



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

Hellen Karine Stulzer

**Desenvolvimento e avaliação de sistemas
microparticulados de liberação modificada a base de
quitosana contendo o antiviral aciclovir**

Florianópolis

2008

Hellen Karine Stulzer

**Desenvolvimento e avaliação de sistemas
microparticulados de liberação modificada a base de
quitosana contendo o antiviral aciclovir**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do Título de Doutora em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Mauro. C.M.Laranjeira

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos. A.S.Silva

Florianópolis

2008

“O futuro tem muitos nomes: para os fracos, ele é inatingível; para os temerosos, ele é desconhecido, para os corajosos ele é a chance”

Vitor Hugo

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu saúde e condições para enfrentar com fé esta importante etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira, pelo carinho com que me acolheu desde o início e pelos inúmeros conhecimentos transmitidos, tornando-se além de orientador, um amigo.

A todos os professores do departamento de Química-UFSC, pelos inúmeros conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Segatto Silva, por mais uma vez ter acreditado em mim, dando a oportunidade de trabalhar novamente com a sua equipe, o meu carinho e gratidão por tudo.

A Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso, pelos ensinamentos e momentos de alegria que proporcionou durante este período.

Aos companheiros do laboratório QUITTECH, em especial ao Alexandre e a Loreana, que contribuíram diretamente para realização deste trabalho.

A todos os meus grandes amigos do Laboratório de Controle de Qualidade, que durante esta etapa foram indispensáveis em todos os momentos.

À toda minha família, em especial a meus pais Walter e Ana, pelo apoio, amor e dedicação e aos meus irmãos Junior e Heliza.

Ao Handerson pelo amor, companheirismo, paciência e atenção durante o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

O aciclovir (ACV), é o mais efetivo e seletivo agente contra os vírus do grupo da herpes existente na atualidade. Entretanto, apresenta absorção limitada quando administrado por via oral, devido a sua baixa solubilidade aliada às características da estrutura molecular e ao curto tempo de meia-vida biológica. Assim, são necessárias administrações freqüentes para manter a concentração plasmática do fármaco em níveis terapêuticos. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de sistemas microparticulados a base de quitosana contendo o antiviral ACV. As micropartículas foram preparadas pelas técnicas de coacervação e *spray-drying* (etapas I e II). A técnica de coacervação juntamente com a reação de amidação entre a quitosana e o ácido malônico, originou as microesferas de malonilquitosana (MLQT), as quais foram reticuladas com glutaraldeído. No produto resultante foi incorporado o fármaco pela técnica de adsorção por contato. Os resultados obtidos por análise elementar, espectroscopia na região do IV e RMN ¹³C, sugeriram a formação de um monoácido carboxílico e grupo monoamida nas MLQT microesferas. Estas, apresentaram encapsulação do ACV de 69,7 % ± 0,67, após 24 horas de contato, menor estabilidade térmica em relação às microesferas gelatinizadas, intumescimento pH dependente, diâmetro médio de 882 µm e liberação do fármaco durante 5,5 horas aproximadamente, através de diferentes mecanismos. As micropartículas desenvolvidas por *spray-drying* (etapa I - sem adição de tripolifosfato, formulação F1), apresentaram uma eficiência de encapsulação média de 92 % ± 0,79, ausência do pico de fusão do ACV (DSC), diminuição na estabilidade térmica (TG/DTG), modificação na estrutura cristalina do ACV para a forma amorfa (DRX), sobreposição dos espectros isolados do aciclovir e da quitosana (IV), e formato arredondado com a superfície interna côncava com tamanho médio de partícula de 5,52 ± 1,8 µm (MEV). O perfil de liberação da formulação F1 indicou que 80 % do ACV foi liberado por um período de 120 minutos, seguindo o modelo matemático proposto por Higuchi. Para as micropartículas desenvolvidas por *spray-drying* (etapa II - com adição de tripolifosfato, formulações F2, F3, F4, F5 e F6), os resultados apresentaram uma eficiência de encapsulação média de 86,4 %; 79,7 %; 73,8 %; 92,5 %; e 90,6 %; respectivamente. As formulações F2, F3 e F4 não apresentaram o pico característico da fusão do ACV (DSC), bem como, os picos relativos à cristalinidade (DRX) e os espectro IV foram uma sobreposição dos compostos isolados. As formulações F5 e F6 apresentaram um evento endotérmico mais acentuado em torno de 215 °C (DSC), mantiveram alguns picos cristalinos característicos presentes no ACV isolado (DRX), indicaram a sobreposição dos espectros IV dos compostos isolados (IV). Através das curvas TG, constatou-se que todas as formulações (etapa II) demonstraram estabilidade térmica até temperatura de 221,3 °C e nas isotermas a 100 °C, não ocorreu perda de massa. As imagens de MEV, de um modo geral, apresentaram tamanho médio de partícula e morfologia bastante variado para todas as formulações. Os melhores perfis de liberação obtidos foram para as formulações F5 e F6, que em pH 6,8 liberam o ACV por 330 e 300 min, respectivamente, seguindo uma cinética de ordem zero. Os estudos de estabilidade acelerada indicaram que as formulações F5 e F6 apresentaram menores teores de degradação do ACV, com um t_{90%} de 103 e 89 dias, respectivamente. A validação da metodologia de doseamento por CLAE foi específica, linear, exata, precisa e robusta dentro das condições experimentais testadas.

ABSTRACT

The acyclovir (ACV), is the most effective and selective agent against the herpes virus group existing at the present time. However, it presents limited absorption when taken orally, due its low solubility allied to the molecular structure characteristics and the short time of the biological half-life. Thus, it is necessary frequent administrations to keep the plasmatic concentration of the drug in therapeutical levels. In this way, the objective of the present study was the development of microparticles systems with chitosan containing the antiviral, ACV. The microparticles were prepared by coacervation and spray-drying (stage I and II) techniques. The coacervation technique together with the amidification reaction between chitosan and malonic acid, originated the MLQT microspheres, which had been cross-linked with glutaraldehyde. In the resultant product was incorporated the ACV, through adsorption technique. The results obtained by elemental analysis, IR spectroscopy and NMR ^{13}C , had suggested the formation of a monoacid carboxylic and monoamide group in MLQT microspheres. These had presented ACV encapsulation of $69.7\% \pm 0.67$, after contact for 24 hours, minor thermal stability in relation to the gelled microspheres, swelling pH dependent, diameter of $882 \mu\text{m}$ and release time of the drug during 5.5 hours approximately, through different mechanisms. The microparticles developed by *spray-drying* (stage I - without addition of tripolyphosphate, formulation F1), had presented an efficiency of encapsulation of $92\% \pm 0.79$, absence of the ACV fusion peak (DSC), reduction in the thermal stability (TG/DTG), modification in the ACV crystalline structure for the amorphous form (XRD), overlapping of the isolated ACV spectrum and chitosan (IR), rounded format with internal surface concavous and size of $5.52 \pm 1.8 \mu\text{m}$ (SEM). The release profile of formulation F1 indicated that 80% of the ACV was released for a period of 120 minutes, following the mathematical model indicated by Higuchi. For microparticles developed by *spray-drying* (stage II - with addition of tripolyphosphate, F2, F3, F4, F5 and F6 formulations), the results presented an efficiency of encapsulation of 86.4 %; 79.7 %; 73.8 %; 92.5 %; and 90.6% respectively. The formulations F2, F3 and F4 had not presented the characteristic ACV fusion peak (DSC), as well as, the ACV crystalline peaks (XRD) and the IR spectrum had been an overlapping of isolated composites. The formulations F5 and F6 presented an accented endothermic event around $215 \text{ }^\circ\text{C}$ (DSC), had kept some characteristic peaks presented in ACV isolated (XRD) the IR spectrums showed an overlapping of isolated compounds (IR). Through TG curves, it was evidenced that all the formulations demonstrated thermal stability until temperature of $221.3 \text{ }^\circ\text{C}$ and in the isotherms at $100 \text{ }^\circ\text{C}$ didn't occur mass loss. The images of SEM, in general way, presented medium particle size and morphology different for all formulations. The best release profiles obtained were for formulations F5 and F6, which in pH 6.8 released the ACV for 300 and 330 min, followed a zero order kinetic. The studies of accelerated stability had indicated that the formulations F5 and F6 had presented minors ACV degradation with $t_{90\%}$ of 103 and 89 days, respectively. The method validation for quantify ACV trough HPLC was specific, linear, accurate and robust in the tested experimental conditions.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Herpesvírus.....	6
2.1.1 Epidemiologia.....	7
2.1.2 Transmissão do vírus.....	7
2.1.3 Latência viral.....	8
2.1.4 Progressão e sintomas.....	8
2.2 Aciclovir.....	9
2.2.1 Características Físico-Químicas.....	9
2.2.2 Mecanismo de ação.....	9
2.2.3 Aspectos farmacocinéticos.....	10
2.2.4 Concentração usual.....	11
2.2.5 Efeitos adversos.....	11
2.2.6 Formulações disponíveis no mercado.....	11
2.3 Biopolímero Quitosana.....	11
2.4 Sistemas Microparticulados.....	15
2.4.1 Aspectos Gerais.....	15
2.4.2 Métodos de preparação	16
2.4.3 Aplicação das micropartículas.....	19
2.4.4 Vias de administração de produtos microparticulados.....	19
2.5 Liberação modificada.....	20
2.5.1 Considerações gerais.....	20
2.5.2 Vantagens terapêuticas.....	22
2.5.3 Sistemas de liberação modificada contendo aciclovir.....	23
2.6 Via Oral.....	25
2.7 Fisiologia do trato gastrintestinal e absorção de fármacos.....	25
2.7.1 Esvaziamento gástrico.....	26

2.7.2 Trânsito pelo intestino delgado.....	26
2.7.3 Trânsito pelo intestino grosso.....	27
3.OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Materiais.....	32
4.1.1 Matérias Primas.....	32
4.1.2 Solventes e Reagentes.....	32
4.1.3 Equipamentos.....	32
4.2 Métodos.....	33
4.2.1 Caracterização do fármaco.....	33
4.2.2 Desenvolvimento das micropartículas.....	33
4.2.2.1 Preparação das microesferas de quitosana gelatinizada pela técnica de coacervação.....	34
4.2.2.2 Síntese das microesferas de malonilquitosana através da reação de amidação com ácido malônico.....	34
4.2.2.3 Caracterização e análises físico-químicas das microesferas de malonilquitosana.....	34
4.2.2.3.1 Determinação do grau de substituição por análise elementar.....	35
4.2.2.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	35
4.2.2.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ¹³ C).....	35
4.2.2.3.4 Análise termogravimétrica (TG).....	35
4.2.2.3.5 Determinação do grau de intumescimento (GI).....	36
4.2.2.3.6 Incorporação do fármaco nas microesferas de malonilquitosana...	36
4.2.2.3.7 Eficiência de encapsulação.....	37
4.2.2.3.8 Liberação <i>in vitro</i>	37

4.2.2.3.9 Avaliação morfológica e tamanho de partícula.....	37
4.2.3 Preparação das micropartículas pela técnica de <i>spray-drying</i>	38
4.2.3.1 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de <i>spray-drying</i>	39
4.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	40
4.2.3.3 Difração de raios X de pó.....	40
4.2.3.4 Termogravimetria modo isotérmico.....	40
4.2.3.5 Estabilidade acelerada.....	40
4.2.4 Validação da metodologia analítica de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
4.2.4.1 Condições cromatográficas.....	41
4.2.4.2 Preparo da solução padrão.....	41
4.2. 4.3 Preparo da amostra.....	41
4.2.4.4 Especificidade.....	42
4.2.4.5 Linearidade e faixa.....	42
4.2. 4.6 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD).....	42
4.2.4.7 Precisão.....	43
4.2.4.8 Exatidão.....	43
4.2.4.9 Robustez.....	43
4.2.5 Análises estatísticas.....	44
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1 Caracterização do aciclovir.....	46
5.1.1 Teor do fármaco.....	47
5.1.2 Identificação por espectroscopia na região do infravermelho.....	47
5.1.3 Identificação por espectroscopia na região do ultravioleta.....	48

5.1.4 Ponto de fusão por calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	49
5.2 Caracterização e avaliação das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de coacervação e modificadas pela reação de amidação com ácido malônico.....	50
5.2.1 Análise elementar	51
5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectrometria magnética nuclear RMN de ¹³ C.....	51
5.2.3 Termogravimetria (TG/DTG).....	54
5.2.4 Grau de intumescimento.....	55
5.2.5 Eficiência de encapsulação.....	57
5.2.6 Liberação <i>in vitro</i> do aciclovir impregnado nas microesferas de malonilquitosana.....	57
5.2.7 Modelo cinético de liberação.....	58
5.2.8 Avaliação morfológica e tamanho de partícula.....	60
5.3 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> – Parte I (sem adição de agente reticulante).....	63
5.3.1 Eficiência de encapsulação.....	64
5.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)...	64
5.3.3 Difração de raios X- de pó (DRX).....	65
5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	67
5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	68
5.3.6 Perfil de liberação.....	69
5.4 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> – Parte II (com adição de agente reticulante).....	72
5.4.1 Eficiência de encapsulação.....	73
5.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)....	73

5.4.3 Difração de raios X- de pó (DRX).....	77
5.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	79
5.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	81
5.4.6 Termogravimetria (TG) modo isotérmico.....	82
5.4.7 Perfil de Liberação.....	83
5.5 Estudos de estabilidade acelerada.....	87
5.5.1 Considerações Gerais.....	88
5.5.2 Estabilidade do ACV.....	89
5.5.3 Estabilidade acelerada das formulações.....	90
5.5.4 Estudos cinéticos de degradação.....	93
5.6 Validação da metodologia de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	97
5.6.1 Aspectos Gerais.....	98
5.6.2 Especificidade	99
5.6.3 Linearidade e faixa.....	100
5.6.4 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).....	101
5.6.5 Precisão.....	102
5.6.6 Exatidão.....	103
5.6.7 Robustez.....	103
6. CONCLUSÕES.....	105
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	109
8. REFERÊNCIAS.....	111
9. ANEXOS.....	123

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura química do aciclovir.....	09
Figura 2. Esquema representativo do mecanismo de ação do aciclovir.....	10
Figura 3. Estrutura química do copolímero quitosana.....	13
Figura 4. Figura representativa da reticulação entre a quitosana e o glutaraldeído.....	14
Figura 5. Figura representativa da reticulação entre a quitosana e o tripolifosfato.....	14
Figura 6. Estrutura dos sistemas obtidos por microencapsulação.....	16
Figura 7. Desenho esquemático do <i>spray-dryer</i>	18
Figura 8. Cedência do fármaco de uma forma farmacêutica de liberação convencional (A) e liberação modificada (B).....	22
Figura 9. Trato gastrintestinal humano.....	27
Figura 10. Esquema representativo da metodologia de preparo das micropartículas de quitosana contendo aciclovir por <i>spray-drying</i>	39
Figura 11. Espectro infravermelho do aciclovir obtidos em pastilhas de KBr	48
Figura 12. Espectro ultravioleta do aciclovir obtido em H ₂ SO ₄ 0,2 mol.L ⁻¹	49
Figura 13. Curva DSC do aciclovir obtida sob razão de aquecimento de 2 °C min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min ⁻¹).....	49
Figura 14. Espectros na região do infravermelho das microesferas gelatinizadas de quitosana (A) e microesferas de malonilquitosana (B), obtidos em pastilhas de KBr.....	52
Figura 15. Espectro RMN de ¹³ C em fase sólida das microesferas gelatinizadas (A) e malonilquitosana (B).....	53
Figura 16. Esquema representativo da síntese da malonilquitosana.....	54
Figura 17. Curvas TG/DTG das microesferas gelatinizadas (A) e microesferas de malonilquitosana (B), obtidas sob razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min ⁻¹).....	55
Figura 18. Intumescimento das microesferas de malonilquitosana em solução tampão pH 1,2; pH 6,8; e pH 9,0.....	56

Figura 19. Perfil de liberação do aciclovir a partir das microesferas de malonilquitosana em pH 1,2 e 6,8.....	58
Figura 20. Fotomicrografias do aciclovir magnificação de 800 x (A), microesferas de malonilquitosana magnificação de 60 x (B), microesferas de malonilquitosana impregnadas com aciclovir em magnificação de 30 x (C) e 60 x (D).....	61
Figura 21. Fotomicrografias da secção transversal das microesferas de malonilquitosana em magnificação de 75 x (A) e 100 x (B).....	62
Figura 22. Curvas DSC do aciclovir, quitosana e formulação F1 obtidas sob razão de aquecimento de 2 °C min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min ⁻¹).....	64
Figura 23. Curvas TG do aciclovir, quitosana e formulação F1, obtidas sob razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min ⁻¹).....	65
Figura 24. Difrátogramas obtidos para o aciclovir, quitosana e formulação F1.....	67
Figura 25. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana e formulação F1 obtidos em pastilha de KBr.....	68
Figura 26. Fotomicrografias da formulação F1 magnificação de 1000 x (A) e 2000 x (B).....	69
Figura 27. Perfil de liberação da formulação F1 em pH 1,2 e 6,8.....	69
Figura 28. Curvas DSC do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4, obtidas sob razão de aquecimento de 2 °C min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min ⁻¹).....	74
Figura 29. Curvas DSC do aciclovir, quitosana, formulações F5 e F6, obtidas sob razão de aquecimento de 2 °C min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min ⁻¹).....	75

Figura 30. Curvas TG do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4, obtidas sob razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio(50 mL min ⁻¹).....	76
Figura 31. Curvas TG do ACV, quitosana, formulações F5 e F6, obtidas sob razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ em atmosfera dinâmica de N ₂	76
Figura 32. Difrátogramas obtidos para o aciclovir, quitosana, formulações F2, F3, F4, F5 e F6 obtidas em pastilha de KBr	78
Figura 33. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4 obtidas em pastilha de KBr.....	79
Figura 34. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana, formulações F5 e F6.....	80
Figura 35. Fotomicrografias das formulações F2, F3 e F4 magnificação de 400 x	81
Figura 36. Fotomicrografias das formulações F5 e F6 magnificação de 400 x.....	82
Figura 37. Isotermas obtidas através de análise termogravimétrica em atmosfera de oxigênio(50 mL. min ⁻¹).....	83
Figura 38. Perfil de liberação das formulações F2, F3, F4, F5 e F6 em pH 1,2.....	84
Figura 39. Perfil de liberação das formulações F2, F3, F4, F5 e F6 em pH 6,8.....	84
Figura 40. Teor de aciclovir das formulações submetidas à temperatura e umidade ambiente.....	91
Figura 41. Teor de aciclovir das formulações submetidas à câmara climática.....	92
Figura 42. Cromatogramas, (A) solução padrão de aciclovir e (B) micropartículas contendo aciclovir 6 µg.mL ⁻¹	99
Figura 43. Cromatogramas, (C) solução padrão de guanina e (D) solução placebo.....	100
Figura 44. Linearidade e faixa do método de quantificação do aciclovir por CLAE.....	101

Índice de Tabelas

Tabela 1. Vírus herpéticos humanos.....	06
Tabela 2. Formulações desenvolvidas por <i>spray-drying</i>	38
Tabela 3. Ensaio de exatidão (procedimento).....	43
Tabela 4. Resultados do grau de intumescimento (G.I) cumulativo e individual nos diferentes valores de pH	57
Tabela 5. Análises dos mecanismos de liberação envolvidos na liberação do ACV a partir das microesferas de malonilquitosana.....	60
Tabela 6. Valores dos coeficientes de correlação obtidos para os três modelos matemáticos utilizados na linearização das curvas de dissolução.....	70
Tabela 7. Resultado do ensaio de eficiência de encapsulação obtidos para as formulações desenvolvidas pela técnica de <i>spray-drying</i> - Parte II	73
Tabela 8. Valores dos coeficientes de correlação obtidos para os três modelos matemáticos utilizados na linearização das curvas de dissolução.....	85
Tabela 9. Dados comparativos entre as formulações desenvolvidas pela técnica de <i>spray-drying</i>	86
Tabela 10. Teor de aciclovir presente formulações submetidas à temperatura e umidade ambiente.....	90
Tabela 11. Teor de aciclovir presente nas formulações submetidas à câmara climática.....	91
Tabela 12. Coeficientes obtidos (r^2) das formulações submetidas às diferentes condições de estabilidade.....	94
Tabela 13. Equações cinéticas para cálculo da degradação do fármaco...	94
Tabela 14. Valores das constantes de velocidade (k_{25}) e $t_{90\%}$	94
Tabela 15. Resultados obtidos para a linearidade e faixa.....	100
Tabela 16. Resultados da repetibilidade (mesmo dia) e precisão intermediária (dias diferentes).....	101
Tabela 17. Resultados da exatidão	102
Tabela 18. Resultados do ensaio de robustez.....	103

Índice de abreviaturas

ACV	Aciclovir
CMV	Citomegalovírus
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DST	Doença sexualmente transmissível
EBV	Epstein-Barr vírus
HHV	Herpes vírus humano
HIV	Human immunodeficiency virus
HPLC	High performance liquid chromatography
HSV	Vírus herpes simples
ICH	International Conference of Harmonization
IV	Infravermelho
IR	Infrared
LC	Liberação controlada
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LE	Liberação estendida
LM	Liberação modificada
MLCT	Malonilquitosana
MLQT	Malonylchitosan
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
RMN	Ressonância magnética nuclear
NMR	Nuclear resonance magnetic
SEM	Scanning electron microscopy
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TPP	Tripolifosfato de sódio
TG	Análise termogravimétrica
USP	United States Pharmacopea
UV	Ultravioleta
VVZ	Varicela-Zoster vírus
XRPD	X-ray powder diffraction

I - Introdução

Doenças infecciosas virais são um importante problema de saúde no mundo. Embora a busca por novos fármacos antivirais seja intensa, os avanços são poucos, já que a maioria destes compostos possui aplicações limitadas, fazendo com que um baixo número deles seja aprovado pelas autoridades governamentais para uso clínico (VLIETINCK e VANDEN, 1991; BARREIRO e FRAGA, 2002).

O aumento do número de pacientes imunocomprometidos e da sobrevivência dos mesmos tem implicado no desenvolvimento de infecções virais nesses pacientes. Além disso, o intenso uso de medicamentos antivirais conduziu ao desenvolvimento de cepas resistentes, as quais são agora comumente disseminadas, agravando-se ainda mais o problema (SNOECK, 2000). Na última década a incidência e a severidade das infecções causadas pelo vírus do Herpes Simplex apresentaram um elevado crescimento, em decorrência do aumento do número de pacientes imunocomprometidos, quimioterapias, transplantes e a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (SNOECK, 2000; JALÓN et al., 2003).

O vírus Herpes Simplex (HSV) é membro da extensa e heterogênea família Herpesviridae, composta por inúmeros patógenos animais e humanos, como Citomegalovírus (CMV), Epstein-Barr (EBV) e Varicela-Zoster (VZV). O HSV é dividido em dois sorotipos, HSV-1 e HSV-2, responsáveis pelos herpes labial e genital, respectivamente. O vírus tem como característica biológica o rápido crescimento em cultivo celular, uma ampla gama de hospedeiros e a capacidade, comum a todos os herpesvírus, de se manter latente em células de seus hospedeiros por tempo indeterminado (COLLINS e ELLIS, 1999; BOIVIN, 2004).

O aciclovir, um análogo sintético da 2'-desoxiguanosina, é o mais efetivo e seletivo agente contra os vírus do grupo da herpes existente na atualidade, é considerado o tratamento de escolha para as infecções causadas pelo HSV, devido à sua alta seletividade pelo vírus herpéticos e baixa citotoxicidade às células do hospedeiro. Este é particularmente ativo contra herpes labial e herpes genital, que são infecções virais comuns em seres humanos (GIAMMONA et al., 1995; ROSSEL et al., 2000).

O aciclovir apresenta absorção limitada quando administrado por via oral, devido à sua baixa solubilidade em água, às características da estrutura molecular e ao curto tempo de meia-vida biológica (1-2 horas) (RANG; DALE; RITTER, 2001). Assim, são necessárias administrações freqüentes para manter a concentração plasmática do fármaco em níveis terapêuticos. A freqüência de administração, aliada ao tempo de tratamento (10 dias ou mais) é a principal causa da não adesão ao tratamento.

Fármacos com estas características são bons candidatos para o desenvolvimento de formulações que proporcionem liberação contínua do mesmo ao longo do trato gastrointestinal. O desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos com esta característica vem sendo demonstrado extensivamente na literatura farmacêutica, devido aos benefícios terapêuticos e farmacológicos em relação às formas farmacêuticas convencionais (PASTRANA et al., 2000; LIESIENE e MATALIONIENE, 2004).

Entre as diferentes estratégias disponíveis para alcançar um controle na liberação de fármacos estão os sistemas microparticulados. A microencapsulação de fármacos é uma técnica que, como o nome sugere, envolve a encapsulação de pequenas partículas do fármaco ou solução do fármaco, num revestimento polimérico (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

A quitosana é um polímero natural, biodegradável e atóxico. Devido às suas características tem se tornado um material potencialmente atraente para diversos usos, principalmente na área farmacêutica. Este polissacarídeo vem sendo usado como sistema polimérico na liberação de fármacos de diversas classes terapêuticas, tais como, antibióticos, antiinflamatórios, antihipertensivos, bem como, peptídeos, proteínas e vacinas. Salienta-se, ainda, que a quitosana e seus derivados apresentam algumas vantagens importantes com relação às atividades farmacológicas, atuando como antiácido e antiúlcera, protegendo a mucosa gástrica e inibindo a adesão das bactérias nas células epiteliais bucais e vaginais (ITO; BAM; ISHIRAHA, 2000; SINHA et al., 2004).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de sistemas poliméricos microparticulados contendo quitosana, a fim de promover uma liberação modificada do antiviral, aciclovir.

II- Revisão de Literatura

2.1 Herpesvírus

Os herpesvírus causam uma larga variedade de doenças humanas que variam desde herpes labial e genital, encefalites e infecções congênitas a doenças linfoproliferativas. Os principais pacientes acometidos destas patologias são os imunocomprometidos, transplantados, portadores de câncer e HIV positivos (SNOECK, 2000; HARTLINE et al., 2005).

Os vírus da família Herpesviridae (herpéticos), são altamente disseminados na natureza. Aproximadamente 100 vírus desta família foram identificados, sendo que oito podem infectar o homem (Tabela 1) (DA SILVA, 2000):

Tabela 1: Vírus herpéticos humanos

Gênero	Nome Oficial	Nome comum	Sigla
α -Herpesviridae			
Herpes simples 1	Herpesvírus humano 1	Vírus Herpes Simplex tipo 1	HSV-1
Herpes simples 2	Herpesvírus humano 2	Vírus Herpes Simplex tipo 2	HSV-2
Varicela Zoster	Herpesvírus humano 3	Vírus da Varicela Zoster	VZV
B -Herpesviridae			
Citomegalovírus	Herpesvírus humano 5	Citomegalovírus	CMV
Reseolovírus	Herpesvírus humano 6	Vírus Herpes Humano tipo 6	HHV-6
	Herpesvírus humano 7	Vírus Herpes Humano tipo 7	HHV-7
γ -Herpesviridae			
Epstein-Barr	Herpesvírus humano 4	Vírus Epstein -Barr	EBV
	Herpesvírus humano 8	Vírus Herpes Humano tipo 8	HHV -8

Fonte: DA SILVA (2000).

Os α -herpesvírus, Herpes Simplex vírus tipos 1 e 2 (HSV-1 e 2), comumente causam lesões herpéticas faciais e genitais, respectivamente, sendo que ambos causam infecções recorrentes (GONG et al., 2004; JENSSEN et al., 2004).

Os HSV são dois vírus da família dos herpesvírus, com genoma de DNA bicatenar (dupla hélice) que se multiplicam no núcleo da célula-hóspede, produzindo cerca de 90 proteínas víricas em grandes quantidades. Estes, apresentam capsídeo

icosaédrico e envelope bilipídico, com a propriedade de infectar alguns tipos de células de forma destrutiva e outras de forma latente. Os HSV-1 e HSV-2 são destrutivos nas células epiteliais e nos fibroblastos e latentes nos neurônios, onde podem ser reativados de acordo com a fragilidade do indivíduo (WHITE e FENNER, 1994).

Os HSV-1 e HSV-2 são muito semelhantes, porém apresentam algumas diferenças significativas. O HSV-1 tem características que o levam a ser particularmente infeccioso e virulento para as células da mucosa oral. O HSV-2 tem características de maior virulência e infecciosidade para a mucosa genital. No entanto, o HSV-1 também pode causar herpes genital e o HSV-2 herpes bucal (GONG et al., 2005).

2.1.1 Epidemiologia

O HSV produz pandemias sem precedentes, disseminando-se por todo mundo. Estudos soroepidemiológicos confirmam que mais de 90 % da população, em geral na quarta década da vida, possui anticorpos séricos contra pelo menos uma das cepas do HSV, ainda que possa não apresentar sintomas (BRADY e BERNSTEIN, 2004; SPEAR et al., 2006). Nos Estados Unidos 16 - 35 % e 40 -80% da população é soropositivo para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente. O vírus da Varicela Zoster – VZV afeta 90 % da população adulta (CASSADY e WHITLEY, 1997). O herpes genital é considerado a doença sexualmente transmissível (DST) que mais afeta as pessoas, acredita-se que milhões de indivíduos estão infectadas com DST, incluindo o HSV (GONG et al., 2005).

2.1.2 Transmissão do vírus

A transmissão do HSV ocorre através das superfícies mucosas ou das soluções de continuidade da pele. Os principais sítios incluem a mucosa oral, ocular, genital e anal. O HSV-2 tem como via preponderante de contágio a relação sexual ou canal do parto, em gestantes infectadas (GONG et al., 2004; JENSSEN et al., 2004).

2.1.3 Latência viral

O HSV apresenta tropismo por ceratinócitos e neurônios. Os ceratinócitos são altamente permissíveis a replicação viral, enquanto, os neurônios não apresentam elevada permissibilidade. O vírus, curiosamente, beneficia-se ao infectar as células imunes ao seu efeito citopático. Devido aos mesmos não poderem destruí-las, acabam integrando-se ao DNA celular e como resultado final ocorre o estabelecimento da infecção latente (JENSSEN et al., 2004; SERGERIE e BOIVIN, 2008).

A latência persiste até que ocorra qualquer alteração estrutural na célula infectada, tal como injúria ou diferenciação celular. Esses fatos podem estar relacionados à alteração de não-permissibilidade da célula. Os fatores capazes de estimular a reativação viral são variados, com destaque para imunodepressão, alterações hormonais, radiação ultravioleta e lesão traumática do nervo acometido. A latência viral nos gânglios pode ser afetada pela presença de neurotransmissores envolvidos nos estados de ansiedade, depressão e distúrbios comportamentais, também comuns nas recorrências (JENSSEN et al., 2004; VARELLA et al., 2005; SPEAR et al., 2006; SERGERIE e BOIVIN, 2008).

2.1.4 Progressão e sintomas

Após infecção da mucosa, o vírus multiplica-se produzindo os característicos exantemas (manchas vermelhas inflamatórias) e vesículas (bolhas) dolorosas. As vesículas contêm líquido rico em *virions* e a sua ruptura junto à mucosa de outro indivíduo é uma forma de transmissão, contudo também existem vírus nas secreções vaginais e peniana ou na saliva. Porém, estas desaparecem e reaparecem sem deixar quaisquer marcas ou cicatrizes, é possível que ambos os vírus e ambas as formas coexistam num só indivíduo (SPEAR et al., 2006).

Os episódios agudos secundários são sempre de menor intensidade que o inicial, devido aos linfócitos memória, contudo a doença permanece para toda a vida, ainda que os episódios se tornem menos frequentes. Muitas infecções e

recorrências são assintomáticas. Não há vacina nem tratamento definitivo, apesar de alguns fármacos especialmente acicloguanosinas como o aciclovir poderem reduzir os sintomas e o perigo de complicações como a encefalite (BRADY e BERNESTEIN, 2004).

2.2 Aciclovir

A era da terapia antiviral seletiva eficaz começou com o aciclovir. Este composto é um derivado da guanosina, com alta especificidade pelo vírus da Herpes Simplex e Varicela-Zoster, sendo considerado o medicamento de escolha para o tratamento destas patologias (SNOECK, 2000; RANG; DALE; RITTER, 2001).

2.2.1 Características Físico-Químicas

O aciclovir (Figura 1) (DE CLERCQ et al., 2001) (2-amino 1,9 -dihidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purina-6-ona), apresenta-se sob a forma de um pó cristalino branco, muito pouco solúvel em água, insolúvel em álcool e ligeiramente solúvel em solução de HCl 0,1 mol.L⁻¹ (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007). Em relação a constante de dissociação (pka) apresenta dois valores; 2,3 e 9,2.

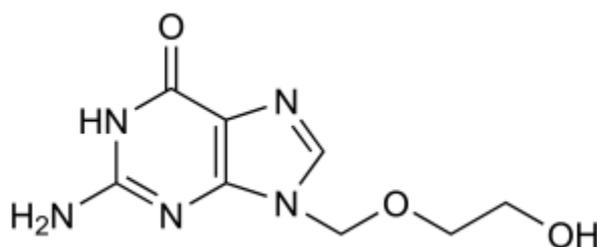


Figura 1. Estrutura química do aciclovir

2.2.2 Mecanismo de ação

O aciclovir é convertido em monofosfato pela timidina quinase e, felizmente, a forma específica viral dessa enzima é muito mais eficaz na fosforilação do que a enzima da célula do hospedeiro. Por conseguinte, é apenas adequadamente ativada

nas células infectadas, e as quinases das células do hospedeiro convertem então o monofosfato em trifosfato. O trifosfato de aciclovir é o inibidor da DNA polimerase viral, terminando a cadeia de nucleotídeos (Figura 2). Este fármaco apresenta uma potência 30 vezes maior contra a enzima do herpes vírus em comparação com a enzima do hospedeiro (RANG; DALE; RITTER, 2001).

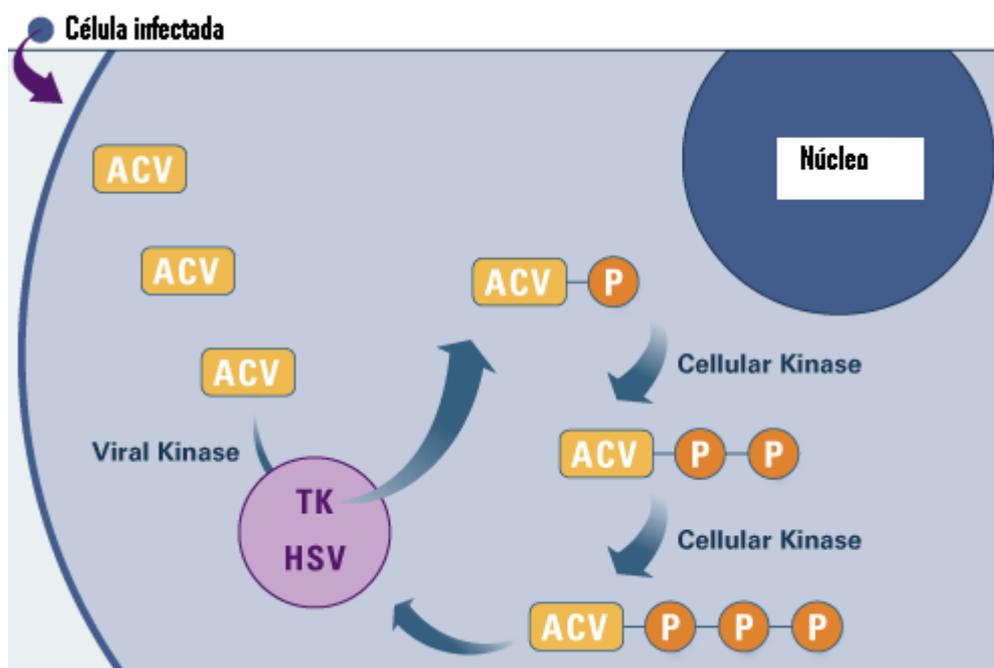


Figura 2. Esquema representativo do mecanismo de ação do aciclovir

2.2.3 Aspectos farmacocinéticos

Quando administrado por via oral, apenas 20 % da dose são absorvidos no trato gastrintestinal e as concentrações plasmáticas máximas são atingidas em 1-2 horas. O fármaco exibe ampla distribuição, alcançando concentrações no LCR (líquido cefalorraquidiano) que correspondem a 50 % das concentrações plasmáticas. O aciclovir é excretado pelos rins, uma parte por filtração glomerular e outra por secreção tubular (RANG; DALE; RITTER, 2001).

2.2.4 Concentração usual

Para adultos por via oral, a dose é de 200 mg quatro vezes ao dia durante 10 dias. Por via intravenosa, 5 mg/Kg a cada 8 horas durante 5 a 7 dias. Para o tratamento de encefalite causada por Herpes Simplex, 10 mg/Kg a cada 8 horas. Por via tópica, a aplicação do creme deve ser a cada 3 horas, seis vezes ao dia durante sete dias (KOROLKOVAS, 2000).

2.2.5 Efeitos adversos

Algumas pessoas podem apresentar reações alérgicas, porém estas são raras. Existem relatos de inchaço, especialmente dos lábios, face ou pálpebras, brotoejas ou manchas. Pode ocorrer ainda, inflamação local durante a injeção intravenosa se houver extravasamento da solução, bem como disfunção renal, embora a infusão lenta reduza esse risco. Náuseas, cefaléia e raramente encefalopatia também foram descritos (KOROLKOVAS, 2000).

2.2.6 Formulações disponíveis no mercado

No mercado farmacêutico está disponível na forma de comprimidos e cápsulas de liberação imediata, pó para suspensão oral, creme, pomada oftálmica e pó liofilizado para administração endovenosa, sendo Zovirax® o nome comercial do medicamento de referência produzido pelo laboratório GlaxoSmithKline (KOROLKOVAS, 2000).

2.3 Biopolímero Quitosana

A quitosana é um aminopolissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, um polímero encontrado em carapaças de crustáceos, cutículas de insetos e parede celular de alguns fungos. Em relação a sua estrutura química é considerada um copolímero,

formado por unidades de β -(1,4) 2 - amino 2-desoxi-D - glicose e β -(1,4) 2 - acetamido- 2- desoxi -D- glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário (Figura 3). Sua obtenção comercial é principalmente proveniente de cascas de camarão e caranguejo (TORRES et al., 2005; TAKAHASHI; IMAI; SUZUKI, 2007).

Durante o processo de desacetilação da quitina, os grupos acetamido são transformados parcialmente em grupos amino ($-\text{NH}_2$) ao longo da cadeia polimérica, este processo ocorre através de reações de hidrólise ácida ou básica (KURITA, 2001; EINBU; GRADALEN; VARUM, 2007).

Este biopolímero é caracterizado como uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos, porém, é solúvel em soluções ácidas diluídas ($\text{pH} < 6,5$), onde ocorre a conversão das unidades glicosaminas para forma solúvel R-NH_3^+ . Em contato com soluções alcalinas ou com poliânions sofre precipitação. Além disso, apresenta ainda a capacidade de formar gel em baixos valores de pH. Comercialmente está disponível na forma de flocos secos, solução e pó fino. O seu peso molecular varia em média entre 3.800 e 2.000.000 Dalton e o grau de desacetilação de 66 a 95 %. Estes parâmetros, acrescidos do tamanho de partícula, densidade e viscosidade são considerados importantes fatores que influenciam nas propriedades das formulações farmacêuticas (SINHA et al., 2004).

As vantagens deste biopolímero em relação aos outros polissacarídeos são devido a sua não toxicidade e biodegradabilidade. Por estas propriedades, a quitosana tem sido usada como matriz de micropartículas e sistemas reticulados para imobilização e liberação de fármacos (NASCIMENTO et al., 2001; HEJAZI e AMIJI, 2003; GONÇALVES et al., 2005).

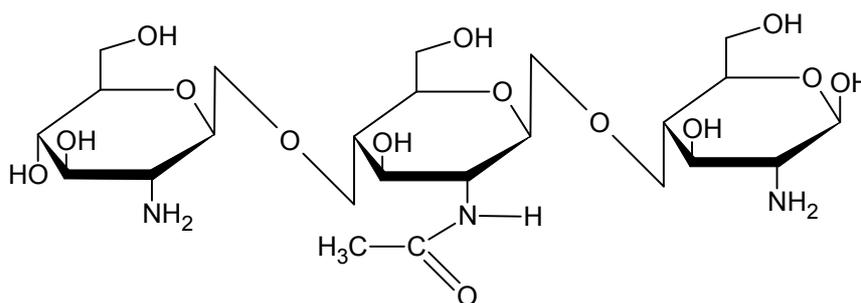


Figura 3. Estrutura química do copolímero quitosana

Uma importante característica da quitosana está na possibilidade de modificações estruturais, de modo a obter diversas formas de interação química e resistência mecânica. Essas interações químicas podem ser obtidas através de diferentes rotas, entre elas o uso de agentes reticulantes. A reticulação é uma modificação química que pode ser feita pela reação do polímero com diferentes substâncias, por exemplo, a reação dos grupos amino com glutaraldeído leva a formação de iminas (Figura 4) (TORRES et al., 2005; GEORGE e ABRAHAM, 2006). O tripolifosfato de sódio (TPP) também é usado como agente reticulante na preparação de micropartículas de quitosana. Este apresenta grupos O^- que são reativos, sendo atraído pelos grupamentos NH_3^+ da molécula de quitosana, ocorrendo assim, um entrelaçamento cruzado e aproximação entre essas duas substâncias através de uma reticulação iônica, conforme representado na Figura 5 (YANG et al., 2007).

O aumento do grau de reticulação leva a um aumento de obstáculos à difusão do fármaco, ou seja, as pontes de reticulação aproximam as cadeias macromoleculares e diminuem a sua mobilidade, provocando assim uma redução da área efetiva de difusão (GUPTA e JABRAIL, 2006).

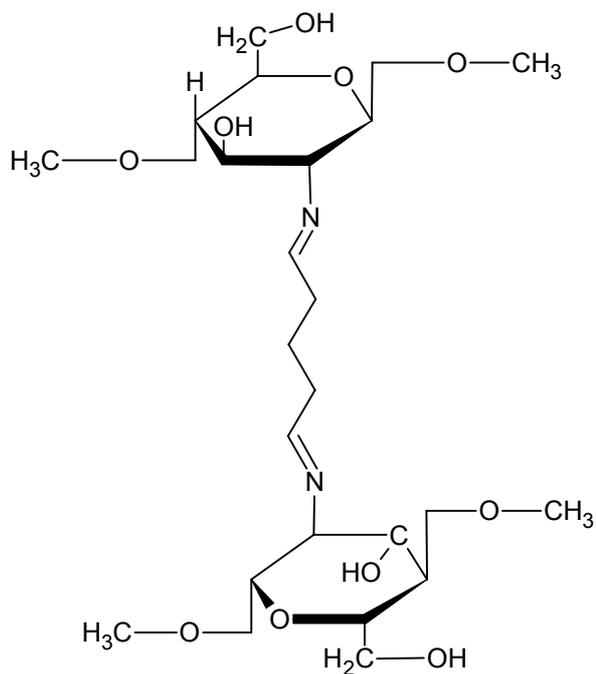


Figura 4. Figura representativa da reticulação entre a quitosana e o glutaraldeído

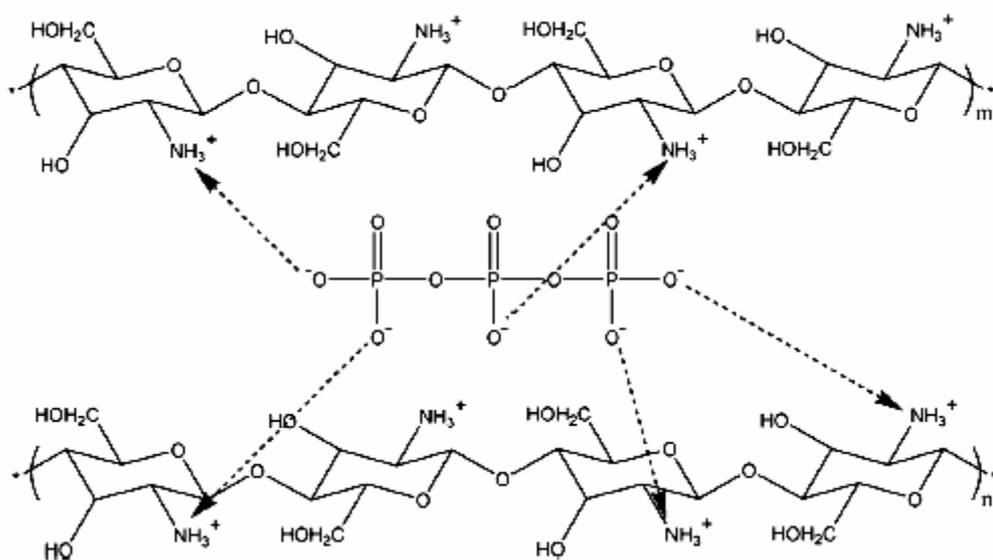


Figura 5. Figura representativa da reticulação entre a quitosana e o tripolifosfato

Outra interessante possibilidade de modificação estrutural da quitosana é a sua funcionalização química, através da introdução na matriz polimérica de grupos funcionais adicionais. Recentemente a reação de amidação da quitosana com ácido malônico, introduzindo grupos amida e carboxilato, resultou na malonilquitosana, a qual foi utilizada na forma de microesferas como sistema de liberação da enrofloxacina, um fármaco de uso exclusivo da medicina veterinária (VALGAS et al., 2005).

Devido à sua natureza policatiônica, quando a quitosana entra em contato com soluções ácidas é possível a sua moldabilidade nas mais diversas formas como, membranas, esferas, géis, microesferas, entre outros (TORRES et al., 2005).

2.4 Sistemas Microparticulados

2.4.1 Aspectos Gerais

A microencapsulação tem sido foco de inúmeras pesquisas na área farmacêutica nos últimos anos, envolvendo diferentes objetivos, entre eles a obtenção de produtos de liberação modificada. Esta técnica é considerada um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver sólidos, líquidos ou gases, isolando-os e protegendo-os das condições ambientais como luz, ar e umidade. Ainda, permite converter líquidos em sólidos, modificando as propriedades do colóide ou da superfície dos materiais, contribuindo para o controle de liberação de fármacos e sua biodisponibilidade. A incorporação de fármacos nestes sistemas pode ser definida como um processo pelo qual se envolvem quantidades pequenas de uma substância farmacologicamente ativa com um filme polimérico (RÉ, 1998; PENG; ZHANG; KENNEDY, 2006).

Os termos micropartículas e microcápsulas referem-se a dois tipos de estruturas distintas (Figura 6). As microcápsulas são partículas normalmente esféricas, se estiverem carregando um líquido ou um gás, ou de outro formato se carregarem partículas sólidas ou semi-sólidas, já que constituem um sistema tipo reservatório. O material microencapsulado é chamado de núcleo ou fase interna

enquanto a fase externa é também conhecida como parede, revestimento ou membrana. Denomina-se microesferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogêneamente disperso no interior da matriz polimérica ou cerosa, formando um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. O material polimérico forma uma rede tridimensional, onde o fármaco pode ser adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à superfície da partícula, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos. As partículas com tamanho entre 10 e 1000 nm (1 μm) são consideradas nanopartículas, enquanto que partículas maiores que 1 μm são denominadas micropartículas (BRESOLIN e FILHO, 2003).

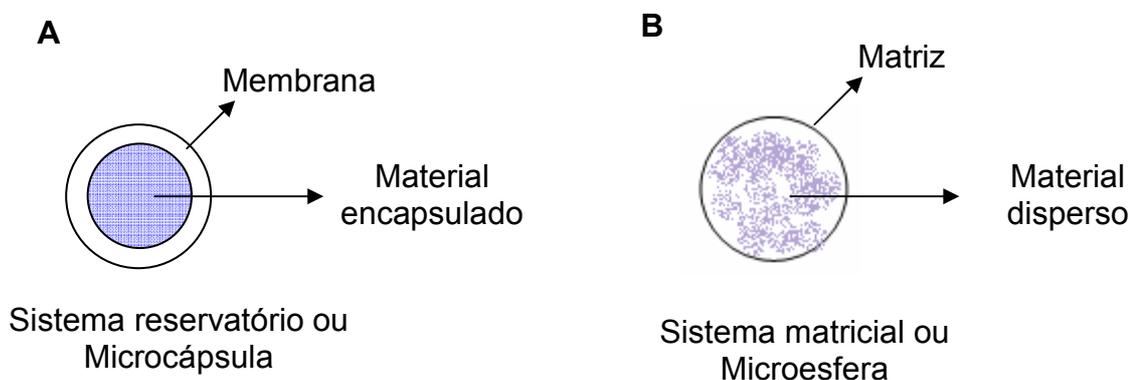


Figura 6. Estrutura dos sistemas obtidos por microencapsulação

2.4.2 Métodos de preparação

Muitos métodos foram propostos para produção de micropartículas, dependendo da solubilidade do núcleo e do polímero, tamanho de partícula, permeabilidade e espessura da parede, propriedades físicas, tipo e taxa de liberação e custo de produção (BRESOLIN e FILHO, 2003; ANAL e SINGH, 2007; JAWOREK, 2007). O método ideal de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido, fácil de transpor à escala industrial e deve ser pouco dependente das características de solubilidade do fármaco e polímero (SILVA et al., 2003).

Para promover a formação de micropartículas, tanto para aplicação em alimentos, como em cosméticos e liberação de fármacos, existem métodos químicos, físicos (mecânicos) e físico-químicos. Entre os métodos químicos utilizados destacam-se a inclusão molecular, que corresponde à encapsulação de certas moléculas por outras e a polimerização interfacial. Pode-se citar ainda a policondensação interfacial e a polimerização em meio disperso (CONSTANT e STRINGHETA, 2002; JAWOREK, 2007).

Como métodos físico-químicos citam-se a separação de fases ou a coacervação simples e complexa, a evaporação-extração de solvente, a gelificação térmica de emulsões e o envolvimento lipossômico. Estes métodos, de forma geral, transformam substâncias inicialmente solúveis, tais como polímeros e ceras, em materiais insolúveis no mesmo meio (PAVANETTO et al., 1993).

A coacervação ou separação de fases consiste na obtenção a partir de uma solução contendo uma macromolécula dispersa, de duas fases líquidas imiscíveis, uma fase de coacervado, em que a macromolécula está presente em elevada concentração e uma fase de equilíbrio, em que a mesma está em baixa concentração. Quando está presente uma única macromolécula este processo é designado por coacervação simples e quando estão presentes duas ou mais moléculas de carga oposta é referido como coacervação complexa. A coacervação simples é induzida por uma alteração de condições que causam a dessolvatação da macromolécula, como a adição de um não-solvente, a adição de micro-íons ou alterações da temperatura, que promovem as interações macromolécula-macromolécula em detrimento das interações macromolécula-solvente. A coacervação complexa é induzida através da criação de forças eletrostáticas entre as macromoléculas (PAVANETTO et al., 1993; SILVA et al., 2003).

Dentro os processos físicos citam-se o revestimento por extrusão, com diversas modalidades, e mais recentemente a coextrusão/esferonização e nebulização por *spray-drying* (CONSTANT e STRINGHETA, 2002; JAWOREK, 2007). Esta tecnologia é utilizada em diversos segmentos industriais, incluindo o

farmacêutico. Embora seja uma técnica de elevado custo, que necessita de investimentos em instalações e operações, muitas são as razões pelas quais a mesma é amplamente utilizada apesar do custo. Estas vantagens incluem a produção de partículas de qualidade consistente, a facilidade em relação ao uso contínuo, a aplicabilidade da técnica em materiais tanto sensíveis quanto resistentes ao aquecimento e a capacidade de processar vários tipos de matérias-primas (PALMIERI; WHERLÉ; STAMM, 1994; DANGPRASIRT e RITTHIDEJ, 1995; WENDEL e ÇELIK, 1998; RATTES e OLIVEIRA, 2007).

No método de atomização por *spray-drying* (Figura 7) o fármaco é incorporado juntamente ao material revestidor previamente solubilizado ou fundido. A solução resultante é atomizada em um compartimento que recebe um fluxo de ar quente. A rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto (BROADHEAD; ROUAN; RHODES, 1992; BERMAN; PIERCE; PAGE, 1994; SHU et al., 2006).

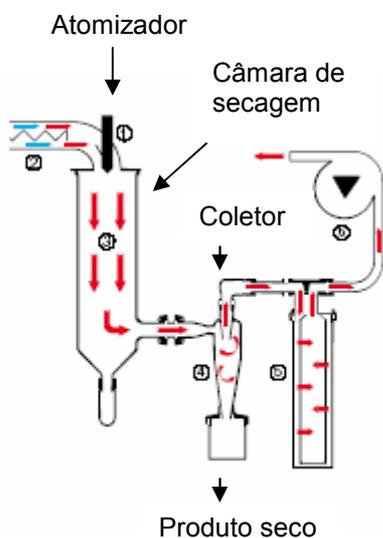


Figura 7. Desenho esquemático do *spray-dryer*

2.4.3 Aplicação das micropartículas

Na área farmacêutica as aplicações das micropartículas são extensas, sendo empregadas para mascarar sabores ou odores, converter líquidos em sólidos e a proteção em relação aos agentes atmosféricos (umidade, luz, calor e/ou oxidação), proporcionando um aumento da estabilidade (DAVIES, 2001; BRESOLIN e FILHO, 2003; SILVA et al., 2003).

Outras aplicações incluem a redução ou eliminação da irritação gástrica ou efeitos secundários provocados por alguns fármacos, a redução da volatilidade, a administração de fármacos incompatíveis, o melhoramento das características de escoamento de pós, a facilitação do manuseio de substâncias tóxicas, o auxílio à dispersão de substâncias insolúveis em água em meios aquosos e a produção de formas farmacêuticas de liberação modificada (DAVIES, 2001; BRESOLIN e FILHO, 2003; SILVA et al., 2003).

2.4.4 Vias de administração de produtos microparticulados

As vias para administração destes produtos são as mais variadas possíveis, dependendo do alvo terapêutico desejado. As microcápsulas podem ser administradas via parenteral ou implantadas. Pela via oral, fármacos microencapsulados são geralmente administrados por meio de cápsulas de gelatina dura, que podem também receber revestimento entérico ou, alternativamente, em suspensões estáveis, eventualmente incluídas em cápsulas moles. As vias nasal e ocular são também de interesse para o uso de micropartículas (BRESOLIN e FILHO, 2003; MELO et al., 2006; VANDELLI et al., 2006; BODMEIER e KRANZ, 2007; HE et al., 2007; DONG; MAINCENT; BODMEIER, 2007).

2.5 Liberação modificada

2.5.1 Considerações gerais

Alguns sistemas de liberação de fármacos destinam-se a liberar o fármaco no organismo de modo que seja absorvido com rapidez e completamente, enquanto outros devem liberar o princípio ativo lentamente para que a ação do fármaco seja prolongada (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Cada sistema de liberação objetiva eliminar as mudanças cíclicas na concentração de fármaco no plasma, observada após a administração de um sistema de liberação convencional. Assim uma variedade de expressões são utilizadas para descrever esses sistemas de liberação modificada (AULTON, 2005):

- Liberação retardada: indica que o fármaco não é liberado imediatamente após a administração, mas um tempo depois, por exemplo, comprimidos com revestimento entérico e cápsulas de liberação pulsátil;
- Liberação repetida: indica que uma dose individual é liberada regularmente logo após a administração, e uma segunda ou terceira doses são subsequentemente liberadas;
- Liberação prolongada: indica que o fármaco é disponibilizado para absorção por um período de tempo mais prolongado do que a partir de uma forma farmacêutica convencional;
- Liberação sustentada: indica uma liberação inicial de fármaco, suficiente para disponibilizar a dose terapêutica logo após a administração, a qual é seguida de uma liberação gradual do fármaco, por um período de tempo estendido;
- Liberação estendida (LE): refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco lentamente de modo a manter as concentrações plasmáticas no nível

terapêutico, por um período prolongado de tempo (em geral, entre 8 e 12 horas);

- Liberação controlada (LC): refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco em uma velocidade constante e fornecem concentrações plasmáticas que permanecem invariáveis com o tempo;

- Liberação modificada (LM): refere-se a formas farmacêuticas definidas pela USP (United States Pharmacopea), nas quais as características de curso e/ou localização de liberação de fármacos são escolhidas para satisfazer objetivos terapêuticos ou de conveniência não oferecidos pelas formas convencionais, entretanto uma forma farmacêutica de liberação estendida (LE) permite uma dupla redução da frequência de doses. É interessante salientar que a USP considera os termos, liberação controlada, liberação prolongada e liberação sustentada intercambiáveis com o termo liberação estendida.

A maioria dos sistemas de liberação modificada (Figura 8) é elaborada de modo que a administração de uma só unidade de dose proporcione a liberação imediata de uma quantidade de fármaco que prontamente produz o efeito terapêutico desejado, e a liberação gradual contínua de quantidades adicionais para manter esse nível de efeito durante um período prolongado. Nestes sistemas, o planejamento baseia-se nas características peculiares de cada fármaco, pois o que pode ser efetivo para um fármaco pode não ser eficiente para outro, considerando as características físicas, químicas e biológicas de cada um. Para manter o nível constante de fármaco no organismo, este deve ser liberado em velocidade que substitua a quantidade que foi metabolizada e excretada (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

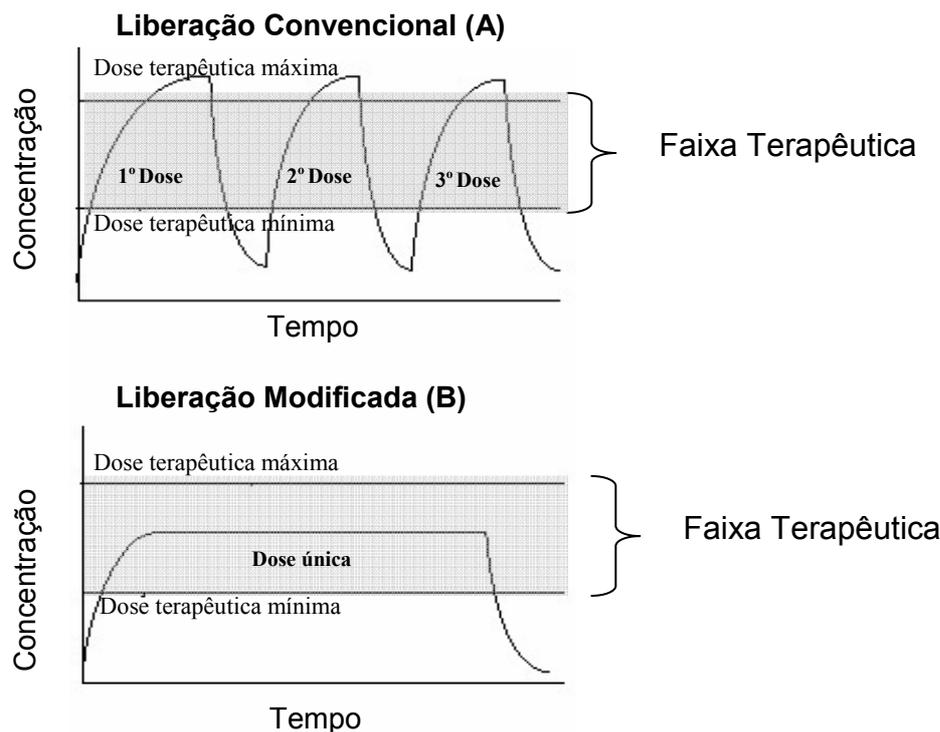


Figura 8. Cedência do fármaco de uma forma farmacêutica de liberação convencional (A) e liberação modificada (B)

2.5.2 Vantagens terapêuticas

Estas formulações apresentam grandes vantagens quando comparadas às formas farmacêuticas de liberação convencional, como por exemplo, a frequência da administração é reduzida e a adesão do paciente à terapêutica pode aumentar, tornando a administração do fármaco mais adequada. As variações das concentrações plasmáticas, características dos regimes posológicos múltiplos das formas farmacêuticas convencionais, são reduzidas, pois se consegue manter um nível plasmático. Outra vantagem menos evidente, mas que está implícita na concepção deste tipo de forma farmacêutica é o fato da quantidade total de fármaco administrado ao paciente poder ser reduzida, logo a biodisponibilidade é maior para uma dose mínima. Por outro lado, pode-se conseguir um controle mais adequado da absorção do fármaco, uma vez que o nível dos picos plasmáticos observados após a administração da dose de um fármaco bastante biodisponível, pode ser reduzida pela sua formulação numa forma de ação modificada. A margem de segurança de fármacos bastante potentes pode ser aumentada e a incidência de efeitos adversos

locais ou sistêmicos pode ser reduzida em pacientes mais sensíveis (LACHMAN; LIEBERMAN; KANING, 2001).

2.5.3 Sistemas de liberação modificada contendo aciclovir

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, vem sendo amplamente investigado (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Pesquisa bibliográfica realizada na base de dados "Science Direct" demonstrou que foram pesquisados e desenvolvidos poucos trabalhos envolvendo sistemas de liberação diferenciados para o aciclovir. Os principais trabalhos estão relatados a seguir:

Em 1998, Gröning e colaboradores desenvolveram comprimidos magnetizados para administração oral, a fim de controlar o trânsito gastrointestinal da formulação. Os resultados apontaram que a concentração plasmática do aciclovir foi significativamente maior após 12 horas da administração, em relação aos comprimidos de liberação imediata.

Lipossomas a base de fosfatidilcolina para liberação ocular foram preparados e investigados *in vitro* e *in vivo*, apresentando um aumento na penetração do fármaco (LAW; HUANG; CHIANG, 2000). Rossel e colaboradores (2000) complexaram o aciclovir com β -ciclodextrinas a fim de promover um aumento da solubilidade. Microesferas de liberação sustentada foram desenvolvidas utilizando a etilcelulose como polímero, promovendo tempos de liberação em torno de 12 horas em fluido gastrointestinal (CHEU et al., 2001).

Sistemas microencapsulados com poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo) foram preparados para administração tópica, permitindo um aumento do aciclovir na epiderme basal (JÁLON et al., 2003). O mesmo sistema com diferentes pesos moleculares também foi utilizado para desenvolver micropartículas visando à

administração intravítrea (CONTI et al., 1997; SANCHO; VANRELL; NEGRO, 2003). Sandri e colaboradores (2004) indicaram um aumento da permeação e muco adesão bucal e vaginal quando o fármaco foi incorporado em uma solução polimérica contendo a 5-metil-pirrolidinoquitosana como polímero base. Pavelic e colaboradores (2005) desenvolveram lipossomas contendo aciclovir para liberação vaginal.

A literatura demonstra o desenvolvimento de comprimidos matriciais hidrofílicos constituídos por hidroxipropilmetilcelulose K4M em diferentes proporções, proporcionando tempos de liberação de aproximadamente 400 minutos (FUERTES et al., 2006).

O copolímero polietileno-co-acetato de vinila foi utilizado para originar um filme bucal de liberação modificada (TALLURY; ALIMOHAMMADI; KALACHANDRA, 2007). A acrilamida enxertada com dextrana e quitosana foi igualmente empregada como polímero base para o desenvolvimento de microesferas contendo aciclovir, através da técnica de emulsificação (ROKHADE; PATIL; AMINABHAVI, 2007).

Recentemente, filmes poliméricos constituídos de etil e hexilmetacrilato com diferentes pesos moleculares foram desenvolvidos por Tallury e colaboradores (2008) para encapsulação do aciclovir. Microcápsulas de liberação controlada foram preparadas a partir de polivinilgalactose-éster-metacrilatrimetilamônia na forma de cloridrato (ZHANG et al., 2008). Um complexo do fármaco com β -ciclodextrina/poliamida/amino, foi formulado objetivando aumentar a solubilidade do mesmo (BENCINI et al., 2008).

Observa-se, ainda, que diversos sistemas investigados contendo aciclovir destina-se às vias de administração alternativas à via oral, o que implica na necessidade de pesquisar e desenvolver sistemas objetivando-se este local de administração.

2.6 Via Oral

A administração de fármacos pela via oral é a mais comum, entretanto é também a mais variável e envolve o trajeto mais complicado de acesso aos tecidos. Certos fármacos são absorvidos no estômago, porém o principal sítio de entrada para a circulação sistêmica é o duodeno, em razão de sua maior superfície de absorção. A maioria dos fármacos absorvidos no trato gastrointestinal (TGI) entra na circulação porta e passa pelo fígado antes de ser distribuído pela circulação geral. O metabolismo de primeira passagem no intestino ou fígado limita a eficácia de muitos fármacos administrados por via oral.

A absorção pelo trato gastrointestinal é regulada por diversos fatores, tais como, estado físico do fármaco, área de superfície para a absorção, fluxo sanguíneo e a concentração no local da absorção. As principais vantagens em se administrar um medicamento por via oral, estão relacionadas com a segurança, conveniência e economia (AULTON, 2005).

2.7 Fisiologia do trato gastrointestinal e absorção de fármacos

A via oral é aquela pela qual a maioria dos medicamentos é administrada, assim sendo, é importante conhecer como essas formulações comportam-se durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Sabe-se que o intestino delgado é o sítio de maior absorção de fármacos e por esse motivo, o tempo em que o fármaco permanece nessa parte do trato gastrointestinal é altamente significativo. Quando estão sendo desenvolvidos sistemas de liberação modificada, é essencial avaliar os fatores que podem afetar o seu comportamento e, especialmente o tempo de trânsito em determinadas regiões do trato gastrointestinal. De modo geral, a maioria das formas farmacêuticas quando ingeridas na posição ereta, passa pelo esôfago rapidamente em geral menos de 15 segundos. O trânsito pelo esôfago depende tanto da forma farmacêutica como da postura (AULTON, 2005).

2.7.1 Esvaziamento gástrico

O tempo que uma forma farmacêutica leva para atravessar o estômago é geralmente denominado de, tempo de resistência gástrica, tempo de esvaziamento gástrico ou velocidade de esvaziamento gástrico. O esvaziamento gástrico de medicamentos é muito variável e depende da forma farmacêutica e se o estômago está cheio ou em jejum. Os tempos de residência gástrica normais variam geralmente de cinco minutos a duas horas (AULTON, 2005).

2.7.2 Trânsito pelo intestino delgado

O intestino delgado é um tubo cilíndrico com pouco mais de 6 metros e aproximadamente 4 cm de diâmetro na porção proximal, estreitando-se até 2,5 cm de diâmetro na porção distal. O duodeno é a primeira porção proximal do intestino delgado, que se estende do piloro (gastroduodenal) ao jejuno. No duodeno realiza-se a digestão do quimo, pela ação do suco entérico que contém enzimas como a enteroquinase e hormônios como a secretina (GUYTON, 1992).

O jejuno e o íleo constituem a porção mesentérica e móvel do intestino delgado, começando ao nível da flexura duodeno-jejunal e terminando ao nível da fossa ilíaca direita, onde se estabelece a continuidade com o intestino grosso. A absorção dos nutrientes ocorre nas regiões do jejuno e do íleo. Os nutrientes são absorvidos pelo sangue e passam para o fígado para serem distribuídos a todo organismo (GUYTON, 1992).

O trânsito no intestino delgado é relativamente constante, em torno de três horas. Contrastando com o estômago, não discrimina sólidos de líquidos e, por isso, não discrimina formas farmacêuticas, no indivíduo em jejum ou após a ingestão de alimentos. O tempo de residência no intestino delgado é um fator de particular importância para formas farmacêuticas que liberam lentamente o fármaco à medida que passam ao longo do trato gastrintestinal, como o são os sistemas de liberação prolongada, sustentada e controlada, bem como formas farmacêuticas com

revestimento entérico, as quais liberam o fármaco somente quando alcançam o intestino delgado (AULTON, 2005).

Geralmente o intestino delgado é considerado como sítio primário de absorção de fármacos e, conseqüentemente, a via principal de escolha para sua liberação. Entretanto, um grande interesse na liberação de fármacos no cólon tem ocorrido nos últimos anos (MACKAY; PHILLIPS; HASTEWEL, 1997; BRESOLIN e FILHO, 2003).

2.7.3 Trânsito pelo intestino grosso

O intestino grosso é a parte final do tubo digestivo. Nele distinguem-se três partes: ceco, cólon e reto. Entre essas regiões, a mais importante em relação à absorção de fármacos é o cólon. Este é composto de três regiões; cólon ascendente, o cólon transverso, que atravessa a cavidade abdominal da direita para a esquerda e o cólon descendente (GUYTON, 1992; MACKAY; PHILLIPS; HASTEWEL, 1997). O trânsito de medicamentos no cólon é longo e variável (2 a 48 horas), podendo variar de acordo com o tipo de forma farmacêutica, da dieta, padrões de alimentação e estados doentes. Na maioria das pessoas, os tempos de trânsito da boca até o ânus ultrapassam 24 horas (AULTON, 2005). O trato gastrointestinal humano está representado na Figura 9.

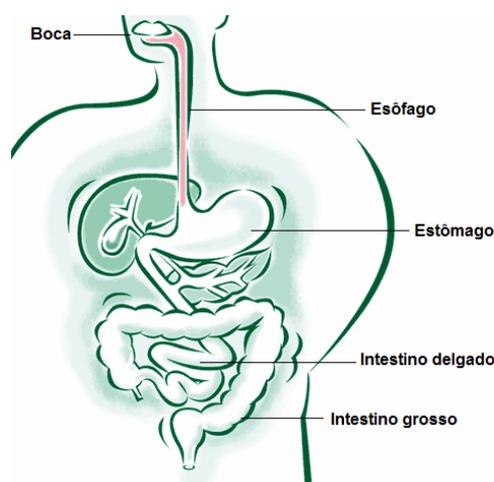


Figura 9. Trato gastrointestinal humano

III- Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo desenvolver micropartículas contendo aciclovir, utilizando o biopolímero quitosana como matriz polimérica, através das técnicas de coacervação e *spray-drying*, a fim de promover uma liberação modificada do fármaco.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterização do fármaco aciclovir (matéria-prima);
- Síntese das microesferas de malonilquitosana através da reação de amidação entre a quitosana (microesferas gelatinizadas) e o ácido malônico;
- Caracterização das microesferas de malonilquitosana, através de análise elementar, IV, RMN ^{13}C , TG e MEV;
- Impregnação do aciclovir nas microesferas de malonilquitosana através da técnica de adsorção por contato;
- Avaliação do grau de intumescimento das microesferas de malonilquitosana contendo aciclovir;
- Desenvolvimento das micropartículas de quitosana contendo aciclovir pela técnica de *spray-drying* (Parte I – sem adição de agente reticulante) e (Parte II- com adição do agente reticulante tripolifosfato);
- Determinação da eficiência de encapsulação das formulações desenvolvidas pelas técnicas de coacervação e *spray-drying*;
- Determinação *in vitro* do perfil de liberação do fármaco a partir das formulações desenvolvidas por ambas as técnicas;

- Aplicação de modelos matemáticos para elucidar os mecanismos envolvidos na liberação do aciclovir a partir dos sistemas poliméricos desenvolvidos pelas distintas técnicas;
- Caracterização das micropartículas desenvolvidas por *spray-drying*, pelas técnicas de DSC, TG, DRX, IV e MEV;
- Avaliação da estabilidade das formulações desenvolvidas por *spray-drying* (Parte II) frente à temperatura de 40 ± 2 °C, umidade relativa de 75 ± 5 % e condições ambientais de temperatura e umidade;
- Validação da metodologia analítica de doseamento das micropartículas produzidas por *spray-drying* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

IV- Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-Primas

O fármaco aciclovir foi cedido pela empresa Eurofarma, este proveniente do fornecedor Chemo SA, número de lote 4507062001. A quitosana foi obtida da Purifarma, apresentando um grau de desacetilação de 90 % e massa molar média de 122.740 Dalton e o tripolifosfato foi adquirido da Plury Química LTDA, lote interno 2134560. Os padrões de aciclovir e guanina são provenientes da Farmacopéia Brasileira.

4.1.2 Solventes e Reagentes

Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza analítica com exceção daqueles utilizados na análise por CLAE.

- Acetonitrila (grau cromatográfico)
- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- Ácido malônico
- Ácido sulfúrico
- Água deionizada
- Água destilada
- Etanol
- Fosfato de sódio
- Glutaraldeído
- Hidróxido de sódio

4.1.3 Equipamentos

- Analisador térmico DSC 60 SHIMADZU
- Aparelho de dissolução VARIAN

- Balança Analítica OHAUS
- Banho de ultrason UNIQUE
- Bomba peristáltica ISMATEC
- Centrifuga SIGMA
- Coluna Cromatográfica PHENOMENEX
- Cromatógrafo líquido SHIMADZU FRC-10 A, com bomba LC-10AD e detector SPD-10AV da SHIMADZU, gerenciado por controlador SCL-10 AVP, acoplado a computador Mega Corp e operado pelo programa Class-VP
- Elemental Analyzer Carlo Erba, modelo EA 1110
- Difrator de raios X, PHILIPS, modelo X-Pert
- Microscópio Eletrônico de Varredura PHILIPS, modelo XL30
- Espectrofotômetro UV/VIS VARIAN, modelo Cary 50 BIO
- Espectrofotômetro RMN 400 MHZ-VARIAN, modelo Eur 0028
- Espectrofotômetro infravermelho FT Perkin Elmer, modelo 16 PC
- Mini *spray-dryer* BUCHI, modelo B-191, Suíça
- Termobalança TGA-50 SHIMADZU

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização do fármaco

O aciclovir (matéria-prima) utilizado para a realização deste trabalho foi submetido aos ensaios de determinação do teor de substância ativa (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e ultravioleta (UV), e calorimetria exploratória diferencial (DSC) com o objetivo de caracterizá-lo e realizar o seu controle de qualidade.

4.2.2 Desenvolvimento das micropartículas

As micropartículas a base de quitosana foram desenvolvidas por técnicas distintas, coacervação e *spray-drying*, conforme metodologias descritas a seguir:

4.2.2.1 Preparação das microesferas de quitosana gelatinizada pela técnica de coacervação

A quitosana (5 g) foi dissolvida em 100 mL de uma solução de ácido acético 5 % (v/v). Em seguida foi gotejada em um banho contendo solução de NaOH 2,0 mol.L⁻¹ através de uma bomba peristáltica (Ismatec) sob constante agitação, para dar origem as microesferas de quitosana gelatinizada, sendo estas lavadas, posteriormente, com água destilada até pH neutro e secas a temperatura ambiente.

4.2.2.2 Síntese das microesferas de malonilquitosana através da reação de amidação com ácido malônico

Uma amostra de 5 g de microesferas de quitosana gelatinizadas foi pesada e suspensa em 20 mL de etanol anidro, sob constante agitação durante uma hora, logo após o etanol foi retirado por filtração. As microesferas de quitosana úmidas foram suspensas novamente em 20 mL de etanol contendo 450 mg de ácido malônico. A mistura resultante foi refluxada por 36 horas a 78 °C e então resfriada em temperatura ambiente. Após este procedimento as microesferas foram colocadas em contato com uma solução de glutaraldeído 2,5 % (m/v) por um período de 24 horas em temperatura ambiente, sob constante agitação. O material resultante foi filtrado e lavado com água destilada para a retirada do excesso do agente reticulante.

4.2.2.3 Caracterização e análises físico-químicas das microesferas de malonilquitosana

As microesferas produzidas pela técnica de coacervação e modificadas pela reação de amidação com ácido malônico foram submetidas aos seguintes ensaios:

4.2.2.3.1 Determinação do grau de substituição por análise elementar

O grau de substituição (GS) nas microesferas de quitosana foi determinado de acordo com o método descrito por Inukai e colaboradores conforme Equação 1 (INUKAI et al., 1998):

$$GS = [(C/N)_r - (C/N)_o] / 3 \quad (1)$$

Onde $(C/N)_r$ é a razão carbono/nitrogênio das microesferas de malonil resultante e $(C/N)_o$ é a razão carbono/nitrogênio das microesferas de quitosana gelatinizada. O valor 3 é referente ao número de átomos de carbono substituintes. Os valores de C/N foram medidos através de um Elemental Analyzer Carlo Erba EA 1110, utilizando-se os valores experimentais percentuais de C, H e N.

4.2.2.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

As microesferas de quitosana gelatinizada e malonilquitosana foram previamente trituradas e prensadas com KBr na forma de pastilhas. Os espectros das microesferas na região do infravermelho foram obtidos através de espectrofotômetro FT Perkin Elmer modelo 16 PC, na região de 4000 - 400 cm^{-1} .

4.2.2.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C em fase sólida foram obtidos em aparelho Oxford Instruments, NMR 400 MHz- Varian Model Eur 0028, através do programa mercury NMR Spectrometer Systems.

4.2.2.3.4 Análise termogravimétrica (TG/DTG)

As curvas TG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 °C e 600 °C, utilizando-se termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu, sob razão dinâmica de nitrogênio (50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), razão de aquecimento de 10 °C. min^{-1} , utilizando cadinho de platina contendo aproximadamente 3 mg da amostra.

4.2.2.3.5 Determinação do grau de intumescimento (GI)

Alíquotas de microesferas secas (0,5 g) foram colocadas em béqueres com soluções de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ pH 1,2 e tampão fosfato com pH 6,8 e 9,0 em temperatura constante de 37 °C. A cada 30 minutos durante o período de 6 horas as microesferas foram retiradas e ligeiramente secas em papel absorvente, para eliminar excesso de água, sendo em seguida pesadas em balança analítica. A mesma massa de microesferas foi submetida a valores crescentes de pH, permanecendo durante duas horas em cada valor. A cada 30 minutos foram secas em papel absorvente e pesadas em balança analítica. O grau de intumescimento (GI %) foi calculado pela Equação 2, até as amostras apresentarem peso constante. Este ensaio foi realizado em triplicata.

$$GI \% = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde GI é o grau de intumescimento, M_t é a massa (g) da amostra hidratada e M_0 é a massa (g) da amostra seca.

4.2.2.3.6 Incorporação do fármaco nas microesferas de malonilquitosana

O aciclovir (0,2 g) foi incorporado nas microesferas de malonilquitosana (1 g) através da técnica de adsorção por contato. O fármaco foi dissolvido em 100 mL de HCl 0,3 mol.L⁻¹ e a solução resultante colocada em contato com as microesferas por períodos de 6, 12 e 24 horas, sob agitação constante para ocorrer uma melhor penetração do fármaco. Após este período as microesferas foram retiradas, filtradas e lavadas ligeiramente com HCl 0,3 mol.L⁻¹, para retirar o excesso do fármaco, e secas à temperatura ambiente.

4.2.2.3.7 Eficiência de encapsulação

Amostras de 100 mg de microesferas de malonilquitosana contendo aciclovir foram trituradas e dissolvidas em 10 mL de HCl 0,3 mol.L⁻¹. A solução foi filtrada através de um filtro (Milipore®) de 0,22 µm. O conteúdo de fármaco contido nas microesferas foi determinado por espectroscopia na região do ultravioleta ($\lambda_{\text{max}}=254$ nm; Varian Carry 50 Bio, USA) e a porcentagem de encapsulação calculada conforme Equação abaixo:

$$\% \text{ Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{Massa de aciclovir presente nas microesferas}}{\text{Massa teórica de aciclovir}} \times 100 \quad (3)$$

4.2.2.3.8 Liberação *in vitro*

Os estudos de liberação foram baseados no método proposto pela Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30/NF 25, 2007), utilizando-se aparato I (cesto), temperatura de $37 \pm 0,5$ °C e velocidade de rotação de 100 rpm. O meio de dissolução simulou o fluido gastrointestinal (pH 1,2 e 6,8) e o volume utilizado foi de 500 mL. Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 minutos ou até a liberação de 80 % do fármaco. O mesmo volume retirado em cada intervalo de tempo foi repostado. As amostras foram centrifugadas e a quantidade de aciclovir liberada determinada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro na região do UV, em 254 nm. A concentração de aciclovir foi determinada através da equação da reta média obtida previamente através da construção de uma curva de calibração (2 a 20 µg.mL⁻¹).

4.2.2.3.9 Avaliação morfológica e tamanho de partícula

Para a avaliação morfológica e determinação do tamanho de partícula foi utilizado equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura, modelo XL30 da

marca PHILIPS. As amostras foram recobertas com ouro (350 Å), sob vácuo, com o auxílio do aparelho Polaron modelo E 5000.

4.2.3 Preparação das micropartículas pela técnica de *spray-drying*

O desenvolvimento das micropartículas pela técnica de *spray-drying* foi realizado em duas etapas: uma primeira etapa onde foi desenvolvida a formulação F1 sem a adição de tripolifosfato (etapa de pré-formulação) e uma segunda etapa onde as demais formulações (F2, F3, F4, F5 e F6) foram preparadas com a adição do agente reticulante tripolifosfato.

As formulações foram desenvolvidas conforme a Tabela 2 e esquema representado na Figura 10. O aciclovir (100 a 200 mg) foi solubilizado em solução de HCl 0,1 mol.L⁻¹. Em seguida, a quitosana, em diferentes concentrações foi dissolvida na solução contendo o fármaco e homogenizada durante 1 hora com o auxílio de um agitador magnético, dando origem a uma solução polimérica. A solução de tripolifosfato foi adicionado à solução lentamente, sob agitação constante durante 30 minutos. A solução resultante foi nebulizada em spray-dryer Buchi (modelo B-191, Suíça) sob as seguintes condições: temperatura do ar (entrada) e saída 180 °C e 92 °C respectivamente, fluxo da solução 7mL/min, fluxo de ar 500L/h e aspiração a 100%.

Tabela 2: Formulações desenvolvidas por *spray-drying*

Formulação	Quitosana (g)	Volume de TPP 2 % (mL)	Massa de aciclovir (mg)	Volume de HCl 0,1 mol.L ⁻¹ (mL)
F1	1	0	200	100
F2	1	1	100	100
F3	1	1	150	100
F4	1	1	200	100
F5	2	2	100	100
F6	2	2	150	100

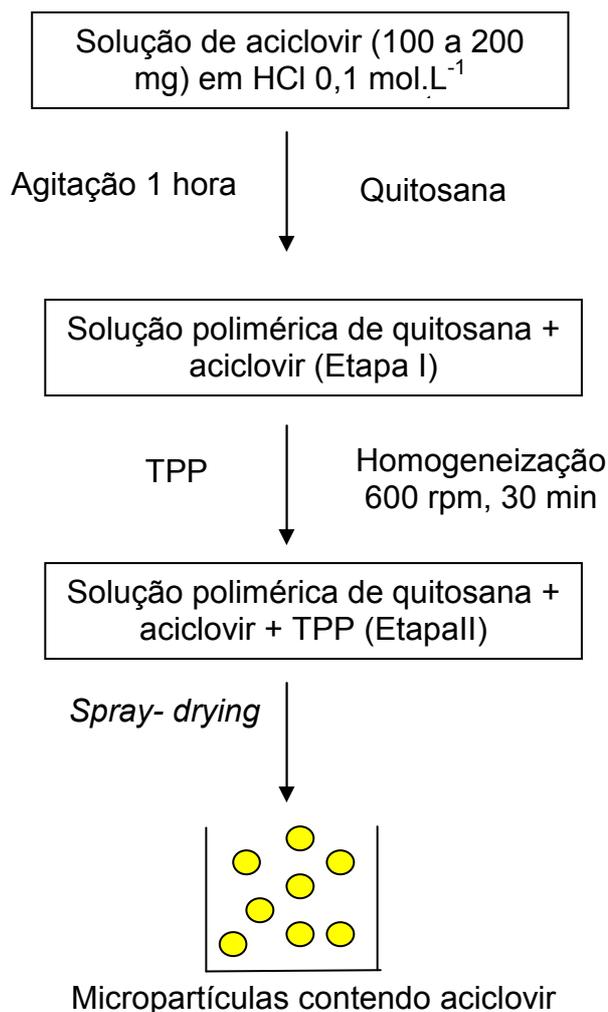


Figura 10. Esquema representativo da metodologia de preparo das micropartículas de quitosana contendo aciclovir por *spray-drying*

4.2.3.1 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de *spray-drying*

As formulações desenvolvidas por esta técnica foram submetidas aos ensaios de: eficiência de encapsulação (determinada por CLAE), termogravimetria (TG), espectroscopia na região do infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e liberação *in vitro*, conforme metodologias descritas anteriormente. Além dos ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X de pó (DRX), métodos descritos a seguir.

As formulações desenvolvidas na segunda etapa foram avaliadas também através de termogravimetria no modo isotérmico e estudos de estabilidade acelerada, conforme metodologias descritas abaixo:

4.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 °C e 600 °C, utilizando-se célula calorimétrica modelo DSC-60 da Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min, utilizando cápsula de alumínio parcialmente fechada contendo a amostra.

4.2.3.3 Difração de raios X de pó

Os difratogramas foram obtidos em equipamento Philips (fonte de radiação Cu-K α , varredura angular 2θ) modelo X-Pert, nas seguintes condições: filtro de níquel, tubo com ânodo de cobre, voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA.

4.2.3.4 Termogravimetria modo isotérmico

As curvas isothermas foram obtidas na faixa de temperatura entre 20 °C e 100 °C, utilizando-se termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu, sob razão dinâmica de oxigênio (50 mL.min⁻¹). A taxa de aquecimento empregada foi de 10 °C.min⁻¹ até 20 °C e 1 °C.min⁻¹ até atingir 100 °C, sendo então mantida nesta temperatura durante 4 horas. As amostras (3 mg) foram pesadas e analisadas em cadinho de platina.

4.2.3.5 Estabilidade acelerada

Os estudos de estabilidade acelerada foram realizados em câmara climática a temperatura de 40 \pm 2 °C e 75 \pm 5 % de umidade relativa durante o período de seis

meses (Resolução RE nº 1, de 29 de Julho de 2005), bem como sob condições ambientais de temperatura e umidade (faixa de temperatura de 20 a 30 °C e faixa de umidade de 60 a 70 %). Amostras das formulações foram retiradas nos intervalos de tempos de 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias e o teor de fármaco determinado por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme metodologia previamente validada.

4.2.4 Validação da metodologia analítica de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.4.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC -10 A Japão), equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10 AV e controlador SCL-10 AVP. Empregou-se uma coluna de fase reversa (150 mm × 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de particular de 5 µm). A fase móvel constituída de água: acetonitrila (95:5 v/v), pH 2,5; eluída em uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹, modo isocrático. O volume injetado foi 20 µL para todas as amostras e os dados foram obtidos através do software Class VP.

4.2.4.2 Preparo da solução padrão

A solução padrão de 50 µg.mL⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 10 mg de aciclovir padrão em 10 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ e o volume completado com fase móvel em balão volumétrico de 200 mL. A partir desta solução foram feitas as diluições necessárias para os ensaios.

4.2.4.3 Preparo da amostra

Uma alíquota de microsferas correspondente a 10 mg de aciclovir foi pesada em balança analítica, dissolvida em 10 mL de etanol 90 % e sonicada durante 15 minutos para extração do fármaco. O volume foi completado em balão volumétrico

de 200 mL com fase móvel. Alíquotas foram diluídas para obterem-se soluções com diferentes concentrações de aciclovir (2, 5 e 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

O método foi validado conforme o preconizado na Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003 e com as recomendações da ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade e faixa, limite de quantificação (LQ) e detecção (LD), precisão, exatidão e robustez.

4.2.4.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de análises comparativas entre as micropartículas sem aciclovir (placebo) e as contendo o aciclovir, com os padrões primários de aciclovir e guanina.

4.2.4.5 Linearidade e faixa

A linearidade e a faixa foram verificadas através da construção de uma curva de calibração em triplicata, contemplando concentrações de 1, 3, 5, 7 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear.

4.2.4.6 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Estes foram calculados a partir do desvio padrão da resposta (σ) e coeficiente angular (s), através das Equações 4 e 5:

$$LQ = \left(\frac{10 \sigma}{S} \right) \quad (4)$$

$$LD = \left(\frac{3.3 \sigma}{S} \right) \quad (5)$$

4.2.4.7 Precisão

A precisão inter-corrída (repetibilidade) foi avaliada através da análise de seis soluções amostra na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes períodos do dia (manhã, tarde e noite) . A precisão intermediária por sua vez foi determinada pela análise de seis medidas de soluções na mesma concentração realizadas em dias distintos.

4.2.4.8 Exatidão

Este parâmetro foi determinado através do ensaio de adição do padrão, onde diferentes concentrações do padrão de aciclovir ($1, 5$ e $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram adicionadas a solução amostra na concentração de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estando a concentração final compreendida na linearidade e faixa do método (Tabela 3).

Tabela 3: Ensaio de exatidão (procedimento)

Solução amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
2	1	3
2	5	7
2	8	10

4.2.4.9 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas variações nos parâmetros cromatográficos como, fluxo ($0,8 \text{ mL. min}^{-1} \pm 0,2$), pH ($2,5 \pm 0,5$), comprimento de onda ($254 \text{ nm} \pm 2$).

4.2.5 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando análise de variância ANOVA unifatorial, no qual os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade for inferior a 5 % ($p < 0,05$ intervalo de confiança de 95 %) e teste t de Student com nível de significância $\alpha = 0,05$ (intervalo de confiança de 95 %).

V- Resultados e Discussões

5.1 Caracterização do aciclovir

O aciclovir utilizado como matéria-prima no desenvolvimento das formulações, foi caracterizado por diferentes técnicas e submetido a ensaios de controle de qualidade de acordo com os compêndios oficiais em que a substância é descrita (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007; BRITISH PHARMACOPEIA, 2006).

O controle de qualidade de fármacos baseia-se nas especificações estabelecidas para cada substância, de acordo com as monografias oficiais vigentes. Esta etapa é de fundamental importância, pois a qualidade do produto final desenvolvido está diretamente relacionada à qualidade da matéria-prima empregada no seu desenvolvimento (FERREIRA, 2002).

5.1.1 Teor do fármaco

O teor de aciclovir determinado por cromatografia líquida de alta eficiência foi de 99,8 % ($\pm 0,45$; $n=3$), estando de acordo com o preconizado na monografia do fármaco, que estabelece valores entre 98 % e 101 % de teor de princípio (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

5.1.2 Identificação por espectroscopia na região do infravermelho

A espectrofotometria no infravermelho é capaz de medir a absorção, por parte de compostos químicos analisados, de uma radiação eletromagnética, sendo este espectro único para cada substância com exceção aos isômeros ópticos que em solução apresentam espectros idênticos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). No setor farmacêutico, é usada em inúmeras aplicações, como por exemplo, na identificação de fármacos, avaliação da pureza, cristalinidade e estudos de compatibilidade (KALINKOVA, 1999).

A Figura 11 representa o espectro na região do infravermelho do aciclovir, estando de acordo com o apresentado na literatura, onde as principais bandas de absorção estão presentes. Na região de 3500 cm^{-1} observa-se uma banda larga, a

qual corresponde ao grupo OH presente na molécula. As bandas em 3382 e 3332 cm^{-1} referem-se às aminas primárias e secundárias. Assim como a banda de alta intensidade em 1584 cm^{-1} corresponde às vibrações de R-NH. A banda fraca de amina secundária situa-se em 2912 cm^{-1} . O grupo CH tem sua banda característica em 1346 cm^{-1} , e os grupos metileno em 1468 cm^{-1} . Na região de 1584 cm^{-1} e 1036 cm^{-1} , estão representadas as bandas referentes à amida e ao álcool primário, respectivamente.

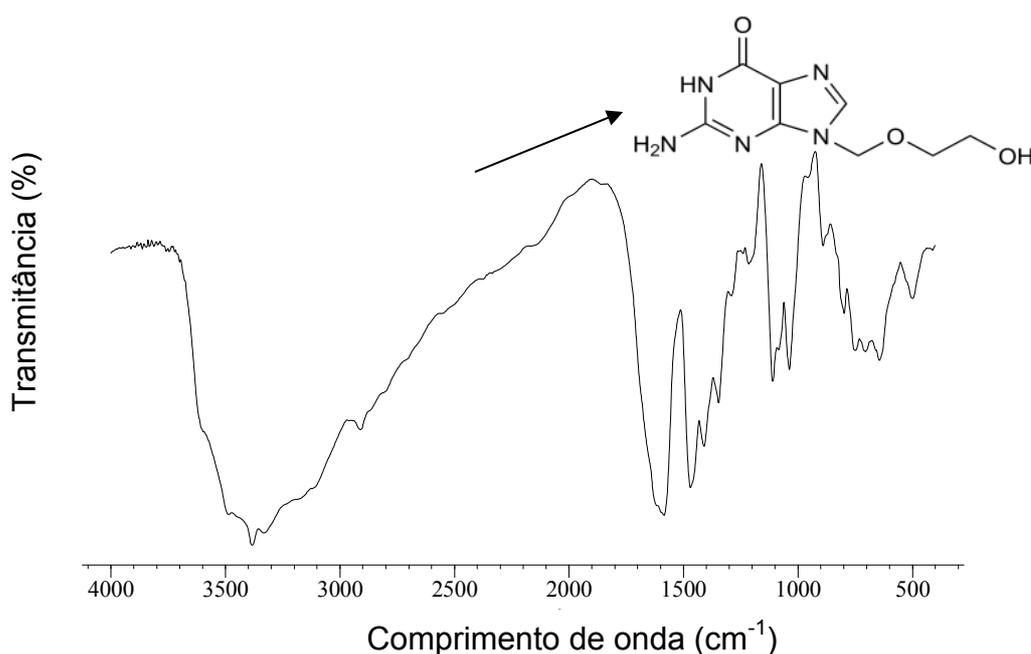


Figura 11. Espectro infravermelho do aciclovir obtidos em pastilhas de KBr

5.1.3 Identificação por espectroscopia na região do ultravioleta

O espectro na região do ultravioleta (Figura 12), analisado em meio ácido (H_2SO_4 0,2 mol.L^{-1}) apresentou o pico de absorção máxima em 255 nm, conforme o preconizado na literatura (MOFFAT et al., 2004).

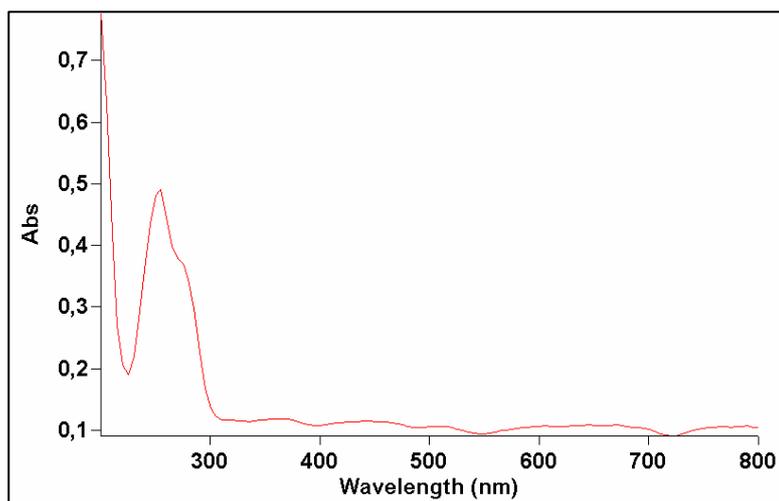


Figura 12. Espectro ultravioleta do aciclovir obtido em H_2SO_4 $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$

5.1.4 Ponto de fusão por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A curva DSC (Figura 13) evidenciou o ponto de fusão do aciclovir em $256,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ($T_{\text{peak}} = 256,70 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_{\text{fusion}} = -125,29 \text{ J/g}$), resultado condizendo com o especificado para este fármaco (BRITISH PHARMACOPEIA, 2006).

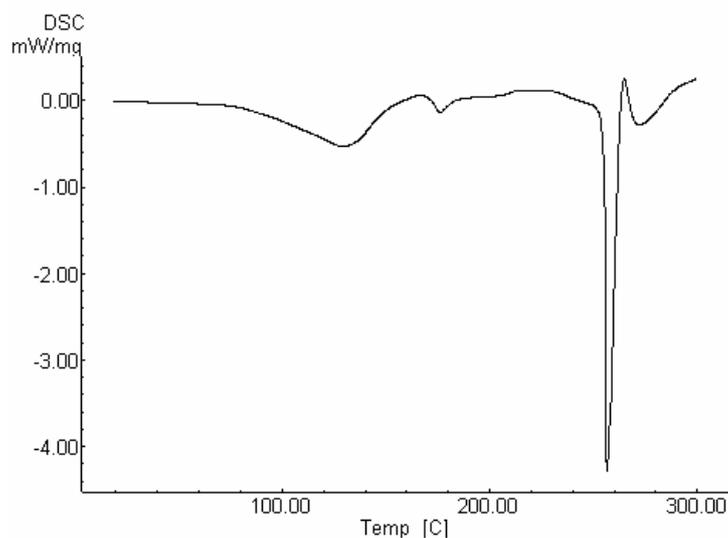


Figura 13. Curva DSC do aciclovir obtida sob razão de aquecimento de $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min^{-1})

A partir destes ensaios de caracterização pode-se evidenciar a autenticidade da amostra e a qualidade do aciclovir utilizado como fármaco modelo no presente trabalho.

5.2 Caracterização e avaliação das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de coacervação e modificadas pela reação de amidação com ácido malônico

5.2.1 Análise elementar

A porcentagem de grupos amino livres nas microesferas de malonilquitosana (36 horas) foi verificada por análise elementar. Os resultados obtidos para este ensaio foram: C 38,2 %; H 7,05 %; N 5,12 % para as microesferas de malonilquitosana e, para as microesferas gelatinizadas, C 38,5 %; H 7,91 % e N 7,0 %.

O conteúdo dos grupos aminos livres encontrado foi de 23,7 %, os quais correspondem a 66,3 % de substituição, considerando que a quitosana de origem apresentava 90 % de desacetilação.

5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectrometria magnética nuclear RMN de ^{13}C

Os espectros na região do infravermelho das microesferas de quitosana gelatinizadas e malonilquitosana estão apresentados na Figura 14. De acordo com os espectros observa-se que as bandas de absorção na região entre $3424\text{-}3446\text{ cm}^{-1}$ das microesferas modificadas com ácido malônico são mais intensas em decorrência das vibrações de estiramento – OH.

Os grupamentos amina primária e amida são identificados no espectro IV na região compreendida entre $1560\text{ e }1650\text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Em ambos os espectros observam-se sinais nesta região, embora nas microesferas gelatinizadas o sinal seja mais intenso. A identificação dos sinais relativos à amina primária e amida presentes nas microesferas de malonilquitosana não aparece de forma clara no espectro, uma vez que ocorreu a sobreposição dos sinais. A banda de absorção observada em 1724 cm^{-1} , no espectro das microesferas de malonilquitosana, pode ser atribuída ao ácido carboxílico, a qual se encontra ausente nas microesferas gelatinizadas.

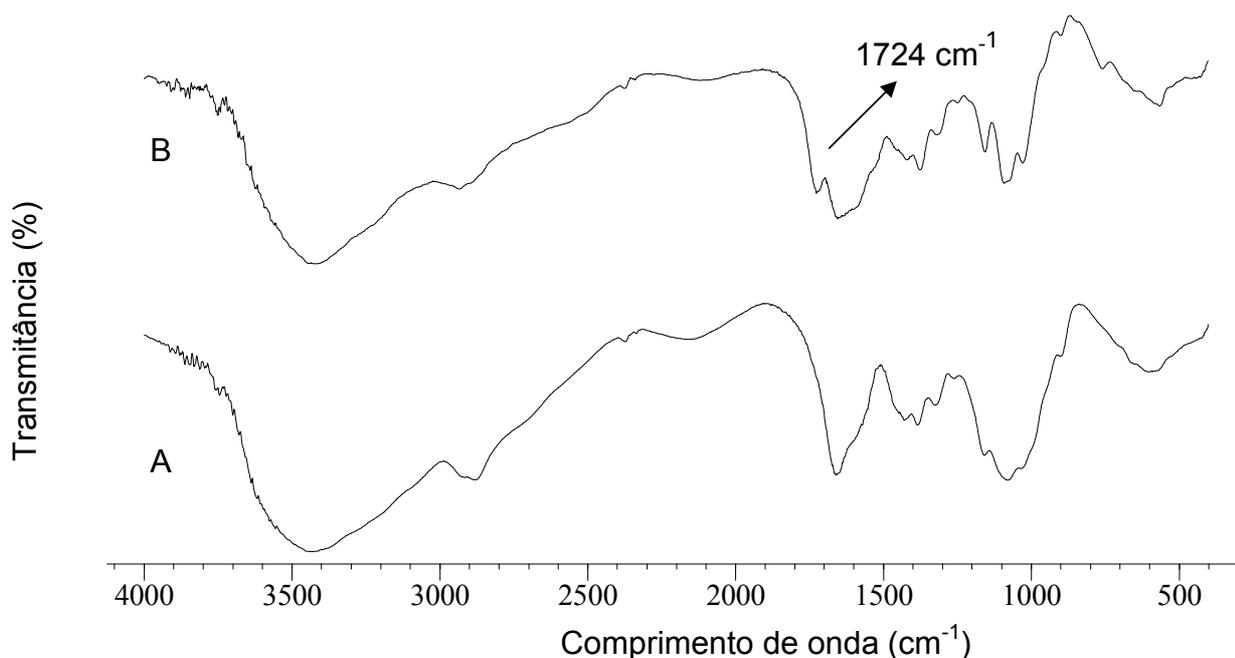


Figura 14. Espectros na região do infravermelho das microesferas gelatinizadas de quitosana (A) e microesferas de malonilquitosana (B), obtidos em pastilhas de KBr

Nos espectros RMN de ¹³C das microesferas gelatinizadas e malonilquitosana (Figura 15) os principais picos estão situados entre δ 20 e 200 ppm, região onde se encontra o sinal referente à carbonila. Os grupos funcionais amida, ácido carboxílico, éster, ou de anidrido apresentam um sinal de carbonila na faixa de δ 155 a 185 ppm (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Em ambos os espectros, observa-se sinais em δ 60,6 a 87,4 ppm e δ 59,1 a 79,0 ppm, respectivamente, que indicam a presença de anel piranose nas amostras. Além disso, dois sinais referentes aos carbonos anoméricos são observados em δ 109,4 e δ 105,0 ppm. A comparação dos espectros das amostras indica que a principal diferença é o sinal adicional referente à carbonila, observados nas microesferas de malonilquitosana em δ 178,3 ppm. O sinal referente à carbonila pode ser atribuído a formação de ácido carboxílico, amida ou ambos.

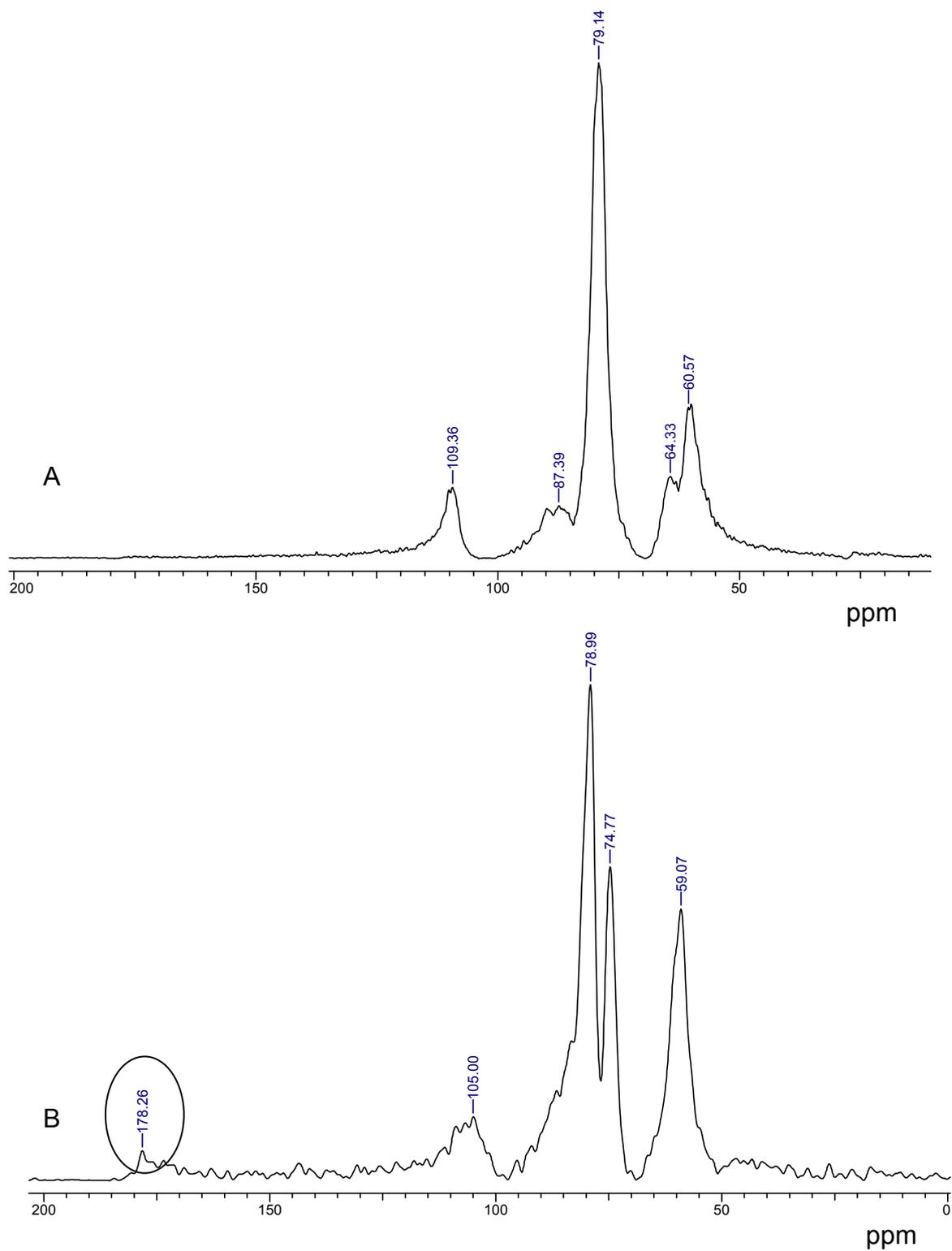


Figura 15. Espectro RMN de ^{13}C em fase s3lida das microesferas gelatinizadas (A) e malonilquitosana (B)

A substituição do grupo malonil nas microesferas gelatinizadas pode ocorrer nos grupos mais reativos, o grupo hidroxil do C₆ e no grupo amino do C₂. Porém a literatura mostra que a N-substituição ocorre mais freqüentemente do que a O-substituição (KAS, 1997). Os resultados obtidos por análise elementar, espectroscopia no infravermelho e RMN de ¹³C sugerem a N-substituição.

A amidação é a reação que ocorre entre ácidos dicarboxílicos ou anidridos correspondentes tais como ácido malônico ou anidrido malônico e amônia, aminas primárias ou aminas secundárias com formação de mono ou diamidas. A malonilquitosana foi sintetizada a partir da reação de amidação entre a quitosana e o ácido malônico (GLASSER e JAIN, 1999). Os resultados obtidos sugerem a formação de grupo monoácido carboxílico e grupo monoamida, conforme esquema representado na Figura 16.

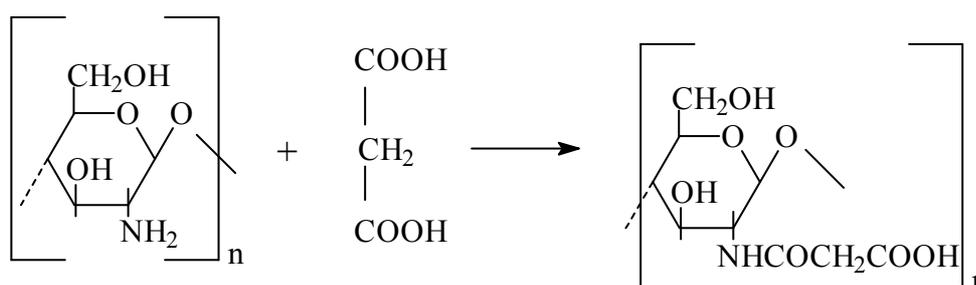


Figura 16. Esquema representativo da síntese da malonilquitosana

5.2.3 Termogravimetria (TG/DTG)

As curvas TG/DTG, ilustradas na Figura 17, demonstram que as microesferas gelatinizadas apresentaram um único evento de perda de massa na faixa de temperatura compreendida entre 235 e 335 °C ($\Delta m = 30,32\%$). Para as microesferas de malonilquitosana as curvas demonstraram duas etapas de degradação na faixa de temperatura de 165 a 221 °C ($\Delta m = 22,54\%$) e 265 a 333 °C ($\Delta m = 21,67\%$). O primeiro evento de massa está relacionado com a volatilização dos produtos formados durante o processo de síntese. Assim, as microesferas de

malonilquitosana apresentaram uma menor estabilidade térmica em relação às microesferas gelatinizadas, fato este que pode ser atribuído às ramificações na cadeia lateral polimérica. A decomposição térmica do produto ocorreu após 400 °C.

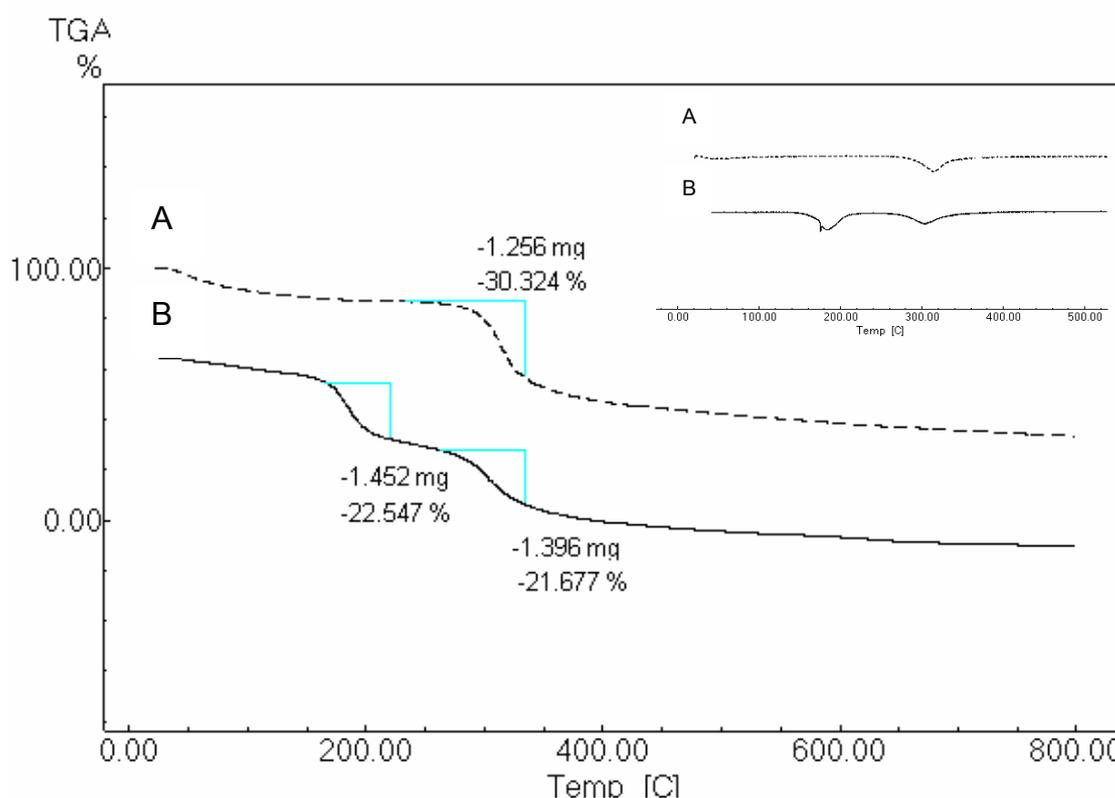


Figura 17. Curvas TG/DTG das microesferas gelatinizadas (A) e microesferas de malonilquitosana (B), obtidas sob razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1})

5.2.4 Grau de intumescimento (GI)

O processo físico-químico de intumescimento em meio aquoso de géis de polímeros sintéticos e naturais e os seus respectivos graus de hidratação vêm sendo investigado com o propósito de aplicar estes sistemas em liberação controlada de fármacos. Através do intumescimento, a estrutura do gel é expandida, promovendo a liberação do princípio ativo. Fatores como grau de reticulação, pH, hidrofobicidade e hidrofiliidade influenciam no grau de intumescimento do polímero (GINANI et al., 1999).

As microesferas de malonilquitosana foram submetidas a valores crescentes de pH (1,2; 6,8; e 9,0) com o objetivo de simular o trato gastrointestinal. Neste ensaio apresentaram um grau de intumescimento igual a 2300 % ($\pm 0,6$) após 6 horas de experimento. Porém, quando as mesmas foram submetidas aos valores de pH individual, os resultados apontaram valores de 2018 % ($\pm 0,89$), 1060 % ($\pm 0,58$) e 1178 % ($\pm 0,91$) em pH 1,2; 6,8 e 9,0 respectivamente, após 6 horas de experimento. Assim, observa-se um maior grau de intumescimento em pH 1,2.

As propriedades de intumescimento de hidrogéis iônicos são originalmente devido à ionização de seus grupos funcionais. Neste estudo as microesferas de malonilquitosana apresentaram um comportamento de intumescimento pH dependente, conforme exposto na Figura 18 e Tabela 4.

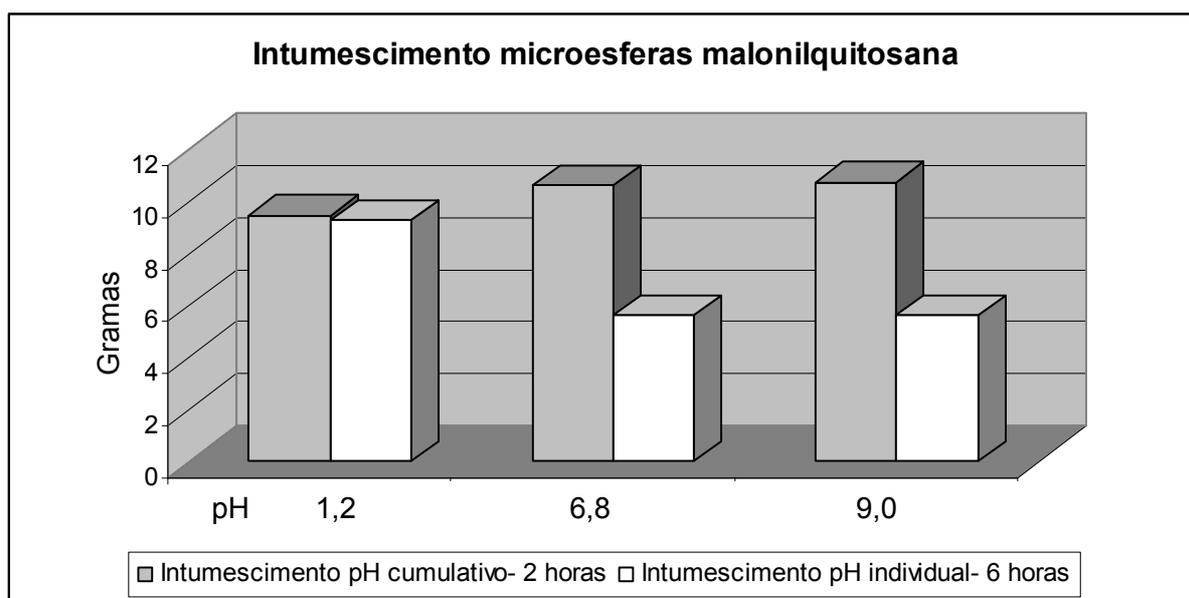


Figura 18. Intumescimento das microesferas de malonilquitosana em solução tampão pH 1,2; pH 6,8; e pH 9,0.

Tabela 4: Resultados do grau de intumescimento (G.I) cumulativo e individual nos diferentes valores de pH

Intumescimento cumulativo				Intumescimento individual					
pH	Tempo (min)	Massa (g)	G.I (%)	Massa (g)	G.I (%)	Massa (g)	G.I (%)	Massa (g)	G.I (%)
				pH 1,2		pH 6,8		pH 9,0	
1,2	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0
	30	7,85	1470	7,52	1440	1,26	152	1,36	172
	60	9,73	1846	9,65	1830	1,38	176	1,41	182
	90	10,51	2002	10,48	1996	1,82	264	1,96	292
	120	10,58	2016	10,48	1996	2,39	378	2,65	430
6,8	150	11,39	2178	10,52	2004	3,65	630	4,23	746
	180	11,41	2182	10,53	2006	4,12	724	4,89	878
	210	11,54	2208	10,55	2010	4,23	746	5,11	922
	240	11,62	2224	10,56	2012	4,89	878	5,13	926
9,0	270	11,73	2246	10,57	2014	5,01	902	5,69	1038
	300	11,79	2258	11,58	2016	5,13	926	6,12	1124
	330	11,80	2260	10,59	2018	5,32	964	6,53	1206
	360	12,00	2300	10,59	2018	5,80	1060	6,39	1178

5.2.5 Eficiência de encapsulação

A concentração de aciclovir encapsulado nas microesferas de malonilquitosana foi de 23,9% ($\pm 0,65$), 45,8 % ($\pm 0,79$) e 69,7 % ($\pm 0,67$) para os tempos de contato de 6, 12 e 24 horas, respectivamente. A maior porcentagem de fármaco impregnado foi para o período de 24 horas.

5.2.6 Liberação *in vitro* do aciclovir impregnado nas microesferas de malonilquitosana

O perfil de liberação do aciclovir presente nas microesferas de malonilquitosana está representado na Figura 19. Através dos gráficos, pode-se observar que 90 % do fármaco foi liberado por um período de até 5,5 horas. Em ambas as soluções observou-se uma liberação rápida do fármaco durante os primeiros 15 minutos de ensaio, sendo esta resultante da quantidade de fármaco remanescente presente na superfície das microesferas. Em pH ácido, 50 % da

quantidade total do fármaco foi liberada em aproximadamente 100 minutos, em pH 6,8 a liberação foi mais lenta durante o mesmo intervalo de tempo, ocorrendo uma liberação de aproximadamente 30%. Estes resultados traduzem o comportamento da quitosana como um polieletrólito catiônico, onde os grupos amino de sua cadeia estão protonados em pH ácido, favorecendo a liberação.

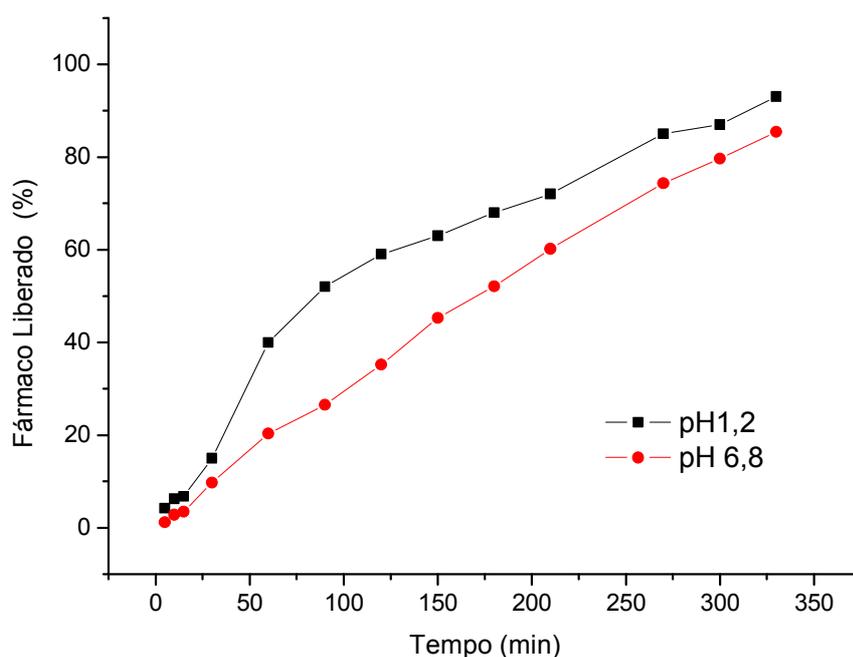


Figura 19. Perfil de liberação do aciclovir a partir das microesferas de malonilquitosana em pH 1,2 e 6,8.

5.2.7 Modelo cinético de liberação

O estabelecimento do perfil de liberação permite caracterizar os mecanismos envolvidos neste processo, além do tempo necessário para que determinadas porcentagens de fármaco se dissolvam. Permite ainda quantificar o tempo de latência (tempo em que o fármaco começa a se dissolver) e detectar alterações cinéticas durante o processo (SHARGEL e ANDY, 2004).

Quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER e PEPPAS, 1987), a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é igual a:

$$M_t/M_\infty = k \cdot t^n \quad (6)$$

Onde M_t/M_∞ é a fração de fármaco liberado no tempo t , k é uma constante cinética que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo, n é o expoente de liberação, que de acordo com o valor numérico assumido, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco. A Equação 6 é geralmente utilizada para interpretar e descrever a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte do fármaco que obedece às leis de Fick ou transporte Fickiano e, outro, como consequência dos fenômenos de intumescimento/relaxamento do gel (expansão dinâmica) e que envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível, chamado transporte Caso-II. Nesta equação tem-se em conta não só a difusão do fármaco, mas também o relaxamento do gel como processos determinantes na liberação do fármaco (RITGER e PEPPAS, 1987),

Consoante com os critérios para a cinética de liberação de fármacos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, um valor do expoente de liberação de $n \leq 0,43$; indica que o mecanismo de liberação envolvido é o de difusão do soluto através das camadas da matriz polimérica, também conhecido como mecanismo de liberação Fickiano ou “Caso I”. Para um valor de $n = 0,85$, indica que a liberação do fármaco (soluto) é controlada pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica, ou seja, independente do tempo, mecanismo este também conhecido como “Caso II” de transporte. Para valores de $0,43 < n < 0,85$, observa-se um transporte não Fickiano ou anômalo, onde ocorre à superposição dos dois fenômenos, a liberação é controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente. Valores de $n > 0,85$ estão relacionados com processos de difusão,

intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica simultaneamente (RITGER e PEPPAS, 1987),

Os valores de n foram obtidos a partir da linearização da Equação 6, avaliados para $M_t/M_\infty < 0,6$; dados expostos na Tabela 5. Em solução tampão pH 1,2 e 6,8, os valores calculados foram 0,8474 e 1,0491 respectivamente. Assim, em solução tampão pH 1,2 o mecanismo envolvido na liberação envolve intumescimento e difusão simultaneamente. Para o ensaio realizado em pH 6,8 a liberação do aciclovir seguiu um mecanismo de liberação que envolve diferentes processos, como, difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica. Os valores de k calculados foram similares em ambos os valores de pH analisados.

Tabela 5: Análises dos mecanismos de liberação envolvidos na liberação do ACV a partir das microesferas de malonilquitosana

Microesferas de malonilquitosana	n	k (min ⁻ⁿ)	r^2
pH 1,2	0,8474	1,5756	0,9863
pH 6,8	1,0491	1,4404	0,9975

Nota: n : expoente de liberação, k : constante de liberação, r^2 : coeficiente de correlação

5.2.8 Avaliação morfológica e tamanho de partícula

A análise de MEV foi realizada através de imagens produzidas pelos elétrons secundários. A grande vantagem da análise feita pela emissão dos elétrons secundários é que ela fornece uma análise da topografia (morfologia e porosidade) do material, pois apesar do feixe de elétrons incidente na amostra produzir elétrons secundários em todo o volume, somente aqueles que estiverem próximos à superfície é que serão emitidos e irão contribuir para a obtenção do sinal.

Na Figura 20 estão representadas as fotomicrografias do aciclovir (A), indicando que o fármaco se apresenta na forma de cristais ortorrômnicos. As fotomicrografias (B, C e D) demonstram a morfologia da superfície externa das

microesferas de malonilquitosana sem o fármaco (B) e impregnadas com o aciclovir (C e D). Estas indicam que as microesferas de malonilquitosana possuem uma boa esfericidade com a superfície lisa, poucos poros e diâmetro médio de aproximadamente 882 μm . Nas fotomicrografias (C, D) observa-se uma quantidade residual de fármaco na superfície, sendo este responsável pela rápida liberação do aciclovir que ocorre durante os primeiros minutos no ensaio de liberação. O mesmo fenômeno foi observado em outros sistemas poliméricos de liberação de fármacos (ZOLNIK e BURGUESS, 2007).

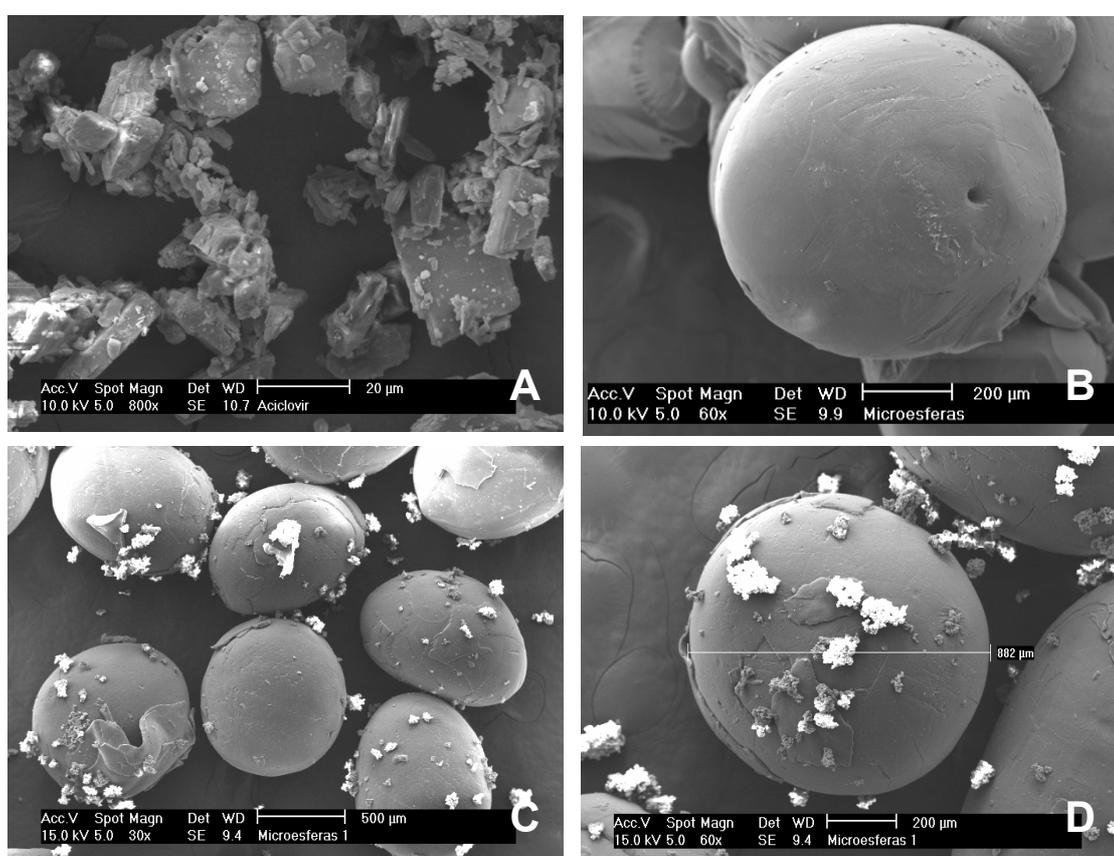


Figura 20. Fotomicrografias do aciclovir magnificação de 800 x (A), microesferas de malonilquitosana magnificação de 60 x (B), microesferas de malonilquitosana impregnadas com aciclovir em magnificação de 30 x (C) e 60 x (D)

As fotomicrografias da secção transversal (Figura 21 A, B) das microesferas de malonilquitosana apontam que as mesmas apresentam poucos poros internamente e uma estrutura compactada.

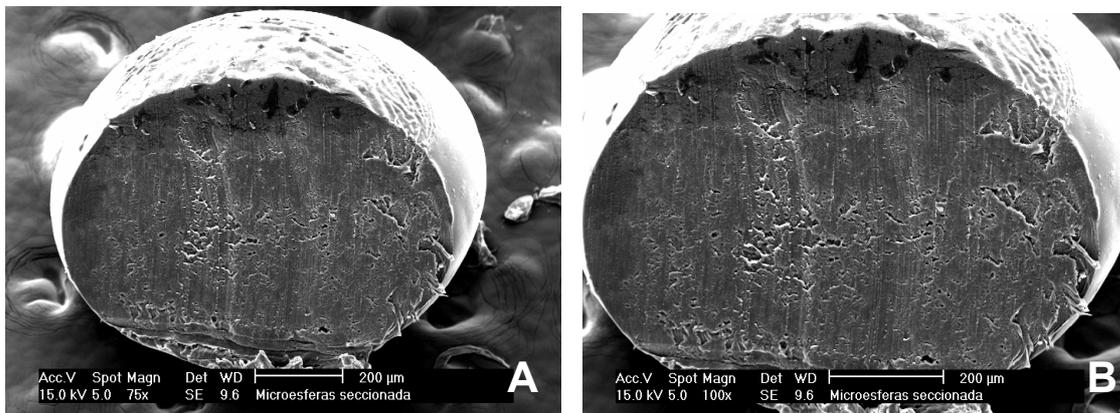


Figura 21. Fotomicrografias da secção transversal das microesferas de malonilquitosana em magnificação de 75 x (A) e 100 x (B)

Os resultados apresentados nesta secção foram publicados no periódico Carbohydrate Polymers. Artigo *In press* (Anexo I).

5.3 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de *spray drying* – Parte I (sem adição de agente reticulante)

5.3.1 Eficiência de encapsulação

A concentração de aciclovir encapsulado na formulação F1 e determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi de $92 \% \pm 0,79$ ($n=3$). Os resultados foram obtidos a partir da comparação dos dados com uma curva de calibração ($1-10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $r^2=0.9999$).

5.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)

A curva DSC do aciclovir (Figura 22) conforme apresentado no item 5.1.4, evidenciou um evento endotérmico referente ao ponto de fusão do fármaco em $256,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ($T_{\text{pico}} = 256,7 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_{\text{fusão}} = -125,29 \text{ J/g}$). Para a quitosana foi observado um pequeno evento endotérmico relacionado à evaporação de água na faixa de temperatura entre $90 \text{ }^\circ\text{C}$ e $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = -21,8 \text{ J/g}$), em temperatura acima de $270 \text{ }^\circ\text{C}$ ocorreu o processo de decomposição térmica. Na curva DSC da formulação F1 pode-se observar o desaparecimento do pico característico da fusão do fármaco, a mesma apresenta um evento endotérmico na faixa de temperatura de $43 \text{ }^\circ\text{C}$ a $52 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta H = 50,5 \text{ J/g}$), que provavelmente está relacionado a perda de água e líquidos residuais remanescentes do processo de desenvolvimento da formulação.

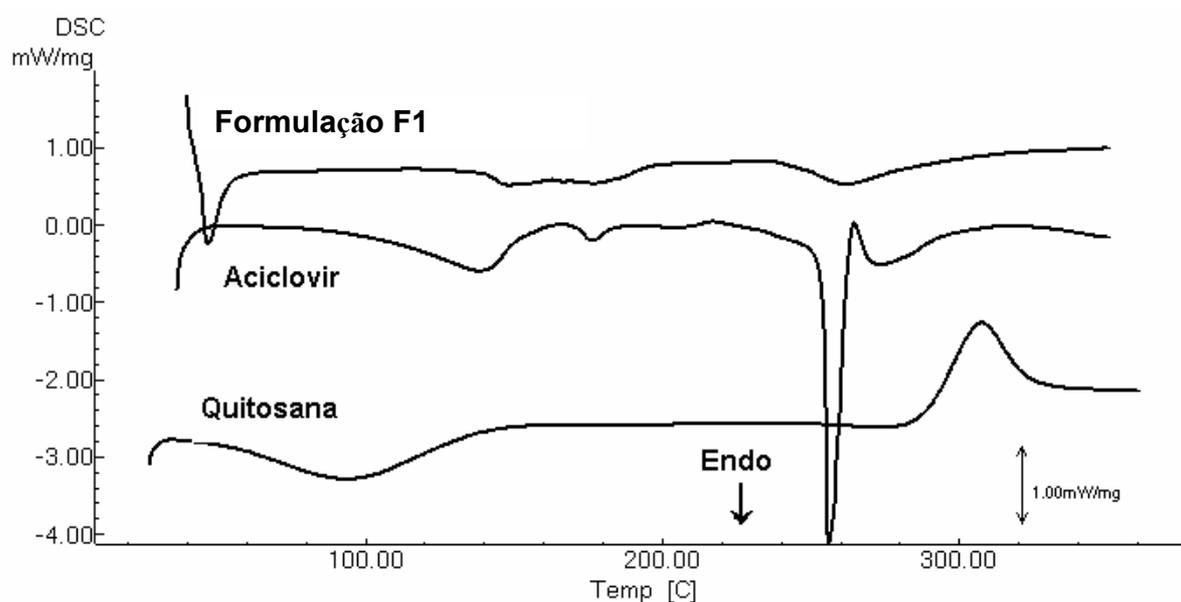


Figura 22. Curvas DSC do aciclovir, quitosana e formulação F1 obtidas sob razão de aquecimento de $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min^{-1})

As curvas TG obtidas para amostra estão representadas na Figura 23. O aciclovir apresentou dois eventos de perda de massa, o primeiro na região entre 269,62 °C e 330,45 °C ($\Delta m = 24,13\%$) e o segundo na região compreendida entre 435 °C e 514 °C ($\Delta m = 16,03\%$). A curva TG da quitosana apresenta um único evento de perda de massa na faixa de temperatura compreendida entre 237,87 °C e 349,6 °C ($\Delta m = 54,92\%$). A formulação F1 apresentou-se termicamente estável até a temperatura de 242,4 °C, após esta iniciou-se um evento de decomposição até 449,66 °C. Dessa forma, sugere-se que não ocorreu uma diminuição significativa da estabilidade térmica da formulação em relação ao fármaco e ao polímero isolados.

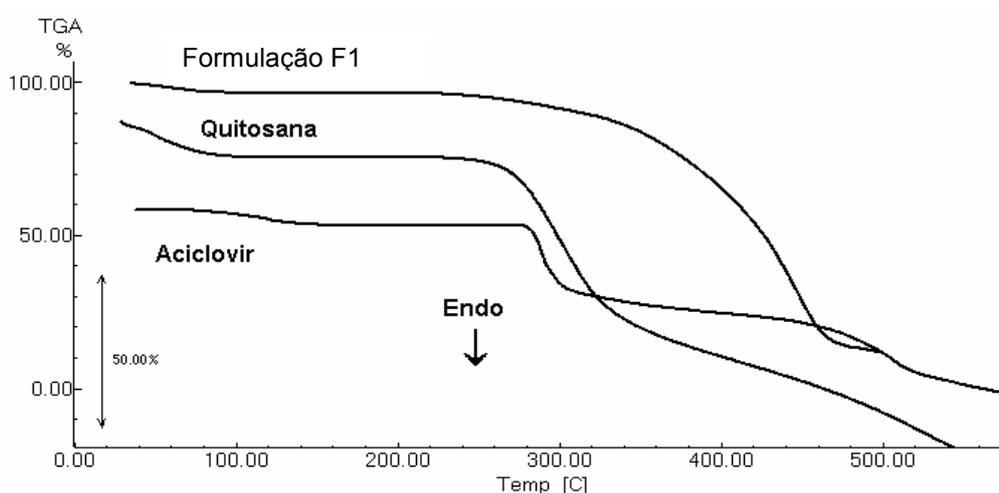


Figura 23. Curvas TG do aciclovir, quitosana e formulação F1, obtidas sob razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1})

5.3.3 Difração de raios-X de pó (DRX)

A difração raios-X de pó é uma técnica que permite a identificação e descrição precisa de substâncias cristalinas, que pode ser demonstrada conforme estudos realizados por Marona e colaboradores (2004), que determinaram a estrutura cristalina da flutamida. A técnica consiste na incidência da radiação em uma amostra e na detecção dos fótons difratados, que constituem o feixe difratado. Em um material onde os átomos estejam arranjados periodicamente no espaço, característica das estruturas cristalinas, o fenômeno da difração de raios-X ocorre

nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg (RIBBAS e RIZZUTO, 1996).

Os cristais contêm arranjos ordenados de moléculas e átomos, mantidos em contato por interações não covalentes. Um sólido amorfo é caracterizado pelo estado desorganizado ou randômico de suas moléculas (FLORENCE e ATWOOD, 2003).

Considerações entre estados cristalinos e amorfos são importantes em relação ao processo de absorção. Sólidos amorfos são, geralmente, mais absorvidos que sólidos no estado cristalino. Tal fato baseia-se na energia envolvida no processo de dissolução, pois em um sólido amorfo as moléculas são arranjadas ao acaso e, portanto, baixa energia é requerida para separá-las, conseqüentemente a dissolução é mais rápida. Assim, o desenvolvimento de formulações contendo o fármaco na forma amorfa é frequentemente benéfico nos termos de dissolução e biodisponibilidade (AMIDON et al., 2000).

O aciclovir possui características cristalinas, que no difratograma (Figura 24) se apresentam sob a forma de picos. Neste estudo foram tomados como referência os picos com maior intensidade relativa para o fármaco puro que correspondem a $2\theta = 4,18; 9,36; 19,73; \text{ e } 23,40$.

As amostras de polímeros podem ser encontradas em diversos graus de organização de suas cadeias poliméricas. Uma amostra onde as cadeias encontram-se totalmente desorganizadas é denominada amorfa (ASADA et al., 2004). A Figura 24 indica o comportamento amorfo da quitosana. No difratograma, observa-se que a formulação F1 não apresentou os picos relativos ao aciclovir, indicando que o mesmo foi modificado para a forma amorfa, condizendo com os resultados obtidos por calorimetria exploratória diferencial.

Este fenômeno pode ser atribuído à secagem por *spray drying*, técnica que frequentemente produz compostos amorfos, devido ao rápido processo de secagem,

o que impede a organização de uma fase cristalina. O mesmo comportamento foi observado por outros autores, envolvendo o uso de polímeros e subsequentemente a nebulização em *spray-drying* (SHU et al., 2006).

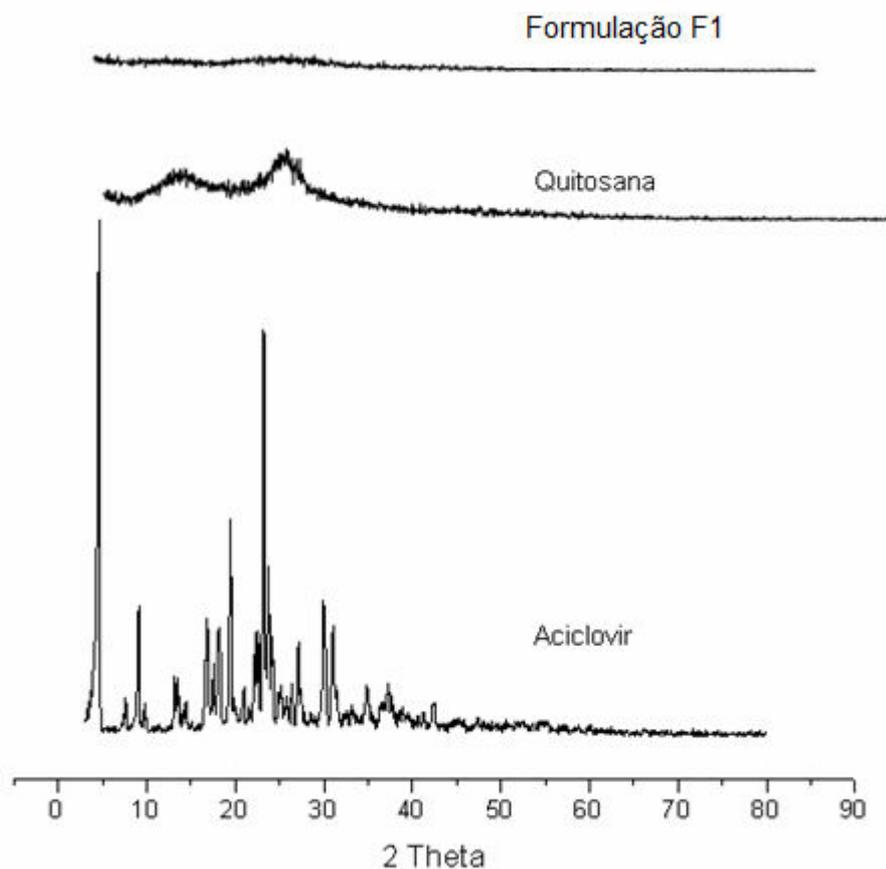


Figura 24. Difratogramas obtidos para o aciclovir, quitosana e formulação F1

5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O espectro na região do infravermelho do aciclovir já foi abordado anteriormente no item 5.1.2 estando de acordo com o apresentado na literatura.

No espectro infravermelho da quitosana (Figura 25), observa-se uma banda na região de 3437 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação -OH , de modo que as bandas em 2924 e 2881 cm^{-1} são bandas atribuídas ao estiramento C-H. As bandas em 1656 e 1537 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O de amida secundária e as

vibrações de deformação N-H de amina primária, respectivamente. Na região de 1375 cm^{-1} ocorre a vibração referente à vibração C-H do grupo CH_3 , do grupo acetamido remanescente na cadeia polimérica, em 1086 cm^{-1} , ocorre o estiramento C-O de álcool primário. O espectro IV da formulação F1 é praticamente uma sobreposição dos espectros isolados do aciclovir e da quitosana, indicando que não ocorre nenhuma interação química entre os mesmos.

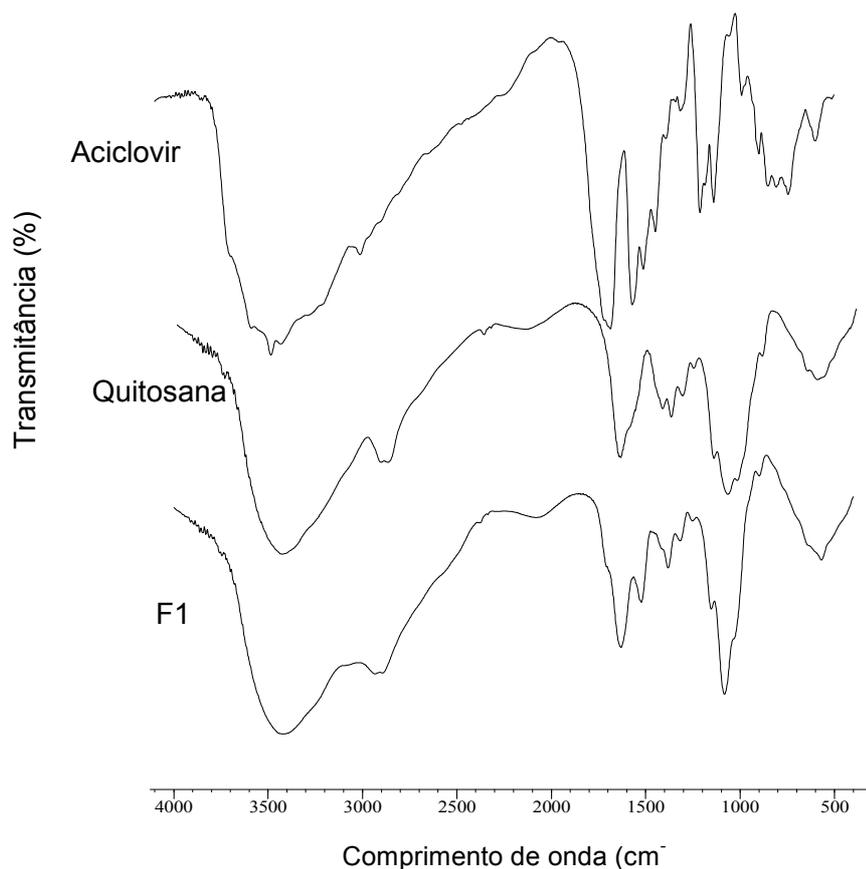


Figura 25. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana e formulação F1 obtidos em pastilha de KBr

5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV indicaram que a formulação F1 (Figura 26 A e B) apresentou formato arredondado e com a superfície interna côncava com tamanho médio de partícula de $5,52 \pm 1,8\ \mu\text{m}$.

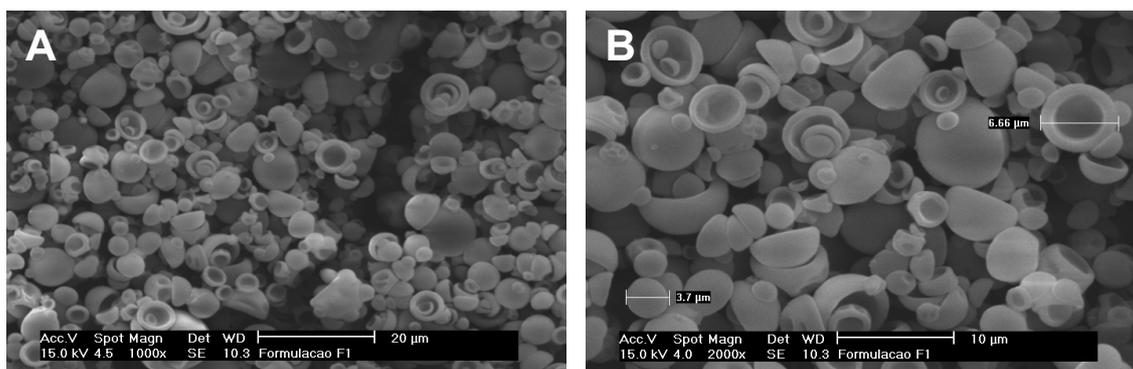


Figura 26. Fotomicrografias da formulação F1 magnificação de 1000 x (A) e 2000 x (B)

5.3.6 Perfil de liberação

Para que uma substância seja absorvida a partir da mucosa gastrintestinal, esta precisa estar dissolvida. A dissolução é o processo através do qual uma substância sólida interage com um solvente para formar uma solução (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). A Farmacopéia Americana (2007) preconiza a liberação de no mínimo 80 % de aciclovir em 45 minutos, presente em comprimidos de liberação imediata. O perfil de liberação (Figura 27) realizado em pH 1,2 e 6,8 da formulação F1, indicou que 80 % do aciclovir foi liberado por um período de 120 minutos.

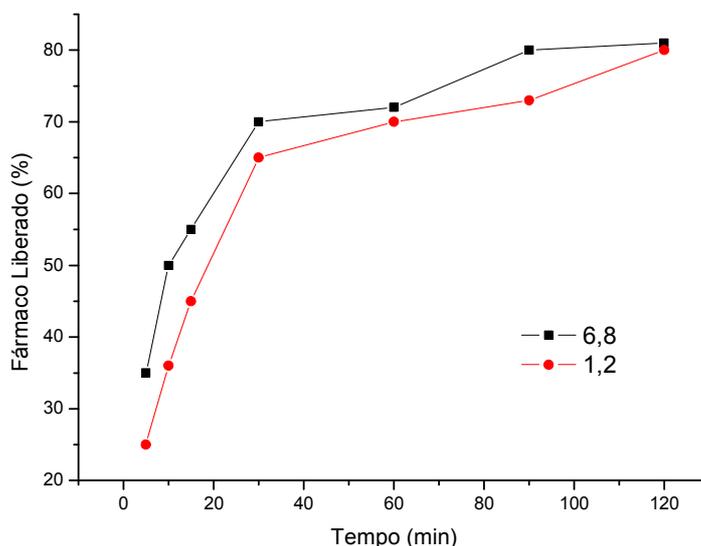


Figura 27. Perfil de liberação da formulação F1 em pH 1,2 e 6,8

O estabelecimento do perfil de dissolução permite caracterizar a ordem cinética do processo e sua constante de velocidade, além do tempo necessário para

que determinadas porcentagens de fármaco se dissolvam. Permite ainda quantificar o tempo de latência (tempo para que o fármaco comece a se dissolver) e detectar alterações cinéticas durante o processo (SHARGEL e ANDY, 2004).

Existem diversos modelos propostos para descrever e analisar o perfil de liberação de fármacos. A interpretação quantitativa dos valores obtidos em um ensaio de dissolução é facilitada através do emprego de uma equação matemática, capaz de transformar a curva de dissolução em função de algum parâmetro relatado para a formulação em análise. O tipo de fármaco, polimorfismo, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade presente na formulação podem influenciar o perfil de dissolução desse fármaco (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; NETZ e ORTEGA, 2002). Os modelos matemáticos aplicados na formulação desenvolvida foram; ordem zero, primeira ordem e Higuchi.

A formulação F1 em ambos os meios de dissolução (pH 1,2 e 6,8) apresentou como o mecanismo envolvido na liberação do fármaco o modelo proposto por Higuchi, que correlaciona a raiz quadrada do tempo *versus* a porcentagem de fármaco dissolvida, que de forma geral é um modelo adequado a formulações destinadas a liberar o fármaco lentamente (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; STULZER e SILVA, 2007). Os coeficientes de correlação obtidos estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores dos coeficientes de correlação obtidos para os três modelos matemáticos utilizados na linearização das curvas de dissolução

Ordem da reação	pH 1,2	pH 6,8
Ordem zero	0,8819	0,8684
Primeira ordem	0,9395	0,9312
Higuchi	0,9434	0,9331

Os resultados alcançados durante esta primeira etapa de pré-formulação apontaram que ocorreram modificações na estrutura cristalina do fármaco, fazendo com que o mesmo se tornasse mais solúvel. Fato este, que também pode ter influenciado no processo de liberação do aciclovir. Tendo em vista, o objetivo de se

desenvolver uma formulação que proporcionasse maiores tempos de liberação procedeu-se o desenvolvimento das demais formulações com o acréscimo de tripolifosfato.

Esse agente reticulante foi previamente utilizado com sucesso para reticular a quitosana na forma de micropartículas, para liberação prolongada do acetaminofeno (DESAI e PARK, 2005)

Os resultados apresentados nesta secção foram publicados no periódico *Latin American Journal of Pharmacy*, volume 26 (6), p.866-871 (2007) (Anexo II).

5.4 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de *spray drying* – Parte II (com adição de agente reticulante)

5.4.1 Eficiência de encapsulação

A concentração de aciclovir encapsulado nas micropartículas produzidas na segunda etapa deste trabalho está descrito na Tabela 7. Os dados demonstram que os melhores resultados obtidos para o ensaio de eficiência de encapsulação média foi para a formulação F5. Através da comparação entre a composição das formulações e os resultados obtidos, nota-se que ocorreu um aumento de fármaco encapsulado de acordo com o aumento da relação polímero/fármaco. Assim, uma maior quantidade de polímero encapsulou uma maior quantidade de fármaco. Resultados similares foram observados por Kim e colaboradores (2006) na encapsulação de retinol com quitosana.

Tabela 7: Resultado do ensaio de eficiência de encapsulação obtidos para as formulações desenvolvidas pela técnica de *spray-drying*- Parte II

Formulação	Eficiência de Encapsulação (média)	Desvio padrão relativo (D.P.R)
F2	86,4 %	± 0,79
F3	79,7 %	± 0,86
F4	73,8 %	± 0,99
F5	92,5 %	± 1,07
F6	90,6 %	± 0,88

n= 3 determinações

5.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)

As curvas DSC das formulações F2, F3 e F4 (Figura 28) apresentaram na faixa de temperatura entre 61 °C a 95 °C um evento endotérmico, que provavelmente está relacionado à umidade (água e solventes remanescentes) presentes nas amostras. O pico de fusão característico do fármaco, não pode ser constatado nas

curvas apresentadas pelas formulações. Entretanto, um evento endotérmico pouco definido em torno de 220 °C pode ser observado.

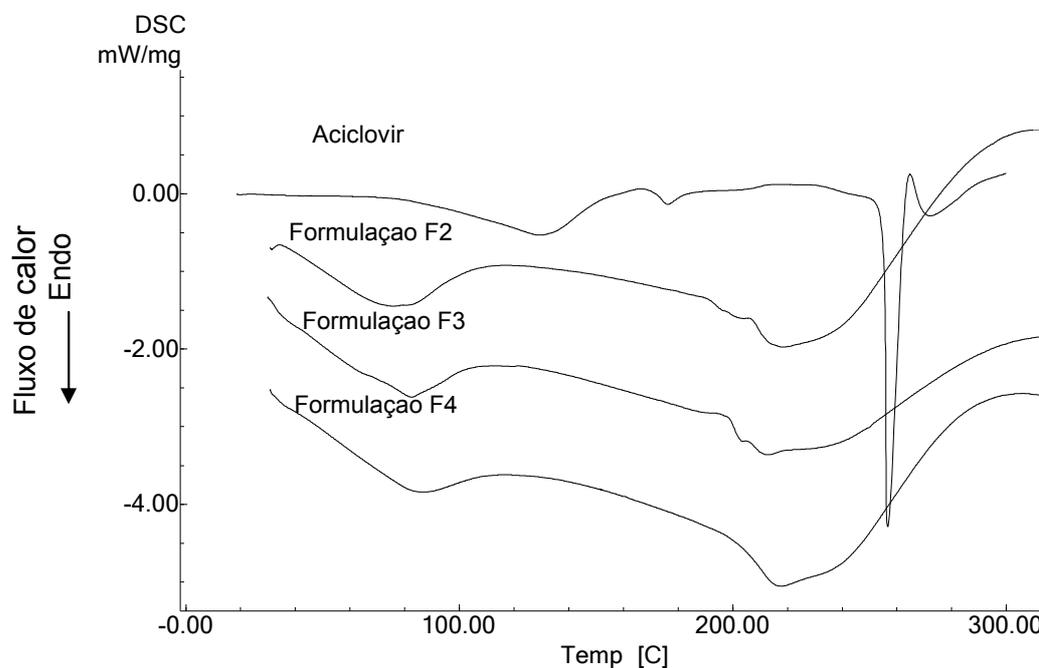


Figura 28. Curvas DSC do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4, obtidas sob razão de aquecimento de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min^{-1})

A Figura 29 representa as curvas DSC obtidas para as formulações F5 e F6 desenvolvidas pela técnica de *spray-drying*. As mesmas apontaram um evento endotérmico mais acentuado em torno de 215 °C, esses resultados podem estar relacionados a alguns fatores. Entre os mais evidentes, citam-se, a transformação parcial do aciclovir para a forma amorfa com conseqüente deslocamento/diminuição do pico característico de fusão do fármaco. Ainda, pode-se suspeitar da ocorrência de alguma interação química entre o fármaco e o polímero, promovendo assim o deslocamento/diminuição do pico de fusão.

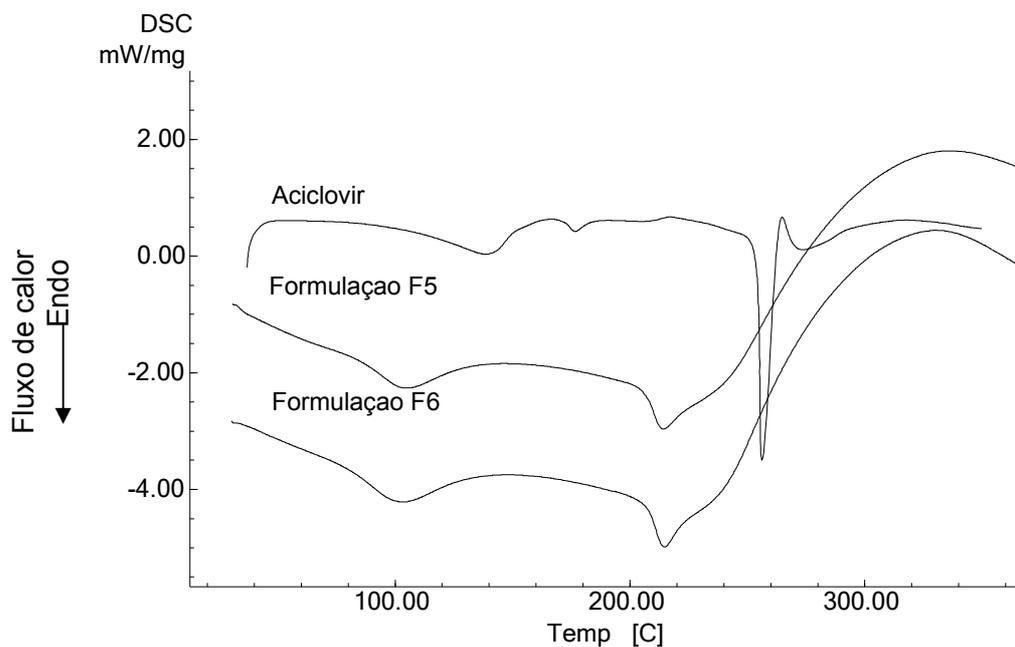


Figura 29. Curvas DSC do aciclovir, quitosana, formulações F5 e F6, obtidas sob razão de aquecimento de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min^{-1})

Através das curvas TG (Figuras 30 e 31), constata-se que todas as formulações demonstraram estabilidade térmica até temperatura de $221,3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, ocorreram eventos de perda de massa com $\Delta m = 22,13\%$ (F2); $25,52\%$ (F3); $24,52\%$ (F4), $25,36\%$ (F5) e $24,95\%$ (F6).

Os resultados foram similares com o demonstrado para a formulação F1 (item 5.3.2), ou seja, não ocorreu diminuição significativa da estabilidade das formulações em comparação com o fármaco isolado e o polímero.

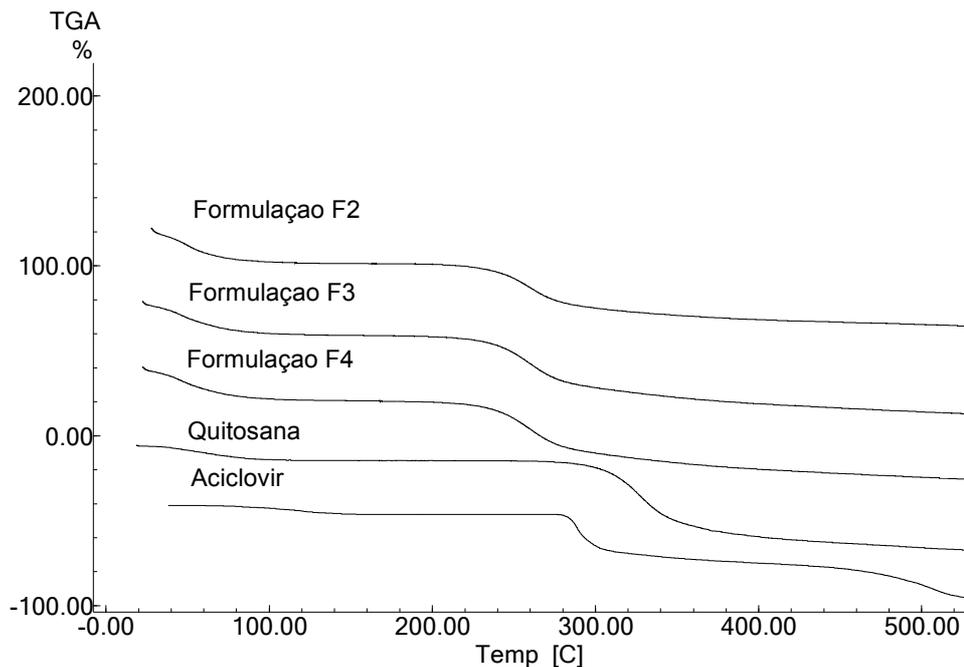


Figura 30. Curvas TG do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4, obtidas sob razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1})

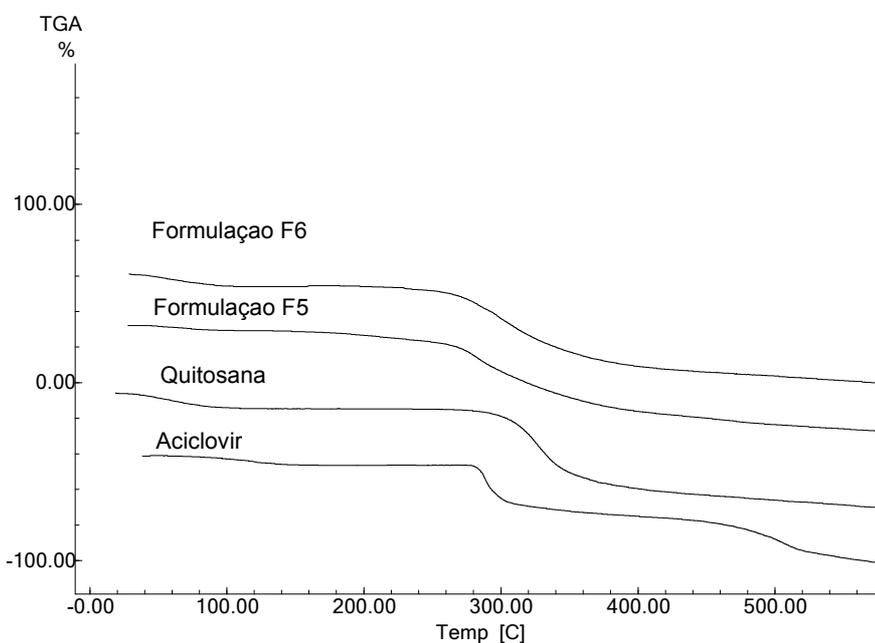


Figura 31. Curvas TG do aciclovir, quitosana, formulações F5 e F6, obtidas sob razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1})

5.4.3 Difração de raios-X de pó (DRX)

A técnica de microencapsulação por *spray-drying*, frequentemente, produz compostos com características amorfas, devido ao rápido processo de secagem, conforme citado no item 5.3.3 (CHAUHAN; SHIMPI; PARADKAR, 2005).

As análises de DRX das formulações produzidas na segunda etapa deste trabalho estão representadas na Figura 32. Da mesma forma que ocorreu com a formulação F1, os difratogramas das formulações F2, F3 e F4 não apresentaram os picos relativos ao aciclovir. Assim, novamente os dados sugerem e condizem com os ensaios de DSC, indicando que o aciclovir presente nas formulações foi alterado para a forma amorfa.

Entretanto, as formulações F5 e F6 mantiveram alguns picos característicos presentes no aciclovir isolado, indicando que ocorreu uma modificação parcial do aciclovir para forma amorfa. Fato previamente suposto pela análise de DSC.

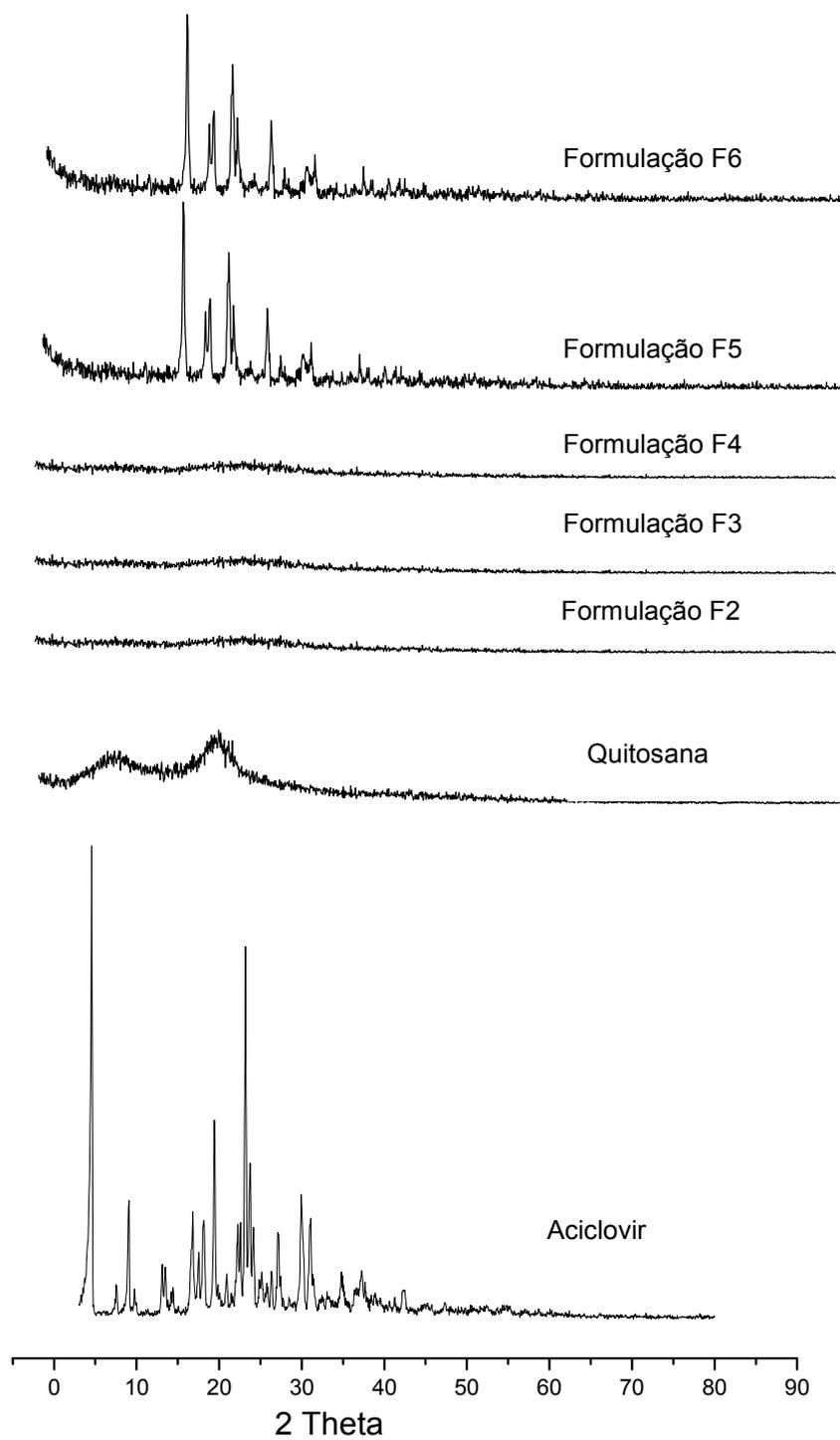


Figura 32. Difratomogramas obtidos para o aciclovir, quitosana, formulações F2, F3, F4, F5 e F6

5.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros IV das formulações F2, F3 e F4 (Figura 33) são uma sobreposição dos espectros isolado do aciclovir e da quitosana, ambos descritos anteriormente nos itens 5.1.2 e 5.3.4. Assim, não se pode evidenciar nenhuma interação química entre o aciclovir e os demais constituintes das formulações.

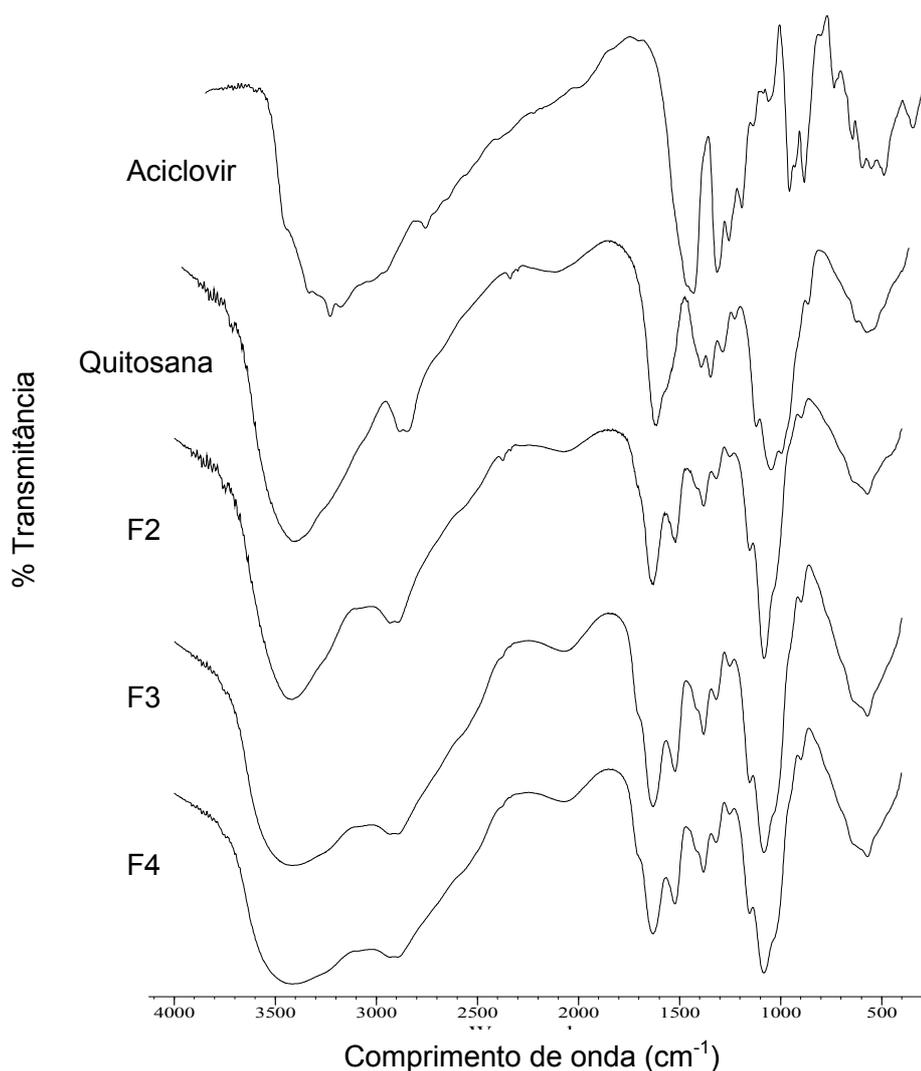


Figura 33. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4 obtidos em pastilhas de KBr

Para as formulações F5 e F6, os espectros IV estão representados na Figura 34. Através destes foi possível constatar que novamente não ocorreram mudanças significativas em relação aos espectros dos compostos isolados.

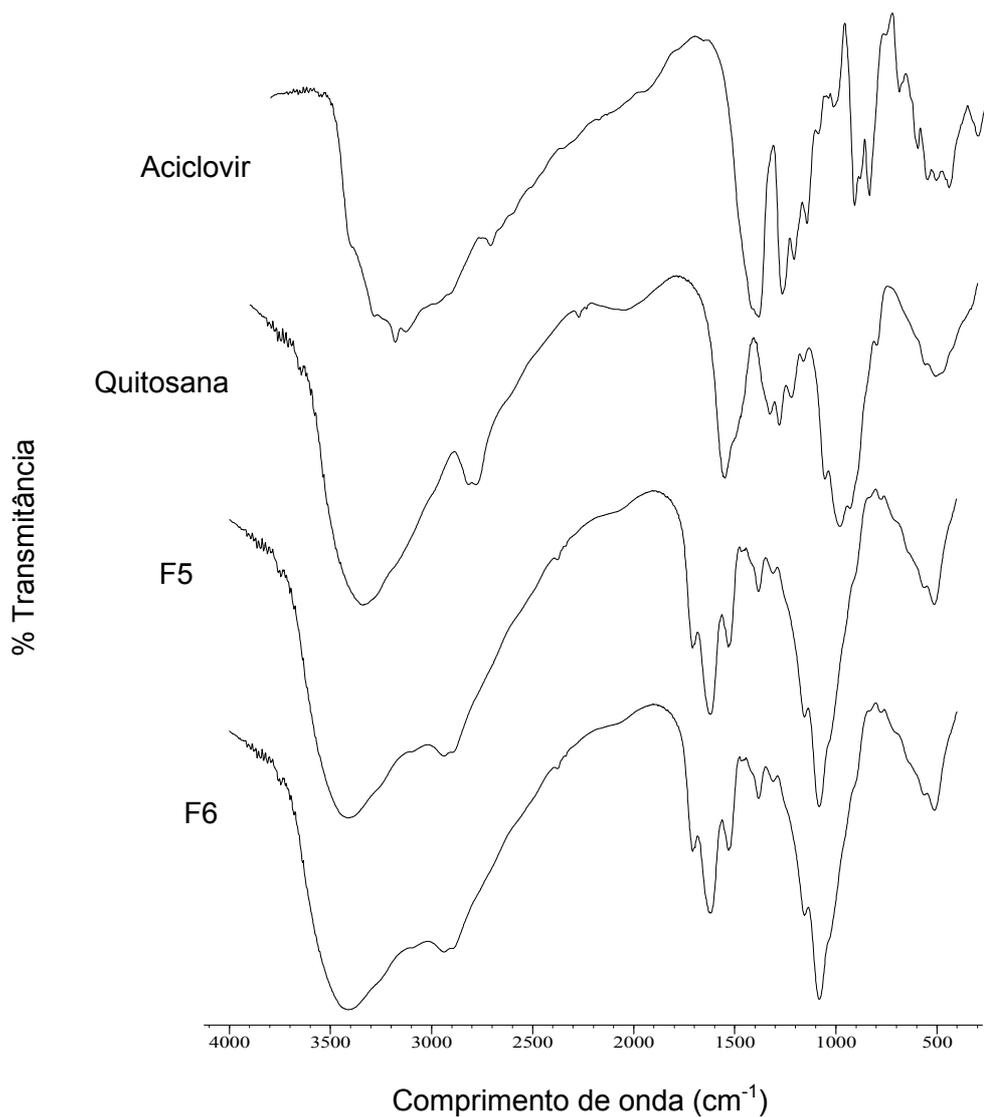


Figura 34. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana, formulações F5 e F6 obtidos em pastilhas de KBr

5.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

De acordo com as fotomicrografias apresentadas na Figura 35, visualiza-se que as formulações, de um modo geral, apresentaram tamanho médio de partícula e morfologia bastante variado. As formulações F2 e F3 demonstraram ser disformes e com a superfície interna côncava. O tamanho médio de partícula das mesmas foi igual a $6,71 \pm 2,7 \mu\text{m}$ e $4,93 \pm 1,9 \mu\text{m}$, respectivamente. A formulação F4 apresentou maiores diferenças entre as partículas, apresentando aspecto bastante irregular e tamanho médio de $3,98 \pm 2,5 \mu\text{m}$.

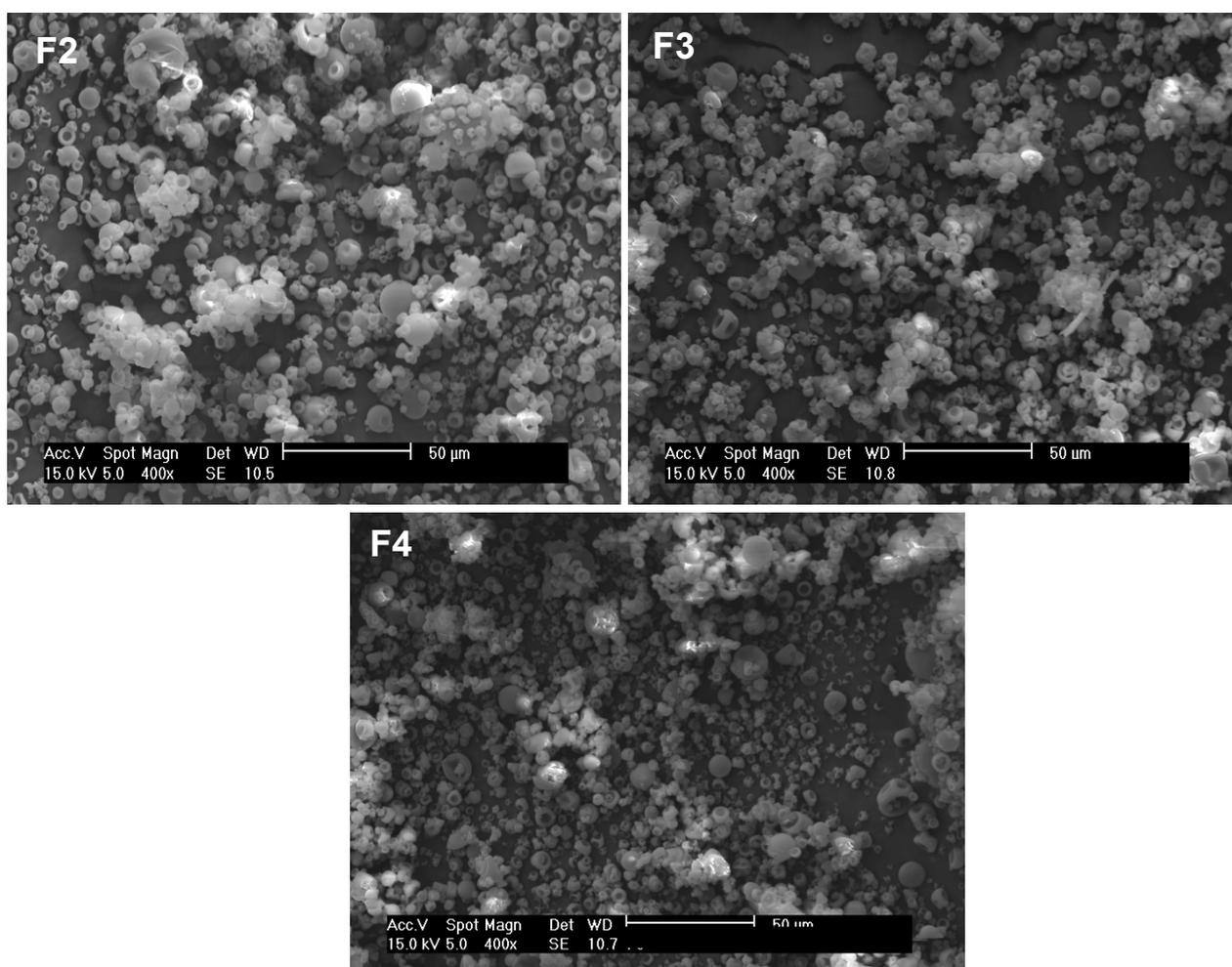


Figura 35. Fotomicrografias das formulações F2, F3 e F4, magnificação de 400 x

As fotomicrografias das formulações F5 e F6 apresentaram aspecto arredondado com tamanho médio de partícula de $4,78 \pm 1,8 \mu\text{m}$ e $5,07 \pm 1,8 \mu\text{m}$, respectivamente (Figura 36).

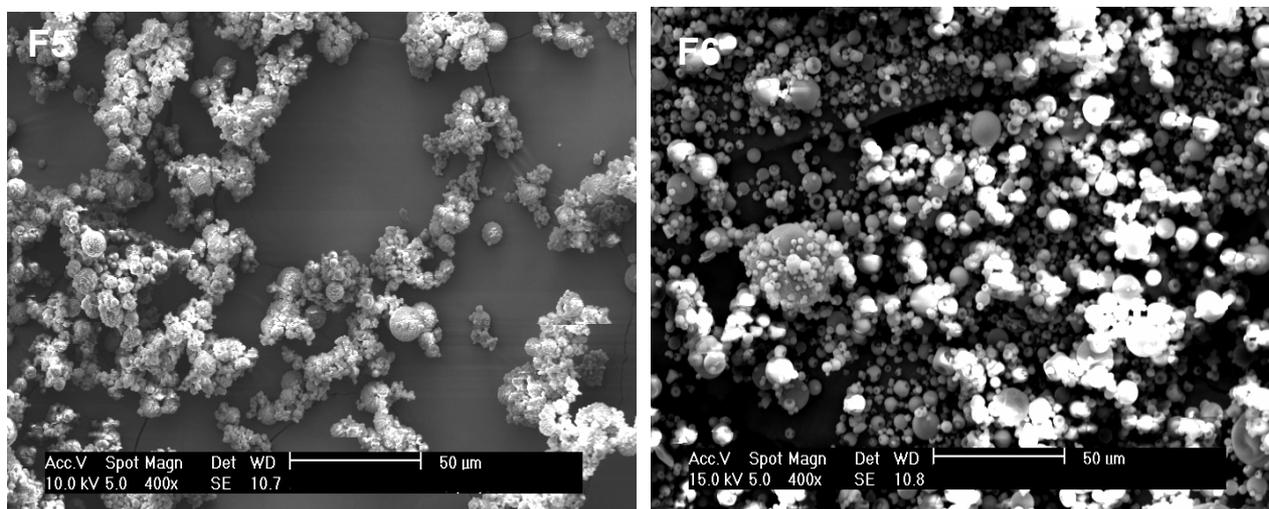


Figura 36. Fotomicrografias das formulações F5 e F6 magnificação de 400 x

5.4.6 Termogravimetria (TG) modo isotérmico

Com o objetivo de verificar a influência do processo de microencapsulação por *spray-dryer* na estabilidade das formulações, procedeu-se a avaliação através de isothermas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera de oxigênio, para simular as condições na qual a amostra permaneceu no equipamento até o término do processo.

As curvas isothermas (Figura 37) indicam que todas as formulações foram estáveis por um período de 4 horas. Assim, pode-se concluir que as amostras não apresentam decomposição térmica durante o processo.

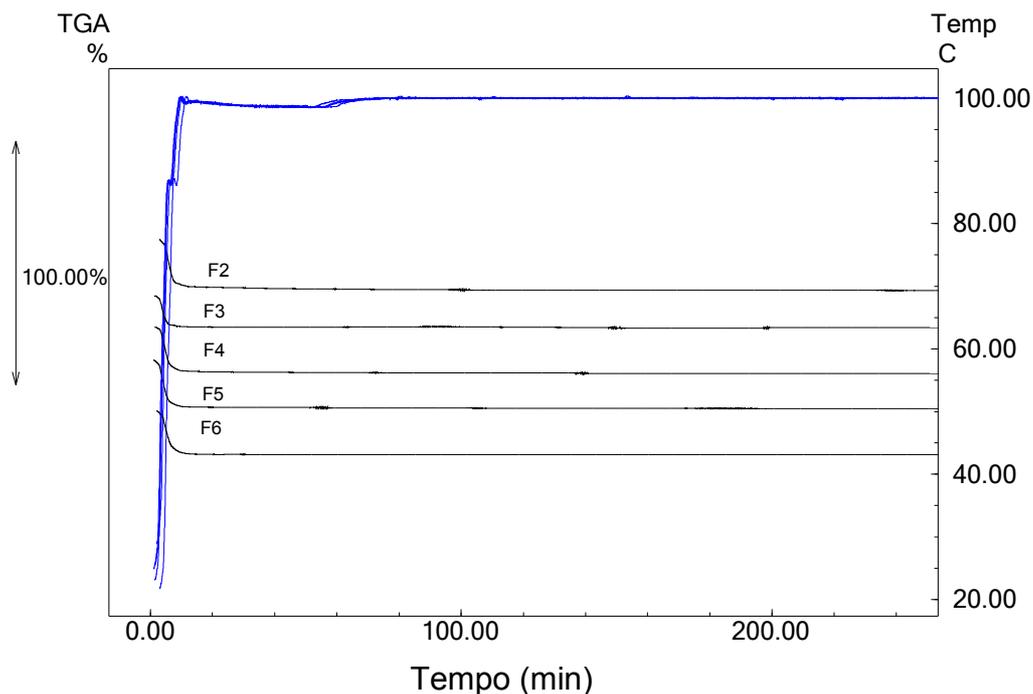


Figura 37. Isotermas obtidas através de análise termogravimétrica em atmosfera de oxigênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)

5.4.7 Perfil de Liberação

O perfil de dissolução pode ser empregado no desenvolvimento e otimização de formulações, estabelecimento do modelo cinético de dissolução e estudos preliminares de bioequivalência (STORPIRTIS et al.,1999). O ensaio de liberação das formulações realizado em pH 1,2 e 6,8 está representado nas Figuras 38 e 39.

O comportamento das formulações em ambos os valores de pH foram similares. A formulação F2 liberou 80 % do teor de aciclovir em aproximadamente 210 min em pH 1,2 e 240 min em pH 6,8. As formulações F3 e F4 promoveram a liberação de igual quantidade de fármaco por 180 e 150 min, respectivamente, em ambos valores de pH. Para as formulações F5 e F6, o tempo de liberação foi superior. As mesmas liberaram 80 % do aciclovir por períodos de 300 e 270 min em pH 1,2 e 330 e 300 min em pH 6,8.

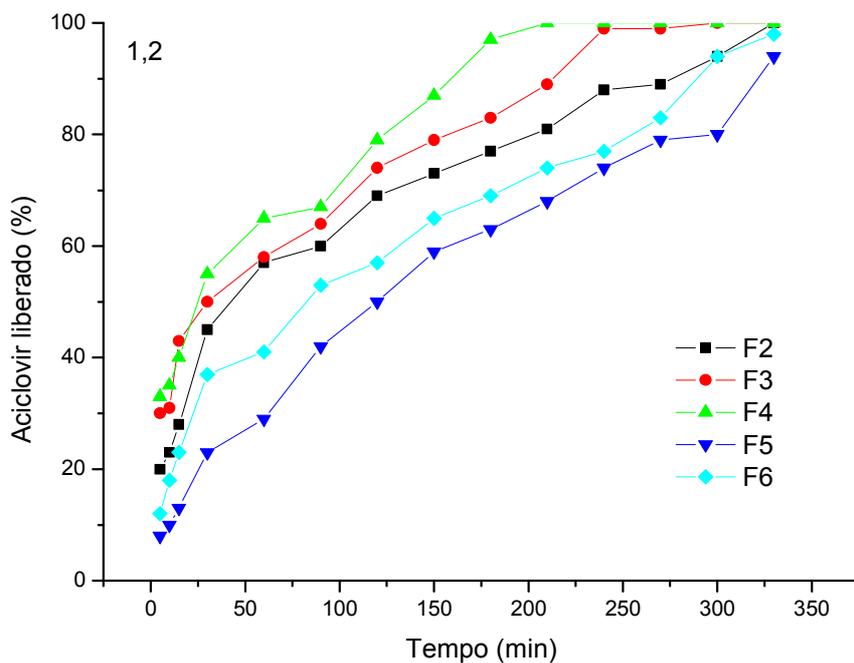


Figura 38. Perfil de liberação das formulações F2, F3, F4, F5 e F6 em pH 1,2

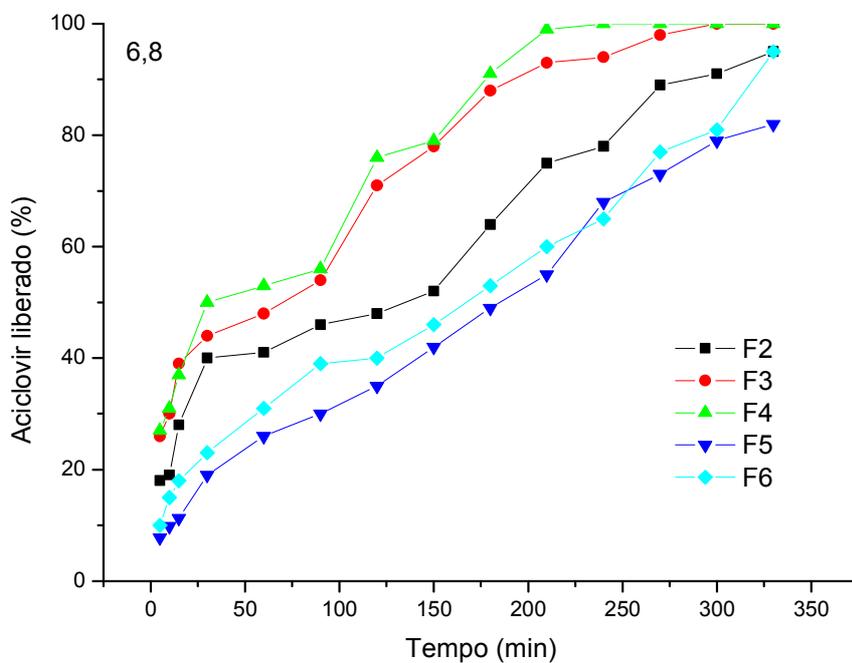


Figura 39. Perfil de liberação das formulações F2, F3, F4, F5 e F6 em pH 6,8

Uma formulação de liberação prolongada ideal é aquela em que o fármaco é liberado constantemente do início ao fim, seguindo um modelo cinético de ordem zero. Entretanto, muitas vezes as formulações de liberação prolongada seguem o modelo cinético proposto por Higuchi, que descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo. Já as formulações de liberação imediata, na maioria dos casos, seguem o modelo de primeira ordem (PATHER et al., 1998; CHAMBIN et al., 2004).

Os modelos matemáticos testados para descrever a cinética de dissolução das formulações de liberação prolongada foram Higuchi e as cinéticas de ordem zero e primeira ordem.

O tratamento matemático das curvas de dissolução demonstrou que o modelo mais adequado para descrever a cinética de dissolução das formulações em pH 1,2 foi o de Higuchi, para todas as amostras. Em pH 6,8, as formulações F5 e F6, apresentaram uma cinética de ordem zero, e as formulações F2, F3 e F4 seguiram o modelo de Higuchi. Os coeficientes de correlação obtidos estão representados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores dos coeficientes de correlação obtidos para os três modelos matemáticos utilizados na linearização das curvas de dissolução

pH 1,2	Formulação F2	Formulação F3	Formulação F4	Formulação F5	Formulação F6
Ordem zero	0,9244	0,8948	0,9865	0,9802	0,9188
Primeira ordem	0,9100	0,9219	0,9937	0,9902	0,9508
Higuchi	0,9417	0,9410	0,9943	0,9988	0,9689
pH 6,8					
Ordem zero	0,9523	0,9156	0,8921	0,9946	0,9793
Primeira ordem	0,9509	0,9395	0,9109	0,9887	0,9685
Higuchi	0,9681	0,9606	0,9486	0,9718	0,9691

Através dos resultados obtidos na segunda etapa de desenvolvimento das formulações por *spray-dryer*, pode-se avaliar a influência da relação

polímero/fármaco e a adição do tripolifosfato na liberação do fármaco com os resultados obtidos na primeira etapa (Tabela 9).

Tabela 9: Dados comparativos entre as formulações desenvolvidas pela técnica de *spray-drying*

Formulação	Relação Quitossana/Aciclovir (mg)	Relação Quitossana(g)/Tripoli fosfato(mL)	Tempo médio de liberação (min) pH 1,2	Tempo médio de liberação pH 6,8 (min)
F1	1000:50	-----	120	120
F2	1000:100	1:1	210	240
F3	1000:150	1:1	180	180
F4	1000:200	1:1	150	150
F5	1000:50	1:1	300	330
F6	1000:75	1:1	270	300

De um modo geral, as formulações que apresentavam a maior quantidade de polímero na forma reticulada em relação à concentração de fármaco, foram as que proporcionaram maiores tempos de liberação. Os resultados demonstram que o polímero reticulado requer concentrações inferiores a 150 mg de fármaco para 1 grama de quitossana para promover melhores perfis de liberação. Por outro lado, o polímero na forma não reticulada em concentrações elevadas em comparação com o fármaco, não proporcionou tempos de liberação acima de 120 minutos (F1).

Assim, pode-se concluir que a concentração de polímero em relação ao fármaco bem como a adição de agente reticulante influencia no processo de liberação. Cabe ainda salientar, que o fato das formulações F5 e F6 apresentarem um maior tempo de liberação em relação às demais, pode estar também relacionado às outras diferenças físico-químicas apresentadas pelas mesmas, verificadas pelos ensaios de DSC e DRX.

5.5 Estudos de estabilidade acelerada

5.5.1 Considerações Gerais

Os testes de estabilidade são empregados no desenvolvimento de medicamentos a fim de evitar problemas posteriores, sendo considerada uma fase importante no desenvolvimento de um novo produto. Estes são realizados para reduzir ou prevenir a ocorrência de deterioração devido à hidrólise, oxidação e outros processos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Em se tratando de produtos farmacêuticos, a estabilidade pode ser conceituada como o espaço de tempo em que o referido produto, em sua embalagem específica, apresenta suas características físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas dentro dos limites estabelecidos, garantindo a sua qualidade (LINTNER, 1995; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

Para determinar a estabilidade de um produto formulado é comum expô-lo à condições intensas de *stress*, ou seja, condições de temperatura, umidade e intensidade de luz que se conheça, da experiência, que provavelmente causam a decomposição deste. Condições elevadas de *stress* aumentam a decomposição do produto e, portanto, reduzem o tempo necessário para o teste. O ensaio concomitante da amostras sob condições normais de temperatura e umidade também é aconselhável se realizar (AULTON, 2005).

Muitos dos processos de decomposição aplicam-se, de modo geral, quando o fármaco estiver em solução. Porém, em todas as formulações há alguma umidade livre (devida tanto aos excipientes quanto ao fármaco). Essa água livre age como vetor para reações químicas entre o fármaco e adjuvantes. Deste modo, é de fundamental importância a determinação da estabilidade de sistemas microencapsulados no estado sólido. Principalmente, quando os mesmos foram desenvolvidos em *spray-dryer*, uma vez que os produtos resultantes apresentam

elevada higroscopicidade, o que pode facilmente desencadear processos de decomposição (LEUNER e DRESSMAN, 2000).

A instabilidade das formulações farmacêuticas pode ser detectada em alguns casos por uma mudança na aparência física, na cor, no odor e no gosto, enquanto em outros casos, podem ocorrer alterações químicas que não são evidentes e que só podem ser determinadas por metodologias específicas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde pequenas quantidades de substâncias podem ser detectadas.

As formulações foram armazenados em câmara climática a 40 ± 2 °C e 75 ± 5 % de umidade relativa, bem como em temperatura e umidade ambiente. O teor de aciclovir foi avaliado por CLAE, em tempos pré-determinados, durante o período de 6 meses, conforme metodologia validada e descrita no item 5.6.

5.5.2 Estabilidade do aciclovir

Os estudos de estabilidade sob condições de “stress” são recomendados pela ICH (2005), sendo que estes foram realizados por Sinhá e colaboradores para o aciclovir. Os ensaios foram feitos sob diferentes condições como hidrolítica, oxidativa, fotolítica e degradação térmica.

Os resultados indicaram que o fármaco em condições neutras (água) não sofre degradação significativa. Entretanto, em condições ácidas ($\text{HCl } 2 \text{ mol.L}^{-1}$) sob aquecimento (80 °C, durante 2 horas) ocorre hidrólise do fármaco. Em condições alcalina o aciclovir se demonstrou estável em comparação à condição ácida.

A degradação em condições oxidativas ocorreu totalmente após o aumento da concentração do agente oxidativo H_2O_2 para 10 % e 30 %. Porém em concentrações inferiores, 1% de H_2O_2 , não foram observadas degradações significativas. Os ensaios de degradação térmica apontaram que o fármaco

permanece estável após 15 dias a 70°C. Em condições fotolíticas foi observado que o aciclovir no estado sólido é mais estável que o mesmo em solução.

5.5.3 Estabilidade acelerada das formulações

Na preparação de um sistema farmacêutico vários excipientes podem ser utilizados, com a finalidade de se obter as características físicas e químicas desejadas do produto ou para melhorar a aparência, odor e sabor. Outras substâncias podem ser usadas para aumentar a estabilidade do fármaco, particularmente no tocante aos processos hidrolítico e oxidativo (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). Em relação aos carreadores poliméricos, estes podem aumentar a estabilidade do produto seco final (LEUNER e DRESSMAN, 2000).

Através dos resultados obtidos pode-se constatar que todas as formulações submetidas à temperatura e umidade ambiente (Figura 40 e Tabela 10) apresentaram uma menor degradação do fármaco, quando as mesmas são comparadas com as que permaneceram em câmara climática (Figura 41 e Tabela 11). A literatura descreve que a temperatura afeta a estabilidade de um fármaco por meio do aumento da velocidade de reação, em média duas a três vezes para cada aumento de 10°C na temperatura. A umidade elevada é outro fator que está relacionada com a diminuição da estabilidade de fármacos (CONNORS; AMIDON; STELLA, 1986; TRISSEL, 2000).

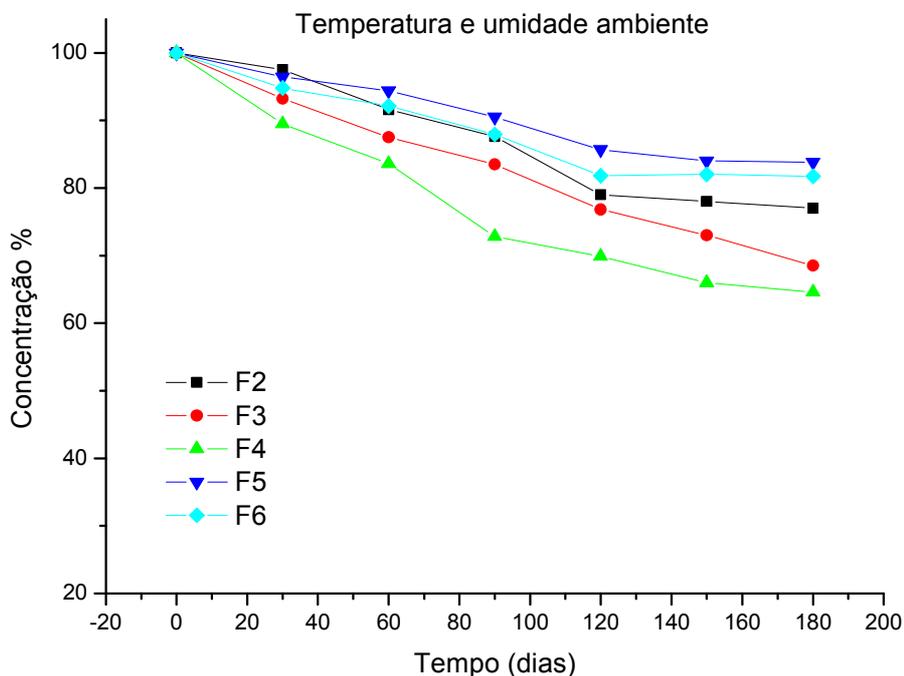


Figura 40. Teor de aciclovir das formulações submetidas à temperatura e umidade ambiente

Tabela 10: Teor de aciclovir presente formulações submetidas à temperatura e umidade ambiente

Tempo (dias)	F2 Média (%) ± D.P.R	F3 Média (%) ± D.P.R	F4 Média (%) ± D.P.R	F5 Média (%) ± D.P.R	F6 Média (%) ± D.P.R
0	100 ± 0,68	100 ± 0,65	100 ± 0,77	100 ± 0,86	100 ± 0,77
30	97,5 ± 0,95	93,2 ± 0,69	89,5 ± 0,85	96,4 ± 0,98	94,8 ± 0,98
60	91,6 ± 1,04	87,5 ± 0,85	83,6 ± 0,76	94,4 ± 0,76	92,1 ± 0,99
90	87,6 ± 1,18	83,5 ± 1,46	72,8 ± 1,13	90,5 ± 0,99	87,9 ± 0,67
120	81,0 ± 0,75	76,8 ± 0,98	69,9 ± 1,04	85,7 ± 0,56	81,8 ± 0,53
150	80,3 ± 0,66	73,8 ± 0,96	66,2 ± 0,66	84,6 ± 0,88	80,9 ± 0,75
180	77,6 ± 0,99	68,5 ± 0,88	64,6 ± 0,62	83,8 ± 1,08	80,7 ± 0,87

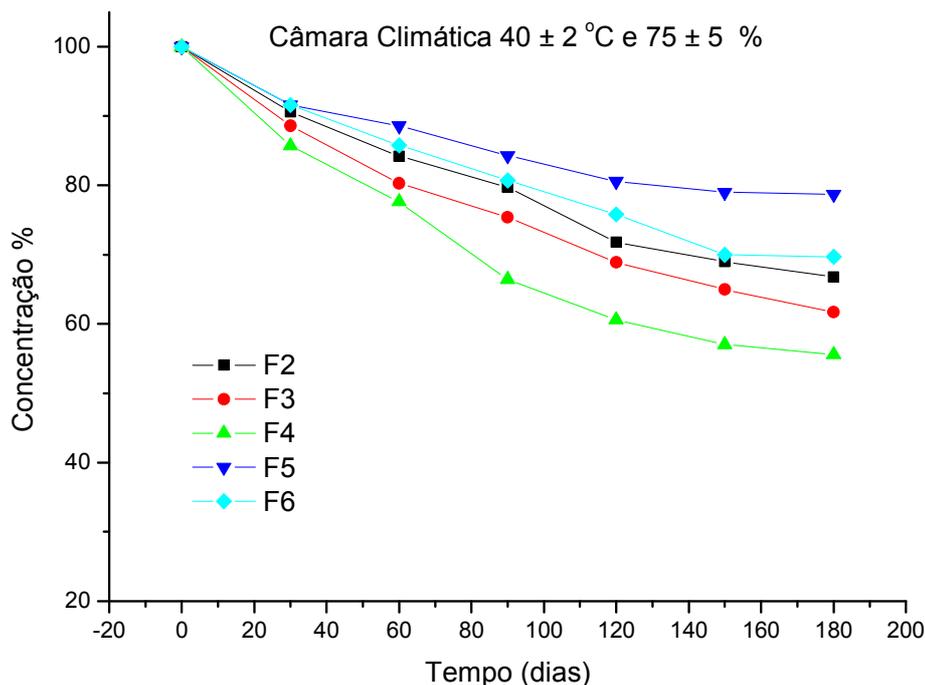


Figura 41. Teor de aciclovir das formulações submetidas à câmara climática

Tabela 11: Teor de aciclovir presente nas formulações submetidas à câmara climática

Tempo (dias)	F2 Média (%) ± D.P.R	F3 Média (%) ± D.P.R	F4 Média (%) ± D.P.R	F5 Média (%) ± D.P.R	F6 Média (%) ± D.P.R
0	100 ± 1,20	100 ± 1,25	100 ± 0,75	100 ± 0,67	100 ± 1,06
30	90,6 ± 0,87	88,6 ± 0,78	85,7 ± 0,58	91,6 ± 0,89	91,6 ± 1,22
60	84,2 ± 0,79	80,3 ± 0,49	77,6 ± 0,88	88,6 ± 0,53	85,8 ± 0,88
90	79,7 ± 0,68	75,4 ± 0,78	66,4 ± 0,91	84,3 ± 0,78	80,7 ± 0,87
120	71,8 ± 1,31	68,9 ± 0,69	60,6 ± 0,99	80,6 ± 0,76	75,8 ± 0,78
150	69,1 ± 0,91	65,6 ± 1,04	57,9 ± 0,88	79,3 ± 0,91	70,4 ± 0,65
180	66,8 ± 0,78	61,7 ± 0,81	55,6 ± 0,87	78,7 ± 0,99	69,7 ± 0,85

O comportamento das formulações nas diferentes condições analisadas foi similar. Em ambas, as formulações F5 e F6 apresentaram menores teores de degradação do aciclovir. Os resultados apontaram que a relação polímero/fármaco também influenciou na estabilidade final das formulações, sendo que quanto maior essa relação, maior a estabilidade. Esse fato pode ser explicado devido a maiores quantidades de polímero proporcionarem uma maior proteção ao fármaco, impedindo a ação direta da temperatura e umidade.

O aumento da estabilidade utilizando-se fármacos revestidos foi relatado por Stulzer e Silva (2006). Neste estudo grânulos de captopril produzidos por leito fluidizado, empregando-se a etilcelulose e metilcelulose como polímeros demonstraram maior estabilidade em relação ao fármaco puro, quando os mesmos foram submetidos às condições de temperatura, umidade e luz elevadas

Ainda, as formulações F5 e F6 possuem quantidades de fármaco na forma cristalina, conforme observado pela técnica de DRX. Segundo Florence e Attwood (2003) compostos cristalinos são mais estáveis que a respectiva forma amorfa.

5.5.4 Estudos cinéticos de degradação

Os dados científicos que fazem parte do estudo da estabilidade de uma formulação levam à previsão do prazo de validade esperado para o produto. A velocidade em que a degradação do fármaco ocorre em uma formulação é essencial. Assim, o estudo da velocidade da mudança química e do modo como é influenciado por fatores como a concentração do fármaco ou do reagente, o solvente empregado, as condições de temperatura e pressão, e a presença de outros agentes químicos na formulação é denominado cinética da reação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

O estudo cinético começa com a medida da concentração do fármaco em intervalos determinados, sob um conjunto específico de condições que incluem temperatura, pH, concentração iônica, intensidade da luz e concentração do fármaco. A medida da concentração do fármaco nos vários intervalos revela sua estabilidade ou instabilidade nas condições especificadas com o decorrer do tempo. A partir desse ponto de início, cada uma das condições originais pode ser variada isoladamente para determinar a influência que essas mudanças exercem sobre a

estabilidade do fármaco (HAN e SURYANARAYANAN, 1999; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Desta forma, é fundamental, na cinética química a definição de velocidade e ordem de reação. A velocidade da reação é a variação de uma espécie em relação ao tempo, enquanto que a ordem da reação permite definir esta variação da velocidade com a concentração dos reagentes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Reações de ordem zero, de primeira ordem e de segunda ordem estão entre as mais importantes nos estudos de degradação de fármacos.

As reações de ordem zero apresentam uma velocidade de decomposição constante, sendo independente da concentração de quaisquer dos reagentes. Nas reações de primeira ordem, a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. Já as reações de segunda ordem se caracterizam por uma velocidade de reação proporcional à concentração de dois reagentes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; FLORENCE e ATTWOOD, 2003). De acordo com a Tabela 12, observa-se que todas as formulações seguiram uma cinética de degradação de segunda ordem.

Tabela 12: Coeficientes obtidos (r^2) das formulações submetidas às diferentes condições de estabilidade

Temperatura e umidade ambiente	Ordem da reação	F2	F3	F4	F5	F6
	Ordem zero	0,9634	0,9962	0,96069	0,9782	0,9185
Primeira Ordem	0,9654	0,9972	0,97257	0,9795	0,9196	
Segunda ordem	0,9965	0,9985	0,9815	0,9804	0,9198	
Câmara climática	Ordem zero	0,9784	0,9757	0,95661	0,9475	0,9826
	Primeira Ordem	0,9871	0,9892	0,97403	0,9569	0,9913
	Segunda ordem	0,9921	0,9970	0,98559	0,9651	0,9969

Para o cálculo da constante de velocidade (k) e do tempo necessário para que o teor do fármaco reduza a 90 % ($t_{90\%}$) foram utilizadas as equações descritas na Tabela 13, de acordo com a ordem de reação calculada. Estes parâmetros foram calculados para as amostras submetidas à temperatura e umidade ambiente, uma vez que o $t_{90\%}$ (prazo de validade) de interesse é para as amostras que se encontram em condições ambientais.

Tabela 13: Equações cinéticas para cálculo da degradação do fármaco

Ordem de reação	k (dias⁻¹)	t_{90%} (dias)
Zero ordem	$C_0^* - C^{**} / t$	$0,1. C_0 / k$
Primeira ordem	$2,303 / t \times \log C_0 / C$	$0,106 / k$
Segunda ordem	$1 / t \times (1 / C - 1 / C_0)$	$1 / 9K \times C_0$

* Concentração do fármaco no tempo zero

** Concentração do fármaco após degradação por um tempo t

O tempo $t_{90\%}$ indica o tempo necessário para que ocorra uma redução de 10 % da concentração inicial de fármaco. O $t_{90\%}$ é preconizado como o limite de degradação máxima que um fármaco pode sofrer, visando à sua utilização pelo paciente (NETZ e ORTEGA, 2002; AULTON, 2005). De acordo com os dados obtidos (Tabela 14), as formulações com maior prazo de validade foram a F5 e F6.

Tabela 14: Valores das constantes de velocidade (k_{25}) e $t_{90\%}$

Temperatura e umidade ambiente	K₂₅ (dias⁻¹)	t_{90%} (dias)
Formulação F2	$1,42 \times 10^{-5}$	78
Formulação F3	$2,55 \times 10^{-5}$	43
Formulação F4	$3,04 \times 10^{-5}$	36
Formulação F5	$1,07 \times 10^{-5}$	103
Formulação F6	$1,24 \times 10^{-5}$	89

Os valores de k apontam a constante de degradação. Convém observar que os maiores valores de k apresentam os menores valores de $t_{90\%}$, uma vez que

quanto maior a constante de velocidade mais rápida será a reação de degradação do fármaco e conseqüentemente, menor será o prazo de validade.

A legislação brasileira (ANVISA) preconiza que para um medicamento durante o estudo de estabilidade acelerada em sua embalagem primária, obter um prazo de validade provisório de 12 meses pode apresentar uma degradação máxima de 10 % do teor (Resolução RE nº 1, de 29 de Julho de 2005).

Porém, cabe ressaltar que os resultados obtidos para as formulações foram para as mesmas sem embalagem, fator que, conseqüentemente, acelera o processo de degradação. Entretanto, como se trata de uma formulação que não será comercializada, estes resultados foram utilizados somente para investigar a estabilidade entre as formulações desenvolvidas.

5.6 Validação da metodologia analítica de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.6.1 Aspectos Gerais

Na literatura, são descritos uma variedade de métodos para quantificação do aciclovir, como matéria-prima ou em formulações farmacêuticas, utilizando técnicas como espectrofotometria, a espectrofluorometria, a eletroquimiluminescência e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV (BASAVIAH e PRAMEELA, 2002; BASAVIAH e PRAMEELA, 2003; JIANGENG; LUO; ZHANG, 2004; HUIDORO; RUPÉREZ; BARBAS, 2005; ABDELLETEF et al., 2006). Entre os métodos relatados, muitos são designados para a determinação do fármaco em líquidos biológicos como plasma, soro e urina (BOULIEU; GALLANT; SILBERSTEIN, 1997; PEH e YUEN; 1997; RAMAKRISHNA et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2003; BAHRAMI; MIRZAEI; KIANI, 2005)

Para o controle de qualidade rotineiro, o desenvolvimento de um método simples, rápido, e sensível é altamente desejável. Assim, procedeu-se o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica que englobasse estas características para determinação do aciclovir nas microesferas produzidas pela técnica de *spray-drying*.

O processo de validação é essencial para definir se uma metodologia desenvolvida está completamente adequada aos objetivos a que se destina, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

A validação da metodologia analítica foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo ICH (2005) através dos parâmetros de especificidade, linearidade e faixa, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão, exatidão e robustez.

5.6.2 Especificidade

Este parâmetro é expresso como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

Os cromatogramas demonstraram que o método é específico, pois não ocorreu sobreposição dos picos de absorção do aciclovir e da guanina, principal produto de degradação do fármaco (SINHA et al ., 2007), bem como absorção dos demais constituintes da formulação no comprimento de onda utilizado para as análises (Figuras 42 e 43).

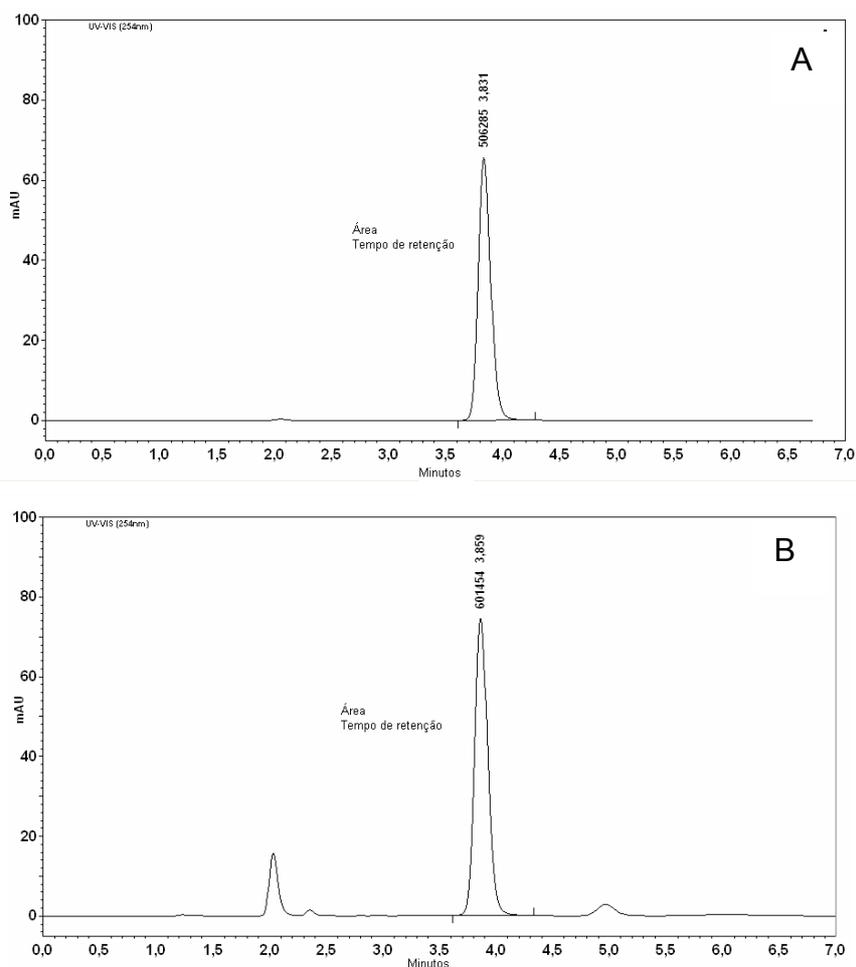


Figura 42. Cromatogramas, (A) solução padrão de aciclovir e (B) micropartículas contendo aciclovir $6 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$

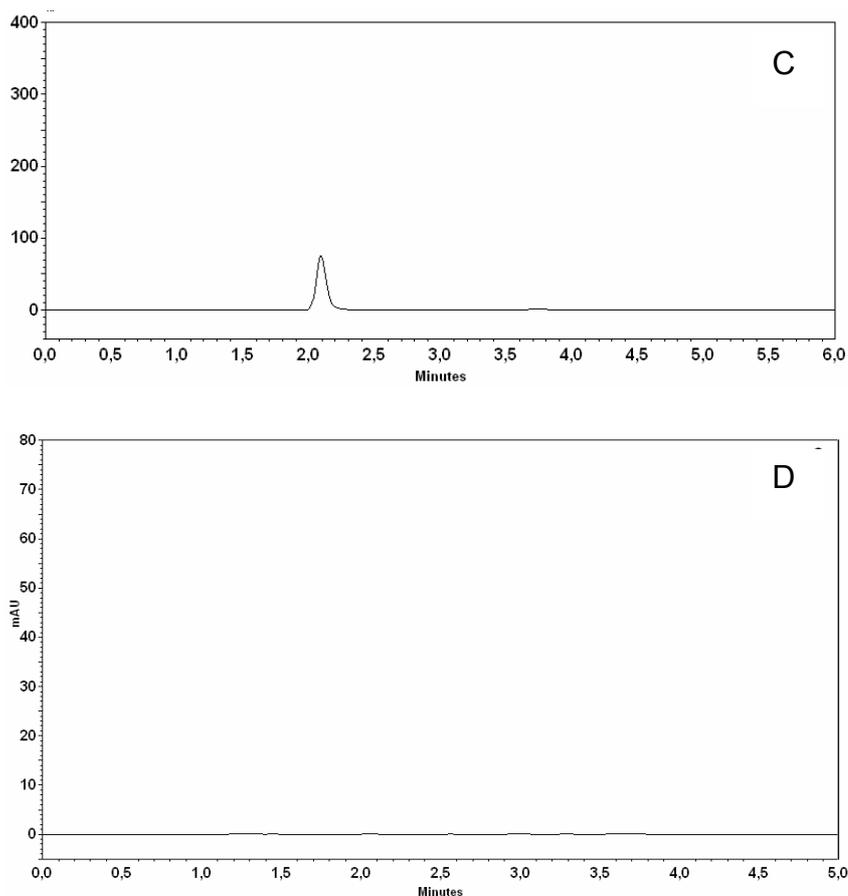


Figura 43. Cromatogramas, (C) solução padrão de guanina e (D) solução placebo

5.6.3 Linearidade e faixa

A linearidade de uma metodologia analítica é a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007). De acordo com a Tabela 15 e Figura 44 observa-se que o método apresentou linearidade no intervalo da concentração testada (1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta faixa de concentração possibilitou detectar o aciclovir dentro dos limites de interesse e a resposta do detector ultravioleta conservou-se linear.

Tabela 15: Resultados obtidos para a linearidade e faixa

Concentração de aciclovir ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área do pico (media \pm D.P.R)
1	103036 \pm 0,013
3	306289 \pm 0,068
5	503997 \pm 1,120
7	716928 \pm 0,711
10	1014936 \pm 0,441
Equação	$y = 101532x + 1069$
r^2	0,9999

* n=3

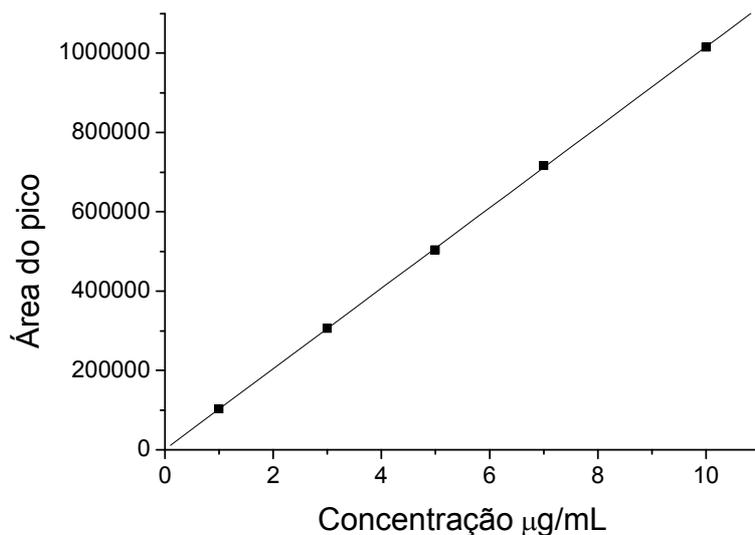


Figura 44. Linearidade e faixa do método de quantificação do aciclovir por CLAE

5.6.4 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

O limite de quantificação é expresso como a menor quantidade de analito na amostra que possa ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais. A definição para o limite de detecção é a menor

quantidade de analito em uma amostra que possa ser detectado, mas não necessariamente quantificado nas condições experimentais.

Os valores calculados para LQ e LD foram de $0,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, indicando a sensibilidade do método. Considerando que a faixa de concentração utilizada para quantificação do aciclovir foi de $1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, conclui-se que o fármaco é seguramente quantificável na faixa selecionada.

5.6.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

Neste ensaio foram utilizadas seis determinações para cada nível (repetibilidade e precisão intermediária) onde foram observadas as diferenças entre as repetições (Tabela 16). O ensaio apresentou um desvio padrão relativo de 0,24 % (precisão intermediária) e 0,14 % (repetibilidade), estes valores estão de acordo com a variação aceitável, onde o limite máximo de DPR é $\pm 2,0$ %. A análise de variância ANOVA demonstrou que não há diferença estatística significativa entre as análises dos diferentes períodos, o valor de F calculado foi de 0,39 e F de significação igual a 7,7.

Tabela 16: Resultados da repetibilidade (mesmo dia) e precisão intermediária (dias diferentes)

Solução amostra ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área média do pico \pm D.P.R %	Solução amostra ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área media do pico \pm D.P.R %
Manhã	$526873 \pm 0,17$	Dia 1	$526873 \pm 0,17$
Tarde	$528611 \pm 0,13$	Dia 2	$527322 \pm 0,44$
Noite	$528395 \pm 0,12$	Dia 3	$528361 \pm 0,11$
Mesmo dia	$527959 \pm 0,14$	Dias diferentes	$527518 \pm 0,24$

*Média \pm D.P.R (n=6)

5.6.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método com o valor verdadeiro. Nos casos em que amostras de todos os componentes da formulação estão disponíveis, se aceita a análise pelo método de adição do padrão (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

Os resultados encontrados para o ensaio de recuperação do aciclovir nas diferentes concentrações analisadas estão indicados na Tabela 17. A porcentagem média para o ensaio de recuperação foi de $100,3 \pm 0,85$ %, resultado que traduz a concordância com o valor verdadeiro da amostra. Através do teste t de Student pode-se afirmar que o valor de recuperação encontrado é estatisticamente igual a 100 %, para nível de significância $\alpha = 0,05$.

Tabela 17: Resultados da exatidão

Solução final	Área média do pico \pm D.P.R	% média recuperada \pm D.P.R
$3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$306289 \pm 0,06$	$99,5 \pm 0,05$
$7 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$716828 \pm 0,71$	$101,2 \pm 0,68$
$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$1014936 \pm 0,44$	$100,3 \pm 1,16$

*Média \pm D.P.R (n=3)

5.6.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007). Mudanças nas condições cromatográficas como, comprimento de onda, fluxo e variação do pH da fase móvel não interferiram nos resultados. Assim, o método se demonstrou robusto em relação às variações desses parâmetros. Dados expostos na Tabela 18.

Tabela 18: Resultados do ensaio de robustez

Solução amostra (5 µg.mL ⁻¹)	Teor de aciclovir (%) ± D.P.R	Solução amostra (5 µg.mL ⁻¹)	Teor de aciclovir (%) ± D.P.R	Solução amostra (5 µg.mL ⁻¹)	Teor de aciclovir (%) ± D.P.R
Fluxo		pH		Comprimento de onda	
0,6 mL.min ⁻¹	99,34 ± 0,44	2,0	102,33 ± 0,36	252 nm	104,30 ± 0,35
0,8 mL.min ⁻¹	100,35 ± 0,64	2,5	100,41 ± 0,81	254 nm	102,40 ± 0,25
1,0 mL.min ⁻¹	100,15 ± 0,85	3,0	98,39 ± 0,78	256 nm	102,13 ± 0,53

*Média ± D.P.R (n=3)

Por fim, os resultados obtidos através do estudo de validação permitem concluir que o método proposto é adequado e seguro para quantificação do aciclovir nas micropartículas desenvolvidas pela técnica de *spray - drying*.

Os dados apresentados nesta secção foram aceites para publicação no periódico Journal of Chromatographic Science (Anexo III).

VI- Conclusões

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados encontrados:

- O aciclovir foi caracterizado por CLAE, IV, UV e DSC e se encontra dentro dos padrões de qualidade preconizados.
- Os ensaios de análise elementar, IV e RMN ^{13}C sugerem formação de um monoácido carboxílico e uma monoamida nas microesferas de malonilquitosana com intumescimento pH dependente. As curvas TG/DTG apresentaram uma menor estabilidade térmica em relação às microesferas gelatinizadas.
- O tempo médio de liberação do aciclovir a partir das microesferas de malonilquitosana foi de 5,5 horas. Os mecanismos envolvidos na liberação das mesmas em pH 1,2 são intumescimento e difusão simultaneamente ($n=0,8474$), em pH 6,8 diferentes processos estão envolvidos, como, difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica ($n=1,0491$).
- A maior taxa de aciclovir encapsulado nas microesferas de malonilquitosana foi de 69,7 % ($\pm 0,67$) para o tempo de contato de 24 horas. Através da microscopia eletrônica de varredura foi constatado que as mesmas apresentam esfericidade com superfície lisa, poucos poros e diâmetro médio de aproximadamente 882 μm .
- A curva DSC da formulação F1 não apresentou o evento endotérmico relativo à fusão do fármaco. O ensaio de DRX confirmou a modificação na estrutura cristalina do aciclovir presente na formulação F1 para a forma amorfa, condizendo com os resultados obtidos em DSC.
- As imagens obtidas por MEV indicaram que a formulação F1 apresentou formato arredondado e com a superfície interna côncava com tamanho médio de partícula de $5,52 \pm 1,8 \mu\text{m}$.

- O perfil de liberação em pH 1,2 e 6,8 da formulação F1 indicou que 80 % do aciclovir foi liberado por um período de 120 minutos, seguindo o modelo matemático proposto por Higuchi.
- As curvas DSC das formulações F2, F3 e F4 não apresentaram o pico de fusão característico do fármaco. As formulações F5 e F6 apresentaram um evento endotérmico mais acentuado em torno de 215 °C. Através das curvas TG, constatou-se que todas as formulações demonstraram estabilidade térmica até temperatura de 221,3 °C.
- As análises de DRX das formulações F2, F3 e F4 não apresentaram os picos relativos ao aciclovir. Assim, novamente os dados sugerem e condizem com os ensaios de DSC, indicando que o aciclovir presente nas formulações foi alterado para a forma amorfa. Entretanto, as formulações F5 e F6 mantiveram alguns picos característicos presentes no aciclovir isolado, indicando que ocorreu uma modificação parcial do aciclovir para forma amorfa.
- As fotomicrografias das formulações, de um modo geral, apresentaram tamanho médio de partícula e morfologia bastante variadas.
- Os melhores valores de eficiência de encapsulação e perfis de liberação foram os obtidos para as formulações F5 e F6. Estas liberaram 80 % do aciclovir por períodos de 300 min e 270 min em pH 1,2; e 330 e 300 min em pH 6,8. O tratamento matemático das curvas de dissolução demonstrou que o modelo mais adequado para descrever a cinética de dissolução das formulações em pH 1,2 foi o de Higuchi para todas as amostras. Em pH 6,8 as formulações F5 e F6, apresentaram uma cinética de ordem zero e as formulações F2, F3 e F4 seguiram o modelo de Higuchi.
- A concentração de polímero em relação ao fármaco bem como a adição de agente reticulante influenciou no processo de encapsulação e liberação.

- Os estudos de estabilidade acelerada indicaram que todas as formulações submetidas à câmara climática apresentaram uma maior degradação do fármaco, quando as mesmas são comparadas com as que permaneceram em temperatura e umidade ambiente.
- As formulações F5 e F6 apresentaram menores teores de degradação do aciclovir. Os resultados apontaram que a relação polímero/fármaco também influenciou na estabilidade final das formulações, sendo que quanto maior essa relação, maior a estabilidade.
- Os estudos cinéticos indicaram que todas as formulações seguiram uma degradação de segunda ordem. As formulações com maior prazo de validade foram a F5 e F6, apresentando um $t_{90\%}$ de 103 e 89 dias, respectivamente.
- O método de quantificação do aciclovir encapsulado nas micropartículas desenvolvidos pela técnica de *spray-drying* foi devidamente validado em termos de especificidade, linearidade e faixa, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão e robustez. Os resultados obtidos permitem concluir que o método proposto foi seguro e adequado para quantificação do fármaco nos sistemas desenvolvidos.
- De um modo geral, pode-se concluir que o objetivo principal proposto pelo trabalho foi alcançado. Uma vez que as formulações desenvolvidas pelas técnicas de coacervação e *spray-drying*, promoveram uma liberação modificada do aciclovir.

VII- Considerações Finais

- As formulações desenvolvidas ainda necessitam a avaliação em modelos *in vivo*, para se obter melhores informações e poder comparar com os resultados obtidos *in vitro*.
- Os resultados apontam que o desenvolvimento e a avaliação de sistemas envolvendo diferentes agentes reticulantes e em diferentes concentrações, bem como a variação dos parâmetros experimentais no desenvolvimento das micropartículas por *spray-drying* são promissores.

VIII- Referências

ABDELLETEF, H.E; EL-HENAWEE, M.M; . EL- SAYED, M.H; AYAD, M.M. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for analysis of acyclovir and acebutolol hydrochloride. *Spectrochimica acta*. v.65, p.996-998, 2006.

AMIDON, G. L; LENNERNÅS, H; SHAH, V. P; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*. v.12, p.413-420, 1995.

ANAL, A. K; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*.v.18, p.240-251, 2007.

ANSEL, H. C; POPOVICH, N. G; ALLEN, L. V. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ASADA, M; TAKAHASHI, H; OKAMOTO, H; TANINO, H; DANJO, K. Teophyline particle desing using chitosan by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 270, p.167-174, 2004.

AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. Artmed Editora, 2005.

BAHRAMI, G; MIRZAEI, S.A; KIANI, A. Determination of acyclovir in human serum by high- performance liquid chromatography using liquid-liquid extraction and its application in pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. v. 25, p. 327-331, 2005.

BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002.

BASAVAIHAH, K; PRAMEELA, H.C. Simple spectrophotometric of acyclovir in bulk drug and formulations. *II Farmaco*.v.57, p. 443-449, 2002.

BASAVAIHAH, K; PRAMEELA, H.C; CHANDRASHEKAR, U. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of acyclovir in pharmaceuticals. *II Farmaco*. v.58, p. 1301-1306, 2003.

BENCINI, M; RANUCCI, E; FERRUTI, P; TROTTA, F; DONALISIO, M; CORNAGLIA, M; LEMBO, D; CAVALLI, R. Preparation and in vitro evaluation of the antiviral activity of the Acyclovir complex of a β -cyclodextrin/poly(amidoamine) copolymer. *Journal of Controlled Release, In Press*.2008.

BERMAN, J; PIERCE, P; PAGE, P. E. Scale up of a spray dry tablet granulation process: Thermodynamic considerations. *Drug Development and industrial pharmacy*. v. 20, p. 731- 755, 1994.

BODMEIER, R; KRANZ, H. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*.v.332, p.107-114, 2007.

BOIVIN, G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes*. v. 2, p. 48-56, 2004.

BOULIEU, R; GALLANT, C; SILBERSTEIN, D. Determination of acyclovir in human plasmaby high-performance liquid cromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. v.693, p. 233- 236, 1997.

BRADY, R; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*. v.61, p.73-81, 2004.

BRASIL, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Diário Oficial União, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm> Acesso em: 11.01.2008.

BRASIL, Resolução - RE nº 1, de 29 de Julho de 2005, Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, Diário Oficial União, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm> Acesso em: 11.01.2008.

BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL-FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos*.Itajaí: Editora da Univali, 2003.

BRITISH PHARMACOPEIA, London: The Stationary Office, 2006.

BROADHEAD, S. K; ROUAN, E; RHODES, C.T. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 18, p. 1169-1206, 1992.

CASSADY, A. K; WHITLEY, R.J. New therapeutic to the alpha herpesvirus infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.39, p.119-128, 1997.

CHAMBIN, O; CHAMPION, D; DEBRAY, C; ROCHAT-GONTHIER, M. H; LE MESTE, M; POURCELOT, Y. Effects of different cellulose derivatives on drug release mechanism studied at a pre formulation stage. *Journal of Controlled Release*. v.95, p.101-108, 2004.

CHAUHAN, B; SHIMPI, S; PARADKAR, A. Preparation and evaluation of glibenclamide-polyglycolized glycerides solid dispersions with silicon dioxide by spray drying technique. *European Journal of Pharmaceutics Sciences*. v. 26, p. 219-230, 2005.

CHEU, S.J; CHEN, R.R.L; CHEN, P.F; LIN, W. J. *In vitro* modified release of acyclovir from ethyl cellulose microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v.18, p.559-565, 2001.

COLLINS, P; ELLIS, N. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. *Journal of Medical Virology*. v. 1, p.58-66, 1999.

CONNORS, K. A; AMIDON, G. L; STELLA, V. J. *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.

CONSTANT, P. B. L; STRINGHETA, P. C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e tecnologia de alimentos*. v.31, p.12-18, 2002.

CONTI, B; BUCOLO, C; GIANNAVOLA, C; PUGLISHE, G; GIUNCHEDI, P; CONTE, U. Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: *in vitro/in vivo* evaluation. *European Journal of Pharmaceutics Sciences*. v.5, p.287-293, 1997.

DANGPRASIRT, P; RITTHIDEJ, G.C. Development of diclofenac sodium controlled release solid dispersion by spray drying using optimization strategy I. Powder formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 21, p.2323-2337, 1995.

DA SILVA, A.G. Propiedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O; DA SILVA, A.G; PEREIRA JR, A.C.(Org). *Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

DAVIES, R. Particle science and technology- a view at the millenium. *Powder Technology*. v.119, p.45-57, 2001

DE CLERCK, E; NAESENS, L; DE BOLE, L; SCHOLS, D; ZHANG, Y; NEYTS, J. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Reviews in Medical Virology*. v.11, p.381-395, 2001.

DESAI, K. G. H. PARK, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linked agent on the properties of spray dried microspheres. *Journal of Microencapsulation*. v. 22, p. 377-395, 2005.

DONG, W. Y; MAINCENT, P; BODMEIER, R. In vitro and in vivo evaluation of carbamazepine-loaded enteric microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 331, p.84-92, 2007.

EINBU, A; GRADALEN, H; VARUM, K. M. Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid. *Carbohydrate Research*.v.342, p.1055-1062, 2007.

FERNÁNDEZ, M; SEPÚLVEDA, J; ARÁNGUIZ, T; PLESSING, C. Technique validation by liquid chromatography for the determination of acyclovir in plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. v.791, p. 357- 363, 2003.

FERREIRA, A. O. *Guia prático da farmácia magistral*. 2 ed. Juiz de Fora: Oesp Gráfica S.A, 2002.

FLORENCE, A. T; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

FUERTE, I; MIRANDA, A; MILLÁN, M; CARABALLO, I. Estimation of the percolation thresholds in acyclovir hydrophilic matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 64, p. 336-342, 2006.

GEORGE, M; ABRAHAM, E. T. Polyonic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and Chitosan- a review. *Journal of Controlled Release*. v.114, p.1-14, 2006.

GIAMMONA, G; PUGLISHI, G; CAVALLARO, G; SPADARO, A; PITARRESI, G. Chemical stability and bioavailability of acyclovir coupled to α,β -poly(N-2-hydroxyethyl)- DL-aspartamide. *Journal of Controlled Release*. v.33, p.261-271, 1995.

GINANI, M. F; NAVARRO, M. V; NASCIMENTO, E. G; OLIVEIRA, U.O.B. Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de géis de quitosana. *Química Nova*. v.22, p.801-804, 1999.

GLASSER, W.G; JAIN, R.K. Method of making ester-crosslinked chitosan support materials and products thereof. *Patente US 5874551*. 23 fevereiro, 1999.

GONÇALVES, V. L; LARANJEIRA, M.CM; FÁVERE, V; PEDROSA, R.C. Effect of cross linking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v.15, p.6-12, 2005.

GONG, Y; RAJ, K. M; LUSCOMBE, C.A; GADAWSKI, I; TAM, T; CHU, J; GIBSON, D; CARLSON, R; SACKS, S.L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*. v.64, p.127-130, 2004.

GONG, E; MATTHEWS, B; MCCARTHY T; CHU, J; HOLAN, G; RAFF, J; SACKS, S. Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*. v.68, p.139-146, 2005.

GRÖNING, R; BERNTGEN, M; GEORGARAKIS, M. Acyclovir serum concentrations following peroral administration of magnetic depot tablets and the influence of extracorporeal magnets to control gastrointestinal transit. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.46, p.285-291, 1998.

GUPTA, K.C; JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linked on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*. v.66, p.43-54, 2006.

GUYTON, A. C. *Fisiologia Humana*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992.

HAN, J; SURYANARAYANAN, R. A method for the rapid evaluation of the physical stability of pharmaceutical hydrates. *Thermochimica acta*. v.329, p.163-170, 1999.

HARTLINE, C. B; HARDEN, E. A; WILLIAMS-AZIZ, S. L; KUSHNER, N. L; BRIDEAU, R. J; KERN, E. R. Inhibition of herpesvirus replication by a series of 4-oxo-dihydroquinolines with viral polymerases activity. *Antiviral Research*. v.65, p.97-105, 2005.

HE, Y; YANG, H; WEN, R; LU, B. Sustained-release tablets of indomethacin-loaded microcapsules: Preparation, in vitro and in vivo characterization. *International Journal of Pharmaceutics*.v.333, p.87-94, 2007.

HEJAZI, R; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*. v.89, p.151-163, 2003.

HUIDORO, A.L; RUPÉREZ, F.J, BARBAS, C. LC methods for acyclovir and related impurities determination. *Journal of Pharmaceuthical and Biomedical Analysis*.v. 37, p. 687- 694, 2005.

ICH- *Internacional Conference on Harmonisation of Techical Requeriments for Registration of Pharmaceuthicals for Human Use: Guideline for the Industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products*, 2003.

ICH- *International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuthicals for Human Use: Q2(R1)-Validation of Analytical procedureds: text and methodology*, 2005.

INUKAI, Y; CHINEN, T; MATSUDA, T; KAIDA, YASUDA, S. Selective separation of germanium (IV) by 2,3- dihydroxypropyl chitosan resin. *Analytica Chimica acta*. v.371, p.187-193, 1998.

ITO, M; BAN, A; ISHIHARA, M. Anti- ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*. v.82, p. 218-225, 2000.

JALÓN, E. G; BLANCO-PRÍETO, M. J; YGARTUA, P; SANTOYO, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. *Journal of Controlled Release*. v.75, p.191-197, 2001.

JALÓN, E. G; BLANCO-PRÍETO, M. J; YGARTUA, P; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simples virus type 1 in cell

culture. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.56, p.183-187, 2003.

JAWOREK, A. Micro- and nanoparticle production by electrospraying. *Powder Technology*. v.176, p. 18-35, 2007.

JENSSEN, H; ANDERSEN, J. H; MANTZILAS, D; GUTTENBERG, T. J. A wide of medium-sized, highly cationic, α -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral Research*. v.64, p.119-126, 2004.

JIAGEN, L; LUO, L; ZHANG, Z. On-line galvanic generated electrochemiluminescence determination of acyclovir based on the flow injection sampling. *Analytical Chimica Acta*. v.510, p. 35-39, 2004.

KALINKOVA, G.N. Infrared spectroscopy in pharmacy. *Vibrational spectroscopy*, v. 19, 1999.

KAS, H.S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate system. *Journal of Microencapsulation*. v.14, p.689-711,1997.

KIM, D.G; YOUNG, J; CHOI, C; ROH, S.H; KANG, S.K, JANG, M.K; NAH, J.W. Retinol- encapsulated low molecular water –soluble chitosan nanoparticle. *International Journal of Pharmaceutics*.v.319, p.130-138, 2006.

KOROKOLVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. Edição 1999/2000. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KURITA, K. Controlled fictionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*. v. 26, p. 1921-1971, 2001.

LACHMAN, L; LIEBERMAN, H.A; KANING, J.L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste, 2001.

LAW, S.L; HUANG, K.J; CHIANG, C.H. Acyclovir-containing liposomes for potencial ocular delivery corneal penetration and absorption. *Journal of Controlled Release*. v.63, p.135-140, 2000.

LEUNER, C; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 50, 47-60, 2000.

LINTER, C. J. In: *Remington: the science and practice of pharmacy*. 19 ed. Easton: Mack Publishing, 1995.

LIESIENE, J; MATALIONIENE, J. Aplication of water-soluble diethylaminoethylcellulose in oral drug delivery. *Reactive & Funcional Polymeres*. v.59, p.185-191, 2004.

MACKAY, M; PHILLIPS, J; HASTEWEL, J. Peptide drug delivery: Colonic and rectal absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.28, p.253-257, 1997.

MANADAS, R; PINA. M.E; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.v.38, p.375-399, 2002.

MARONA, H.R.N; M.P.B. STORTI; V.A.L NETO. Flutamida: Revisão de suas propriedades farmacológicas e físico-químicas. Métodos de análise em formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 50, p. 37-44, 2004.

MELO, E; ALVES, P.M; SILVA, A.C; MALPIQUE, R;LAMEIRO, M.H. Encapsulation of adenoviral vectors into chitosan–bile salt microparticles for mucosal vaccination. *Journal of Biotechnology*.v.126, p.152-162, 2006.

MOFFAT, A.C; OSSELTON, M.D; WIDDOP, B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 3.ed. London – Chicago: Editora Pharmaceutical Analytical and Toxicological data. v.2, 2004.

NASCIMENTO, A; LARANJEIRA, M.C.M, FÁVERE, V.T; JOSUÉ. A. Impregnation and release of aspirin from chitosan/poly(acrylic acid) graft copolymer microspheres. *Journal of Microencapsulation*. v.18, p.679-684, 2001.

NETZ, P.A; ORTEGA, G. G. *Fundamentos de físico-química*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

PALMIERI, G. F; WHERLÉ, P; STAMM, A. Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled drug release. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 20, p.2859-2879, 1994.

PASTRANA, Y. C; RIVERA, A. B; ENRIQUE, T. E; CARABALLO, I. Caracterización farmacocinética de formulaciones orales de liberación sostenida. Factores que influyen en el perfil farmacocinético. *Acta Pharmaceutica Bonaerense*. v.19, p.25-34, 2000.

PATHER, S.I; RUSSEL, I; SYCE, J.A; NEAU, S.H. Sustained release theophylline tablets by direct compression Part 1: formulation and in vitro testing. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 164, p. 1-10, 1998.

PAVANETTO, F; GENTA, I; GIUNCHEDI, P; CONTI, B. Evaluation of spray-drying as a method for polylactide and polylactide -co- glycolide microspheres preparation. *Journal of Microencapsulation*. v.10, p.487-497, 1993.

PAVELIC, Z. P; SKALKO-BASNET, N; FILIPOVIC-GRCIC, J; MARTINAC, A; JALSENJAK, I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *Journal of Controlled Release*. v.106, p.34-43, 2005.

PEH, K.K; YUEN, K.H. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in human plasma using fluorescence detector. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*.v.693, p. 241-244 ,1997

PENG, X; ZHANG, L; KENNEDY, F.J. Release behavior of microspheres from cross-linked N-methylated chitosan encapsulated ofloxacin. *Carbohydrate Polymers*.v.65, p.288-295, 2006.

RAMAKRISHNA, A.B; BANSAL, Y.K; RAO, A.R.M; GANDHI, T.P. Rapid, simple and sensitive high performance liquid chromatographic method for detection and determination of acyclovir in human plasma and its use in bioavailability. *Journal of Chromatography B: Biomedical. Sciences and Applications*. v.739, p.231-237, 2000.

RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4^a Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

RATTES, A. L. R; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology*.v.171, p.7-14, 2007.

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

RIBAS, R.V.; RIZZUTTO, M.A *Laboratório de Estrutura da Matéria II; Difração de Raios-X 2 e Elétrons*, Ed. IF-USP, São Paulo, 1996.

RITGER, P. L; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*. v.5, p. 23-36, 1987.

ROKHADE, A. P; PATIL, S. A; AMINABHAVI, T. M. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. *Carbohydrate Polymers*. v. 67, p.605-613, 2007.

ROSSEL, C. V; CARRENÕ, J. S; BAEZA, M.R; ALDERETE, J.B. Inclusion complex of the antiviral drug acyclovir with cyclodextrin in aqueous solution and in solid phase. *Química Nova*. v.23, p. 749-752, 2000.

SANCHO, C. M; VANRELL, R. H; NEGRO, S. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of acyclovir: influence of fatty and non- fatty additives . *Journal of Microencapsulation*. v. 20, p.799-810, 2003.

SANDRI, G; ROSSI, S; FERRARI, F; BONFERONI, M. C; MUZZARELLI, C; CARAMELLA, C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.21, p.351-359, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R; GUTERRES, S. S; FREITAS, L. L; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nonoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. v.26, p.726-737, 2003.

SERGERIE, Y; BOIVIN, G. Hydroxyurea enhances the activity of acyclovir and cidofovir against herpes simplex virus type 1 resistant strains harboring mutations in the thymidine kinase and/or the DNA polymerase genes *Antiviral Research*. v. 77, p. 77-80, 2008.

SHARGEL, L; ANDY, Y. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. Publisher: Mc. Graw-Hill, United States of America, 2004.

SHU, B; YU, W; ZHAO, Y; LIU, X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*. v. 76, p.664-669, 2006.

SILVA, C; RIBEIRO, A; FERREIRA, D; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.v.39, p. 1-30, 2003.

SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F;X; KIEMLE, D. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Guanabara. Rio de Janeiro. 2005.

SINHA, V. R; SINGLA, A. K; WADHAWAN, S; KAUSHIK, R; KUMRIA, R; BANSAL, K; DAHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carries for dugs. *International Journal of Pharmaceutics*. v.274, p.1-33, 2004.

SINHA, V.R; THEHAN, M.A; KUMAR, M; SINGH, S; BHINGE, J.R. Stress studies on acyclovir. *Journal of Chromatographic Science*.v.45, p.319 -324, 2007.

SNOECK, R. Antiviral therapy research of herpes simplex. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.16, p.157-159, 2000.

SPEAR, P.G; MANOJ, S; YOON, M; JOGGER, C.R; ZAGO, A; NYCSCOFISKY, D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology*. v.344, p.17-24, 2006.

STORPIRTS, S; OLIVEIRA, P. G; RODRIGUES, D; MARANHO, D. C. Considerações biofarmacêuticas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.35, n.1, p.1-11, 1999.

STULZER H.K.; SILVA M.A.S. Estudo de Estabilidade de Grânulos Revestidos e Comprimidos contendo Captopril. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v. 25, p. 497-504, 2006.

STULZER, H;K; SILVA, .M.A.S. Desenvolvimento e Avaliação de Comprimidos de Captopril de Liberação Prolongada. *Latin American Journal of Pharmacy*. v.26, p. 25-264, 2007.

TAKAHASHI, T; IMAI, M; SUZUKI, I. Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. *Biochemical Engineering Journal*. v.36, p.43-48, 2007.

TALLURY, P; ALIMOHAMMADI, N; KALACHANDRA, S. Poly (ethylene-co-vinylacetate) copolymer matrix for delivery of chlorhexidine and acyclovir drugs for use in the oral environment: Effect of drug combination, copolymer composition and coating on the drug release rate. *Dental Materials*. v.23, p.404-409, 2007.

TALLURY, P; AIRRABEELLI, R; LI, J; PAQUETTE, D; KALACHANDRA, S. Release of antimicrobial and antiviral drugs from methacrylate copolymer system: Effect of copolymer molecular weight and drug loading on drug release. *Dental Materials*. v.24, p.274-280, 2008.

TORRES, M. A; VIEIRA, R. S; BEOOU, M. M; SANTANA, C. S. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v.15, p.306-312, 2005.

TRISSEL, L. A. *Trissel's stability of compounded formulations*. 2 ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

USP 30- *The United States Pharmacopeia*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VALGAS, S; GONÇALVES, V; PEDROZA, R.C; FÁVERE, V.T, LARANJEIRA, M.C. Malonylchitosan microspheres as a matrix for oral enrofloxacin delivery. *Macromolecular Symposia*. v. 229, p.246-252, 2005.

VANDELLI, M. A; TOSI, G; RUOZI, B; LEO, E. PLA-microparticles formulated by means a thermoreversible gel able to modify protein encapsulation and release without being co-encapsulated. *International Journal of Pharmaceutics*.v.323, p.131-138, 2006.

VARELLA, B.R; PIRES, I.L; SARAIVA, C.A; GUIMARÃES, A.C.C; GUIMARÃES, M.A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. *Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial*. v.41, p.257-262, 2005.

VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. A.; Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic,. v. 6, p. 47-69. 1991.

WENDEL, S; ÇELIK, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de spray- drying. *Pharmaceutical Technology*. v.2, p. 31-45, 1998.

WHITE, D.O; FENNER, F.J. *Medical Virology*. 4th.ed. San Diego: Academic, 1994.

YANG, C. H; HUANG, K. S; LIN, P. W; LIN, Y. C. Using a cross-flow microfluidic chip and external crosslinking reaction for monodisperse TPP-chitosan microparticle. *Sensors and actuators B: Chemical*. V. 124, p.510-516, 2007.

ZHANG, F; WU, Q; CHEN, Z.C; ZHANG, M; LIN, X.F. Hepatic-targeting microcapsules construction by self-assembly of bioactive galactose-branched polyelectrolyte for controlled drug release system. *Journal of Colloid and Interface Science*.v.317, p.477-484, 2008.

ZOLNIK, B.S; BURGESS, D.J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *Journal of Controlled Release*. v. 122, p. 338-344, 2007.

Anexo I

Anexo II

Anexo III

I - Introdução

Doenças infecciosas virais são um importante problema de saúde no mundo. Embora a busca por novos fármacos antivirais seja intensa, os avanços são poucos, já que a maioria destes compostos possui aplicações limitadas, fazendo com que um baixo número deles seja aprovado pelas autoridades governamentais para uso clínico (VLIETINCK e VANDEN, 1991; BARREIRO e FRAGA, 2002).

O aumento do número de pacientes imunocomprometidos e da sobrevivência dos mesmos tem implicado no desenvolvimento de infecções virais nesses pacientes. Além disso, o intenso uso de medicamentos antivirais conduziu ao desenvolvimento de cepas resistentes, as quais são agora comumente disseminadas, agravando-se ainda mais o problema (SNOECK, 2000). Na última década a incidência e a severidade das infecções causadas pelo vírus do Herpes Simplex apresentaram um elevado crescimento, em decorrência do aumento do número de pacientes imunocomprometidos, quimioterapias, transplantes e a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (SNOECK, 2000; JALÓN et al., 2003).

O vírus Herpes Simplex (HSV) é membro da extensa e heterogênea família Herpesviridae, composta por inúmeros patógenos animais e humanos, como Citomegalovírus (CMV), Epstein-Barr (EBV) e Varicela-Zoster (VZV). O HSV é dividido em dois sorotipos, HSV-1 e HSV-2, responsáveis pelos herpes labial e genital, respectivamente. O vírus tem como característica biológica o rápido crescimento em cultivo celular, uma ampla gama de hospedeiros e a capacidade, comum a todos os herpesvírus, de se manter latente em células de seus hospedeiros por tempo indeterminado (COLLINS e ELLIS, 1999; BOIVIN, 2004).

O aciclovir, um análogo sintético da 2'-desoxiguanosina, é o mais efetivo e seletivo agente contra os vírus do grupo da herpes existente na atualidade, é considerado o tratamento de escolha para as infecções causadas pelo HSV, devido à sua alta seletividade pelo vírus herpéticos e baixa citotoxicidade às células do hospedeiro. Este é particularmente ativo contra herpes labial e herpes genital, que são infecções virais comuns em seres humanos (GIAMMONA et al., 1995; ROSSEL et al., 2000).

O aciclovir apresenta absorção limitada quando administrado por via oral, devido à sua baixa solubilidade em água, às características da estrutura molecular e ao curto tempo de meia-vida biológica (1-2 horas) (RANG; DALE; RITTER, 2001). Assim, são necessárias administrações freqüentes para manter a concentração plasmática do fármaco em níveis terapêuticos. A freqüência de administração, aliada ao tempo de tratamento (10 dias ou mais) é a principal causa da não adesão ao tratamento.

Fármacos com estas características são bons candidatos para o desenvolvimento de formulações que proporcionem liberação contínua do mesmo ao longo do trato gastrointestinal. O desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos com esta característica vem sendo demonstrado extensivamente na literatura farmacêutica, devido aos benefícios terapêuticos e farmacológicos em relação às formas farmacêuticas convencionais (PASTRANA et al., 2000; LIESIENE e MATALIONIENE, 2004).

Entre as diferentes estratégias disponíveis para alcançar um controle na liberação de fármacos estão os sistemas microparticulados. A microencapsulação de fármacos é uma técnica que, como o nome sugere, envolve a encapsulação de pequenas partículas do fármaco ou solução do fármaco, num revestimento polimérico (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

A quitosana é um polímero natural, biodegradável e atóxico. Devido às suas características tem se tornado um material potencialmente atraente para diversos usos, principalmente na área farmacêutica. Este polissacarídeo vem sendo usado como sistema polimérico na liberação de fármacos de diversas classes terapêuticas, tais como, antibióticos, antiinflamatórios, antihipertensivos, bem como, peptídeos, proteínas e vacinas. Salienta-se, ainda, que a quitosana e seus derivados apresentam algumas vantagens importantes com relação às atividades farmacológicas, atuando como antiácido e antiúlcera, protegendo a mucosa gástrica e inibindo a adesão das bactérias nas células epiteliais bucais e vaginais (ITO; BAM; ISHIRAHA, 2000; SINHA et al., 2004).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de sistemas poliméricos microparticulados contendo quitosana, a fim de promover uma liberação modificada do antiviral, aciclovir.

II- Revisão de Literatura

2.1 Herpesvírus

Os herpesvírus causam uma larga variedade de doenças humanas que variam desde herpes labial e genital, encefalites e infecções congênitas a doenças linfoproliferativas. Os principais pacientes acometidos destas patologias são os imunocomprometidos, transplantados, portadores de câncer e HIV positivos (SNOECK, 2000; HARTLINE et al., 2005).

Os vírus da família Herpesviridae (herpéticos), são altamente disseminados na natureza. Aproximadamente 100 vírus desta família foram identificados, sendo que oito podem infectar o homem (Tabela 1) (DA SILVA, 2000):

Tabela 1: Vírus herpéticos humanos

Gênero	Nome Oficial	Nome comum	Sigla
α -Herpesviridae			
Herpes simples 1	Herpesvírus humano 1	Vírus Herpes Simplex tipo 1	HSV-1
Herpes simples 2	Herpesvírus humano 2	Vírus Herpes Simplex tipo 2	HSV-2
Varicela Zoster	Herpesvírus humano 3	Vírus da Varicela Zoster	VZV
B -Herpesviridae			
Citomegalovírus	Herpesvírus humano 5	Citomegalovírus	CMV
Reseolovírus	Herpesvírus humano 6	Vírus Herpes Humano tipo 6	HHV-6
	Herpesvírus humano 7	Vírus Herpes Humano tipo 7	HHV-7
γ -Herpesviridae			
Epstein-Barr	Herpesvírus humano 4	Vírus Epstein -Barr	EBV
	Herpesvírus humano 8	Vírus Herpes Humano tipo 8	HHV -8

Fonte: DA SILVA (2000).

Os α -herpesvírus, Herpes Simplex vírus tipos 1 e 2 (HSV-1 e 2), comumente causam lesões herpéticas faciais e genitais, respectivamente, sendo que ambos causam infecções recorrentes (GONG et al., 2004; JENSSEN et al., 2004).

Os HSV são dois vírus da família dos herpesvírus, com genoma de DNA bicatenar (dupla hélice) que se multiplicam no núcleo da célula-hóspede, produzindo cerca de 90 proteínas víricas em grandes quantidades. Estes, apresentam capsídeo

icosaédrico e envelope bilipídico, com a propriedade de infectar alguns tipos de células de forma destrutiva e outras de forma latente. Os HSV-1 e HSV-2 são destrutivos nas células epiteliais e nos fibroblastos e latentes nos neurônios, onde podem ser reativados de acordo com a fragilidade do indivíduo (WHITE e FENNER, 1994).

Os HSV-1 e HSV-2 são muito semelhantes, porém apresentam algumas diferenças significativas. O HSV-1 tem características que o levam a ser particularmente infeccioso e virulento para as células da mucosa oral. O HSV-2 tem características de maior virulência e infecciosidade para a mucosa genital. No entanto, o HSV-1 também pode causar herpes genital e o HSV-2 herpes bucal (GONG et al., 2005).

2.1.1 Epidemiologia

O HSV produz pandemias sem precedentes, disseminando-se por todo mundo. Estudos soroepidemiológicos confirmam que mais de 90 % da população, em geral na quarta década da vida, possui anticorpos séricos contra pelo menos uma das cepas do HSV, ainda que possa não apresentar sintomas (BRADY e BERNSTEIN, 2004; SPEAR et al., 2006). Nos Estados Unidos 16 - 35 % e 40 -80% da população é soropositivo para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente. O vírus da Varicela Zoster – VZV afeta 90 % da população adulta (CASSADY e WHITLEY, 1997). O herpes genital é considerado a doença sexualmente transmissível (DST) que mais afeta as pessoas, acredita-se que milhões de indivíduos estão infectadas com DST, incluindo o HSV (GONG et al., 2005).

2.1.2 Transmissão do vírus

A transmissão do HSV ocorre através das superfícies mucosas ou das soluções de continuidade da pele. Os principais sítios incluem a mucosa oral, ocular, genital e anal. O HSV-2 tem como via preponderante de contágio a relação sexual ou canal do parto, em gestantes infectadas (GONG et al., 2004; JENSSEN et al., 2004).

2.1.3 Latência viral

O HSV apresenta tropismo por ceratinócitos e neurônios. Os ceratinócitos são altamente permissíveis a replicação viral, enquanto, os neurônios não apresentam elevada permissibilidade. O vírus, curiosamente, beneficia-se ao infectar as células imunes ao seu efeito citopático. Devido aos mesmos não poderem destruí-las, acabam integrando-se ao DNA celular e como resultado final ocorre o estabelecimento da infecção latente (JENSSEN et al., 2004; SERGERIE e BOIVIN, 2008).

A latência persiste até que ocorra qualquer alteração estrutural na célula infectada, tal como injúria ou diferenciação celular. Esses fatos podem estar relacionados à alteração de não-permissibilidade da célula. Os fatores capazes de estimular a reativação viral são variados, com destaque para imunodepressão, alterações hormonais, radiação ultravioleta e lesão traumática do nervo acometido. A latência viral nos gânglios pode ser afetada pela presença de neurotransmissores envolvidos nos estados de ansiedade, depressão e distúrbios comportamentais, também comuns nas recorrências (JENSSEN et al., 2004; VARELLA et al., 2005; SPEAR et al., 2006; SERGERIE e BOIVIN, 2008).

2.1.4 Progressão e sintomas

Após infecção da mucosa, o vírus multiplica-se produzindo os característicos exantemas (manchas vermelhas inflamatórias) e vesículas (bolhas) dolorosas. As vesículas contêm líquido rico em *virions* e a sua ruptura junto à mucosa de outro indivíduo é uma forma de transmissão, contudo também existem vírus nas secreções vaginais e peniana ou na saliva. Porém, estas desaparecem e reaparecem sem deixar quaisquer marcas ou cicatrizes, é possível que ambos os vírus e ambas as formas coexistam num só indivíduo (SPEAR et al., 2006).

Os episódios agudos secundários são sempre de menor intensidade que o inicial, devido aos linfócitos memória, contudo a doença permanece para toda a vida, ainda que os episódios se tornem menos frequentes. Muitas infecções e

recorrências são assintomáticas. Não há vacina nem tratamento definitivo, apesar de alguns fármacos especialmente acicloguanosinas como o aciclovir poderem reduzir os sintomas e o perigo de complicações como a encefalite (BRADY e BERNESTEIN, 2004).

2.2 Aciclovir

A era da terapia antiviral seletiva eficaz começou com o aciclovir. Este composto é um derivado da guanosina, com alta especificidade pelo vírus da Herpes Simplex e Varicela-Zoster, sendo considerado o medicamento de escolha para o tratamento destas patologias (SNOECK, 2000; RANG; DALE; RITTER, 2001).

2.2.1 Características Físico-Químicas

O aciclovir (Figura 1) (DE CLERCQ et al., 2001) (2-amino 1,9 -dihidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purina-6-ona), apresenta-se sob a forma de um pó cristalino branco, muito pouco solúvel em água, insolúvel em álcool e ligeiramente solúvel em solução de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007). Em relação a constante de dissociação (pka) apresenta dois valores; 2,3 e 9,2.

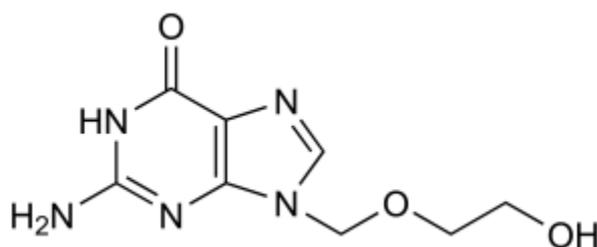


Figura 1. Estrutura química do aciclovir

2.2.2 Mecanismo de ação

O aciclovir é convertido em monofosfato pela timidina quinase e, felizmente, a forma específica viral dessa enzima é muito mais eficaz na fosforilação do que a enzima da célula do hospedeiro. Por conseguinte, é apenas adequadamente ativada

nas células infectadas, e as quinases das células do hospedeiro convertem então o monofosfato em trifosfato. O trifosfato de aciclovir é o inibidor da DNA polimerase viral, terminando a cadeia de nucleotídeos (Figura 2). Este fármaco apresenta uma potência 30 vezes maior contra a enzima do herpes vírus em comparação com a enzima do hospedeiro (RANG; DALE; RITTER, 2001).

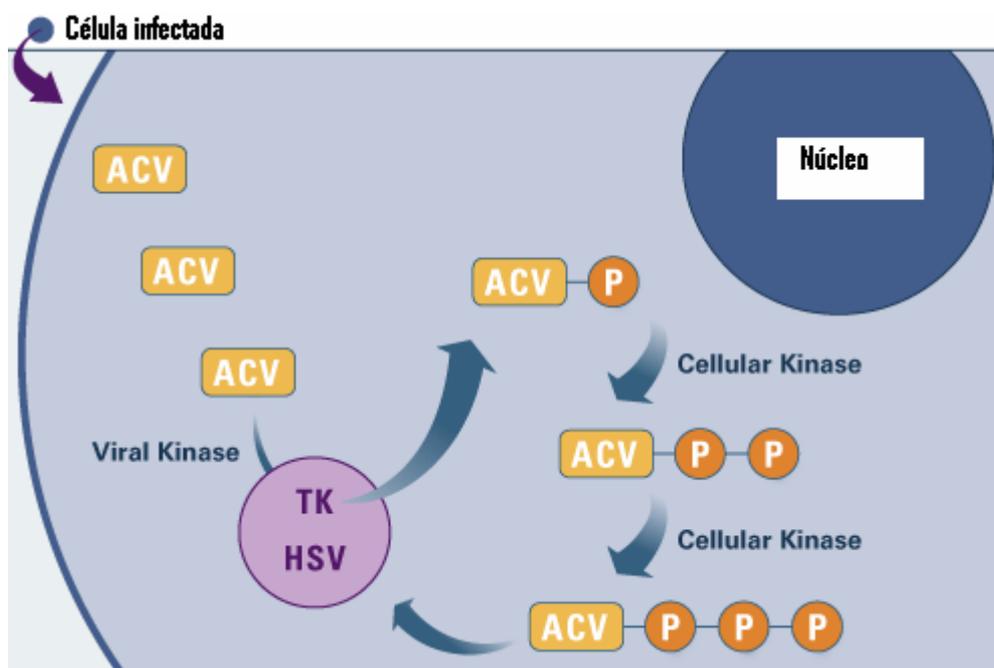


Figura 2. Esquema representativo do mecanismo de ação do aciclovir

2.2.3 Aspectos farmacocinéticos

Quando administrado por via oral, apenas 20 % da dose são absorvidos no trato gastrintestinal e as concentrações plasmáticas máximas são atingidas em 1-2 horas. O fármaco exibe ampla distribuição, alcançando concentrações no LCR (líquido cefalorraquidiano) que correspondem a 50 % das concentrações plasmáticas. O aciclovir é excretado pelos rins, uma parte por filtração glomerular e outra por secreção tubular (RANG; DALE; RITTER, 2001).

2.2.4 Concentração usual

Para adultos por via oral, a dose é de 200 mg quatro vezes ao dia durante 10 dias. Por via intravenosa, 5 mg/Kg a cada 8 horas durante 5 a 7 dias. Para o tratamento de encefalite causada por Herpes Simplex, 10 mg/Kg a cada 8 horas. Por via tópica, a aplicação do creme deve ser a cada 3 horas, seis vezes ao dia durante sete dias (KOROLKOVAS, 2000).

2.2.5 Efeitos adversos

Algumas pessoas podem apresentar reações alérgicas, porém estas são raras. Existem relatos de inchaço, especialmente dos lábios, face ou pálpebras, brotoejas ou manchas. Pode ocorrer ainda, inflamação local durante a injeção intravenosa se houver extravasamento da solução, bem como disfunção renal, embora a infusão lenta reduza esse risco. Náuseas, cefaléia e raramente encefalopatia também foram descritos (KOROLKOVAS, 2000).

2.2.6 Formulações disponíveis no mercado

No mercado farmacêutico está disponível na forma de comprimidos e cápsulas de liberação imediata, pó para suspensão oral, creme, pomada oftálmica e pó liofilizado para administração endovenosa, sendo Zovirax® o nome comercial do medicamento de referência produzido pelo laboratório GlaxoSmithKline (KOROLKOVAS, 2000).

2.3 Biopolímero Quitosana

A quitosana é um aminopolissacarídeo biodegradável, hidrofílico, não tóxico e biocompatível, obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, um polímero encontrado em carapaças de crustáceos, cutículas de insetos e parede celular de alguns fungos. Em relação a sua estrutura química é considerada um copolímero,

formado por unidades de β -(1,4) 2 - amino 2-desoxi-D - glicose e β -(1,4) 2 - acetamido- 2- desoxi -D- glicose com a presença de grupos amino e grupos hidroxila primário e secundário (Figura 3). Sua obtenção comercial é principalmente proveniente de cascas de camarão e caranguejo (TORRES et al., 2005; TAKAHASHI; IMAI; SUZUKI, 2007).

Durante o processo de desacetilação da quitina, os grupos acetamido são transformados parcialmente em grupos amino ($-NH_2$) ao longo da cadeia polimérica, este processo ocorre através de reações de hidrólise ácida ou básica (KURITA, 2001; EINBU; GRADALEN; VARUM, 2007).

Este biopolímero é caracterizado como uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos, porém, é solúvel em soluções ácidas diluídas ($pH < 6,5$), onde ocorre a conversão das unidades glicosaminas para forma solúvel $R-NH_3^+$. Em contato com soluções alcalinas ou com poliânions sofre precipitação. Além disso, apresenta ainda a capacidade de formar gel em baixos valores de pH. Comercialmente está disponível na forma de flocos secos, solução e pó fino. O seu peso molecular varia em média entre 3.800 e 2.000.000 Dalton e o grau de desacetilação de 66 a 95 %. Estes parâmetros, acrescidos do tamanho de partícula, densidade e viscosidade são considerados importantes fatores que influenciam nas propriedades das formulações farmacêuticas (SINHA et al., 2004).

As vantagens deste biopolímero em relação aos outros polissacarídeos são devido a sua não toxicidade e biodegradabilidade. Por estas propriedades, a quitosana tem sido usada como matriz de micropartículas e sistemas reticulados para imobilização e liberação de fármacos (NASCIMENTO et al., 2001; HEJAZI e AMIJI, 2003; GONÇALVES et al., 2005).

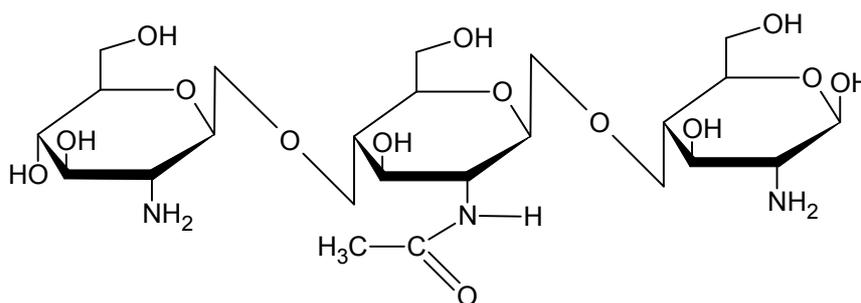


Figura 3. Estrutura química do copolímero quitosana

Uma importante característica da quitosana está na possibilidade de modificações estruturais, de modo a obter diversas formas de interação química e resistência mecânica. Essas interações químicas podem ser obtidas através de diferentes rotas, entre elas o uso de agentes reticulantes. A reticulação é uma modificação química que pode ser feita pela reação do polímero com diferentes substâncias, por exemplo, a reação dos grupos amino com glutaraldeído leva a formação de iminas (Figura 4) (TORRES et al., 2005; GEORGE e ABRAHAM, 2006). O tripolifosfato de sódio (TPP) também é usado como agente reticulante na preparação de micropartículas de quitosana. Este apresenta grupos O^- que são reativos, sendo atraído pelos grupamentos NH_3^+ da molécula de quitosana, ocorrendo assim, um entrelaçamento cruzado e aproximação entre essas duas substâncias através de uma reticulação iônica, conforme representado na Figura 5 (YANG et al., 2007).

O aumento do grau de reticulação leva a um aumento de obstáculos à difusão do fármaco, ou seja, as pontes de reticulação aproximam as cadeias macromoleculares e diminuem a sua mobilidade, provocando assim uma redução da área efetiva de difusão (GUPTA e JABRAIL, 2006).

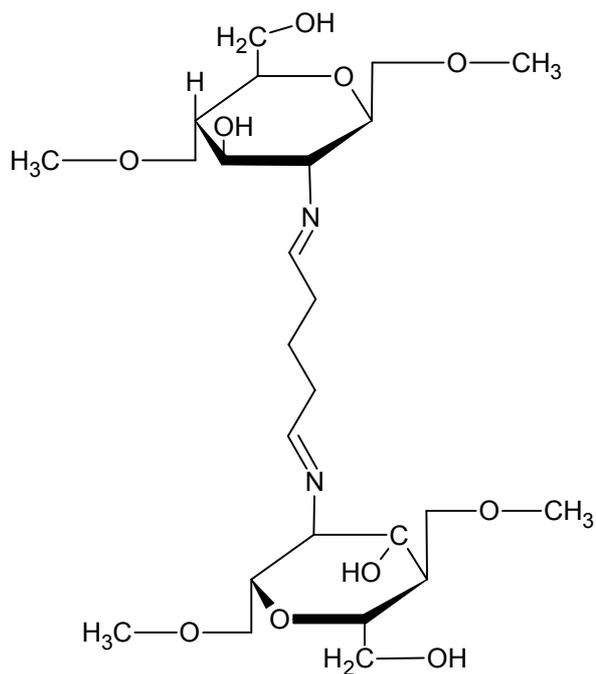


Figura 4. Figura representativa da reticulação entre a quitosana e o glutaraldeído

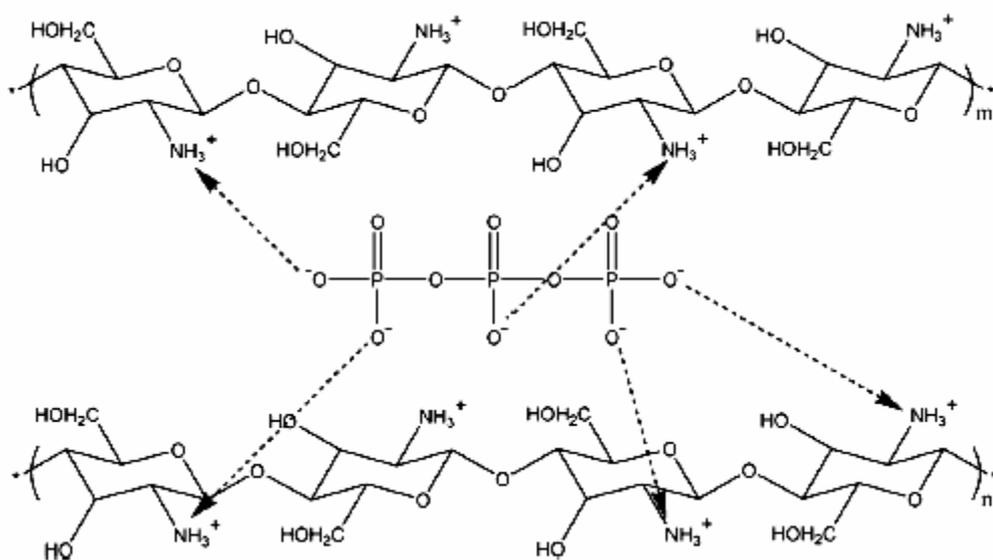


Figura 5. Figura representativa da reticulação entre a quitosana e o tripolifosfato

Outra interessante possibilidade de modificação estrutural da quitosana é a sua funcionalização química, através da introdução na matriz polimérica de grupos funcionais adicionais. Recentemente a reação de amidação da quitosana com ácido malônico, introduzindo grupos amida e carboxilato, resultou na malonilquitosana, a qual foi utilizada na forma de microesferas como sistema de liberação da enrofloxacina, um fármaco de uso exclusivo da medicina veterinária (VALGAS et al., 2005).

Devido à sua natureza policatiônica, quando a quitosana entra em contato com soluções ácidas é possível a sua moldabilidade nas mais diversas formas como, membranas, esferas, géis, microesferas, entre outros (TORRES et al., 2005).

2.4 Sistemas Microparticulados

2.4.1 Aspectos Gerais

A microencapsulação tem sido foco de inúmeras pesquisas na área farmacêutica nos últimos anos, envolvendo diferentes objetivos, entre eles a obtenção de produtos de liberação modificada. Esta técnica é considerada um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver sólidos, líquidos ou gases, isolando-os e protegendo-os das condições ambientais como luz, ar e umidade. Ainda, permite converter líquidos em sólidos, modificando as propriedades do colóide ou da superfície dos materiais, contribuindo para o controle de liberação de fármacos e sua biodisponibilidade. A incorporação de fármacos nestes sistemas pode ser definida como um processo pelo qual se envolvem quantidades pequenas de uma substância farmacologicamente ativa com um filme polimérico (RÉ, 1998; PENG; ZHANG; KENNEDY, 2006).

Os termos micropartículas e microcápsulas referem-se a dois tipos de estruturas distintas (Figura 6). As microcápsulas são partículas normalmente esféricas, se estiverem carregando um líquido ou um gás, ou de outro formato se carregarem partículas sólidas ou semi-sólidas, já que constituem um sistema tipo reservatório. O material microencapsulado é chamado de núcleo ou fase interna

enquanto a fase externa é também conhecida como parede, revestimento ou membrana. Denomina-se microesferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso no interior da matriz polimérica ou cerosa, formando um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. O material polimérico forma uma rede tridimensional, onde o fármaco pode ser adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à superfície da partícula, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos. As partículas com tamanho entre 10 e 1000 nm (1 μm) são consideradas nanopartículas, enquanto que partículas maiores que 1 μm são denominadas micropartículas (BRESOLIN e FILHO, 2003).

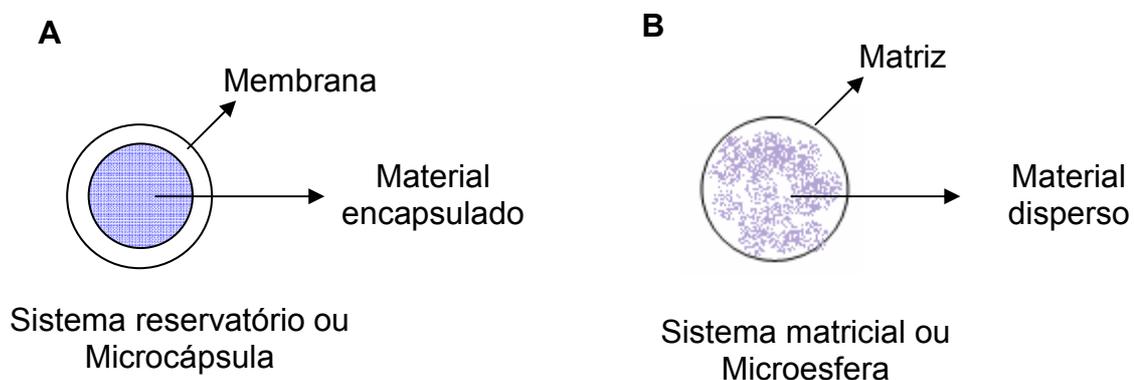


Figura 6. Estrutura dos sistemas obtidos por microencapsulação

2.4.2 Métodos de preparação

Muitos métodos foram propostos para produção de micropartículas, dependendo da solubilidade do núcleo e do polímero, tamanho de partícula, permeabilidade e espessura da parede, propriedades físicas, tipo e taxa de liberação e custo de produção (BRESOLIN e FILHO, 2003; ANAL e SINGH, 2007; JAWOREK, 2007). O método ideal de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido, fácil de transpor à escala industrial e deve ser pouco dependente das características de solubilidade do fármaco e polímero (SILVA et al., 2003).

Para promover a formação de micropartículas, tanto para aplicação em alimentos, como em cosméticos e liberação de fármacos, existem métodos químicos, físicos (mecânicos) e físico-químicos. Entre os métodos químicos utilizados destacam-se a inclusão molecular, que corresponde à encapsulação de certas moléculas por outras e a polimerização interfacial. Pode-se citar ainda a policondensação interfacial e a polimerização em meio disperso (CONSTANT e STRINGHETA, 2002; JAWOREK, 2007).

Como métodos físico-químicos citam-se a separação de fases ou a coacervação simples e complexa, a evaporação-extração de solvente, a gelificação térmica de emulsões e o envolvimento lipossômico. Estes métodos, de forma geral, transformam substâncias inicialmente solúveis, tais como polímeros e ceras, em materiais insolúveis no mesmo meio (PAVANETTO et al., 1993).

A coacervação ou separação de fases consiste na obtenção a partir de uma solução contendo uma macromolécula dispersa, de duas fases líquidas imiscíveis, uma fase de coacervado, em que a macromolécula está presente em elevada concentração e uma fase de equilíbrio, em que a mesma está em baixa concentração. Quando está presente uma única macromolécula este processo é designado por coacervação simples e quando estão presentes duas ou mais moléculas de carga oposta é referido como coacervação complexa. A coacervação simples é induzida por uma alteração de condições que causam a dessolvatação da macromolécula, como a adição de um não-solvente, a adição de micro-íons ou alterações da temperatura, que promovem as interações macromolécula-macromolécula em detrimento das interações macromolécula-solvente. A coacervação complexa é induzida através da criação de forças eletrostáticas entre as macromoléculas (PAVANETTO et al., 1993; SILVA et al., 2003).

Dentro os processos físicos citam-se o revestimento por extrusão, com diversas modalidades, e mais recentemente a coextrusão/esferonização e nebulização por *spray-drying* (CONSTANT e STRINGHETA, 2002; JAWOREK, 2007). Esta tecnologia é utilizada em diversos segmentos industriais, incluindo o

farmacêutico. Embora seja uma técnica de elevado custo, que necessita de investimentos em instalações e operações, muitas são as razões pelas quais a mesma é amplamente utilizada apesar do custo. Estas vantagens incluem a produção de partículas de qualidade consistente, a facilidade em relação ao uso contínuo, a aplicabilidade da técnica em materiais tanto sensíveis quanto resistentes ao aquecimento e a capacidade de processar vários tipos de matérias-primas (PALMIERI; WHERLÉ; STAMM, 1994; DANGPRASIRT e RITTHIDEJ, 1995; WENDEL e ÇELIK, 1998; RATTES e OLIVEIRA, 2007).

No método de atomização por *spray-drying* (Figura 7) o fármaco é incorporado juntamente ao material revestidor previamente solubilizado ou fundido. A solução resultante é atomizada em um compartimento que recebe um fluxo de ar quente. A rápida evaporação da água permite manter baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não afete demasiadamente o produto (BROADHEAD; ROUAN; RHODES, 1992; BERMAN; PIERCE; PAGE, 1994; SHU et al., 2006).

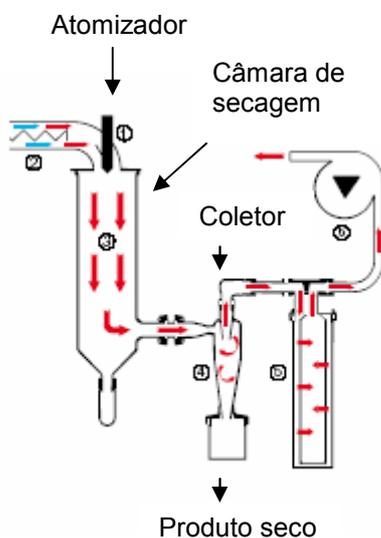


Figura 7. Desenho esquemático do *spray-dryer*

2.4.3 Aplicação das micropartículas

Na área farmacêutica as aplicações das micropartículas são extensas, sendo empregadas para mascarar sabores ou odores, converter líquidos em sólidos e a proteção em relação aos agentes atmosféricos (umidade, luz, calor e/ou oxidação), proporcionando um aumento da estabilidade (DAVIES, 2001; BRESOLIN e FILHO, 2003; SILVA et al., 2003).

Outras aplicações incluem a redução ou eliminação da irritação gástrica ou efeitos secundários provocados por alguns fármacos, a redução da volatilidade, a administração de fármacos incompatíveis, o melhoramento das características de escoamento de pós, a facilitação do manuseio de substâncias tóxicas, o auxílio à dispersão de substâncias insolúveis em água em meios aquosos e a produção de formas farmacêuticas de liberação modificada (DAVIES, 2001; BRESOLIN e FILHO, 2003; SILVA et al., 2003).

2.4.4 Vias de administração de produtos microparticulados

As vias para administração destes produtos são as mais variadas possíveis, dependendo do alvo terapêutico desejado. As microcápsulas podem ser administradas via parenteral ou implantadas. Pela via oral, fármacos microencapsulados são geralmente administrados por meio de cápsulas de gelatina dura, que podem também receber revestimento entérico ou, alternativamente, em suspensões estáveis, eventualmente incluídas em cápsulas moles. As vias nasal e ocular são também de interesse para o uso de micropartículas (BRESOLIN e FILHO, 2003; MELO et al., 2006; VANDELLI et al., 2006; BODMEIER e KRANZ, 2007; HE et al., 2007; DONG; MAINCENT; BODMEIER, 2007).

2.5 Liberação modificada

2.5.1 Considerações gerais

Alguns sistemas de liberação de fármacos destinam-se a liberar o fármaco no organismo de modo que seja absorvido com rapidez e completamente, enquanto outros devem liberar o princípio ativo lentamente para que a ação do fármaco seja prolongada (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Cada sistema de liberação objetiva eliminar as mudanças cíclicas na concentração de fármaco no plasma, observada após a administração de um sistema de liberação convencional. Assim uma variedade de expressões são utilizadas para descrever esses sistemas de liberação modificada (AULTON, 2005):

- Liberação retardada: indica que o fármaco não é liberado imediatamente após a administração, mas um tempo depois, por exemplo, comprimidos com revestimento entérico e cápsulas de liberação pulsátil;
- Liberação repetida: indica que uma dose individual é liberada regularmente logo após a administração, e uma segunda ou terceira doses são subsequentemente liberadas;
- Liberação prolongada: indica que o fármaco é disponibilizado para absorção por um período de tempo mais prolongado do que a partir de uma forma farmacêutica convencional;
- Liberação sustentada: indica uma liberação inicial de fármaco, suficiente para disponibilizar a dose terapêutica logo após a administração, a qual é seguida de uma liberação gradual do fármaco, por um período de tempo estendido;
- Liberação estendida (LE): refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco lentamente de modo a manter as concentrações plasmáticas no nível

terapêutico, por um período prolongado de tempo (em geral, entre 8 e 12 horas);

- Liberação controlada (LC): refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco em uma velocidade constante e fornecem concentrações plasmáticas que permanecem invariáveis com o tempo;
- Liberação modificada (LM): refere-se a formas farmacêuticas definidas pela USP (United States Pharmacopeia), nas quais as características de curso e/ou localização de liberação de fármacos são escolhidas para satisfazer objetivos terapêuticos ou de conveniência não oferecidos pelas formas convencionais, entretanto uma forma farmacêutica de liberação estendida (LE) permite uma dupla redução da frequência de doses. É interessante salientar que a USP considera os termos, liberação controlada, liberação prolongada e liberação sustentada intercambiáveis com o termo liberação estendida.

A maioria dos sistemas de liberação modificada (Figura 8) é elaborada de modo que a administração de uma só unidade de dose proporcione a liberação imediata de uma quantidade de fármaco que prontamente produz o efeito terapêutico desejado, e a liberação gradual contínua de quantidades adicionais para manter esse nível de efeito durante um período prolongado. Nestes sistemas, o planejamento baseia-se nas características peculiares de cada fármaco, pois o que pode ser efetivo para um fármaco pode não ser eficiente para outro, considerando as características físicas, químicas e biológicas de cada um. Para manter o nível constante de fármaco no organismo, este deve ser liberado em velocidade que substitua a quantidade que foi metabolizada e excretada (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

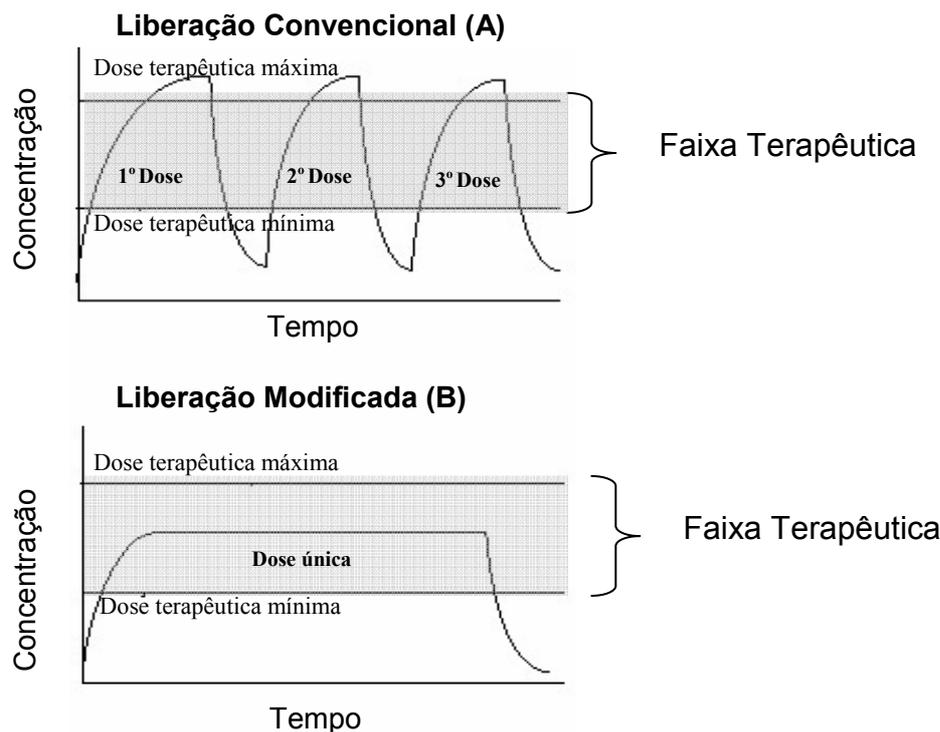


Figura 8. Cedência do fármaco de uma forma farmacêutica de liberação convencional (A) e liberação modificada (B)

2.5.2 Vantagens terapêuticas

Estas formulações apresentam grandes vantagens quando comparadas às formas farmacêuticas de liberação convencional, como por exemplo, a frequência da administração é reduzida e a adesão do paciente à terapêutica pode aumentar, tornando a administração do fármaco mais adequada. As variações das concentrações plasmáticas, características dos regimes posológicos múltiplos das formas farmacêuticas convencionais, são reduzidas, pois se consegue manter um nível plasmático. Outra vantagem menos evidente, mas que está implícita na concepção deste tipo de forma farmacêutica é o fato da quantidade total de fármaco administrado ao paciente poder ser reduzida, logo a biodisponibilidade é maior para uma dose mínima. Por outro lado, pode-se conseguir um controle mais adequado da absorção do fármaco, uma vez que o nível dos picos plasmáticos observados após a administração da dose de um fármaco bastante biodisponível, pode ser reduzida pela sua formulação numa forma de ação modificada. A margem de segurança de fármacos bastante potentes pode ser aumentada e a incidência de efeitos adversos

locais ou sistêmicos pode ser reduzida em pacientes mais sensíveis (LACHMAN; LIEBERMAN; KANING, 2001).

2.5.3 Sistemas de liberação modificada contendo aciclovir

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, vem sendo amplamente investigado (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Pesquisa bibliográfica realizada na base de dados "Science Direct" demonstrou que foram pesquisados e desenvolvidos poucos trabalhos envolvendo sistemas de liberação diferenciados para o aciclovir. Os principais trabalhos estão relatados a seguir:

Em 1998, Gröning e colaboradores desenvolveram comprimidos magnetizados para administração oral, a fim de controlar o trânsito gastrointestinal da formulação. Os resultados apontaram que a concentração plasmática do aciclovir foi significativamente maior após 12 horas da administração, em relação aos comprimidos de liberação imediata.

Lipossomas a base de fosfatidilcolina para liberação ocular foram preparados e investigados *in vitro* e *in vivo*, apresentando um aumento na penetração do fármaco (LAW; HUANG; CHIANG, 2000). Rossel e colaboradores (2000) complexaram o aciclovir com β -ciclodextrinas a fim de promover um aumento da solubilidade. Microesferas de liberação sustentada foram desenvolvidas utilizando a etilcelulose como polímero, promovendo tempos de liberação em torno de 12 horas em fluido gastrointestinal (CHEU et al., 2001).

Sistemas microencapsulados com poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo) foram preparados para administração tópica, permitindo um aumento do aciclovir na epiderme basal (JÁLON et al., 2003). O mesmo sistema com diferentes pesos moleculares também foi utilizado para desenvolver micropartículas visando à

administração intravítrea (CONTI et al., 1997; SANCHO; VANRELL; NEGRO, 2003). Sandri e colaboradores (2004) indicaram um aumento da permeação e muco adesão bucal e vaginal quando o fármaco foi incorporado em uma solução polimérica contendo a 5-metil-pirrolidinoquitosana como polímero base. Pavelic e colaboradores (2005) desenvolveram lipossomas contendo aciclovir para liberação vaginal.

A literatura demonstra o desenvolvimento de comprimidos matriciais hidrofílicos constituídos por hidroxipropilmetilcelulose K4M em diferentes proporções, proporcionando tempos de liberação de aproximadamente 400 minutos (FUERTES et al., 2006).

O copolímero polietileno-co-acetato de vinila foi utilizado para originar um filme bucal de liberação modificada (TALLURY; ALIMOHAMMADI; KALACHANDRA, 2007). A acrilamida enxertada com dextrana e quitosana foi igualmente empregada como polímero base para o desenvolvimento de microesferas contendo aciclovir, através da técnica de emulsificação (ROKHADE; PATIL; AMINABHAVI, 2007).

Recentemente, filmes poliméricos constituídos de etil e hexilmetacrilato com diferentes pesos moleculares foram desenvolvidos por Tallury e colaboradores (2008) para encapsulação do aciclovir. Microcápsulas de liberação controlada foram preparadas a partir de polivinilgalactose-éster-metacrilatrimetilamônia na forma de cloridrato (ZHANG et al., 2008). Um complexo do fármaco com β -ciclodextrina/poliamida/amino, foi formulado objetivando aumentar a solubilidade do mesmo (BENCINI et al., 2008).

Observa-se, ainda, que diversos sistemas investigados contendo aciclovir destina-se às vias de administração alternativas à via oral, o que implica na necessidade de pesquisar e desenvolver sistemas objetivando-se este local de administração.

2.6 Via Oral

A administração de fármacos pela via oral é a mais comum, entretanto é também a mais variável e envolve o trajeto mais complicado de acesso aos tecidos. Certos fármacos são absorvidos no estômago, porém o principal sítio de entrada para a circulação sistêmica é o duodeno, em razão de sua maior superfície de absorção. A maioria dos fármacos absorvidos no trato gastrointestinal (TGI) entra na circulação porta e passa pelo fígado antes de ser distribuído pela circulação geral. O metabolismo de primeira passagem no intestino ou fígado limita a eficácia de muitos fármacos administrados por via oral.

A absorção pelo trato gastrointestinal é regulada por diversos fatores, tais como, estado físico do fármaco, área de superfície para a absorção, fluxo sanguíneo e a concentração no local da absorção. As principais vantagens em se administrar um medicamento por via oral, estão relacionadas com a segurança, conveniência e economia (AULTON, 2005).

2.7 Fisiologia do trato gastrointestinal e absorção de fármacos

A via oral é aquela pela qual a maioria dos medicamentos é administrada, assim sendo, é importante conhecer como essas formulações comportam-se durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Sabe-se que o intestino delgado é o sítio de maior absorção de fármacos e por esse motivo, o tempo em que o fármaco permanece nessa parte do trato gastrointestinal é altamente significativo. Quando estão sendo desenvolvidos sistemas de liberação modificada, é essencial avaliar os fatores que podem afetar o seu comportamento e, especialmente o tempo de trânsito em determinadas regiões do trato gastrointestinal. De modo geral, a maioria das formas farmacêuticas quando ingeridas na posição ereta, passa pelo esôfago rapidamente em geral menos de 15 segundos. O trânsito pelo esôfago depende tanto da forma farmacêutica como da postura (AULTON, 2005).

2.7.1 Esvaziamento gástrico

O tempo que uma forma farmacêutica leva para atravessar o estômago é geralmente denominado de, tempo de resistência gástrica, tempo de esvaziamento gástrico ou velocidade de esvaziamento gástrico. O esvaziamento gástrico de medicamentos é muito variável e depende da forma farmacêutica e se o estômago está cheio ou em jejum. Os tempos de residência gástrica normais variam geralmente de cinco minutos a duas horas (AULTON, 2005).

2.7.2 Trânsito pelo intestino delgado

O intestino delgado é um tubo cilíndrico com pouco mais de 6 metros e aproximadamente 4 cm de diâmetro na porção proximal, estreitando-se até 2,5 cm de diâmetro na porção distal. O duodeno é a primeira porção proximal do intestino delgado, que se estende do piloro (gastroduodenal) ao jejuno. No duodeno realiza-se a digestão do quimo, pela ação do suco entérico que contém enzimas como a enteroquinase e hormônios como a secretina (GUYTON, 1992).

O jejuno e o íleo constituem a porção mesentérica e móvel do intestino delgado, começando ao nível da flexura duodeno-jejunal e terminando ao nível da fossa ilíaca direita, onde se estabelece a continuidade com o intestino grosso. A absorção dos nutrientes ocorre nas regiões do jejuno e do íleo. Os nutrientes são absorvidos pelo sangue e passam para o fígado para serem distribuídos a todo organismo (GUYTON, 1992).

O trânsito no intestino delgado é relativamente constante, em torno de três horas. Contrastando com o estômago, não discrimina sólidos de líquidos e, por isso, não discrimina formas farmacêuticas, no indivíduo em jejum ou após a ingestão de alimentos. O tempo de residência no intestino delgado é um fator de particular importância para formas farmacêuticas que liberam lentamente o fármaco à medida que passam ao longo do trato gastrintestinal, como o são os sistemas de liberação prolongada, sustentada e controlada, bem como formas farmacêuticas com

revestimento entérico, as quais liberam o fármaco somente quando alcançam o intestino delgado (AULTON, 2005).

Geralmente o intestino delgado é considerado como sítio primário de absorção de fármacos e, conseqüentemente, a via principal de escolha para sua liberação. Entretanto, um grande interesse na liberação de fármacos no cólon tem ocorrido nos últimos anos (MACKAY; PHILLIPS; HASTEWEL, 1997; BRESOLIN e FILHO, 2003).

2.7.3 Trânsito pelo intestino grosso

O intestino grosso é a parte final do tubo digestivo. Nele distinguem-se três partes: ceco, cólon e reto. Entre essas regiões, a mais importante em relação à absorção de fármacos é o cólon. Este é composto de três regiões; cólon ascendente, o cólon transverso, que atravessa a cavidade abdominal da direita para a esquerda e o cólon descendente (GUYTON, 1992; MACKAY; PHILLIPS; HASTEWEL, 1997). O trânsito de medicamentos no cólon é longo e variável (2 a 48 horas), podendo variar de acordo com o tipo de forma farmacêutica, da dieta, padrões de alimentação e estados doentes. Na maioria das pessoas, os tempos de trânsito da boca até o ânus ultrapassam 24 horas (AULTON, 2005). O trato gastrintestinal humano está representado na Figura 9.

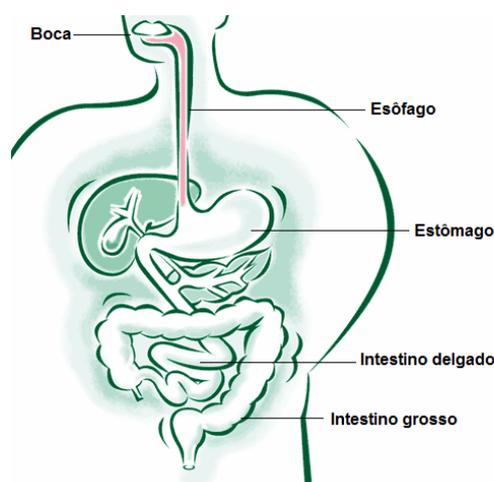


Figura 9. Trato gastrintestinal humano

III- Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo desenvolver micropartículas contendo aciclovir, utilizando o biopolímero quitosana como matriz polimérica, através das técnicas de coacervação e *spray-drying*, a fim de promover uma liberação modificada do fármaco.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterização do fármaco aciclovir (matéria-prima);
- Síntese das microesferas de malonilquitosana através da reação de amidação entre a quitosana (microesferas gelatinizadas) e o ácido malônico;
- Caracterização das microesferas de malonilquitosana, através de análise elementar, IV, RMN ^{13}C , TG e MEV;
- Impregnação do aciclovir nas microesferas de malonilquitosana através da técnica de adsorção por contato;
- Avaliação do grau de intumescimento das microesferas de malonilquitosana contendo aciclovir;
- Desenvolvimento das micropartículas de quitosana contendo aciclovir pela técnica de *spray-drying* (Parte I – sem adição de agente reticulante) e (Parte II- com adição do agente reticulante tripolifosfato);
- Determinação da eficiência de encapsulação das formulações desenvolvidas pelas técnicas de coacervação e *spray-drying*;
- Determinação *in vitro* do perfil de liberação do fármaco a partir das formulações desenvolvidas por ambas as técnicas;

- Aplicação de modelos matemáticos para elucidar os mecanismos envolvidos na liberação do aciclovir a partir dos sistemas poliméricos desenvolvidos pelas distintas técnicas;
- Caracterização das micropartículas desenvolvidas por *spray-drying*, pelas técnicas de DSC, TG, DRX, IV e MEV;
- Avaliação da estabilidade das formulações desenvolvidas por *spray-drying* (Parte II) frente à temperatura de 40 ± 2 °C, umidade relativa de 75 ± 5 % e condições ambientais de temperatura e umidade;
- Validação da metodologia analítica de doseamento das micropartículas produzidas por *spray-drying* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

IV- Materiais e Métodos

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-Primas

O fármaco aciclovir foi cedido pela empresa Eurofarma, este proveniente do fornecedor Chemo SA, número de lote 4507062001. A quitosana foi obtida da Purifarma, apresentando um grau de desacetilação de 90 % e massa molar média de 122.740 Dalton e o tripolifosfato foi adquirido da Plury Química LTDA, lote interno 2134560. Os padrões de aciclovir e guanina são provenientes da Farmacopéia Brasileira.

4.1.2 Solventes e Reagentes

Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza analítica com exceção daqueles utilizados na análise por CLAE.

- Acetonitrila (grau cromatográfico)
- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- Ácido malônico
- Ácido sulfúrico
- Água deionizada
- Água destilada
- Etanol
- Fosfato de sódio
- Glutaraldeído
- Hidróxido de sódio

4.1.3 Equipamentos

- Analisador térmico DSC 60 SHIMADZU
- Aparelho de dissolução VARIAN

- Balança Analítica OHAUS
- Banho de ultrason UNIQUE
- Bomba peristáltica ISMATEC
- Centrifuga SIGMA
- Coluna Cromatográfica PHENOMENEX
- Cromatógrafo líquido SHIMADZU FRC-10 A, com bomba LC-10AD e detector SPD-10AV da SHIMADZU, gerenciado por controlador SCL-10 AVP, acoplado a computador Mega Corp e operado pelo programa Class-VP
- Elemental Analyzer Carlo Erba, modelo EA 1110
- Difrator de raios X, PHILIPS, modelo X-Pert
- Microscópio Eletrônico de Varredura PHILIPS, modelo XL30
- Espectrofotômetro UV/VIS VARIAN, modelo Cary 50 BIO
- Espectrofotômetro RMN 400 MHZ-VARIAN, modelo Eur 0028
- Espectrofotômetro infravermelho FT Perkin Elmer, modelo 16 PC
- Mini *spray-dryer* BUCHI, modelo B-191, Suíça
- Termobalança TGA-50 SHIMADZU

4.2 Métodos

4.2.1 Caracterização do fármaco

O aciclovir (matéria-prima) utilizado para a realização deste trabalho foi submetido aos ensaios de determinação do teor de substância ativa (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e ultravioleta (UV), e calorimetria exploratória diferencial (DSC) com o objetivo de caracterizá-lo e realizar o seu controle de qualidade.

4.2.2 Desenvolvimento das micropartículas

As micropartículas a base de quitosana foram desenvolvidas por técnicas distintas, coacervação e *spray-drying*, conforme metodologias descritas a seguir:

4.2.2.1 Preparação das microesferas de quitosana gelatinizada pela técnica de coacervação

A quitosana (5 g) foi dissolvida em 100 mL de uma solução de ácido acético 5 % (v/v). Em seguida foi gotejada em um banho contendo solução de NaOH 2,0 mol.L⁻¹ através de uma bomba peristáltica (Ismatec) sob constante agitação, para dar origem as microesferas de quitosana gelatinizada, sendo estas lavadas, posteriormente, com água destilada até pH neutro e secas a temperatura ambiente.

4.2.2.2 Síntese das microesferas de malonilquitosana através da reação de amidação com ácido malônico

Uma amostra de 5 g de microesferas de quitosana gelatinizadas foi pesada e suspensa em 20 mL de etanol anidro, sob constante agitação durante uma hora, logo após o etanol foi retirado por filtração. As microesferas de quitosana úmidas foram suspensas novamente em 20 mL de etanol contendo 450 mg de ácido malônico. A mistura resultante foi refluxada por 36 horas a 78 °C e então resfriada em temperatura ambiente. Após este procedimento as microesferas foram colocadas em contato com uma solução de glutaraldeído 2,5 % (m/v) por um período de 24 horas em temperatura ambiente, sob constante agitação. O material resultante foi filtrado e lavado com água destilada para a retirada do excesso do agente reticulante.

4.2.2.3 Caracterização e análises físico-químicas das microesferas de malonilquitosana

As microesferas produzidas pela técnica de coacervação e modificadas pela reação de amidação com ácido malônico foram submetidas aos seguintes ensaios:

4.2.2.3.1 Determinação do grau de substituição por análise elementar

O grau de substituição (GS) nas microesferas de quitosana foi determinado de acordo com o método descrito por Inukai e colaboradores conforme Equação 1 (INUKAI et al., 1998):

$$GS = [(C/N)_r - (C/N)_o] / 3 \quad (1)$$

Onde $(C/N)_r$ é a razão carbono/nitrogênio das microesferas de malonil resultante e $(C/N)_o$ é a razão carbono/nitrogênio das microesferas de quitosana gelatinizada. O valor 3 é referente ao número de átomos de carbono substituintes. Os valores de C/N foram medidos através de um Elemental Analyzer Carlo Erba EA 1110, utilizando-se os valores experimentais percentuais de C, H e N.

4.2.2.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

As microesferas de quitosana gelatinizada e malonilquitosana foram previamente trituradas e prensadas com KBr na forma de pastilhas. Os espectros das microesferas na região do infravermelho foram obtidos através de espectrofotômetro FT Perkin Elmer modelo 16 PC, na região de 4000 - 400 cm^{-1} .

4.2.2.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C em fase sólida foram obtidos em aparelho Oxford Instruments, NMR 400 MHz- Varian Model Eur 0028, através do programa mercury NMR Spectrometer Systems.

4.2.2.3.4 Análise termogravimétrica (TG/DTG)

As curvas TG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 °C e 600 °C, utilizando-se termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu, sob razão dinâmica de nitrogênio (50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), razão de aquecimento de 10 °C. min^{-1} , utilizando cadinho de platina contendo aproximadamente 3 mg da amostra.

4.2.2.3.5 Determinação do grau de intumescimento (GI)

Alíquotas de microesferas secas (0,5 g) foram colocadas em béqueres com soluções de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ pH 1,2 e tampão fosfato com pH 6,8 e 9,0 em temperatura constante de 37 °C. A cada 30 minutos durante o período de 6 horas as microesferas foram retiradas e ligeiramente secas em papel absorvente, para eliminar excesso de água, sendo em seguida pesadas em balança analítica. A mesma massa de microesferas foi submetida a valores crescentes de pH, permanecendo durante duas horas em cada valor. A cada 30 minutos foram secas em papel absorvente e pesadas em balança analítica. O grau de intumescimento (GI %) foi calculado pela Equação 2, até as amostras apresentarem peso constante. Este ensaio foi realizado em triplicata.

$$GI \% = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde GI é o grau de intumescimento, M_t é a massa (g) da amostra hidratada e M_0 é a massa (g) da amostra seca.

4.2.2.3.6 Incorporação do fármaco nas microesferas de malonilquitosana

O aciclovir (0,2 g) foi incorporado nas microesferas de malonilquitosana (1 g) através da técnica de adsorção por contato. O fármaco foi dissolvido em 100 mL de HCl 0,3 mol.L⁻¹ e a solução resultante colocada em contato com as microesferas por períodos de 6, 12 e 24 horas, sob agitação constante para ocorrer uma melhor penetração do fármaco. Após este período as microesferas foram retiradas, filtradas e lavadas ligeiramente com HCl 0,3 mol.L⁻¹, para retirar o excesso do fármaco, e secas à temperatura ambiente.

4.2.2.3.7 Eficiência de encapsulação

Amostras de 100 mg de microesferas de malonilquitosana contendo aciclovir foram trituradas e dissolvidas em 10 mL de HCl 0,3 mol.L⁻¹. A solução foi filtrada através de um filtro (Milipore®) de 0,22 µm. O conteúdo de fármaco contido nas microesferas foi determinado por espectroscopia na região do ultravioleta ($\lambda_{\text{max}}=254$ nm; Varian Carry 50 Bio, USA) e a porcentagem de encapsulação calculada conforme Equação abaixo:

$$\% \text{ Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{Massa de aciclovir presente nas microesferas}}{\text{Massa teórica de aciclovir}} \times 100 \quad (3)$$

4.2.2.3.8 Liberação *in vitro*

Os estudos de liberação foram baseados no método proposto pela Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30/NF 25, 2007), utilizando-se aparato I (cesto), temperatura de $37 \pm 0,5$ °C e velocidade de rotação de 100 rpm. O meio de dissolução simulou o fluido gastrointestinal (pH 1,2 e 6,8) e o volume utilizado foi de 500 mL. Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos intervalos de 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 minutos ou até a liberação de 80 % do fármaco. O mesmo volume retirado em cada intervalo de tempo foi repostado. As amostras foram centrifugadas e a quantidade de aciclovir liberada determinada através da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro na região do UV, em 254 nm. A concentração de aciclovir foi determinada através da equação da reta média obtida previamente através da construção de uma curva de calibração (2 a 20 µg.mL⁻¹).

4.2.2.3.9 Avaliação morfológica e tamanho de partícula

Para a avaliação morfológica e determinação do tamanho de partícula foi utilizado equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura, modelo XL30 da

marca PHILIPS. As amostras foram recobertas com ouro (350 Å), sob vácuo, com o auxílio do aparelho Polaron modelo E 5000.

4.2.3 Preparação das micropartículas pela técnica de *spray-drying*

O desenvolvimento das micropartículas pela técnica de *spray-drying* foi realizado em duas etapas: uma primeira etapa onde foi desenvolvida a formulação F1 sem a adição de tripolifosfato (etapa de pré-formulação) e uma segunda etapa onde as demais formulações (F2, F3, F4, F5 e F6) foram preparadas com a adição do agente reticulante tripolifosfato.

As formulações foram desenvolvidas conforme a Tabela 2 e esquema representado na Figura 10. O aciclovir (100 a 200 mg) foi solubilizado em solução de HCl 0,1 mol.L⁻¹. Em seguida, a quitosana, em diferentes concentrações foi dissolvida na solução contendo o fármaco e homogenizada durante 1 hora com o auxílio de um agitador magnético, dando origem a uma solução polimérica. A solução de tripolifosfato foi adicionado à solução lentamente, sob agitação constante durante 30 minutos. A solução resultante foi nebulizada em spray-dryer Buchi (modelo B-191, Suíça) sob as seguintes condições: temperatura do ar (entrada) e saída 180 °C e 92 °C respectivamente, fluxo da solução 7mL/min, fluxo de ar 500L/h e aspiração a 100%.

Tabela 2: Formulações desenvolvidas por *spray-drying*

Formulação	Quitosana (g)	Volume de TPP 2 % (mL)	Massa de aciclovir (mg)	Volume de HCl 0,1 mol.L ⁻¹ (mL)
F1	1	0	200	100
F2	1	1	100	100
F3	1	1	150	100
F4	1	1	200	100
F5	2	2	100	100
F6	2	2	150	100

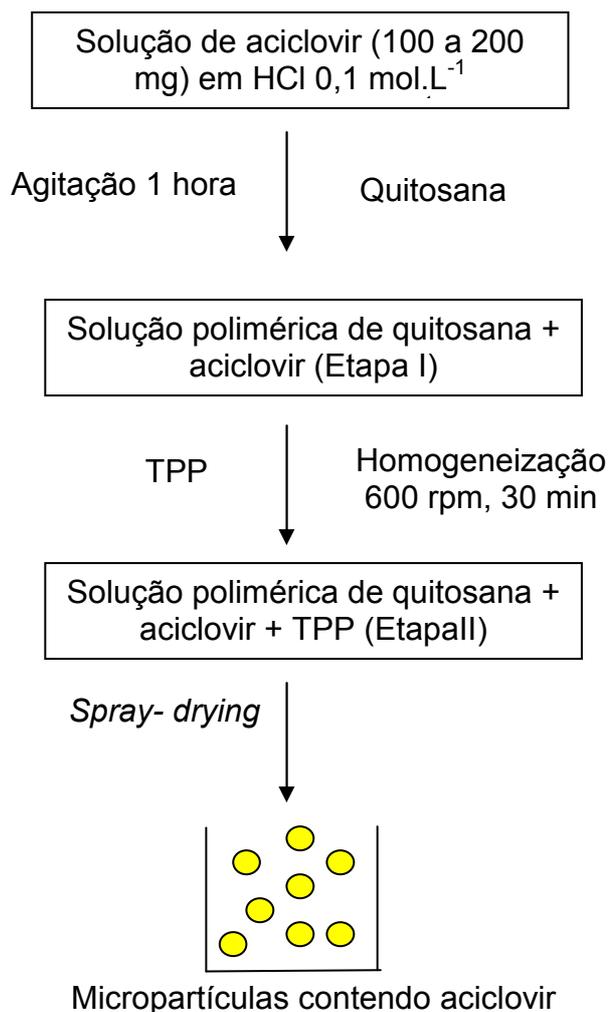


Figura 10. Esquema representativo da metodologia de preparo das micropartículas de quitosana contendo aciclovir por *spray-drying*

4.2.3.1 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de *spray-drying*

As formulações desenvolvidas por esta técnica foram submetidas aos ensaios de: eficiência de encapsulação (determinada por CLAE), termogravimetria (TG), espectroscopia na região do infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e liberação *in vitro*, conforme metodologias descritas anteriormente. Além dos ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X de pó (DRX), métodos descritos a seguir.

As formulações desenvolvidas na segunda etapa foram avaliadas também através de termogravimetria no modo isotérmico e estudos de estabilidade acelerada, conforme metodologias descritas abaixo:

4.2.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 °C e 600 °C, utilizando-se célula calorimétrica modelo DSC-60 da Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min, utilizando cápsula de alumínio parcialmente fechada contendo a amostra.

4.2.3.3 Difração de raios X de pó

Os difratogramas foram obtidos em equipamento Philips (fonte de radiação Cu-K α , varredura angular 2θ) modelo X-Pert, nas seguintes condições: filtro de níquel, tubo com ânodo de cobre, voltagem de 40 kV, corrente de 40 mA.

4.2.3.4 Termogravimetria modo isotérmico

As curvas isothermas foram obtidas na faixa de temperatura entre 20 °C e 100 °C, utilizando-se termobalança modelo TGA-50 da marca Shimadzu, sob razão dinâmica de oxigênio (50 mL.min⁻¹). A taxa de aquecimento empregada foi de 10 °C.min⁻¹ até 20 °C e 1 °C.min⁻¹ até atingir 100 °C, sendo então mantida nesta temperatura durante 4 horas. As amostras (3 mg) foram pesadas e analisadas em cadinho de platina.

4.2.3.5 Estabilidade acelerada

Os estudos de estabilidade acelerada foram realizados em câmara climática a temperatura de 40 \pm 2 °C e 75 \pm 5 % de umidade relativa durante o período de seis

meses (Resolução RE nº 1, de 29 de Julho de 2005), bem como sob condições ambientais de temperatura e umidade (faixa de temperatura de 20 a 30 °C e faixa de umidade de 60 a 70 %). Amostras das formulações foram retiradas nos intervalos de tempos de 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias e o teor de fármaco determinado por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme metodologia previamente validada.

4.2.4 Validação da metodologia analítica de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.4.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC -10 A Japão), equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10 AV e controlador SCL-10 AVP. Empregou-se uma coluna de fase reversa (150 mm × 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de particular de 5 µm). A fase móvel constituída de água: acetonitrila (95:5 v/v), pH 2,5; eluída em uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹, modo isocrático. O volume injetado foi 20 µL para todas as amostras e os dados foram obtidos através do software Class VP.

4.2.4.2 Preparo da solução padrão

A solução padrão de 50 µg.mL⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 10 mg de aciclovir padrão em 10 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹ e o volume completado com fase móvel em balão volumétrico de 200 mL. A partir desta solução foram feitas as diluições necessárias para os ensaios.

4.2.4.3 Preparo da amostra

Uma alíquota de microsferas correspondente a 10 mg de aciclovir foi pesada em balança analítica, dissolvida em 10 mL de etanol 90 % e sonicada durante 15 minutos para extração do fármaco. O volume foi completado em balão volumétrico

de 200 mL com fase móvel. Alíquotas foram diluídas para obterem-se soluções com diferentes concentrações de aciclovir (2, 5 e 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

O método foi validado conforme o preconizado na Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003 e com as recomendações da ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade e faixa, limite de quantificação (LQ) e detecção (LD), precisão, exatidão e robustez.

4.2.4.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de análises comparativas entre as micropartículas sem aciclovir (placebo) e as contendo o aciclovir, com os padrões primários de aciclovir e guanina.

4.2.4.5 Linearidade e faixa

A linearidade e a faixa foram verificadas através da construção de uma curva de calibração em triplicata, contemplando concentrações de 1, 3, 5, 7 e 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear.

4.2.4.6 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Estes foram calculados a partir do desvio padrão da resposta (σ) e coeficiente angular (s), através das Equações 4 e 5:

$$LQ = \left(\frac{10 \sigma}{S} \right) \quad (4)$$

$$LD = \left(\frac{3.3 \sigma}{S} \right) \quad (5)$$

4.2.4.7 Precisão

A precisão inter-corrída (repetibilidade) foi avaliada através da análise de seis soluções amostra na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes períodos do dia (manhã, tarde e noite) . A precisão intermediária por sua vez foi determinada pela análise de seis medidas de soluções na mesma concentração realizadas em dias distintos.

4.2.4.8 Exatidão

Este parâmetro foi determinado através do ensaio de adição do padrão, onde diferentes concentrações do padrão de aciclovir ($1, 5$ e $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram adicionadas a solução amostra na concentração de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, estando a concentração final compreendida na linearidade e faixa do método (Tabela 3).

Tabela 3: Ensaio de exatidão (procedimento)

Solução amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução padrão ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
2	1	3
2	5	7
2	8	10

4.2.4.9 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas variações nos parâmetros cromatográficos como, fluxo ($0,8 \text{ mL. min}^{-1} \pm 0,2$), pH ($2,5 \pm 0,5$), comprimento de onda ($254 \text{ nm} \pm 2$).

4.2.5 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando análise de variância ANOVA unifatorial, no qual os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade for inferior a 5 % ($p < 0,05$ intervalo de confiança de 95 %) e teste t de Student com nível de significância $\alpha = 0,05$ (intervalo de confiança de 95 %).

V- Resultados e Discussões

5.1 Caracterização do aciclovir

O aciclovir utilizado como matéria-prima no desenvolvimento das formulações, foi caracterizado por diferentes técnicas e submetido a ensaios de controle de qualidade de acordo com os compêndios oficiais em que a substância é descrita (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007; BRITISH PHARMACOPEIA, 2006).

O controle de qualidade de fármacos baseia-se nas especificações estabelecidas para cada substância, de acordo com as monografias oficiais vigentes. Esta etapa é de fundamental importância, pois a qualidade do produto final desenvolvido está diretamente relacionada à qualidade da matéria-prima empregada no seu desenvolvimento (FERREIRA, 2002).

5.1.1 Teor do fármaco

O teor de aciclovir determinado por cromatografia líquida de alta eficiência foi de 99,8 % ($\pm 0,45$; $n=3$), estando de acordo com o preconizado na monografia do fármaco, que estabelece valores entre 98 % e 101 % de teor de princípio (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

5.1.2 Identificação por espectroscopia na região do infravermelho

A espectrofotometria no infravermelho é capaz de medir a absorção, por parte de compostos químicos analisados, de uma radiação eletromagnética, sendo este espectro único para cada substância com exceção aos isômeros ópticos que em solução apresentam espectros idênticos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). No setor farmacêutico, é usada em inúmeras aplicações, como por exemplo, na identificação de fármacos, avaliação da pureza, cristalinidade e estudos de compatibilidade (KALINKOVA, 1999).

A Figura 11 representa o espectro na região do infravermelho do aciclovir, estando de acordo com o apresentado na literatura, onde as principais bandas de absorção estão presentes. Na região de 3500 cm^{-1} observa-se uma banda larga, a

qual corresponde ao grupo OH presente na molécula. As bandas em 3382 e 3332 cm^{-1} referem-se às aminas primárias e secundárias. Assim como a banda de alta intensidade em 1584 cm^{-1} corresponde às vibrações de R-NH. A banda fraca de amina secundária situa-se em 2912 cm^{-1} . O grupo CH tem sua banda característica em 1346 cm^{-1} , e os grupos metileno em 1468 cm^{-1} . Na região de 1584 cm^{-1} e 1036 cm^{-1} , estão representadas as bandas referentes à amida e ao álcool primário, respectivamente.

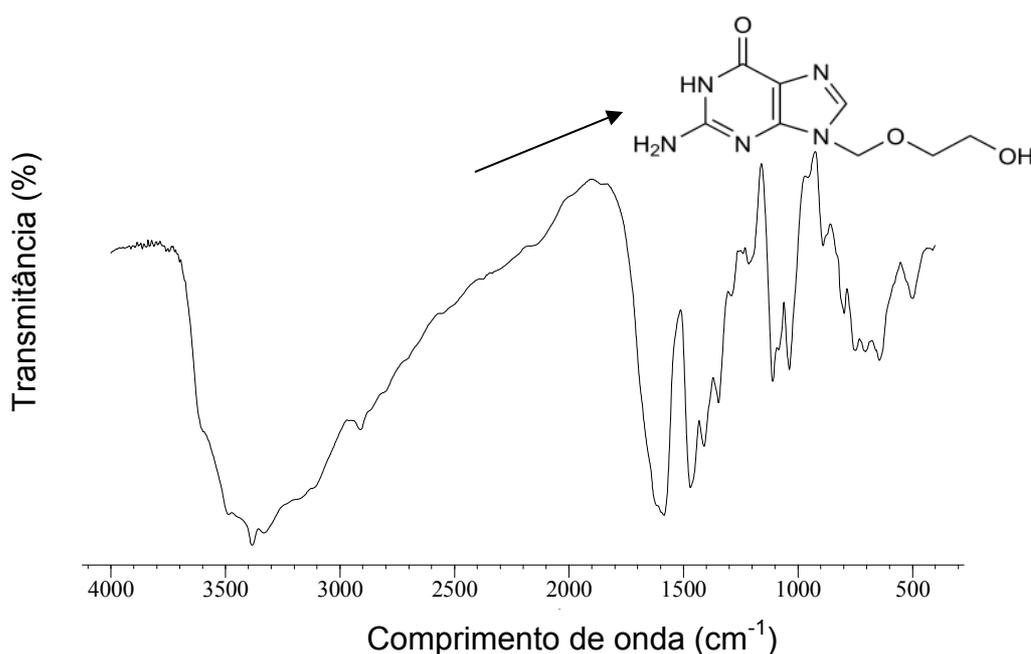


Figura 11. Espectro infravermelho do aciclovir obtidos em pastilhas de KBr

5.1.3 Identificação por espectroscopia na região do ultravioleta

O espectro na região do ultravioleta (Figura 12), analisado em meio ácido (H_2SO_4 0,2 mol.L^{-1}) apresentou o pico de absorção máxima em 255 nm, conforme o preconizado na literatura (MOFFAT et al., 2004).

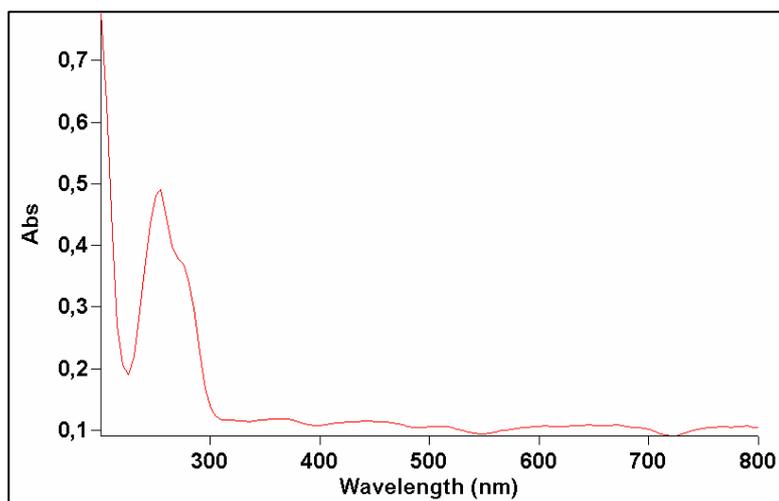


Figura 12. Espectro ultravioleta do aciclovir obtido em H_2SO_4 0,2 mol.L⁻¹

5.1.4 Ponto de fusão por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A curva DSC (Figura 13) evidenciou o ponto de fusão do aciclovir em 256,7 °C ($T_{\text{peak}} = 256,70$ °C, $\Delta H_{\text{fusion}} = -125,29$ J/g), resultado condizendo com o especificado para este fármaco (BRITISH PHARMACOPEIA, 2006).

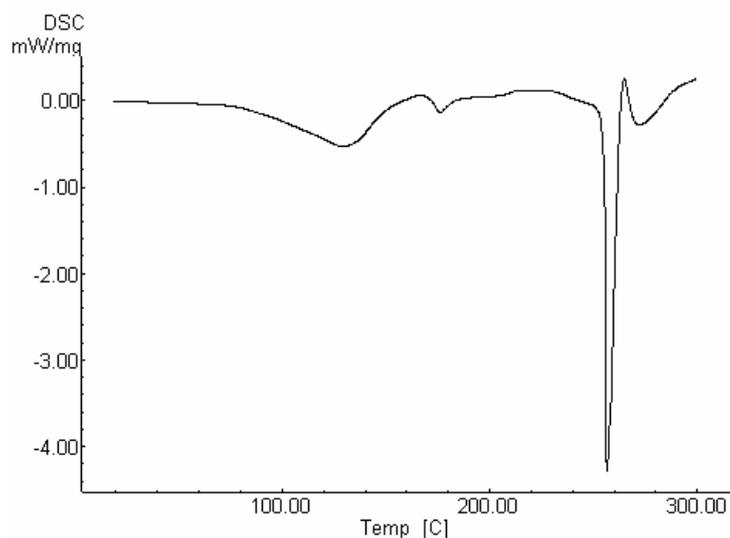


Figura 13. Curva DSC do aciclovir obtida sob razão de aquecimento de 2 °C min⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min⁻¹)

A partir destes ensaios de caracterização pode-se evidenciar a autenticidade da amostra e a qualidade do aciclovir utilizado como fármaco modelo no presente trabalho.

5.2 Caracterização e avaliação das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de coacervação e modificadas pela reação de amidação com ácido malônico

5.2.1 Análise elementar

A porcentagem de grupos amino livres nas microesferas de malonilquitosana (36 horas) foi verificada por análise elementar. Os resultados obtidos para este ensaio foram: C 38,2 %; H 7,05 %; N 5,12 % para as microesferas de malonilquitosana e, para as microesferas gelatinizadas, C 38,5 %; H 7,91 % e N 7,0 %.

O conteúdo dos grupos aminos livres encontrado foi de 23,7 %, os quais correspondem a 66,3 % de substituição, considerando que a quitosana de origem apresentava 90 % de desacetilação.

5.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectrometria magnética nuclear RMN de ^{13}C

Os espectros na região do infravermelho das microesferas de quitosana gelatinizadas e malonilquitosana estão apresentados na Figura 14. De acordo com os espectros observa-se que as bandas de absorção na região entre $3424\text{-}3446\text{ cm}^{-1}$ das microesferas modificadas com ácido malônico são mais intensas em decorrência das vibrações de estiramento – OH.

Os grupamentos amina primária e amida são identificados no espectro IV na região compreendida entre $1560\text{ e }1650\text{ cm}^{-1}$ (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Em ambos os espectros observam-se sinais nesta região, embora nas microesferas gelatinizadas o sinal seja mais intenso. A identificação dos sinais relativos à amina primária e amida presentes nas microesferas de malonilquitosana não aparece de forma clara no espectro, uma vez que ocorreu a sobreposição dos sinais. A banda de absorção observada em 1724 cm^{-1} , no espectro das microesferas de malonilquitosana, pode ser atribuída ao ácido carboxílico, a qual se encontra ausente nas microesferas gelatinizadas.

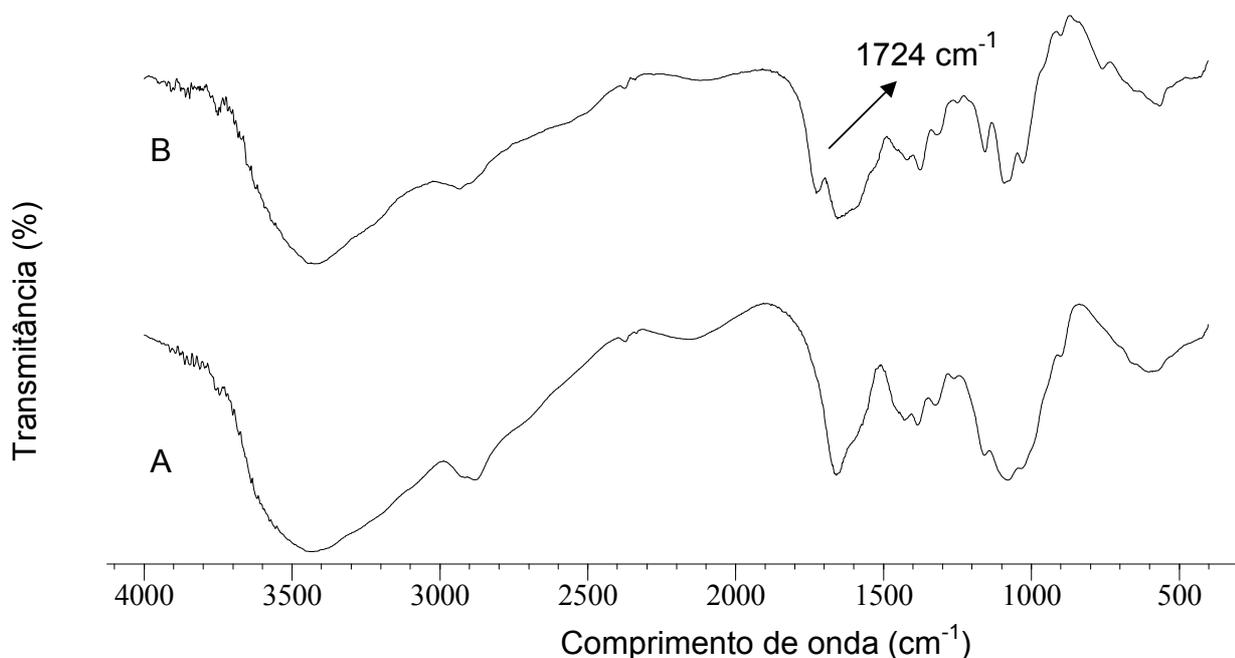


Figura 14. Espectros na região do infravermelho das microesferas gelatinizadas de quitosana (A) e microesferas de malonilquitosana (B), obtidos em pastilhas de KBr

Nos espectros RMN de ¹³C das microesferas gelatinizadas e malonilquitosana (Figura 15) os principais picos estão situados entre δ 20 e 200 ppm, região onde se encontra o sinal referente à carbonila. Os grupos funcionais amida, ácido carboxílico, éster, ou de anidrido apresentam um sinal de carbonila na faixa de δ 155 a 185 ppm (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Em ambos os espectros, observa-se sinais em δ 60,6 a 87,4 ppm e δ 59,1 a 79,0 ppm, respectivamente, que indicam a presença de anel piranose nas amostras. Além disso, dois sinais referentes aos carbonos anoméricos são observados em δ 109,4 e δ 105,0 ppm. A comparação dos espectros das amostras indica que a principal diferença é o sinal adicional referente à carbonila, observados nas microesferas de malonilquitosana em δ 178,3 ppm. O sinal referente à carbonila pode ser atribuído a formação de ácido carboxílico, amida ou ambos.

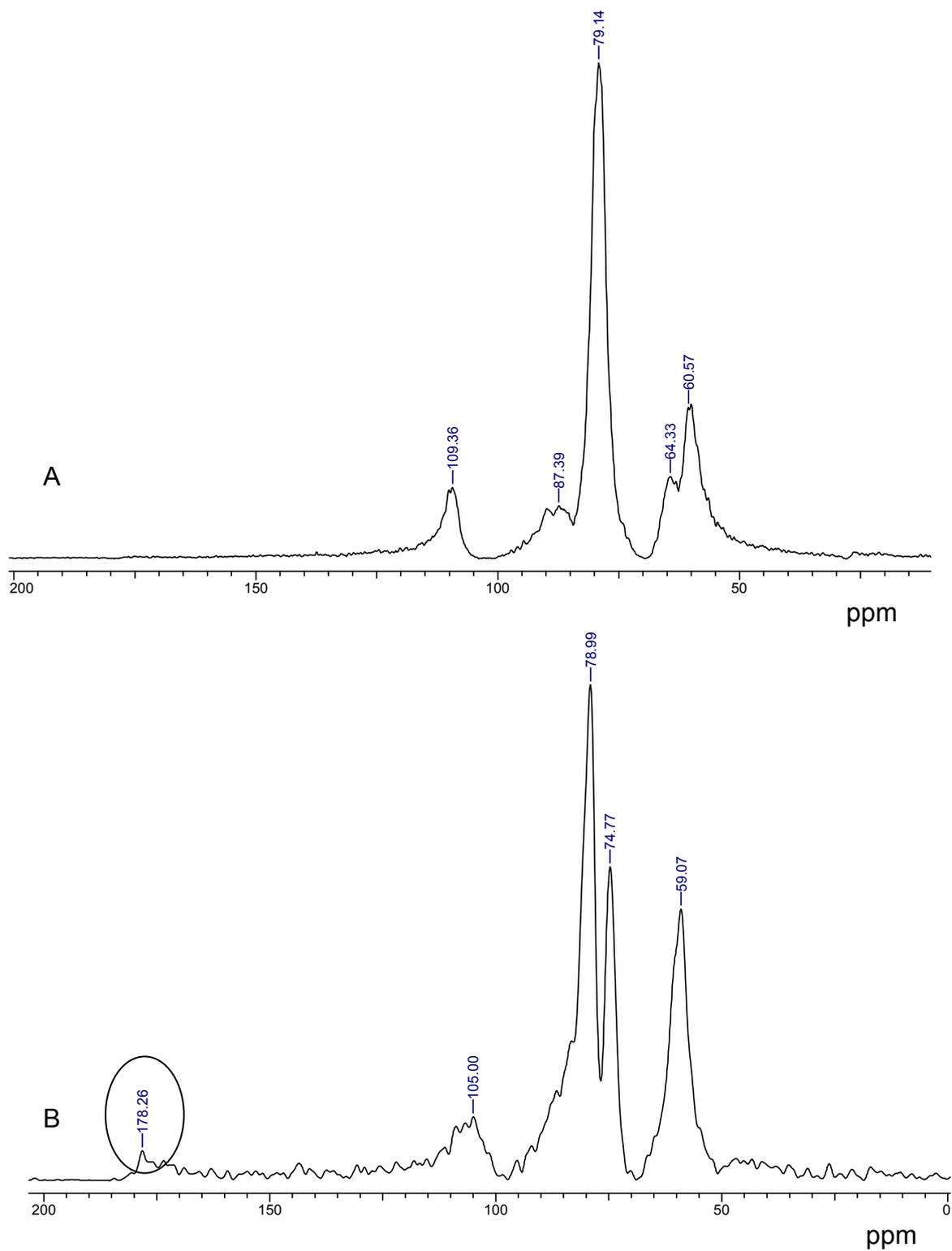


Figura 15. Espectro RMN de ^{13}C em fase s3lida das microesferas gelatinizadas (A) e malonilquitosana (B)

A substituição do grupo malonil nas microesferas gelatinizadas pode ocorrer nos grupos mais reativos, o grupo hidroxil do C₆ e no grupo amino do C₂. Porém a literatura mostra que a N-substituição ocorre mais freqüentemente do que a O-substituição (KAS, 1997). Os resultados obtidos por análise elementar, espectroscopia no infravermelho e RMN de ¹³C sugerem a N-substituição.

A amidação é a reação que ocorre entre ácidos dicarboxílicos ou anidridos correspondentes tais como ácido malônico ou anidrido malônico e amônia, aminas primárias ou aminas secundárias com formação de mono ou diamidas. A malonilquitosana foi sintetizada a partir da reação de amidação entre a quitosana e o ácido malônico (GLASSER e JAIN, 1999). Os resultados obtidos sugerem a formação de grupo monoácido carboxílico e grupo monoamida, conforme esquema representado na Figura 16.

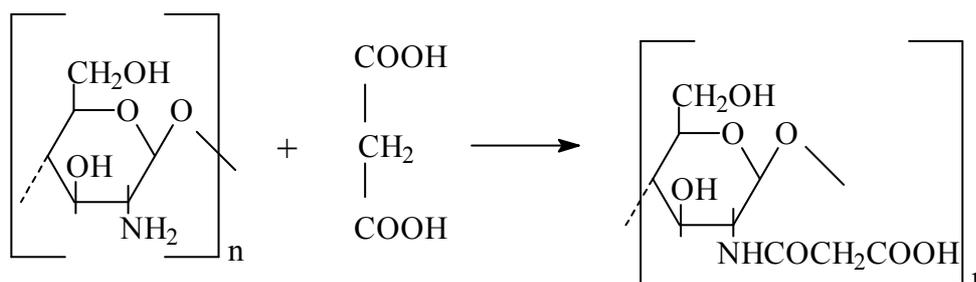


Figura 16. Esquema representativo da síntese da malonilquitosana

5.2.3 Termogravimetria (TG/DTG)

As curvas TG/DTG, ilustradas na Figura 17, demonstram que as microesferas gelatinizadas apresentaram um único evento de perda de massa na faixa de temperatura compreendida entre 235 e 335 °C ($\Delta m = 30,32\%$). Para as microesferas de malonilquitosana as curvas demonstraram duas etapas de degradação na faixa de temperatura de 165 a 221 °C ($\Delta m = 22,54\%$) e 265 a 333 °C ($\Delta m = 21,67\%$). O primeiro evento de massa está relacionado com a volatilização dos produtos formados durante o processo de síntese. Assim, as microesferas de

malonilquitosana apresentaram uma menor estabilidade térmica em relação às microesferas gelatinizadas, fato este que pode ser atribuído às ramificações na cadeia lateral polimérica. A decomposição térmica do produto ocorreu após 400 °C.

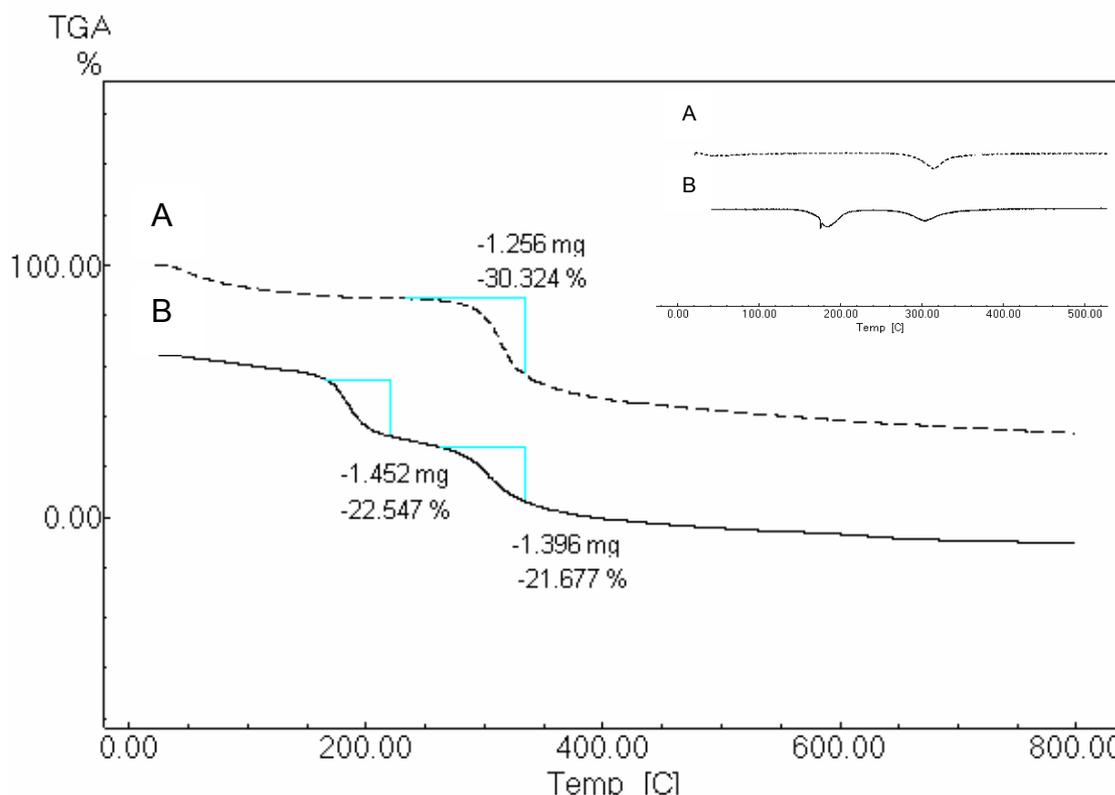


Figura 17. Curvas TG/DTG das microesferas gelatinizadas (A) e microesferas de malonilquitosana (B), obtidas sob razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1})

5.2.4 Grau de intumescimento (GI)

O processo físico-químico de intumescimento em meio aquoso de géis de polímeros sintéticos e naturais e os seus respectivos graus de hidratação vêm sendo investigado com o propósito de aplicar estes sistemas em liberação controlada de fármacos. Através do intumescimento, a estrutura do gel é expandida, promovendo a liberação do princípio ativo. Fatores como grau de reticulação, pH, hidrofobicidade e hidrofiliidade influenciam no grau de intumescimento do polímero (GINANI et al., 1999).

As microesferas de malonilquitosana foram submetidas a valores crescentes de pH (1,2; 6,8; e 9,0) com o objetivo de simular o trato gastrointestinal. Neste ensaio apresentaram um grau de intumescimento igual a 2300 % ($\pm 0,6$) após 6 horas de experimento. Porém, quando as mesmas foram submetidas aos valores de pH individual, os resultados apontaram valores de 2018 % ($\pm 0,89$), 1060 % ($\pm 0,58$) e 1178 % ($\pm 0,91$) em pH 1,2; 6,8 e 9,0 respectivamente, após 6 horas de experimento. Assim, observa-se um maior grau de intumescimento em pH 1,2.

As propriedades de intumescimento de hidrogéis iônicos são originalmente devido à ionização de seus grupos funcionais. Neste estudo as microesferas de malonilquitosana apresentaram um comportamento de intumescimento pH dependente, conforme exposto na Figura 18 e Tabela 4.

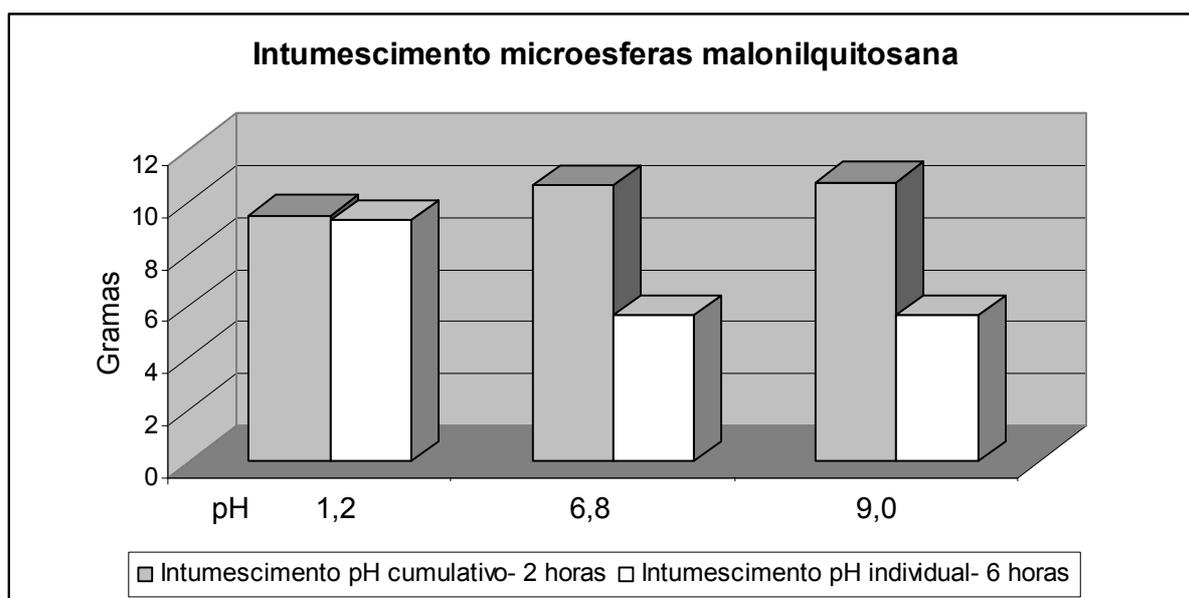


Figura 18. Intumescimento das microesferas de malonilquitosana em solução tampão pH 1,2; pH 6,8; e pH 9,0.

Tabela 4: Resultados do grau de intumescimento (G.I) cumulativo e individual nos diferentes valores de pH

Intumescimento cumulativo				Intumescimento individual					
pH	Tempo (min)	Massa (g)	G.I (%)	Massa (g)	G.I (%)	Massa (g)	G.I (%)	Massa (g)	G.I (%)
				pH 1,2		pH 6,8		pH 9,0	
1,2	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0
	30	7,85	1470	7,52	1440	1,26	152	1,36	172
	60	9,73	1846	9,65	1830	1,38	176	1,41	182
	90	10,51	2002	10,48	1996	1,82	264	1,96	292
	120	10,58	2016	10,48	1996	2,39	378	2,65	430
6,8	150	11,39	2178	10,52	2004	3,65	630	4,23	746
	180	11,41	2182	10,53	2006	4,12	724	4,89	878
	210	11,54	2208	10,55	2010	4,23	746	5,11	922
	240	11,62	2224	10,56	2012	4,89	878	5,13	926
9,0	270	11,73	2246	10,57	2014	5,01	902	5,69	1038
	300	11,79	2258	11,58	2016	5,13	926	6,12	1124
	330	11,80	2260	10,59	2018	5,32	964	6,53	1206
	360	12,00	2300	10,59	2018	5,80	1060	6,39	1178

5.2.5 Eficiência de encapsulação

A concentração de aciclovir encapsulado nas microesferas de malonilquitosana foi de 23,9% ($\pm 0,65$), 45,8 % ($\pm 0,79$) e 69,7 % ($\pm 0,67$) para os tempos de contato de 6, 12 e 24 horas, respectivamente. A maior porcentagem de fármaco impregnado foi para o período de 24 horas.

5.2.6 Liberação *in vitro* do aciclovir impregnado nas microesferas de malonilquitosana

O perfil de liberação do aciclovir presente nas microesferas de malonilquitosana está representado na Figura 19. Através dos gráficos, pode-se observar que 90 % do fármaco foi liberado por um período de até 5,5 horas. Em ambas as soluções observou-se uma liberação rápida do fármaco durante os primeiros 15 minutos de ensaio, sendo esta resultante da quantidade de fármaco remanescente presente na superfície das microesferas. Em pH ácido, 50 % da

quantidade total do fármaco foi liberada em aproximadamente 100 minutos, em pH 6,8 a liberação foi mais lenta durante o mesmo intervalo de tempo, ocorrendo uma liberação de aproximadamente 30%. Estes resultados traduzem o comportamento da quitosana como um polieletrólito catiônico, onde os grupos amino de sua cadeia estão protonados em pH ácido, favorecendo a liberação.

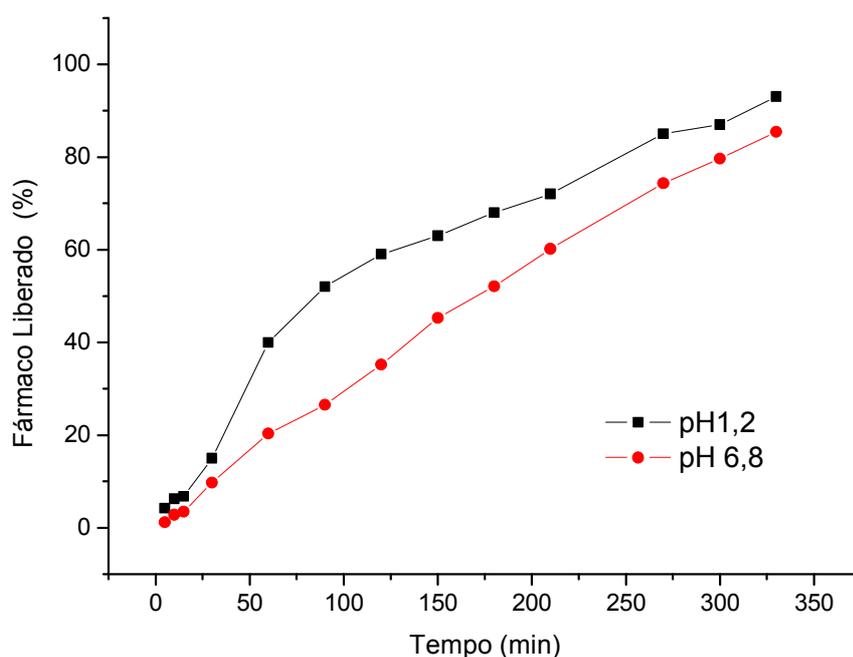


Figura 19. Perfil de liberação do aciclovir a partir das microesferas de malonilquitosana em pH 1,2 e 6,8.

5.2.7 Modelo cinético de liberação

O estabelecimento do perfil de liberação permite caracterizar os mecanismos envolvidos neste processo, além do tempo necessário para que determinadas porcentagens de fármaco se dissolvam. Permite ainda quantificar o tempo de latência (tempo em que o fármaco começa a se dissolver) e detectar alterações cinéticas durante o processo (SHARGEL e ANDY, 2004).

Quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano, controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas) (RITGER e PEPPAS, 1987), a relação entre a velocidade de liberação e o tempo é igual a:

$$M_t/M_\infty = k \cdot t^n \quad (6)$$

Onde M_t/M_∞ é a fração de fármaco liberado no tempo t , k é uma constante cinética que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo, n é o expoente de liberação, que de acordo com o valor numérico assumido, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco. A Equação 6 é geralmente utilizada para interpretar e descrever a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos aparentemente independentes: um devido ao transporte do fármaco que obedece às leis de Fick ou transporte Fickiano e, outro, como consequência dos fenômenos de intumescimento/relaxamento do gel (expansão dinâmica) e que envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível, chamado transporte Caso-II. Nesta equação tem-se em conta não só a difusão do fármaco, mas também o relaxamento do gel como processos determinantes na liberação do fármaco (RITGER e PEPPAS, 1987),

Consoante com os critérios para a cinética de liberação de fármacos a partir de sistemas intumescíveis com geometria esférica, um valor do expoente de liberação de $n \leq 0,43$; indica que o mecanismo de liberação envolvido é o de difusão do soluto através das camadas da matriz polimérica, também conhecido como mecanismo de liberação Fickiano ou "Caso I". Para um valor de $n = 0,85$, indica que a liberação do fármaco (soluto) é controlada pelo intumescimento/relaxação da cadeia polimérica, ou seja, independente do tempo, mecanismo este também conhecido como "Caso II" de transporte. Para valores de $0,43 < n < 0,85$, observa-se um transporte não Fickiano ou anômalo, onde ocorre à superposição dos dois fenômenos, a liberação é controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente. Valores de $n > 0,85$ estão relacionados com processos de difusão,

intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica simultaneamente (RITGER e PEPPAS, 1987),

Os valores de n foram obtidos a partir da linearização da Equação 6, avaliados para $M_t/M_\infty < 0,6$; dados expostos na Tabela 5. Em solução tampão pH 1,2 e 6,8, os valores calculados foram 0,8474 e 1,0491 respectivamente. Assim, em solução tampão pH 1,2 o mecanismo envolvido na liberação envolve intumescimento e difusão simultaneamente. Para o ensaio realizado em pH 6,8 a liberação do aciclovir seguiu um mecanismo de liberação que envolve diferentes processos, como, difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica. Os valores de k calculados foram similares em ambos os valores de pH analisados.

Tabela 5: Análises dos mecanismos de liberação envolvidos na liberação do ACV a partir das microesferas de malonilquitosana

Microesferas de malonilquitosana	n	k (min ⁻ⁿ)	r^2
pH 1,2	0,8474	1,5756	0,9863
pH 6,8	1,0491	1,4404	0,9975

Nota: n : expoente de liberação, k : constante de liberação, r^2 : coeficiente de correlação

5.2.8 Avaliação morfológica e tamanho de partícula

A análise de MEV foi realizada através de imagens produzidas pelos elétrons secundários. A grande vantagem da análise feita pela emissão dos elétrons secundários é que ela fornece uma análise da topografia (morfologia e porosidade) do material, pois apesar do feixe de elétrons incidente na amostra produzir elétrons secundários em todo o volume, somente aqueles que estiverem próximos à superfície é que serão emitidos e irão contribuir para a obtenção do sinal.

Na Figura 20 estão representadas as fotomicrografias do aciclovir (A), indicando que o fármaco se apresenta na forma de cristais ortorrômnicos. As fotomicrografias (B, C e D) demonstram a morfologia da superfície externa das

microesferas de malonilquitosana sem o fármaco (B) e impregnadas com o aciclovir (C e D). Estas indicam que as microesferas de malonilquitosana possuem uma boa esfericidade com a superfície lisa, poucos poros e diâmetro médio de aproximadamente 882 μm . Nas fotomicrografias (C, D) observa-se uma quantidade residual de fármaco na superfície, sendo este responsável pela rápida liberação do aciclovir que ocorre durante os primeiros minutos no ensaio de liberação. O mesmo fenômeno foi observado em outros sistemas poliméricos de liberação de fármacos (ZOLNIK e BURGUESS, 2007).

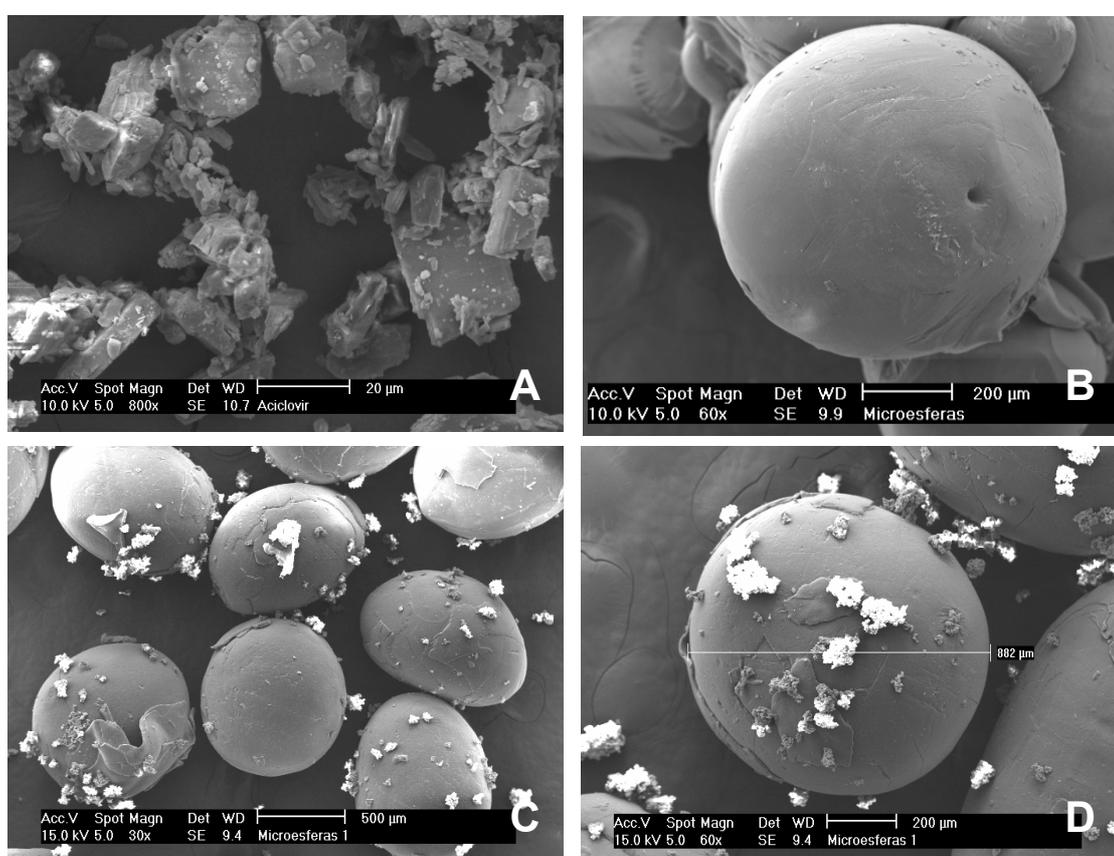


Figura 20. Fotomicrografias do aciclovir magnificação de 800 x (A), microesferas de malonilquitosana magnificação de 60 x (B), microesferas de malonilquitosana impregnadas com aciclovir em magnificação de 30 x (C) e 60 x (D)

As fotomicrografias da secção transversal (Figura 21 A, B) das microesferas de malonilquitosana apontam que as mesmas apresentam poucos poros internamente e uma estrutura compactada.

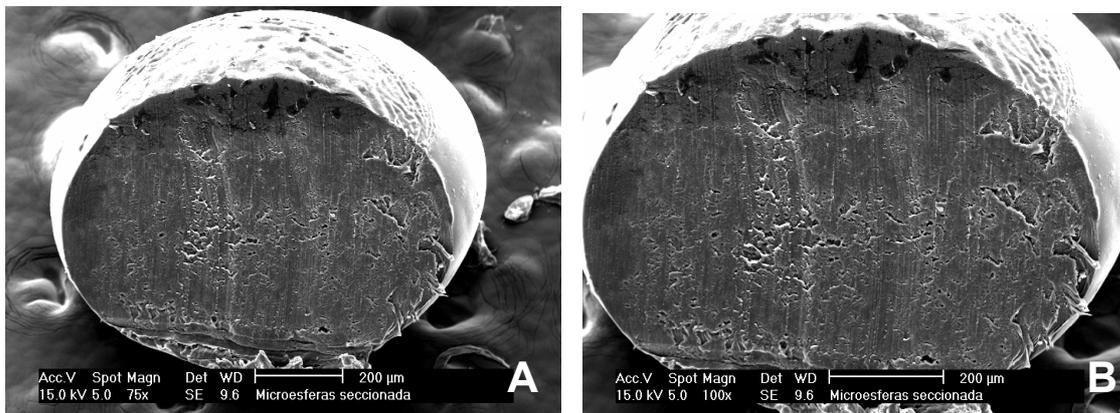


Figura 21. Fotomicrografias da secção transversal das microesferas de malonilquitosana em magnificação de 75 x (A) e 100 x (B)

Os resultados apresentados nesta secção foram publicados no periódico Carbohydrate Polymers. Artigo *In press* (Anexo I).

5.3 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de *spray drying* – Parte I (sem adição de agente reticulante)

5.3.1 Eficiência de encapsulação

A concentração de aciclovir encapsulado na formulação F1 e determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi de 92 % \pm 0,79 (n=3). Os resultados foram obtidos a partir da comparação dos dados com uma curva de calibração (1–10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $r^2 = 0.9999$).

5.3.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)

A curva DSC do aciclovir (Figura 22) conforme apresentado no item 5.1.4, evidenciou um evento endotérmico referente ao ponto de fusão do fármaco em 256,7 °C ($T_{\text{pico}} = 256,7 \text{ °C}$, $\Delta H_{\text{fusão}} = -125,29 \text{ J/g}$). Para a quitosana foi observado um pequeno evento endotérmico relacionado à evaporação de água na faixa de temperatura entre 90 °C e 110 °C ($\Delta H = -21,8 \text{ J/g}$), em temperatura acima de 270 °C ocorreu o processo de decomposição térmica. Na curva DSC da formulação F1 pode-se observar o desaparecimento do pico característico da fusão do fármaco, a mesma apresenta um evento endotérmico na faixa de temperatura de 43 °C a 52 °C ($\Delta H = 50,5 \text{ J/g}$), que provavelmente está relacionado a perda de água e líquidos residuais remanescentes do processo de desenvolvimento da formulação.

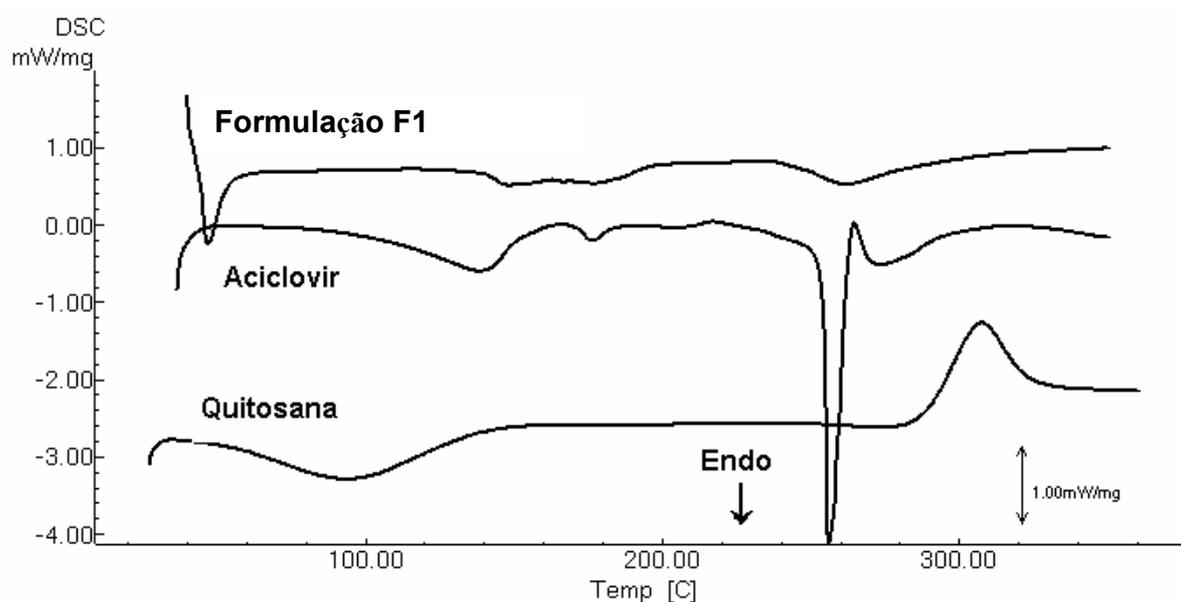


Figura 22. Curvas DSC do aciclovir, quitosana e formulação F1 obtidas sob razão de aquecimento de 2 °C min⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min⁻¹)

As curvas TG obtidas para amostra estão representadas na Figura 23. O aciclovir apresentou dois eventos de perda de massa, o primeiro na região entre 269,62 °C e 330,45 °C ($\Delta m = 24,13\%$) e o segundo na região compreendida entre 435 °C e 514 °C ($\Delta m = 16,03\%$). A curva TG da quitosana apresenta um único evento de perda de massa na faixa de temperatura compreendida entre 237,87 °C e 349,6 °C ($\Delta m = 54,92\%$). A formulação F1 apresentou-se termicamente estável até a temperatura de 242,4 °C, após esta iniciou-se um evento de decomposição até 449,66 °C. Dessa forma, sugere-se que não ocorreu uma diminuição significativa da estabilidade térmica da formulação em relação ao fármaco e ao polímero isolados.

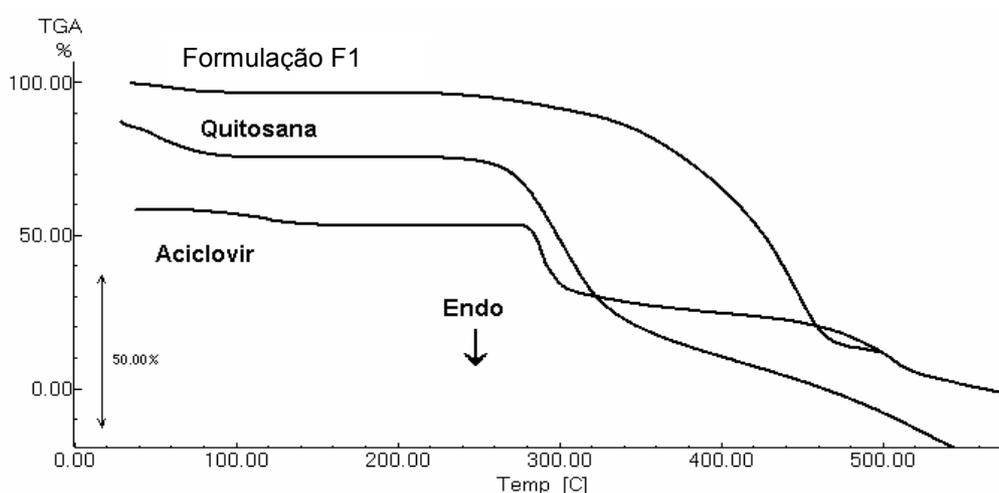


Figura 23. Curvas TG do aciclovir, quitosana e formulação F1, obtidas sob razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1})

5.3.3 Difração de raios-X de pó (DRX)

A difração raios-X de pó é uma técnica que permite a identificação e descrição precisa de substâncias cristalinas, que pode ser demonstrada conforme estudos realizados por Marona e colaboradores (2004), que determinaram a estrutura cristalina da flutamida. A técnica consiste na incidência da radiação em uma amostra e na detecção dos fótons difratados, que constituem o feixe difratado. Em um material onde os átomos estejam arranjados periodicamente no espaço, característica das estruturas cristalinas, o fenômeno da difração de raios-X ocorre

nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg (RIBBAS e RIZZUTO, 1996).

Os cristais contêm arranjos ordenados de moléculas e átomos, mantidos em contato por interações não covalentes. Um sólido amorfo é caracterizado pelo estado desorganizado ou randômico de suas moléculas (FLORENCE e ATWOOD, 2003).

Considerações entre estados cristalinos e amorfos são importantes em relação ao processo de absorção. Sólidos amorfos são, geralmente, mais absorvidos que sólidos no estado cristalino. Tal fato baseia-se na energia envolvida no processo de dissolução, pois em um sólido amorfo as moléculas são arranjadas ao acaso e, portanto, baixa energia é requerida para separá-las, conseqüentemente a dissolução é mais rápida. Assim, o desenvolvimento de formulações contendo o fármaco na forma amorfa é frequentemente benéfico nos termos de dissolução e biodisponibilidade (AMIDON et al., 2000).

O aciclovir possui características cristalinas, que no difratograma (Figura 24) se apresentam sob a forma de picos. Neste estudo foram tomados como referência os picos com maior intensidade relativa para o fármaco puro que correspondem a $2\theta = 4,18; 9,36; 19,73; \text{ e } 23,40$.

As amostras de polímeros podem ser encontradas em diversos graus de organização de suas cadeias poliméricas. Uma amostra onde as cadeias encontram-se totalmente desorganizadas é denominada amorfa (ASADA et al., 2004). A Figura 24 indica o comportamento amorfo da quitosana. No difratograma, observa-se que a formulação F1 não apresentou os picos relativos ao aciclovir, indicando que o mesmo foi modificado para a forma amorfa, condizendo com os resultados obtidos por calorimetria exploratória diferencial.

Este fenômeno pode ser atribuído à secagem por *spray drying*, técnica que frequentemente produz compostos amorfos, devido ao rápido processo de secagem,

o que impede a organização de uma fase cristalina. O mesmo comportamento foi observado por outros autores, envolvendo o uso de polímeros e subsequentemente a nebulização em *spray-drying* (SHU et al., 2006).

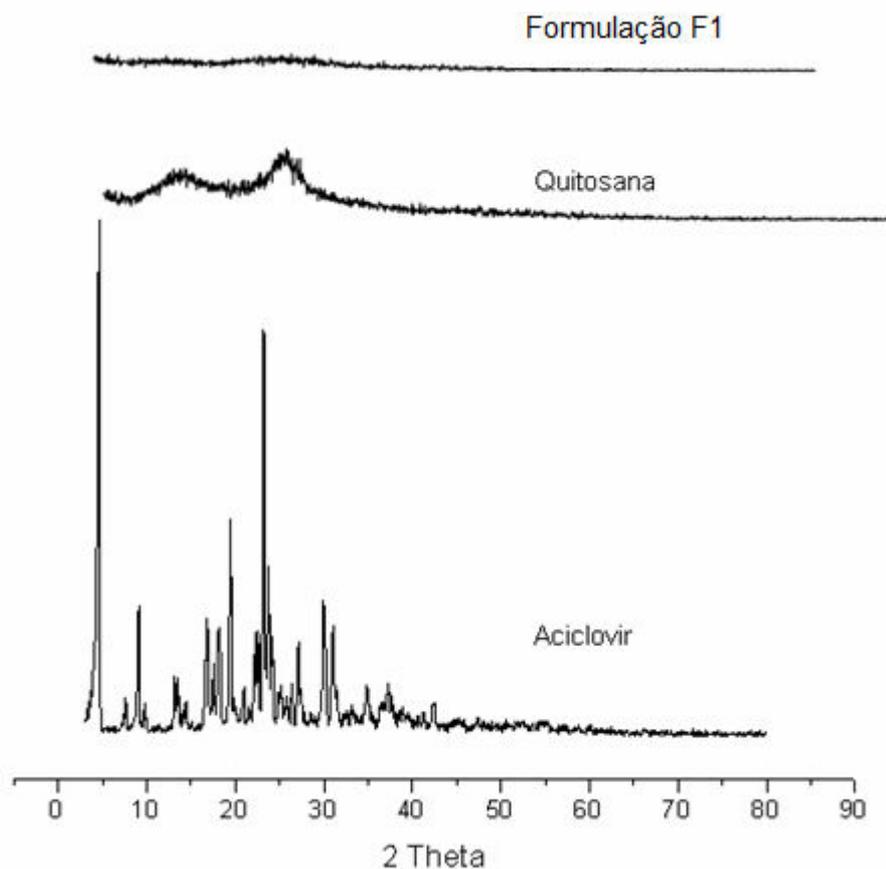


Figura 24. Difratogramas obtidos para o aciclovir, quitosana e formulação F1

5.3.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O espectro na região do infravermelho do aciclovir já foi abordado anteriormente no item 5.1.2 estando de acordo com o apresentado na literatura.

No espectro infravermelho da quitosana (Figura 25), observa-se uma banda na região de 3437 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação -OH , de modo que as bandas em 2924 e 2881 cm^{-1} são bandas atribuídas ao estiramento C-H. As bandas em 1656 e 1537 cm^{-1} referem-se ao estiramento C=O de amida secundária e as

vibrações de deformação N-H de amina primária, respectivamente. Na região de 1375 cm^{-1} ocorre a vibração referente à vibração C-H do grupo CH_3 , do grupo acetamido remanescente na cadeia polimérica, em 1086 cm^{-1} , ocorre o estiramento C-O de álcool primário. O espectro IV da formulação F1 é praticamente uma sobreposição dos espectros isolados do aciclovir e da quitosana, indicando que não ocorre nenhuma interação química entre os mesmos.

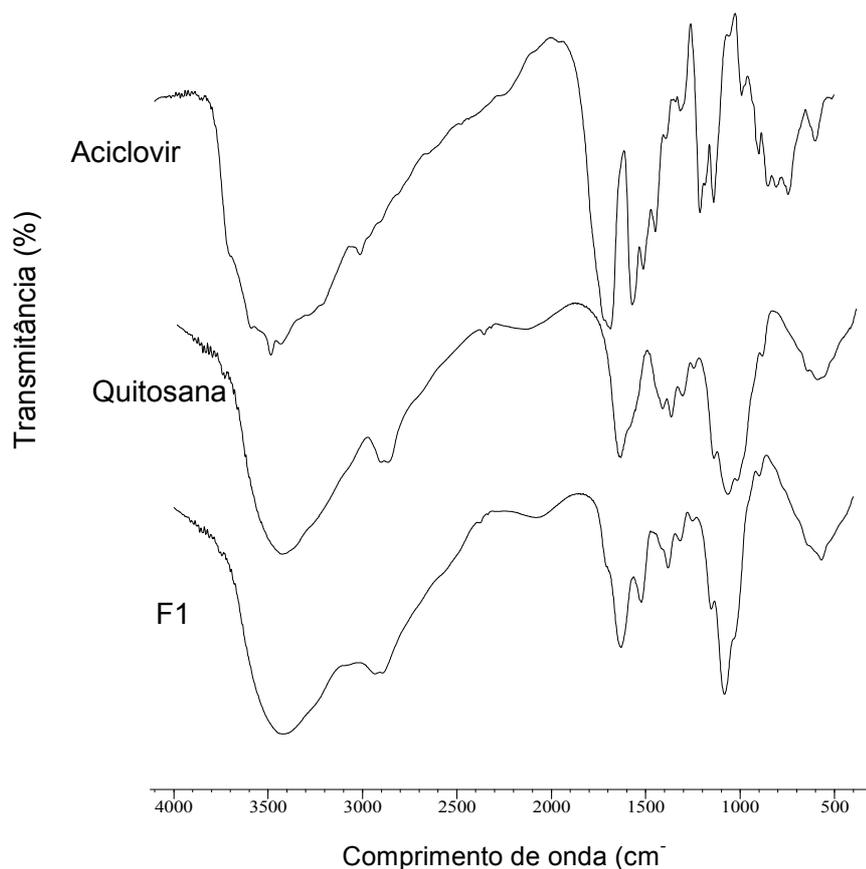


Figura 25. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana e formulação F1 obtidos em pastilha de KBr

5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV indicaram que a formulação F1 (Figura 26 A e B) apresentou formato arredondado e com a superfície interna côncava com tamanho médio de partícula de $5,52 \pm 1,8\ \mu\text{m}$.

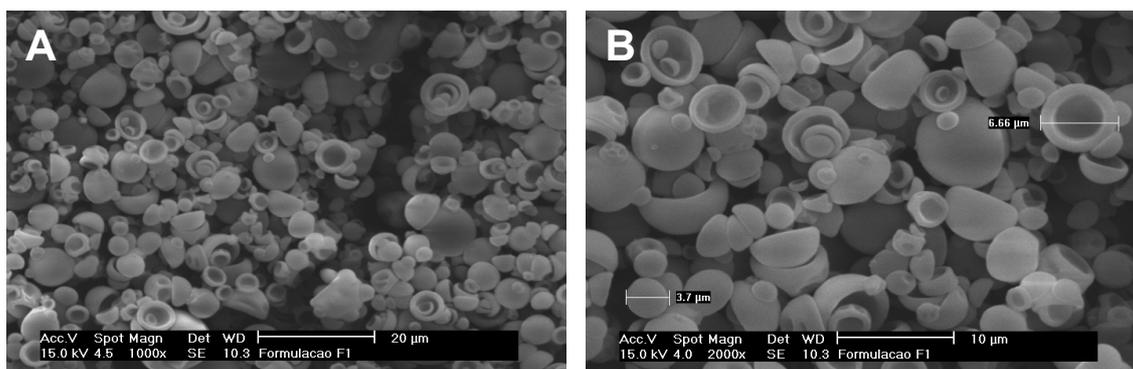


Figura 26. Fotomicrografias da formulação F1 magnificação de 1000 x (A) e 2000 x (B)

5.3.6 Perfil de liberação

Para que uma substância seja absorvida a partir da mucosa gastrintestinal, esta precisa estar dissolvida. A dissolução é o processo através do qual uma substância sólida interage com um solvente para formar uma solução (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). A Farmacopéia Americana (2007) preconiza a liberação de no mínimo 80 % de aciclovir em 45 minutos, presente em comprimidos de liberação imediata. O perfil de liberação (Figura 27) realizado em pH 1,2 e 6,8 da formulação F1, indicou que 80 % do aciclovir foi liberado por um período de 120 minutos.

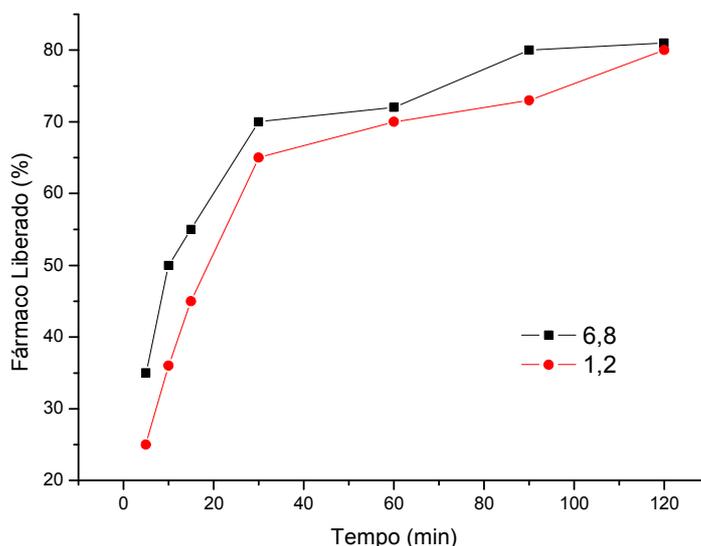


Figura 27. Perfil de liberação da formulação F1 em pH 1,2 e 6,8

O estabelecimento do perfil de dissolução permite caracterizar a ordem cinética do processo e sua constante de velocidade, além do tempo necessário para

que determinadas porcentagens de fármaco se dissolvam. Permite ainda quantificar o tempo de latência (tempo para que o fármaco comece a se dissolver) e detectar alterações cinéticas durante o processo (SHARGEL e ANDY, 2004).

Existem diversos modelos propostos para descrever e analisar o perfil de liberação de fármacos. A interpretação quantitativa dos valores obtidos em um ensaio de dissolução é facilitada através do emprego de uma equação matemática, capaz de transformar a curva de dissolução em função de algum parâmetro relatado para a formulação em análise. O tipo de fármaco, polimorfismo, cristalinidade, tamanho de partícula, solubilidade e quantidade presente na formulação podem influenciar o perfil de dissolução desse fármaco (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; NETZ e ORTEGA, 2002). Os modelos matemáticos aplicados na formulação desenvolvida foram; ordem zero, primeira ordem e Higuchi.

A formulação F1 em ambos os meios de dissolução (pH 1,2 e 6,8) apresentou como o mecanismo envolvido na liberação do fármaco o modelo proposto por Higuchi, que correlaciona a raiz quadrada do tempo *versus* a porcentagem de fármaco dissolvida, que de forma geral é um modelo adequado a formulações destinadas a liberar o fármaco lentamente (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; STULZER e SILVA, 2007). Os coeficientes de correlação obtidos estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores dos coeficientes de correlação obtidos para os três modelos matemáticos utilizados na linearização das curvas de dissolução

Ordem da reação	pH 1,2	pH 6,8
Ordem zero	0,8819	0,8684
Primeira ordem	0,9395	0,9312
Higuchi	0,9434	0,9331

Os resultados alcançados durante esta primeira etapa de pré-formulação apontaram que ocorreram modificações na estrutura cristalina do fármaco, fazendo com que o mesmo se tornasse mais solúvel. Fato este, que também pode ter influenciado no processo de liberação do aciclovir. Tendo em vista, o objetivo de se

desenvolver uma formulação que proporcionasse maiores tempos de liberação procedeu-se o desenvolvimento das demais formulações com o acréscimo de tripolifosfato.

Esse agente reticulante foi previamente utilizado com sucesso para reticular a quitosana na forma de micropartículas, para liberação prolongada do acetaminofeno (DESAI e PARK, 2005)

Os resultados apresentados nesta secção foram publicados no periódico *Latin American Journal of Pharmacy*, volume 26 (6), p.866-871 (2007) (Anexo II).

5.4 Caracterização das micropartículas produzidas pela técnica de *spray drying* – Parte II (com adição de agente reticulante)

5.4.1 Eficiência de encapsulação

A concentração de aciclovir encapsulado nas micropartículas produzidas na segunda etapa deste trabalho está descrito na Tabela 7. Os dados demonstram que os melhores resultados obtidos para o ensaio de eficiência de encapsulação média foi para a formulação F5. Através da comparação entre a composição das formulações e os resultados obtidos, nota-se que ocorreu um aumento de fármaco encapsulado de acordo com o aumento da relação polímero/fármaco. Assim, uma maior quantidade de polímero encapsulou uma maior quantidade de fármaco. Resultados similares foram observados por Kim e colaboradores (2006) na encapsulação de retinol com quitosana.

Tabela 7: Resultado do ensaio de eficiência de encapsulação obtidos para as formulações desenvolvidas pela técnica de *spray-drying*- Parte II

Formulação	Eficiência de Encapsulação (média)	Desvio padrão relativo (D.P.R)
F2	86,4 %	± 0,79
F3	79,7 %	± 0,86
F4	73,8 %	± 0,99
F5	92,5 %	± 1,07
F6	90,6 %	± 0,88

n= 3 determinações

5.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG)

As curvas DSC das formulações F2, F3 e F4 (Figura 28) apresentaram na faixa de temperatura entre 61 °C a 95 °C um evento endotérmico, que provavelmente está relacionado à umidade (água e solventes remanescentes) presentes nas amostras. O pico de fusão característico do fármaco, não pode ser constatado nas

curvas apresentadas pelas formulações. Entretanto, um evento endotérmico pouco definido em torno de 220 °C pode ser observado.

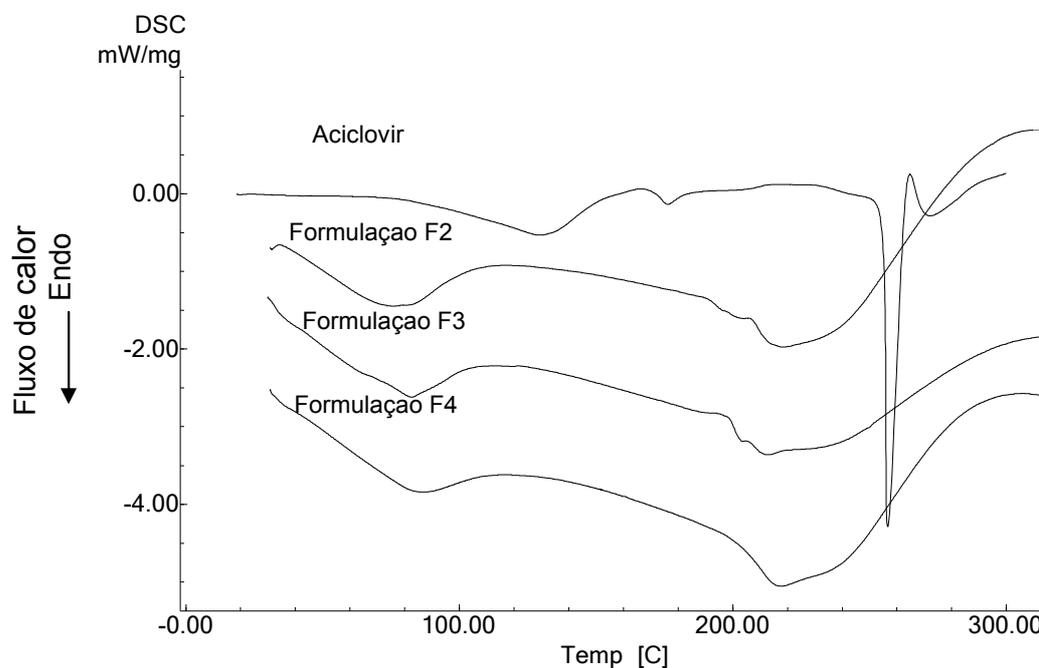


Figura 28. Curvas DSC do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4, obtidas sob razão de aquecimento de 2 °C min⁻¹ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min⁻¹)

A Figura 29 representa as curvas DSC obtidas para as formulações F5 e F6 desenvolvidas pela técnica de *spray-drying*. As mesmas apontaram um evento endotérmico mais acentuado em torno de 215 °C, esses resultados podem estar relacionados a alguns fatores. Entre os mais evidentes, citam-se, a transformação parcial do aciclovir para a forma amorfa com conseqüente deslocamento/diminuição do pico característico de fusão do fármaco. Ainda, pode-se suspeitar da ocorrência de alguma interação química entre o fármaco e o polímero, promovendo assim o deslocamento/diminuição do pico de fusão.

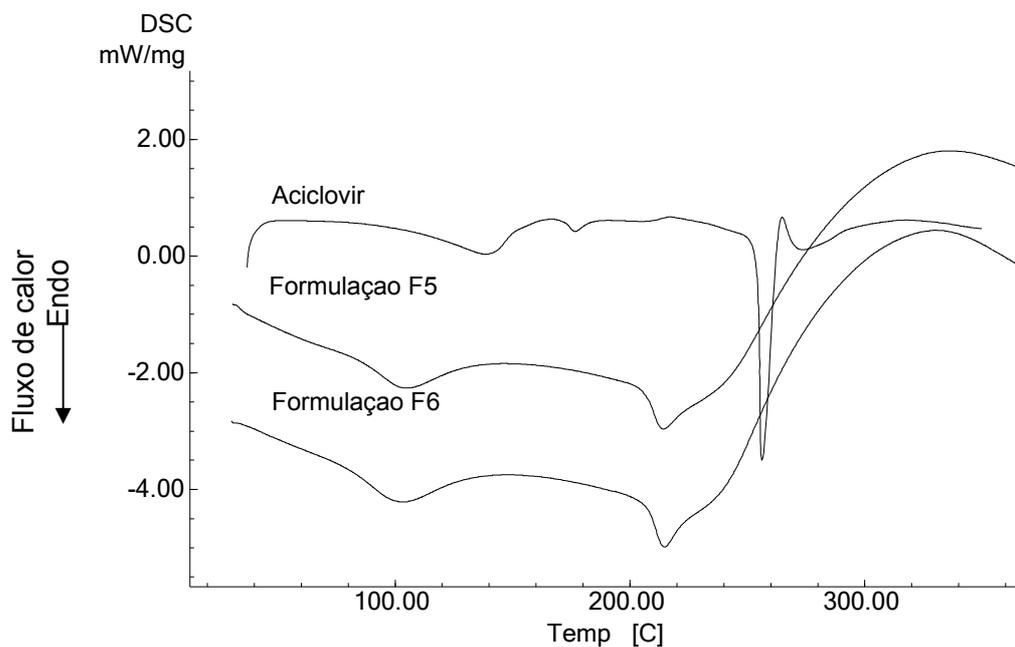


Figura 29. Curvas DSC do aciclovir, quitosana, formulações F5 e F6, obtidas sob razão de aquecimento de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL min^{-1})

Através das curvas TG (Figuras 30 e 31), constata-se que todas as formulações demonstraram estabilidade térmica até temperatura de $221,3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, ocorreram eventos de perda de massa com $\Delta m = 22,13\%$ (F2); $25,52\%$ (F3); $24,52\%$ (F4), $25,36\%$ (F5) e $24,95\%$ (F6).

Os resultados foram similares com o demonstrado para a formulação F1 (item 5.3.2), ou seja, não ocorreu diminuição significativa da estabilidade das formulações em comparação com o fármaco isolado e o polímero.

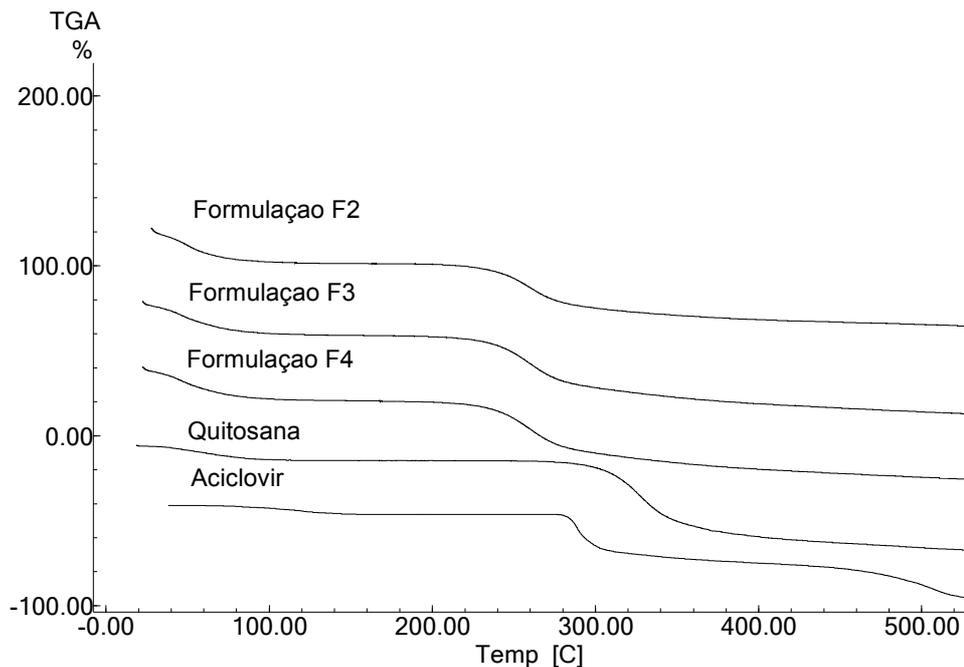


Figura 30. Curvas TG do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4, obtidas sob razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1})

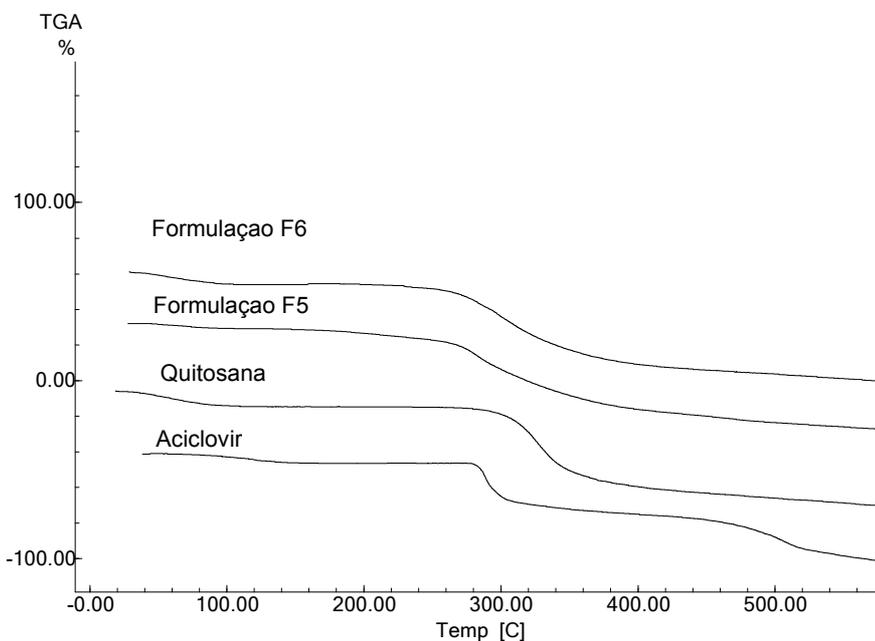


Figura 31. Curvas TG do aciclovir, quitosana, formulações F5 e F6, obtidas sob razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL min^{-1})

5.4.3 Difração de raios-X de pó (DRX)

A técnica de microencapsulação por *spray-drying*, frequentemente, produz compostos com características amorfas, devido ao rápido processo de secagem, conforme citado no item 5.3.3 (CHAUHAN; SHIMPI; PARADKAR, 2005).

As análises de DRX das formulações produzidas na segunda etapa deste trabalho estão representadas na Figura 32. Da mesma forma que ocorreu com a formulação F1, os difratogramas das formulações F2, F3 e F4 não apresentaram os picos relativos ao aciclovir. Assim, novamente os dados sugerem e condizem com os ensaios de DSC, indicando que o aciclovir presente nas formulações foi alterado para a forma amorfa.

Entretanto, as formulações F5 e F6 mantiveram alguns picos característicos presentes no aciclovir isolado, indicando que ocorreu uma modificação parcial do aciclovir para forma amorfa. Fato previamente suposto pela análise de DSC.

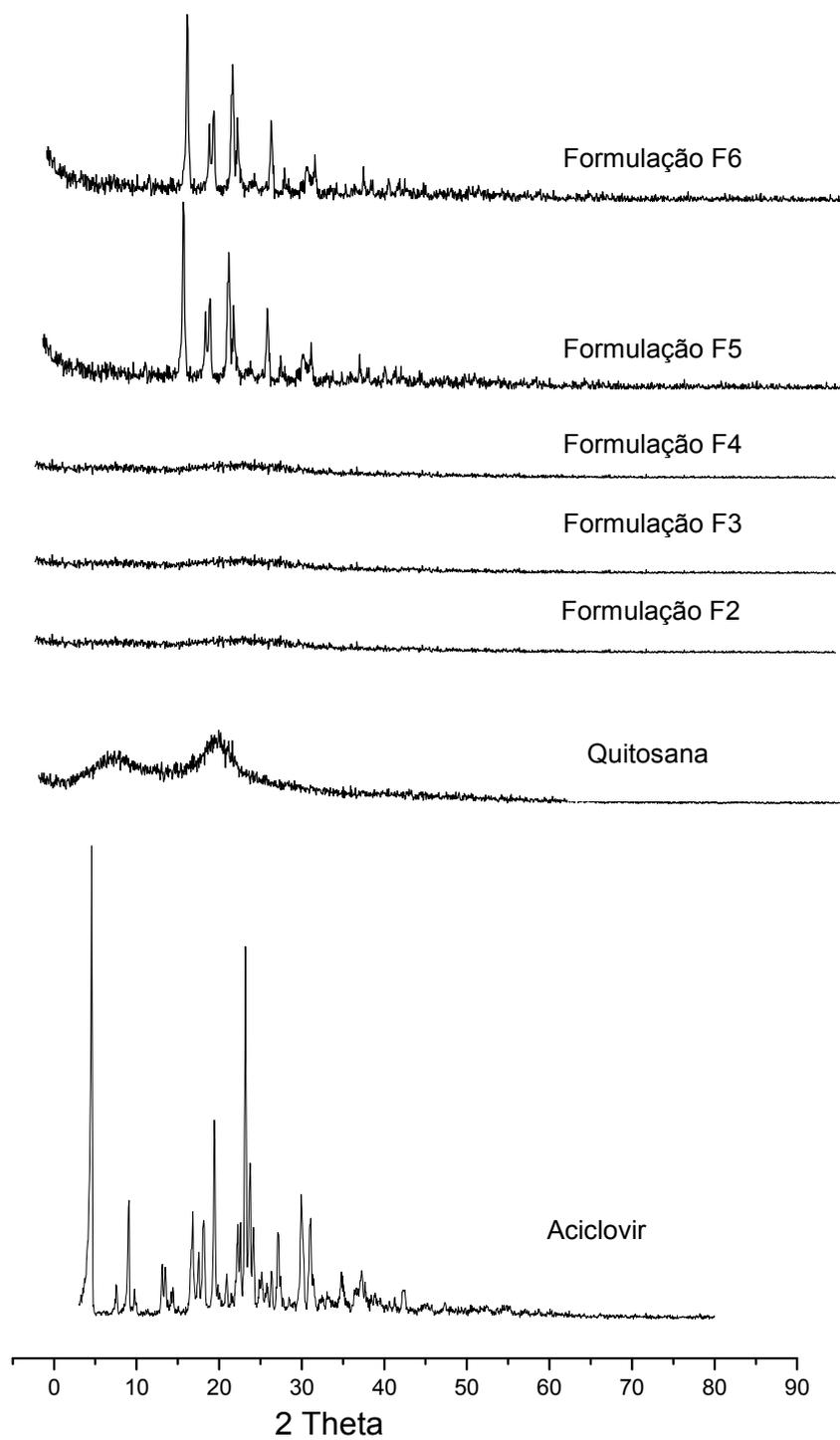


Figura 32. Difratomogramas obtidos para o aciclovir, quitosana, formulações F2, F3, F4, F5 e F6

5.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros IV das formulações F2, F3 e F4 (Figura 33) são uma sobreposição dos espectros isolado do aciclovir e da quitosana, ambos descritos anteriormente nos itens 5.1.2 e 5.3.4. Assim, não se pode evidenciar nenhuma interação química entre o aciclovir e os demais constituintes das formulações.

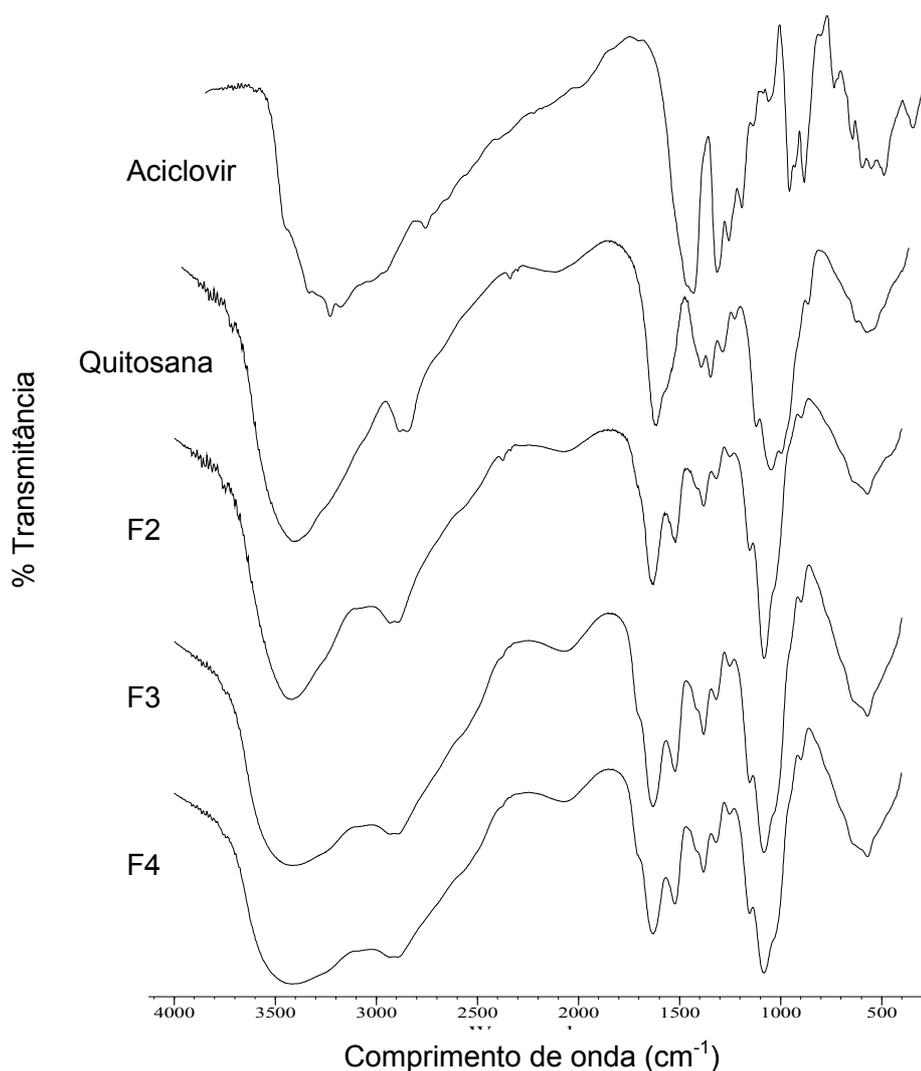


Figura 33. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana, formulações F2, F3 e F4 obtidos em pastilhas de KBr

Para as formulações F5 e F6, os espectros IV estão representados na Figura 34. Através destes foi possível constatar que novamente não ocorreram mudanças significativas em relação aos espectros dos compostos isolados.

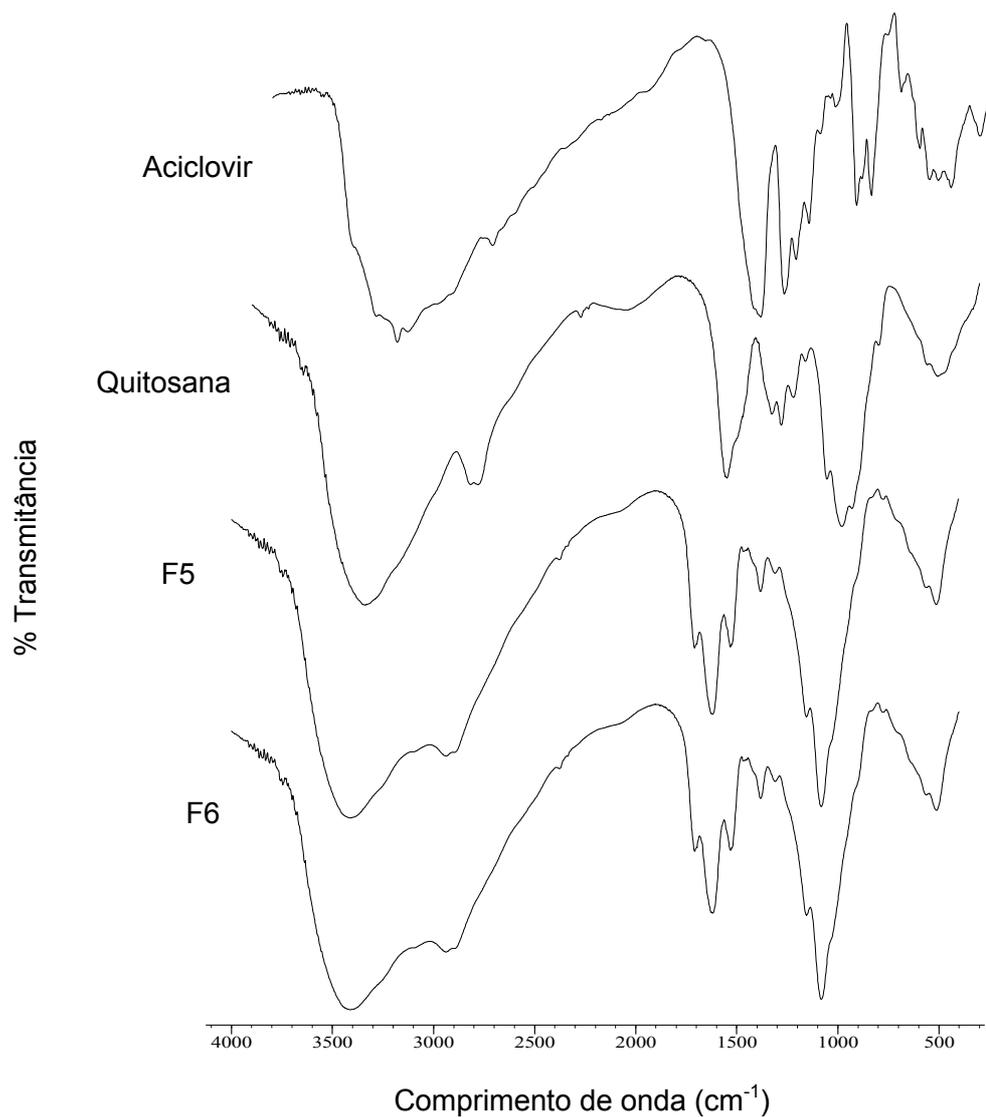


Figura 34. Espectros Infravermelhos do aciclovir, quitosana, formulações F5 e F6 obtidos em pastilhas de KBr

5.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

De acordo com as fotomicrografias apresentadas na Figura 35, visualiza-se que as formulações, de um modo geral, apresentaram tamanho médio de partícula e morfologia bastante variado. As formulações F2 e F3 demonstraram ser disformes e com a superfície interna côncava. O tamanho médio de partícula das mesmas foi igual a $6,71 \pm 2,7 \mu\text{m}$ e $4,93 \pm 1,9 \mu\text{m}$, respectivamente. A formulação F4 apresentou maiores diferenças entre as partículas, apresentando aspecto bastante irregular e tamanho médio de $3,98 \pm 2,5 \mu\text{m}$.

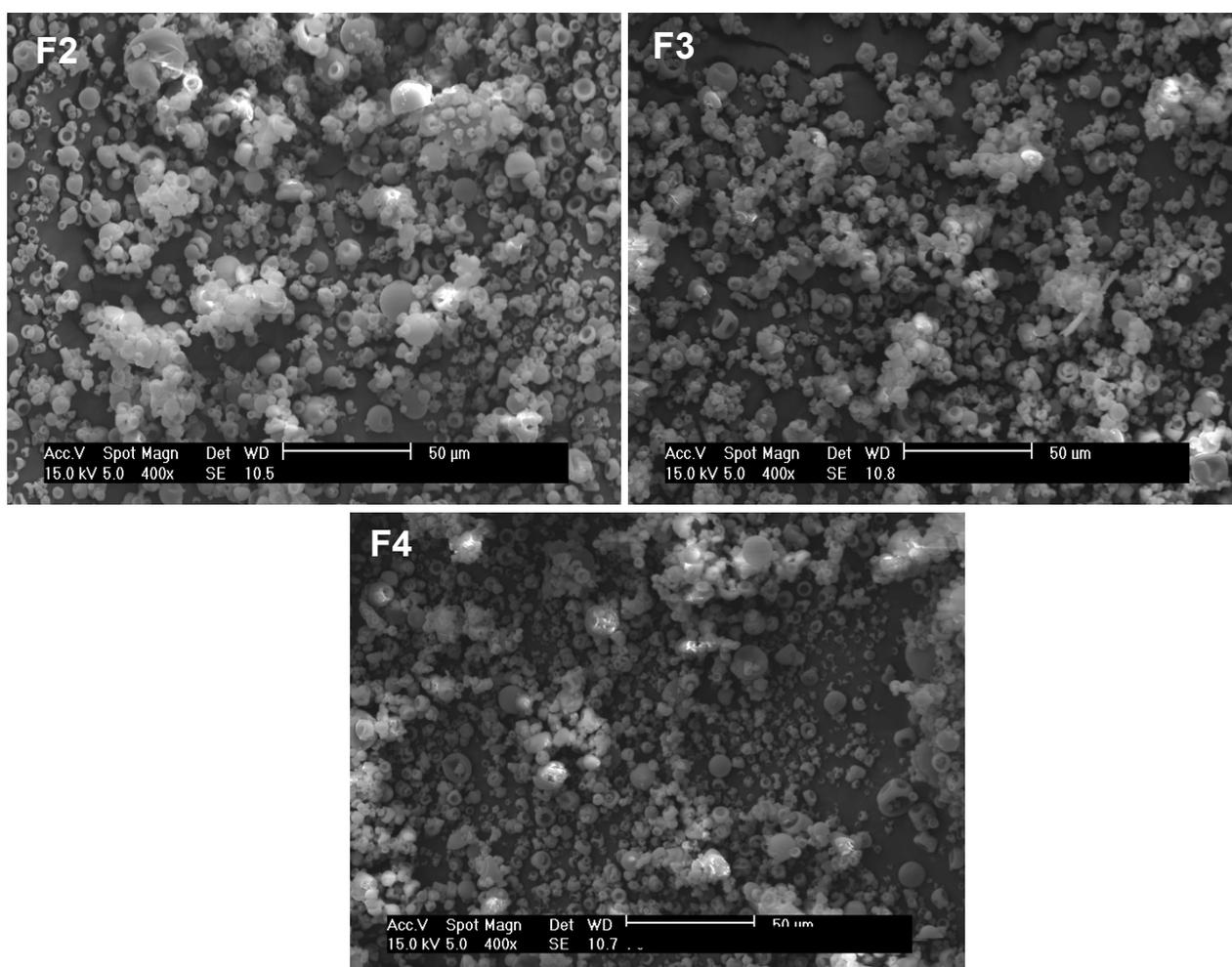


Figura 35. Fotomicrografias das formulações F2, F3 e F4, magnificação de 400 x

As fotomicrografias das formulações F5 e F6 apresentaram aspecto arredondado com tamanho médio de partícula de $4,78 \pm 1,8 \mu\text{m}$ e $5,07 \pm 1,8 \mu\text{m}$, respectivamente (Figura 36).

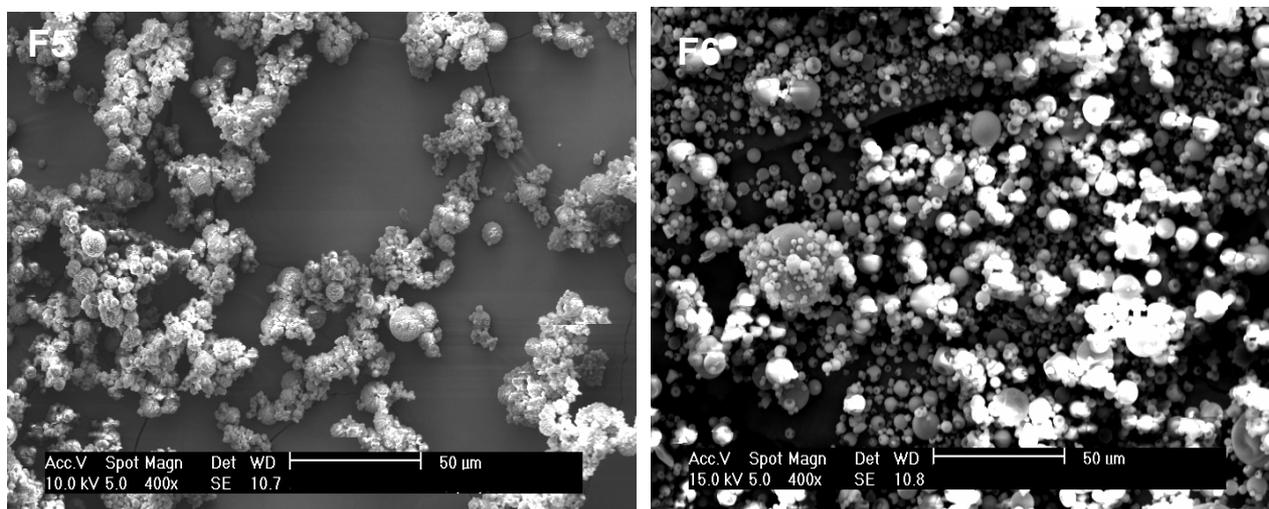


Figura 36. Fotomicrografias das formulações F5 e F6 magnificação de 400 x

5.4.6 Termogravimetria (TG) modo isotérmico

Com o objetivo de verificar a influência do processo de microencapsulação por *spray-dryer* na estabilidade das formulações, procedeu-se a avaliação através de isotermas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera de oxigênio, para simular as condições na qual a amostra permaneceu no equipamento até o término do processo.

As curvas isotermas (Figura 37) indicam que todas as formulações foram estáveis por um período de 4 horas. Assim, pode-se concluir que as amostras não apresentam decomposição térmica durante o processo.

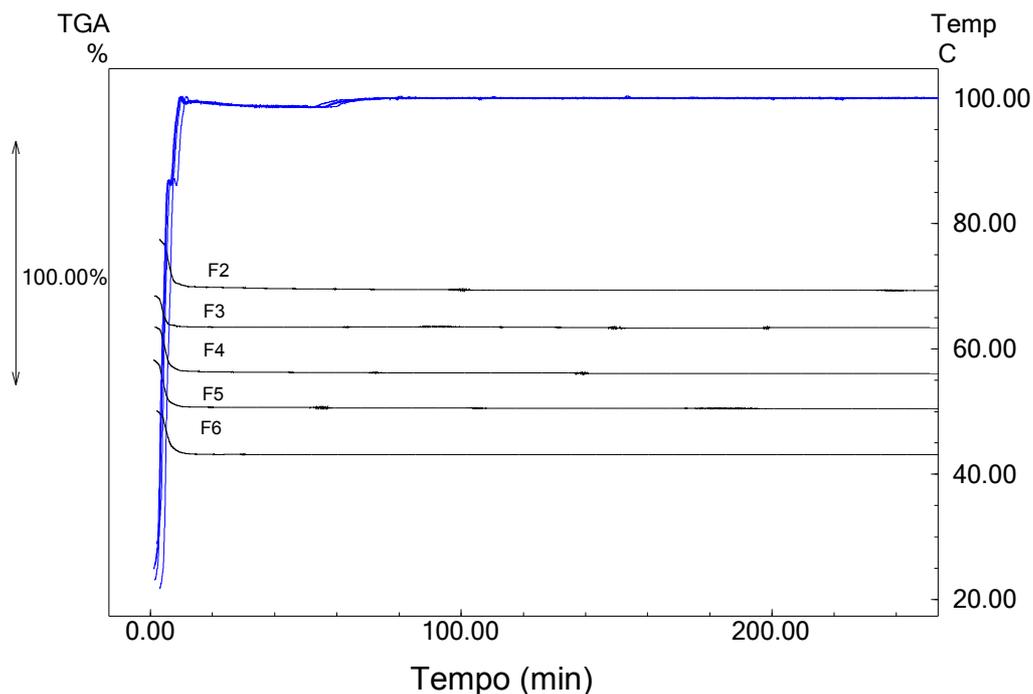


Figura 37. Isotermas obtidas através de análise termogravimétrica em atmosfera de oxigênio ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)

5.4.7 Perfil de Liberação

O perfil de dissolução pode ser empregado no desenvolvimento e otimização de formulações, estabelecimento do modelo cinético de dissolução e estudos preliminares de bioequivalência (STORPIRTIS et al.,1999). O ensaio de liberação das formulações realizado em pH 1,2 e 6,8 está representado nas Figuras 38 e 39.

O comportamento das formulações em ambos os valores de pH foram similares. A formulação F2 liberou 80 % do teor de aciclovir em aproximadamente 210 min em pH 1,2 e 240 min em pH 6,8. As formulações F3 e F4 promoveram a liberação de igual quantidade de fármaco por 180 e 150 min, respectivamente, em ambos valores de pH. Para as formulações F5 e F6, o tempo de liberação foi superior. As mesmas liberaram 80 % do aciclovir por períodos de 300 e 270 min em pH 1,2 e 330 e 300 min em pH 6,8.

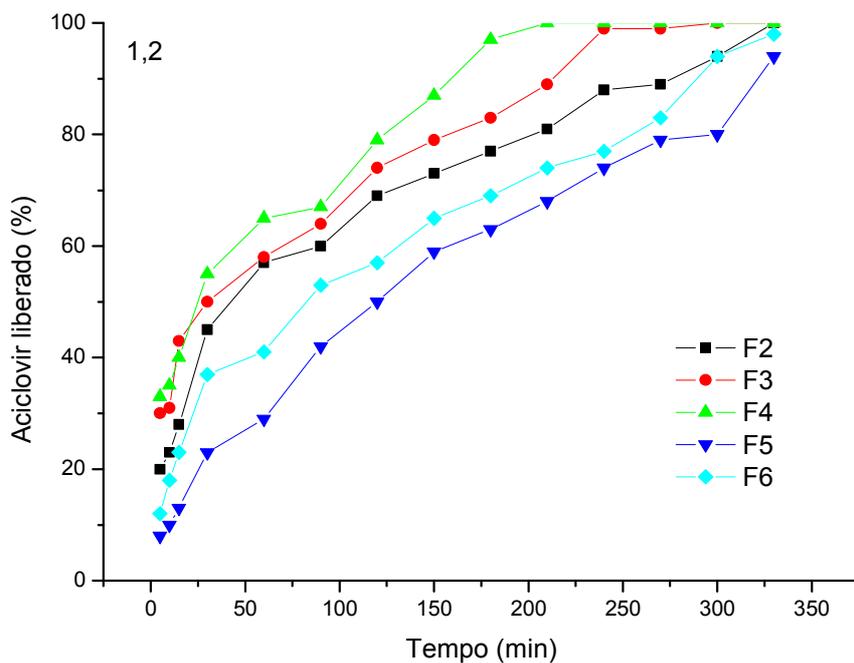


Figura 38. Perfil de liberação das formulações F2, F3, F4, F5 e F6 em pH 1,2

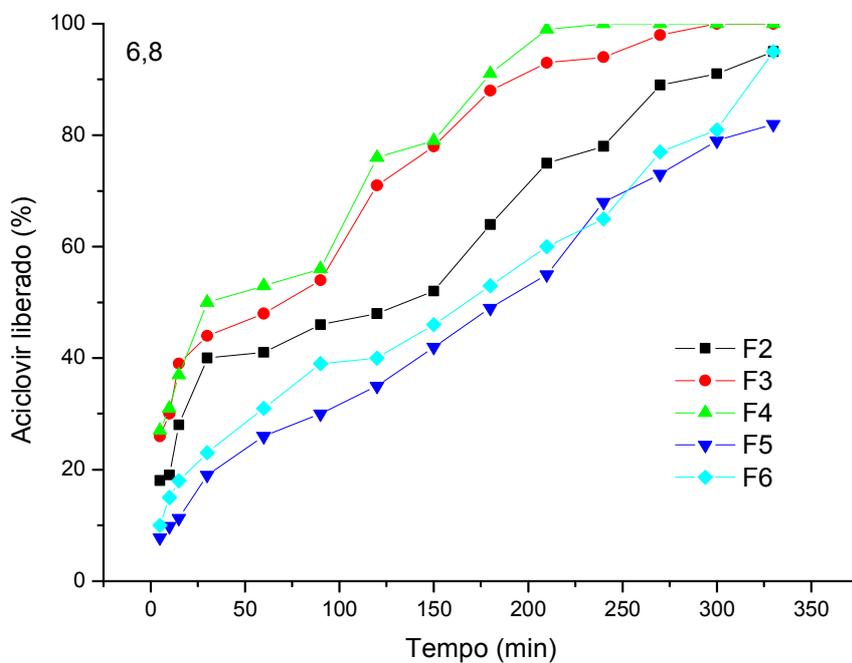


Figura 39. Perfil de liberação das formulações F2, F3, F4, F5 e F6 em pH 6,8

Uma formulação de liberação prolongada ideal é aquela em que o fármaco é liberado constantemente do início ao fim, seguindo um modelo cinético de ordem zero. Entretanto, muitas vezes as formulações de liberação prolongada seguem o modelo cinético proposto por Higuchi, que descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo. Já as formulações de liberação imediata, na maioria dos casos, seguem o modelo de primeira ordem (PATHER et al., 1998; CHAMBIN et al., 2004).

Os modelos matemáticos testados para descrever a cinética de dissolução das formulações de liberação prolongada foram Higuchi e as cinéticas de ordem zero e primeira ordem.

O tratamento matemático das curvas de dissolução demonstrou que o modelo mais adequado para descrever a cinética de dissolução das formulações em pH 1,2 foi o de Higuchi, para todas as amostras. Em pH 6,8, as formulações F5 e F6, apresentaram uma cinética de ordem zero, e as formulações F2, F3 e F4 seguiram o modelo de Higuchi. Os coeficientes de correlação obtidos estão representados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores dos coeficientes de correlação obtidos para os três modelos matemáticos utilizados na linearização das curvas de dissolução

pH 1,2	Formulação F2	Formulação F3	Formulação F4	Formulação F5	Formulação F6
Ordem zero	0,9244	0,8948	0,9865	0,9802	0,9188
Primeira ordem	0,9100	0,9219	0,9937	0,9902	0,9508
Higuchi	0,9417	0,9410	0,9943	0,9988	0,9689
pH 6,8					
Ordem zero	0,9523	0,9156	0,8921	0,9946	0,9793
Primeira ordem	0,9509	0,9395	0,9109	0,9887	0,9685
Higuchi	0,9681	0,9606	0,9486	0,9718	0,9691

Através dos resultados obtidos na segunda etapa de desenvolvimento das formulações por *spray-dryer*, pode-se avaliar a influência da relação

polímero/fármaco e a adição do tripolifosfato na liberação do fármaco com os resultados obtidos na primeira etapa (Tabela 9).

Tabela 9: Dados comparativos entre as formulações desenvolvidas pela técnica de *spray-drying*

Formulação	Relação Quitossana/Aciclovir (mg)	Relação Quitossana(g)/Tripoli fosfato(mL)	Tempo médio de liberação (min) pH 1,2	Tempo médio de liberação pH 6,8 (min)
F1	1000:50	-----	120	120
F2	1000:100	1:1	210	240
F3	1000:150	1:1	180	180
F4	1000:200	1:1	150	150
F5	1000:50	1:1	300	330
F6	1000:75	1:1	270	300

De um modo geral, as formulações que apresentavam a maior quantidade de polímero na forma reticulada em relação à concentração de fármaco, foram as que proporcionaram maiores tempos de liberação. Os resultados demonstram que o polímero reticulado requer concentrações inferiores a 150 mg de fármaco para 1 grama de quitossana para promover melhores perfis de liberação. Por outro lado, o polímero na forma não reticulada em concentrações elevadas em comparação com o fármaco, não proporcionou tempos de liberação acima de 120 minutos (F1).

Assim, pode-se concluir que a concentração de polímero em relação ao fármaco bem como a adição de agente reticulante influencia no processo de liberação. Cabe ainda salientar, que o fato das formulações F5 e F6 apresentarem um maior tempo de liberação em relação às demais, pode estar também relacionado às outras diferenças físico-químicas apresentadas pelas mesmas, verificadas pelos ensaios de DSC e DRX.

5.5 Estudos de estabilidade acelerada

5.5.1 Considerações Gerais

Os testes de estabilidade são empregados no desenvolvimento de medicamentos a fim de evitar problemas posteriores, sendo considerada uma fase importante no desenvolvimento de um novo produto. Estes são realizados para reduzir ou prevenir a ocorrência de deterioração devido à hidrólise, oxidação e outros processos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Em se tratando de produtos farmacêuticos, a estabilidade pode ser conceituada como o espaço de tempo em que o referido produto, em sua embalagem específica, apresenta suas características físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas dentro dos limites estabelecidos, garantindo a sua qualidade (LINTNER, 1995; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

Para determinar a estabilidade de um produto formulado é comum expô-lo à condições intensas de *stress*, ou seja, condições de temperatura, umidade e intensidade de luz que se conheça, da experiência, que provavelmente causam a decomposição deste. Condições elevadas de *stress* aumentam a decomposição do produto e, portanto, reduzem o tempo necessário para o teste. O ensaio concomitante da amostras sob condições normais de temperatura e umidade também é aconselhável se realizar (AULTON, 2005).

Muitos dos processos de decomposição aplicam-se, de modo geral, quando o fármaco estiver em solução. Porém, em todas as formulações há alguma umidade livre (devida tanto aos excipientes quanto ao fármaco). Essa água livre age como vetor para reações químicas entre o fármaco e adjuvantes. Deste modo, é de fundamental importância a determinação da estabilidade de sistemas microencapsulados no estado sólido. Principalmente, quando os mesmos foram desenvolvidos em *spray-dryer*, uma vez que os produtos resultantes apresentam

elevada higroscopicidade, o que pode facilmente desencadear processos de decomposição (LEUNER e DRESSMAN, 2000).

A instabilidade das formulações farmacêuticas pode ser detectada em alguns casos por uma mudança na aparência física, na cor, no odor e no gosto, enquanto em outros casos, podem ocorrer alterações químicas que não são evidentes e que só podem ser determinadas por metodologias específicas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde pequenas quantidades de substâncias podem ser detectadas.

As formulações foram armazenados em câmara climática a 40 ± 2 °C e 75 ± 5 % de umidade relativa, bem como em temperatura e umidade ambiente. O teor de aciclovir foi avaliado por CLAE, em tempos pré-determinados, durante o período de 6 meses, conforme metodologia validada e descrita no item 5.6.

5.5.2 Estabilidade do aciclovir

Os estudos de estabilidade sob condições de “stress” são recomendados pela ICH (2005), sendo que estes foram realizados por Sinhá e colaboradores para o aciclovir. Os ensaios foram feitos sob diferentes condições como hidrolítica, oxidativa, fotolítica e degradação térmica.

Os resultados indicaram que o fármaco em condições neutras (água) não sofre degradação significativa. Entretanto, em condições ácidas ($\text{HCl } 2 \text{ mol.L}^{-1}$) sob aquecimento (80 °C, durante 2 horas) ocorre hidrólise do fármaco. Em condições alcalina o aciclovir se demonstrou estável em comparação à condição ácida.

A degradação em condições oxidativas ocorreu totalmente após o aumento da concentração do agente oxidativo H_2O_2 para 10 % e 30 %. Porém em concentrações inferiores, 1% de H_2O_2 , não foram observadas degradações significativas. Os ensaios de degradação térmica apontaram que o fármaco

permanece estável após 15 dias a 70°C. Em condições fotolíticas foi observado que o aciclovir no estado sólido é mais estável que o mesmo em solução.

5.5.3 Estabilidade acelerada das formulações

Na preparação de um sistema farmacêutico vários excipientes podem ser utilizados, com a finalidade de se obter as características físicas e químicas desejadas do produto ou para melhorar a aparência, odor e sabor. Outras substâncias podem ser usadas para aumentar a estabilidade do fármaco, particularmente no tocante aos processos hidrolítico e oxidativo (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). Em relação aos carreadores poliméricos, estes podem aumentar a estabilidade do produto seco final (LEUNER e DRESSMAN, 2000).

Através dos resultados obtidos pode-se constatar que todas as formulações submetidas à temperatura e umidade ambiente (Figura 40 e Tabela 10) apresentaram uma menor degradação do fármaco, quando as mesmas são comparadas com as que permaneceram em câmara climática (Figura 41 e Tabela 11). A literatura descreve que a temperatura afeta a estabilidade de um fármaco por meio do aumento da velocidade de reação, em média duas a três vezes para cada aumento de 10°C na temperatura. A umidade elevada é outro fator que está relacionada com a diminuição da estabilidade de fármacos (CONNORS; AMIDON; STELLA, 1986; TRISSEL, 2000).

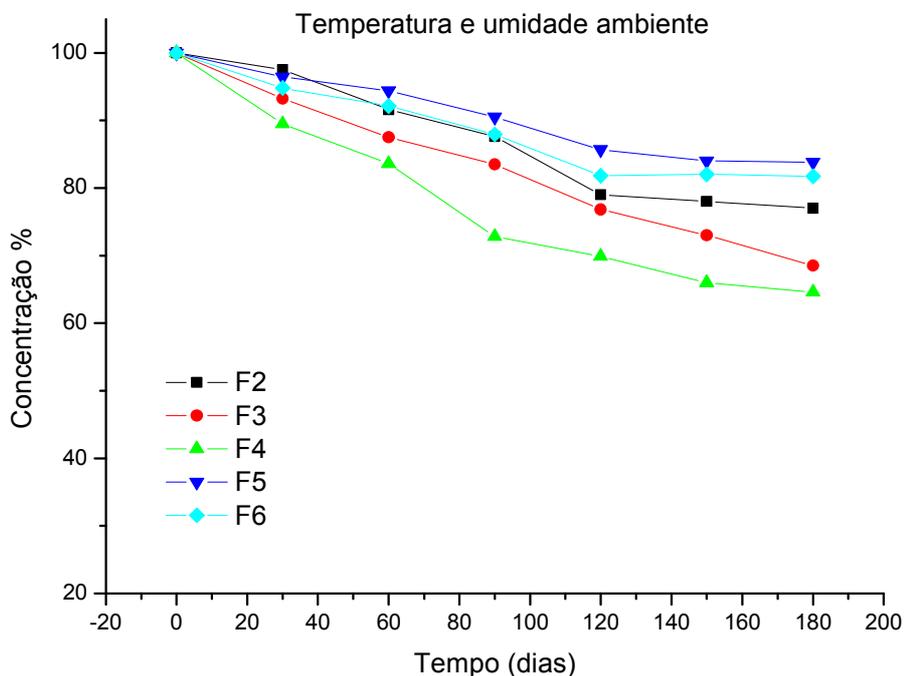


Figura 40. Teor de aciclovir das formulações submetidas à temperatura e umidade ambiente

Tabela 10: Teor de aciclovir presente formulações submetidas à temperatura e umidade ambiente

Tempo (dias)	F2 Média (%) ± D.P.R	F3 Média (%) ± D.P.R	F4 Média (%) ± D.P.R	F5 Média (%) ± D.P.R	F6 Média (%) ± D.P.R
0	100 ± 0,68	100 ± 0,65	100 ± 0,77	100 ± 0,86	100 ± 0,77
30	97,5 ± 0,95	93,2 ± 0,69	89,5 ± 0,85	96,4 ± 0,98	94,8 ± 0,98
60	91,6 ± 1,04	87,5 ± 0,85	83,6 ± 0,76	94,4 ± 0,76	92,1 ± 0,99
90	87,6 ± 1,18	83,5 ± 1,46	72,8 ± 1,13	90,5 ± 0,99	87,9 ± 0,67
120	81,0 ± 0,75	76,8 ± 0,98	69,9 ± 1,04	85,7 ± 0,56	81,8 ± 0,53
150	80,3 ± 0,66	73,8 ± 0,96	66,2 ± 0,66	84,6 ± 0,88	80,9 ± 0,75
180	77,6 ± 0,99	68,5 ± 0,88	64,6 ± 0,62	83,8 ± 1,08	80,7 ± 0,87

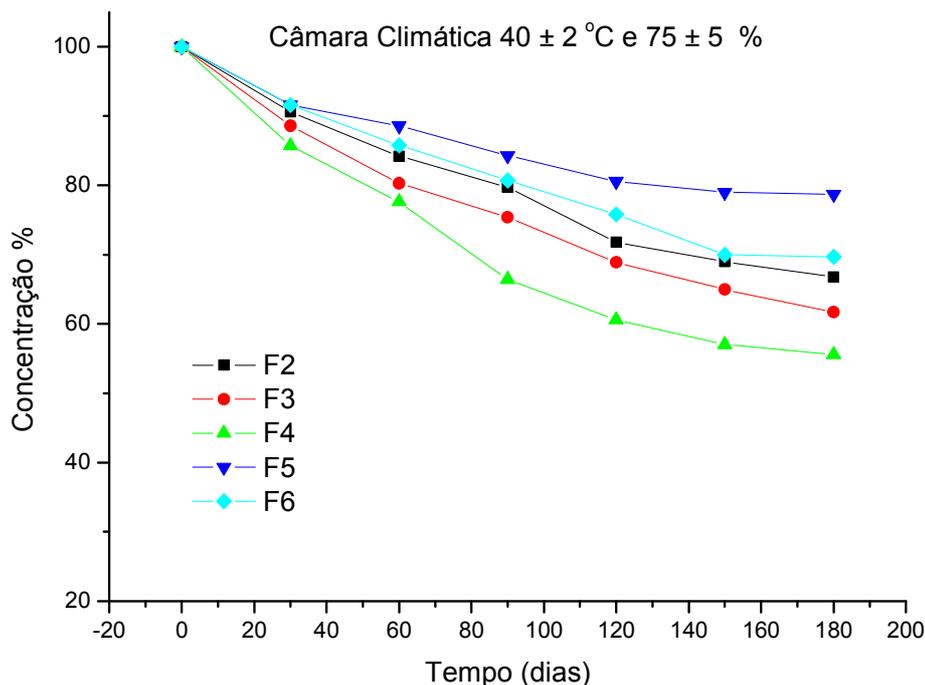


Figura 41. Teor de aciclovir das formulações submetidas à câmara climática

Tabela 11: Teor de aciclovir presente nas formulações submetidas à câmara climática

Tempo (dias)	F2 Média (%) ± D.P.R	F3 Média (%) ± D.P.R	F4 Média (%) ± D.P.R	F5 Média (%) ± D.P.R	F6 Média (%) ± D.P.R
0	100 ± 1,20	100 ± 1,25	100 ± 0,75	100 ± 0,67	100 ± 1,06
30	90,6 ± 0,87	88,6 ± 0,78	85,7 ± 0,58	91,6 ± 0,89	91,6 ± 1,22
60	84,2 ± 0,79	80,3 ± 0,49	77,6 ± 0,88	88,6 ± 0,53	85,8 ± 0,88
90	79,7 ± 0,68	75,4 ± 0,78	66,4 ± 0,91	84,3 ± 0,78	80,7 ± 0,87
120	71,8 ± 1,31	68,9 ± 0,69	60,6 ± 0,99	80,6 ± 0,76	75,8 ± 0,78
150	69,1 ± 0,91	65,6 ± 1,04	57,9 ± 0,88	79,3 ± 0,91	70,4 ± 0,65
180	66,8 ± 0,78	61,7 ± 0,81	55,6 ± 0,87	78,7 ± 0,99	69,7 ± 0,85

O comportamento das formulações nas diferentes condições analisadas foi similar. Em ambas, as formulações F5 e F6 apresentaram menores teores de degradação do aciclovir. Os resultados apontaram que a relação polímero/fármaco também influenciou na estabilidade final das formulações, sendo que quanto maior essa relação, maior a estabilidade. Esse fato pode ser explicado devido a maiores quantidades de polímero proporcionarem uma maior proteção ao fármaco, impedindo a ação direta da temperatura e umidade.

O aumento da estabilidade utilizando-se fármacos revestidos foi relatado por Stulzer e Silva (2006). Neste estudo grânulos de captopril produzidos por leito fluidizado, empregando-se a etilcelulose e metilcelulose como polímeros demonstraram maior estabilidade em relação ao fármaco puro, quando os mesmos foram submetidos às condições de temperatura, umidade e luz elevadas

Ainda, as formulações F5 e F6 possuem quantidades de fármaco na forma cristalina, conforme observado pela técnica de DRX. Segundo Florence e Attwood (2003) compostos cristalinos são mais estáveis que a respectiva forma amorfa.

5.5.4 Estudos cinéticos de degradação

Os dados científicos que fazem parte do estudo da estabilidade de uma formulação levam à previsão do prazo de validade esperado para o produto. A velocidade em que a degradação do fármaco ocorre em uma formulação é essencial. Assim, o estudo da velocidade da mudança química e do modo como é influenciado por fatores como a concentração do fármaco ou do reagente, o solvente empregado, as condições de temperatura e pressão, e a presença de outros agentes químicos na formulação é denominado cinética da reação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

O estudo cinético começa com a medida da concentração do fármaco em intervalos determinados, sob um conjunto específico de condições que incluem temperatura, pH, concentração iônica, intensidade da luz e concentração do fármaco. A medida da concentração do fármaco nos vários intervalos revela sua estabilidade ou instabilidade nas condições especificadas com o decorrer do tempo. A partir desse ponto de início, cada uma das condições originais pode ser variada isoladamente para determinar a influência que essas mudanças exercem sobre a

estabilidade do fármaco (HAN e SURYANARAYANAN, 1999; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Desta forma, é fundamental, na cinética química a definição de velocidade e ordem de reação. A velocidade da reação é a variação de uma espécie em relação ao tempo, enquanto que a ordem da reação permite definir esta variação da velocidade com a concentração dos reagentes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Reações de ordem zero, de primeira ordem e de segunda ordem estão entre as mais importantes nos estudos de degradação de fármacos.

As reações de ordem zero apresentam uma velocidade de decomposição constante, sendo independente da concentração de quaisquer dos reagentes. Nas reações de primeira ordem, a velocidade de reação é proporcional à concentração de um dos reagentes. Já as reações de segunda ordem se caracterizam por uma velocidade de reação proporcional à concentração de dois reagentes (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001; FLORENCE e ATTWOOD, 2003). De acordo com a Tabela 12, observa-se que todas as formulações seguiram uma cinética de degradação de segunda ordem.

Tabela 12: Coeficientes obtidos (r^2) das formulações submetidas às diferentes condições de estabilidade

Temperatura e umidade ambiente	Ordem da reação	F2	F3	F4	F5	F6
	Ordem zero	0,9634	0,9962	0,96069	0,9782	0,9185
Primeira Ordem	0,9654	0,9972	0,97257	0,9795	0,9196	
Segunda ordem	0,9965	0,9985	0,9815	0,9804	0,9198	
Câmara climática	Ordem zero	0,9784	0,9757	0,95661	0,9475	0,9826
	Primeira Ordem	0,9871	0,9892	0,97403	0,9569	0,9913
	Segunda ordem	0,9921	0,9970	0,98559	0,9651	0,9969

Para o cálculo da constante de velocidade (k) e do tempo necessário para que o teor do fármaco reduza a 90 % ($t_{90\%}$) foram utilizadas as equações descritas na Tabela 13, de acordo com a ordem de reação calculada. Estes parâmetros foram calculados para as amostras submetidas à temperatura e umidade ambiente, uma vez que o $t_{90\%}$ (prazo de validade) de interesse é para as amostras que se encontram em condições ambientais.

Tabela 13: Equações cinéticas para cálculo da degradação do fármaco

Ordem de reação	k (dias⁻¹)	t_{90%} (dias)
Zero ordem	$C_0^* - C^{**} / t$	$0,1. C_0 / k$
Primeira ordem	$2,303 / t \times \log C_0 / C$	$0,106 / k$
Segunda ordem	$1 / t \times (1 / C - 1 / C_0)$	$1 / 9K \times C_0$

* Concentração do fármaco no tempo zero

** Concentração do fármaco após degradação por um tempo t

O tempo $t_{90\%}$ indica o tempo necessário para que ocorra uma redução de 10 % da concentração inicial de fármaco. O $t_{90\%}$ é preconizado como o limite de degradação máxima que um fármaco pode sofrer, visando à sua utilização pelo paciente (NETZ e ORTEGA, 2002; AULTON, 2005). De acordo com os dados obtidos (Tabela 14), as formulações com maior prazo de validade foram a F5 e F6.

Tabela 14: Valores das constantes de velocidade (k_{25}) e $t_{90\%}$

Temperatura e umidade ambiente	K₂₅ (dias⁻¹)	t_{90%} (dias)
Formulação F2	$1,42 \times 10^{-5}$	78
Formulação F3	$2,55 \times 10^{-5}$	43
Formulação F4	$3,04 \times 10^{-5}$	36
Formulação F5	$1,07 \times 10^{-5}$	103
Formulação F6	$1,24 \times 10^{-5}$	89

Os valores de k apontam a constante de degradação. Convém observar que os maiores valores de k apresentam os menores valores de $t_{90\%}$, uma vez que

quanto maior a constante de velocidade mais rápida será a reação de degradação do fármaco e conseqüentemente, menor será o prazo de validade.

A legislação brasileira (ANVISA) preconiza que para um medicamento durante o estudo de estabilidade acelerada em sua embalagem primária, obter um prazo de validade provisório de 12 meses pode apresentar uma degradação máxima de 10 % do teor (Resolução RE nº 1, de 29 de Julho de 2005).

Porém, cabe ressaltar que os resultados obtidos para as formulações foram para as mesmas sem embalagem, fator que, conseqüentemente, acelera o processo de degradação. Entretanto, como se trata de uma formulação que não será comercializada, estes resultados foram utilizados somente para investigar a estabilidade entre as formulações desenvolvidas.

5.6 Validação da metodologia analítica de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.6.1 Aspectos Gerais

Na literatura, são descritos uma variedade de métodos para quantificação do aciclovir, como matéria-prima ou em formulações farmacêuticas, utilizando técnicas como espectrofotometria, a espectrofluorometria, a eletroquimiluminescência e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV (BASAVIAH e PRAMEELA, 2002; BASAVIAH e PRAMEELA, 2003; JIANGENG; LUO; ZHANG, 2004; HUIDORO; RUPÉREZ; BARBAS, 2005; ABDELLETEF et al., 2006). Entre os métodos relatados, muitos são designados para a determinação do fármaco em líquidos biológicos como plasma, soro e urina (BOULIEU; GALLANT; SILBERSTEIN, 1997; PEH e YUEN; 1997; RAMAKRISHNA et al., 2000; FERNANDEZ et al., 2003; BAHRAMI; MIRZAEI; KIANI, 2005)

Para o controle de qualidade rotineiro, o desenvolvimento de um método simples, rápido, e sensível é altamente desejável. Assim, procedeu-se o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica que englobasse estas características para determinação do aciclovir nas microesferas produzidas pela técnica de *spray-drying*.

O processo de validação é essencial para definir se uma metodologia desenvolvida está completamente adequada aos objetivos a que se destina, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados (UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

A validação da metodologia analítica foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo ICH (2005) através dos parâmetros de especificidade, linearidade e faixa, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão, exatidão e robustez.

5.6.2 Especificidade

Este parâmetro é expresso como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

Os cromatogramas demonstraram que o método é específico, pois não ocorreu sobreposição dos picos de absorção do aciclovir e da guanina, principal produto de degradação do fármaco (SINHA et al ., 2007), bem como absorção dos demais constituintes da formulação no comprimento de onda utilizado para as análises (Figuras 42 e 43).

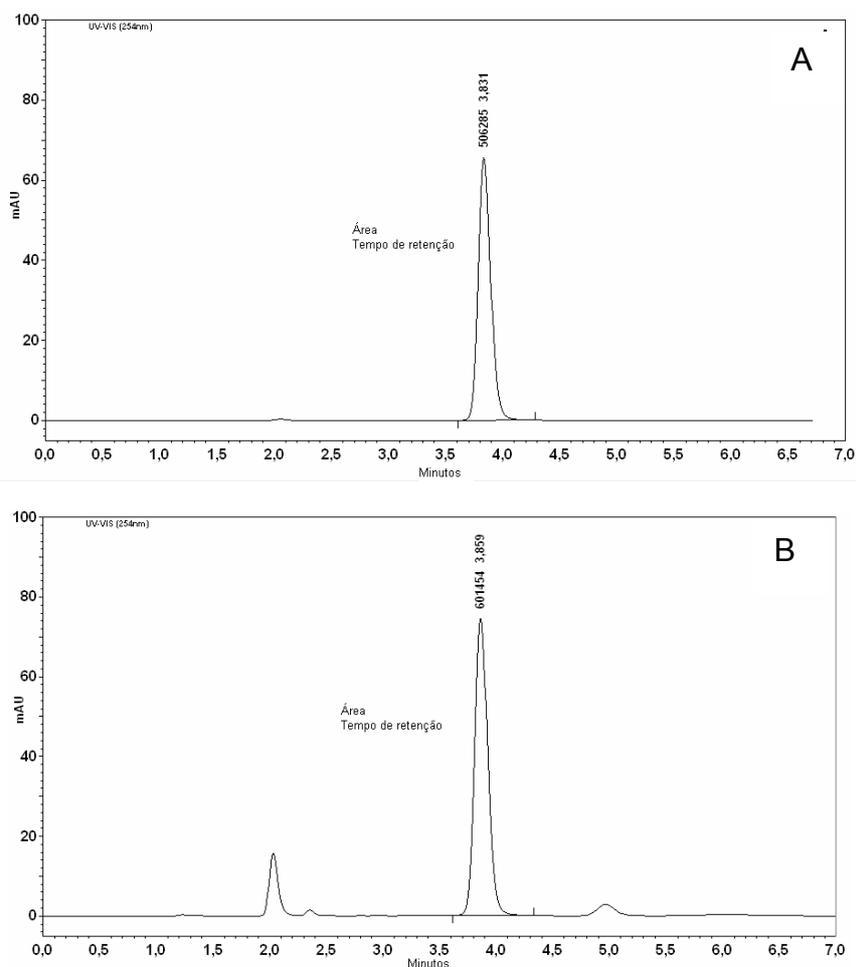


Figura 42. Cromatogramas, (A) solução padrão de aciclovir e (B) micropartículas contendo aciclovir $6 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$

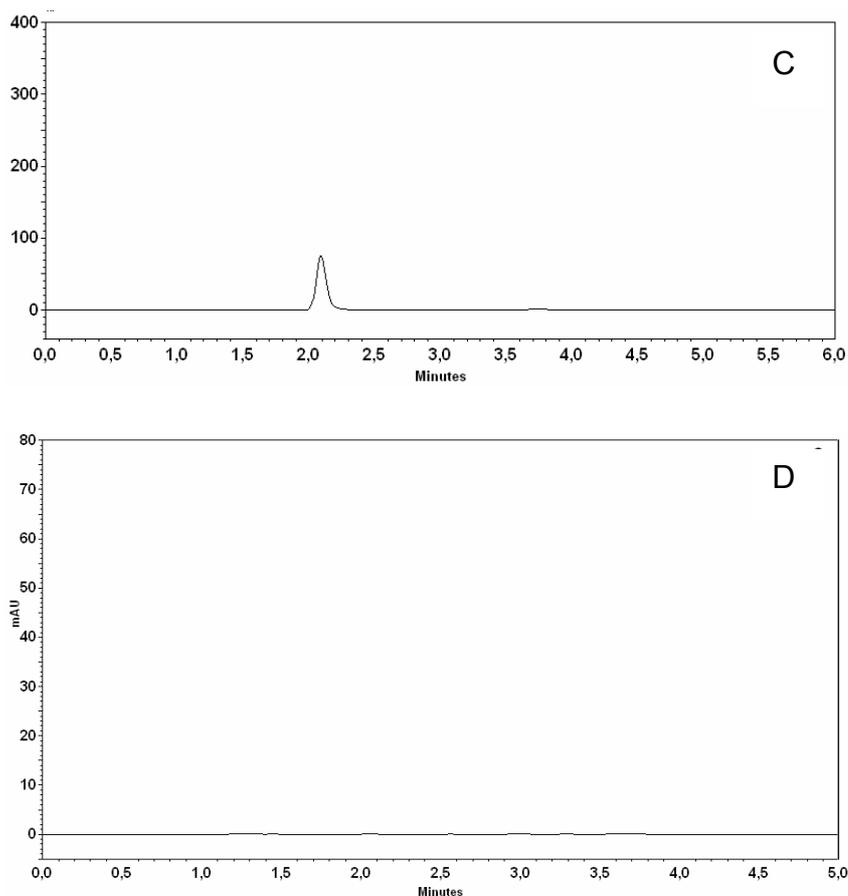


Figura 43. Cromatogramas, (C) solução padrão de guanina e (D) solução placebo

5.6.3 Linearidade e faixa

A linearidade de uma metodologia analítica é a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007). De acordo com a Tabela 15 e Figura 44 observa-se que o método apresentou linearidade no intervalo da concentração testada (1 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Esta faixa de concentração possibilitou detectar o aciclovir dentro dos limites de interesse e a resposta do detector ultravioleta conservou-se linear.

Tabela 15: Resultados obtidos para a linearidade e faixa

Concentração de aciclovir ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área do pico (media \pm D.P.R)
1	103036 \pm 0,013
3	306289 \pm 0,068
5	503997 \pm 1,120
7	716928 \pm 0,711
10	1014936 \pm 0,441
Equação	$y = 101532x + 1069$
r^2	0,9999

* n=3

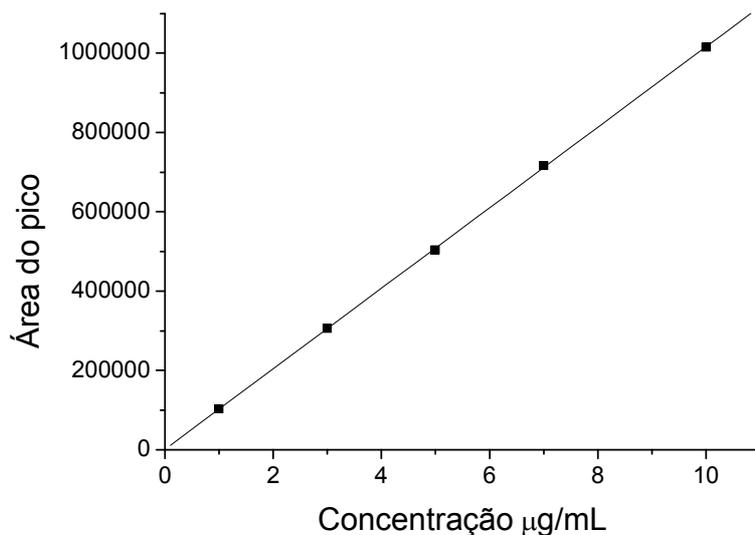


Figura 44. Linearidade e faixa do método de quantificação do aciclovir por CLAE

5.6.4 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

O limite de quantificação é expresso como a menor quantidade de analito na amostra que possa ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais. A definição para o limite de detecção é a menor

quantidade de analito em uma amostra que possa ser detectado, mas não necessariamente quantificado nas condições experimentais.

Os valores calculados para LQ e LD foram de $0,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, indicando a sensibilidade do método. Considerando que a faixa de concentração utilizada para quantificação do aciclovir foi de $1-10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, conclui-se que o fármaco é seguramente quantificável na faixa selecionada.

5.6.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

Neste ensaio foram utilizadas seis determinações para cada nível (repetibilidade e precisão intermediária) onde foram observadas as diferenças entre as repetições (Tabela 16). O ensaio apresentou um desvio padrão relativo de 0,24 % (precisão intermediária) e 0,14 % (repetibilidade), estes valores estão de acordo com a variação aceitável, onde o limite máximo de DPR é $\pm 2,0$ %. A análise de variância ANOVA demonstrou que não há diferença estatística significativa entre as análises dos diferentes períodos, o valor de F calculado foi de 0,39 e F de significação igual a 7,7.

Tabela 16: Resultados da repetibilidade (mesmo dia) e precisão intermediária (dias diferentes)

Solução amostra ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área média do pico \pm D.P.R %	Solução amostra ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área media do pico \pm D.P.R %
Manhã	$526873 \pm 0,17$	Dia 1	$526873 \pm 0,17$
Tarde	$528611 \pm 0,13$	Dia 2	$527322 \pm 0,44$
Noite	$528395 \pm 0,12$	Dia 3	$528361 \pm 0,11$
Mesmo dia	$527959 \pm 0,14$	Dias diferentes	$527518 \pm 0,24$

*Média \pm D.P.R (n=6)

5.6.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método com o valor verdadeiro. Nos casos em que amostras de todos os componentes da formulação estão disponíveis, se aceita a análise pelo método de adição do padrão (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

Os resultados encontrados para o ensaio de recuperação do aciclovir nas diferentes concentrações analisadas estão indicados na Tabela 17. A porcentagem média para o ensaio de recuperação foi de $100,3 \pm 0,85$ %, resultado que traduz a concordância com o valor verdadeiro da amostra. Através do teste t de Student pode-se afirmar que o valor de recuperação encontrado é estatisticamente igual a 100 %, para nível de significância $\alpha = 0,05$.

Tabela 17: Resultados da exatidão

Solução final	Área média do pico \pm D.P.R	% média recuperada \pm D.P.R
$3 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$306289 \pm 0,06$	$99,5 \pm 0,05$
$7 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$716828 \pm 0,71$	$101,2 \pm 0,68$
$10 \mu\text{g.mL}^{-1}$	$1014936 \pm 0,44$	$100,3 \pm 1,16$

*Média \pm D.P.R (n=3)

5.6.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007). Mudanças nas condições cromatográficas como, comprimento de onda, fluxo e variação do pH da fase móvel não interferiram nos resultados. Assim, o método se demonstrou robusto em relação às variações desses parâmetros. Dados expostos na Tabela 18.

Tabela 18: Resultados do ensaio de robustez

Solução amostra (5 µg.mL ⁻¹)	Teor de aciclovir (%) ± D.P.R	Solução amostra (5 µg.mL ⁻¹)	Teor de aciclovir (%) ± D.P.R	Solução amostra (5 µg.mL ⁻¹)	Teor de aciclovir (%) ± D.P.R
Fluxo		pH		Comprimento de onda	
0,6 mL.min ⁻¹	99,34 ± 0,44	2,0	102,33 ± 0,36	252 nm	104,30 ± 0,35
0,8 mL.min ⁻¹	100,35 ± 0,64	2,5	100,41 ± 0,81	254 nm	102,40 ± 0,25
1,0 mL.min ⁻¹	100,15 ± 0,85	3,0	98,39 ± 0,78	256 nm	102,13 ± 0,53

*Média ± D.P.R (n=3)

Por fim, os resultados obtidos através do estudo de validação permitem concluir que o método proposto é adequado e seguro para quantificação do aciclovir nas micropartículas desenvolvidas pela técnica de *spray - drying*.

Os dados apresentados nesta secção foram aceites para publicação no periódico Journal of Chromatographic Science (Anexo III).

VI- Conclusões

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados encontrados:

- O aciclovir foi caracterizado por CLAE, IV, UV e DSC e se encontra dentro dos padrões de qualidade preconizados.
- Os ensaios de análise elementar, IV e RMN ^{13}C sugerem formação de um monoácido carboxílico e uma monoamida nas microesferas de malonilquitosana com intumescimento pH dependente. As curvas TG/DTG apresentaram uma menor estabilidade térmica em relação às microesferas gelatinizadas.
- O tempo médio de liberação do aciclovir a partir das microesferas de malonilquitosana foi de 5,5 horas. Os mecanismos envolvidos na liberação das mesmas em pH 1,2 são intumescimento e difusão simultaneamente ($n=0,8474$), em pH 6,8 diferentes processos estão envolvidos, como, difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica ($n=1,0491$).
- A maior taxa de aciclovir encapsulado nas microesferas de malonilquitosana foi de 69,7 % ($\pm 0,67$) para o tempo de contato de 24 horas. Através da microscopia eletrônica de varredura foi constatado que as mesmas apresentam esfericidade com superfície lisa, poucos poros e diâmetro médio de aproximadamente 882 μm .
- A curva DSC da formulação F1 não apresentou o evento endotérmico relativo à fusão do fármaco. O ensaio de DRX confirmou a modificação na estrutura cristalina do aciclovir presente na formulação F1 para a forma amorfa, condizendo com os resultados obtidos em DSC.
- As imagens obtidas por MEV indicaram que a formulação F1 apresentou formato arredondado e com a superfície interna côncava com tamanho médio de partícula de $5,52 \pm 1,8 \mu\text{m}$.

- O perfil de liberação em pH 1,2 e 6,8 da formulação F1 indicou que 80 % do aciclovir foi liberado por um período de 120 minutos, seguindo o modelo matemático proposto por Higuchi.
- As curvas DSC das formulações F2, F3 e F4 não apresentaram o pico de fusão característico do fármaco. As formulações F5 e F6 apresentaram um evento endotérmico mais acentuado em torno de 215 °C. Através das curvas TG, constatou-se que todas as formulações demonstraram estabilidade térmica até temperatura de 221,3 °C.
- As análises de DRX das formulações F2, F3 e F4 não apresentaram os picos relativos ao aciclovir. Assim, novamente os dados sugerem e condizem com os ensaios de DSC, indicando que o aciclovir presente nas formulações foi alterado para a forma amorfa. Entretanto, as formulações F5 e F6 mantiveram alguns picos característicos presentes no aciclovir isolado, indicando que ocorreu uma modificação parcial do aciclovir para forma amorfa.
- As fotomicrografias das formulações, de um modo geral, apresentaram tamanho médio de partícula e morfologia bastante variadas.
- Os melhores valores de eficiência de encapsulação e perfis de liberação foram os obtidos para as formulações F5 e F6. Estas liberaram 80 % do aciclovir por períodos de 300 min e 270 min em pH 1,2; e 330 e 300 min em pH 6,8. O tratamento matemático das curvas de dissolução demonstrou que o modelo mais adequado para descrever a cinética de dissolução das formulações em pH 1,2 foi o de Higuchi para todas as amostras. Em pH 6,8 as formulações F5 e F6, apresentaram uma cinética de ordem zero e as formulações F2, F3 e F4 seguiram o modelo de Higuchi.
- A concentração de polímero em relação ao fármaco bem como a adição de agente reticulante influenciou no processo de encapsulação e liberação.

- Os estudos de estabilidade acelerada indicaram que todas as formulações submetidas à câmara climática apresentaram uma maior degradação do fármaco, quando as mesmas são comparadas com as que permaneceram em temperatura e umidade ambiente.
- As formulações F5 e F6 apresentaram menores teores de degradação do aciclovir. Os resultados apontaram que a relação polímero/fármaco também influenciou na estabilidade final das formulações, sendo que quanto maior essa relação, maior a estabilidade.
- Os estudos cinéticos indicaram que todas as formulações seguiram uma degradação de segunda ordem. As formulações com maior prazo de validade foram a F5 e F6, apresentando um $t_{90\%}$ de 103 e 89 dias, respectivamente.
- O método de quantificação do aciclovir encapsulado nas micropartículas desenvolvidos pela técnica de *spray-drying* foi devidamente validado em termos de especificidade, linearidade e faixa, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão e robustez. Os resultados obtidos permitem concluir que o método proposto foi seguro e adequado para quantificação do fármaco nos sistemas desenvolvidos.
- De um modo geral, pode-se concluir que o objetivo principal proposto pelo trabalho foi alcançado. Uma vez que as formulações desenvolvidas pelas técnicas de coacervação e *spray-drying*, promoveram uma liberação modificada do aciclovir.

VII- Considerações Finais

- As formulações desenvolvidas ainda necessitam a avaliação em modelos *in vivo*, para se obter melhores informações e poder comparar com os resultados obtidos *in vitro*.
- Os resultados apontam que o desenvolvimento e a avaliação de sistemas envolvendo diferentes agentes reticulantes e em diferentes concentrações, bem como a variação dos parâmetros experimentais no desenvolvimento das micropartículas por *spray-drying* são promissores.

VIII- Referências

ABDELLETEF, H.E; EL-HENAWEE, M.M; . EL- SAYED, M.H; AYAD, M.M. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for analysis of acyclovir and acebutolol hydrochloride. *Spectrochimica acta*. v.65, p.996-998, 2006.

AMIDON, G. L; LENNERNÅS, H; SHAH, V. P; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*. v.12, p.413-420, 1995.

ANAL, A. K; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*.v.18, p.240-251, 2007.

ANSEL, H. C; POPOVICH, N. G; ALLEN, L. V. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ASADA, M; TAKAHASHI, H; OKAMOTO, H; TANINO, H; DANJO, K. Teophyline particle desing using chitosan by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 270, p.167-174, 2004.

AULTON, M.E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. Artmed Editora, 2005.

BAHRAMI, G; MIRZAEI, S.A; KIANI, A. Determination of acyclovir in human serum by high- performance liquid chromatography using liquid-liquid extraction and its application in pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. v. 25, p. 327-331, 2005.

BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002.

BASAVIAH, K; PRAMEELA, H.C. Simple spectrophotometric of acyclovir in bulk drug and formulations. *II Farmaco*.v.57, p. 443-449, 2002.

BASAVIAH, K; PRAMEELA, H.C; CHANDRASHEKAR, U. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of acyclovir in pharmaceuticals. *II Farmaco*. v.58, p. 1301-1306, 2003.

BENCINI, M; RANUCCI, E; FERRUTI, P; TROTTA, F; DONALISIO, M; CORNAGLIA, M; LEMBO, D; CAVALLI, R. Preparation and in vitro evaluation of the antiviral activity of the Acyclovir complex of a β -cyclodextrin/poly(amidoamine) copolymer. *Journal of Controlled Release, In Press*.2008.

BERMAN, J; PIERCE, P; PAGE, P. E. Scale up of a spray dry tablet granulation process: Thermodynamic considerations. *Drug Development and industrial pharmacy*. v. 20, p. 731- 755, 1994.

BODMEIER, R; KRANZ, H. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*.v.332, p.107-114, 2007.

BOIVIN, G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes*. v. 2, p. 48-56, 2004.

BOULIEU, R; GALLANT, C; SILBERSTEIN, D. Determination of acyclovir in human plasmaby high-performance liquid cromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. v.693, p. 233- 236, 1997.

BRADY, R; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*. v.61, p.73-81, 2004.

BRASIL, Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Diário Oficial União, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm> Acesso em: 11.01.2008.

BRASIL, Resolução - RE nº 1, de 29 de Julho de 2005, Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, Diário Oficial União, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, on line, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm> Acesso em: 11.01.2008.

BRESOLIN, T. M. B; CECHINEL-FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos*.Itajaí: Editora da Univali, 2003.

BRITISH PHARMACOPEIA, London: The Stationary Office, 2006.

BROADHEAD, S. K; ROUAN, E; RHODES, C.T. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 18, p. 1169-1206, 1992.

CASSADY, A. K; WHITLEY, R.J. New therapeutic to the alpha herpesvirus infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.39, p.119-128, 1997.

CHAMBIN, O; CHAMPION, D; DEBRAY, C; ROCHAT-GONTHIER, M. H; LE MESTE, M; POURCELOT, Y. Effects of different cellulose derivatives on drug release mechanism studied at a pre formulation stage. *Journal of Controlled Release*. v.95, p.101-108, 2004.

CHAUHAN, B; SHIMPI, S; PARADKAR, A. Preparation and evaluation of glibenclamide-polyglycolized glycerides solid dispersions with silicon dioxide by spray drying technique. *European Journal of Pharmaceutics Sciences*. v. 26, p. 219-230, 2005.

CHEU, S.J; CHEN, R.R.L; CHEN, P.F; LIN, W. J. *In vitro* modified release of acyclovir from ethyl cellulose microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v.18, p.559-565, 2001.

COLLINS, P; ELLIS, N. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. *Journal of Medical Virology*. v. 1, p.58-66, 1999.

CONNORS, K. A; AMIDON, G. L; STELLA, V. J. *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.

CONSTANT, P. B. L; STRINGHETA, P. C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e tecnologia de alimentos*. v.31, p.12-18, 2002.

CONTI, B; BUCOLO, C; GIANNAVOLA, C; PUGLISHE, G; GIUNCHEDI, P; CONTE, U. Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: *in vitro/in vivo* evaluation. *European Journal of Pharmaceutics Sciences*. v.5, p.287-293, 1997.

DANGPRASIRT, P; RITTHIDEJ, G.C. Development of diclofenac sodium controlled release solid dispersion by spray drying using optimization strategy I. Powder formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 21, p.2323-2337, 1995.

DA SILVA, A.G. Propiedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O; DA SILVA, A.G; PEREIRA JR, A.C.(Org). *Herpes:clínica, diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

DAVIES, R. Particle science and technology- a view at the millenium. *Powder Technology*. v.119, p.45-57, 2001

DE CLERCK, E; NAESENS, L; DE BOLE, L; SCHOLS, D; ZHANG, Y; NEYTS, J. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Reviews in Medical Virology*. v.11, p.381-395, 2001.

DESAI, K. G. H. PARK, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linked agent on the properties of spray dried microspheres. *Journal of Microencapsulation*. v. 22, p. 377-395, 2005.

DONG, W. Y; MAINCENT, P; BODMEIER, R. In vitro and in vivo evaluation of carbamazepine-loaded enteric microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 331, p.84-92, 2007.

EINBU, A; GRADALEN, H; VARUM, K. M. Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid. *Carbohydrate Research*.v.342, p.1055-1062, 2007.

FERNÁNDEZ, M; SEPÚLVEDA, J; ARÁNGUIZ, T; PLESSING, C. Technique validation by liquid chromatography for the determination of acyclovir in plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. v.791, p. 357- 363, 2003.

FERREIRA, A. O. *Guia prático da farmácia magistral*. 2 ed. Juiz de Fora: Oesp Gráfica S.A, 2002.

FLORENCE, A. T; ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

FUERTE, I; MIRANDA, A; MILLÁN, M; CARABALLO, I. Estimation of the percolation thresholds in acyclovir hydrophilic matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 64, p. 336-342, 2006.

GEORGE, M; ABRAHAM, E. T. Polyonic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and Chitosan- a review. *Journal of Controlled Release*. v.114, p.1-14, 2006.

GIAMMONA, G; PUGLISHI, G; CAVALLARO, G; SPADARO, A; PITARRESI, G. Chemical stability and bioavailability of acyclovir coupled to α,β -poly(N-2-hydroxyethyl)- DL-aspartamide. *Journal of Controlled Release*. v.33, p.261-271, 1995.

GINANI, M. F; NAVARRO, M. V; NASCIMENTO, E. G; OLIVEIRA, U.O.B. Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de géis de quitosana. *Química Nova*. v.22, p.801-804, 1999.

GLASSER, W.G; JAIN, R.K. Method of making ester-crosslinked chitosan support materials and products thereof. *Patente US 5874551*. 23 fevereiro, 1999.

GONÇALVES, V. L; LARANJEIRA, M.CM; FÁVERE, V; PEDROSA, R.C. Effect of cross linking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v.15, p.6-12, 2005.

GONG, Y; RAJ, K. M; LUSCOMBE, C.A; GADAWSKI, I; TAM, T; CHU, J; GIBSON, D; CARLSON, R; SACKS, S.L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*. v.64, p.127-130, 2004.

GONG, E; MATTHEWS, B; MCCARTHY T; CHU, J; HOLAN, G; RAFF, J; SACKS, S. Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*. v.68, p.139-146, 2005.

GRÖNING, R; BERNTGEN, M; GEORGARAKIS, M. Acyclovir serum concentrations following peroral administration of magnetic depot tablets and the influence of extracorporeal magnets to control gastrointestinal transit. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.46, p.285-291, 1998.

GUPTA, K.C; JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linked on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*. v.66, p.43-54, 2006.

GUYTON, A. C. *Fisiologia Humana*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992.

HAN, J; SURYANARAYANAN, R. A method for the rapid evaluation of the physical stability of pharmaceutical hydrates. *Thermochimica acta*. v.329, p.163-170, 1999.

HARTLINE, C. B; HARDEN, E. A; WILLIAMS-AZIZ, S. L; KUSHNER, N. L; BRIDEAU, R. J; KERN, E. R. Inhibition of herpesvirus replication by a series of 4-oxo-dihydroquinolines with viral polymerases activity. *Antiviral Research*. v.65, p.97-105, 2005.

HE, Y; YANG, H; WEN, R; LU, B. Sustained-release tablets of indomethacin-loaded microcapsules: Preparation, in vitro and in vivo characterization. *International Journal of Pharmaceutics*.v.333, p.87-94, 2007.

HEJAZI, R; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*. v.89, p.151-163, 2003.

HUIDORO, A.L; RUPÉREZ, F.J, BARBAS, C. LC methods for acyclovir and related impurities determination. *Journal of Pharmaceutival and Biomedical Analysis*.v. 37, p. 687- 694, 2005.

ICH- *Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline for the Industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products*, 2003.

ICH- *International Conference on Harmonization of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: text and methodology*, 2005.

INUKAI, Y; CHINEN, T; MATSUDA, T; KAIDA, YASUDA, S. Selective separation of germanium (IV) by 2,3- dihydroxypropyl chitosan resin. *Analytica Chimica acta*. v.371, p.187-193, 1998.

ITO, M; BAN, A; ISHIHARA, M. Anti- ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*. v.82, p. 218-225, 2000.

JALÓN, E. G; BLANCO-PRÍETO, M. J; YGARTUA, P; SANTOYO, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. *Journal of Controlled Release*. v.75, p.191-197, 2001.

JALÓN, E. G; BLANCO-PRÍETO, M. J; YGARTUA, P; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simples virus type 1 in cell

culture. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.56, p.183-187, 2003.

JAWOREK, A. Micro- and nanoparticle production by electrospraying. *Powder Technology*. v.176, p. 18-35, 2007.

JENSSEN, H; ANDERSEN, J. H; MANTZILAS, D; GUTTENBERG, T. J. A wide of medium-sized, highly cationic, α -helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral Research*. v.64, p.119-126, 2004.

JIAGEN, L; LUO, L; ZHANG, Z. On-line galvanic generated electrochemiluminescence determination of acyclovir based on the flow injection sampling. *Analytical Chimica Acta*. v.510, p. 35-39, 2004.

KALINKOVA, G.N. Infrared spectroscopy in pharmacy. *Vibrational spectroscopy*, v. 19, 1999.

KAS, H.S. Chitosan: properties, preparation and application to microparticulate system. *Journal of Microencapsulation*. v.14, p.689-711,1997.

KIM, D.G; YOUNG, J; CHOI, C; ROH, S.H; KANG, S.K, JANG, M.K; NAH, J.W. Retinol- encapsulated low molecular water –soluble chitosan nanoparticle. *International Journal of Pharmaceutics*.v.319, p.130-138, 2006.

KOROKOLVAS, A. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. Edição 1999/2000. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KURITA, K. Controlled fictionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*. v. 26, p. 1921-1971, 2001.

LACHMAN, L; LIEBERMAN, H.A; KANING, J.L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Fundação Calouste, 2001.

LAW, S.L; HUANG, K.J; CHIANG, C.H. Acyclovir-containing liposomes for potencial ocular delivery corneal penetration and absorption. *Journal of Controlled Release*. v.63, p.135-140, 2000.

LEUNER, C; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 50, 47-60, 2000.

LINTER, C. J. In: *Remington: the science and practice of pharmacy*. 19 ed. Easton: Mack Publishing, 1995.

LIESIENE, J; MATALIONIENE, J. Application of water-soluble diethylaminoethylcellulose in oral drug delivery. *Reactive & Funcional Polymeres*. v.59, p.185-191, 2004.

MACKAY, M; PHILLIPS, J; HASTEWEL, J. Peptide drug delivery: Colonic and rectal absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.28, p.253-257, 1997.

MANADAS, R; PINA. M.E; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.v.38, p.375-399, 2002.

MARONA, H.R.N; M.P.B. STORTI; V.A.L NETO. Flutamida: Revisão de suas propriedades farmacológicas e físico-químicas. Métodos de análise em formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 50, p. 37-44, 2004.

MELO, E; ALVES, P.M; SILVA, A.C; MALPIQUE, R;LAMEIRO, M.H. Encapsulation of adenoviral vectors into chitosan–bile salt microparticles for mucosal vaccination. *Journal of Biotechnology*.v.126, p.152-162, 2006.

MOFFAT, A.C; OSSELTON, M.D; WIDDOP, B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3.ed. London – Chicago: Editora Pharmaceutical Analytical and Toxicological data. v.2, 2004.

NASCIMENTO, A; LARANJEIRA, M.C.M, FÁVERE, V.T; JOSUÉ. A. Impregnation and release of aspirin from chitosan/poly(acrylic acid) graft copolymer microspheres. *Journal of Microencapsulation*. v.18, p.679-684, 2001.

NETZ, P.A; ORTEGA, G. G. *Fundamentos de físico-química*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

PALMIERI, G. F; WHERLÉ, P; STAMM, A. Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled drug release. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 20, p.2859-2879, 1994.

PASTRANA, Y. C; RIVERA, A. B; ENRIQUE, T. E; CARABALLO, I. Caracterización farmacocinética de formulaciones orales de liberación sostenida. Factores que influyen en el perfil farmacocinético. *Acta Pharmaceutica Bonaerense*. v.19, p.25-34, 2000.

PATHER, S.I; RUSSEL, I; SYCE, J.A; NEAU, S.H. Sustained release theophylline tablets by direct compression Part 1: formulation and in vitro testing. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 164, p. 1-10, 1998.

PAVANETTO, F; GENTA, I; GIUNCHEDI, P; CONTI, B. Evaluation of spray-drying as a method for polylactide and polylactide -co- glycolide microspheres preparation. *Journal of Microencapsulation*. v.10, p.487-497, 1993.

PAVELIC, Z. P; SKALKO-BASNET, N; FILIPOVIC-GRCIC, J; MARTINAC, A; JALSENJAK, I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *Journal of Controlled Release*. v.106, p.34-43, 2005.

PEH, K.K; YUEN, K.H. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in human plasma using fluorescence detector. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*.v.693, p. 241-244 ,1997

PENG, X; ZHANG, L; KENNEDY, F.J. Release behavior of microspheres from cross-linked N-methylated chitosan encapsulated ofloxacin. *Carbohydrate Polymers*.v.65, p.288-295, 2006.

RAMAKRISHNA, A.B; BANSAL, Y.K; RAO, A.R.M; GANDHI, T.P. Rapid, simple and sensitive high performance liquid chromatographic method for detection and determination of acyclovir in human plasma and its use in bioavailability. *Journal of Chromatography B: Biomedical. Sciences and Applications*. v.739, p.231-237, 2000.

RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4^a Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

RATTES, A. L. R; OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology*.v.171, p.7-14, 2007.

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

RIBAS, R.V.; RIZZUTTO, M.A *Laboratório de Estrutura da Matéria II; Difração de Raios-X 2 e Elétrons*, Ed. IF-USP, São Paulo, 1996.

RITGER, P. L; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*. v.5, p. 23-36, 1987.

ROKHADE, A. P; PATIL, S. A; AMINABHAVI, T. M. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. *Carbohydrate Polymers*. v. 67, p.605-613, 2007.

ROSSEL, C. V; CARRENÕ, J. S; BAEZA, M.R; ALDERETE, J.B. Inclusion complex of the antiviral drug acyclovir with cyclodextrin in aqueous solution and in solid phase. *Química Nova*. v.23, p. 749-752, 2000.

SANCHO, C. M; VANRELL, R. H; NEGRO, S. Poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for long-term intravitreal delivery of acyclovir: influence of fatty and non- fatty additives . *Journal of Microencapsulation*. v. 20, p.799-810, 2003.

SANDRI, G; ROSSI, S; FERRARI, F; BONFERONI, M. C; MUZZARELLI, C; CARAMELLA, C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.21, p.351-359, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R; GUTERRES, S. S; FREITAS, L. L; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nonoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. v.26, p.726-737, 2003.

SERGERIE, Y; BOIVIN, G. Hydroxyurea enhances the activity of acyclovir and cidofovir against herpes simplex virus type 1 resistant strains harboring mutations in the thymidine kinase and/or the DNA polymerase genes *Antiviral Research*. v. 77, p. 77-80, 2008.

SHARGEL, L; ANDY, Y. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. Publisher: Mc. Graw-Hill, United States of America, 2004.

SHU, B; YU, W; ZHAO, Y; LIU, X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*. v. 76, p.664-669, 2006.

SILVA, C; RIBEIRO, A; FERREIRA, D; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*.v.39, p. 1-30, 2003.

SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F;X; KIEMLE, D. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Guanabara. Rio de Janeiro. 2005.

SINHA, V. R; SINGLA, A. K; WADHAWAN, S; KAUSHIK, R; KUMRIA, R; BANSAL, K; DAHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carries for dugs. *International Journal of Pharmaceutics*. v.274, p.1-33, 2004.

SINHA, V.R; THEHAN, M.A; KUMAR, M; SINGH, S; BHINGE, J.R. Stress studies on acyclovir. *Journal of Chromatographic Science*.v.45, p.319 -324, 2007.

SNOECK, R. Antiviral therapy research of herpes simplex. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.16, p.157-159, 2000.

SPEAR, P.G; MANOJ, S; YOON, M; JOGGER, C.R; ZAGO, A; NYCSCOFISKY, D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology*. v.344, p.17-24, 2006.

STORPIRTS, S; OLIVEIRA, P. G; RODRIGUES, D; MARANHO, D. C. Considerações biofarmacêuticas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.35, n.1, p.1-11, 1999.

STULZER H.K.; SILVA M.A.S. Estudo de Estabilidade de Grânulos Revestidos e Comprimidos contendo Captopril. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v. 25, p. 497-504, 2006.

STULZER, H;K; SILVA, .M.A.S. Desenvolvimento e Avaliação de Comprimidos de Captopril de Liberação Prolongada. *Latin American Journal of Pharmacy*. v.26, p. 25-264, 2007.

TAKAHASHI, T; IMAI, M; SUZUKI, I. Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. *Biochemical Engineering Journal*. v.36, p.43-48, 2007.

TALLURY, P; ALIMOHAMMADI, N; KALACHANDRA, S. Poly (ethylene-co-vinylacetate) copolymer matrix for delivery of chlorhexidine and acyclovir drugs for use in the oral environment: Effect of drug combination, copolymer composition and coating on the drug release rate. *Dental Materials*. v.23, p.404-409, 2007.

TALLURY, P; AIRRABEELLI, R; LI, J; PAQUETTE, D; KALACHANDRA, S. Release of antimicrobial and antiviral drugs from methacrylate copolymer system: Effect of copolymer molecular weight and drug loading on drug release. *Dental Materials*. v.24, p.274-280, 2008.

TORRES, M. A; VIEIRA, R. S; BEOOU, M. M; SANTANA, C. S. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. v.15, p.306-312, 2005.

TRISSEL, L. A. *Trissel's stability of compounded formulations*. 2 ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

USP 30- *The United States Pharmacopeia*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VALGAS, S; GONÇALVES, V; PEDROZA, R.C; FÁVERE, V.T, LARANJEIRA, M.C. Malonylchitosan microspheres as a matrix for oral enrofloxacin delivery. *Macromolecular Symposia*. v. 229, p.246-252, 2005.

VANDELLI, M. A; TOSI, G; RUOZI, B; LEO, E. PLA-microparticles formulated by means a thermoreversible gel able to modify protein encapsulation and release without being co-encapsulated. *International Journal of Pharmaceutics*.v.323, p.131-138, 2006.

VARELLA, B.R; PIRES, I.L; SARAIVA, C.A; GUIMARÃES, A.C.C; GUIMARÃES, M.A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. *Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial*. v.41, p.257-262, 2005.

VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. A.; Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic,. v. 6, p. 47-69. 1991.

WENDEL, S; ÇELIK, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de spray- drying. *Pharmaceutical Technology*. v.2, p. 31-45, 1998.

WHITE, D.O; FENNER, F.J. *Medical Virology*. 4th.ed. San Diego: Academic, 1994.

YANG, C. H; HUANG, K. S; LIN, P. W; LIN, Y. C. Using a cross-flow microfluidic chip and external crosslinking reaction for monodisperse TPP-chitosan microparticle. *Sensors and actuators B: Chemical*. V. 124, p.510-516, 2007.

ZHANG, F; WU, Q; CHEN, Z.C; ZHANG, M; LIN, X.F. Hepatic-targeting microcapsules construction by self-assembly of bioactive galactose-branched polyelectrolyte for controlled drug release system. *Journal of Colloid and Interface Science*.v.317, p.477-484, 2008.

ZOLNIK, B.S; BURGESS, D.J. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *Journal of Controlled Release*. v. 122, p. 338-344, 2007.

Anexo I

Anexo II

Anexo III
