e não imunogênicos. Entretanto, alguns lipossomas exibem pobre estabilidade durante a estocagem e uso. A estabilidade dos lipossomas pode melhorar pelo aumento do conteúdo de colesterol lipossomal ou sintetizando lipossomas polimerizáveis. Mas com isso pode haver uma diminuição da biodegradabilidade¹⁹.

Sistemas transdérmicos

A pele é muitas vezes considerada uma barreira que guarda todos os agentes, inclusive drogas, fora do corpo. Entretanto, são poucas as drogas que possuem

propriedades de penetrar na pele a apreciáveis taxas e tem suficiente potência para que baixas doses sejam suficientes. A barreira limitante para a entrada da droga é a camada externa da pele, o stratum corneum, que é composto, primariamente, de queratina e lipídios. Para a droga penetrar na pele em quantidade significativa ela deveria ter um baixo peso molecular e apreciável solubilidade na água e no óleo. O maior desafio dos sistemas transdérmicos é aumentar a variedade de drogas que podem ser administradas¹⁹.

A descoberta de sistemas de liberação de drogas transdérmicos (TDSs) é uma inovação no campo dos sistemas de liberação de drogas. A habilidade dos TDSs de liberar drogas para efeito sistêmico na pele intacta evita o primeiro passo do metabolismo e por isso tem acelerado as pesquisas desse sistema no campo farmacêutico. Durante uma década de pesquisa extensa alguns TDSs tem sido desenvolvido e comercializados com sucesso. Embora as vantagens da medicação transdérmica serem muito impressionantes, os TDSs possuem certas limitações. Uma das maiores limitações das aplicações deste sistema é que às vezes ele pode induzir a reações de irritação ou sensibilização da pele. Estas reações podem ser desencadeadas pela droga sozinha ou pelo material usado na produção do dispositivo. Testes de alguns TDSs tem revelado que algumas dessas reações são provocadas diretamente contra o dispositivo e não contra as drogas³².

Complexos de inclusão com ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos (naturais e semi-sintéticos) de forma anelar, capazes de formar complexos de inclusão monomoleculares. Estes complexos de inclusão representam verdadeiras encapsulações em níveis moleculares²⁶.

Bioadesivos e Mucoadesivos

Os sistemas bioadesivos de liberação de fármacos aderem a uma rede de mucina e/ou por baixo de uma camada epitelial de superfície mucosa. Os bioadesivos estabelecem um íntimo contato entre o polímero e o substrato seguindo a formação e interpenetração/difusão do polímero e do substrato. Bioadesivos têm

recebido atenção devido ao fato que estes podem ser usados para aumentar a intimidade do contato entre sistemas de liberação de drogas e a superfície que absorve³³.

Formas farmacêuticas para liberação colônica

A liberação colônica de fármacos tem como local alvo para a liberação o cólon. A liberação direta no cólon diminui a possibilidade do fármaco sofrer hidrólise. O cólon possui baixa concentração de enzimas apresentando 80% menos de atividade enzimática do que o intestino delgado. O intestino grosso não é tradicionalmente considerado um órgão de absorção de drogas, com exceção de sua porção terminal, o reto, que é utilizado para administração de supositórios e de pomadas. Tais formas farmacêuticas destinam-se a tratamentos locais e também sistêmicos²⁶.

Sistemas flutuantes para liberação gástricas de fármacos

Em contato com o fluido gástrico, o tablete de flutuação intra-gástrico forma uma barreira de gel coloidal ao redor da superfície do sistema tornando este impermeável a água que o circunda e mantém a densidade menor que um. Assim o sistema permanece flutuando no fluido gástrico até que toda a droga aprisionada no sistema seja liberada²⁰.

1.4. PROCESSOS DE LIBERAÇÃO

A liberação envolve diferentes maneiras para a disponibilização do fármaco no meio alvo. Pode-se citar a permeação por meio de poros, de partição³⁴, fonoforese³⁵, ultra-som²⁴, pressão osmótica²⁰.

A liberação por poros e por partição podem não atuar exclusivamente mas um pode predominar sobre o outro de acordo com o par droga/membrana. Nos hidrogéis onde a liberação por partição predomina³⁶, o soluto dissolve-se no polímero e atravessa a membrana por difusão na fração polimérica. Na liberação por

meio de poros o soluto difunde através de microcanais dentro da estrutura da membrana. A permeabilidade então seria determinada pela média do tamanho do poro em relação ao volume molecular do soluto e a solubilidade do soluto na água³⁴.

A fonoforese é definida como o movimento de drogas pela pele intacta e por tecidos finos sob a influência de uma perturbação externa ultrasonica^{24,35}.

Os sistemas de liberação de drogas controlados por pressão osmótica são produzidos pelo recobrimento do núcleo do reservatório de uma droga ativa ou de um droga inativa osmoticamente. Quando a droga é inativa ela é combinada com um sal que possa ser ativado pela pressão osmótica. A membrana de recobrimento é rígida e capaz de manter a integridade estrutural do sistema de liberação durante a liberação da droga. Ela é permeável ao fluxo do fluido gastrointestinal mas é impermeável ao soluto. A espessura da membrana de recobrimento afeta a taxa e a duração da liberação de ordem zero da droga do sistema²⁰.

1.5. POLÍMEROS

1.5.1. Quitina e quitosana

Quitina e quitosana (QTS) são dois dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza^{30, 34, 37, 38, 39}. São derivados da celulose, embora não seja produzido em organismos produtores de celulose. A quitina é o principal componente de organismos tal com fungos e crustáceos⁴⁰.

A diferença entre a celulose e a quitina está no grupamento hidroxí da posição 2 da celulose que foi substituído pelo grupamento acetamido na quitina [β -(1-4)-2-acetamino-2desoxi-D-glicose]^{37, 41}.

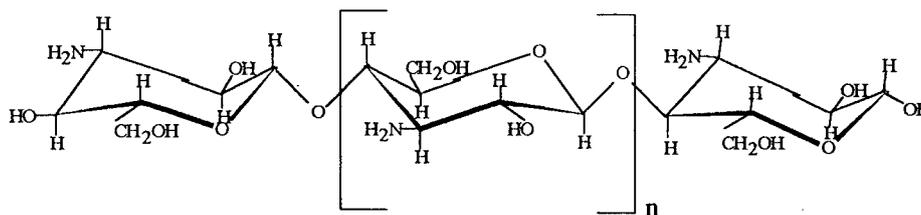


Figura 2. Fórmula estrutural da quitosana

A quitosana ($\beta(1\rightarrow4)$ 2-amino-2-desoxi- β -D-glicose) deriva da quitina³⁴ e é formada através de N-desacetilação^{30, 42}. A quitosana forma complexos polieletrólitos com polímeros poliânions³¹. A estrutura da quitosana está representada na Figura 2.

Embora a estrutura da quitosana seja representada como um homopolímero, o processo de desacetilação é raramente completo e a maioria dos produtos comerciais são copolímeros compostos de unidades repetidas de quitosana e unidades repetidas de quitina^{38, 39}. A quitosana é um polissacarídeo natural^{31, 38}, tendo características similares a glicosaminas. Não é tóxico e é bioabsorvível e tem sido explorado para a liberação de várias drogas³⁸,

A hidrofiliabilidade do polímero é próprio do grupamento amino e é solúvel em soluções de ácido diluído³⁸, (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, etc.)⁴² e comporta-se como uma borracha - hidrogel em água³⁸.

A quitosana tem atraído a atenção como uma matriz para a liberação controlada devido a sua fácil degradação por enzimas e por seus produtos de degradação não serem tóxicos. A característica de insolubilidade da quitosana em água e também em alguns solventes orgânicos limita seu uso com suporte de drogas⁴³.

Tem sido relatado na literatura a propriedade de concentração seletiva desses polímeros em células tumorais⁴³.

Por que usar quitosana

Quitina e quitosana são recursos naturais que estão começando a ser comercializados. Esses polímeros são rejeitos da indústria que comercializa caranguejo e camarão. Nos E. U. A. o Departamento de Comércio citou em 1973 que havia mais de 150.000 toneladas de quitina produzida e desperdiçada pelo processamento da casca de camarão, marisco, molusco e ostra³⁷. Outras fontes são o exoesqueleto de insetos, paredes de fungos, microfauna e plânctons⁴¹. A quitina e a quitosana também despertam interesse comercial devido a sua relativa alta

percentagem de nitrogênio (6,89%) comparado com substitutos sintéticos da celulose (1,25%)³⁷.

Áreas de uso para quitosana

Algumas áreas têm sido investigadas para encontrar possíveis usos para esses polímeros ao longo dos anos³⁷.

As aplicações destes materiais incluem as áreas da agricultura (tratamento de sementes, como ingrediente de comida, inseticida), processamento de comida e biotecnologia⁴⁴, biomédicas, produção de papéis, têxtil, produtos fotográficos, agente quelante de metais pesados (Cd, Hg, Pb, Cr, Ni)³⁷, como adsorvente de corantes, redução do colesterol, em determinado grau observa-se também que a quitosana estimula ao sistema imune^{37, 45}.

Usos biomédicos para quitosana

A habilidade da quitosana intumescer em água e adquirir uma leve consistência de gel e assemelhar-se a tecidos biológicos pode aumentar a sua biocompatibilidade e fazer dela uma boa matriz para produtos farmacêuticos hidrofílicos que permeiam pobremente em matrizes de silicone popularmente usados para liberação de drogas. Filmes de quitosana tem boa propriedade mecânica pois suportam stress mecânico e possuem bom grau de intumescimento. Possui boa permeabilidade para fármacos pois foram estudados a permeação de uma série de drogas através de gel de quitosana e concluiu-se que a taxa de permeação diminui com o aumento do peso molecular da droga³⁴.

Tratamento de queimados

A quitosana é uma grande candidata para o tratamento de queimados. Ela forma filmes que absorvem água e são biocompatíveis. Estes filmes podem ser

formados diretamente na queimadura pela aplicação de uma solução aquosa de acetato de quitosana. A solução, embora ácida, promove um esfriamento e uma agradável suavidade quando aplicada em feridas abertas de pacientes com queimaduras. Uma outra vantagem deste tratamento com quitosana é que ela permite uma excelente oxigenação do tecido, sendo isso importante para prevenir o aumento da ferida por privação de oxigênio. Adicionalmente, filmes de quitosana tem a habilidade de absorver água e são naturalmente degradáveis por enzimas do corpo. Isso significa que a quitosana não precisa ser removida o que poderia aumentar o dano do tecido injuriado³⁷.

Atividade de ligante de célula biológica

A quitosana tem mostrado uma agressiva propriedade de blindar uma variedade de células mamárias e microbianas. Esta propriedade pode ser aplicada na área biomédica. Estas possíveis aplicações podem ser como homeostático, bacteriostático e agente espermicida³⁷.

Quitosana como um agente homeostático

A quitosana é um polímero que desde 1950 tem aplicação conhecida como agente de blindagem de células vermelhas do sangue. Alguns estudos tem mostrado que polímeros possuem propriedade de aglutinação celular. Nos anos 60 a quitosana foi investigada e foi descoberto que a quitosana a baixas concentrações tem a habilidade de aglutinar células vermelhas do sangue. Isto leva a considerar a este polímero como um agente homeostático. A aglutinação das células vermelhas do sangue por polímeros é dependente da estrutura do polímero e do seu peso molecular. Quitosana com peso molecular de 35.000 foi capaz de produzir apenas uma leve coagulação de sangue com heparina, enquanto quitosana com peso molecular de 600.000 ou mais produziu uma firme coagulação³⁷.

Mecanismo de blindagem de células

O mecanismo de blindagem de células também tem sido pesquisado. É bem conhecida a força repulsiva entre as células vermelhas do sangue devido a altas

cargas negativas da membrana celular e esta predominante presença de cargas negativas é devido a resíduos ácidos neuramínico. O processo de blindagem das células remove a alta rede de cargas negativas das células. Os pesquisadores então notaram que a quitosana não modifica as células do sangue e também foi determinado que a quitosana não produz gel com as células sanguíneas. Entretanto concluiu-se que a formação de gel das células vermelhas do sangue é devido a interação das cargas positivas da quitosana com os receptores contendo resíduos de ácidos neuramínicos na superfície celular.³⁷

Propriedades do grupamento da quitosana

Os grupamentos da quitosana tem propriedades específicas.

Grupo amino livre (-NH₂): solubilidade em soluções ácidas, insolubilidade a pH's maiores de 6.5, insolubilidade em ácido sulfúrico, limitada solubilidade em H₃PO₄, insolubilidade na maioria dos solventes orgânicos³⁷;

Grupo amino protonado (-NH₃⁺): solubilidade a pH's menores que 6.5, forma soluções viscosas, forma gel com poliânions, irá permanecer solúvel em algumas misturas de água-álcool³⁷.

1.5.2. PVA

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero poli-hidroxi feito pela hidrólise do acetato de polivinil⁴⁶. O PVA é um dos poucos polímeros comerciais com baixo peso molecular e que é solúvel em água⁴⁷.

As propriedades físicas do PVA são controladas pelo peso molecular e pelo grau de hidrólise. A viscosidade é controlada pelo peso molecular, concentração e em menor grau pela temperatura. O grau de hidrólise não afeta fortemente sua viscosidade, embora a viscosidade seja proporcional ao grau de hidrólise a um peso

molecular constante. O PVA pode ser biodegradável. A presença de PVA não interfere em outros materiais biodegradáveis⁴⁷.

1.6. CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA

Quando se deseja obter um sistema de liberação controlada deve-se considerar as condições fisiológicas que o sistema irá passar até o seu destino final. Na produção de microcápsula, ou qualquer outro sistema, para a liberação controlada com administração por via oral, o meio que deverá ser considerado é o meio gastrointestinal.

Os mais importantes fatores do meio gastrointestinal que podem afetar a performance da microcápsula são o pH do estômago, o esvaziamento gástrico e a atividade enzimática do trato gastrointestinal²⁸.

1.6.1. pH

O pH dos fluidos nos vários segmentos do trato gastrointestinal pode promover um estímulo do meio para a resposta de liberação de drogas²³.

A superfície do estômago possui células secretoras que produzem uma camada de muco com 1-1,5 mm de espessura para lubrificação e proteção da mucosa gástrica. As células parietais secretam HCl a uma concentração aproximada de 0,16 M, mas a quantidade e concentração de ácido depende de uma série de condições³⁶.

O pH do estômago varia de aproximadamente 1,0 a 3,5^{28, 36} dependendo da presença e da ausência de comida e refluxo do conteúdo intestinal para o estômago. O pH do intestino pode variar de aproximadamente 3.8 a 6.6 no intestino delgado a 7.5 a 8.0 no intestino grosso. Estas médias resultam de uma progressiva diluição do ácido químico do estômago pelos íons bicarbonato da secreção pancreática que é liberado pelo ducto biliar para o duodeno como também de secreções intestinais²⁸.

Baseado nos pH's do estômago e do intestino delgado um sistema de liberação controlada deve ser desenhado para resistir a dissolução a valores baixos de pH's e ser facilmente solúvel em pH 7. Muitas formulações de liberação controlada falharam na liberação de seus conteúdos por que seu desenho era baseado na errada suposição que o pH do intestino delgado era alcalino²⁸.

1.6.2. Esvaziamento gástrico

O controle da mobilidade gastrointestinal é uma importante barreira fisiológica para o controle da liberação oral de drogas³⁶.

O esvaziamento gástrico dos tabletes revestidos tem sido relatado como altamente variável e pode ser de 30 minutos ou menos até 7 horas ou mais dependendo da presença e do tipo de comida no estômago e ainda outros fatores. Há um consentimento geral que, devido a grande variabilidade do tempo de esvaziamento gástrico, um tempo arbitrário de 1 a 2 horas não é real para basear o perfil da liberação já que há relatos na literatura de um tempo médio de esvaziamento de 6 horas²⁸.

O mecanismo envolvido no esvaziamento gástrico de sólidos e líquidos é diferente e não completamente entendido. Uma refeição normal muda o padrão da mobilidade de um estado de jejum para um estado alimentado dependendo do conteúdo calórico da comida. A viscosidade também afeta o tempo de esvaziamento dos alimentos: baixa viscosidade dos alimentos diminui o tempo de esvaziamento comparado com alimentos de alta viscosidade. Sólidos e líquidos são esvaziados diferentemente, o esvaziamento de líquidos é controlado pelo estômago proximal e precede o esvaziamento de sólidos que é controlado pelo estômago distal³⁶. A presença de comidas gordas reduz a taxa de esvaziamento do estômago e o nível da atividade peristáltica.²⁸

O tamanho da partícula é um dos mais importantes parâmetros que afetam o esvaziamento de sólidos. Tamanhos de 1-5 mm podem ser esvaziados simultaneamente com o alimento, as partículas maiores devem ser reduzidas para o esvaziamento. Formas não digeríveis com diâmetro maior de 5mm são somente

esvaziados depois que a maioria dos alimentos foi esvaziado. O tempo de esvaziamento gástrico de um sistema pode ser controlado pela manutenção do estado alimentado. Para drogas que possuem um perfil de absorção com sítio específico, o lento tempo de esvaziamento pode permitir uma mais completa absorção²³.

1.6.3. Atividade enzimática

As enzimas também desenvolvem um importante papel na liberação de fármacos. Há uma variedade de enzimas no intestino que ajudam a quebrar várias substâncias.

As principais enzimas encontradas no trato intestinal são secretadas pelo pâncreas e digerem os três maiores grupos de compostos: carboidratos, proteínas e lipídios. Enzimas envolvidas no processamento de carboidratos são a α -amilase que é uma enzima salivar e pancreática e várias dissacaridasas. As proteínas são quebradas com pepsina no estômago e com tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidase, aminopeptidase e tetra, tri e dipeptidase no intestino delgado. Lipídios são metabolizados pela lipase do pâncreas e das células epiteliais bem como a colesterol esterase. A bile é secretada para ajudar na digestão de gorduras e absorção de lipídios³⁶.

1.7. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS MICROENCAPSULADOS

Embora os conceitos de microencapsulação e liberação sustentada sejam relativamente antigos, sua aplicação para a liberação controlada de proteínas e antígenos data dos anos 80⁴⁸.

Uma área onde a microencapsulação é extensamente aplicada é na indústria de sabão em pó. Alguns detergentes contêm enzimas como a protease para a remoção de manchas de sangue. As enzimas são microencapsuladas em um polímero solúvel em água como o polietilenoglicol por razões estéticas e para assegurar uma segura manipulação⁴⁹.

Historicamente, as primeiras tentativas de se modificar a liberação de um agente ativo foram alcançadas quando se revestiam pílulas para mascarar o sabor desagradável dos fármacos. Assim, eram utilizados revestimentos metálicos que, de alguma forma, retardavam a liberação do fármaco²⁶.

O primeiro relatório de um processo de microencapsulação que consistiu na preparação de microesferas de gelatina através de coacervação foi publicado em 1931. Porém, somente depois de duas décadas esta técnica foi aplicada a microencapsulação de drogas. Estas microcápsulas foram projetadas inicialmente para administração oral com três objetivos principais⁴⁸: (i) mascarar o gosto inadequado de algumas drogas^{27, 48} (ii) prevenir a degradação de drogas nos fluidos gástricos (iii) sustentar o lançamento de drogas no compartimento intestinal. Muitas destas formulações estão atualmente no mercado. Eles são compostos de polímeros não biodegradáveis do qual a droga frequentemente é lançada por um mecanismo de difusão⁴⁸.

De maneira simples, pode-se dizer que uma microcápsula é uma pequena esfera com uma parede uniforme em volta dela⁵⁰, em geral elástica e que serve para a ingestão de medicamentos dosificados⁵¹. O material no seu interior é referido como um núcleo ou fase interna enquanto a parede é às vezes chamada de cápsula, recobrimento ou membrana. A maioria das microcápsulas tem diâmetro entre poucos micrômetros até poucos milímetros⁵⁰.

Na formação de algumas microcápsulas, um sólido finamente dividido, tal como um fármaco, é suspenso em uma solução polimérica. Microcápsulas então são formadas e solidificadas. Neste caso a parede na verdade se torna uma fase contínua da partícula. O sólido agora faz parte da matriz do polímero⁵⁰.

A cápsula protege o medicamento contra as influências externas, facilita a aplicação e devido a sua boa solubilidade no organismo, libera rapidamente o medicamento. As microcápsulas e as nanocápsulas constituem produtos intermediários na fabricação de medicamentos⁵¹.

Um número grande de materiais tem sido usado como revestimento entérico. O modo de ação pode ser baseado em um mecanismo ou a combinação de mecanismos. Alguns dos primeiros revestimentos continham materiais hidrofílicos que entumescem na presença de umidade, causando uma quebra na camada do revestimento. O ideal deste mecanismo é que o material revestido começaria a entumescer no estômago mas só romperia no intestino⁵¹.

Ramaraj e Radhakrishnan produziram cápsulas de hidrogel com uma rede de polímeros interpenetrantes. Os polímeros usados foram poliacrilamida e álcool polivinílico. Esta rede polimérica foi avaliada como sistema de liberação usando os corantes violeta cristal e azul de bromotimol. Os experimentos foram feitos em 100 mL de solução tampão de fosfato, 37°C e pH 7.4²¹.

Latha et alii produziu microesferas com caseína e glutaraldeído como agente reticulador. Estas microesferas suportavam a droga 5 – fluoracil (5 –FU) que é um fármaco usado no tratamento de carcinomas do cólon, reto, estômago e pâncreas. A liberação *in vitro* da droga foi examinada em tampão fosfato na ausência e na presença de protease a 37°C. Os dados da liberação mostraram que somente 20% da droga é liberada na ausência de protease mesmo depois de 5 dias, enquanto na presença da enzima a matriz liberou completamente a 5 – FU em 24 horas²⁹.

A microencapsulação pode evitar a rejeição imunológica devido a transplantes nas ilhotas de Langerhans, células livres, células paratireóides ou células tumorais. Vandebossche et alii estudou a reação do hospedeiro contra 8 diferentes tipos de microcápsulas vazias produzidas a partir de alginato e poli-lisina.

A reação foi investigada depois das microcápsulas residirem intraperitonealmente de 4 a 28 dias⁵².

Um estudo foi feito da liberação oral da teofilina suportada em microesferas de caseína bovina reticulada com glutaraldeído. A liberação da droga foi avaliada usando fluidos gástrico e intestinal simulados, sem enzimas, à temperatura de 37°C e a cinética de intumescimento nesses biofluidos foi examinada por diferença do peso da microcápsula seca e intumescida⁵³.

As cinéticas de liberação mostraram que a liberação é muito menor no fluido gástrico do que no intestinal. Este resultado está de acordo com o esperado já que a matriz intumescerá mais a pH 7.4. Enquanto 100% da droga é liberada em aproximadamente 5 horas no fluido intestinal, no fluido gástrico ela leva 8 horas para alcançar uma liberação completa⁵³.

A natureza química de uma droga, como o seu coeficiente de partição, afeta seu perfil de liberação. O coeficiente de partição é definido como a tendência da distribuição da droga entre as duas maiores fases presentes. Jalšenjāk et alii preparou microesferas com albumina sérica humana e barbituratos pelo método de desnaturação térmica. A escolha dos barbituratos devido ao fato deles serem considerados análogos estruturais tendo propriedades gerais similares mas diferentes coeficientes de partição⁵⁴.

A encapsulação de óleos tem sido investigada por várias razões: para proteger óleos suscetíveis a decomposição por oxidação, para proteger óleos voláteis da evaporação e ajudar a encapsulação de drogas²⁷.

Rabiskova et alii selecionou um grupo de surfactantes com diferentes balanços hidrófilo/lipófilo (HLB) para investigar a influência das propriedades de óleos adicionados dentro da coacervação complexa de microcápsulas. O valor HLB de um material surfactante é medido da sua relativa hidrofiliçidade / lipofiliçidade. A adição de surfactantes com valores de HLB de aproximadamente 2-5-6 resulta em um aumento de emulsão dentro de cápsulas coacervadas. Embora surfactantes com valores de HLB acima desta média aumentem a estabilidade da emulsão, eles mudam a superfície do óleo adicionado e conseqüentemente previnem a encapsulação²⁷.

1.8. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS A PARTIR DE OUTROS SISTEMAS DE APRISIONAMENTO

Revestimentos como queratina, gelatina formalizada, óleos e gorduras dependem de quebra enzimática ou emulsificação, ajudado por sais biliares e colesterol. Revestimentos baseados somente na quebra enzimática não apresentam um bom resultado porque este mecanismo é relativamente lento²⁸.

Em estudos realizados procurou-se identificar materiais que possam ser suscetíveis para a preparação de matrizes hidrofílicas capazes de liberar drogas insolúveis em água a uma velocidade constante. As ciclodextrinas foram consideradas boas candidatas e já foram usadas para a dissolução de drogas insolúveis²⁶.

Dispersões sólidas têm sido usadas para aumentar a dissolução de drogas de muito baixa solubilidade em suportes solúveis e também para sustentar a liberação de compostos solúveis em matrizes menos solúveis. O uso de dispersões de drogas com baixa solubilidade tem sido proposto como um viável modo de produzir formas de liberação sustentada pela via parenteral com relativa baixa toxicidade. Os derivados menos solúveis dissolvem lentamente e então retardam a liberação do composto ativo. Se os derivados menos solúveis forem transformados em drogas ativas, eles então poderão suplementar a atividade da droga. A biodisponibilidade deste tipo de dispersão sólida é dependente do derivado usado, sua solubilidade e seu grau ou taxas de conversão para espécies bioativas e seu subsequente metabolismo⁵⁵.

Kohri e colaboradores propuseram um estudo para examinar a relação entre as taxas de liberação de um fármaco de grânulos de liberação sustentada e a concentração da droga no plasma de coelhos versus o tempo. Dois tipos de grânulos de liberação sustentada foram preparados: um pH dependente e outro pH independente. Estes grânulos foram administrados pela via oral à coelhos e o tempo de curso da droga no plasma foram comparados⁵⁶.

Bundgaard e colaboradores sintetizaram várias pró-drogas a partir de alquil e ésteres do ácido pilocárpico. A pilocarpina é amplamente usada como um miótico

de uso tópico para o controle da pressão intra-ocular elevada associada com glaucoma. Sua biodisponibilidade é muito baixa, somente 1 a 3% ou menos. Esta pobre biodisponibilidade tem sido predominantemente atribuída a rápida perda da droga da área pré-córnea via drenagem, a absorção conjuntiva sistêmica e a vasodilatação da droga em conjunção com a pobre permeabilidade, a droga atravessa a membrana córnea. Um outro problema associado a pilocarpina é seu curto tempo de ação. A proposta era de desenvolver pró-drogas com características que aumentem a biodisponibilidade do fármaco, ou seja, alta lipofilicidade, suficiente solubilidade aquosa e prolongamento da duração da ação da pilocarpina⁵⁷.

1.9. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS A PARTIR DE MATRIZ DE QUITOSANA

Quitossana tem atraído a atenção como uma matriz para liberação controlada por sua reatividade e funcionalidade, é facilmente degradada por enzimas e seus produtos de degradação são não tóxicos. A característica de insolubilidade da QTS em água como também em alguns solventes orgânicos comuns limita seu uso como suporte de drogas⁴³.

Em estudos recentes foram preparados suportes de quitossana reticulada com glutaraldeído e sensíveis ao pH. O grau de N-desacetilação, a quantidade de agente reticulador, a composição do eletrólito em solução e temperatura também foram estudados.⁴⁰

A reticulação da quitossana com polímeros poli-éteres foi baseada na formação complexa de ligações químicas e físicas, ou seja, suas ligações iminas e interações entre cadeias macromoleculares. As ligações de hidrogênio exibem propriedades de intumescimento que dependem do valor do pH da solução e da composição dos géis. A cinética de intumescimento de uma série de quitosanas reticuladas com glutaraldeído em uma rede interpenetrante de hidrogéis poli éteres foram estudadas em função do pH, do grau de N-acetilação da quitossana da quantidade de agente de ligação, da composição dos eletrólitos presentes, da

temperatura e da composição do gel. Neste trabalho as amostras preparadas eram em formas de finos discos com espessuras de 0.34 ± 0.02 mm e diâmetro de 11.12 ± 0.02 mm.⁴⁰

Thanoo et alli preparou microesferas de quitosana com boa geometria esférica e uma superfície lisa. As microesferas foram preparadas com diferentes graus de intumescimento através da variação da densidade das ligações. Nas microesferas foram incorporadas teofilina, aspirina ou griseofulvina. Estudou-se a influência da densidade das reticulações, do tamanho das partículas e da quantidade de fármaco incorporado no suporte nas taxas de liberação. O perfil de liberação *in vitro* das drogas foram examinadas em fluido gástrico e intestinal simulados sem enzimas⁴³.

O grau de intumescimento da microesferas foram influenciados pela extensão das reticulações induzidas. O grau de intumescimento mostrou ser o mesmo em todos os fluidos testados indicando muito pouco efeito da força iônica ou o pH do meio. A incorporação das drogas nas microesferas alterou a morfologia da superfície de modo significativo e pequenas esferas, por causa de sua grande área de contato com o meio onde ocorre a cinética de liberação, favorecem a rápida dissolução da droga em comparação com esferas maiores⁴³.

Quanto ao perfil de liberação das três drogas nos fluidos gástrico e intestinal obteve-se os seguintes resultados. No caso da teofilina a liberação foi muito rápida em ambos os fluidos e quase 95% da droga foi liberada dentro de 1 hora. A liberação da griseofulvina, que é a droga menos solúvel das três, foi muito lenta em ambos os líquidos. Enquanto a aspirina mostrou uma ligeira rapidez na liberação no fluido intestinal quando comparado com o fluido gástrico provavelmente por causa do ácido acetil salicílico que é ionizado e solubilizado no fluido levemente alcalino, pH 7.5, do intestino⁴³.

Entre todas as novas técnicas de liberação controlada, o uso de membranas é a mais promissora devido a sua habilidade para manter constante os perfis de liberação. Bonvin et alli realizou estudos de liberação a partir de membranas de quitosana incorporando drogas de diferentes pesos moleculares. A taxa de liberação foi medida em água a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ pela determinação da quantidade de droga

liberada por análise espectrofotométrica. As drogas foram acetamina, nicotinamida, benzoato de sódio, salicilato de sódio, fenobarbital de sódio e cefazolina de sódio e foram escolhidas levando em consideração seus pesos moleculares, suas solubilidades e absorção em ultravioleta.⁵⁸

A habilidade da quitosana de formar filmes tem sido objeto de alguns estudos, alguns dos quais tem levado a vários usos no campo industrial. Filmes fotográficos, membranas de osmose reversa e cosméticos podem conter significantes quantidades de quitosana⁵⁹.

Na análise do comportamento da quitosana de acordo com modificações das condições da solução tal como pH, concentração, força iônica e solvente foi feito um extensivo estudo com soluções diluídas e concentradas de quitosana e suas propriedades para formar filmes. Tais estudos mostrou que as propriedades mecânicas e microestruturais da quitosana podem ser manipuladas através das condições a que é submetida. Esses estudos também mostram que a viscosidade intrínseca $[\eta]$ é dependente da força iônica e do pH da solução de quitosana. Quando a força iônica aumenta, as repulsões eletrostáticas inter e intra-molecular entre as cadeias de quitosana são reduzidas devido ao efeito de proteção dos contra íons. Isso irá permitir que as cadeias fiquem mais próximas e então diminua a viscosidade intrínseca ou o volume hidrodinâmico das moléculas de quitosana⁵⁹.

Jameela e colaboradores produziram microcápsulas de quitosana reticuladas com glutaraldeído contendo um agente antineoplásico, o mitoxantrona. A atividade antitumoral foi analisada pela inoculação da droga livre e microencapsulada intraperitonealmente em cobaias. A maior porcentagem de cobaias que sobreviveram foram tratados com a droga microencapsulada e também mantiveram seu peso corporal. Os dados demonstraram que microesferas contendo quitosana minimizam a toxicidade da droga e maximizam a eficácia terapêutica⁶⁰.

Aspirina e heparina foram adicionados em quitosana / vinil acetato de polietileno. O perfil de liberação *in vitro* dessas drogas foi monitorado em tampão de HCl Tris com pH 7.4, usando um espectrofotômetro U. V. A quantidade inicial liberada foi maior, seguido de uma constante e lenta liberação por um longo período de tempo²⁵.

Devido as suas propriedades de não toxicidade, alta biocompatibilidade e não antigenicidade, a quitosana tem sido usada como um bom material para produção de sistemas transdérmicos. A quitosana foi usada na preparação de uma membrana de permeação de drogas pela via transdérmica e o propranolol que é uma droga usada no tratamento de arritmias cardíacas foi selecionado como modelo de drogas para o estudo em questão. As membranas com diferentes taxas de permeabilidade foram obtidas através de diferentes graus de reticulação com glutaraldeído^{7,32}.

Chen e colaboradores produziram cápsulas de quitosana para encapsulação de hemoglobina ou dextran. Neste estudo foram abordados vários parâmetros que incluem os efeitos da flexibilidade na cadeia de molécula de quitosana nas características físicas, de liberação e de preparação da cápsula⁴⁴.

Devido as características da quitosana de formar gel a baixos pH's e também de prevenir úlceras e diminuir a irritação do estômago foram preparados lipossomas e nanopartículas com ampicilina incorporada. Foi estudado a estrutura da matriz e o perfil de liberação da ampicilina. A ampicilina é um dos mais potenciais antibióticos de largo espectro usado no tratamento de infecções bacterianas. Lipossomas e nanopartículas tem despertado interesse como suportes para a liberação controlada, pois são capazes de aumentar a liberação intracelular de antibióticos³⁸.

Os microgrânulos de quitosana com ampicilina foram preparados suspendendo-se a quitosana com ampicilina em uma solução de ácido acético e de solução de NaOH. As matrizes resultantes foram secas e o tamanho médio das partículas foram de 0,1-0,5 μm ³⁸.

As fotomicrografias da morfologia da superfície das micropartículas de quitosana revelou que a superfície não é porosa e a morfologia interna pareceu ser menos lisa e ter microporos. A comparação da microcápsula com e sem o fármaco mostrou que a presença do fármaco não causa nenhuma mudança na forma, tamanho e morfologia na superfície das microesferas. A estrutura interna das microesferas mostrou que a ampicilina formou cristais de aproximadamente 10 μm e foi incorporada mais no interior da matriz do que no seu exterior³⁸.

O perfil de liberação foi estudado em solução tampão de HCl 0,1 M ou solução tampão de fosfato. Os dados mostraram uma liberação inicial devido ao efeito “burst” seguido de uma liberação constante por um período de 72 horas. A quantidade de droga liberada aumentou em função da concentração da ampicilina na matriz e a quantidade do fármaco liberado foi muito maior em solução tampão de HCl quando comparado com a solução tampão fosfato. O processo de liberação da ampicilina parece ser através de difusão com o intumescimento da matriz ou desintegração da matriz em solução de HCl. A dissolução lenta da ampicilina em solução tampão fosfato é atribuído a pouca habilidade da quitosana formar gel em pH 7,4 ³⁸.

1.10. LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS A PARTIR DE QTS-PVA E PVA

A permeabilidade e difusão da vitamina B-12 em quitosana, quitosana reticulada, e blenda de quitosana/álcool polivinílico (PVA) foram estudadas. Aparentemente o coeficiente de difusão, D , para membranas de blenda e quitosana reticulada depende somente do equilíbrio de intumescimento, Q , do material em água. Nesse trabalho foram estudadas a variação do coeficiente de difusão, o coeficiente de difusão e a taxa de intumescimento com quitosana (blenda e reticulada) ³⁴.

Microcápsulas de quitosana e PVA foram produzidas e foram estudadas a permeabilidade da riboflavina e da insulina através dessas cápsulas. Todas as medidas foram feitas a 37°C e um compartimento de uma célula foi abastecida com diferentes pH's de tampões fosfato ou com solução de glicose em tampão fosfato a pH 7.4 ⁶⁸.

A dependência da permeação com a variação do pH foi discutida em termos do conteúdo de água no interior da microcápsula devendo ocorrer um intumescimento da membrana. Nesse estudo a liberação em pH ácido

(aproximadamente 3) foi maior do que em pH básico (aproximadamente 8). A quantidade de água na membrana mostrou uma dependência do pH ⁶⁸.

Thanoo et alli produziram microesferas de PVA contendo várias drogas. Uma solução aquosa de PVA contendo várias concentrações de glutaraldeído foi dispersada como gotas em parafina líquida usando um agente estabilizante. As microesferas continham aspirina, griseofulvina ou ácido nicotínico. O estudo de liberação foi realizado em fluidos gástrico e intestinal simulados, sem enzima e a 37°C. Foi observado que devido ao aumento da densidade de ligações cruzadas da quitosana com o glutaraldeído há uma redução considerável na taxa de liberação sugerindo que o perfil de liberação pode ser controlado pela mudança na densidade das ligações da quitosana e do glutaraldeído ⁶².

1.11. LIBERAÇÃO CONTROLADA DA RIFAMPICINA

A rifampicina foi aprisionada em uma matriz de silicone e seu perfil de liberação foi estudado em 10 mL de NaCl 0.9% a temperatura ambiente, a pH 7. A solubilidade da rifampicina era de 0.28% e foram usados 30 mg de polímero. A taxa de liberação da rifampicina dependeu da quantidade de droga incorporada e mostrou dois períodos significativos. O primeiro foi chamado de efeito “burst” que é o efeito da droga dispersa na matriz, sua massa, distribuição e solubilidade dos cristais de rifampicina na superfície do polímero. O segundo período foi contínuo e após 48 horas a difusão foi controlada pela estrutura da matriz elastomérica ⁶³.

HAMPL e colaboradores estudaram a eficácia da rifampicina retida em um catéter de silicone na prevenção de colonização bacteriana no líquido cerebrospinal (LCS). A infecção é causada pelo catéter usado na retirada do LCS. O procedimento convencional para o tratamento dessa infecção é a remoção do catéter infectado, inserção de um dreno externo e depois de um intervalo de várias semanas com uma terapia de antibiótico um novo sistema de remoção do fluido é implantado. Os testes de avaliação da eficácia da liberação da rifampicina foram realizados *in vitro* e *in vivo* em cobaias ⁶⁴.

O objetivo desse estudo foi desenvolver um catéter de silicone antimicrobial com a liberação controlada do antibiótico por um longo período de tempo. O processo de incorporação da rifampicina no catéter foi desenvolvido para que a liberação da rifampicina ocorra em concentração bactericida por 60 dias ou mais. A rifampicina foi a escolhida depois de uma triagem inicial devido a seu natural hidrofobicidade comparado com a maioria dos antimicrobianos e também por sua compatibilidade com o polímero. Esse sistema mostrou-se eficiente na liberação do fármaco e conseqüentemente na prevenção da infecção tendo como inconveniente uma possível rápida resistência da bactéria a rifampicina⁶⁴.

1.12. EFICÁCIA DO TRATAMENTO DE TUBERCULOSE COM A RIFAMPICINA

Foram feitos estudos do efeito da rifampicina *in vivo* e *in vitro* na infecções por *Staphylococcus aureus*. Este estudo propôs comparar a eficácia *in vivo* e *in vitro* da rifampicina variando sua concentração contra 3 diferentes cepas de *S. aureus* onde foram observadas a ótima concentração de rifampicina necessária para alcançar a efetividade do fármaco contra a bactéria, o surgimento de resistência a rifampicina e ainda se o antibiótico vancomicina altera o desenvolvimento da resistência a rifampicina⁶⁴.

Foram comparados dois regimentos de tratamento para bacteremia complexa pelo *Mycobacterium avium* em AIDS e os fármacos usados foram Rifabutin, etambutol e claritromicina versus rifampicin, etambutol, clofazimine e ciproflaxacim. Os pacientes com AIDS e bacteremia complexa pelo *Mycobacterium avium* foram selecionados aleatoriamente e metade recebia diariamente o grupo de 4 drogas e a outra metade recebia diariamente o grupo de 3 drogas. Os pacientes que foram tratados com o grupo das três drogas (rifabutin, etambutol e claritromicina) apresentam melhora da bacteremia mais freqüentemente e mais rapidamente do que o tratamento com as 4 drogas (rifampicin, etambutol, clofazimine e ciproflaxacim)⁶⁵.

Halsey et al comparou a eficácia do tratamento da isoniazida versus rifampicina e pirazinamida na prevenção da tuberculose em pacientes HIV positivos. Foram comparados a eficácia da isoniazida durante 6 meses contra rifampicina e pirazinamida durante dois meses. Os indivíduos foram escolhidos aleatoriamente. A tuberculose desenvolveu-se em 3.8% dos participantes que foram tratados com isoniazida e 5.0% dos pacientes tratados com rifampicina e pirazinamida desenvolveram a tuberculose⁹.

Pacientes com tuberculose participaram de um estudo para avaliar a farmacocinética da rifampicina. Todos os pacientes foram programados para receber uma vez por dia, pela manhã, 600 mg de rifampicina oral estando o estômago vazio. Os resultados do estudo não confirmaram os estudos relatados em outras bibliografias¹⁷.

Atividades de vários análogos da rifampicina foram comparados no tratamento de lepra. Foram estudados a evolução de seus efeitos colaterais no crescimento *in vitro* do *Mycobacterium leprae*. A rifampicina é uma droga de primeira linha no tratamento da lepra e os resultados deste estudo sugerem que outros análogos deste fármaco são mais potentes contra cepas de *Mycobacterium leprae* sensíveis e resistentes à rifampicina⁶⁶.

O resultado da combinação de rifampicina e ofloxacina foram relatados na quimioterapia para tratamento de 60 casos multibacilares de lepra de janeiro de 1989 a setembro de 1995⁶⁷.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a liberação controlada da rifampicina após a sua microencapsulação com o sistema polimérico quitosana-pva.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação da composição da blenda polimérica, QTS-PVA, para a microencapsulação;
- Estudo das cinéticas de liberação tendo como variável as soluções onde ocorrem as cinéticas;
- Estudo da liberação da rifampicina variando a composição da blenda polimérica;
- Estudo do efeito do pH na liberação da rifampicina;
- Determinação da porcentagem da rifampicina liberada utilizando a Lei de Lambert – Beer.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS E REAGENTES

3.1.1. Equipamentos

A balança analítica usada para as pesagens de reagentes foi da marca Shangping Eletronic Balance, modelo FAI 6045. As medidas dos pH's foram feitas com o pHmetro da marca Testa Tecnologia Eletrônica Ltda., modelo TPH-2.

O espectrofotômetro do modelo U.3000, marca Hitachi e o espectrofotômetro digital Fluxo Mar com. Imp. e Exp. Ltda. modelo 724 visível foram usados para as medidas espectrofotométricas. A centrífuga utilizada para a centrifugação das amostras foi a centrífuga Sigma Laborzentrifugen GmbH 3360 Osterode, modelo 2-15 rotor 11192.

Para a produção das emulsões poliméricas e das blendas foi usado agitador magnético, marca Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda. , modelo AMA 102 e banho termostatizados modelo MQBTZ 99-20 – Microquímica Ind. Com. Repr. Ltda.

Para a análise da morfologia interna e externa da microcápsula foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Philips, modelo XL 30, do Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

3.1.2. Reagentes

A quitosana foi adquirida da KITO-Química Fina Ltda. e foi purificada posteriormente como será descrito adiante. O álcool polivílico foi adquirido da MERCK CHEM. Os demais reagentes de natureza analítica tais como, ácido clorídrico, ácido acético, hidróxido de sódio, sulfato de sódio, foram adquiridos da VETEC Química Fina Ltda.

O fármaco rifampicina usado no tratamento dos doentes e comercializado pela Industria Farmacêutica Brasmédica foi doado através do Prof. Dr. Cláudio Costa Neto, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. O soro fisiológico foi adquirido da marca Soro Fisiológico F da JP Indústria Farmacêutica.

3.1.3. Soluções

Solução coagulante

A solução usada para a produção das microcápsulas é denominada de solução coagulante e consiste de uma solução de sulfato de sódio 20% p/v. O pH medido foi de 6,9⁶⁸.

Soluções utilizadas na liberação da rifampicina

O monitoramento do fármaco liberado ocorreu em diferentes soluções. Foram usadas soluções de sulfato de sódio 10% p/v, soro fisiológico comercial 0,9% de solução isotônica de NaCl em diferentes pH's , ajustados com solução concentrada de HCl e NaOH.

Após a determinação de força iônica do soro fisiológico comercial foram feitas soluções com mesma força iônica de 0,154 M do soro. As soluções foram NaCl (P.A.), 0,9% e sulfato de sódio 0,051M que também foram usadas para monitorar a liberação do fármaco.

Solução de rifampicina

Foram preparadas diferentes soluções de rifampicina para a determinação da absorvância molar, o ϵ . A partir da solução estoque de concentração $1,94 \cdot 10^{-4}$ M foram feitas 5 diluições e suas respectivas absorvâncias foram determinadas.

3.2. MÉTODO

3.2.1. Purificação da quitosana

A purificação da quitosana foi feita dissolvendo-se 15g de quitosana em 600 mL de ácido acético 5% e mantendo-se sob agitação constante até que esta solução ficasse bem dissolvida. Após esta etapa, a solução resultante foi filtrada e reprecipitada com NaOH 1M. O precipitado foi lavado com água destilada até pH neutro sob filtração a vácuo. Quando atingiu-se o pH desejado, a quitosana foi lavada com acetona e colocada na estufa na temperatura de 60°C. Após a quitosana ter secado, foi moída e peneirada em peneira de 100 mesh.

3.2.2. Determinação do grau de desacetilação

O grau de desacetilação, isto é, o teor de NH₂ da quitosana foi determinado por titulação potenciométrica pelo método de Broussignac⁶⁹. O método envolve a titulação da quitosana em presença de um excesso de ácido forte, com NaOH 0.1 M. Foram dissolvidas 2,0g de QTS em 20 mL de HCl 0,300 M e diluída com 200 mL de água destilada. A titulação foi levada até o volume final de 100 mL de NaOH.

O teor de NH₂ foi calculado a partir da equação de Broussignac, equação 1, na qual os volumes inicial e final foram obtidos graficamente. O grau de desacetilação calculado foi de 83,66% de NH₂.

$$\%NH_2 = 16,1(V_2 - V_1) \times \frac{M_b}{W} \quad \text{Equação 1}$$

Na equação V₁, V₂, W e M_b representam respectivamente o volume de base referente ao primeiro ponto de equivalência, o volume de base referente ao segundo

ponto de equivalência, o peso original do polímero em gramas e a molaridade da base.

3.2.3. Preparação da blenda QTS-PVA

Para a preparação da blenda foram feitas separadamente duas emulsões poliméricas. Na emulsão de QTS dissolveu-se uma massa de quitosana 83,66% desacetilada em quantidade que variou, conforme Tabela 1, em 50 ml de ácido acético 5% v/v sob agitação constante, sistema fechado e temperatura não superior a 60°C. Na emulsão de PVA dissolveu-se a massa do polímero que variou, conforme a Tabela 2, em 50 ml de H₂O, também sob agitação constante e temperatura não superior a 60°C. Após as emulsões de QTS e PVA estarem prontas, elas foram misturadas e mantidas sob agitação durante 8 horas.

A Figura 3 mostra um sistema de produção de blenda onde temos uma cela, sobre um agitador magnético, com solução de quitosana e solução de PVA. Essa cela está acoplada a um banho termostatizado que mantém a temperatura constante em 60°C e um condensador para evitar a perda de líquido.

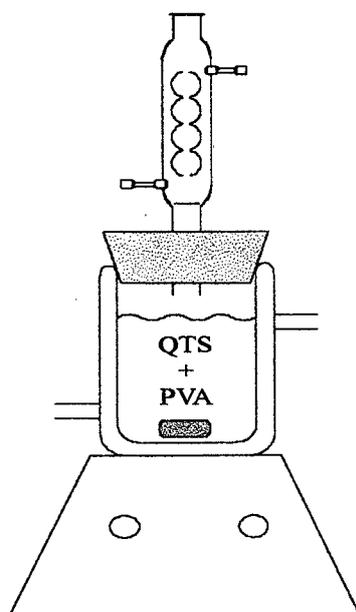


Figura 3. Sistema de produção de blenda polimérica.

Para o estudo da influência da composição da blenda na liberação da rifampicina foram preparadas diferentes blendas, em sistema fechado mantendo-se a temperatura e a agitação constante, onde variou-se a porcentagem dos polímeros.

A proporção de QTS foi variada mantendo-se a massa de PVA constante em 6,8 g. A composição inicial denominada 100% , corresponde à blenda contendo 6,8 g de PVA e 0,7 g de QTS ⁷⁰. Os demais percentuais se aplicam à massa inicial de QTS, conforme a Tabela 1. A cada composição da blenda procedeu-se uma nova preparação de emulsões e foi seguida toda a metodologia descrita anteriormente.

Tabela 1. Variação da massa de QTS na blenda QTS-PVA.

% QTS	m _{PVA} (g)	m _{QTS} (g)
90	6,8	0,630
80	6,8	0,560
75	6,8	0,525
70	6,8	0,490
60	6,8	0,420
50	6,8	0,350

O efeito da variação de PVA na blenda foi estudado mantendo-se constante a massa de QTS em 0,7 g conforme a Tabela 2. De forma similar, as blendas com variação de PVA foram preparadas a partir da mistura de emulsões contendo as massas respectivas de QTS e PVA , conforme descrito anteriormente.

Tabela 2. Variação da massa de PVA na blenda QTS-PVA.

% PVA	m _{PVA} (g)	m _{QTS} (g)
90	6,1	0,700
75	5,1	0,700
65	4,4	0,700
55	3,7	0,700
50	3,4	0,700

3.2.4. Preparação das microcápsulas

A preparação das microcápsulas foi feita pelo método da coacervação salina, “salting-out”⁶⁸, partindo-se de 1 mL de blenda que após ser colocada em uma seringa descartável de 5 mL com agulha de 0,7 x 30 mm foi gotejada manualmente em uma cela acoplada a um banho termostaticado, conforme Figura 4, que continha 100 mL de solução coagulante. Foram adicionados 12 mL de álcool etílico para evitar que as microcápsulas coalescessem. As microcápsulas foram mantidas sob agitação constante por 1 hora e 30 minutos e temperatura de 30°C também constante. Cada 1 mL de blenda produz em média 100 microcápsulas e é denominada de batelada.

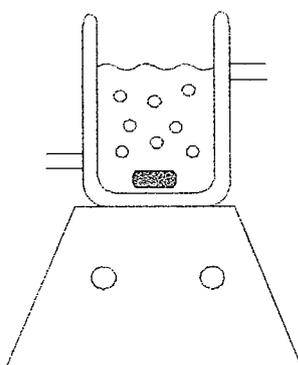


Figura 4: Sistema utilizado na produção de cápsulas

3.2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das microcápsulas, interna e externa, vazia e com a rifampicina microencapsulada, foi investigada através de fotomicrografias da Microscopia Eletrônica de Varredura do laboratório de materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. As amostras congeladas e então seccionadas transversalmente, coladas em estabes, recobertas com ouro e analisadas através da microsonda de energia dispersiva de raio-X-EDS.

3.2.6. Microencapsulação

3.2.6.1. Processo de microencapsulação da rifampicina

A microencapsulação da rifampicina foi feita a partir da adição de 30 mg do fármaco sólido em 1 mL de blenda QTS-PVA colocada na seringa seguida da homogeneização de ambos. Após esse procedimento, a coacervação da batelada de microcápsula com a rifampicina incorporada é feita como descrito anteriormente.

3.2.6.2. Cálculo da rifampicina microencapsulada

Após terminada a coagulação da batelada de microcápsulas com rifampicina microencapsulada, as microcápsulas eram retiradas da solução coagulante e transferidas para a solução de monitoramento de liberação do fármaco.

A absorvância da solução coagulante era determinada, através de espectrofotometria, e a concentração de rifampicina que tinha se dispersado na solução durante o processo de coagulação era calculada a partir da equação de Lambert Beer, Equação 2. A partir da equação da concentração molar calculou-se a massa da rifampicina na solução e por diferença, Equação 3, foi determinado a

massa de fármaco que permaneceu na batelada de microcápsulas após terminada a coagulação. Esta massa era calculada para cada nova batelada produzida.

$$Abs. = \epsilon.C.x$$

Equação 2

$$m_{microencapsulada} = 30mg - m_{dissolvida \ na \ coagulação}$$

Equação 3

Na Equação 2, a abs., ϵ , C e x são respectivamente a absorbância obtida da solução, o coeficiente de absorção molar do fármaco, a concentração molar da rifampicina liberada e a dimensão da cubeta usada na leitura da absorbância.

3.2.6.3. Variação da massa de rifampicina incorporada a blenda

A influência da massa de rifampicina no processo de liberação foi estudada variando a quantidade de rifampicina incorporada a blenda. Foram feitas 3 bateladas de microcápsulas com a blenda 50% de PVA onde as quantidades de fármaco incorporado foram 10 mg, 20 mg e 30 mg. A coacervação das microcápsulas seguiu como descrito anteriormente e o cálculo da massa de rifampicina microencapsulada ocorreu como descrito no item 3.2.6.2.

3.2.7. Liberação da rifampicina

3.2.7.1. Controle da liberação da rifampicina

Após terminada a coacervação, as microcápsulas foram transferidas para um sistema fechado, conforme Figura 5, a fim de se acompanhar a liberação do fármaco. O sistema consistia de um balão de três bocas que continha 50 mL de uma

das soluções utilizadas na liberação do fármaco. A temperatura foi mantida constante em 36°C por um banho termostatizado. Alíquotas de 3 mL foram retiradas, após homogeneização, da célula reacional em diferentes tempos, centrifugadas por 10 min a 8.000 rpm. Após medida a absorbância, a alíquota era devolvida à célula reacional. A medida colorimétrica do sobrenadante foi feita acertando o zero da absorbância com o branco da solução onde estava ocorrendo a liberação. A absorbância foi plotada versus o tempo, obtendo-se as curvas cinéticas de liberação.

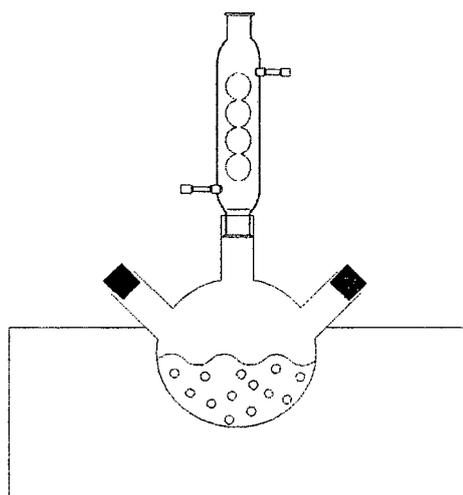


Figura 5. Sistema utilizado para o acompanhamento da liberação da rifampicina

3.2.7.2. Cálculo da porcentagem da rifampicina liberada

A absorbância extraída da curva cinética de liberação foi usada no cálculo da massa da rifampicina liberada na solução de liberação. A absorbância foi convertida para concentração de acordo com a Equação 2, seguida da conversão para massa de rifampicina liberada (m_{liberada}). O cálculo da porcentagem de rifampicina liberada foi calculado a partir da Equação 4.

$$\% \text{ de RFP liberada} = \frac{m_{\text{liberada}}}{m_{\text{microencapsulada}}} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Para o processo de liberação as absorbâncias foram extraídas da curva cinética no tempo de 1 hora de controle da liberação. Na liberação em solução de Na₂SO₄ 10% p/v a absorbância corresponde ao platô da curva cinética de liberação.

3.2.8. Rifampicina

3.2.8.1. Influência do pH na absorbância da rifampicina

Uma das variáveis que estudamos foi a liberação do fármaco em diferentes pH's, devido ao fato que quando administramos um remédio por via oral, este passa por várias condições em nosso organismo e uma condição importante são os diferentes pH's do trato gastrointestinal.

Assim, estudamos previamente através da leitura da absorbância a λ igual a 476 nm se a variação do pH's modificava a absorbância da rifampicina. Foi feita uma solução estoque $3,6 \cdot 10^{-4}$ M de rifampicina com pH inicial de 6,9. A partir desse pH, foram feitos ajustes de pH, com a adição de uma solução concentrada de HCl. A cada pH atingido era feita a leitura da absorbância. Foram determinadas um total de 6 leituras de absorbâncias que variaram de pH 6,9 a 2,0.

3.2.8.2. Determinação do coeficiente de absorção molar (ϵ)

A partir dos resultados encontrados no estudo da influência do pH na absorbância da rifampicina determinou-se o ϵ nos pH's 2,0, 3,0 e 6,9. Foram feitas 5

diluições para cada pH a partir de uma solução estoque de concentração igual a $3,6 \cdot 10^{-4}$ M.

3.2.8.3. Reversibilidade da absorvância da rifampicina

O estudo da reversibilidade da absorvância da rifampicina foi realizado com uma solução aquosa do fármaco que teve seu pH medido e variado aleatoriamente com a adição do ácido clorídrico e hidróxido de sódio. A cada pH atingido era lido a absorvância da solução.

3.2.9. Influência da espécie salina na liberação da rifampicina

A influência da espécie salina na cinética de liberação foi estudada com três soluções de forças iônicas iguais que foram as soluções de NaCl (P.A) 0,9%, soro fisiológico comercial e uma solução de Na_2SO_4 de concentração de 0,154 M. O procedimento de liberação foi feito como descrito anteriormente.

3.2.10. Estudo da reusabilidade das cápsulas

A reusabilidade foi feita com uma batelada de microcápsulas produzida com a blenda com 75% de QTS. Após a primeira cinética de liberação em solução de Na_2SO_4 10% p/v, as microcápsulas foram retiradas do meio de liberação por filtração com gaze e armazenadas e secas á temperatura ambiente e então seguiu-se a segunda cinética em nova solução de Na_2SO_4 10% p/v. O cálculo das massas liberadas foi feito conforme descrito anteriormente, item 3.2.7.2, página 48.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A rifampicina é um fármaco amplamente utilizado no tratamento da tuberculose e a sua administração ocorre por via oral e tem como consequência dessa via de administração a sua passagem através do trato gastrointestinal por vários pH's. Assim, neste estudo, procuramos nos aproximar das condições corporais, em relação ao pH, estudando a liberação da rifampicina em diferentes pH's em solução de soro fisiológico. O sistema polimérico utilizado tem a quitosana como o principal polímero, por ser biodegradável e conferir as características necessárias para o processo de liberação.

4.1. RIFAMPICINA

4.1.1. Influência do pH na absorbância da rifampicina

Como já foi mencionado anteriormente, página 24, o pH dos fluidos nos vários segmentos do trato gastrointestinal pode promover um estímulo do meio para a resposta de liberação de drogas. Objetivando estudar o efeito do pH na liberação do fármaco, procurou-se inicialmente observar se o pH influenciaria a absorbância de uma solução de rifampicina. Assim, variamos o pH de uma solução de rifampicina de concentração $1,45 \cdot 10^{-4} \text{M}$ com a adição de HCl concentrado. A faixa de variação de pH foi de 6,9 a 2,0 e foi adicionado ácido concentrado para minimizar a diluição da solução de rifampicina.

Tabela 3: Absorbância da solução de rifampicina em função da variação de pH.

pH	Absorbância
6,9	0,514
6,0	0,511
5,1	0,509
4,1	0,504
3,1	0,462
2,1	0,377

Na figura 6 podemos observar o gráfico da absorbância em função do pH.

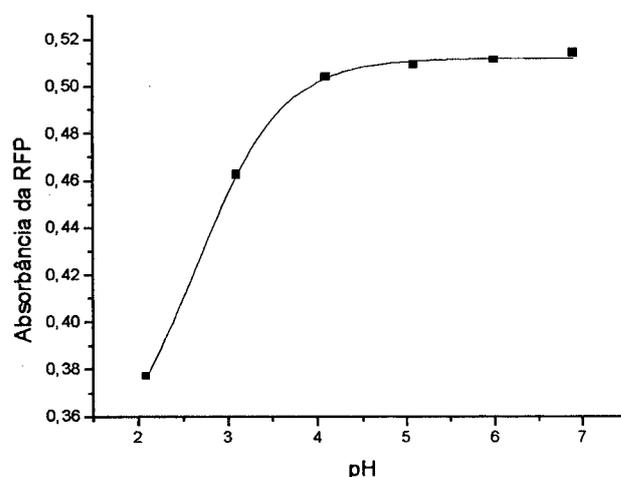


Figura 6. Absorbância da solução de rifampicina versus pH.

Foi observado que nos o pH's 2,0 e 3,0 a absorbância do fármaco é menor que em pH acima de 4,0, Tabela 3. Do pH inicial da solução de 6,9 até pH 4,0 podemos considerar a existência de um platô, ocorrendo um decréscimo da absorbância nos pH's 3,0 e 2,0.

Este resultado originou a dois outros estudos o primeiro com a finalidade de investigar se a menor absorbância observada nos pH's 2,0 e 3,0 é devido a uma

degradação do fármaco e o segundo para calcular o coeficiente molar da rifampicina em diferentes pH's.

O mesmo perfil de liberação foi observado no estudo da liberação oral de teofilina suportada em caseína bovina onde as menores liberações ocorreram em fluido gástrico enquanto no fluido intestinal a liberação foi maior⁵³.

4.1.2. Determinação da coeficiente de absorção molar (ϵ)

Após a verificação no estudo anterior que a absorbância da rifampicina era afetada nos diferentes pH's, foi necessário a determinação da coeficiente de absorção molar da rifampicina. Foram determinados os ϵ nos pH's 2,0, 3,0 e 6,9. A escolha do pH 6,9 foi devido ao fato que o pH da solução coagulante era de 6,9 e também por este pH se encontrar no platô da absorbância como é verificado na Figura 6.

O ϵ nos pH's 2,0, 3,0 e 6,9 foram respectivamente $9\ 186,70\ \text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $11\ 824,11\ \text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $13\ 490,78\ \text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, conforme apresentados na Figura 7.

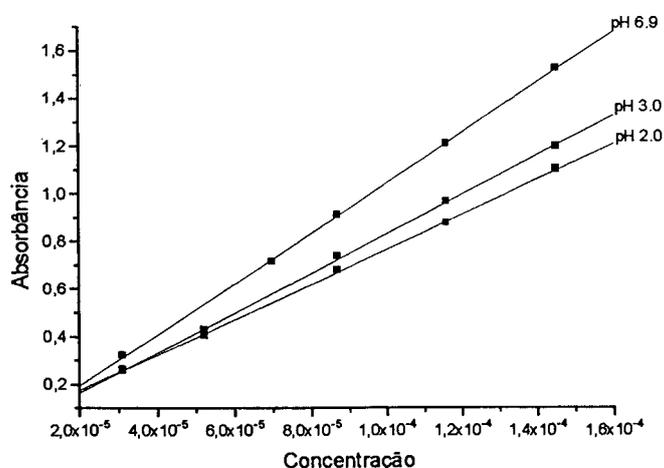


Figura 7. Determinação dos ϵ . Absorbância versus concentração.

Para qualquer estudo realizado a pH acima de 4,0, isto é, no platô da Figura 6, foi utilizado o ϵ de $13\,490\text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.1.3. Reversibilidade do coeficiente de absorção molar

Como observado anteriormente, houve variação da absorbância da rifampicina nos pH's 2,0 e 3,0 e procurou-se verificar se o pH causava a decomposição da rifampicina.

Foi feito o estudo sobre a reversibilidade da absorbância do fármaco em função do pH, onde foi observado que após mudanças do pH aleatoriamente, acidificando e basificando a solução aquosa de rifampicina, observou-se que a estrutura da rifampicina não era alterada uma vez que não ocorreu deslocamento do $\lambda_{\text{máx.}}$, conforme a Figura 8.

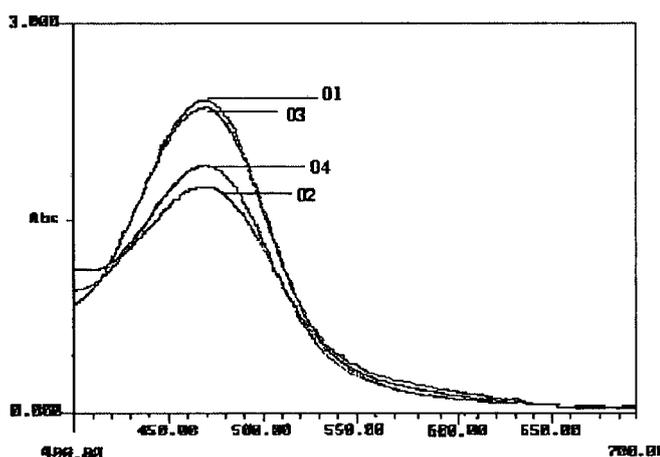


Figura 8: Reversibilidade do coeficiente de absorção molar em função do pH.
pH 9,8 → espectro 01, pH 2,0 → espectro 02, pH 11,0 → espectro 03, pH 3,0 → espectro 04

Inicialmente obteve-se o espectro da rifampicina a pH 9,8 (espectro 1), em seguida foi adicionado gotas de uma solução concentrada de HCl à solução até o pH atingir 2,0 (espectro 2), adicionando-se então gotas de uma solução concentrada de

NaOH até pH 11,0 (espectro 3) e finalmente foi atingido o pH 3,0 pela adição de HCl (espectro 4). Podemos atribuir esta reversibilidade à presença de um equilíbrio ácido-base na rifampicina.

4.2 EFEITO DA VARIAÇÃO DE QTS NO PROCESSO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DA RIFAMPICINA

O estudo da liberação de rifampicina variando a quantidade de quitosana na blenda apresentou uma cinética de liberação de acordo com a Figura 9. A liberação foi monitorada em solução de Na₂SO₄ 10% p/v por um período aproximado de 60 horas e nas primeiras 17 horas a cinética de liberação ocorreu de forma contínua e após esse período atingiu um platô.

A Figura 9 é um exemplo de uma cinética de liberação com blenda de composição de 90% de QTS. A porcentagem liberada neste caso específico foi de 28,4% a um pH de 6,9 corresponde ao pH do meio de liberação. Esta porcentagem de liberação corresponde ao platô da curva cinética de liberação. Essa cinética de liberação foi acompanhada por um período de aproximadamente 60 horas e as cápsulas se mantiveram inteiras por todo esse período devido ao meio de liberação ter sido Na₂SO₄ 10% p/v onde cápsulas não coalescem.

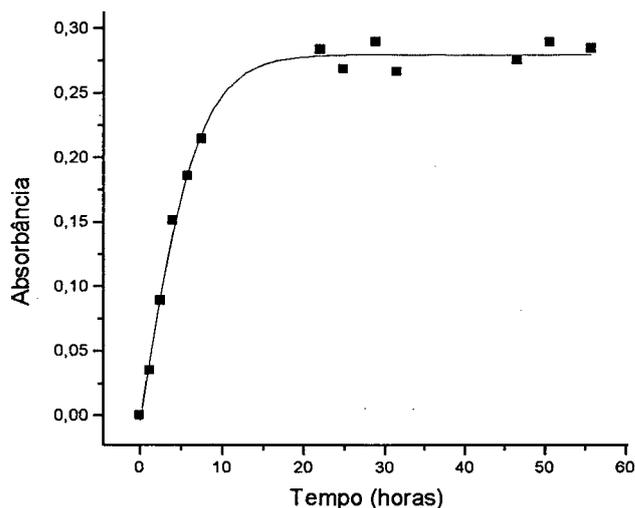


Figura 9. Cinética de liberação de rifampicina microencapsulada com blenda 90% de QTS

A porcentagem de rifampicina liberada foi calculada utilizando-se a Equação 4, página 49, a partir da leitura da absorbância no platô da curva cinética de liberação. Na Tabela 4 estão as porcentagens de rifampicina liberada em função da variação de QTS.

Tabela 4. Porcentagem de rifampicina liberada em função da variação da massa de QTS a pH 6,9.

% QTS	% liberada
90	28,4
80	20,0
75	24,0
70	20,0
60	18,0
50	11,2

Na análise do perfil de liberação com blendas de concentração de QTS variada observa-se que a diminuição da massa de QTS na blenda afeta a liberação da rifampicina, havendo uma diminuição da droga liberada, Figura 10.

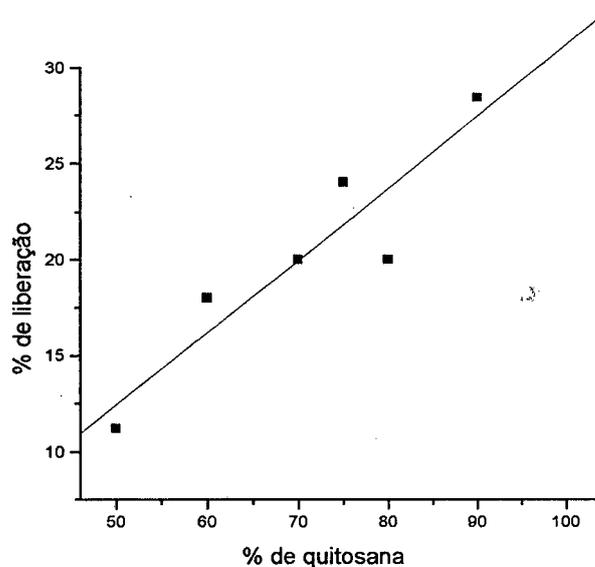


Figura 10. Porcentagem de liberação da rifampicina em Na_2SO_4 10% p/v em função da composição de QTS na blenda a pH 6,9.

Considerando que a QTS é um polímero catiônico e que o processo de liberação ocorreu a pH igual a 6,9, a Figura 10 reflete a ação da quantidade de QTS na blenda. À medida que aumenta o número de grupos NH_2 está se aumentando o número de interação entre a água e o suporte havendo um maior intumescimento da cápsula aumentando, assim, a porcentagem de rifampicina liberada.

4.3. EFEITO DA VARIAÇÃO DE PVA NO PROCESSO DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DA RIFAMPICINA

A cinética de liberação de rifampicina com variação de PVA apresentou o mesmo comportamento que a cinética de liberação com blenda com variação de QTS, ou seja, observa-se que até aproximadamente 17 horas a microcápsula libera

continuamente a rifampicina e após esse tempo a liberação alcança um platô. A liberação foi monitorada também em solução de Na₂SO₄ 10% p/v.

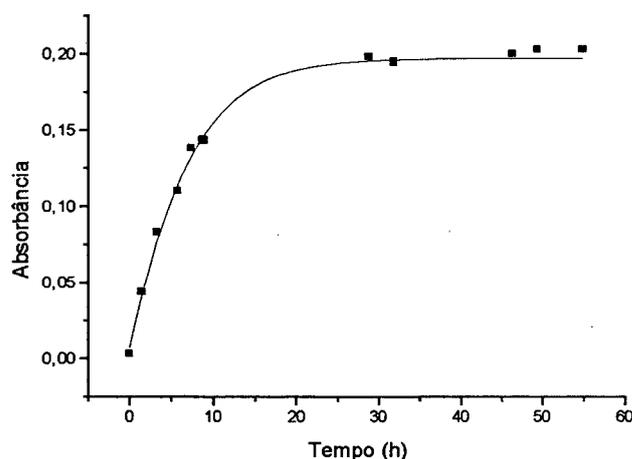


Figura 11. Cinética de liberação de rifampicina na blenda 90% de PVA

A Figura 11 mostra a cinética de liberação de rifampicina com blenda 90% de PVA. O cálculo da quantidade de fármaco liberado foi a partir da leitura da absorbância no platô, utilizando-se a Lei de Lambert – Beer conforme descrito na seção 3.2.7.2.

A porcentagem de rifampicina liberada foi calculada a partir da leitura da absorbância no platô da curva cinética de liberação. Na Tabela 5 estão as porcentagens de rifampicina liberada em função da porcentagens de PVA. Na Figura 12 observa-se que a variação da proporção de PVA na blenda apresenta um comportamento diferenciado, afetando pouco o processo de liberação. Os altos percentuais de liberação nas proporções de 50% e 55% de PVA, podem ser atribuídos a uma menor espessura da parede das cápsulas e não a uma ação específica do PVA. Cápsulas com porcentagens menores de PVA não foram produzidas devido a ao fato de não ser possível obter cápsulas com um mínimo de resistência para o acompanhamento das cinéticas.

Tabela 5. Porcentagem de rifampicina liberada em função da variação da massa de PVA em pH 6,9.

% PVA	% liberada
90	24,00
75	23,48
65	23,20
55	32,21
50	31,16

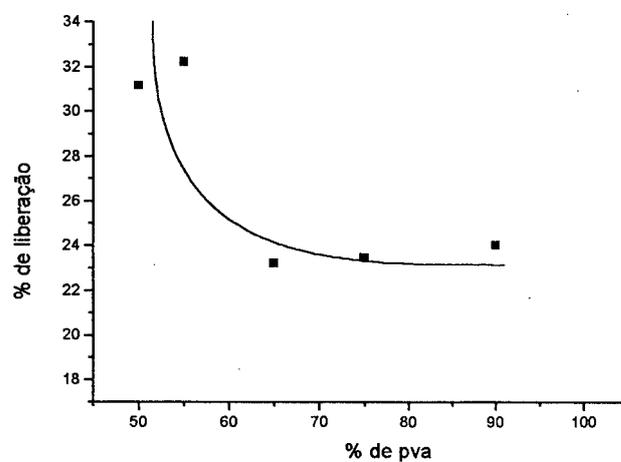


Figura 12. Porcentagem de liberação da rifampicina em Na_2SO_4 em função da composição de PVA na blenda a pH 6,9.

4.4. ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÁPSULAS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As fotomicrografias das microcápsulas que foram congeladas antes do corte, sua superfície, morfologia externa e interna, com e sem rifampicina são mostradas nas figuras a seguir. As microcápsulas foram preparadas com blenda 70% de QTS e incorporado 30 mg de rifampicina ao sistema polimérico.

Na Figura 13 observamos a morfologia externa de uma microcápsula sem a rifampicina microencapsulada.

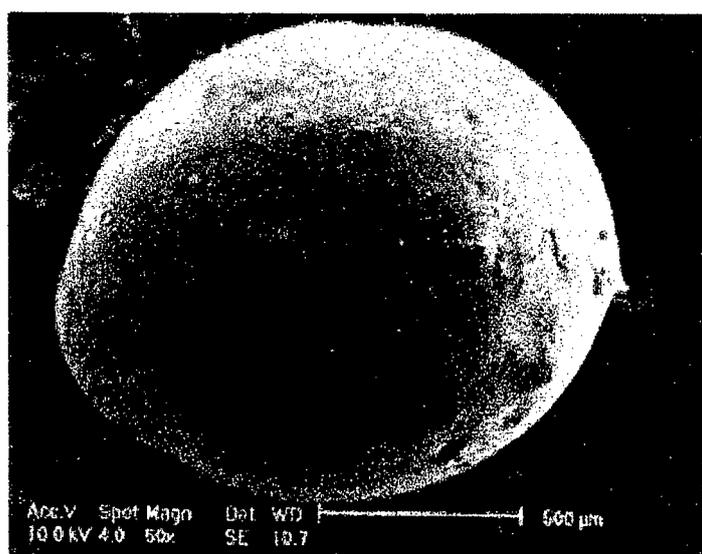


Figura 13 : MEV de uma microcápsula vazia e congelada antes do corte.

As cápsulas não passaram por nenhum processo de endurecimento da sua superfície. Na Figura 14 observa-se a forma irregular da microcápsula e isto é devido ao manuseio da mesma. Quando colocadas novamente em solução salina de Na_2SO_4 , as cápsulas retornam ao seu formato esférico. Em solução não salina as cápsulas coalescem.

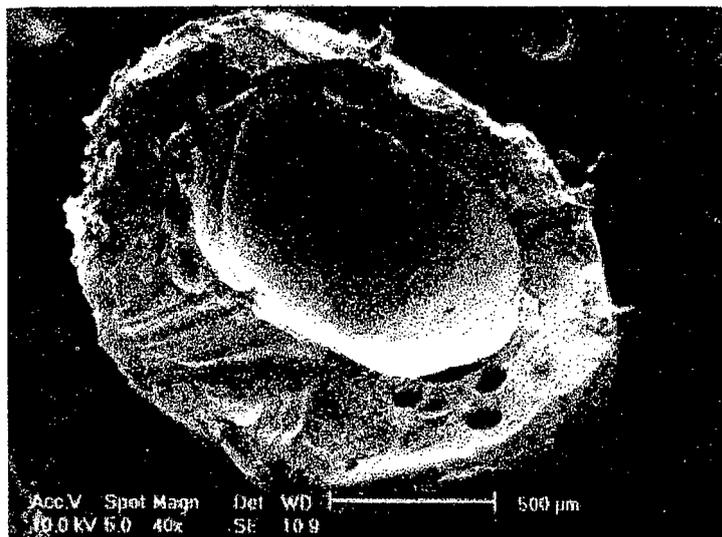


Figura 14: MEV de uma microcápsula seccionada sem rifampicina microencapsulada.

O processo de coacervação salina produz cápsulas esféricas e porosas como observamos na Figura 13 e com núcleos bem definidos, Figura 14. Conforme Miguez et alii os poros das cápsulas não possuem uniformidade e as cápsulas permitem a retenção de espécies de alto peso molecular e a permeação de moléculas pequenas, sendo útil no caso de microencapsulação de enzimas⁶⁸.

Na Figura 15 podemos observar a morfologia da parede interna de uma microcápsula sem rifampicina microencapsulada e comparar com a Figura 16 onde observamos pequenos aglomerados que atribuímos serem de rifampicina que, no processo de coagulação, incorpora-se na parede da microcápsula.

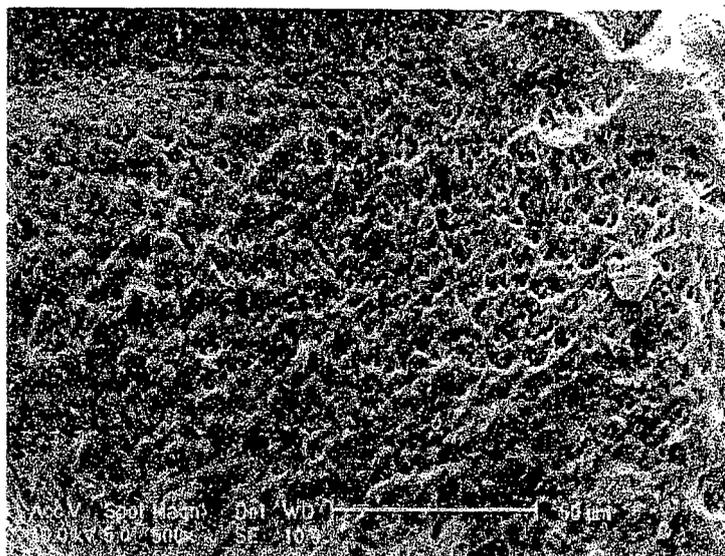


Figura 15: MEV da parede de uma microcápsula sem rifampicina microencapsulada.

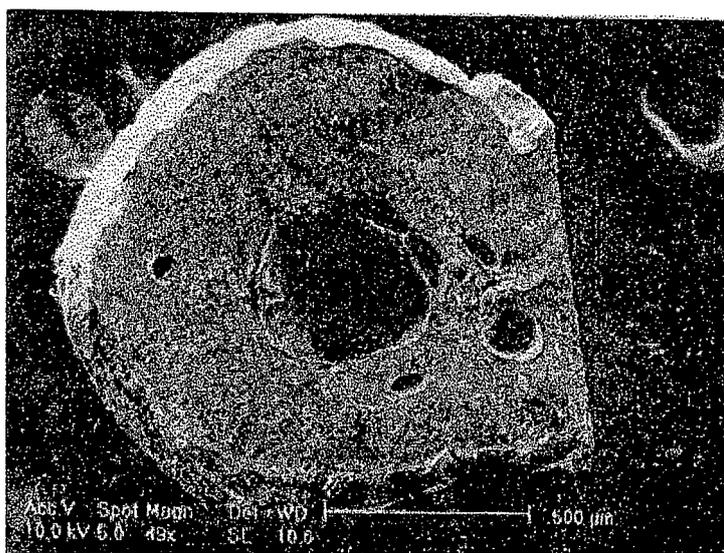


Figura 16: MEV da superfície interna de uma microcápsula com rifampicina microencapsulada.

Na Figura 17 e 18 podemos observar mais detalhadamente os aglomerados de rifampicina. Estes aglomerados se formam devido ao fato de que a rifampicina foi incorporada à blenda na sua forma cristalina. Outros trabalhos incorporaram seu encapsulado na forma líquida o que confere à cápsula uma homogeneidade da sua parede com seu encapsulado⁷⁰.

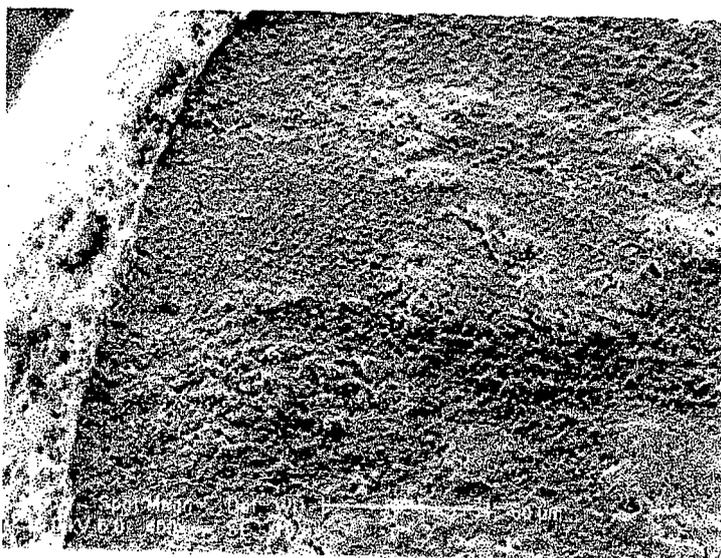


Figura 17: MEV da parede interna da microcápsula com a rifampicina microencapsulada.

A escolha de se encapsular a rifampicina no seu estado sólido foi devido ao fato de que dessa forma não estaríamos alterando a composição da blenda. Incorporamos ao sistema polimérico 30 mg de rifampicina e caso fosse incorporado essa quantidade de fármaco em solução, a viscosidade da blenda teria sido alterada ou teríamos que optar por uma massa de rifampicina muito inferior a 30 mg.

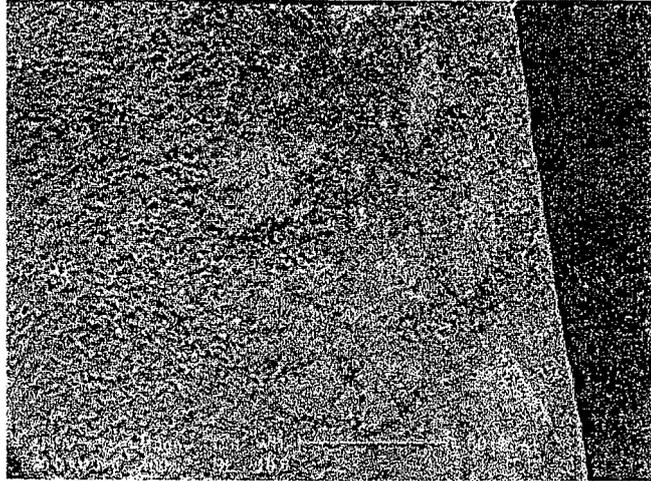


Figura 18: MEV da parede de uma microcápsula com rifampicina microencapsulada.

A rifampicina possui baixo peso molecular, comparando-se com o polímero e com outras espécies já encapsuladas, e não fica retida no núcleo da cápsula e sim na sua parede, sofrendo um processo de difusão ao longo da parede. No caso de encapsulação de material de alto peso molecular como no caso da urease não purificada, esta fica retida no núcleo da cápsula, não sofrendo difusão⁶⁸. A difusão é um processo complexo, resultante da somatória de diversos fatores que a influenciam, tais como a difusividade do agente ativo no polímero, solubilidade do agente ativo no polímero, coeficiente de partição entre o meio e o polímero, quantidade do agente ativo e outros fatores como o design da matriz e a camada de difusão hidrodinâmica²⁶.

4.5. LIBERAÇÃO CONTROLADA DA RIFAMPICINA MICROENCAPSULADA EM SORO FISIOLÓGICO

Objetivando o estudo da liberação da rifampicina microencapsulada em um meio próximo do fisiológico foi feito o estudo da liberação da droga em soro fisiológico comercial cuja concentração era de 0,9% de solução isotônica de NaCl.

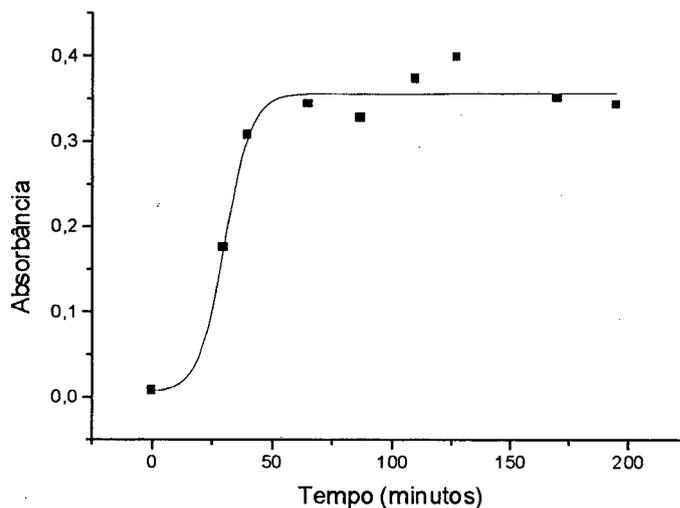


Figura 19. Liberação da rifampicina em soro fisiológico

A Figura 19 representa uma curva cinética do processo de liberação da rifampicina, a pH 6,4 e blenda 100% de QTS, durante 195 minutos. Os valores de absorbância estão relatados na Tabela 6. Para o estudo da liberação da rifampicina em função do pH, foi feito uma cinética de liberação para cada pH desejado à temperatura de 36°C.

Tabela 6: Absorbância da solução de liberação em função do tempo.

Tempo (minutos)	Absorbância
0	0.007
30	0.175
40	0.307
65	0.344
87	0.328
110	0.373
127	0.389
170	0.349
195	0.342

A quantidade de rifampicina liberada foi calculada a partir da absorbância no tempo de 1 hora de cada cinética. Para cada pH foi realizado uma curva cinética. Através do gráfico obtido podemos observar que a liberação ocorre até aproximadamente 50 minutos e após esse tempo a liberação alcança um platô. A leitura da absorbância ocorreu até 200 minutos pois após esse tempo, em soro fisiológico, a microcápsula coalesce. Isto se deve a baixa concentração salina da solução e também ao pH de 6,4 do soro. Neste pH a microcápsula possui baixa estabilidade. O processo de liberação foi acompanhado á temperatura de 36°C. Esta temperatura foi escolhida por ser a temperatura corporal.

4.6. CONTROLE DE LIBERAÇÃO DA RIFAMPICINA EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH

O efeito do pH na liberação da rifampicina, Figura 20, foi estudado entre os pH's 2,0 e 6,9, em soro fisiológico. Este gráfico foi construído a partir da curva cinética de liberação nos pH's estudados onde foi determinado a porcentagem de

rifampicina liberada após decorrido uma hora de liberação, como está descrito no item 3.2.7.2., página 48. A Tabela 7 está apresentando os valores da porcentagem de liberação em função do pH. No estudo da influência do pH foi observado uma menor liberação da rifampicina nos pH's 2,0 e 3,0. Essa baixa liberação pode ser atribuída a interação iônica entre a rifampicina microencapsulada e o suporte polimérico.

Uma menor liberação em pH ácido também foi observado no estudo da liberação de teofilina a partir de microesferas de caseína em fluido gástrico e intestinal simulados, a pH 1,5 e pH 7,4 respectivamente⁵³.

Microesferas de caseína reticuladas com glutaraldeído liberaram somente 20% de 5-fluoracil incorporado no suporte. A liberação ocorreu em tampão fosfato e na ausência de protease.²⁹

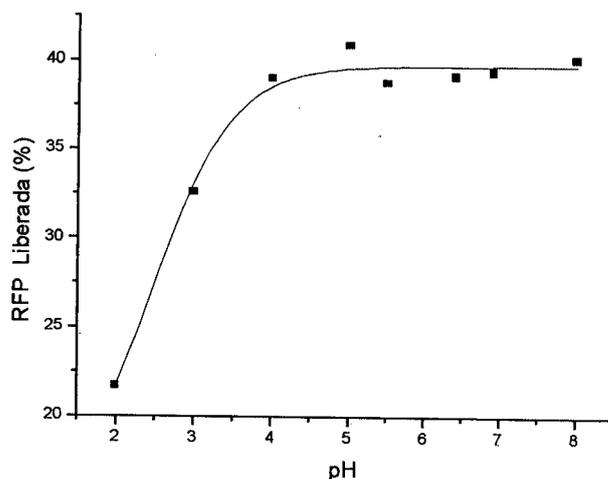


Figura 20: Rifampicina liberada em função do pH

Tabela 7 : Porcentagem de liberação em função do pH

pH	% de liberação
2	21,66
3	32,56
4	39,01
5,5	38,73
6,4	39,11
6,9	39,37
8	40,10
5	40,85

A quitosana é um suporte catiônico com alta densidade de carga positiva. Com materiais carregados negativamente a quitosana interage fortemente levando a uma neutralidade elétrica⁷¹. A curva de titulação da quitosana nos indica que esta possui um ponto de equivalência em pH aproximadamente 4⁷⁰.

Por outro lado, como a rifampicina apresenta pK_{a1} de 1,7, a pH 2,0 e 3,0 estaria presente na forma básica, enquanto o suporte de quitosana estaria na forma ácida nestes pH's, apresentando assim uma interação iônica entre as espécies, diminuindo a porcentagem de liberação do fármaco. Acima de pH 4,0, o suporte estaria desprotonado, em que os grupos amino, NH_2 , da quitosana exerceria uma menor atração sobre o fármaco facilitando, assim, a sua liberação.

4.7. VARIAÇÃO DA MASSA DE RIFAMPICINA INCORPORADA À BLENDA

No estudo da variação da massa de rifampicina incorporada à blenda previamente à produção de cápsulas observou-se que quanto maior a massa é incorporada à blenda, maior é a liberação da rifampicina. Podemos observar nas cinéticas de liberação da Figura 21 este perfil de comportamento. A Figura 22 apresenta a porcentagem de liberação em função da massa de rifampicina incorporada na blenda polimérica.

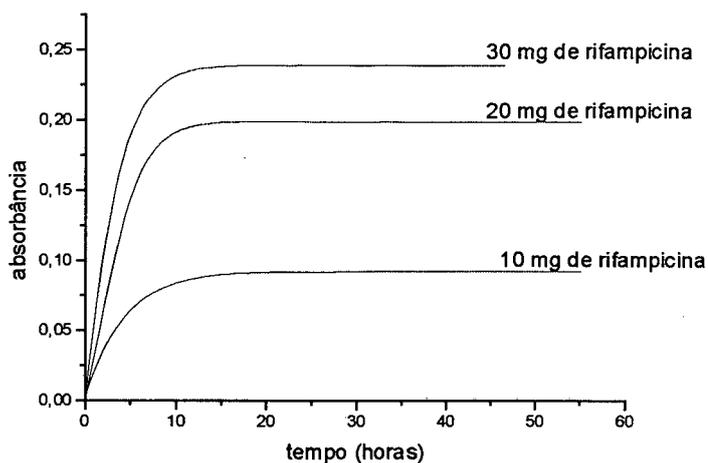


Figura 21. Cinéticas de liberação de rifampicina com massa variada de rifampicina incorporada à blenda.

A blenda polimérica utilizada foi de composição de 50% de PVA com temperatura de 36°C, a solução que ocorreu a liberação foi Na₂SO₄ 10% p/v e o pH dessa solução era de 6,9.

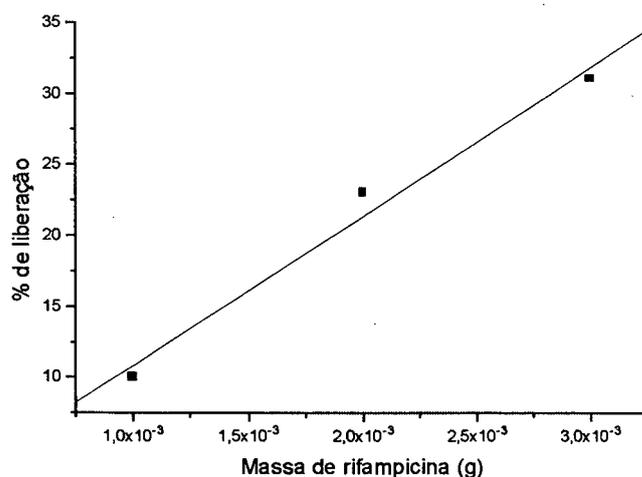


Figura 22. Porcentagem de rifampicina liberada variando-se a massa do fármaco incorporado à blenda polimérica.

Comportamento similar tem sido observado para a liberação de ampicilina em micropartículas de quitosana, em que a quantidade de fármaco liberada aumentou em função da concentração de ampicilina na matriz³⁸.

Esse perfil de liberação crescente de acordo com o aumento da massa de rifampicina incorporada na matriz é importante para o estudo da liberação da rifampicina pois a quantidade de rifampicina administrada aos pacientes tuberculosos é superior a quantidade de fármaco que incorporamos na matriz. Assim poderemos aumentar a quantidade de rifampicina incorporada na blenda QTS-PVA e ter conseqüentemente um aumento da porcentagem de liberação.

4.8. INFLUÊNCIA DA ESPÉCIE SALINA NA LIBERAÇÃO DA RIFAMPICINA

Além da liberação da rifampicina em soro fisiológico que consiste de uma solução NaCl 0.9%, foi estudado também a liberação da rifampicina em soluções salinas de diferentes sais devido ao fato que as cinéticas de liberação ocorreram em diferentes espécies salinas. A força iônica das soluções foi mantida constante constante.

Utilizou-se uma solução de NaCl p.a de concentração 0.9% e de Na₂SO₄ de concentração 0,051M. A força iônica das três soluções foi de 0,154 M que é a mesma do soro fisiológico. A Figura 23 apresenta as cinéticas de liberação nessas três soluções.

A porcentagem liberada foi de 49%, 35% e 46% respectivamente das soluções de sulfato de sódio 0,051M, cloreto de sódio 0,9% e soro fisiológico. Essas porcentagens foram calculadas de acordo com o descrito no item 3.2.7.2, página 48.

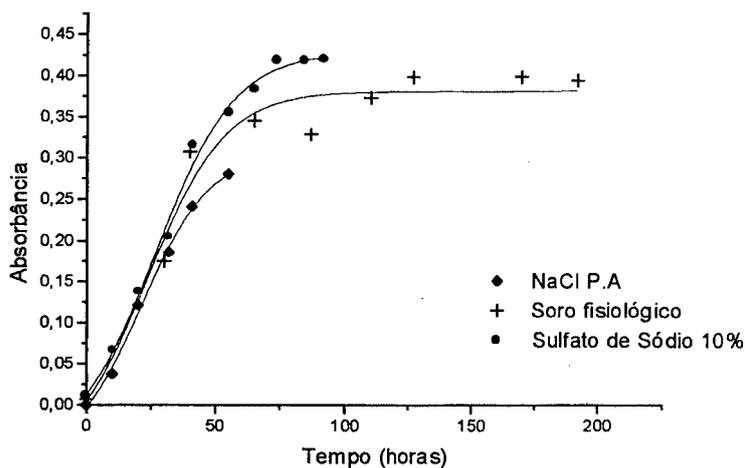


Figura 23. Cinéticas de liberação da rifampicina em soluções de diferentes espécies salinas

O resultado desse estudo nos mostra que não há uma influência significativa da espécie salina na liberação do fármaco como podemos observar na porção mais significativa das cinéticas que é até aproximadamente 50 minutos de liberação.

4.9. ESTUDO DA REUSABILIDADE DAS CÁPSULAS

Para estudar se a microcápsula é capaz de dar continuidade à liberação foi feito um estudo do reuso da microcápsula. Para o estudo do reuso foi realizado uma segunda cinética de liberação utilizando-se, assim como na primeira cinética dessa mesma batelada de cápsulas, solução de Na_2SO_4 10% p/v como solução de liberação, temperatura de 36°C , pH 6,9 e blenda de composição de 75% QTS.

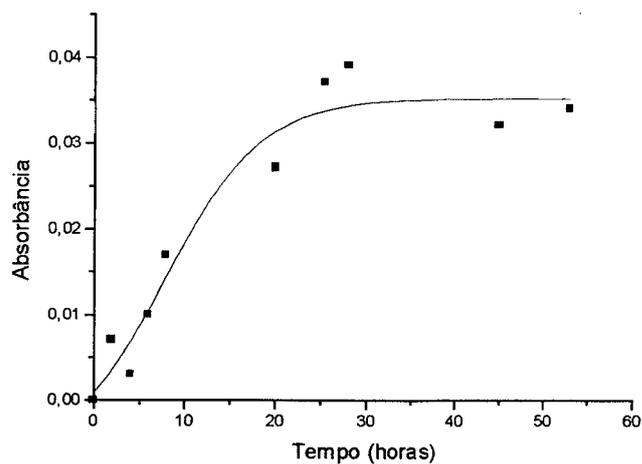


Figura 24. Reuso das microcápsulas com blenda 75% de QTS.

No segundo processo cinético a batelada de microcápsula continuou liberando o fármaco, só que em menor quantidade. Na cinética da Figura 24 podemos observar que a absorbância máxima no platô foi de 0,035, enquanto que na primeira cinética a absorbância máxima no platô foi de 0,111, ou seja, na segunda cinética a liberação foi de 6%.

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados neste trabalho mostraram os seguintes resultados:

- A variação da massa de QTS na blenda QTS-PVA demonstrou que a quitosana pode influenciar a liberação da rifampicina de modo a aumentar a liberação com o aumento da massa de QTS;
- A variação do PVA na blenda polimérica não apresenta uma variação significativa na liberação do fármaco.
- A análise morfológica das microcápsulas apresentou um resultado de acordo com o encontrado na literatura, ou seja, formato esférico e núcleos definidos;
- O aumento da massa de rifampicina incorporada na blenda polimérica aumenta a liberação da rifampicina. Isto é importante pois a dose diária do fármaco que um paciente necessita é muito maior do que a massa microencapsulada;
- O perfil de liberação apresentado pela rifampicina quando houve a variação do pH mostrou-se adequado pois a ingestão oral do medicamento tem como consequência a passagem do medicamento por diferentes pH's no trato gastrointestinal;
- A menor liberação da rifampicina em pH's 2,0 e 3,0 é significativa tendo em vista que o estômago apresenta esta faixa de pH, onde ocorre menor absorção do fármaco;
- A maior liberação da rifampicina em pH's acima de 4,0 é um resultado significativo pois este pH está próximo ao pH do intestino que é onde ocorre a maior absorção do fármaco;
- A variação da espécie salina não altera a liberação do fármaco;

De acordo com os resultados encontrados, a blenda polimérica QTS-PVA, a nível de estudos acadêmicos, mostra-se com uma boa perspectiva para a liberação controlada de fármacos. Analisando este sistema polimérico para uso *in vivo* é observado que muitos estudos deverão ser desenvolvidos para o melhoramento da resistência do suporte já que, como mencionado, o trato gastrointestinal possui uma

série de características que exigem um suporte com maior resistência para poder manter-se íntegro por períodos de tempo relativamente longos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LEITE, C. Q. F., TELAROLLI JUNIOR, R. Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Tuberculose. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 18, n. 1, p.17-28,1997.
2. FERREIRA, M. A. S., FONSECA, L. S. Diagnóstico Sorológico da Tuberculose. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 18, n. 1, p. 41-56, 1997.
3. HIRATA, R.D.C., HIRATA, M.H., MAMIZUDA, W.M., et al. Aplicação de Técnicas de Biologia Molecular na Avaliação da Resistência de *M. Tuberculosis* a Drogas Antimicrobianas. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 18, n. 1, p. 87-100, 1997.
4. ENARSON, D. A. Global Control - The Challenge of Tuberculosis: Statements on Global Control and Prevention. **The Lancet**, v. 346 n. 8978, p. 809, Set 23, 1995. Disponível na Internet. <http://www.thelancet.com/newlancet/index.html>. 23 agosto 1998. .
5. GMHC TREATMENT ISSUES: TUBERCULOSIS. Disponível na Internet. <http://www.gmhc.org/living/medcare/tb.html>. 23 maio 1998.
6. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Core Curriculum On Tuberculosis- What the Clinician Should Know. Disponível na Internet. <http://www.cdc.gov/nchstp/tb/pubs/corecurr.htm>. 15 outubro 1998.
7. MANDELL, G. L., SANDE, M. A. Fármacos Antimicrobianos – Drogas Utilizadas na Quimioterapia da Tuberculose e Lepra. In: Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêuticas**. 8º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. P. 760-772.

8. DE COCK, KEVEN M., WILKINSON, DAVID. " Tuberculosis Control in Resource-poor Countries: Alternative Approaches in the era of HIV. **The Lancet**, v. 346, n. 8976, p. 675 (3), Set 9, 1995.
<http://www.thelancet.com/newlancet/index.html>. 23 agosto 1998
9. HALSEY N.A, COBERLY J.S, DESORMEAUX J, et al. Randomised trial of isoniazid versus rifampicin and pyrazinamide for prevention of tuberculosis in HIV-1 infection. **The Lancet**, n. 351, n. 9105, p. 786-92, Mar 14, 1998.
<http://www.thelancet.com/newlancet/index.html>. 23 agosto 1998
10. PALACI, M., UELI, S.Y.M., CURCIO, M., et al. Quimioterapia da Tuberculose: Fundamentos, Regimes e Resistência Bacteriana. **Rev. Ciênc. Farm.**, v. 18, n. 1, p. 29-40, 1997.
11. LEITE, L.P.S., COSTA, A.L.P, ANDRADE, R. N. S. et al. Tratamento Cirúrgico Adjuvante da Tuberculose Pulmonar Multirresistente. **J. Pneumol.**, v. 23, n. 1, p. 11-14, 1997. Disponível na Internet.
<http://www.nib.unicamp.br/sbpt/Jornal/1997/artjan/art02.html>. 01 setembro 1998.
12. MICHELL, I., WENDON, J., FITT, S., et al. Anti-Tuberculous Therapy and Acute Liver Failure. **The Lancet**, v. 45, n. 8949, p. 555 (2), Mar 4, 1995.
<http://www.thelancet.com/newlancet/index.html>. 23 agosto 1998.
13. MWINGA, A. Treatment in Developing Countries. The Challenge of Tuberculosis: Statements on Global Control and Prevention. **The Lancet**, v. 346, n. 8978, p. 812(2)n, Setembro 23 1995.
<http://www.thelancet.com/newlancet/index.html>. 23 agosto 1998.
14. PELIZZA, G., NEBULONI, M., FERRARI, P., et al. Polimorfismo of Rifampicin. **IL Famarco**. v. 32, fasc.6, p. 471-481, 1977.

15. _____. **The merck index: an enciclopedia of chemicals, drugs and biologicals.** Windholz, editor [et al.] 9 th. ed. Rahway, Merck, p. 1187, 1976.
16. ISRAILI, Z. H. ; ROGERS, C. M. , EL-ATTAR, H. **Pharmacokinetics of Antituberculosis Drugs in Patients. J. Clin Pharmacol.**, v. 27, p. 78-83, 1987.
17. JARURATANASIRIKUL, S. **The Pharmacokinetics of Oral Rifampicin in AIDS Patients. J. Med Assoc Thai**, v. 81,n. 1, p.25-8, 1998. **Medline Bookstore.** Disponível na Internet. [http://medscape.com/server-java/MedPage?med98-99+148564+\(rifampicin\)](http://medscape.com/server-java/MedPage?med98-99+148564+(rifampicin)). Abstract. 17 outubro 98.
18. HOLDINESS, M. R. **Clinical Pharmacokinetics of the Antituberculosis Drugs. Clin. Pharmacokinetics**, v. 9, p. 511-544, 1984.
19. LANGER,R. **New Methods of Drug Delivery. American Association for the Advance**, v. 249, p. 1527-1533, 1990.
20. CHIEN, YIE W. **Potential Developments and New Approches in Oral Controlled-Release Drug Delivery Systems. Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9, n. 7, p. 1291-1330. 1983.
21. RAMARAJ, B., RADHAKRISHNAN, G. **Hidrogel Capsules for Sustained Drug Release. J. Appl. Polym.Sc**, vol. 51, p. 979 – 988, 1994. ,
22. AGUIAR, A. J., WHEELER, S. F., ZELMER, J. E. **Evaluation of Physical and Pharmaceutical Factors Involved in Drug Release and Availability from - Chloramphenicol Capsules. J. Pharm. Sc.**, v. 57, n. 11, p. 1844-1849, 1968.
23. KOST, J., LANGER, R. **Responsive Polymeric Delivery System. Advance Drug Delivery Reviews**, v. 6, 19-50, 1991.

24. MIYAZAKI,S., YOKOUCHI, C., TAKADA, M. External Control of Drug Release: Controlled Release of Insulin from a Hydrophilic Polymer Implant by Ultrasound Irradiation in Diabetic Rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.40, p. 716-717, 1988.
25. VASUDEV, S. C., CHANDY, T., SHARMA, C. P. Development of Chitosan/Polyethylene Vinyl Acetate Co-Matrix: Controlled Release of Aspirin-Heparin for Preventing Cardiovascular Thrombosis. **Biomaterials**, v. 18, n.5, p. 375-381, 1997.
26. EVANGELISTA, R.C., Tecnologia Farmacêutica para Produção de Medicamentos de Liberação Controlada. In: FACO RACINE 98 – ENCONTRO TÉCNICO CIENTÍFICO PARA AS INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS E COSMÉTICAS, Curso 5. 1998, São Paulo, Apostila... São Paulo, 1998.
27. RABISKOVA, M., SONG, J., OPAWALE, F. O., et al. The Influence of Surface Properties on Uptake of Oil into Complex Coacervate Microcapsules. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, p. 631-635, 1994.
28. AGYLIRAN, G. A., BANKER, G. S. Polymers for Enteric Coating Applications. In: Tarcha, Peter J. **Polymer for controlled drug delivery**; p. 39-66, Boston: CRC Press, 1991.
29. LATHA, P. G., JAYAKRISHNAN, A. , RATHINAM, K., et al. Casein as a Carrier Matrix for 5-Fluoracil. Drug Release from Microspheres, Drug-Protein Conjugates and In-Vivo Degradation of Microspheres in Rat Muscle. **J. Pharm. Pharmacol.**; v. 46, p. 858-862,1994.

30. LEE, K. J., PARK, W. H., HA, W. S. Polyelectrolyte Complexes of Sodium Alginate with Chitosan or Its Derivatives for Microcapsules. **Journal Applied Polymer Science**; v. 63, n. 4, p. 425-432, 1997.
31. HUGUET, M.L., GROBOILLOT, A., NEUFELD, R. J. et al. Hemoglobin Encapsulation in Chitosan/Calcium Alginate Beads. **Journal Applied Polymer Science**; v. 51, p. 1427-1432, 1994.
32. THACHARODI, D., RAO, K. P. Developmente and In Vitro Evaluation of Chitosan-Based Transdermal Drug Delivery Systems for the Controlled Delivery of Propranolol Hydrochloride. **Biomaterials**; v. 16, n. 2, p. 145-148, 1995.
33. LEUNG, S.H. S., ROBINSON, J. R. Bioadhesive drug delivery. In: MOLYNEUX, Philip. **Water-soluble synthetic polymers: properties and behavior**. Boston: Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 350-366.
34. NAKATSUKA, S., ANDRADY, A.L. Permeability of Vitamin B-12 in Chitosan Membranes. Effect of Crosslinking and Blending with Poly (Vinyl Alcohol) on Permeability. **J. Applied Polymer Science**, v. 44, p. 17-28, 1992.
35. SKAUEN, D. M., ZENTNER, G. M. Phonophoresis. **Int. J. Pharma.**, v. 20, p. 235-245, 1984.
36. KNUTH, K., AMIJI, M., ROBINSON, J. R. Hydrogel delivery systems for vaginal and oral applications. **Advance Drug Delivery**, n. 11, p. 137-167, 1993.
37. CHITIN AND CHITOSAN. Disponível na Internet.
http://www5.bae.ncsu.edu/courses/bae465/1995_projects/bake/smith/index1.html. 17 agosto 1998.

38. CHANDY, T., SHARMA, C. P. Chitosan Matrix for Oral Sustained Delivery of Ampicillin. **Biomaterials**, v. 12, n. 12, 1993.
39. RATHKE, T. D., H., SAMUEL M. Review of Chitin and Chitosan as Fiber na Film Formers. **J.M.S.- Ver. Macromol. Chem. Phys.**, C34; n. 3, p. 375-437, 1994.
40. YAO, K, PENG, T., FENG, H. B., HE, Y.Y. Swelling Kinetics and Release Characteristic of Crosslinked Chitosan: Polyether Polymer Network (Semi-IPN) Hidrogels. **J. Polym. Science: Part A: Polymer Chemistry**; n. 32, p. 1213- 1223, 1994.
41. Biopolymer engineering - chitin & chitosan solutions for the 21st century.
<http://www.biopolymer.com/index.htm>, 17/11/1998.
42. HIRANO, S., OHE, Y., ONO,H. Selective N-acylation of chitosan. **Carbohydrate Research**; v. 47, 315-320, 1976.
43. THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. Cross-linked Chitosan Microspheres Preparation and Evoluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceutics. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 44, p. 283-286, 1991.
44. CHEN, R. H, TSAIH, M. L., LIN, W. C. Effects of Chain Flexibility of Chitosan Molecules on the Preparation, Physical, and Release Characteristics of the Prepared Capsule. **Carbohydrate Polymers**, n. 31, p. 141-148, 1996.
45. MUZZARELLI, R., BALDASARRE, V., CONTI, F., et al. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. **Biomaterials**, v. 9, p. 247-252, 1988.

46. WITTCOFF, H. A. , REUBEN, B. G. **Industrial Organic Chemicals in Perspective**. Part two: technology, formulation, and use. New York: John Wiley - & Sons, p. 173, 1980.
47. CINCERA, D. L. Poly (Vinyl Alcohol) Vinyl Polyers. In: OTMER Kirk; **Encyclopedia of Chemical Tecnology**, 3^a ed.; p. 848-865, New York: Jonh Wiley & Sons, 1980.
48. ALONSO, M. J. Controlled Release of Proteins and antigens from biodegradable polymer micro and nanospheres. Disponível na Internet. <http://www.engr.umbc.edu/~chaubal/peptide.html>. 21 agosto 1998.
49. FRANCIJONE, J., VASISHTHA, N. The Art and Science of Microencapsulation. Disponível na Internet. <http://129.162.25.66/3pubs/today/summer/microeng.htm>, 20 outubro 1998.
50. SPARKS, R. E. Microencapsulation, In: OTHMER K. **Encyclopedia of chemical technology**. New York: John Wilwy& Sons, v. 15, p 470-493,1990.
51. VOIGT, R, MANFRED, B. Cápsulas. In: **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**. Espanha: Acribia Zaragoga, 1982, p. 259-269.
52. VANDENBOSSCHE, G. M. R., BRACKE, M. M., CUVELIER, A. C., et al. Host reaction against empty alginate-polylysine microcapsules. Influence of preparation produce. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, 115-120, 1993.
53. JAYAKRISHNAN, A., LATHA, P. G. Glutaraldehyde cross-linked bovine casein microspheres as a matrix for the controlled release of theophylline: in-vitro studies. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, 8-13, 1994.
-

54. JALŠENJAK, I., FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J. Microspheres of human serum albumin with barbiturates: effect of drug partition coefficient on preparation and drug release. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, 394-399, 1993.
55. YANG, T. T., SWARBRIC, J. Sustained-Release Delivery Systems, I: Phase Diagram Studies of Dapsone and Selected Derivates. **J. Pharm. Scienc.**, v. 75, n.1, p. 53-56, 1987.
56. KOHRI, N., MORI, K.I., MIYAAZAKI, K., ARITA, T. Sustained Release of Nifedipine from Granules. **J. Pharm. Scienc.**, v. 75, n. 1, 57-61, 1986.
57. BUNDGAAR, H., FALCH, E. , LARSEN, C. , MIKKELSON, T. J. Pilocarpine prodrugs I. Syntesis, Physicochemical, Properties and Kinetics of Lactonization of Pilolocarpic Acid Esters. **J. Pharm. Scienc.**, v. 75, n. 1, p. 36-43, 1987.
58. BONVIN, M.M., BERTORELLO, M.M. In vitro drug release from chitosan membranes: Study of the mechanisms of permeation. **Polymer Bulletin (Berlin)**, v. 32, n. 1, p. 69-75, 1994.
59. FUJIWARA, Y., AIBA, S., HWANG, C. Filmogenic properties of chitin / chitosan. In: International Conference on Chitin and Chitosan, 1985, Senigallia. **Proceedings...** Itália, 1985, p.389-396.
60. JAMEELA, S.R., LATHA, P. G., SUBRAMONIAM, A. et al. A. Antitumour Activity of Mitoxantrone-loaded Chitosan Microspheres Against Ehrlich ascites Carcinoma. **J. Pharm. Pharmacol.**; v. 48, p. 685-688, 1998.
61. KIM, J.H., KIM, J.Y., LEE, Y.M. et al. Controlled release of riboflavina and insulin through crosslinked poly (vinyl Alcohol) / chitosan blend membrane. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 44, p. 1823-128, 1992.

62. THANOO, B. C., SUNNY, M. C., JAYAKRISHNAN, A. Controlled release of oral drugs from cross-linked polyvinyl alcohol microspheres. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 45, p. 16-20, 1993.
63. SCHIERHOLZ, J. M. Physico-chemical properties of a rifampicin-release polydimethylsiloxane shunt. **Biomaterials**, v. 18, n. 8, p. 635-641, 1997.
64. HAMPL, J., SCHIERHOLZ, J., JANSEN, B., et al. In vitro and in vivo efficacy of a rifampin-loaded silicone Catheter for the prevention of CFS shunt Infections. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 133, p. 147-152, 1995.
65. SHAFRAN, S. D., SINGER, J., ZAROWNY, D. P., et al. A comparison of two regimens for the treatment of *Mycobacterium avium* Complex Bacteremia in AIDS: Rifabutin, Ethambutol, and Clarithromycin versus Rifampin, Ethambutol, Clofamine, and Ciprofloxacin. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 6, p. 377-383, 1996. Disponível na Internet. <http://www.nejm.org/publicM/1996/0335/0006/0377/1.html>. 13 agosto 1997.
66. DHOPLÉ AM. Comparative in vitro activities of rifamycin analogues against *Mycobacterium leprae*. **Indian J. Lepr**, v.69, n.4., p.377-384, 1997. **Medline Bookstore**. Disponível na Internet. [http://medscape.com/server-java/MedPage?med98-99+204801+\(rifampicin\)](http://medscape.com/server-java/MedPage?med98-99+204801+(rifampicin)). Abstract. 17 outubro 98.
67. SAMPOONACHOT P, BUNDIT C, KUHACHAROEN N, et al. Combined chemotherapy trials with regimens containing ofloxacin and rifampicin for multibacillary leprosy patients. **Indian J. Lepr**, v.79, n.4., p.210-7, 1996. **Medline Bookstore**. Disponível na Internet. [http://medscape.com/server-java/MedPage?med95-97+400194+\(rifampicin\)](http://medscape.com/server-java/MedPage?med95-97+400194+(rifampicin)). Abstract. 17 outubro 98.

68. MIGUEZ, M. J. B., RODRIGUES, B. C., SANCHEZ, N. M., et al.. Preparation and scanning electronic microscopy study of chitosan/polyvinyl (alcohol) – encapsulated crude urease extract. **Journal Microencapsulation**; v. 14, n. 5, 639-646, 1997.
69. BROUSSIGNAC, J. Un hault polymère naturel per connun dans l'industrie le chitosane. **Chim. Ind. –Gén. Chim.**, v.99, n.º 9, p. 1211-1247, 1970.
70. STOLBERG, J., LARANJEIRA, M. C. M., SANCHEZ, M. N., M. et al. Microspheres of Chitosan/ Poly(vinylalcohol) Incorporating Tetrasulphonated Copper (II) Phthalocyanine: Preparation and Characterization. **Journal of Microencapsulation**. (Aceito para publicação julho 1997).
71. SANDFORD, P. A. , HUTCHINGS, G.P. Chitosan a natural cationic biopolymer: commercial applications. In: YALPANI, M. **Industrial polysaccharides: genetic engineering structure / property relations and applications**, p. 363-376, 1987.