

VIVIA BUZZI

**MICROESFERAS DE POLISSACARÍDEOS POR REDES POLIMÉRICAS
INTERPENETRANTES (RPI) PARA O ESTUDO E MODULAÇÃO DO PERFIL DE
LIBERAÇÃO DO PIROXICAM**

JOINVILLE

2009

VIVIA BUZZI

**MICROESFERAS DE POLISSACARÍDEOS POR REDES POLIMÉRICAS
INTERPENETRANTES (RPI) PARA O ESTUDO E MODULAÇÃO DO PERFIL DE
LIBERAÇÃO DO PIROXICAM**

Projeto de pesquisa apresentado como
requisito parcial para obtenção do título
de mestre em Engenharia de Processos
na Universidade da Região de Joinville.
Professora Orientadora: Dra. Denise
Abatti Kasper Silva
Professora co-Orientadora: Dra. Ana
Paula Testa Pezzin

JOINVILLE

2009

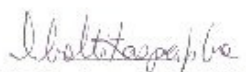
Termo de Aprovação

“Microesferas de polissacarídeos por redes poliméricas interpenetrantes (RPI) para o estudo e modulação do perfil de liberação do piroxicam”

por

Vivia Buzzi

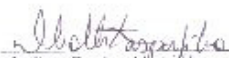
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.


Prof. Dra. Denise Abatti Kasper Silva
Orientadora (U. NIVILLE)


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Co-Orientadora (UNIVILLE)

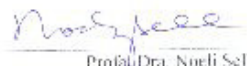

Prof. Dra. Noeli Sellin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

Banca Examinadora:


Prof. Dra. Denise Abatti Kasper Silva
Orientadora (U. NIVILLE)


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Co-Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Marcia Margarete Meier
(PGM Produtos Odontológicos Ltda)


Prof. Dra. Noeli Sellin
(UNIVILLE)

Joinville, 18 de setembro de 2009

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de colocar um agradecimento especial as pessoas que me ajudaram e acompanharam todo o desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Dra. Denise Abatti k. Silva, minha orientadora pela oportunidade, estímulo a pesquisa e inúmeros ensinamentos.

A Professora Dra. Giovana C. Bazzo, por toda sua contribuição, paciência e conhecimentos transmitidos;

A Professora Dra. Ana Paula T. Pezzin pela sua contribuição em várias etapas deste trabalho;

Ao Professor Msc. Theodoro W. Maciel por sua grande colaboração em análises de HPLC e CG/MS;

As alunas de iniciação científica Gabriela Tambosi e Marli Bruder pela intensa dedicação na parte experimental deste trabalho, que sem a atuação delas não seria possível à realização deste trabalho;

A Professora Dra. Elisabeth Wisbeck pela sua contribuição nas análises estatísticas;

A FAPESC, órgão que financiou a bolsa de estudos para a realização deste trabalho;

A minha família, Gentil, Elenita e Sheila, que sempre me apoiaram e incentivaram aos estudos e esteve sempre presente;

Ao Eduardo, por todo amor, carinho, paciência, compreensão (quando muitas vezes estive ausente) e incentivo que me deu durante todo o caminho percorrido para chegar até aqui;

E a todas aquelas pessoas que de alguma maneira contribuíram e ajudaram para a realização deste trabalho.

A todos, muito OBRIGADA!

*"O Homem pode adquirir conhecimento ou se tornar um animal,
como ele quiser. Deus faz os animais, o homem faz a si próprio."*

Georg Lichetnbery

RESUMO

Os hidrogéis são materiais formados de polímeros hidrofílicos que apresentam capacidade de absorver grande quantidade de água ou fluidos biológicos e liberar agente ativo de forma controlada. Uma das maneiras de obter microesferas de hidrogéis com tais características é por sistemas semi-RPI. A gelatina e alguns derivados de celulose podem ser usados como matrizes nesses sistemas. Neste trabalho, estudou-se a imobilização do Piroxicam (P) em micropartículas obtidas em diferentes matrizes: Alginato/Carboximetil celulose (Alg/CMC) e Gelatina/CMC (Gel/CMC) e avaliaram-se as melhores condições de encapsulação e liberação do fármaco. As micropartículas foram preparadas pelo método de emulsão reticulação em duplicata e aplicou-se um planejamento fatorial 2^3 cujos fatores foram CMC (10 ou 20% em relação à massa de gelatina), cloreto de cálcio (3 e 5%) ou glutaraldeído (5 e 10%) e quantidade de Piroxicam na emulsão (20 ou 40 mg). As micropartículas foram separadas por filtração, lavadas, congeladas e liofilizadas por, no mínimo, 2h30'. Caracterizaram-se as micropartículas por microscopias ótica e eletrônica de varredura (MEV), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-x (DR-X). Além disso, determinou-se a eficiência de encapsulação (EE%) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o percentual de hidratação (PH%) e o perfil de liberação *in vitro* do Piroxicam. A análise do planejamento fatorial indicou que o sistema mais eficiente para encapsular o Piroxicam foi o de micropartículas de Gel/CMC com níveis de CMC e glutaraldeído mais elevados. A caracterização do sistema Alg/CMC mostrou que o processo de liofilização modificou a forma das micropartículas, que passaram de esféricas para disformes e que a presença do Piroxicam não alterou a textura, a forma e o tamanho das partículas. As análises de DSC e DR-X não detectaram Piroxicam cristalino nas matrizes, justificado pela baixa eficiência de encapsulação, inferior a 3%. A análise do planejamento fatorial mostrou que o percentual de CMC na matriz apresentou influência significativa sobre a EE% quando em menor nível. Já os demais fatores e suas combinações apresentaram influência estatisticamente insignificante. Os resultados do sistema Gel/CMC apontaram que a EE% chegou a 11% quando houve aplicação de percentuais mais elevados de CMC e glutaraldeído. A análise morfológica demonstrou que as micropartículas apresentaram formas regulares, esféricas e superfície rugosa semelhante a esponjas. Observou-se ainda, a presença de Piroxicam na superfície das micropartículas, principalmente das amostras G4(-+-) e G5(++-), indicando que o fármaco estava parcialmente adsorvido e não encapsulado. A amostra G8(+++) apresentou menor quantidade de fármaco na superfície e para a G7(++-) essa característica é menos evidente. Os espectros de infravermelho das amostras confirmaram a presença do Piroxicam nas micropartículas e a análise comparativa de DSC e DR-X demonstraram que o fármaco manteve a forma cristalina original. O teste de intumescimento indicou que o aumento da quantidade de glutaraldeído reduziu o grau de hidratação de 405,6% para 283,9%. A presença de CMC não influenciou significativamente essa propriedade. No ensaio de liberação, as amostras G4(-+-) e G5(++-) apresentaram velocidades de liberação superiores (0,48 e 0,34 mg/Lmin) às registradas para G7(++-) e G8(+++) (0,27 e 0,22 mg/Lmin), concordando com as observações de MEV. Conclui-se que a EE% e o perfil de liberação de Piroxicam foi melhor nas amostras com maiores concentrações de CMC e glutaraldeído (G7(++-) e G8(+++)).

Palavras-chaves: hidrogel, microencapsulação, Piroxicam, biopolímeros

ABSTRACT

Hydrogels are materials made of hydrophilic polymers that have the ability to absorb large amounts of water or biological fluids and release the active agent in a controlled manner. One way to obtain hydrogel microspheres with such characteristics is by semi-IPN systems. Gelatin and some cellulose derivatives can be used as matrices in these systems. The aim of this work was to study the Piroxicam (P) immobilization microparticles obtained in different matrices, one Alginate/ Carboxymethyl cellulose (Alg/CMC) and a gelatin/CMC (Gel/CMC) and evaluated the best conditions for encapsulation and drug release. Microspheres were prepared by emulsion crosslinking method in duplicate and applied a factorial planning 2^3 of which factors were CMC (10 or 20% by mass of gelatin), calcium chloride (3 and 5%) or glutaraldehyde (5 and 10%) and amount of Piroxicam in the emulsion (20 or 40 mg). Microspheres were separated by filtration, washed, frozen and dried for at least 2h30. Characterized by optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and x-ray diffraction (XRD). Furthermore, we determined the encapsulation efficiency (EE%) by high performance liquid chromatography (HPLC), the percentage of hydration (PH%) and the release profile *in vitro* of Piroxicam. The analysis of the factorial planning showed that the most efficient system to encapsulate the Piroxicam was the microparticle Gel/CMC with higher levels of CMC and glutaraldehyde. The characterization of the Alg/CMC system showed that freeze-drying changed the form of microparticles, which changed from spherical to deformed and that the presence of Piroxicam did not change the texture, shape and size of the microparticles. DSC and XRD analysis did not detect crystalline Piroxicam in matrices, justified by the low encapsulation efficiency of less than 3%. The analysis of the factorial planning showed that the percentage of CMC in the matrix had a significant influence on the EE% when a lesser level. The other factors and their combinations showed statistically significant influence. The results of the Gel/CMC system showed that the EE% reached 11% when higher percentages of CMC and glutaraldehyde were used. The morphological analysis showed that the microparticles presented regular shape, spherical and rough surface like sponges. It was also observed the presence of Piroxicam on the surface of the microparticles, especially for the samples G4 (-+-) and G5(+--), indicating that the drug was partially adsorbed and not encapsulated. The sample G8 (+++) showed lower amount of drug on the surface while this characteristic is less evident for the sample G7 (+++). The infrared spectra of the samples confirmed the presence of Piroxicam in microparticles and a comparative analysis of DSC and XRD showed that the drug maintained its original crystalline form. The test percentage of hydration (PH%) indicated that the swelling increased amounts of glutaraldehyde reduced the degree of hydration from 405.6 to 283.9%. The presence of CMC did not affect this property. The test release profile *in vitro* of Piroxicam samples G4 (-+-) and G5 (+--) showed higher release velocities (0.48 and 0.34 mg / Lmin) recorded for the G7 (+++) and G8 (+ + +) (0.27 and 0.22 mg / Lmin) in agreement with the observations of SEM. We can conclude that the EE% and the release profile of Piroxicam was improved in samples with higher concentrations of CMC and glutaraldehyde G7(++-)and G8 (+++).

Keywords: Hydrogels, microencapsulation, Piroxicam, biopolymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diferença estrutural entre microesferas (A) e microcápsulas (B).....	18
Figura 2- Representação esquemática da síntese de sistemas semi-RPI	21
Figura 3 - Fórmula estrutural da molécula de Alginato	23
Figura 4 - Fórmula estrutural da carboximetilcelulose de sódio (CMCNa)	24
Figura 5 - Fórmula estrutural da molécula de gelatina.	25
Figura 6 - Fórmula Estrutural do fármaco Piroxicam.	27
Figura 7- Micrografias de microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de PHB/quitosana contendo Piroxicam	29
Figura 8 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de acetobutirato de celulose/PHB usando Piroxicam com aumentos de 200X (A) e 50X (B)	30
Figura 9 - Fluxograma para a descrição da metodologia	31
Figura 10 - Esquema de obtenção das micropartículas Alg/CMC pelo método de emulsão-reticulação	33
Figura 11 - Esquema de obtenção das micropartículas Gel/CMC pelo método de emulsão-reticulação	35
Figura 12 - Gráfico de pareto para as micropartículas de Alg/CMC	41
Figura 13 -Microscopia óptica das micropartículas de Alg/CMC com ampliação de 40x (A) e (B) A3 (2%CMC; 5% CaCl ₂ ; 10% Piroxicam)após filtração e liofilização respectivamente	42
Figura 14 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de Alg /CMC para PP (padrão de Piroxicam), AB controle (sem fármaco) A1, A2, A3 e A6 respectivamente	43
Figura 15 – Curvas de DSC para as micropartículas de Alg/CMC.	45
Figura 16 – Difrátogramas das micropartículas de Alg /CMC obtidas a partir de formulação A1, A2, A3, A6, AB controle (sem fármaco) e PP (padrão Piroxicam)	46

Figura 17 - Espectro no infravermelho com transformada de Fourier FTIR para as micropartículas, PP (padrão de Piroxicam), AB (controle), A1, A2, A3 e A6 respectivamente de Alg/CMC.....	49
Figura 18 - Teste Q de Dixon aplicado para as micropartículas de Gel/CMC.	51
Figura 19 – Gráfico de pareto para as micropartículas de Gel/CMC.....	51
Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta para as micropartículas de Gel/CMC...	52
Figura 21 -Microscopia óptica das microesferas de Gel./CMC com ampliação de 40 x após filtração G5(20%CMC; 5% glutaraldeído; 10% Piroxicam).....	53
Figura 22 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de Gel/CMC obtidas a partir da formulação P (Piroxicam), GB (controle) G4, G5, G7e G8.	54
Figura 23 – Curvas de DSC para as micropartículas de Gel/CMC.....	55
Figura 24 – Difrátogramas das micropartículas de Gel /CMC obtidas a partir da formulação G4, G5, G7, G8, GB controle (sem fármaco) e PP (padrão Piroxicam).	57
Figura 25 - Espectro no infravermelho com transformada de Fourier FTIR para as micropartículas, PP (padrão de Piroxicam), GB (sem fármaco), G4, G5, G7 e G8 respectivamente de Gel/CMC	58
Figura 26 - Perfil de liberação para as micropartículas de Gel/CMC.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Planejamento fatorial 2^3 para a preparação das micropartículas em matriz de Alg/CMC. Os índices (–) e (+) indicam o nível de cada variável como inferior e superior, respectivamente	34
Tabela 2: Planejamento fatorial 2^3 para a preparação das micropartículas em matriz De Gel/CMC. Os índices (–) e (+) indicam o nível de cada variável como inferior e superior, respectivamente	36
Tabela 3: Eficiência de encapsulação (EE%) e desvio padrão para as formulações de Alg/CMC	40
Tabela 4: Temperaturas e entalpias de fusão para as micropartículas de Alg/CMC ...	45
Tabela 5: Principais bandas de absorção no infravermelho (FTIR) observadas para o Piroxicam.....	47
Tabela 6: Principais bandas de absorção no infravermelho observadas para a matriz alginato/CMC.....	48
Tabela 7: Eficiência de encapsulação (EE%) e desvio padrão para as formulações de Gel/CMC.....	50
Tabela 8: Temperaturas e entalpias de fusão para as micropartículas de Gel/CMC ..	56
Tabela 9: Principais bandas de absorção no infravermelho (FTIR) observadas para a matriz Gel/CMC.	59
Tabela 10: Valores obtidos para o percentual de hidratação das amostras de Gel/CMC.....	60
Tabela 11: Correlação dos valores referente aos ensaios de velocidade de liberação, EE% e PH%	62

LISTA DE ABREVIATURAS

RPI	rede polimérica interpenetrante
Alg.	alginato
CMC	carboximetilcelulose
Gel.	gelatina
CaCl₂	cloreto de cálcio
CMCNa	carboximetilcelulose sódica
pKa	coeficiente de dissociação ácida
FTIR	espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
DR-X	difração de raios-x
DSC	calorimetria exploratória diferencial
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PVP	polivinilpirrolidona
CG/MS	cromatografia gasosa com espectrômetro de massa acoplado
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
EE%	eficiência de encapsulação %
PP	Piroxicam padrão
AB	controle para matriz alginato (apenas matriz, sem fármaco)
GB	controle para matriz gelatina (apenas matriz, sem fármaco)
PH%	percentual de hidratação
DP%	desvio-padrão %
T_T	temperatura de transição
ΔH	entalpia de transição

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Microencapsulação de fármacos.....	17
2.2 Métodos tradicionais para obtenção de micropartículas.....	18
2.3 Hidrogéis.....	20
2.4 Polímeros hidrossolúveis características e aplicações.....	22
2.5 Tensoativos e suas funções.....	26
2.6 Propriedades do fármaco Piroxicam.....	27
2.7 Estado da arte microencapsulação de Piroxicam.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Materiais.....	31
3.2 Métodos.....	31
3.3 Preparação de micropartículas semi-RPI.....	32
3.3.1 Micropartículas de Alginato/CMC.....	32
3.3.2 Planejamento experimental para micropartículas de Alginato/CMC.....	33
3.3.3 Micropartículas de Gelatina/CMC.....	34
3.3.4 Planejamento experimental para micropartículas de Gelatina/CMC.....	35
3.3.5 Análise de incorporação do fármaco nas matrizes.....	36
3.4 Caracterização da morfologia e de superfície das micropartículas.....	36
3.5 Interação matriz-fármaco e estado físico do agente ativo.....	37
3.6 Determinação da eficiência de encapsulação (EE%) do agente ativo nas matrizes propostas.....	37
3.7 Análises estatísticas.....	38
3.8 Velocidade de intumescimento.....	38
3.9 Perfil de liberação do fármaco <i>in vitro</i>	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	40

4.1 Micropartículas de Alg/CMC	40
4.1.1 Caracterização das micropartículas de Alg/CMC	42
4.1.1.1 Caracterização Morfológica: microscopia óptica (M.O) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
4.1.1.2 Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X. 44	
4.2 Micropartículas de Gel/CMC	50
4.2.1 Caracterização das micropartículas de Gel/CMC	49
4.2.1.1 Caracterização Morfológica: microscopia óptica (M.O) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.2.1.2 Análises de Calorimetria exploratória diferencial(DSC) e difração de raio-X... 55	
4.2.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier FTIR	58
4.2.2 Velocidade de intumescimento.....	60
4.2.3 Perfil de liberação do fármaco <i>in vitro</i>	60
 5. CONCLUSÕES	 63
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 64
 APÊNDICES	 72

1. INTRODUÇÃO

A técnica de microencapsulação é realizada comercialmente no Brasil, e atende a vários segmentos, dentre eles o farmacêutico, o cosmético, de alimentos, pesticidas, pigmentos, agentes de cura e encapsulação de células vivas, incluindo enzimas e microorganismos (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000).

A microencapsulação é um processo amplamente aplicado na área farmacêutica com vários objetivos, entre eles: desenvolvimento de formas de liberação controlada, obtenção de micropartículas gastro-resistentes, desenvolvimento de formas de liberação intrapulmonar e intra-articular, diminuição da toxicidade gastrointestinal, aumento da dissolução e biodisponibilidade e tratamento das doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (PEREIRA, *et.al*, 2006^A).

Um dos fármacos de grande interesse para se diminuir a toxicidade gastrointestinal é o Piroxicam, um medicamento anti-inflamatório de ingestão oral, comumente utilizado para aliviar os sintomas da artrite reumatóide, osteoartrite, dor pós-operatória; atuando também como um analgésico, especialmente quando há um componente inflamatório. Entretanto, este fármaco causa irritações gastro-intestinais, como apontam as inúmeras reclamações dos usuários deste medicamento, principalmente quando se realiza um tratamento prolongado durante o qual ocorre o aparecimento de gastrite, que muitas vezes evolui e transforma-se em uma úlcera ou algo mais grave. Acredita-se que a resposta insatisfatória da formulação oral esteja relacionada à possível hidrólise do agente ativo no trato gastrointestinal.

Segundo a Agência Européia de Medicamentos com dados de 2007, a recomendação de prescrições com o Piroxicam foi restringida, devido ao riscos de reações adversas gastrointestinais que este fármaco pode causar. Isto não se aplica aos medicamentos que contenham o Piroxicam para aplicação tópica (local). Dessa forma, encapsular medicamentos como o Piroxicam tornam-se uma estratégia simples e que pode reduzir a irritação gastrointestinal provocada pelo fármaco. Esse efeito é conseguido aplicando-se como membrana um material resistente ao meio

ácido e que se decompõe em pH alcalino. Assim, a cápsula passa pelo estômago sem se romper, permitindo a absorção do ativo apenas no intestino, onde o meio alcalino existente propiciará sua liberação, graças à degradação da membrana. Alguns polímeros apresentam essas características como, por exemplo, poliésteres biodegradáveis e alguns polissacarídeos na forma de hidrogéis (CUI *et. al*, 2006).

Uma das maneiras de obter microesferas de hidrogéis com tais características é através de sistemas semi-RPI (*semi-interpenetrating polymer network, semi-IPN*) ou RPI. O primeiro sistema caracteriza-se pela combinação de um polímero na forma reticulada e o segundo na forma linear. Os hidrogéis RPI são formados pela combinação de dois polímeros diferentes e ambos são reticulados. A gelatina, o alginato de sódio e alguns derivados hidrossolúveis de celulose podem ser usados como matrizes bioabsorvíveis para liberação de fármacos nesses sistemas.

O interesse por hidrogéis se baseia em suas características como a biocompatibilidade e a não toxicidade, o que os torna candidatos em potencial para serem aplicados na área médica e farmacêutica, principalmente na preparação de fórmulas de administração oral.

As propostas de encapsular o Piroxicam estão indicadas em literatura recente, a exemplo de Bazzo *et al.* (2009^B) e Rinaldi *et al.* (2009), o que expressa a importância na obtenção de alternativas para manter esse fármaco em uso e o caráter diferencial desta proposta em propor a aplicação de hidrogéis.

O presente trabalho teve como propósito estudar o efeito da encapsulação do fármaco Piroxicam em matrizes semi-RPI de alginato de sódio/carboximetilcelulose (Alg/CMC) e gelatina/carboximetilcelulose (Gel/CMC).

Para isso, depois de obtidas as micropartículas, verificou-se a incorporação do fármaco nas matrizes propostas; determinou-se a eficiência de encapsulação (EE%) do agente ativo nas matrizes; caracterizou-se a morfologia e a superfície das micropartículas, a interação matriz-fármaco e estado físico do agente ativo; estabeleceu-se o grau de intumescimento das micropartículas; e por fim delineou-se o perfil de liberação do fármaco.

Para descrever o estudo desenvolvido, este trabalho foi organizado em 5 seções. A seção 2 a seguir, apresenta uma revisão bibliográfica (concisa) sobre a importância da microencapsulação, principais métodos de obtenção de micropartículas, polímeros, hidrogéis. Na Seção 3, encontram-se os materiais e

métodos aplicados para o estudo. Já na seção 4 têm-se os resultados e discussões e por fim, na seção 5, encontram-se as conclusões e algumas considerações finais do trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microencapsulação de fármacos

Microencapsulação é a técnica que permite encapsular substâncias sólidas ou líquidas no interior de matrizes poliméricas ou revesti-las com polímeros (WISE, 2000; UDDIN, 2001). Atualmente, a microencapsulação vem sendo utilizada em diversas áreas. Na área farmacêutica, pode ser empregada com as seguintes finalidades (WISE, 2000) (BERKLAND *et al.*, 2004):

- Controlar ou prolongar a liberação de fármacos;
- Diminuir as flutuações plasmáticas de certos fármacos, diminuindo ocorrência de efeitos colaterais, especialmente quando administrado por via oral;
- Proteger substâncias que degradam facilmente pela ação de agentes externos, tais como umidade, luz e oxigênio, promovendo uma melhoria na sua estabilidade;
- Proteger fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, com proteínas e hormônios;
- Mascaram o sabor e/ou odor desagradáveis de certas substâncias, entre outras aplicações.

As micropartículas poliméricas podem ser denominadas de microesferas ou microcápsulas, diferindo com relação à estrutura final da partícula, conforme representado na Figura 1.

Conforme Kumar (2000), microesferas são a rigor partículas esféricas ocas ao passo que microcápsulas são definidas como partículas de tamanho entre 50 nm a 2 μ m contendo uma substância como núcleo.

Suave *et al.* (2006) definem microesferas como sendo partículas compactadas constituídas por uma rede polimérica na qual a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular. Já as microcápsulas são as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável.

As microcápsulas são formadas pelo envolvimento do material ativo ou núcleo com o material de parede ou encapsulante e podem ter diâmetros variando entre unidades de micrometros até milímetros e apresentar diversas formas, dependendo dos materiais e métodos usados para sua obtenção (ABURTO, *et al.*, 1998).

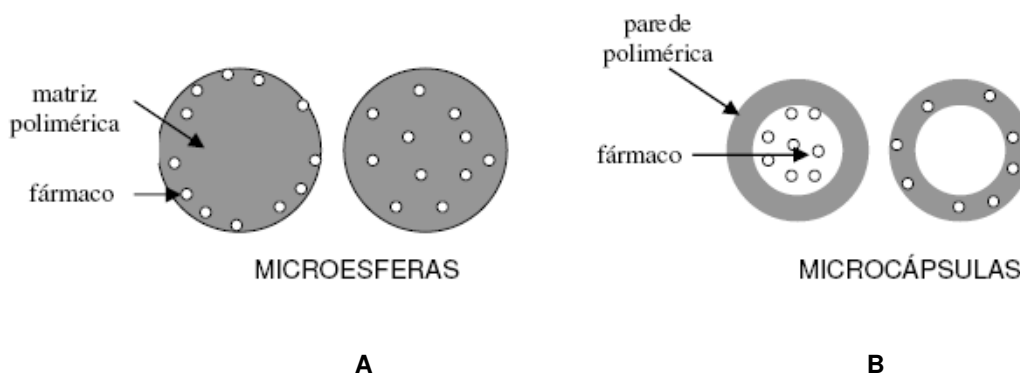


Figura 1-Diferença estrutural entre microesferas (A) e microcápsulas (B). Fonte: Bazzo, 2008^c.

2.2 Métodos tradicionais para obtenção de micropartículas

A escolha do método mais adequado para se obter micropartículas depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação (SUAVE *et al.*, 2006). Os métodos mais utilizados serão descritos a seguir:

Spray-drying é amplamente utilizado na secagem de materiais por oferecer um excelente contato entre as partículas e o gás. O estudo de processos de secagem e decomposição térmica de materiais neste equipamento, visa à otimização de processos industriais e a obtenção de produtos com características morfológicas (área superficial, diâmetro médio de partícula, densidade específica) de acordo com as exigências do mercado (RATTES e OLIVEIRA, 2007).

Segundo Barros e Stringuetha (2006), a microencapsulação conduzida em um equipamento *spray-drying* envolve três etapas básicas: a primeira, relativa à preparação da dispersão ou emulsão a ser preparada; a segunda refere-se à homogeneização dessa dispersão e finalmente, a atomização da massa dentro da câmara de secagem.

A técnica de microencapsulação mais antiga e talvez a mais utilizada, envolve a separação de fases por coacervação, que consiste na deposição do polímero ao redor do agente ativo a ser recoberto pela alteração das características físico-químicas do meio, tais como a temperatura, a força iônica, o pH ou a polaridade (SUAVE *et al.* 2006). Essa técnica envolve a associação reversível de dois polímeros e apresenta algumas vantagens frente a outras técnicas como a possibilidade de se trabalhar com biopolímeros, a ausência de solvente orgânico e condições brandas de temperatura no processamento (PRATA, 2006).

O método de emulsão e evaporação de solvente consiste em dissolver o polímero e o fármaco em um solvente orgânico e posteriormente emulsificar em uma solução aquosa, contendo um estabilizante ou emulsificante, sob agitação. A evaporação do solvente orgânico, realizada em temperatura adequada, leva à formação das micropartículas. A emulsão obtida por esta técnica é denominada óleo em água (O/A) e aplicada apenas nos casos em que o polímero e o fármaco são insolúveis em água. Baixas eficiências de encapsulação são obtidas quando se utilizam fármacos hidrossolúveis, uma vez que estes tendem a difundir e solubilizar-se na fase aquosa (GIBAUD; BONNEVILLE e ASTIER, 2002) (WANG e WANG, 2002).

A técnica de emulsificação seguida de reticulação envolve procedimentos simples na obtenção das partículas, além de apresentar a possibilidade de modular as características físico-químicas das microesferas pela escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação. Esta técnica não requer temperaturas elevadas nem agentes que induzam a separação de fases e é possível atingir tamanhos de partícula controlados na faixa nano e micrométrica (ANDREANI, 2008). Esta é uma das técnicas mais utilizadas na preparação de micropartículas e permite a incorporação tanto de fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos. Uma vantagem desta metodologia é a sua simplicidade de execução. Porém, requer a seleção adequada de solventes, emulsificantes e condições de agitação (WATTS *et al.*, 1990).

As características das micropartículas obtidas pela técnica de emulsão/reticulação, bem como a liberação de fármacos a partir da matriz polimérica, dependem da concentração, solubilidade, massa molar, entre outras propriedades físico-químicas do polímero, dos solventes empregados, do tipo e concentração do emulsificante, das características físico-químicas do fármaco, da velocidade de

agitação, temperatura, bem como da velocidade de remoção do solvente (WISE, 2000; O'DONNELL e MCGINITY, 1997).

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos utilizando a técnica de emulsificação/reticulação na preparação de microesferas com diferentes polímeros. Podem-se citar entre eles diferentes polissacarídeos, tais como a celulose e seus derivados, os alginatos e as quitosanas (ROKHADE *et al.*, 2006; BAZZO *et al.* 2009^b). Como exemplo, Chen *et al.* (2006) desenvolveram microesferas baseadas em alginato de sódio e proteína do soro para utilizações como matrizes biocompatíveis para a administração oral de compostos bioativos sensíveis, usando riboflavina como modelo. As microesferas de alginato e proteína do soro demonstraram a habilidade de retardar a liberação de compostos no estômago, porém permitiu a completa liberação no intestino delgado.

A presença de um estabilizante ou emulsificante na fase externa da emulsão é um fator crítico para a obtenção de partículas esféricas individuais. A função do emulsificante é prevenir a agregação das microesferas durante a evaporação do solvente, bem como promover a estabilização das gotículas de solvente durante o processo de evaporação. Vem sendo utilizados como emulsificantes, a gelatina, alginato, hidroxipropilmetil celulose, polissorbatos, entre outros (COUVREUR *et al.*, 1997; DINARVAND, MIRFATTAH e ATYABI, 2002).

Polímeros hidrofílicos, como a gelatina, o alginato e outros polissacarídeos possuem a propriedade de formar redes insolúveis quando reticulados e intumescerem o que os define como hidrogéis (ZHANG *et al.*, 1998^A; MUNIZ e GEUSKENS, 2000; PEPPAS *et al.*, 2000; MUTA *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2003^B; GUILHERME, *et al.*, 2005).

2.3 Hidrogéis

O interesse pelos hidrogéis se baseia em suas características que, dentre elas, podem ser destacadas a biocompatibilidade e a não toxicidade (HOFFMAN, 2002; GUPTA *et al.*, 2002; ROSSO *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004^B; CELLESI *et al.*, 2004). Assim, os hidrogéis são candidatos em potencial para serem utilizados

principalmente na área médica e farmacêutica. Dentre as diversas aplicações, destacam-se as lentes de contato, processos de separação, moduladores de liberação de fármacos, substratos para cultura de células, implantes terapêuticos, entre outras (SHAPIRO e COHEN, 1997; HENDRICK *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006).

Uma das maneiras de se obter hidrogéis com boa estabilidade mecânica e permeabilidade controlada é sintetizá-los como sistemas semi-IPN (do inglês *semi-interpenetrating polymer network*: semi-IPN) ou RPI (IPN) (LU *et al.*, 2003 ^A; ZENG e FANG, 2004; LU *et al.*, 2004 ^B; ZHANG *et al.*, 2006). Para os sistemas semi-RPI, hidrogéis são formados pela combinação de um polímero na forma reticulada e outro na forma linear. A representação esquemática da síntese do sistema semi-RPI está ilustrada na Figura 2. Os hidrogéis RPI são formados pela combinação de dois polímeros diferentes, ambos reticulados (AOUADA, 2005). Pesquisas recentes vêm demonstrando a eficiência desses sistemas também na formação de microesferas (ZHANG *et al.*, 2006; ROKHADE *et al.*, 2006).

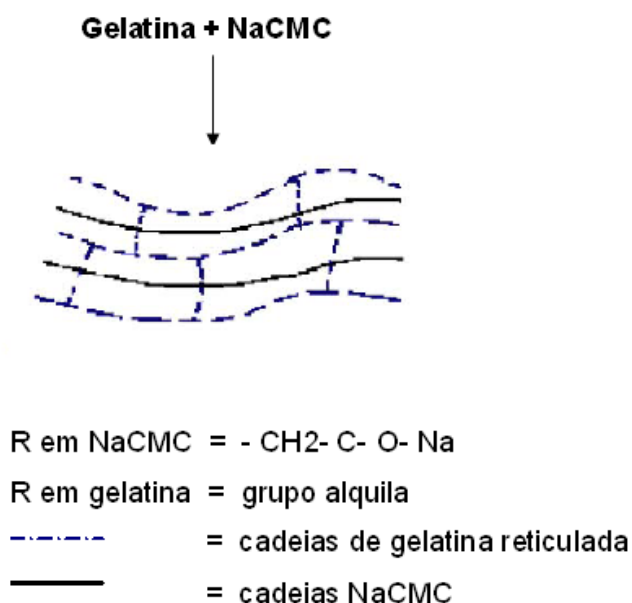


Figura 2-Representação esquemática da síntese de sistemas semi-RPI. Fonte: Adaptado de Rokhade, et al., 2006.

2.4 Polímeros hidrossolúveis características e aplicações

Os polissacarídeos têm sido estudados por pesquisadores das áreas biomédicas e biotecnológicas a fim de explorar cada vez mais as potencialidades que estes materiais oferecem. Dentre esses polissacarídeos, destacam-se alguns derivados da celulose e de origem marinha como os alginatos. Estes polímeros são biocompatíveis, não necessitam de solventes orgânicos para solubilização e, no caso do alginato pode ser facilmente reticulado com CaCl_2 (MUKAI-CORRÊA *et al.*, 2005), além de permitirem a formação de microesferas.

Na última década, esses polímeros naturais, na forma de hidrogéis têm sido usados para a imobilização de enzimas e células encapsulação de fármacos, e mais recentemente para ativos cosméticos. Esses sistemas apresentam vantagens como atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo, além de serem encontrados em abundância na natureza (OLIVEIRA, 2004).

O alginato é um sal, normalmente de sódio, do ácido poliurônico, o ácido algínico, que se obtêm a partir de algas marrons. É muito viscoso e versátil quando aplicado na fabricação de alimentos (FENNEMA, 2000). Compõe a família dos polissacarídeos com estruturas não ramificadas, consistindo de ligações β -D-(1 $\rightarrow$ 4), formado por um copolímero linear do ácido β -D-manurônico (M) e do ácido α -L-gulurônico (G), que podem estar em blocos únicos (M) ou (G), ou alternados (MG). Na Figura 3 é possível verificar a estrutura do alginato. As propriedades físicas do alginato dependem da composição em ácido urônico e da quantidade relativa dos três blocos. O alginato forma géis em presença de cátions divalentes, como o cálcio, devido à formação de ligações cruzadas (SABRA e DECKWER, 2005). A difusão de íons cálcio para o interior do complexo assegura sua gelificação interna, podendo servir de revestimento de fármacos (DRAGET *et al.*, 2006^B; RODRIGUES *et al.*, 2006).

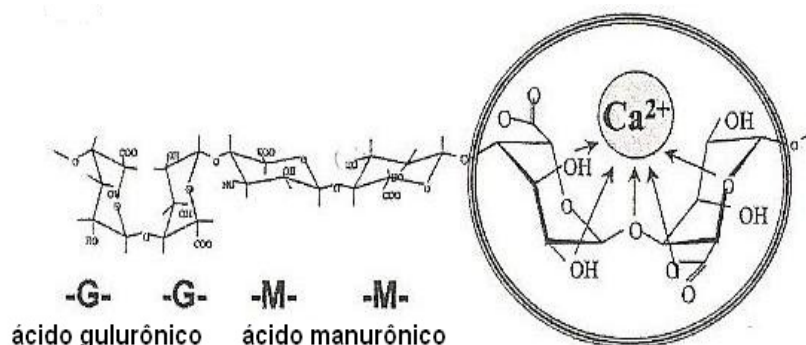


Figura 3 - Fórmula estrutural da molécula de Alginato. Fonte: Adaptado de Deckwer e Sabra, 1998.

Existem dois métodos de formação de gel de alginato: gelificação interna e difusão. No primeiro processo, ocorre inicialmente à nucleação com a gelificação simultânea em várias posições, e após a formação da rede de gel primária, ainda existirão blocos G livres que podem criar novas zonas de junção. No segundo processo, ocorre uma gelificação rápida, na qual a solução de alginato é gotejada em solução contendo os íons cálcio, formando esferas únicas e independentes (DRAGET, *et al.*, 2002^A). Suas propriedades mucoadesivas, estabilidade em condições ácidas e proteolíticas, biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo custo, quando comparados com outros hidrogéis, fazem deste polímero um produto com características bastante versáteis para o revestimento em sistemas microparticulados para liberação controlada de fármacos (PONCELET *et al.*, 1992; YUGUCHI *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; AMICI *et al.*, 2007).

A formação dos géis de alginato é independente da temperatura, porém uma mudança na temperatura pode influenciar o processo de gelificação, favorecendo a transição sol-gel na presença de íons cálcio (OLIVEIRA e SCARPA, 2004).

Mofidi *et al.* (2000) utilizaram o método de suspensão água-em-óleo e reticulação, para preparação de microesferas de alginato com tamanho controlado, resistentes ao aquecimento, esterilizáveis e secáveis. As partículas apresentaram baixa densidade e estabilidade mecânica, podendo ser esterilizadas e secas sem efeitos adversos, que permitiu a produção de microesferas uniformes com tamanho desejável.

A celulose é um polímero natural abundante, basicamente composto por unidades de glicose unidas por ligações β (1-4), sem ramificações. Os derivados iônicos da celulose como a carboximetil celulose sódica (CMCNa) vem se destacando na preparação de sistemas microparticulados para liberação controlada. A CMCNa é um carboximetil éter de celulose, apresenta elevada solubilidade em água, seu pKa é 4,52 e pode ser degradado por celulasas (DARVARI e HASIRCI, 1996), presentes em abundância na natureza. Devido a estas características, a CMCNa é uma ótima alternativa para formação de matrizes biodegradáveis (DARVARI e HASIRCI, 1996).

Pode tornar-se insolúvel em meio aquoso através de reações químicas de reticulação com acrilonitrila, metacrilato de metila (OKIEIMEN e OGBEIFUN, 1996) ou poliacrilamida (BAJPAI e GIRI, 2002). O uso de íons como cobre e ferro (PRASAD e KALYANASUNDARAM, 1995 ^B; PRASAD e KALYANASUNDARAM, 1993 ^A) e alumínio (IANNUCCELLI *et al.*, 1993; DARVARI e HASIRCI, 1996; KÖK *et al.*, 1999) formam complexos com os grupos carboxila da CMCNa, reduzindo sua solubilidade em água, devido à formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Na Figura 4 é apresentada a estrutura do CMCNa.

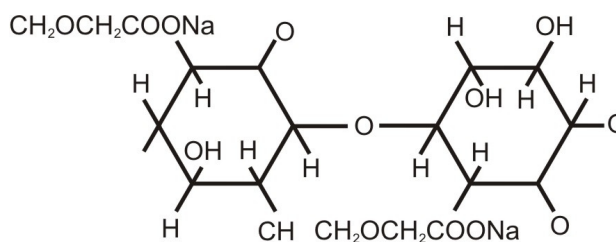


Figura 4 - Fórmula estrutural da carboximetilcelulose de sódio (CMCNa).

Michailova *et al.* (1999) estudaram as propriedades viscoelásticas da CMCNa em diferentes pHs. Observaram, que em meio ácido, a solução de CMC apresenta uma resposta semelhante a um material sólido. Raios-gama também foram usados para obter hidrogéis de blendas de CMC e polivinilpirrolidona com o propósito de serem aplicadas como curativos em feridas (WANG *et al.*, 2007). A CMC também foi sugerida para administração via nasal de apomorfina (UGWOKE *et al.*, 2000).

Microesferas semi-RPI de CMC e gelatina para liberação controlada de Trometamina foram caracterizadas por Rokhade *et al.*, (2006). Os autores relatam uma estreita distribuição no tamanho das partículas que variaram de 247 a 535 μm , embora esféricas apresentassem rugosidade na superfície. O estudo permitiu determinar a influência da quantidade de agente reticulante, de CMC e também a capacidade de carreamento do fármaco na liberação da Trometamina. As análises de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Difração de raios-X (DR-X) foram executadas para compreender a natureza cristalina do fármaco após a encapsulação. A eficiência de encapsulação do fármaco conseguida foi de 67% realizada por método UV. *In vitro*, os estudos da liberação indicaram uma dependência da taxa de liberação no agente reticulante e na quantidade de CMCNa usada para produzir as microesferas.

A gelatina é uma proteína purificada obtida por hidrólise ácida parcial (tipo A) ou hidrólise alcalina parcial (tipo B) do colágeno animal. Pode ser constituída por uma mistura dos dois tipos. A Figura 5 ilustra sua estrutura (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002).

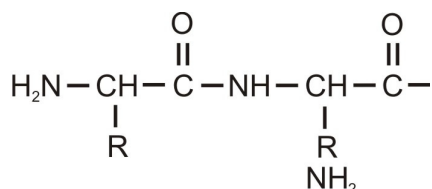


Figura 5 - Fórmula estrutural da molécula de gelatina.

A gelatina é sem dúvida o biopolímero mais popular. É usado com sucesso na indústria de alimentos como espessante e gelificante destacam-se também na indústria farmacêutica (RANADE; HOLLINGER, 2004), principalmente na produção de cápsulas. Gelatinas, normalmente, dissolvem-se em água a 40°C e ao sofrer resfriamento a temperaturas inferiores à ambiente formam um gel. O gel contém zonas de junção formadas em grande parte por triplas hélices ordenadas separadas ao longo das cadeias por resíduos de peptídeos dispostos de forma desordenada. Isto explicaria como e porque todos os géis e gelatinas se comportam em condições

isotérmicas como uma borracha (OUSADA e KHOKHLOV, 2002). Sua aplicação em sistemas de liberação vem sendo estudada na última década. Sistema RPI baseado em gelatina tem sido estudado, misturando-a com dextran como material biodegradável (KOSMALA, *et al.*, 2000; LIANG, *et al.*, 2004). A aplicação de hidrogéis RPI de ácido poli (acrílico) e gelatina e sua eficácia no carregamento de antibiótico, para o tratamento experimental (*in vivo*) de Osteomelite foi realizado por Changez *et al.* (2005).

2.5 Tensoativos e suas funções

Tensoativos são moléculas anfifílicas, as quais têm a característica de possuírem solubilidades diferentes quando presentes em meio aquoso. Possuem simultaneamente afinidade com água (hidrofílica) e com óleo (lipofílico). Denominam-se também surfactantes ou agentes de superfície. A maioria deles são sintéticos, porém, cada vez mais são utilizados os de origem natural (MAGALHÃES, 2000; GOMES *et al.*, 2005; FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

Dentre os agentes de interface amplamente utilizados na área farmacêutica, encontram-se os tensoativos não-iônicos à base de Sorbitol, principalmente Tween 80 e o Span 80 (MARTIN, 1993). O Span 80 é um tensoativo lipofílico, sendo desta forma solúvel ou dispersível em óleo, e é muito utilizado em produtos alimentícios e na preparação de medicamentos de administração oral (ANDREANI, 2008).

Os Tweens são ésteres de sorbitano etoxilados e agem como tensoativos hidrófilos, diferenciando-se pelo ácido graxo presente em sua estrutura. Em especial, o Tween 80, também conhecido como polissorbato 80, é um oleato, surfactante não-iônico, um líquido amarelo solúvel em água. (MAPRIC, 2009).

2.6 Propriedades do Fármaco Piroxicam

O Piroxicam é um antiinflamatório não-esteróide, que atua inibindo a atividade da enzima ciclooxigenase, que catalisa a biossíntese das prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico. O processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção, sendo que este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão. Também utilizado no tratamento de artrite gotosa aguda, artrite reumatóide, inflamação não-reumática e osteoartrite (KOROLKOVAS, 2002). Quimicamente, sua fórmula corresponde ao 4-hidróxi-2-metil-N-(piridinil-2)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido (THE MERCK INDEX, 2001). Trata-se de um pó branco a levemente amarelo, cristalino, praticamente insolúvel em água, solúvel em cloridrato de metileno, levemente solúvel em etanol (EUROPEAN, 2001). Possui massa molecular igual a 331,35 g/mol, com fórmula estrutural apresentada na Figura 6. Por ser um ácido fraco (pKa 6,3), sua solubilidade em água depende do meio.

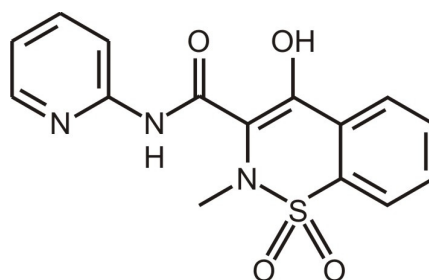


Figura 6 - Fórmula Estrutural do fármaco Piroxicam.

Kallinteri e Antimisialis (2001) avaliaram a solubilidade do Piroxicam em soluções aquosas com diferentes valores de pH (3,7; 5,0 e 7,0) e evidenciaram que a solubilidade do Piroxicam aumenta gradativamente com o aumento do pH.

Seu ponto de fusão varia de 198 a 200°C. Para sua identificação pode ser empregada a espectroscopia no infravermelho, comparando a um Piroxicam de referência, a espectrofotometria no ultravioleta, ou, ainda, a cromatografia líquida e a cromatografia em camada delgada (EUROPEAN, 2001; USP 25, 2000). Devido aos

riscos de reações gastrointestinais adversas que este fármaco pode causar, a Agência Europeia de Medicamentos (2007) restringiu a recomendação de prescrições com o Piroxicam. Isto não se aplica aos medicamentos que contenham o Piroxicam para aplicação tópica (local).

Figueras *et al.* (1994) referem que, na Espanha, os antiinflamatórios não-hormonais são os terceiros grupos de fármacos mais prescritos e constituíram 8,8% do total de relatos sobre eventos adversos a drogas. De 1609 reações adversas associadas ao uso de antiinflamatórios não-hormonais (diclofenaco, Piroxicam, naproxeno, indometacina e cetoprofeno) e notificadas ao Serviço de Farmacovigilância Espanhol, 364 foram reações associadas ao diclofenaco; 282, ao Piroxicam; 197, à indometacina; 155, ao uso de naproxeno, e 137, ao cetoprofeno. Os principais eventos adversos foram: reações gastrintestinais (39%), cutâneas (20%) e efeitos sobre o sistema nervoso central e periférico (9%).

A microencapsulação de alguns fármacos específicos pode ser extremamente vantajosa, como é o caso do Piroxicam. Este fármaco pode causar irritação da mucosa gastrintestinal quando administrado por via oral, fato que justifica a sua utilização na forma de sistemas multiparticulados, os quais tendem a se espalhar uniformemente, evitando a concentração do ativo em um único local e diminuindo, desta forma, a irritação (SWEETMAN, 2002).

2.7 Estado da arte microencapsulação de Piroxicam

Trabalhos recentes sugerem a encapsulação do Piroxicam em matrizes biodegradáveis. Microesferas contendo Piroxicam vêm sendo preparadas a partir de diferentes polímeros, como policarbonato (JOSEPH *et al.*, 2002), poli (anidrido sebácico) (PSA) (BERKLAND *et al.*, 2004), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLG) (POLLAUFG e PACK, 2006), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLG) (BERCHANE *et al.*, 2007), poli (3-hidroxibutirato) (PHB) (BAZZO *et al.*, 2009^b) e acetobutirato de celulose e PHB (RINALDI *et al.*, 2009).

Berkland *et al.* (2004) prepararam microesferas poli (anidrido sebácico) (PSA) e analisaram o efeito da polaridade de 3 fármacos diferentes, dentre eles o Piroxicam, bem como o efeito do tamanho das partículas sobre a eficiência de

encapsulação. Os resultados apontaram que o aumento do tamanho das partículas aumenta o teor de fármaco carregado pelo PSA. A eficiência de encapsulação atingida para o Piroxicam nessa matriz ficou entre 13 a 34%.

Microesferas de PLG contendo Piroxicam foram desenvolvidas por Berchane *et al.* (2007) para avaliar o efeito do tamanho das partículas, polidispersidade e a degradação do polímero na liberação do fármaco propondo um modelo matemático para os sistemas gerados. A eficiência de encapsulação obtida foi de 30%. No ensaio de liberação *in vitro* 50% do fármaco encapsulado, liberou-se dentro dos 3 primeiros dias e foi observado que a velocidade inicial de liberação diminuiu com um aumento no tamanho da microesfera. O modelo matemático que incluiu tanto a polidispersidade como o tamanho médio das partículas representou melhor o comportamento observado.

Bazzo *et al.* (2009^b) prepararam micropartículas de poli (3-hidroxibutirato) (PHB) e quitosana contendo Piroxicam e cetoprofeno como fármacos modelo pela técnica de emulsão/evaporação do solvente (O/A). No entanto, uma das limitações quanto ao emprego desse polímero é o elevado grau de cristalinidade e a alta velocidade de cristalização. A influência de alguns parâmetros do processo sobre a eficiência de encapsulação do Piroxicam foi avaliada por um planejamento fatorial do tipo 2³. A eficiência de encapsulação do fármaco foi de 33,5 a 23,3%. Na Figura 7 a partir da análise de MEV, as microesferas apresentaram forma esférica, diâmetro médio de $31,1 \pm 9,2 \mu\text{m}$ e superfície externa rugosa. No interior destas partículas, observou-se a predominância de uma matriz polimérica densa e algumas pequenas cavidades. Não foram observados cristais de Piroxicam aderidos à superfície. A liberação de 51,4% do fármaco ocorreu nos primeiros 45 min da análise.

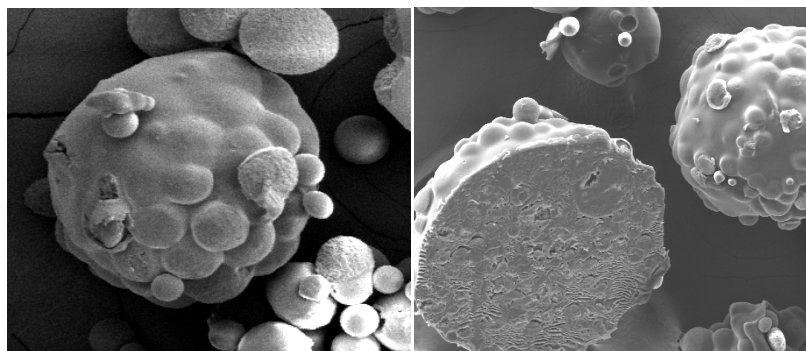


Figura 7 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de PHB/quitosana usando Piroxicam. Fonte: Bazzo, *et al.*, 2009^b.

Rinaldi *et al.* (2009) prepararam e caracterizaram micropartículas de acetobutirato de celulose e poli (3-hidroxibutirato) [PHB] contendo Piroxicam. As micropartículas foram preparadas por meio da técnica de emulsão/evaporação do solvente O/A. A eficiência de encapsulação conseguida foi em torno de 50%. A caracterização morfológica das micropartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 8 é possível observar que as micropartículas apresentaram-se com formas irregulares e cristais de fármaco não-encapsulado próximo à superfície das partículas. Para o ensaio de liberação após 2,5 horas, todas as formulações já haviam liberado cerca de 70-80% do fármaco.

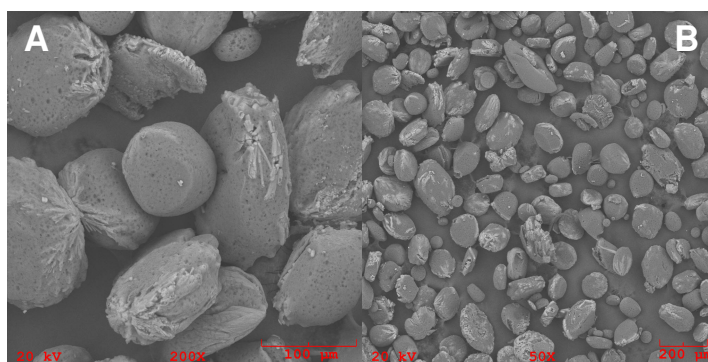


Figura 8 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura para as micropartículas de acetobutirato de celulose/PHB usando Piroxicam com aumentos de 200X (A) e 50X (B). Fonte: Rinaldi, *et al.* 2009.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os materiais usados foram adquiridos dos seguintes fornecedores: cloreto cálcio (CaCl_2) (PA) do laboratório Synth Ltda; Carboximetilcelulose (CMC) fornecedor Deg, diclorometano (PA) fornecedor Maia indústria e comércio Ltda, gelatina em pó e parafina da Vertec química fina Ltda; éter de petróleo (PA) da Maia indústria e comércio Ltda, clorofórmio (PA) do laboratório Synth Ltda; n-hexano 95% (PA) da Alphatec química fina; alginato, polivinilpirrolidona (PVP) e Span 80 da Sigma Aldrich; glutaraldeído 25% em água (PA) da Casa da química indústria e comércio Ltda e Piroxicam da Deg Imp. de Produtos Químicos.

3.2 Métodos

A Figura 9 apresenta o fluxograma com a descrição da metodologia realizada.

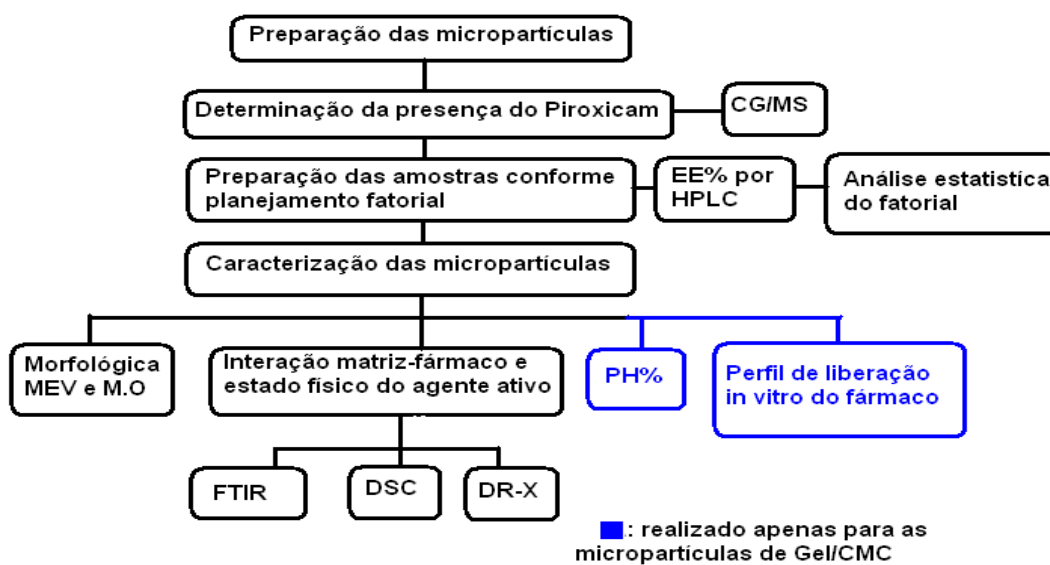


Figura 9 - Fluxograma para a descrição da metodologia.

3.3 Preparação de micropartículas semi-RPI

Os sistemas de micropartículas semi-RPI foram obtidos pelo método de emulsão-reticulação e estão descritos detalhadamente nos itens seguir:

3.3.1 Micropartículas de Alginato/CMC

A partir de uma adaptação da metodologia proposta por Zhang *et al.*, (2006) e apresentada na Figura 10, a 20 mL de uma solução alginato de sódio 3% (m/v) foi acrescentado CMC sob agitação, utilizando agitador da marca Ikamag Ret. (700 rpm), a 40°C, até completa dissolução. Em seguida, foi adicionado 1,25 mL de parafina líquida contendo 2% (m/m) de Span 80 e Piroxicam dissolvido em 1 mL clorofórmio, mantendo-se sob agitação, sob temperatura ambiente, por 1 hora. Paralelamente, preparou-se uma solução de diclorometano/hexano (1:2), contendo 0,3 g de Span 80. Adicionou-se esta composição orgânica à solução anterior sob agitação de 900 rpm por 10 min. Acrescentou-se, então, 5 mL de solução PVP 1,5% (m/v), mantendo-se a agitação por mais 20 min. Na seqüência, gotejou-se a emulsão em 150 mL de uma solução de cloreto de cálcio previamente preparada, mantendo-se em agitação a 1000 rpm, por 1 hora, para a reação de reticulação. As micropartículas formadas foram coletadas em funil de Büchner, lavadas com água deionizada (600 mL), mantidas refrigeradas por 12 h e posteriormente congeladas. Liofilizou-se por no mínimo 2h30'.

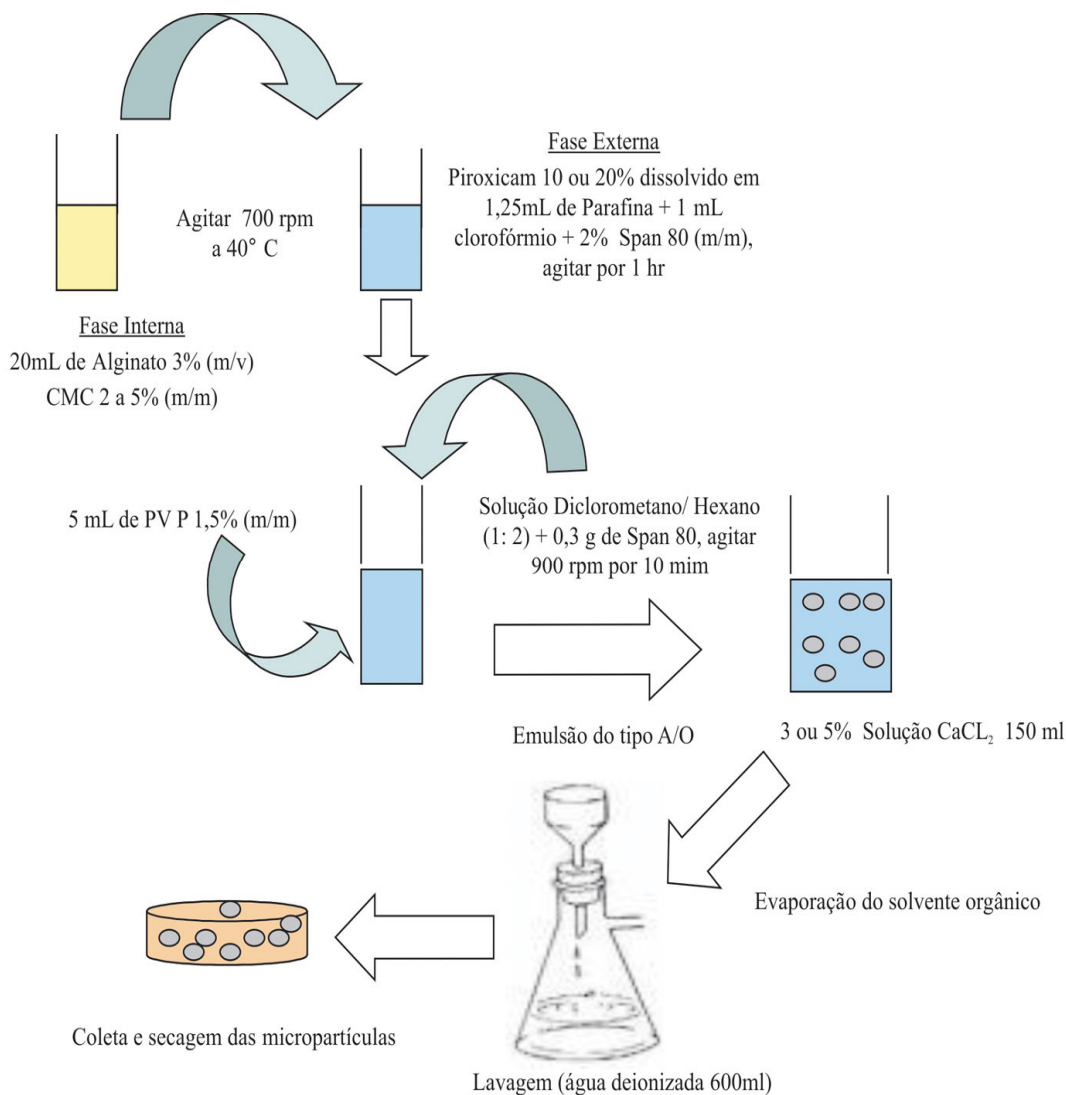


Figura 10 - Esquema de obtenção das micropartículas Alg/CMC pelo método de emulsão-reticulação.

3.3.2 Planejamento experimental para micropartículas de Alginato/CMC

Para realizar um planejamento experimental deve-se fixar um número de níveis (n) para cada um dos fatores ou variáveis (k). Realizando os experimentos em todas as combinações possíveis, é obtido um plano fatorial completo (n^K). Na maioria dos casos, para os estágios iniciais de experimentação, são utilizados dois níveis para cada fator. Desta forma, um fatorial completo envolvendo três fatores em dois níveis, requer 8 ensaios em duplicata (BARROS NETO *et al.*, 1996).

A Tabela 1 apresenta a variação dos teores de CMC, cloreto de cálcio e Piroxicam representando o fatorial 2^3 , elaborado para obtenção das micropartículas de Alg/CMC. Todas as amostras foram realizadas em duplicata.

Tabela 1: Planejamento fatorial 2^3 para a preparação das micropartículas em matriz de Alg/CMC. Os índices (-) e (+) indicam o nível de cada variável como inferior e superior, respectivamente.

<i>Alginate/CMC</i>	<i>Percentual de CMC na matriz 2% e 5%</i>	<i>Concentração da solução de CaCl_2 3% e 5%</i>	<i>Percentual de Piroxicam na emulsão 10% e 20%</i>
A1	-	-	-
A2	-	-	+
A3	-	+	-
A4	-	+	+
A5	+	-	-
A6	+	-	+
A7	+	+	-
A8	+	+	+

3.3.3. Micropartículas de Gel/CMC.

Baseado no método proposto por Tabata e Ikada (1989), adaptado por Rokhade *et al.* (2006) e representado na Figura 11, inicialmente, preparou-se uma solução 4% (m/v) de gelatina para 10 mL de solução. Em seguida, acrescentou-se CMC à solução de gelatina. Manteve-se a mistura sob agitação utilizando agitador da marca Ikamag Ret. (300 rpm), a 40 °C, por 30 min, para a completa dissolução da gelatina e da CMC e adicionou-se o Piroxicam. Verteu-se essa solução, vagarosamente, sobre uma mistura 60/40 (m/m) de parafina/éter de petróleo contendo 0,5% (m/m) de Span 80, mantida sob agitação por 10 min, a 1000 rpm. Acrescentou-se a essa emulsão glutaraldeído, lentamente, mantendo-se a velocidade de agitação por mais 35 min. Verteu-se cuidadosamente a mistura no filtro Büchner, e cuidadosamente lavou-se as micropartículas com 300 mL de n-hexano, 300 mL de álcool etílico comercial e 200 mL de água deionizada, seqüencialmente. Com o auxílio de uma espátula, transferiram-se as partículas para tubos de Falcon e guardou-se em geladeira por 8 horas. Após, o material foi

transferido gelado para um frasco de liofilizador colocando-o no freezer por, no mínimo, 5 h. Liofilizou-se por no mínimo 2h30'. A Figura 11 apresenta um esquema ilustrativo do método para obtenção das micropartículas de Gel/CMC.

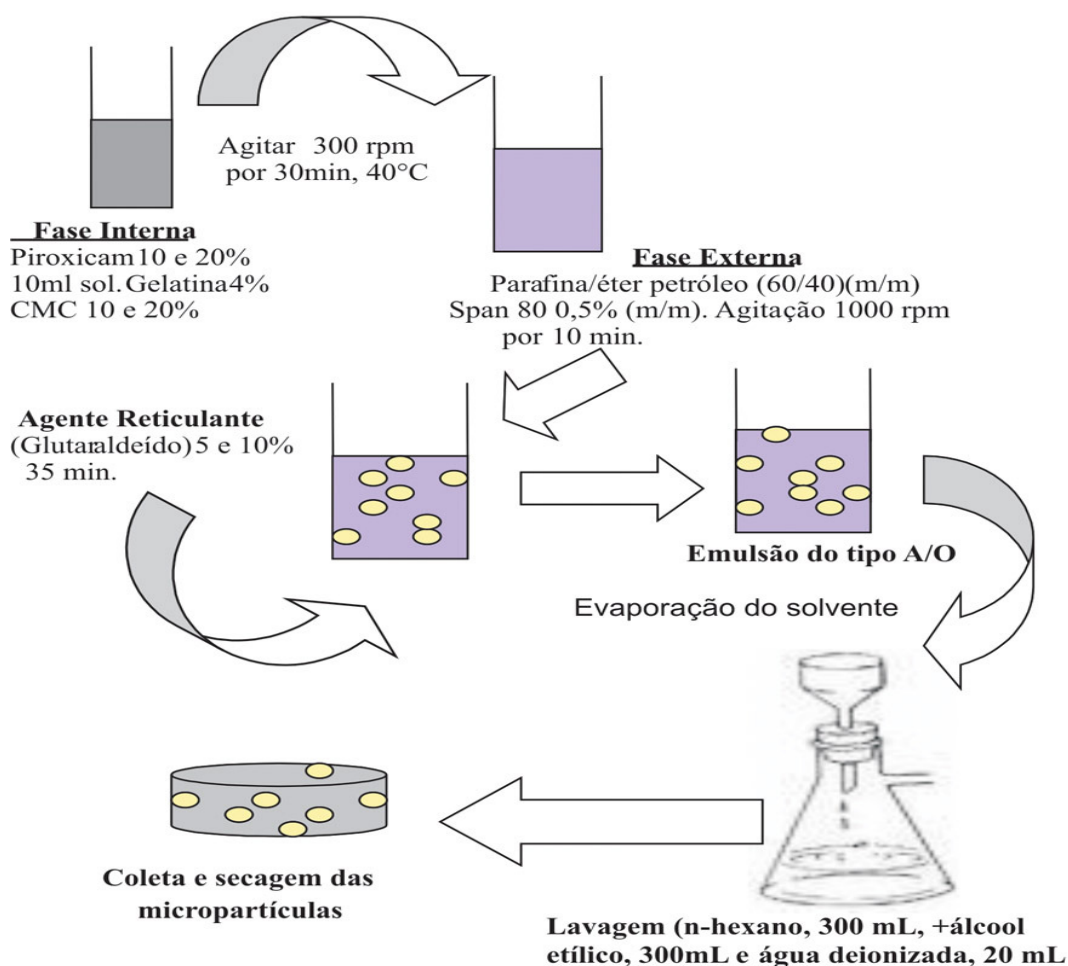


Figura 11 - Esquema de obtenção das micropartículas Gel/CMC pelo método de emulsão-reticulação.

3.3.4 Planejamento experimental para micropartículas de Gel/CMC

A Tabela 2 apresenta a variação dos teores de CMC, glutaraldeído (agente reticulante) e Piroxicam representando o plano fatorial 2^3 para as micropartículas de Gel/CMC.

Tabela 2: Planejamento fatorial 2^3 para a preparação das micropartículas em matriz de Gel/CMC. Os índices (-) e (+) indicam o nível de cada variável como inferior e superior, respectivamente.

<i>Gelatina /CMC</i>	<i>Percentual de CMC na matriz 10% e 20%</i>	<i>Percentual de Glutaraldeído 5% e 10%</i>	<i>Percentual de Piroxicam na emulsão 10% e 20%</i>
G1	-	-	-
G2	-	-	+
G3	-	+	-
G4	-	+	+
G5	+	-	-
G6	+	-	+
G7	+	+	-
G8	+	+	+

3.3.5. Análise de incorporação do fármaco nas matrizes

10 mg de micropartículas foram expostas a 3 mL de clorofórmio, agitadas e após decantação, colheu-se uma alíquota do sobrenadante que foi analisado em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrofotômetro de massa (CG/MS) da marca GC system Agilent 7890 A, coluna:HP5-MS, fluxo de hélio: 1mL/min. Procedeu-se a mesma análise para um padrão de Piroxicam.

3.4. Caracterização da morfologia e de superfície das micropartículas

A avaliação da morfologia e as características das superfícies das micropartículas foram realizadas num microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips XL30. Amostras de cada formulação foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro e observadas em microscópio eletrônico. O acompanhamento da formação e o efeito do processo de secagem das micropartículas foram realizados com o auxílio de um microscópio óptico LEICA DM 1000 com aparato para microfotografia LEICA EC3 utilizando resolução de 40X.

3.5 Interação matriz-fármaco e estado físico do agente ativo

A interação matriz-fármaco e estado físico do agente ativo foi verificada por análises de:

Calorimetria exploratória diferencial (DSC): as curvas foram obtidas a 10 °C/min num equipamento TA-Instrument DSC 2920 Modulated em atmosfera inerte de N₂, equipado com um sistema de resfriamento tipo LNCA (resfriamento com nitrogênio líquido) com amostras de 2 a 5 mg. Foi feito somente um aquecimento da temperatura ambiente até 250 °C, pois no segundo aquecimento as amostras apresentaram-se amorfas, ou seja, não apresentaram pico de fusão, em laboratório de estudos de materiais da França.

Difração de Raios-X (DR-X): o estado físico do Piroxicam nas micropartículas foi avaliado utilizando um difratômetro de raios-X Philips X'Pert , com radiação CuK α (λ = 1.54056 Å), na faixa de 5° a 50°, com passo de 0,05° e tempo de 1 s, no laboratório de estudos de materiais da UFSC-SC.

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR): as micropartículas de Alg/CMC e Gel/CMC na ausência e presença do agente ativo foram analisadas em equipamento Perkin-Elmer Spectrum One, no intervalo de 2000 a 700 cm⁻¹, pela técnica de reflectância difusa, em laboratório de caracterização de materiais do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina (CCT-UDESC).

3.6 Determinação da eficiência de encapsulação (EE%) do agente ativo nas matrizes propostas.

As amostras foram analisadas em HPLC, Merck Hitachi modelo: D-7000 IF, com coluna: Merck Lichrosfer RP-18. Foram pesados 100 mg das amostras e mantidas em acetona (P.A) por 24 horas. A seguir, coletou-se uma alíquota do sobrenadante que foi transferido para tubos do tipo eppendorf e congelados por

mais 24 horas, onde foi retirado 0,1ml dessa alíquota e acrescentado 0,9 mL de acetona P.A (diluição 1:10), após essas amostras foram submetidas à análise em HPLC onde foi determinada a EE%. A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada por meio da Equação 1:

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade de fármaco encapsulado}}{\text{Quantidade de fármaco proposto no fatorial}} \times 100$$

(1)

As análises foram realizadas em duplicata e considerou-se a média das concentrações obtidas.

3.7 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram analisados por teste estatístico para rejeição de valores desviantes (Teste Q de Dixon), sendo aceitos ou não, com um nível de confiança de 95% (RORABACHER, 1991).

Para o planejamento fatorial, foi utilizada a análise de Pareto (BARROS NETO *et al.*, 1996), que permite identificar e quantificar o efeito de cada um dos fatores (percentual de CMC, agente reticulante e Piroxicam) e de suas interações nos experimentos realizados, sendo avaliados como resposta o parâmetro de EE%.

3.8 Velocidade de intumescimento

Para avaliar a influência dos diferentes métodos de preparação na capacidade de absorver água, realizou esse ensaio conforme método descrito a seguir.

Iniciou-se retirando a tara de um cadinho do tipo Goosh (porosidade 2) devidamente seco em estufa a vácuo (40 °C/260 mmHg), marca Nova Ética, até obter massa constante. Logo após, este foi umedecido com 2 mL de água destilada, retirado o excesso e determinado seu peso novamente. Em seguida, acrescentou-se 0,10 g de micropartículas previamente secas até massa constante em estufa a vácuo (40 °C/260 mmHg) dentro do cadinho e posteriormente, com o auxílio de uma pipeta, as micropartículas foram intumescidas com 5 mL de água destilada de forma que todas ficassem submersas. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, retirou-se a água em excesso do cadinho com o auxílio de um papel absorvente e realizou-se a pesagem, caracterizando a massa úmida, (M_u) e, em seguida, acrescentou-se novamente 5 mL de água destilada. O percentual de hidratação (PH%) das amostras foi calculado a partir da equação 2 (PEREIRA, 1997^B).

$$PH\% = \frac{(M_u - M_s)}{M_s} \times 100 \quad (2)$$

3.9 Perfil de liberação do fármaco *in vitro*

Micropartículas contendo o equivalente a 15 mg de fármaco foram colocadas em frascos vedados, seguido da adição de 30 mL de tampão fosfato pH 7,4 (condição *sink*) e mantidas em banho-maria, da marca GFL, modelo D 3006, a 37 ± 2 °C. Em intervalos pré-determinados, foram retiradas alíquotas de 5 mL e após leitura, devolvidas ao meio quando possível. Para algumas amostras nova alíquota de solução tampão foi repostada ao meio, para manter o volume constante nos frascos de ensaio. A concentração de Piroxicam no meio foi determinada por espectrofotometria de absorção na região do UV em $\lambda_{\text{máx}} = 353$ nm, utilizando Espectrofotômetro da marca SHIMADZU, modelo 1601PC. A partir da curva de calibração (faixa de concentração de 1,0 a 20,0 mg/L de fármaco) encontrada no Apêndice 2, calculou-se a quantidade de Piroxicam liberada para o meio em função do tempo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a obtenção das micropartículas e antes de promover a aplicação do planejamento fatorial, considerou-se importante verificar se o fármaco manteve-se na estrutura das micropartículas. A Figura 1 que se encontra no Apêndice mostra os Espectrogramas das amostras submetidas ao CG/MS. O padrão de Piroxicam (azul) (PP) e o teor do fármaco em duas amostras de cada uma das matrizes indicam que houve o carregamento do fármaco.

4.1 Micropartículas de Alg/CMC

Confirmada a presença do fármaco nas matrizes, procedeu-se com a preparação das amostras, conforme previsto no planejamento fatorial.

A Tabela 3 apresenta a média e o desvio padrão (DP) da eficiência de encapsulação (EE%) do Piroxicam nas formulações de Alg/CMC.

Tabela 3: Eficiência de encapsulação (EE%) E desvio padrão para as formulações de Alg/CMC.

Amostra Fatorial	EE %	DP%	Composição da matriz		
			CMC	CaCl ₂	Piroxicam
A1	0,714	0,58	2%	3%	10%
A2	1,214	0,04	2%	3%	20%
A3	0,715	0,02	2%	5%	10%
A4	1,159	0,31	2%	5%	20%
A5	0,401	0,31	5%	3%	10%
A6	0,514	0,03	5%	3%	20%
A7	0,854	0,24	5%	5%	10%
A8	0,732	0,04	5%	5%	20%

Para analisar os efeitos das variáveis separadamente ou de suas interações sobre EE%, foi realizada a análise de variância (ANOVA), de modo a obter os efeitos significativos ($p < 0,05$). Com esse mesmo intuito, gerou-se o gráfico de pareto (Figura 12). Esse gráfico apresenta as três variáveis e as 4 interações dessas

variáveis. Observou-se, a partir dessas análises, que o percentual de CMC na matriz apresentou influência significativa sobre a EE% quando presente em menor percentual. Já os demais fatores e suas combinações apresentaram influência estatisticamente insignificante.

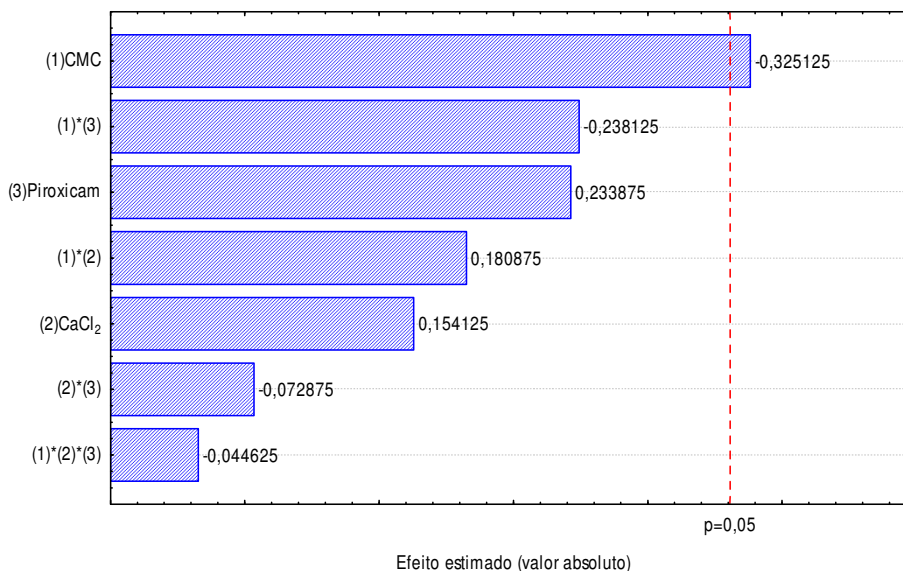


Figura 12 – Gráfico de pareto para as micropartículas de Alg/CMC.

Nessa matriz, a EE% não ultrapassou 1,5%, entretanto é possível observar que as amostras A2 e A4 apresentaram as maiores eficiências dentre os sistemas analisados, ou seja, sob o percentual mínimo de CMC. Sabe-se que a baixa eficiência de encapsulação depende das características físico-químicas do fármaco e dos polímeros na matriz, embora haja grupos funcionais semelhantes nas matrizes, aqui basicamente polissacarídeos, e no fármaco, esse último apresenta baixa solubilidade em água e elevada solubilidade em solventes como acetona e clorados, de forma geral (THE MERCK, 2001). Como em determinada etapa do processo, o sistema foi submetido a uma fase orgânica na presença de diclorometano, esse fato deve ter influenciado o baixo teor na encapsulação. Outro fator pode estar relacionado com as características do Piroxicam como a elevada densidade eletrônica em virtude dos anéis aromáticos em sua estrutura e a ionização da CMC em meio aquoso. Esse ânion pode ter contribuído para afastar

o Piroxicam durante o processo de encapsulação reduzindo o teor de fármaco nas micropartículas. De qualquer modo, procedeu-se a caracterização das micropartículas obtidas.

4.1.1 Caracterização das micropartículas de Alg/CMC

As micropartículas foram caracterizadas conforme as análises a seguir:

4.1.1.1 Caracterização Morfológica: microscopia óptica (M.O) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após o estudo da EE%, foi realizada a caracterização das micropartículas.

A Figura 13 permite analisar o efeito do processo de liofilização nas características das micropartículas de Alg/CMC. Após a filtração, as partículas apresentaram-se esféricas e depois de liofilizadas esse formato foi perdido.

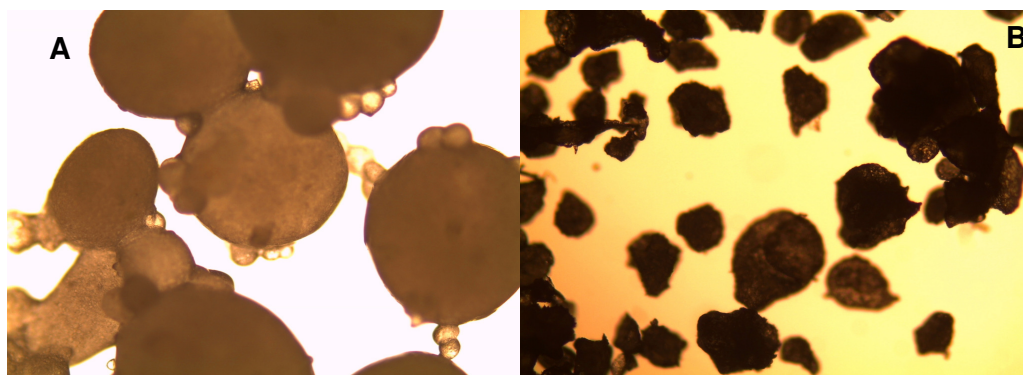


Figura 13 - Microscopia óptica das micropartículas de Alg/CMC com ampliação de 40X (A) e (B) A3 (2%CMC; 5% CaCl_2 ; 10% Piroxicam) após filtração e liofilização, respectivamente.

Na Figura 14, encontram-se as micrografias do Piroxicam (PP), das micropartículas obtidas como controle (AB) e para as formulações A1, A2, A3, A6, em Alg/CMC, respectivamente.

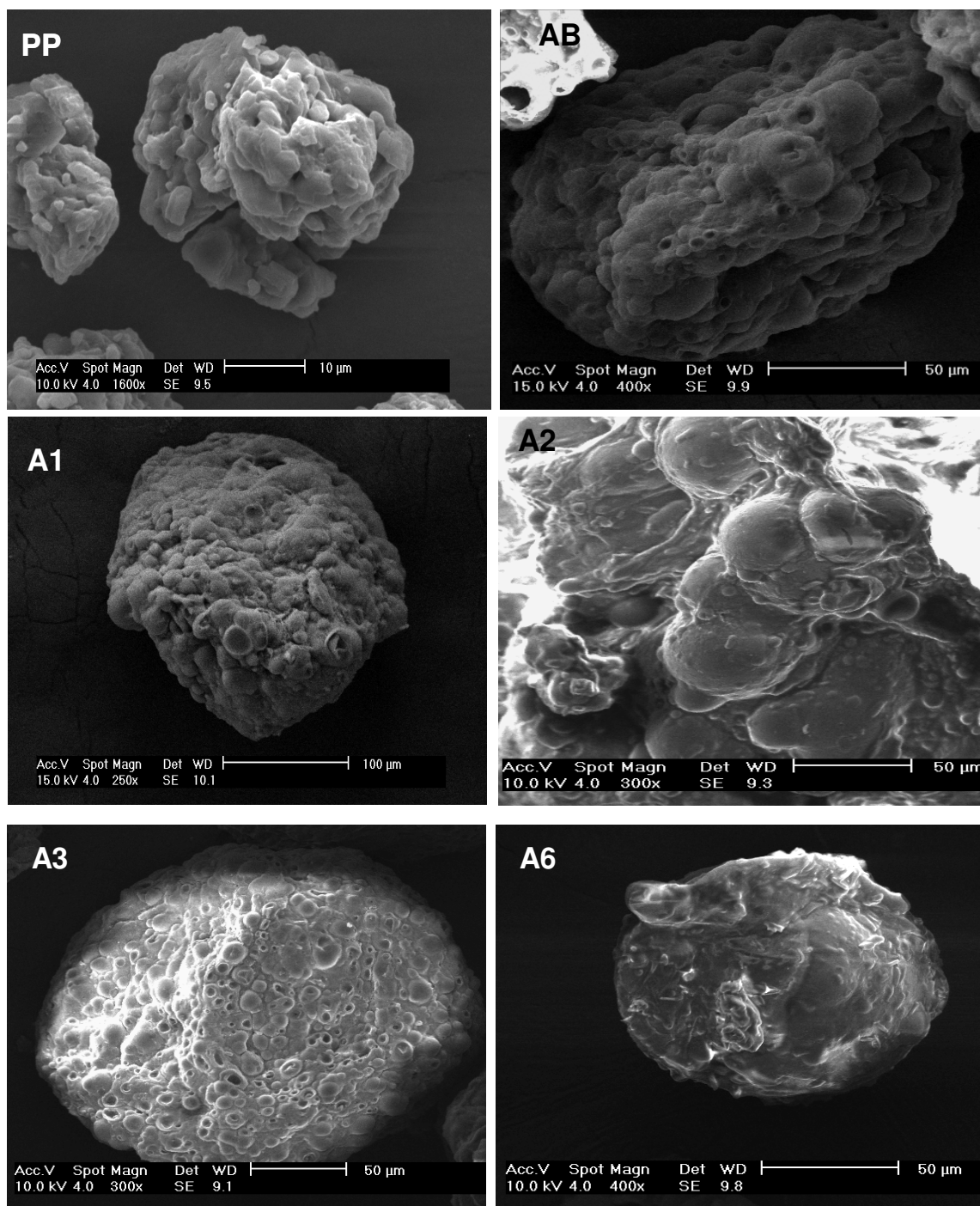


Figura 14 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de Alg /CMC para PP (padrão de Piroxicam), AB controle (sem fármaco), A1, A2, A3 e A6, respectivamente.

Confirma-se por meio das micrografias, o efeito do processo de secagem por liofilização, na morfologia das micropartículas. A rugosidade na superfície é observada para as amostras, AB, A1, A2 e A3. Essa característica também foi registrada por Tavakol *et al.* (2009) ao encapsularem sulfasalazina em matriz de

alginato e quitosana. Comparando as imagens das amostras AB (não carregada) e A1, verifica-se que a presença do Piroxicam não alterou a textura, a forma e o tamanho das partículas que ficou na ordem de 110 μm . Entretanto, duplicando-se a quantidade inicial de fármaco no meio, comparação entre as amostras A1 e A2, verifica-se uma alteração no tamanho e na rugosidade da superfície das amostras, sugerindo que a quantidade de Piroxicam adicionada inicialmente pode influenciar a morfologia das micropartículas geradas. É possível observar que a amostra A2 se mostrou mais eficaz para este sistema, o que condiz com o gráfico de pareto gerado, que apresentou uma melhor EE%, quando presente na matriz, CMC em seu nível inferior. Já a variação da concentração de reticulante, amostras A1 e A3 não mostraram efeito significativo sobre a morfologia das micropartículas em matriz de alginato, essa ausência de efeito também foi observada na EE%. Entretanto, a mudança percentual da CMC na composição da matriz mostrou alterações morfológicas: como aparente redução do tamanho e suavizando a superfície das micropartículas que pode ser observado nas amostras A1 e A6.

A forma irregular de micropartículas com Piroxicam também foi registrada por Rinaldi *et al.* (2009) para a matriz de acetobutirato de celulose e poli(3-hidroxibutirato).

4.1.1.2 Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raio-X (DR-X)

As análises de calorimetria exploratória diferencial e difração de raios-x foram realizadas com o objetivo de avaliar a ocorrência de alterações no grau de cristalinidade, bem como a presença ou não de mais de uma forma polimórfica do fármaco escolhido.

A técnica de DSC quantifica a perda ou ganho de calor resultante das mudanças físicas e químicas ocorridas na amostra em função da temperatura programada.

As curvas de DSC das micropartículas de Alg/CMC são mostradas na Figura 15, para as composições fatoriais escolhidas e para o controle (AB).

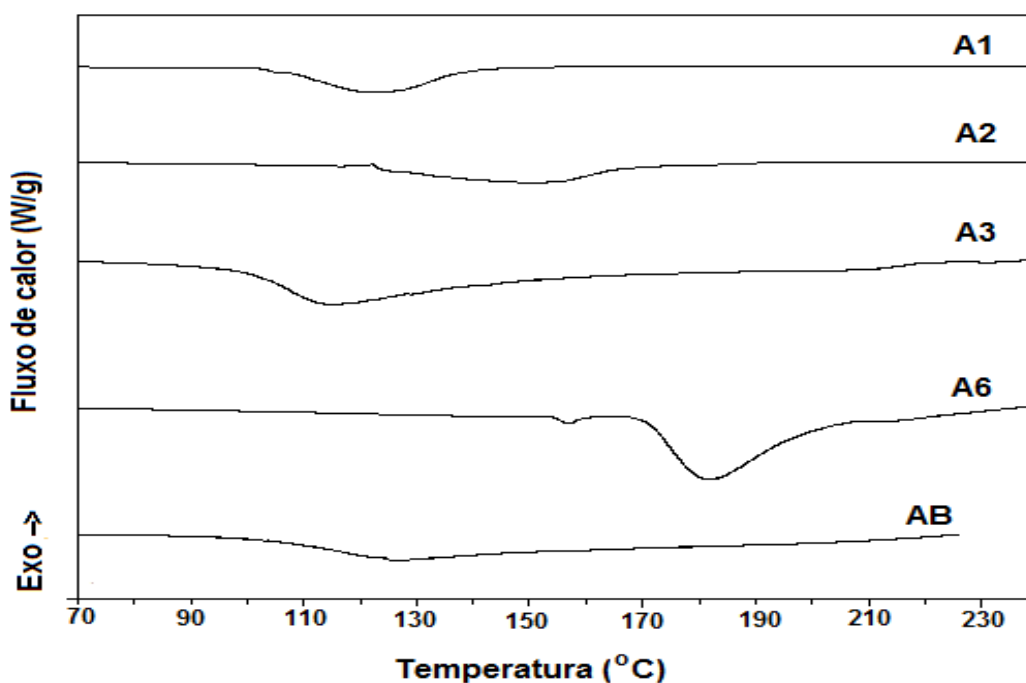


Figura 15 – Curvas de DSC para as micropartículas de Alg/CMC.

A tabela 4 mostra as temperaturas e as entalpias de transição para as micropartículas de Alg/CMC apresentadas na Figura 14.

Tabela 4: Temperaturas e entalpias de transição para as micropartículas de Alg/CMC

Amostra Fatorial	T_{T1} (°C)	ΔH_{T1} (J/g)	ΔH_{T2} (J/g)	T_{T2} (°C)
AB	126	247		
A1	123	63		
A2	150	78		
A3	115	278		
A6	157	3,5	182	125

Com o auxílio da Figura 15 e da Tabela 4, pode-se observar que o perfil das curvas do padrão da matriz (AB) e para as amostras A1, A2 e A3 apresentam-se semelhantes, sem picos de fusão evidentes o que sugere uma característica amorfa às composições que o fármaco apresenta-se molecularmente disperso na matriz, ou ainda que a quantidade de fármaco presente seja insuficiente para modificar

claramente o comportamento do material. Já a amostra A6 apresentou um pico em torno de 180 °C, que pode indicar a presença de substância cristalina. Inicialmente, descarta-se ao Piroxicam cristalino, pois a EE% nessa amostra, não é superior àquela registrada para a amostra A2 e o ponto de fusão do Piroxicam, descrito pela literatura, varia de 198-200 °C (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2003).

Micropartículas contendo Piroxicam em matriz de blendas de PHB e quitosana estudadas por Bazzo *et al.* (2009^b) e as curvas de DSC, neste caso, apresentaram somente um pico de fusão em 168 °C. Segundo os autores, isso sugere que PHB e Piroxicam estejam fundindo na mesma temperatura. Em estudo mais detalhado, Bazzo (2008^c) atribui a ausência do pico de fusão do fármaco na temperatura de 204 °C à presença do Piroxicam molecularmente disperso na matriz polimérica, na forma amorfa.

O perfil de difração de raios-X para as micropartículas de Alg/CMC é mostrado na Figura 16.

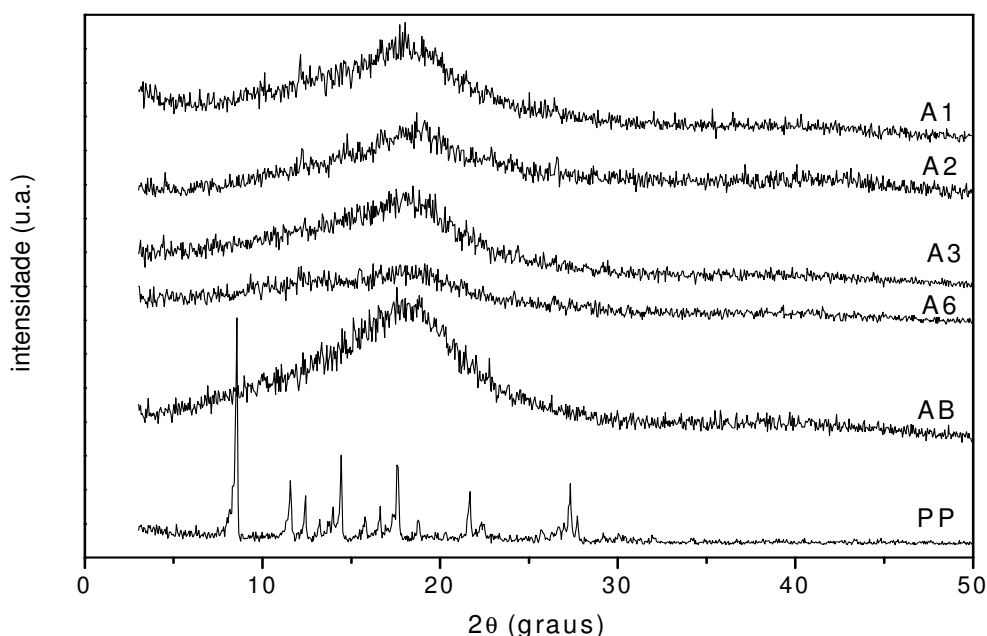


Figura 16 – Difrátogramas das micropartículas de Alg /CMC obtidas a partir da formulação A1, A2, A3, A6, AB controle (sem fármaco) e PP (padrão Piroxicam).

Como se pode observar, o Piroxicam padrão (PP) apresenta picos de difração em 2θ igual a 8° ; 14° ; $17,5^\circ$, sendo similar ao Piroxicam descrito por Vrečer *et al.* (2003). O polimorfismo do Piroxicam foi muito estudado nesses últimos anos, ele pode se apresentar segundo Vrečer *et al.* (2003) de formas distintas: a cúbica, a agulha e monohidratada, obtidas pela cristalização por solventes. A cinética de cristalização e a polaridade dos solventes utilizados determinam a cristalização do Piroxicam em cada uma destas formas (BAZZO *et al.* 2008^a).

A amostra controle (AB) apresenta um halo amorfo em 2θ igual a 18° . Já as amostras A1, A2, A3 e A6 são similares entre si, apresentando apenas o halo amorfo referente à matriz, sem registrar qualquer pico relativo ao fármaco cristalino, o que permite manter as hipóteses levantadas na discussão das curvas de DSC.

No que se refere à intensidade, as amostras A1, A2, A3 e A6 também se apresentam semelhantes, embora a amostra A6 seja mais discreta.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de EE% para as micropartículas de Alg/CMC, é possível confirmar pelas análises de DSC e DR-X o baixo rendimento de encapsulação nessa matriz.

Como parte do estudo, registrou-se os espectros no FTIR para as 4 amostras, confirmando que o fármaco não se apresentou na superfície das micropartículas.

A Tabela 5 apresenta as principais bandas observadas para o Piroxicam.

Tabela 5: Principais bandas de absorção no infravermelho (FTIR) observadas para o Piroxicam.

Número de onda (cm^{-1})	Característica
1734	Deformação axial C=O (carbonila)
1625	Deformação angular N-H (amida II)
1571 e 1525	Amida I (C=O), amida secundária
1434	Deformação axial C-N e C-C do anel
1351	Deformação axial assimétrica S(=O) ₂ e deformação angular C-H
1300 e 1215	Deformação angular C-H
1183	Deformação axial simétrica S(=O) ₂
1146 e 1118	Deformação axial assimétrica e simétrica de C-O, deformação axial de C-C e C-H
1035	Deformação angular de C-H do anel
942	Deformação angular de CH ₂ fora do plano
881 e 830	Deformação axial assimétrica fora do plano de N-H
767 e 733	Deformação axial C-H fora do plano do anel piridínico

A Tabela 6 apresenta as principais bandas no FTIR observadas para a matriz de Alg/CMC.

Tabela 6: Principais bandas de absorção no infravermelho observadas para a matriz alginato/CMC.

Número de onda (cm⁻¹)	Característica
1742	Deformação axial C=O
1600	Deformação axial assimétrica do ânion carboxilato
1424	Deformação axial de C-H
1361, 908 e 834	Deformação angular de C-H
1217	Deformação axial de C-H, C-O, C-C
1100	Deformação axial assimétrica C-O-C
1037	Deformação angular de C-H

Os espectros de FTIR mostrados na Figura 17 (região de 1800-700 cm⁻¹) para as amostras de Alg/CMC e para o Piroxicam padrão confirmam a similaridade das estruturas químicas dos dois polímeros.

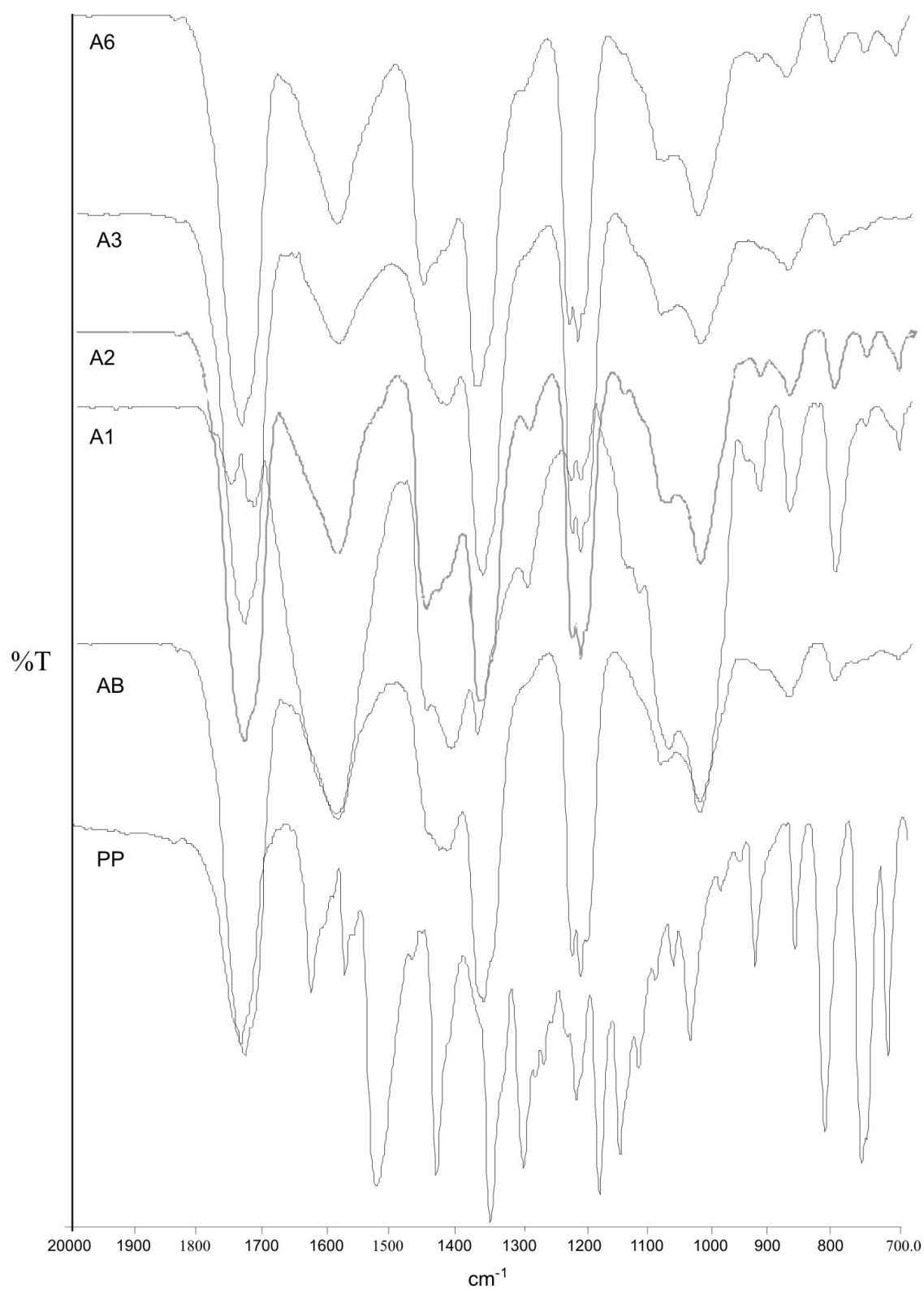


Figura 17 - Espectro no infravermelho com transformada de Fourier FTIR para as micropartículas, PP (padrão de Piroxicam), AB (controle), A1, A2, A3 e A6 respectivamente de Alg/CMC.

Devido à baixa EE% obtida para a matriz de alginato não se prosseguiu com as análises de velocidade de intumescimento e ensaio de liberação *in vitro*.

4.2 Micropartículas de Gel/CMC

A Tabela 7 mostra a EE% média e desvio padrão (DP%) para as formulações de Gel/CMC para as amostras considerando-se o planejamento fatorial.

Tabela 7: Eficiência de encapsulação (EE%) e desvio padrão para as formulações de Gel/CMC.

Amostra Fatorial	EE %	DP%	Composição da matriz		
			CMC	glutal	Piroxicam
G1	1,203	0,03	10%	5%	10%
G2	2,211	0,78	10%	5%	20%
G3	4,79	0,48	10%	10%	10%
G4	1,588	0,87	10%	10%	20%
G5	4,663	0,05	20%	5%	10%
G6	2,125	0,25	20%	5%	20%
G7	7,803	2,02	20%	10%	10%
G8	10,64	1,96	20%	10%	20%

Nas matrizes de Gel/CMC obteve-se uma EE% de aproximadamente 10,64% quando houve a aplicação dos percentuais mais elevados de CMC e de glutaraldeído, caso registrado para as amostras G7 e G8. Verifica-se que a EE% registrada para as amostras G1 a G6 variou entre 1,2% e 4,8%. Considerando-se os valores de EE% dos dois sistemas estudados (matriz base alginato e base gelatina), a segunda mostrou-se mais eficiente.

A Figura 18 mostra o cubo gerado a partir dos resultados obtidos pela ANOVA sendo possível observar que a CMC e o glutaraldeído, ambos no nível mais alto influenciaram na EE% ($p < 0,05$) e que essa é estatisticamente diferente das demais.

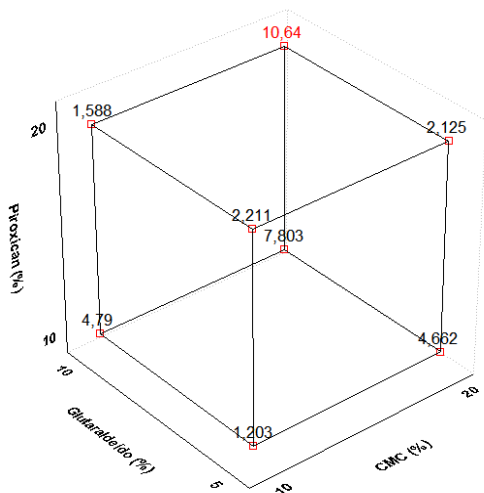


Figura 18 - Teste Q de Dixon aplicado para as micropartículas de Gel/CMC.

A Figura 19 ilustra o gráfico de pareto apresentando as 3 variáveis e as 4 interações. Observa-se que além dos efeitos de CMC e glutaraldeído, pode ser identificada a influência significativa para a combinação dos fatores CMC/glutaraldeído ((1)*(2)) e CMC/glutaraldeído/Piroxicam ((1)*(2)*(3)).

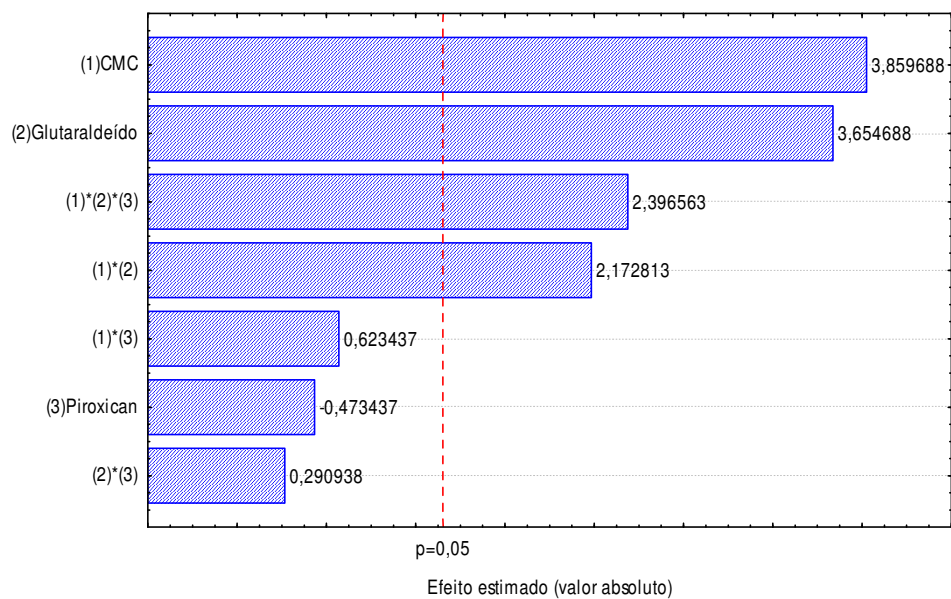


Figura 19 – Gráfico de pareto para as micropartículas de Gel/CMC.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 20) demonstra a influência do glutaraldeído e da CMC sobre a EE%. Observa-se que a EE% chega próximo a 10% quando os teores de CMC e de glutaraldeído passam do nível inferior (10 e 5%, respectivamente) para o nível superior (20 e 10% respectivamente), que correspondem às amostras G7 e G8.

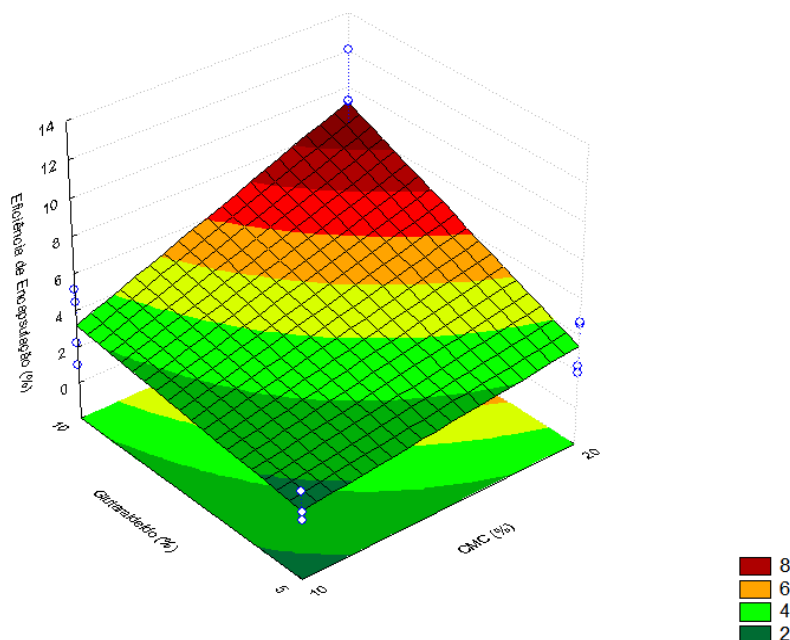


Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta para as micropartículas de Gel/CMC.

A dificuldade em encapsular esse fármaco já foi registrada por Rinaldi *et al.*, (2009), que utilizou acetobutirato de celulose e PHB, onde todas as formulações estudadas, em torno de 50% da quantidade total de fármaco adicionada não foram encapsuladas e o teor de fármaco nas micropartículas foi praticamente o mesmo em torno de 15 mg.

Analisando os resultados obtidos para as matrizes Alg/CMC e Gel/CMC propostas neste estudo, a que melhor apresentou uma EE% foi à matriz G8. Sugerem-se como alternativas, na busca de aumentar a EE% no sistema Gel/CMC, usar acetona como co-solvente para o Piroxicam, na fase inicial do processo de microencapsulação e avaliar o efeito da redução da quantidade de éter de petróleo da fase orgânica.

Como forma de avaliar a composição das matrizes propostas para gelatina em seu percentual de CMC, glutaraldeído e Piroxicam, selecionou-se 4 dos fatoriais, que foram: G4, G5, G7 e G8 e procedeu-se a caracterização.

4.2.1 Caracterização das micropartículas de Gel/CMC

As micropartículas de Gel/CMC foram caracterizadas conforme as análises a seguir:

4.2.1.1 Caracterização Morfológica: microscopia óptica (M.O) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A Figura 21 mostra as imagens obtidas para as micropartículas de Gel/CMC após filtração, onde se observa a forma esférica.



Figura 21 - Microscopia óptica das microesferas de Gel/CMC com ampliação de 40 x após filtração G5 (20%CMC; 5% glutaraldeído; 10% Piroxicam).

Ao contrário do que ocorreu com as micropartículas Alg/CMC, na Figura 20 pode-se observar que as micropartículas de Gel/CMC apresentaram forma esférica antes filtração (Figura 21) e após liofilização (Figura 22).

Na Figura 22, encontram-se as micrografias do Piroxicam (PP), das micropartículas obtidas para o controle (GB) e para as formulações G4, G5, G7, G8, em Gel/CMC, respectivamente.

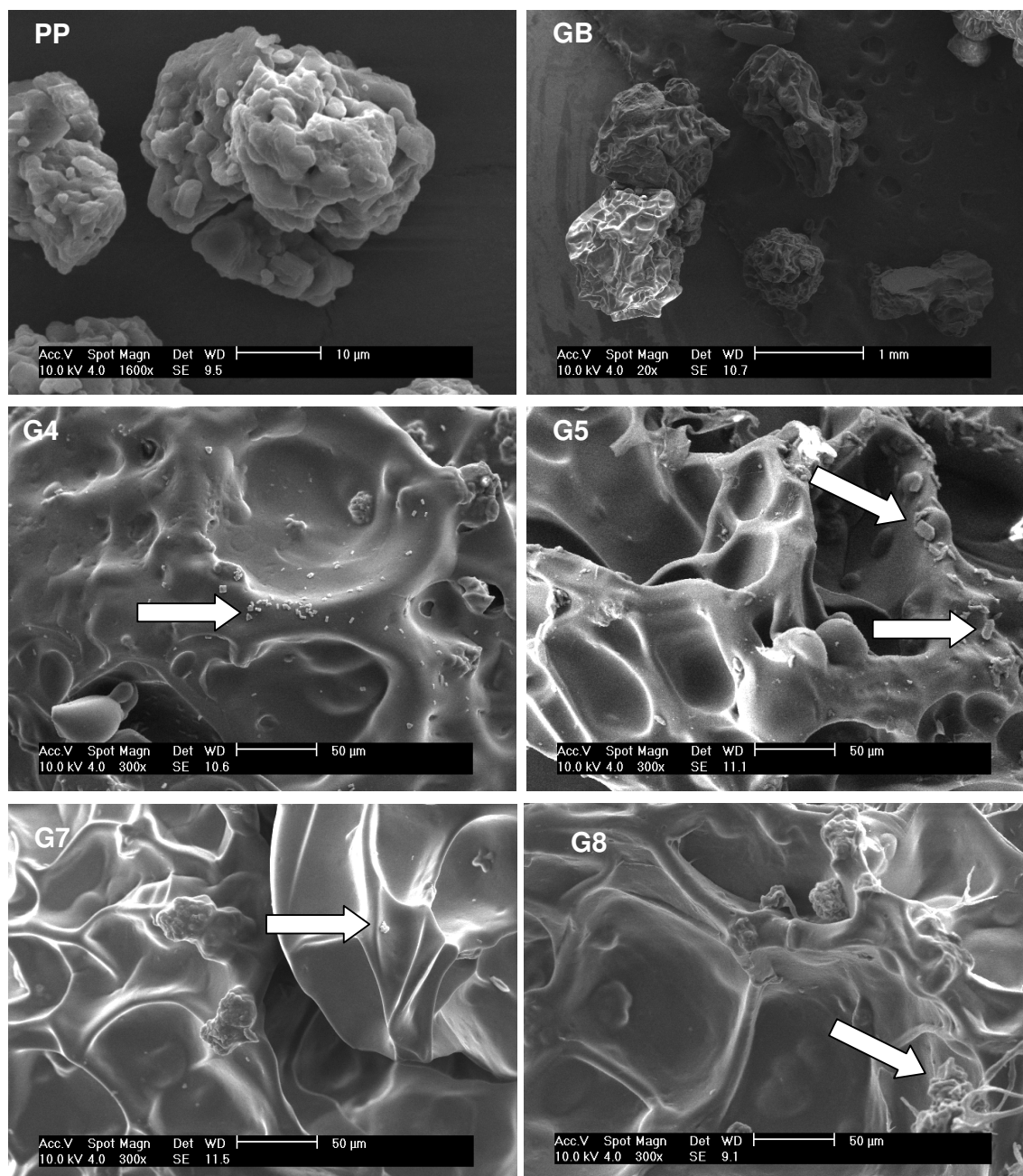


Figura 22 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de Gel /CMC obtidas a partir da formulação P (Piroxicam), GB (controle), G4, G5, G7e G8.

As micropartículas provenientes das formulações a base de gelatina apresentaram formas regulares, esféricas e superfície rugosa, porém menos porosas do que as formulações obtidas para a matriz de Alg/CMC, conforme mostra a Figura 22. Rokhade *et al.* (2006) ao encapsular Ceterolaco de Trometamina em matriz de Gel/CMC, observaram que as partículas apresentaram superfície ligeiramente

áspera e o tamanho médio das partículas foi de 247 a 535 μm . Confirma-se por meio das micrografias, o efeito do processo de secagem por liofilização, na superfície das micropartículas, pois apresenta rugosidade, e essa característica é observada para todas as amostras. Embora a EE% das amostras de Gel/CMC tenham-se mostrado superiores às aquelas obtidas em Alg/CMC, observou-se a presença de cristais de Piroxicam na superfície das micropartículas que está sendo indicada pelas setas na Figura 22, principalmente das amostras G4 e G5 indicando que o fármaco está parcialmente adsorvido e não encapsulado. A amostra G8 apresentou menor quantidade de cristais na superfície e para amostra G7 essa característica é menos evidente, sugerindo uma melhor encapsulação nessas duas últimas composições.

A presença de Piroxicam não-encapsulado próximo à superfície também foi registrada por Rinaldi *et al.* (2009).

4.2.1.2 Análises de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Difração de raio -X (DR-X)

A Figura 23 mostra as curvas de DSC para o controle (GB) e as micropartículas de Gel/CMC obtidas.

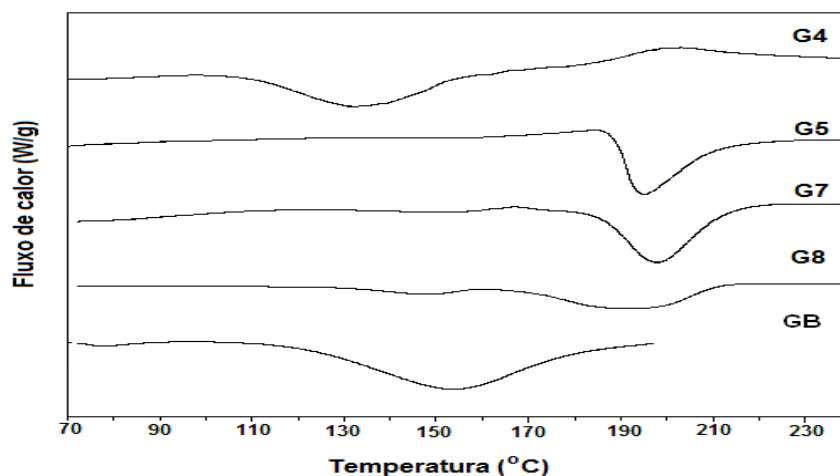


Figura 23 – Curvas de DSC para as micropartículas de Gel/CMC.

A Tabela 8 mostra as temperaturas e as entalpias de transição para as micropartículas de Gel/CMC.

Tabela 8: Temperaturas e entalpias de transição para as micropartículas de Alg/CMC

Amostra Fatorial	T_{T1} (°C)	ΔH_{T1} (J/g)	T_{T2} (°C)	ΔH_{T2} (J/g)	T_{T3} (°C)	ΔH_{T3} (J/g)
GB	77	20	153	218		
G4	119	182	135	120		
G5	-	-	-	-	195	118
G7	-	-	-	-	198	121
G8	148	12	194	79		

As análises das curvas de DSC juntamente com os dados da Tabela 8, sugerem que o fármaco foi encapsulado. As amostras G5 e G7 apresentam um pico endotérmico em torno de 198 °C, característico do processo de fusão do Piroxicam, que de acordo com a literatura varia de 198 a 200 °C (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2003). Amostra G8 apresentou uma temperatura de fusão em 194 °C que está sendo atribuído à presença de Piroxicam na matriz.

Bazzo (2008^c) ao encapsular o Piroxicam em matriz de PHB/quitosana, observou apenas um evento endotérmico correspondente ao processo de fusão, deslocado para uma temperatura mais baixa em relação à temperatura de fusão dos componentes puros. A ausência do pico de fusão do fármaco na temperatura de 204 °C poderia ser um indicativo de que o Piroxicam estaria molecularmente disperso na matriz polimérica, na forma amorfa.

A Figura 24 mostra os difratogramas para as micropartículas de Gel/CMC.

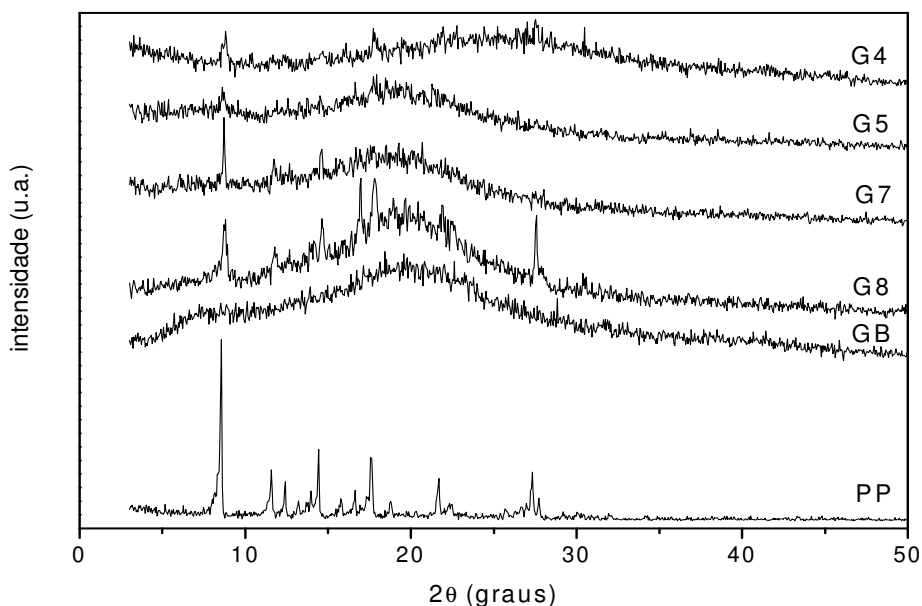


Figura 24 - Difratogramas das micropartículas de Gel /CMC obtidas a partir da formulação G4, G5, G7, G8, GB controle (sem fármaco) e PP (padrão Piroxicam).

A amostra controle (GB) mostrou um halo amorfo em 2θ igual a 21° . Observou-se que as amostras G5, G7 e G8 são similares e apresentam o mesmo halo amorfo em 21° , bem como o pico de difração em 8° , referente ao Piroxicam. Já a amostra G4 apresentou somente o pico 2θ igual a 8° . A intensidade deste pico se mostrou inferior para as amostras G4 e G5, o que indica que houve encapsulamento de menor quantidade de Piroxicam quando comparado às amostras G7 e G8.

Pela maior intensidade dos picos em 8° e 14° , a amostra G7 parece ter encapsulado maior quantidade de Piroxicam que a G5.

Já a amostra G8 apresenta tanto halo em 21° quanto os picos em 2θ igual a 8; 12; 14; 17,5 e $27,5^\circ$; mostrando que esta amostra possui o maior teor de Piroxicam em relação às demais amostras.

A presença do fármaco nas matrizes, mantendo a mesma forma cristalina pode ser justificada considerando o método de obtenção das micropartículas de Gel/CMC, pois neste caso o Piroxicam é adicionado na forma sólida junto à solução polimérica, na primeira fase do processo.

4.2.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 25 mostra os espectros de FTIR para as micropartículas de Gel/CMC.

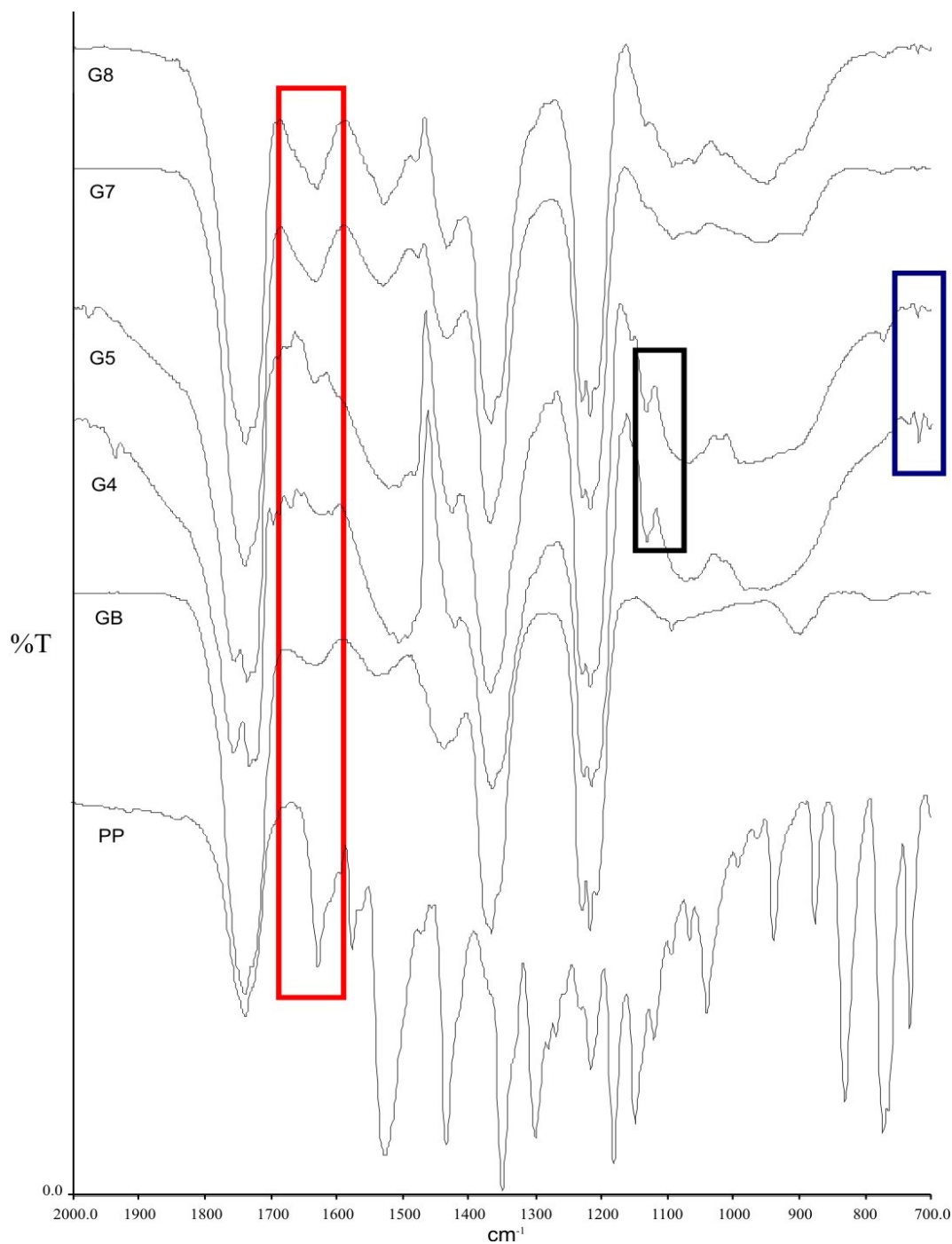


Figura 25 - Espectro no infravermelho com transformada de Fourier FTIR para as micropartículas, PP (padrão de Piroxicam), GB (sem fármaco), G4, G5, G7 e G8 respectivamente de Gel/CMC.

Do espectro do fármaco, destaca-se as bandas de deformação axial simétrica de S (=O)₂ em 1179 cm⁻¹ e assimétrica em 1349 cm⁻¹ e a deformação axial do C-C do anel entre 1600 e 1400 cm⁻¹. Como previsto para compostos com anéis aromáticos, há bandas fortes na região de 900 – 700 cm⁻¹ relativo às deformações C - H fora do plano do anel, especificamente entre 648 e 703 cm⁻¹ há a presença de banda dessa deformação axial em virtude do anel piridínico, que pode ser observado na Tabela 6 (anteriormente apresentada).

A presença do Piroxicam na superfície da matriz pode ser confirmada pela presença das bandas em torno de 1130 e 720 cm⁻¹ principalmente para G4 e G5. A banda com deformação axial de C-H em 1430 cm⁻¹ é observada para a matriz (GB), que é deslocada para 1425 cm⁻¹ nessas duas amostras. A banda em torno de 1628 cm⁻¹ refere-se ao grupo N-H, que pode ser observado no espectro de FTIR (Figura 25) para as amostras de gelatina e no Piroxicam padrão. A Tabela 9 apresenta as principais bandas encontradas na matriz de Gel/CMC.

Tabela 9: Principais bandas de absorção no infravermelho (FTIR) observadas para a matriz Gel/CMC.

Número de onda (cm ⁻¹)	Característica
1739 - 1735	Deformação axial C=O (carbonila)
1638 - 1625	Deformação angular N-H (amida II)
1571 e 1525	Amida I (C=O), amida secundária
1436 e 1434	Deformação axial C-N e C-C do anel
1350	Deformação axial assimétrica S(=O) ₂ e deformação angular C-H
1300 e 1215	Deformação angular C-H
1180	Deformação axial simétrica S(=O) ₂
1146 e 1131	Deformação axial assimétrica e simétrica de C-O, deformação axial de C-C e C-H
1035	Deformação angular de C-H do anel (esta é de piroxicam somente)
980	Deformação angular de CH ₂ fora do plano (esta é de piroxicam somente)
897- 830	Deformação axial assimétrica fora do plano de N-H
770 e 721	Deformação axial C-H fora do plano do anel piridínico (esta é de piroxicam somente)

4.2.2 Ensaio de intumescimento

O resultado encontrado para o percentual de hidratação (PH%) das amostras de Gel/CMC está apresentado na Tabela 10. O ensaio de intumescimento indicou que o aumento da quantidade de glutaraldeído reduziu a absorção de água, de 374,7% para 284,2%, pois quanto mais reticulado estiver o material menos água irá absorver. A presença de CMC não influenciou significativamente essa propriedade.

Segundo Rokhade *et al.* (2006), ao usar a mesma matriz para encapsular o fármaco ceterolaco de trometamina o percentual de hidratação reduziu de 459% para 176%, fato este, atribuído ao aumento na quantidade de agente reticulante.

Tabela 10: Valores obtidos para o percentual de hidratação e desvio padrão das amostras de Gel/CMC.

Amostra Fatorial	PH%	DP%
G4	319,7	192,8
G5	374,7	36,7
G7	284,2	34,8
G8	290,4	22,9

4.2.3 Perfil de liberação do fármaco *in vitro*

A Figura 26 mostra os resultados obtidos para o ensaio de perfil de liberação para as micropartículas de Gel/CMC.

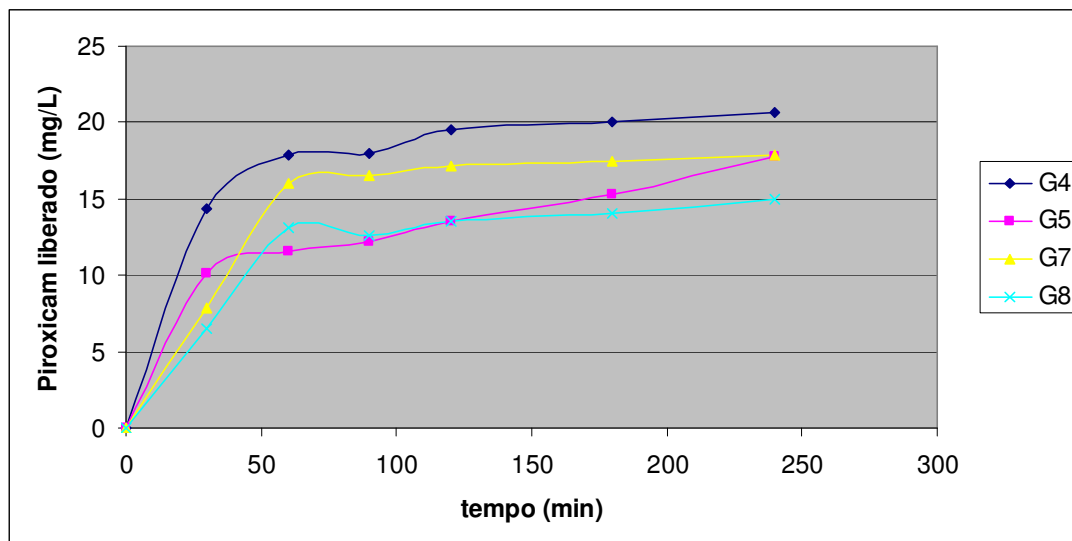


Figura 26 - Perfil de liberação para as micropartículas de Gel/CMC.

O número limitado de registros para os primeiros 60 minutos de ensaio não permitiu avaliar se o comportamento desse sistema pode ser descrito por algum modelo matemático como o proposto por Reis *et al.* (2007^A). Entretanto, foi possível verificar que as amostras G4 e G5 apresentaram velocidades de liberação superiores (0,48 mg/Lmin e 0,34 mg/Lmin) às registradas para G7 e G8 (0,27 mg/Lmin e 0,22 mg/Lmin), o que se mostra coerente com as observações sob MEV, ou seja, que o fármaco está na superfície das amostras. Além disso, observa-se também que após 120 min, 98 % do fármaco foi liberado pela amostra G4. Os sistemas G5 e G7 liberaram aproximadamente 85% e a amostra G8 liberou um máximo de 71%. Cabe destacar que após 4 h, o perfil da curva da mostra G5 indica que esse percentual deve evoluir a valores semelhantes ao registrado por G4.

Uma relação entre os ensaios de velocidade de liberação, EE% e PH% podem ser relacionados a partir dos dados da Tabela 8. As amostras G4 e G5 foram as que apresentaram as maiores velocidade de liberação, maior PH% o que favorece a difusão do solvente e conforme observado no MEV a presença de cristais de Piroxicam na superfície podem ter contribuído para uma rápida liberação. A amostra G7 possuía um percentual de glutaraldeído de 10% e apresentou um PH% de 284,2%, conclui-se que um aumento na quantidade de glutaraldeído influenciou na redução da absorção de água, pois quanto mais reticulado estiver o material

menos água absorverá através da micropartícula influenciando o tempo de liberação.

Tabela 11: Correlação dos valores referente aos ensaios de velocidade de liberação, EE% e PH%.

Amostra Fatorial	PH%	EE%	Velocidade liberação mg/Lmin
G4	319,7	1,588	0,48
G5	374,7	4,663	0,34
G7	284,2	7,803	0,27
G8	290,4	10,64	0,22

Segundo estudo realizado por Rinaldi *et al.* (2009), todas as formulações foram capazes de prolongar ligeiramente a liberação do Piroxicam comparadas ao fármaco não-encapsulado. No entanto, após 2:30 h, todas as formulações já haviam liberado cerca de 70-80% do fármaco.

Joseph, Lakshmi e Jayakrishnan, em 2002, realizaram um estudo, no qual a liberação *in vitro* de Piroxicam num fluido gástrico artificial a 37 °C mostrou um efeito de liberação rápida não significativa e que a quantidade de fármaco liberada com o tempo aumentou até as primeiras 8 horas, tempo a partir do qual não se liberaram quantidades significativas de fármaco. No fluido intestinal, a liberação foi mais rápida e contínua e, para maiores cargas de fármaco, liberação acumulativa, alcançou 90% em 8 horas. O estudo demonstrou que as microesferas de Piroxicam permitem liberação sustentada por período de tempo mais longo e um aumento da sua biodisponibilidade.

A liberação do fármaco a partir de microesferas pode ser afetada por diversos fatores, tais como: tamanho e porosidade das partículas, distribuição do fármaco, massa molar do polímero, proporção do polímero presente na formulação, entre outros (FREIBERG e ZHU, 2004). Neste caso, a rápida liberação do Piroxicam a partir das micropartículas está relacionada principalmente à presença do fármaco não-encapsulado aderido à superfície externa e, provavelmente, à distribuição do fármaco preferencialmente na superfície e não no interior das partículas, facilitando a liberação do Piroxicam.

CONCLUSÕES

A análise do planejamento fatorial indicou que o sistema mais eficiente para encapsular o Piroxicam foi o de micropartículas de Gel/CMC com níveis de CMC e glutaraldeído mais elevados.

A caracterização do sistema Alg/CMC mostrou que o processo de liofilização modificou a forma das micropartículas, que passaram de esféricas para disformes e que a presença do Piroxicam não alterou a textura, a forma e o tamanho das partículas. As análises de DSC e DR-X não detectaram Piroxicam cristalino nas matrizes, justificado pela baixa eficiência de encapsulação, inferior a 2%. A análise do planejamento fatorial mostrou que o percentual de CMC na matriz apresentou influência significativa sobre a EE% quando presente em menor percentual. Já os demais fatores e suas combinações apresentaram influência estatisticamente insignificante.

Em contrapartida, o sistema Gel/CMC mostrou-se mais eficiente, sendo possível obter uma EE% máxima de 10,64% na presença dos percentuais mais elevados de CMC e de glutaraldeído. Entretanto, as micrografias de algumas composições revelaram parte do fármaco adsorvido, confirmado por infravermelho. As análises de DSC e DR-X indicaram que o Piroxicam permaneceu nas matrizes, mantendo a mesma forma cristalina. O percentual de hidratação (PH%) das amostras indicou que o aumento da quantidade de glutaraldeído reduziu a absorção de água no sistema.

O estudo do perfil de liberação indicou que as amostras liberaram entre 71 e 98% do fármaco presente nas amostras. As velocidades de liberação permaneceram entre 0,22 mg/L.min e 0,48 mg/L.min.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURTO, L.D. Microencapsulação de óleo essencial de laranja por atomização. Campinas, SP. 1998. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/DEA) UNICAMP], pp.80.

AMICI, E.; TETRADIS-MERIS, G.; PULIDO DE TORRES, C.; JOUSSE, F. Alginate gelation in microfluidic channels. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 97-104, 2007.

ANDREANI, L. Desenvolvimento e Caracterização de microesferas de glúten de trigo para utilização em sistemas de liberação controlada. Florianópolis, SC, 2008 (Dissertação Mestrado - Pós-Graduação em Química) UFSC, 2008.

AOUADA, F.A. Síntese e caracterização óptica, morfológica e mecânica de hidrogéis de poliacrilamida com material eletro-óptico confinado: polímero condutor e cristais líquidos. Dissertação de mestrado Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá. 2005.

BAJPAI, A. K.; GIRI, A. Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals. *Reactive & Functional Polymers*, v.53, p.125-141, 2002.

BARROS, R.A.F.; STRINGUETHA, C, P. Microencapsulamento de antocianinas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Ano IX – 36 – jan./Jun. 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. Planejamento e otimização de experimentos. UNICAMP, Campinas, p.66, 1996.

BAZZO, G. C.; LEMOS-SENNA, E.; GONCALVES, M. C.; PIRES, A. T. N. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly(hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. *J. Braz. Chem. Soc.* [online], vol.19, n.5, p. 914-921, 2008. ^a

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

BAZZO, C.G. Piroxicam e cetoprofeno utilizados como fármacos modelo em micropartículas de PHB e PHB/quitosana: preparação, caracterização e avaliação do perfil de liberação. Florianópolis, 2008. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. ^c

BERCHANE, N.S.; CARSON, K.H.; RICE-FICHT, A.C; ANDREWS, M.J. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: experiment and theory. *International Journal of Pharmaceutics* v. 337, p. 118–126, 2007.

BERKLAND, C.; KIPPER, M. J.; NARASIMHAN B.; KYEKYOON K.K.; PACK, D. W. Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. *Journal of Controlled Release* v. 94, n.1, p.129– 141, 2004.

CELLESI, F.; TIRELLI, N.; HUBBELL, J.A. *Biomaterials*, v. 25, p.5115, 2004.

CHANGEZ, M.; KOUL, V.; DINDA, A. K. Efficacy of antibioticsloaded interpenetrating network (IPNs) hydrogel based on poly(acrylic acid) and gelatin for treatment of experimental osteomyelitis: In vivo study. *Biomaterials*, v.26, p. 2095 -2104, 2005.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, v. 27, p. 4646-4654, 2006.

COUVREUR, P.; BLANCO-PIETRO, M.J.; PUISIEUX, F.; ROQUES, B.; FATAL, E. Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. *Adv. Drug Delivery Rev.*, n. 28, p. 85-96, 1997.

CUI, F.; SHI, K.; ZHANG, L.; TAO, A.; KAWASHIMA, Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery : preparation, invitro characterization and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, v.114, p. 242-250, 2006.

DARVARI, R.; HASIRCI V. Pesticide and model drug release from carboxymethylcellulose microspheres. *J. Microencapsulation*, v.13, p.9-24, 1996.

DECKWER,D.W.; SABRA,W. Alginate- A polysaccharide of industrial interest and diverse biological functions. *In:DEKKER, M. Polysaccharides: Structural diversity and functional versatilly*. 1 ed. New York: Severian Dumitriu, 1998. p. 515-533.

DINARVAND, R.; MIRFATTAH, S.; ATYABI, F. Preparation, characterization and in vitro drug release of isosorbide dinitrate microspheres. *J. Microencapsulation*, v. 19, n. 1, p. 73-81, 2002.

DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginates from algae. In S. De Baets, S. Vandamme, & A. Steinbüchel, *Biopolymers. Polysaccharides II: polysaccharides from eucaryotes*, p. 215–244, 2002. ^A

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.;STOKKE, B. T. Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. *Food Hydrocolloids*, v. 20, p. 170–175, 2006. ^B

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4 Ed. Strasbourg: Council of Europe, p. 1771. 2001.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 7 ed. Infarmed,Lisboa, 2003.

FENNEMA, O. R. Química de los alimentos. 2.ed, Zaragoza, ESP: ACRIBIA, p.1258 , 2000.

FIGUERAS, A.; CAPELLA, D.; CASTELL, J.M.; LAORTE, J.R. Spontaneous reporting of adverse drug reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs. A report from the Spanish system of pharmacovigilance, including an early analysis of topical and enteric-coated formulations. *Eur J Clin Pharmacol*, v.47, p. 297-303, 1994.

FLORENCE,A.T.; ATTWOOD, D. *Princípios Físico-químicos em farmácia*. São Paulo, Universidade de São Paulo: 2003.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, n. 1-2, p. 1-18, 2004.

GIBAUD, S.; BONNEVILLE, A.; ASTIER, A. Preparation of 3,4-diaminopyridine microparticles by solvent-evaporation methods. *Int. J. Pharm.*, v. 242, p. 197-201, 2002.

GOMES, A.A.D.; NÓBREGA, S.A.G.; PEGADO, M.R.; BARROS NETO, E.L.; DANTAS NETO, A.A.; CASTRO DANTAS, L.T. Formulação de gel de fraturamento utilizando tensoativos não-iônicos. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (VI COBEQ). Natal, RN - Brasil. 2005.

GUILHERME, M.R.; DE MOURA, M.R.; RADOVANOVIC, E.; GEUSKENS, G.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C. *Polymer*, 2005.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. *Drug Discov. Today*, v.7, p. 569, 2002.

HENDRICK, V.; MUNIZ, E.C.; GEUSKENS, G.; WÉRENNE, J. *Cytotechnology*, v. 36, p. 49, 2001.

HOFFMAN, A.S. *Adv. Drug. Deliv. Rev*, v. 43, p. 3, 2002.

IANNUCCELLI, V.; FORNI, F.; VANDELLI, M.A.; BERNABEI, T. Effect of the loading method on the drug release from corss-linked carboxymethylcellulose beads. *J. Controlled Release*,v. 23, p.13-20, 1993.

JOSEPH, N.J.; LAKSHMI, S.; JAYAKRISSHNAN, A. A floating-type oral dosage form for Piroxicam based on hollow polycarbonate microspheres: in vitro and in vivo evaluation in rabbits. *J. Controlled Release*, v. 79, p. 71-79, 2002.

KALLINTERI, P.; ANTIMISIARIS, S.G. Solubility of drugs in the presence of gelatin: effect of drug lipophylicity and degree of ionization. *Int. J. of Pharm.*, v. 221, p. 219-226, 2001.

KOBAYASHI, M.; CHANG, Y.S.; OKA, M. *Biomaterials*, v. 26, p. 3243, 2005.

KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara 2002/2003*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

KÖK, F. N.; ARICA, M. Y.; GENCER, O.; ABAK, K.; HASIRCI, V. Controlled release of aldicarb from carboxymethyl cellulose microspheres: in vitro and field applications. *Pesticide Science*, v.55, p.1194-1202, 1999.

KOSMALA, J. D.; HENTHORN, D. B.; & PEPPAS, L. B. Preparation of interpenetrating networks of gelatin and dextran as degradable biomaterials. *Biomaterials*, v.21, p.2019–2023. 2000.

KUMAR, M. N. V. R. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), p.234-258, 2000.

LIANG, H. C.; CHANG, W. H.; LIANG, H. F.; LEE, M. H.; & SUNG, H. W. Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide. *Journal of Applied Polymer Science*, v.91, p.4017–4026, 2004.

LU, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; ZHOU, Y. *Polymer*, v.44, p.6689, 2003. ^A

LU, Y., ZHANG, L.; XIAO, P. *Polym. Degrad. Stab.*, v. 86, p.51, 2004. ^B

MAGALHÃES, J. *Cosmetologia*. Rubio: Rio de Janeiro, 2000.

MAPRIC. Distribuidora de matérias-primas. Disponível em: http://www.mapric.com.br/anexos/boletim544_21052008_113145.pdf. Acesso em: 5 ago. 2009.

MARTIN, A. *Physical Pharmacy*. 4.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1993.

MICHAILOVA, V.; TITEVA, S.T.; KOTSILKOVA, R.; KRUSTEVA, E.; MINKOV, E. Influence of aqueous medium on viscoelastic properties of carboxymethylcellulose sodium, hydroxypropylmethyl cellulose and thermally pre-gelatinized starch gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.149, p.515-520, 1999.

MOFIDI, N.; MOGHADAMA, A.,N.; SARBOLOUKI, M. N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*. v.35, n.9, p. 885-888, 2000.

MUNIZ, E.C.; GEUSKENS, G. J. *Memb. Sci.*, v.172, p.287, 2000.

MUTA, H.; MIWA, M.; SATOH, M. *Polymer*, v. 42, p. 6313, 2001.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Caracterização de microcapsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2005.

O'DONNELL, P.B.; MCGINITY, J.W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug Delivery Rev.*, n. 28, p. 25-42, 1997.

OKIEIMEN, F.E.; OGBEIFUN, D.E. Graft copolymerizations of modified cellulose, crafting of acrylonitrile, and methyl methacrylate on carboxy methyl cellulose, *J. Applied Polymer Science*, v.59, p.981-986, 1996.

OLIVEIRA, C.P.A. Produção e caracterização de partículas de hidrogéis para aplicações em cosméticos. Campinas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, 2004.

OLIVEIRA, G. A; SCARPA, V.M. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. Quím. Nova v.27 n.1 São Paulo jan./fev. 2004.

OUSADA, Y.; KHOKHLOV, A.R., Polymer gels and network. Nova iorque: Marcel Dekker, 2002.

PADILHA,A.F.; AMBROZIO,F.F.. Técnicas de Análise Microestrutural. São Paulo: Hermus, 2004.

PEPPAS, N A; BURES, P; LEOBANDUNGLE, W; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, v. 50, p.27-46, 2000.

PEREIRA, R. M.; CRUZ,L.; RÉ,I.M; GUTERRES,S.S. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico preparadasa partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. Acta Farm. Bonaerense v. 25, n° 2, p.198-205, 2006 ^A.

PEREIRA, M.B. Hidrogéis de poli (álcool vinílico): efeito da densidade de reticulação e da natureza química do reticulante sobre a liberação controlada de compostos iônicos. Campinas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Estadual de Campinas, 1997 ^B.

PONCELET, D.; LENCKI, R.; BEAULIEU, C.; HALLE, J. P.; NEUFELD, R. J.; FOURNIER, A. Production of alginate beads by emulsification internal gelation. 1. Methodology. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 38, n.1, p. 39–45, 1992.

POLLAUF, E. J.; PACK, D.W. Use of thermodynamic parameters for design of double-walled microsphere fabrication methods. Biomaterials, v. 27, p. 2898–2906, 2006

PRASAD, M. P.; KALYANASUNDARAM, M. Effect of incorporation of gelatin, and interactive polymer on the matrix stability and release of fenthion from crosslinked matrices of carboxymethylcellulose. J. Controlled Release, v.27, p.219-225, 1993. ^A

PRASAD, M. P.; KALYANASUNDARAM, M. Scanning electron microscopic analysis and swelling behaviour of ionotropically crosslinked carboxymethylcellulose and carboxymethylcellulose-gelatin matrices. Carbohydrate Polymers, v.26, p.35-41, 1995. ^B

PRATA, S.A. Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa. Campinas. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição- DOUTORADO)- Universidade Estadual de Campinas, 2006.

RANADE,V.V.; HOLLINGER, M.A. Drug Delivery System. Flórida: CRC Press, 2004.

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

REIS, V.A; GUILHERME, R.M; RUBIRA, F.A; MUNIZ, C.E. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 310, p. 128-135, 2007. ^A

REIS, A.V.; CAVALCANTI, O.A.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C. Synthesis and characterization of hydrogels formed from a glycidyl methacrylate derivative of galactomannan. *Inter. J. Pharm*, v.267, n. 1-2, p.13-25, 2003. ^B

RINALDI, T.P.A.; MAZERA, K.S.; PEZZINI, R.B.; ZÉTOLA, M.; BAZZO, C.G. Preparo e caracterização de micropartículas de acetobutirato de celulose e poli(3-hidroxibutirato) contendo piroxicam. *Acta Scientiarum. Health Sciences*. v. 31, n. 1, p. 51-56, 2009.

ROSSO, F.; BARBARISI, M.; PETILLO, O.; MARGARUCCI, S.; CALARCO, A.; PELUSO, G. *Mater. Sci. Engin.* v. 23, p. 371, 2003.

RODRIGUES, A. P.; HIRSCH, D.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LOGATO, P. V. R.; MORAES, A. M. Production and characterization of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 638-643, 2006.

ROKHADE, A. P.; AGNIHOTRI, S. A.; SANGAMESH A. P.; MALLIKARJUNA, N. N.; KULKARNI, P.V.; AMINABHAVI, T.M. Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. *Carbohydrate Polymers*, v. 65, p. 243-252, 2006.

RORABACHER, B.D. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. *Anal. Chem.*, 63 (2), pp 139–146, 1991.

SABRA, W.; DECKWER, W.D. Alginate: a polysaccharide of industrial interest and diverse biological functions. In: *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. Nova Iorque: Marcel Dekker, 10 ed, p. 518, 2005.

SANTOS, A.B.; FERREIRA, V.P.; GROSSO, C.R.F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis a oxidação óleo-resina de páprica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* v.3(16), p.26-30, 2000.

SILVA, C. M.; RIBEIRO, A. J.; FIGUEIREDO, I. V.; GONCALVES, A. R.; VEIGA, F. Alginate microspheres prepared by internal gelation: development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 311, p. 1-10, 2006.

SHAPIRO, L.; COHEN S. *Biomaterials* v. 18, p.583, 1997.

SUAVE, J.; DALLAGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. Revista Saúde e Ambiente (UNIVILLE), v. 7, p. 12-20, 2006.

SWEETMAN, S. C. Martindale: the complete drug reference. 33. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2002.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Synthesis of gelatin microspheres containing Interferon. Pharmaceutical research, v. 6, n. 5, p. 422-427, 1989.

TAN, J.; GEMEINHART, R.A.; MA, M.; SALTZMAN, W.M. Biomaterials, v. 26, p. 3663, 2005.

TAVAKOL, M.; FARAHANI, VASHEGHANI, E.; FARAHANI, DOLATABADI, T.; NAJAFABADI, H.S. Sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan gel beads coated by chitosan. Carbohydrate Polymers. v. 77. p. 326–330, 2009.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Thirteenth edition. New Jersey: Merck. p.7588, 2001.

UDDIN, M. S.; HAWLADER, M. N. A.; ZHU, H. J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. J. Microencapsulation, v. 18, n. 2, p. 199-209, 2001.

UGWOKE, MICHAEL I.; KAUFMANN, G.; VERBEKE, N.; KINGET, R. Intranasal bioavailability of apomorphine from carboxymethylcellulose-based drug delivery systems. International Journal of Pharmaceutics v. 202, p. 125–131, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL USP . 25.ed. Rockille: United States Pharmacopeial Convention. p.1388-1389, 2000.

VREČER, F.; VRBINC, M.; MEDEN, A. Characterization of piroxicam crystal modifications. International Journal of Pharmaceutics. V.256, p. 3-15, 2003.

ZENG, M.; FANG Z. J. Membr. Sci. v 245, p. 9, 2004.

ZHANG, X., HU Z., LI Y. Polymer, v.39, p. 2783, 1998. ^A

ZHANG, X.; WU, D.; CHU, C. Biomaterial, v. 25, p. 3793, 2004. ^B

ZHANG, F.; CHENG, G.; YING, X. Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. Reactive & Functional Polymers, v. 66, p. 712-719, 2006.

WANG, F. J.; WANG, C. H. Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres. J. Microencapsulation, v. 19, n. 4, p. 495-510, 2002.

WANG, C.; YE, W.; ZHENG, Y.; LIU, X.; TONG, Z. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly . *International Journal of Pharmaceutics*, v.338, p. 165-173, 2007.

WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D., Microencapsulation Using Emulsification/Solvent Evaporation: An Overview of Techniques and Applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990

WISE, D. L. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. New York: Marcel Dekker, 2000.

YUGUCHI, Y.; URAKAWA, H.; KAJIWARA, K.; DRAGET, K.I.; STOKKE, B.T. Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 2. Time-resolved studies on ionotropic gels. *Journal of Molecular Structure*, v. 554, p. 21–34, 2000.

APÊNDICE 1

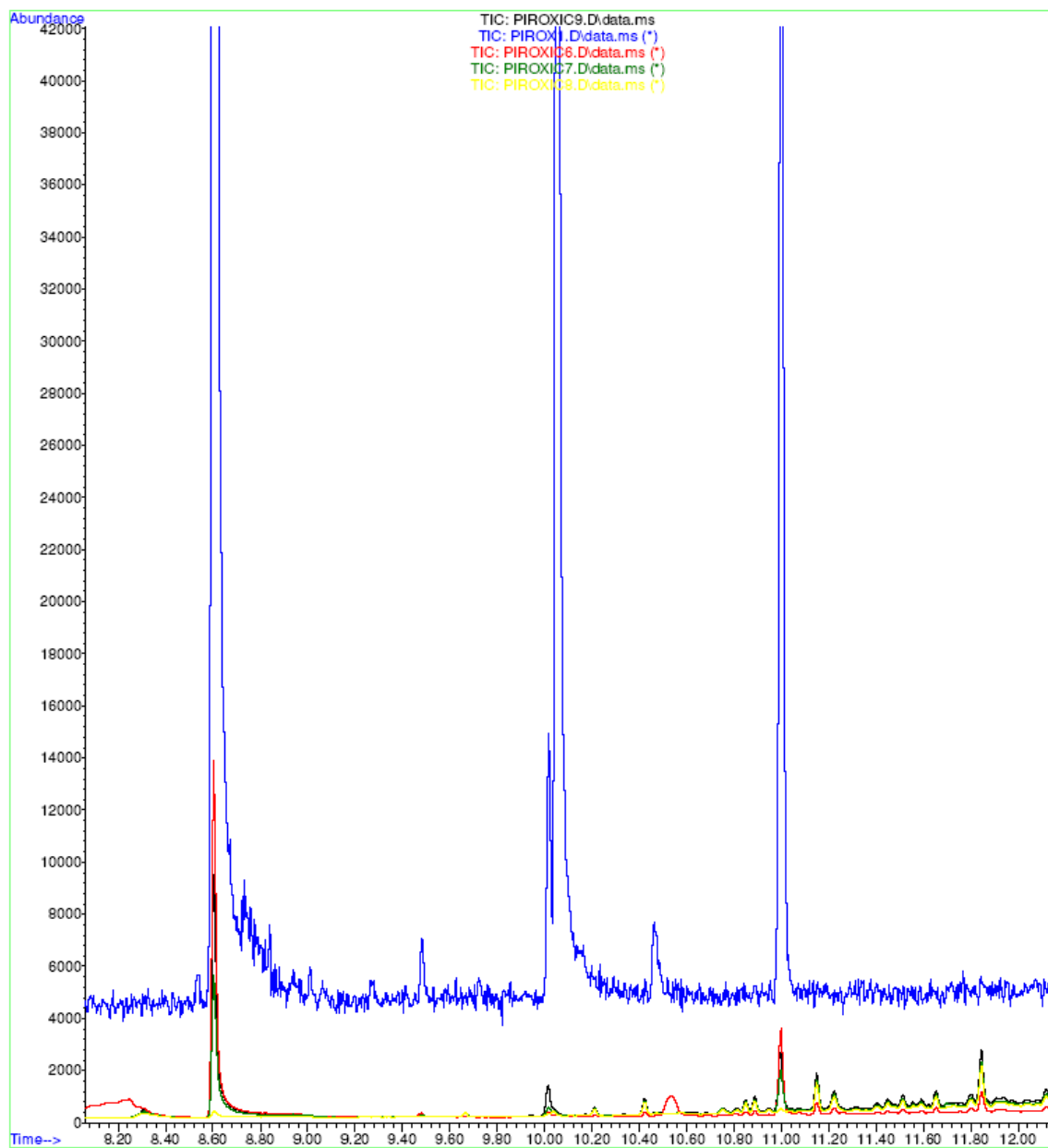


Figura 1 - Espectrograma apresentando os picos em 8,6 e 10,99 min, de fragmento do Piroxicam onde: padrão (preto), amostra em matriz alginato (vermelho) e (azul), amostra em matriz gelatina (verde) e (amarelo).

APÊNDICE 2

Tabela 1: valores médios de absorvância obtidos para a construção da curva de calibração do Piroxicam, por espectrofotometria na região UV, no comprimento de onda 353nm, utilizando tampão fosfato pH 7,4.

Concentração (mg/L)	Absorvância (nm)
1	0,047
5	0,213
10	0,405
15	0,593
20	0,865

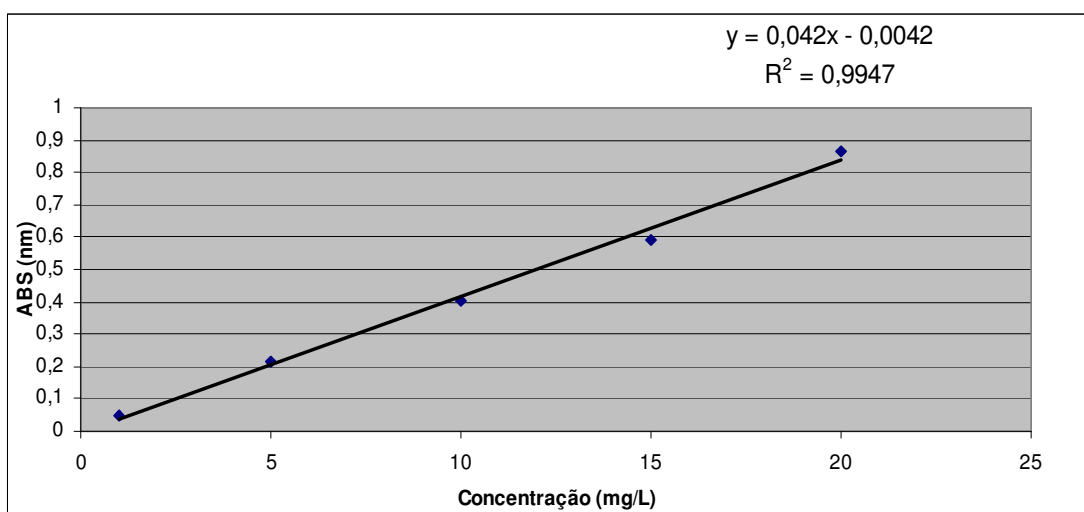


Figura 2 - Representação gráfica da curva de calibração do Piroxicam obtida por espectrofotometria UV a 353nm, em tampão fosfato pH 7,4 e sua respectiva equação da reta.