



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MICHELLE DE OLIVEIRA PEDROSA

**GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO
PARA UM CANDIDATO A FÁRMACO DERIVADO DO TIOFENO**

CAMPINA GRANDE

2013

MICHELLE DE OLIVEIRA PEDROSA

**GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO
PARA UM CANDIDATO A FÁRMACO DERIVADO DO TIOFENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa Desenvolvimento e Controle da Qualidade de Produtos Farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

CAMPINA GRANDE
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

P372g

Pedrosa, Michelle de Oliveira.

Grânulos de alginato de cálcio como sistema de liberação para um candidato a fármaco derivado do tiofeno [manuscrito] / Michelle de Oliveira Pedrosa. – 2013.

66 f. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2013.

“Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Departamento de Farmácia.”

1. Alginato de sódio. 2. Tecnologia farmacêutica. 3. Derivado tiofênico. I. Título.

21. ed. CDD 615.1

MICHELLE DE OLIVEIRA PEDROSA

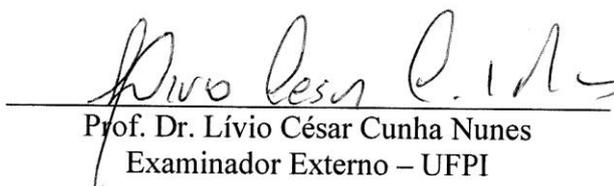
**GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARA
UM CANDIDATO A FÁRMACO DERIVADO DO TIOFENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

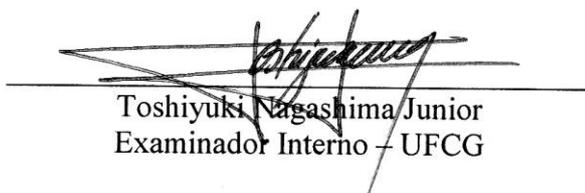
Aprovada em 26 / 09 / 2013.



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno
Orientador



Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes
Examinador Externo – UFPI



Toshiyuki Nagashima Junior
Examinador Interno – UFCG

AGRADECIMENTOS

À Deus por atender minhas orações, quando eu pedi luz e forças para fazer minhas escolhas com convicção e transformar minhas dificuldades em conquistas e vitórias, por presentear todos os meus dias com a vida.

Aos meus amados pais, Fátima e Ney, por todo amor, amizade, dedicação e apoio a mim dispensados, sempre me fazendo acreditar que nada é impossível. Aos meus irmãos, Alexandre e Junior pela amizade e torcida.

Ao meu orientador, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno pela orientação, amizade, confiança e liberdade para inovar.

À todos os professores deste curso, pela dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas, cada um de forma especial contribuiu para meu aperfeiçoamento na pesquisa científica.

Agradeço imensamente as minhas queridas IC's Andressa e Rayane, pela amizade, comprometimento, competência e esforço dedicados para a realização deste trabalho e pelos agradáveis momentos de convivência, com elas eu divido os méritos desta conquista.

Agradeço a todos do LDCPF que contribuíram de forma direta e indireta para a realização dos meus trabalhos e pela agradabilíssima convivência. Em especial agradeço a Geovani pela presteza e zelo na realização de muitos experimentos; à Alexssandra (Alê) nas análises estatísticas; à Daniele (Dani) que me ajudou na interpretação de alguns resultados.

Às minhas queridas amigas Jamilly, Katharina e Giovanna, que tornaram minha vida mais agradável nos últimos 24 meses, pelo apoio, pelos sorrisos, por compartilhar as alegrias e frustrações.

À Universidade Estadual da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

O uso de polissacarídeos biodegradáveis no desenvolvimento de novos sistemas transportadores de fármaco tem ganhado bastante aceitação. Os grânulos de hidrogel contendo um agente terapêutico formado a partir do polímero alginato de sódio em presença de íons divalentes, são estudados como um sistema multiparticulado para liberação controlada sítio específica, para proteção do fármaco das condições adversas do meio e para melhorar a sua fabricação. A grande maioria das substâncias utilizadas na terapêutica atual derivou da utilização da estratégia de modificação molecular, e os compostos heterocíclicos que apresentam átomos de enxofre em sua composição são alvo dessa estratégia, visto que apresentam atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral. Os derivados tiofênicos contendo o grupo cicloalquil ligado ao anel tiofênico apresentam importantes atividades farmacológicas, principalmente antifúngicas, sendo consideradas moléculas importantes devido a crescente demanda por novos fármacos com esta atividade, porém eles apresentam limitadas propriedades farmacocinéticas devido ao seu caráter altamente hidrofóbico. Este trabalho objetivou obter um sistema multiparticulado de grânulos de alginato de cálcio contendo o 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopentil[b]tiofeno-3-carbonitrila (5CN06-LSVM), um derivado tiofênico, pelo método de gelificação ionotrópica, a partir de uma solução aquosa de alginato de sódio 3% e emulsão O/A do fármaco 0,1%, misturadas em 5 diferentes proporções (A, B, C, D e E) com uma solução de cloreto de cálcio a 10%. A morfologia, a microscopia eletrônica de varredura (MEV), o rendimento dos grânulos, a taxa de carregamento, o intumescimento e erosão e a análise térmica foram avaliadas. Os grânulos resultantes, com exceção da amostra B, foram ovais, não aglomerados e com uma superfície apresentando fissuras. O rendimento variou entre 82% e 107%. O composto altamente hidrofóbico pode ser aprisionado até 67,17% dentro dos grânulos. Os grânulos mostraram baixo grau de intumescimento na solução de simulação de suco gástrico, mas em tampão fosfato pH 7,4 intumesceram rapidamente com erosão completa da rede polimérica em 60 minutos. A análise termogravimétrica mostrou que a estabilidade térmica do fármaco era melhor quando incorporado aos grânulos. Concluiu-se com este estudo, que é possível obter um sistema multiparticulado, utilizando um método simples, fácil e reprodutível, possível de ser utilizado para administração oral de fármacos hidrofóbicos.

Palavras-chaves: alginato de sódio, derivado tiofênico, gelificação ionotrópica, grânulos.

ABSTRACT

The use of biodegradable polysaccharides in development of new drug delivery systems has gained much acceptance. The granules of hydrogels containing a therapeutic agent formed from the sodium alginate polymer in the presence of divalent ions are studied as a multiparticulate system for controlled release site specific, to protect the drug from adverse conditions and to improve its manufacture. The great majority of the substances used in actual therapeutic derived from the utilization of molecular modification, and the heterocyclic compounds that present sulfur atoms in its composition are the target of this strategy, since they exhibit antibacterial, antifungal, antiviral and antitumor activities. The thiophene derivatives containing the cycloalkyl group linked to the ring thiophenic present important pharmacological activities, mainly antifungal activities, being considered important molecules due the increasing demand for new drugs with this activity, but they have limited pharmacokinetic properties owing to its highly hydrophobic character. This study aimed to obtain a multiparticulate system of calcium alginate beads containing 2-[(2, 4-dichlorobenzylidene)-amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopentyl[b]thiophene-3-carbonitrile (5CN06-LSVM), a derivative thiophenic, by ionotropic gelation method from aqueous solution of sodium alginate 3% and O / W emulsion drug 0.1%, mixed in 5 different ratios (A, B, C, D and E) with solution of calcium chloride 10%. The morphology, the scanning electron microscopy (SEM), the yield of the granules, the loading rate, swelling and erosion and the thermal analysis were evaluated. The resulting granules, with the exception of sample B, were oval, not agglomerated and with a surface fissures. The yield ranged between 82% and 107%. The highly hydrophobic compound can be entrapped within the granules. The granules showed low degree o swelling in the simulation solution of gastric juice, but in phosphate buffer pH 7.4 swelled quickly with complete erosion of the polymer network in 60 minutes. The thermo gravimetric analyses showed that thermal stability of the drug was better when incorporated into the granules. I was concluded from this study, it is possible to obtain multiparticulate system using a simple, easy, and reproducible method, can be used for oral administration of hydrophobic drugs.

Key words: sodium alginate, derivative thiophenic, ionotropic gelation, granules.

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Sistemas matriciais de liberação de fármaco	19
Figura 2- Técnica de preparação de grânulos de hidrogel por gelificação ionotrópica	21
Figura 3- Estrutura química do ácido algínico	22
Figura 4- Formação de gel de Alginato de Cálcio	23
Figura 5 -Estrutura química de 2-amino-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila	24
Figura 6- Estrutura química do -[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H- ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila	26
Figura 7- Espectro de varredura do 5CN06-LSVM observado o comprimento de onda de 393nm correspondendo à absorção máxima do fármaco	32
Figura 8- Espectro de varredura das amostras de grânulos contendo 5CN06-LSVM (A) e sem o fármaco (B) no UV MINI - 1240 (Shimadzu).	33
Figura 9- Curva de calibração do 5CN06-LSVM (média, n=3).	39
Figura 10- Etapas de obtenção de grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM	40
Figura 11- Análise macroscópica das diferentes amostras de grânulos contendo 5CN06 obtidos por método de gelificação ionotrópica	45
Figura 12- Análise morfológica por MEV dos grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM, em aumento 100x (à esquerda) e 500x (à direita).	46
Figura 13- Termogramas TG e DSC do 5CN06-LSVM	53
Figura 14- Curvas termogravimétricas (amostra A)	54
Figura 15- Curvas termogravimétricas (amostra C)	54
Figura 16- Curvas termogravimétricas (amostra D)	55
Figura 17- Curvas termogravimétricas (amostra E)	55
Figura 18- Curvas DSC dos grânulos de alginato de cálcio contendo fármaco (amostra A)	57
Figura 19- Curvas DSC dos grânulos de alginato de cálcio contendo fármaco (amostra C)	57
Figura 20- Curvas DSC dos grânulos de alginato de cálcio contendo fármaco (amostra D)	58
Figura 21- Curvas DSC dos grânulos de alginato de cálcio contendo fármaco (amostra E)	58
Figura 22 - Curvas DSC do alginato de sódio puro	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas do 5CN06-LSVM (ARAÚJO, 2010).	25
Tabela 2. Dados utilizados na construção da curva de calibração do 5CN06-LSVM.	33
Tabela 3. Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.	35
Tabela 4. Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária).	35
Tabela 5. Resultados do ensaio para verificação da robustez do método.	36
Tabela 6. Formulações com as diferentes proporções de solução de alginato de sódio 3% e emulsão de 5CN06-LSVM 0,1% em cada amostra.	41
Tabela 7. Percentual em massa dos elementos encontrados na superfície das amostras, por EDX.	47
Tabela 8. Determinação da massa esperada, massa obtida e rendimento.	47
Tabela 9. Determinação da taxa de carregamento do grânulos contendo o 5CN06-LSVM.	48
Tabela 10. Variação de peso dos grânulos após 30 minutos e 3 horas em diferentes meios.	51
Tabela 11. Dados da análise termogravimétrica de amostras A, C, D, E e 5CN06-LSVM puro.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaCl₂ -Cloroeto de Cálcio

CV%- Coeficiente de Variação

DPR - Desvio Padrão Relativo

DP- Desvio Padrão

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

DTG - Termogravimetria derivada

EDX - Espectroscopia de Energia Dispersiva de raio-X (EDX)

FDA - *Food and Drug Administration*

LogP - Coeficiente de Partição

GAC - Grânulos de Alginato de Cálcio

IC – Coeficiente Angular

LD -Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

NSTF - Novos Sistemas Transportadores de Fármaco

PEO - óxido de polietileno

r² – Coeficiente de Determinação

r - Coeficiente de Correlação

SG - Suco Gástrico

TF -Tampão Fosfato

TG – Termogravimetria

% VP - Percentual de Variação de Peso

5CN06-LSVM - 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO	16
2.1.1 Novos Sistemas Transportadores de Fármaco (NSTF)	17
2.1.1.1 Sistemas multiparticulados	18
2.1.1.2 Sistemas Matriciais Poliméricos Hidrofílicos	18
2.2 GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA	20
2.2.1 Alginato	21
2.3 DERIVADOS DO TIOFENO	23
2.3.1 Derivado 2-aminotiofeno (5CN06-LSMV)	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
PARTE I - Validação da metodologia analítica de quantificação do 5CN06-LSVM	28
1 MÉTODOS	29
1.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	29
1.1.1 Determinação do comprimento de onda de detecção	29
1.1.2 Validação do método analítico	29
1.1.2.1 Seletividade e especificidade	29
1.1.2.2 Linearidade	30
1.1.2.3 Exatidão	30
1.1.2.4 Precisão	30
1.1.2.5 Robustez	30
1.1.2.6 Limite de detecção	31
1.1.2.7 Limite de quantificação	31
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
2.1 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DE DETECÇÃO	32
2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	32
2.2.1 Especificidade (seletividade)	32

2.2.2 Linearidade	33
2.2.3 Exatidão	34
2.2.4 Precisão	35
2.2.5 Robustez	36
2.2.6 Limite de detecção e quantificação	36
3 CONCLUSÕES	37
PARTE II -Desenvolvimento e caracterização dos grânulos de alginato de cálcio contendo o fármaco	38
1 MÉTODOS	39
1.1 PREPARAÇÃO DOS GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO	39
1.1.1 Preparação da solução de cloreto de cálcio (CaCl ₂) 10%(p/v).	39
1.1.2 Preparação da solução de alginato de sódio 3%(p/v).	39
1.1.3 Preparação da emulsão de 5CN06-LSVM à 0,1%(p/v).	39
1.1.4 Preparação dos grânulos de alginato de cálcio contendo o 5CN06-LSVM	39
1.2 DESENHO DOS EXPERIMENTOS	40
1.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO 5CN06-LSVM POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)	41
1.4 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO	41
1.5 TAXA DE ENCAPSULAÇÃO	41
1.6 ESTUDO DE INTUMESCIMENTO E EROÇÃO	42
1.7 ANÁLISE TÉRMICA [CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TG)]	42
1.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
2.1 PREPARAÇÃO DO GRÂNULO CONTENDO O FÁRMACO 5CN06-LSVM	44
2.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)	45
2.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO	47
2.4 TAXA DE ENCAPSULAÇÃO DE 5CN06 –LSVM NOS GRÂNULOS	47
2.5 TESTE DE INTUMESCIMENTO E EROÇÃO	49
2.6 ANÁLISE POR TERMOGRAVIMETRIA (TG) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	51

3. CONCLUSÕES	60
4. REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A farmacotécnica e a tecnologia farmacêutica contemporânea têm como alvo principal incluir os fármacos em um sistema de liberação de medicamentos capaz de vencer as barreiras anatômicas e fisiológicas que limitam absorção de fármacos. Os novos sistemas de vetorização têm como objetivos melhorar a biodisponibilidade, a segurança e garantir maior adesão ao tratamento medicamentoso.

O uso de polissacarídeos biodegradáveis no desenvolvimento desses novos sistemas transportadores de fármaco (NSTF) tem ganhado bastante atenção. Os grânulos de hidrogel contendo uma substância farmacologicamente ativa, por exemplo, formado a partir do polímero alginato de sódio em presença de íons divalentes, são estudados como um sistema multiparticulado para liberação controlada sítio específica, além de proteger os fármacos das condições adversas do meio. Os polímeros utilizados não são tóxicos e estão facilmente disponíveis na natureza, e os métodos de preparação são facilmente executáveis e reproduzíveis, o que torna os novos sistemas opções privilegiadas.

Nesse contexto, a produção destes sistemas multiparticulados como prática em farmacotécnica voltada a promover aos fármacos melhoria de suas propriedades, em especial na proteção contra a degradação e como vetores promotores de sua absorção, é capaz também de facilitar a sua manipulação, aumentar sua solubilidade e controlar a liberação e consequente biodisponibilidade do fármaco.

A pesquisa de novos fármacos caracteriza-se por sua complexidade e representa o primeiro estágio no caminho do desenvolvimento de medicamentos. A grande maioria deles utilizados na terapêutica atual derivou da utilização da estratégia de modificação molecular, cuja técnica permite fazer o melhoramento da estrutura do protótipo. Os fármacos obtidos raramente são administrados como substâncias químicas isoladas, mas sim, inclusos em uma forma farmacêutica que garanta os efeitos farmacológicos desejados, segurança e boa biodisponibilidade.

Os compostos heterocíclicos são alvo dessa estratégia de modificação molecular, visto que são fármacos empregados atualmente na cura de infecções. A maioria desses apresentam-se nitrogenados e outros apresentam átomos de enxofre em sua composição química. Vários heterociclos contendo o átomo de enxofre têm sido usados como agente antibacteriano, agente antiviral e no combate ao câncer como, por exemplo, o oltipraz, um representante da classe das 1,2-ditioil-3-tionas, que tem se mostrado eficiente no tratamento do câncer de fígado; o tioconazol, composto contendo um tiofeno em sua estrutura, possuindo atividade antifúngica;

a entricitabina (Emtriva®) que é um antirretroviral que atua na inibição da enzima transcriptase reversa do HIV, impedindo a replicação viral (SIQUEIRA et al., 2010).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas na descoberta de novos agentes antimicrobianos e se fazem necessárias, visto que pacientes imunocomprometidos, portadores de leucemia, linfoma, *diabetes mellitus* e AIDS possuem uma maior probabilidade de serem acometidos por microrganismos resistentes (LIMA et al., 2006).

Estudos relataram diversos benzo[*b*]tiofenos e compostos com grupo 4,5 cicloalquil ligado à porção tiofeno como importantes heterociclos bioativos com atividades antimicrobianas e potentes atividade antifúngicas, um deles é o 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopentil[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (5CN06-LSVM), derivado tiofênico sintetizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) (FERREIRA et al, 2004; RYU et al., 2005; MENDONÇA-JR et al., 2011).

Tendo em vista a crescente demanda, nos últimos anos, por novos fármacos com atividade antifúngica, as atividades farmacológicas apontadas na literatura para os derivados tiofênicos e a efetividade do uso de sistemas multiparticulados como vetores promotores de absorção, torna-se relevante o desenvolvimento deste trabalho, que utilizou técnicas apropriadas para se obter grânulos contendo o 5CN06-LSVM, contribuindo assim na ampliação dos conhecimentos da técnica de obtenção, bem como para sua futura aplicabilidade no mercado farmacêutico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

Os medicamentos são sistemas de liberação, constituindo assim um meio de administrar um fármaco ao organismo, de maneira segura, eficiente e reprodutível. O desenvolvimento e a formulação apropriada da forma farmacêutica do medicamento requer a consideração das características físicas, químicas, físico-químicas e biológicas de todos os princípios ativos e matérias primas usadas no produto, assim como as características anátomo-fisiológicas do local de administração e absorção. Existem várias formas farmacêuticas para incorporação do fármaco que variam de acordo com a via de administração, podendo ser tomadas oralmente ou injetadas, assim como aplicadas sobre a pele ou inaladas (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; AUTON, 2005).

De forma geral os fármacos devem ser liberados de sua forma farmacêutica e serem dissolvidos antes de serem absorvidos para os fluidos do organismo via membranas absorventes, epitélio da pele, trato gastrointestinal e pulmões. Havendo assim, entre o local de administração e o órgão ou tecido alvo, uma série de barreiras anatômicas, químicas ou biológicas que contrariam a obtenção do efeito terapêutico desejado, visto que o padrão de absorção dos fármacos varia consideravelmente de substância para substância, assim como entre as diferentes vias de administração (OLIVEIRA et al, 2004; AUTON, 2005; PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007).

As formas farmacêuticas conhecidas como convencionais, são aquelas desenvolvidas para liberar o fármaco rapidamente após a administração, sendo empregados recursos que favorecem os processos de liberação e dissolução do fármaco, porém estes sistemas apresentam algumas características como:

- I. Flutuações de concentrações plasmáticas do fármaco que ocasionam picos com valores que ultrapassam a faixa terapêutica;
- II. Dificuldade de adesão ao tratamento por parte do paciente em função das inúmeras doses a serem administradas ao longo do tratamento.

Estes são alguns dos desafios a serem superados pela tecnologia farmacêutica (PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007; BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2003).

Nos últimos 40 anos uma significativa expansão no mercado de novos sistemas farmacêuticos para liberação de fármaco pode ser percebido. O desenvolvimento de novos sistemas tem como objetivo estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes que possibilitem o aumento da biodisponibilidade dos fármacos, com o consequente aumento da

eficiência do efeito farmacológico e de uma possível diminuição dos efeitos colaterais, sendo assim administrados com mais segurança. No entanto, estes objetivos são dificultados por impedimentos fisiológicos bem como a dificuldade em manter a forma farmacêutica no local ótimo para absorção do fármaco (BAUMGARTNER et al., 2000).

2.1.1 Novos Sistemas Transportadores de Fármaco

Os Novos Sistemas Transportadores de Fármacos (NSTF), também conhecido como formas farmacêuticas não convencionais ou de liberação modificada, são aquelas que apresentam modificação da taxa de liberação ou do local onde a substância ativa é liberada (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002). Estes sistemas têm sido largamente estudado e envolvem uma grande quantidade de modelos, entre eles estão os sistemas multiparticulados ou grânulos, micropartículas, microemulsões, nanopartículas, lipossomas, entre outros (FORMARIZ et al, 2005; SANTOS & CASTANHO, 2002; PONGJANYAKU & RONGTHONG,2010; MISHRA, PATEL & TIWARI, 2010).

Os NSTF são os mais indicados para se atingir o objetivo de qualquer forma farmacêutica que é a liberação do fármaco no local apropriado do organismo e a manutenção da concentração exigida. Além disso, apresentam as seguintes vantagens que complementam o interesse do seu desenvolvimento e utilização:

- I. Tratamento contínuo, diminuindo o número de administrações diárias;
- II. Diminuição ou mesmo desaparecimento dos picos plasmáticos;
- III. Diminuição nas oscilações da concentração sanguínea do fármaco, evitando níveis subterapêuticos ou tóxicos;
- IV. Aumento das concentrações plasmáticas eficazes para os princípios ativos de meia-vida biológica relativamente curta;
- V. Menor acúmulo do fármaco no organismo;
- VI. Proteção do fármaco de uma eventual degradação pelos componentes dos fluidos biológicos, nomeadamente dos fluidos gástricos (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002).

As formas farmacêuticas sólidas de uso oral são as mais utilizadas, uma vez que esta via continua sendo a mais atraente para a administração de todos os agentes medicinais, visto a facilidade de entrega, a falta de dor associada e a eficácia. (ANSEL; O'HAGAN, 1998; SINGH& O'HAGAN, 1998). Diversas tecnologias podem ser empregadas para promover a liberação modificada e gradual de um fármaco

veiculado em uma forma oral e a utilização de grânulos para este fim é uma possibilidade bastante versátil (PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007).

2.1.1.1 Grânulos

Nos sistemas multiparticulados, a dose do fármaco está dividida em várias subunidades funcionais de liberação, que podem ser microcomprimidos, *pelets* ou grânulos, e apresentam vantagens em relação à forma de dose única. Para administrar a dose total recomendada, estas subunidades estão contidas em um comprimido ou uma cápsula que será administrada por via oral. As partículas pequenas são misturadas com o conteúdo do trato gastrointestinal e ficam distribuídas por uma grande área. Portanto, concentrações locais elevadas do fármaco são evitadas, e o risco de irritações locais é reduzido. Além disso, múltiplas unidades são menos variáveis e menos dependentes do tempo de trânsito gástrico, que resulta numa biodisponibilidade mais reprodutível do fármaco (PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007; PONGJANYAKU & RONGTHONG, 2010; PATIL, CHAVANKE & WAGH, 2012). Essas formas farmacêuticas apresentam diferentes tamanhos e formas e podem ser produzidas por uma variedade de processos, dentre os quais podem ser destacados a granulação e o revestimento em leito fluidizado, a extrusão/esferonização, a compressão e a gelificação ionotrópica (PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007; PATIL, CHAVANKE & WAGH, 2012)

Quanto aos modelos disponíveis para se obter as múltiplas unidades e sustentar a liberação de fármacos, temos os sistemas matriciais, que utilizam polímeros, geralmente de natureza hidrofílica e inerte, que são substâncias capazes de modular a liberação. Essa estratégia é uma das mais empregadas, devido às vantagens inerentes, tais como: eficácia, baixo custo, produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais, aceitação da *Food and Drug Administration* (FDA) e aplicabilidade para fármacos com baixa solubilidade (LOPES, LOBO & COSTA, 2005; MIRANDA, MILLÁN & CARABALLO, 2006).

2.1.1.2 Sistemas Matriciais Poliméricos Hidrofílicos

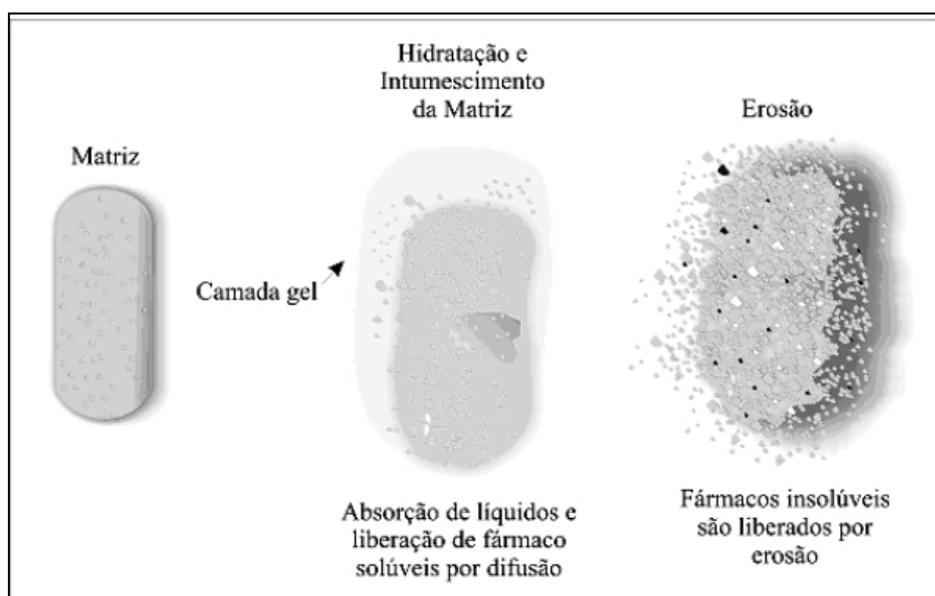
As matrizes hidrofílicas são constituídas por uma mistura do fármaco com um polímero hidrófilo, onde o fármaco pode se encontrar homogeneamente disperso na matriz polimérica, dentro de um reservatório ou adsorvido em sua superfície, e na sua liberação estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo penetração de água na matriz, difusão do fármaco pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação destes mecanismos (FIALHO et al, 2003).

Os polímeros utilizados apresentam características e propriedades especiais, tais como: capacidade de formação de estruturas microporosas/semipermeáveis, capacidade de intumescimento (expansão) em contato com a água e capacidade de complexação com fármacos. Numerosos polímeros biodegradáveis estão disponíveis e tem sido estudado em sistemas matriciais de liberação de fármaco (LYRA et al., 2007; GHOSAL & RAY, 2011).

Estes sistemas são também chamados de matrizes solúveis e intumescíveis, ou hidrogéis, pois são capazes de sofrer intumescimento, seguido da erosão do gel formado e dissolução em meio aquoso. Os materiais hidrofílicos comumente usados são os derivados celulósicos (metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e carboximetilcelulose sódica), os polissacarídeos (gommas, ágar e alginato de sódio) e o carbopol, além dos derivados do óxido de polietileno (PEO) (LOPES, LOBO & COSTA, 2005; MCCARRON et al., 2005).

A taxa na qual o fármaco é liberado, constitui a principal variável nos sistemas matriciais hidrofílicos, sendo controlada pela formação da camada do hidrogel em torno da matriz após a sua exposição a um fluido aquoso. A quantificação do grau de erosão da superfície da matriz intumescida ou a definição das taxas de absorção de água na interface entre o gel e o meio que o cerca podem ser bastante importante para determinação das taxas de liberação do fármaco (Figura 1), podendo desta forma, ocorrer uma liberação linear do fármaco. Pela determinação e ajuste da velocidade de erosão do sistema matricial, pode-se alcançar uma liberação de ordem zero para um dispositivo oral eficiente de liberação controlada de fármacos (GOHEL & BARIYA, 2009).

Figura 1- Sistemas matriciais de liberação de fármaco



(LYRA et al., 2007)

Assim, o conjunto de subunidades de hidrogel que constitui o sistema multiparticulado é um vantajoso sistema transportador de fármaco que pode ser usada pela via oral, permitindo a liberação do fármaco após expansão em contato com o meio de dissolução ou em resposta à estímulos fisiológicos como temperatura, pH, enzimas, biomoléculas (glicose, uréia ou insulina), força iônica e oxidação (VILLANOVA, ORÉFICE & CUNHA, 2010).

2.2 GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA

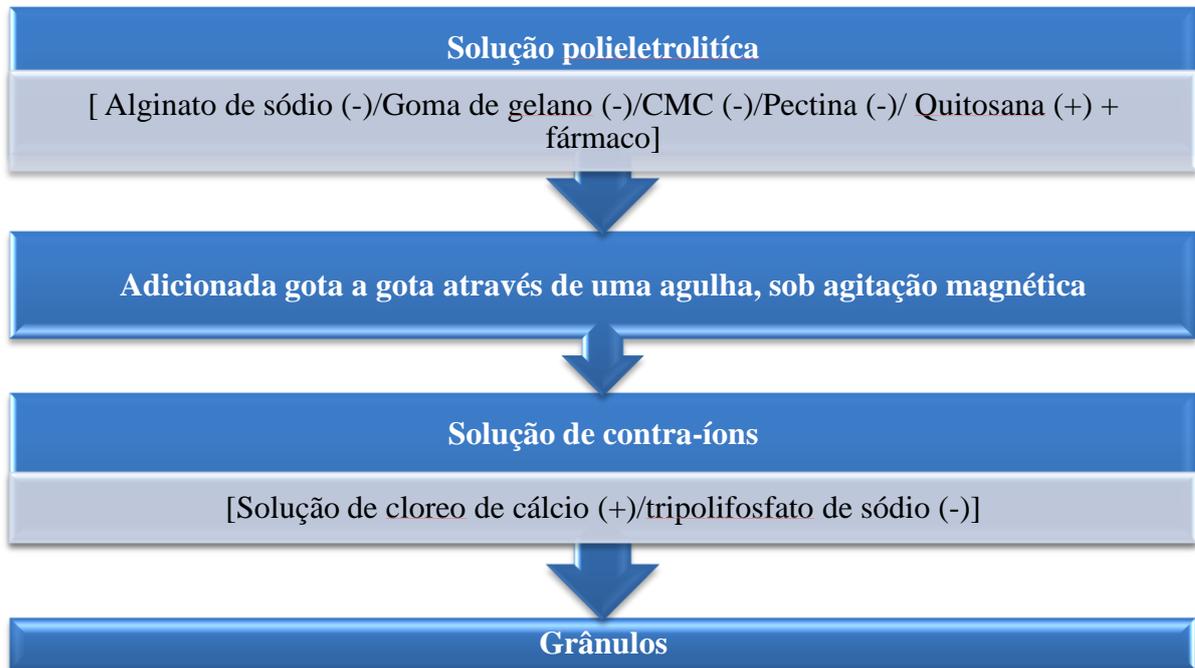
Gelificação ionotrópica é uma técnica bastante utilizada para obtenção de grânulos de hidrogel. A técnica baseia-se na capacidade de polieletrólitos para fazer ligação cruzada na presença de contra-íons. Os grânulos formados são entidades polimérica hidrófilas que são produzidos pela queda de uma solução ou emulsão de polímero-fármaco em uma solução aquosa de cátions polivalentes. Os cátions difundem para as gotas poliméricas carregadas com o fármaco, formando uma rede ionicamente reticulada tridimensional (PATIL, CHAVANKE & WAGH, 2012).

Segundo Donbrow (1992), pode-se formar grânulos contendo um fármaco através de uma extrusão/solidificação, onde material do núcleo na forma líquida, fundido ou em solução, é lançado através do orifício de um tubo fino ou seringa para formar micro gotas, cujo tamanho será dependente do diâmetro do orifício e da velocidade de saída do material. As gotas contêm o material de revestimento ou este é adicionado quando as gotas caem ou são injetadas. A solidificação do material de revestimento que ocorre para que os grânulos se formem pode ser por evaporação do solvente, difusão do solvente ou por reação química.

A solidificação por reação química é um processo que não envolve condições agressivas, baseando-se na gelificação ionotrópica, e consiste em incorporar o material a encapsular numa solução de alginato de sódio, para depois a mistura sofrer extrusão gota a gota, através de uma pipeta de calibre reduzido ou de uma seringa, para uma solução de cloreto de cálcio (KIM e LEE, 1992; BOYLAN, et al., 1994).

Os polímeros naturais ou semi-sintéticos, ou seja, alginatos, goma de gelano, quitosana, pectina e carboximetilcelulose são amplamente utilizados para o encapsulamento de fármacos utilizando esta técnica. Esses polieletrólitos naturais contêm certos ânions e cátions em sua estrutura química, esses ânions e cátions formam a estrutura de malha, pela combinação com os contra-íons, induzindo a gelificação por ligações cruzadas (Figura 2) (AL-KASSAS, AL-GOHARY & AL-FAADHEL, 2007).

Figura 2- Técnica de preparação de grânulos de hidrogel por gelificação ionotrópica



(Adaptado de PATIL, CHAVANKE & WAGH, 2012)

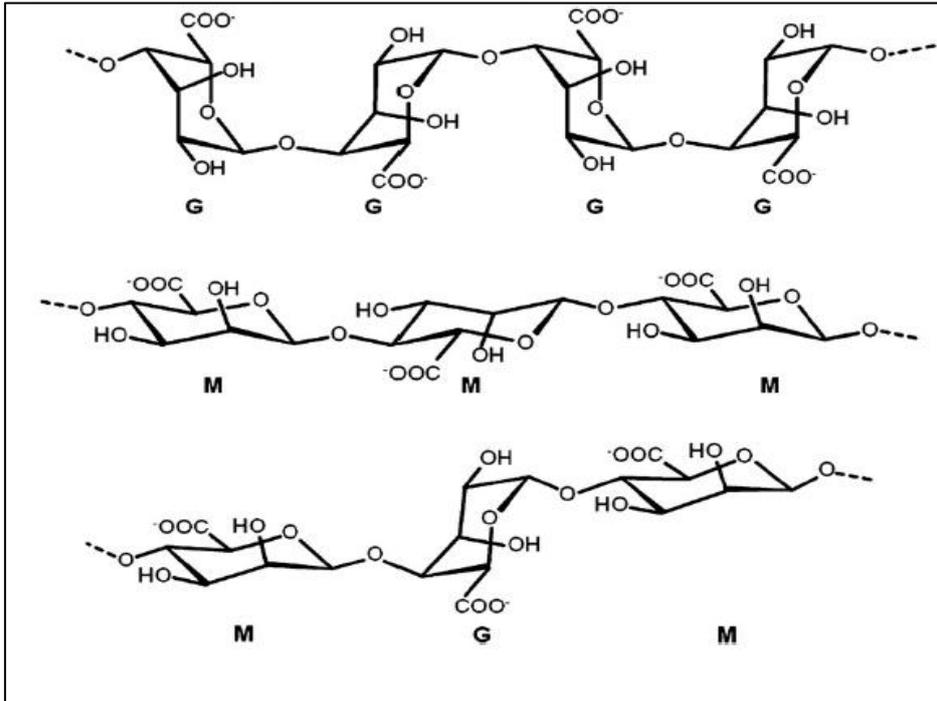
2.2.1 Alginato

Na última década, os polímeros naturais, na forma de hidrogéis, têm sido usados para a imobilização de enzimas e células, encapsulação de fármacos e de ativos cosméticos (OLIVEIRA et al., 2004). O alginato, é um polímero polianiónico, de ocorrência natural, que vem sendo muito utilizado em aplicações biomédicas, devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, custo relativamente baixo e pelas suas propriedades de formação de gel na presença de cátions bivalentes e polivalentes. Ele é um polissacarídeo, comercialmente disponível na forma de sal de sódio do ácido algínico (alginato de sódio) e, conseqüentemente, solúvel em água. É extraído tipicamente de algas marinhas marrons (Phaeophyceae), incluindo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, e também de algumas espécies de bactérias como isolados da forma *Azotobacter vinelandii* e de várias espécies de *Pseudomonas* (PEPPERMAN, KUAN & MCCOMBS, 1991; SUGAWARA, IMAI & OTAGIRI, 1994; ASLANI & KENNEDY, 1996; CHAN, JIN & HENG, 2002; BAJPAI & SHARMA, 2004; LEE & MOONEY, 2012).

A estrutura do alginato é constituída de dois tipos de resíduos uronatos, o β -D manuronato (M) e o α -L guluronato (G), unidos por ligações glicosídicas (1,4) em proporções e arranjos variáveis. Estes monômeros são organizados em blocos ao longo da cadeia, que

podem ser compostos por blocos de homopolímeros (GG e MM) associados aos blocos alternados (MG) na mesma molécula (Figura 3). A composição do alginato, a sequência dos blocos e o peso molecular são importantes, uma vez que estes fatores determinam as propriedades físicas do gel formado (LEE & MOONEY, 2012; PATIL, CHAVANKE & WAGH, 2012; LIAKOSA et al., 2013).

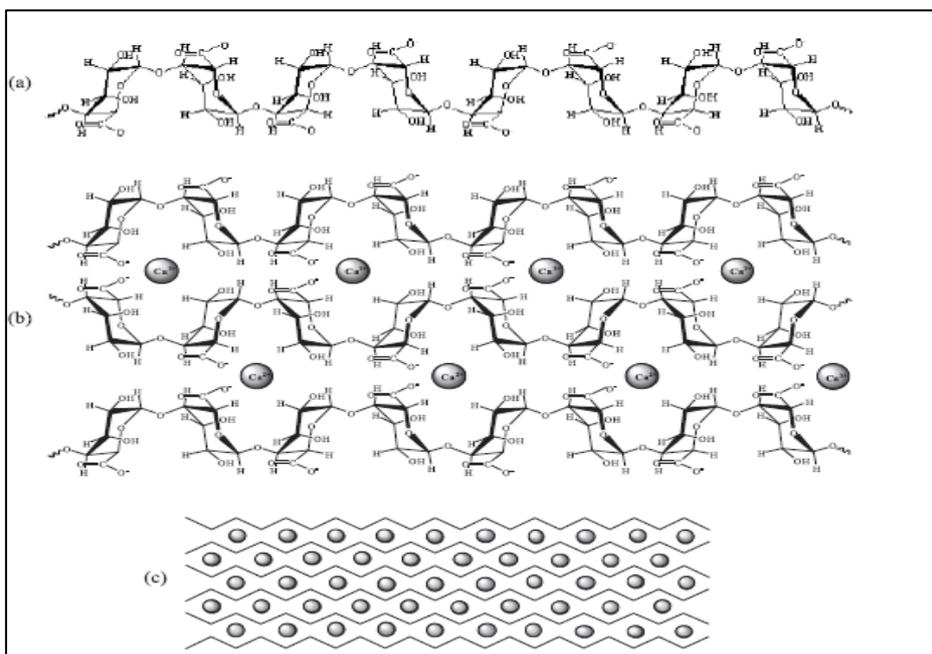
Figura 3 - Estrutura química do ácido algínico



(LEE & MOONEY, 2012)

Em solução aquosa, os alginatos se comportam como bobinas flexíveis, mas quando eles interagem com cátions divalentes, tais como os íons de cálcio, formam estruturas ordenadas e tridimensionais pelo processo de gelificação ionotrópica. A ligação cruzada do alginato de sódio solúvel em água é iniciada quando seus ânions entram em contato com os íons de cálcio (Ca^{+2}), formando junções intercadeias pelo mecanismo de ligação cooperativa dos íons entre os dois blocos GG alinhados de duas cadeias de alginato (figura 4). Neste momento é possível a incorporação de fármacos, ou outras moléculas bioativas na matriz polimérica através, principalmente, de interações eletrostáticas e van der Waals. A formação do alginato de cálcio é um processo instantâneo e irreversível, e é determinada pela velocidade de difusão dos íons cálcio na matriz do polímero alginato de sódio (GOMBOTZ & WEE, 1998; CHAVANPATIL et al., 2007; AMICI et al, 2008; SHI et al., 2011; LIAKOSA et al., 2013).

Figura 4 – Formação de gel de Alginato de cálcio



a. Homopolímeros de unidade gularônica em solução. b. Ligação entre as cadeias através de íons cálcio. c. formação da cadeia de gel com cadeias homopoliméricas unidas através de íons cálcio (KAWAGUTI & SATO 2008).

2.3 DERIVADOS DO TIOFENO

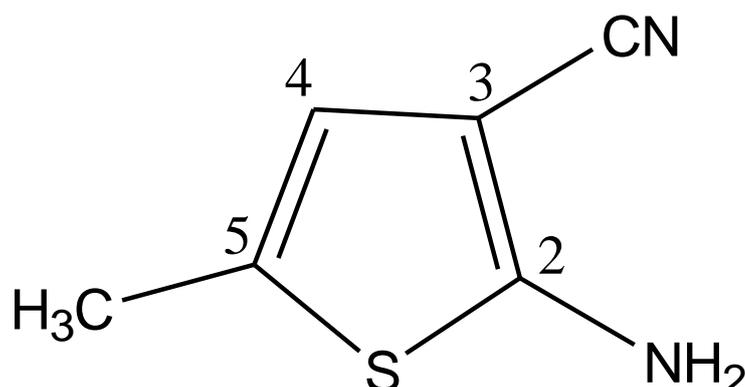
A química medicinal, através da técnica de modificação molecular, permite a obtenção de novos medicamentos. A grande maioria dos fármacos utilizados na terapêutica atual derivaram da utilização da estratégia de modificação molecular, cuja técnica permite fazer o melhoramento da estrutura do protótipo, através de modificações planejadas que podem identificar os diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação bioativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado – visando o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação do perfil farmacocinético e estabelecimento da relação estrutura/atividade (MONTANARI, 1995; LIMA, 2007).

Os compostos heterocíclicos são alvo dessa estratégia de modificação molecular, visto que correspondem a cerca de 65% dos fármacos empregados atualmente na cura de infecções, dos quais 95% desses apresentam-se nitrogenados e 25% deles apresentam átomos de enxofre em sua composição química (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Os derivados do anel tiofênico (Figura 5) estão muitas vezes presentes em compostos biologicamente ativos e numerosos exemplos de atividades biológicas são previstos. Eles podem ser inibidores da replicação do vírus herpes simples tipo I (HSV-1), antimetabólicos,

inibidores de cisteína e serina proteases (principalmente a trombina) e antagonistas 5-HT₆. Podem ser também encontrados em compostos que apresentam atividades, tais como inibidores BACE1, agentes antiinflamatórios, anti-HIV e com atividade inibidora de câncer mamário (PARAI et al., 2008; PINTO et al., 2008)

Figura 5 - Estrutura química de 2-amino-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila



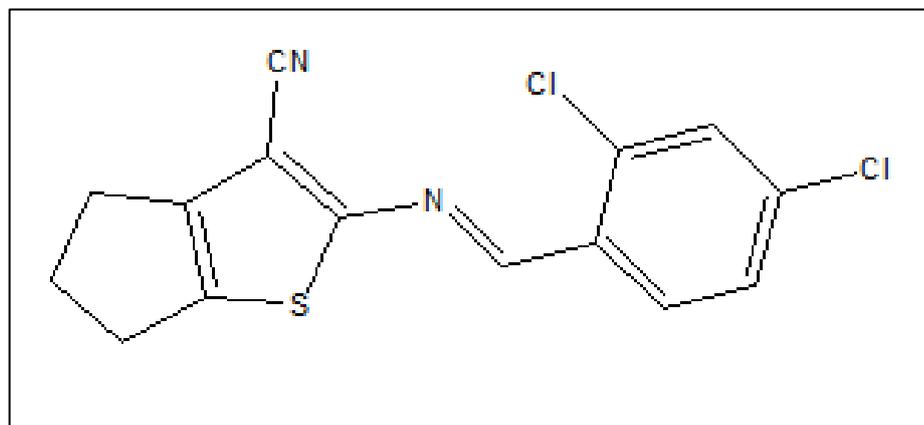
Dados da literatura mostram que os derivados do benzo[b]tiofeno apresentam atividade antifúngica contra espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis*) e espécies do gênero *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, e *A. flavus*) (PINTO et al., 2008).

O estudo de Mendonça-Jr et al. (2011), em que a atividade antifúngica de compostos derivados do tiofeno foi testada contra 44 cepas de fungos, incluído espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*), mostrou que os derivados 2-amino-3-ciano-cicloalquil[b]tiofenos apresentaram moderada atividade antifúngica, porém com efeitos fungicida, e o grupo 4,5 cicloalquil ligado à porção tiofeno era essencial para atividade antifúngica.

2.3.1 Derivado 2-Aminotiofeno (5CN06- LSVM)

O composto 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (Figura 6), genericamente chamado de 2-aminotiofeno, foi sintetizado e espectroscopicamente caracterizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), e nomeado pelo mesmo grupo de 5CN06-LSVM. Para a obtenção foi utilizado uma reação clássica de Gewald, seguido de substituição (por condensação) com diferentes aldeídos aromáticos (SCOTTI et al., 2012).

Figura 6- Estrutura química do -[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila



As características físico-químicas da molécula podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas do 5CN06-LSVM (ARAÚJO, 2010).

Derivado tiofênico	Aparência	Faixa de Fusão (°C)	F.M.	LogP	M.M.
2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila	Pó Amarelo	Polimorfo A: 186.5-189 Polimorfo B 189-191	$C_{15}H_{10}N_2SCl_2$	5,98	320

F.M: fórmula molecular, LogP: Coeficiente de partição da molécula, M.M.: massa molecular

O coeficiente de partição (LogP) do 5CN06-LSVM indica a natureza bastante hidrofóbica deste composto. Visto que o LogP de uma determinada espécie química é definido como sendo a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa. Esta propriedade indicativa de hidrofobicidade está claramente correlacionada com a atividade biológica dos compostos (TAVARES, 2004).

Em um estudo *in vitro* em que foram analisadas 20 leveduras e 15 fungos filamentosos obtidos de pacientes imunossuprimidos, incluindo espécies de *Candida*, dermatófitos e fungos emergentes, pelo método de microdiluição, os resultados mostraram que as moléculas de

5CN06-LSVM apresentaram ação antifúngica ao *Fusarium solani*, espécies de *Candida* e *Trichophyton*. Mostraram ainda atividade fungistática e fungicida contra isolados de *Candida* (ARAÚJO, 2010).

A atividade fungicida deste composto é uma importante característica, visto que nenhum dos compostos da classe dos azóis (itraconazol, cetoconazol e fluconazol), apresenta essa ação, o que dificulta o desenvolvimento do fenômeno de resistência fúngica a este novo composto (ARAÚJO, 2010).

Há uma crescente demanda por novos fármacos com atividade antifúngica, em virtude da crescente resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado farmacêutico, sendo assim os derivados tiofênicos que apresentam propriedades farmacológicas importantes são um caminho para o tratamento eficiente das infecções fúngicas. Além disso, a efetividade do uso de sistemas multiparticulados como vetores promotores de absorção, com intuito de melhorar a biodisponibilidade e proteger o fármaco de condições adversas do meio, parece ser de óbvia relevância, tornando este trabalho um caminho promissor ao utilizar técnicas apropriadas para se obter grânulos contendo o 5CN06-LSVM, contribuindo assim na ampliação dos conhecimentos da técnica de obtenção, bem como para sua futura aplicabilidade no mercado farmacêutico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar grânulos de alginato de cálcio (GAC) contendo um derivado tiofênico, o 2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4Hciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (5CN06-LSVM) visando um sistema multiparticulado para liberação de fármaco de baixa solubilidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Produzir GAC contendo 5CN06-LSVM através da técnica de gelificação ionotrópica;

4.2.2 Desenvolver e validar uma metodologia analítica de quantificação do 5CN06-LSVM

4.2.3 Avaliar e caracterizar as partículas obtidas quanto a seus aspectos macroscópicos, morfológicos, rendimento, taxa de encapsulação, capacidade de intumescimento e comportamento térmico;

4.2.4 Avaliar o efeito dos constituintes sobre a qualidade das partículas obtidas.

PARTE I**Validação da metodologia analítica de
quantificação do 5CN06-LSVM**

1 MÉTODOS

1.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico utilizando um espectrofotômetro UV MINI - 1240 (Shimadzu, São Paulo, SP, Brasil) foi empregado para a determinação e quantificação do 5CN06-LSVM no ensaio de taxa de carregamento e liberação *in vitro* dos sistemas desenvolvidos. A validação foi realizada conforme a RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, com o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a determinação quantitativa do fármaco e assegurar a confiabilidade dos resultados (Brasil, 2003).

A fim de definir as condições ideais para análise em espectrofotômetro definiu-se inicialmente o comprimento de onda de detecção, seguido da validação do método propriamente dita.

1.1.1 Determinação do comprimento de onda de detecção

Com o intuito de se obter o melhor comprimento de onda de detecção para análise, foi realizada a varredura do fármaco, na concentração de 10µg/mL de 5CN06-LSVM, entre os comprimentos de onda de 200 a 800nm, utilizando como solvente/diluyente o clorofórmio (Fmaia, São Paulo, SP, Brasil).

1.1.2 Validação do método analítico

Na RE N° 899, de 29 de maio de 2003, a ANVISA determina os testes a serem realizados para a validação de um método analítico de acordo com categorias de análise (BRASIL, 2003)

O método analítico desenvolvido neste trabalho se enquadra na categoria I e III, visto que será utilizado para identificar e quantificar o 5CN06-LSVM no teste de liberação *in vitro* dos grânulos desenvolvidos. Assim, foram realizados os seguintes experimentos para validação do método: seletividade (especificidade), linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária), robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

1.1.2.1 Seletividade e especificidade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação das bandas máximas de absorção obtidas da análise de uma amostra dos grânulos sem o fármaco, comparadas com as bandas do sistema contendo o fármaco.

1.1.2.2 Linearidade

Para a construção das curvas analíticas foram preparadas três soluções estoque de 5CN06-LSVM em clorofórmio concentração de 80µg/mL, a partir das quais, por meio de diluições seriadas em acetonitrila (Fmaia, São Paulo, SP, Brasil), foram obtidas 11 concentrações teóricas (3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16 µg/mL). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente para determinação da equação da reta (método dos mínimos quadrados) e dos coeficientes de correlação (r) e (r²). A curva de calibração foi construída plotando-se os valores referentes às áreas dos picos no eixo das ordenadas e as respectivas concentrações do analito no eixo das abscissas.

1.1.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por intermédio de análises em três diferentes níveis de concentração (5, 10, 15 µg/ mL), em três repetições e expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. A exatidão foi expressa conforme a Equação 1 abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (1)$$

1.1.2.4 Precisão

A precisão foi determinada por análises em seis repetições na concentração do ponto médio da curva (10 µg/ mL). A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas), sendo expressas como CV%.

1.1.2.5 Robustez

Neste parâmetro foram realizadas a análise de 3 repetições da solução do 5CN06-LSVM em clorofórmio e em dois diferentes fabricantes de acetonitrila, na concentração do ponto médio da curva (10 µg/ mL). A fim de verificar a influência de pequenas variações ocasionadas pela marca do solvente acetonitrila adquirido por diferentes fornecedores. Os fabricantes de acetonitrila utilizados foram Fmaia e J.T. Baker (México).

1.1.2.6 Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado por meio da divisão entre o desvio padrão (DP) dos coeficientes lineares das três curvas de calibração do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares (IC) das curvas multiplicados por 3,0 conforme a Equação 2 abaixo:

$$LD = 3x \frac{DP}{IC} \quad (2)$$

1.1.2.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi calculado da mesma forma que o limite de detecção, porém, multiplicando-se os valores por 10,0, conforme equação abaixo:

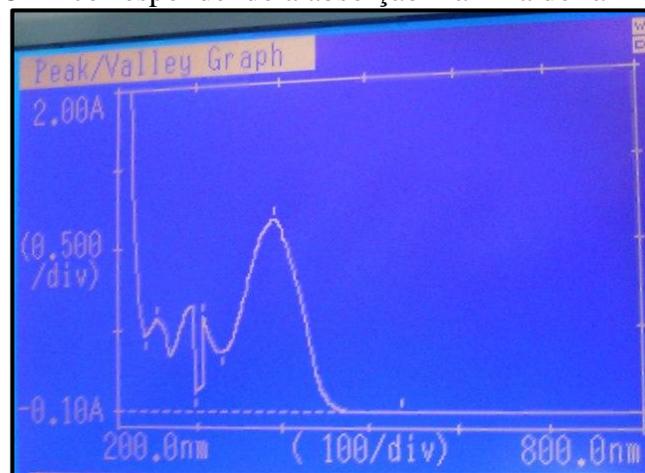
$$LQ = 10x \frac{DP}{IC} \quad (3)$$

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DE DETECÇÃO

Através da varredura espectrofotométrica na faixa de 200 a 800nm, utilizando uma solução de 5CN06-LSVM 10 μ g/mL, determinou-se o comprimento de onda $\lambda = 393$ nm, onde o fármaco apresentou pico de absorção máxima. Este valor de λ foi considerado adequado para detecção do fármaco, utilizando um espectrofotômetro com detector UV-VIS no desenvolvimento e validação do método analítico, conforme Figura 7.

Figura 7- Espectro de varredura do 5CN06-LSVM observado o comprimento de onda de 393nm correspondendo a absorção máxima do fármaco.



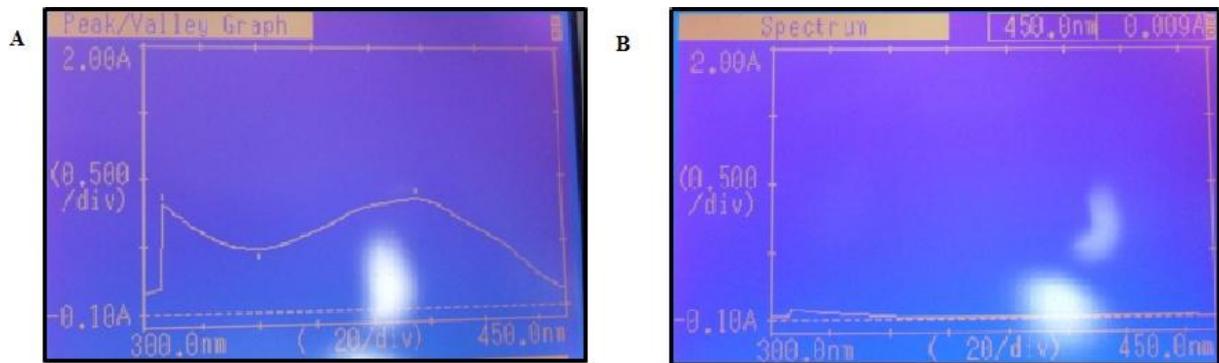
2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Conforme descrito anteriormente, o método desenvolvido nesse trabalho para a quantificação do 5CN06-LSVM foi validado segundo os parâmetros seletividade (especificidade), linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária), robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

2.2.1 Especificidade (seletividade)

A metodologia desenvolvida demonstrou ser seletiva, uma vez que no comprimento de onda encontrado para o fármaco (393nm) não foram evidenciados picos interferentes relacionados aos componentes da formulação. Este fato é evidenciado ao comparar os espectros de varreduras das amostras dos grânulos contendo o fármaco com os espectros das amostras dos grânulos sem o fármaco, conforme demonstrado na Figura 8.

Figura 8 - Espectro de varredura das amostras de grânulos contendo 5CN06-LSVM (A) e sem o fármaco (B) no UV MINI - 1240 (Shimadzu).



2.2.2 Linearidade

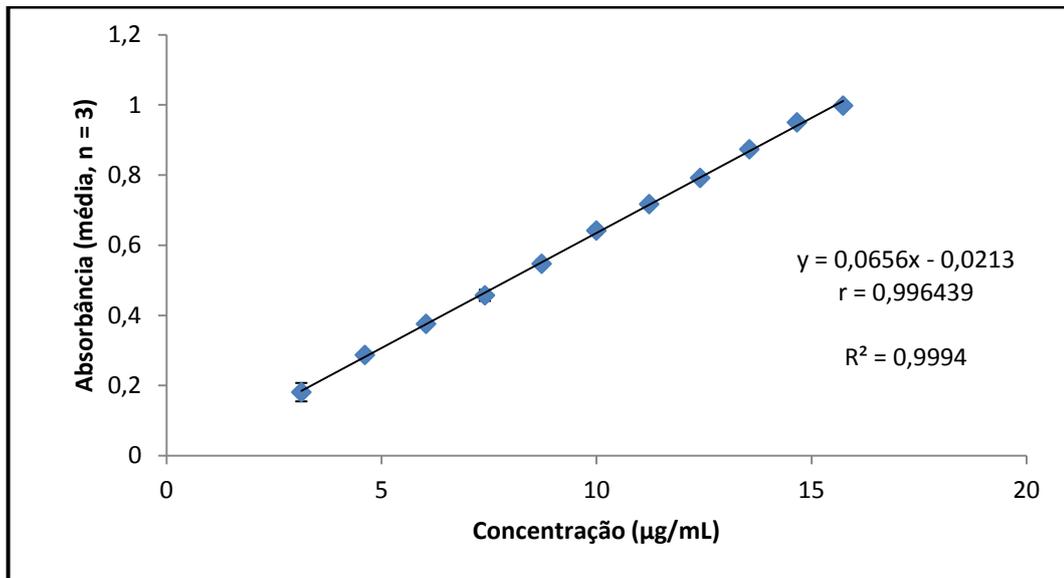
Os resultados obtidos das corridas das 11 diferentes concentrações do fármaco, em triplicata são mostrados na Tabela 2 e a curva obtida, assim como o coeficiente de correlação linear e a equação da reta são apresentados na Figura 9.

Tabela 2. Dados utilizados na construção da curva de calibração do 5CN06-LSVM

Concentração (µg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	DesvPad	CV%
3	0,200	0,151	0,192	0,181	0,0263	14,52313749
5	0,285	0,285	0,291	0,287	0,0035	1,207004047
6	0,375	0,372	0,380	0,376	0,0040	1,075807955
7	0,463	0,439	0,469	0,457	0,0159	3,473634106
9	0,548	0,536	0,557	0,547	0,0105	1,926079297
10	0,630	0,653	0,642	0,642	0,0115	1,792772356
11	0,710	0,717	0,724	0,717	0,0070	0,976290098
12	0,790	0,789	0,796	0,792	0,0038	0,478223861
14	0,865	0,885	0,870	0,873	0,0104	1,191793511
15	0,940	0,959	0,951	0,950	0,0095	1,004146528
16	1,008	0,995	0,990	0,998	0,0093	0,931330429

Abs = absorvância; DesvPad= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação

Figura 9- Curva de calibração do 5CN06-LSVM (média, n=3).



O método apresentou-se linear em uma faixa de 3 a 16µg/mL. A curva analítica ($y = 0,0656x - 0,0213$) obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,996439, estando em concordância com os critérios estabelecidos pela RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, que preconiza valor mínimo de $r = 0,99$ (Brasil, 2003). Os coeficientes de determinação (r^2) e o coeficiente de correlação (r) demonstram que nos intervalos de concentração estudados os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração dos fármacos na amostra e com uma excelente correlação devido ao r ser maior que 0,99.

2.2.3 Exatidão

O resultado das análises em triplicata das 3 concentrações (baixa, média e alta) do 5CN06-LSVM, conforme pode ser observado na Tabela 3, mostra que o método em análise é considerado exato, visto que se encontram dentro do limite estabelecido pela RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, que é de 98 a 102% (BRASIL, 2003).

Tabela 3. Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método

Parâmetro	Concentração		Exatidão (%)
	Nominal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Obtida (média \pm DP; n=3)	
Exatidão	5,00	4,905 \pm 0,009	98,10
	10,00	10,134 \pm 0,175	101,34
	15,00	14,834 \pm 0,145	98,89

2.2.4 Precisão

A Tabela 4 expressa os valores obtidos durante a determinação da precisão do método. Foram determinadas a repetibilidade e a precisão intermediária (intra-corrída). Conforme a legislação vigente no Brasil (Brasil, 2003), a repetibilidade do método foi avaliada a partir da leitura em sextuplicata do ponto médio da curva de calibração (10 $\mu\text{g/ mL}$). Já para a precisão intermediária, as amostras foram analisadas em dias distintos e por analistas diferentes. O parâmetro legal indica que o coeficiente de variação (% CV) deve ser inferior a 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 4. Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Analista	Dia	Concentração		Precisão (CV%)	Exatidão (%)
		nominal ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	obtida (média \pm DP; n=6)		
Analista 1	Dia 1	10	9,897 \pm 0,246	2,49	98,97
	Dia 2	10	9,829 \pm 0,108	1,1	98,29

Analista 2	Dia 1	10	9,806 ± 0,197	2,01	98,06
	Dia 2	10	9,829 ± 0,059	0,6	98,29

2.2.5 Robustez

Ao observar os resultados apresentados na Tabela 5, constata-se que o método apresenta robustez intrínseca, uma vez que ao analisar amostras na concentração de 10µg/mL em triplicata e em diferentes condições (tipo de solvente e diferentes fabricantes do solvente), as respostas mantiveram-se dentro das especificações exigidas pela legislação.

Tabela 5. Resultados do ensaio para verificação da robustez do método

Modificações	Solvente acetonitrila (F1)	Solvente acetonitrila (F2)	Solvente (clorofórmio)
Concentração nominal (µg.mL ⁻¹)	10,00	10,144	10,00
Concentração obtida (média ± DP; n=3)	9,951 ± 0,177	10,144 ± 0,153	10,225 ± 0,078
Precisão (%)	1,78	1,51	0,77
Exatidão (%)	99,51	101,44	102,25

F1= fabricante 1 (FMaia); F2= fabricante 2 (J.T. Baker)

Os resultados demonstram que a precisão esteve menor do que 5% que é o parâmetro aceitável pela legislação vigente e os resultados da exatidão mostraram valores próximo a 100 %.

2.2.6 Limite de detecção e quantificação

Os resultados encontrados par limite de detecção, que representa a menor quantidade que o método é capaz de identificar foi de 0,24µg mL⁻¹, e para limite de quantificação, que é a menor quantidade que o método pode quantificar na amostra foi de 0,81µg mL⁻¹.

3 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido se mostrou seletivo, específico, preciso, exato e robusto, podendo-se concluir que ele é adequado para quantificação do 5CN06-LSVM durante os estudos para verificação da taxa de carregamento, bem como o estudo de liberação *in vitro* do fármaco a partir dos sistemas poliméricos desenvolvidos.

PARTE II**Desenvolvimento e caracterização dos grânulos
de alginato de cálcio contendo o fármaco
5CN06-LSVM**

1 MÉTODOS

1.1 PREPARAÇÃO DOS GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO

1.1.1 Preparação da solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 10%_(p/v).

Inicialmente, pesou-se 10g de cloreto de cálcio anidro P.A (Dinâmica, Diadema , SP, Brasil), transferiu-se para um grau de porcelana, onde se realizou a trituração do pó. Em seguida, o cloreto de cálcio foi solubilizado com água purificada (Osmose Reversa OS10LX, GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil), transferido para uma balão volumétrico de 100mL e completado o volume com água purificada.

1.1.2 Preparação da solução de alginato de sódio 3%_(p/v).

Inicialmente, pesou-se 3g de alginato de sódio PA (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil, que foi solubilizado com água purificada, até o volume de 100 mL, sob aquecimento à 70°C em banho-maria (Solab SL 155/10, Piracicaba, SP, Brasil) com posterior agitação mecânica (FISATON 713 D, São Paulo, SP, Brasil) por 5 min a 2000rpm.

1.1.3 Preparação da emulsão de 5CN06-LSVM à 0,1%_(p/v).

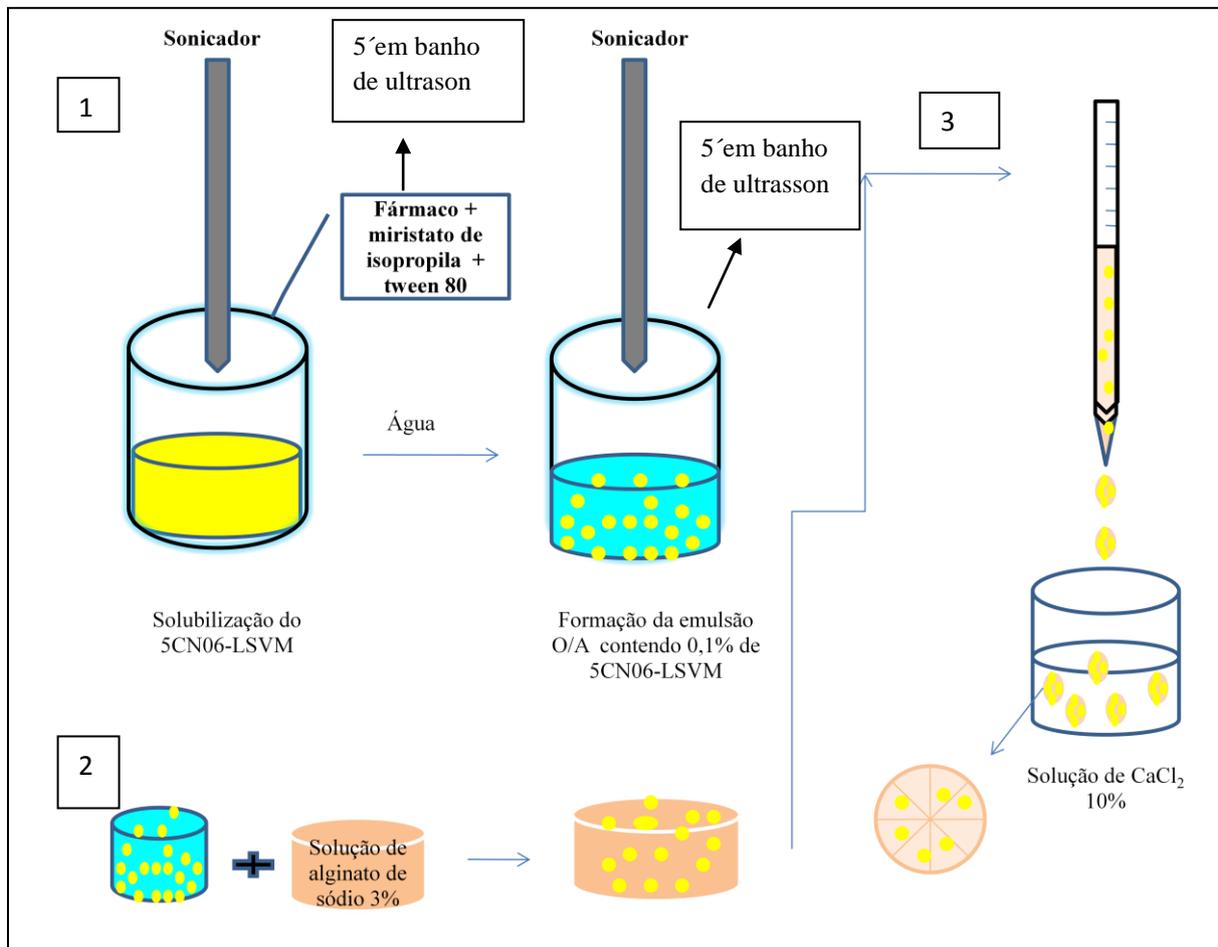
Pesou-se 0,02g de 5CN06-LSVM, 6g de miristato de isopropila (Via Farma, São Paulo, SP, Brasil), 3g de polissorbato 80 (Tween 80[®], Via Farma, São Paulo, SP, Brasil) e 10,98mL de água purificada. Inicialmente, misturou-se o polissorbato 80, o miristato de isopropila e o fármaco (5CN06-LSVM) em um béquer. Essa mistura foi submetida a três ciclos de 1,0min no sonicador (Unique modelo Desruptor, Indaiatuba, SP, Brasil) a uma potência ultrassônica de 250 Watts e banho de ultrassom (Unique USC 2800 A, Indaiatuba, SP, Brasil) por 5,0min. Após solubilização do fármaco, a água foi adicionada lentamente. A cada parte de água adicionada, a mistura foi submetida a um ciclo de 1,0min no sonicador e 5,0 min no banho de ultrassom, até completa formação da emulsão O/A.

1.1.4 Preparação dos grânulos de alginato de cálcio contendo o 5CN06-LSVM

Os grânulos foram preparados pelo método de gelificação ionotrópica da emulsão (Figura 10). A solução de alginato 3% e da emulsão de 5CN06-LSVM 0,1% foram misturadas conforme quantidades estabelecidas na Tabela 6, e foram gotejadas com o auxílio de uma bureta de vidro cuja ponta estava acoplada a uma ponteira de micropipeta de 10 μ L, sobre a

solução de CaCl_2 10% mantida sob agitação magnética (IKA[®] RH Basic 1, Campinas, SP, Brasil). A distância entre a ponteira da bureta e a superfície da solução de CaCl_2 foi de 7,0cm.

Figura 10 - Etapas de obtenção de grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM



1: preparação da emulsão O/A; 2: mistura e homogeneização da solução de alginato de sódio a emulsão contendo o fármaco; 3: gotejamento da emulsão resultante da etapa 2 na solução de cloreto de cálcio.

Os grânulos de 5CN06-LSVM foram mantidos na solução de CaCl_2 por 30min, separadas por tamização e lavadas com água. Após a retirada do excesso de água com ajuda do papel de filtro, os grânulos foram transferidos para um papel de filtro seco e colocadas em um dessecador para secagem por cinco dias.

1.2 DESENHO DOS EXPERIMENTOS

Neste estudo foram preparadas cinco formulações diferentes para obtenção dos grânulos. Variando-se as quantidades de solução de alginato de sódio 3% (p/v) e da emulsão contendo 5CN06-LSVM 0,1% (p/v), de acordo com a Tabela 6. Nesta avaliação foi mantida constante a concentração de CaCl_2 a 10% (p/v). Cada amostra foi realizada em duplicata.

Tabela 6. Formulações com as diferentes proporções de solução de alginato de sódio 3% e emulsão de 5CN06-LSVM 0,1% em cada amostra.

	Solução de alginato de sódio 3% (mL)	Emulsão de 5CN06-LSVM 0,1% (mL)
A	5	5
B	5	15
C	15	5
D	15	15
E	10	10

1.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO 5CN06-LSVM POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)

A análise morfológica os grânulos de alginato de cálcio carregadas com o 5CN06-LSVM foram realizadas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Hitachi, TM-1000, Krefeld, Alemanha), em aumentos de 100 e 500x. Após posicionamento das fitas adesivas dupla-face de carbono no suporte de aço, as amostras foram previamente preparadas para o processo de metalização através de um procedimento de limpeza padrão, ou seja, imersão da amostra em acetona pura (3 mL). Em seguida a amostra foi disposta no suporte de aço e colocada no metalizador para que a mesma fosse revestida com uma fina camada de ouro, para observação através do MEV.

Os percentuais em massa dos elementos das amostras foram obtidos através da aplicação de raios-X nas superfícies da amostra e a posterior análise dos fluorescentes raios-X emitidos.

1.4 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO

O rendimento foi calculado como sendo a razão entre a massa seca obtida das partículas geradas e a quantidade total de componentes não voláteis utilizados na sua composição (alginato de sódio, 5CN06-LSVM, miristato de isopropila e polissorbato 80) e foi expresso em termos percentuais.

1.5 TAXA DE ENCAPSULAÇÃO

Para quantificação do teor de 5CN06-LSVM nos grânulos, uma massa de aproximadamente 0,25g de grânulos contendo o fármaco foi desintegrada em clorofórmio e

pulverizada em gral para extrair o 5CN06. As amostras foram filtradas com papel de filtro e recolhidas em um balão volumétrico de 10mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. As amostras foram então diluídas para se obter uma concentração teórica de 10µg/mL. Esse procedimento foi realizado com cada amostra separadamente, em triplicata. As soluções foram quantificadas em um espectrofotômetro UV MINI - 1240 (Shimadzu).

A taxa de encapsulação do fármaco foi expressa como resultado percentual entre a concentração obtida de 5CN06-LSVM em relação à concentração teórica de 10µg/mL.

1.6 ESTUDO DE INTUMESCIMENTO E EROSÃO

A capacidade de intumescimento e a erosão dos grânulos de alginato contendo o fármaco foi avaliada pelo percentual de variação de peso (%VP) dos grânulos quando estes eram colocados em solução (meio 1 e meio 2). Foram pesados cuidadosamente 6 grânulos secos e colocados em 2 meios diferentes. O meio 1 foi uma solução de simulação do suco gástrico (SG) sem pepsina e o meio 2 uma solução tampão fosfato pH 7,4 (TF). A solução de simulação do SG foi preparada por dissolução de 2,0g de cloreto de sódio em 7,0mL de HCl concentrado (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) em 1,0L de água purificada. Em intervalos de 30, 60, 90, 120 e 180 minutos, os grânulos foram retirados, sutilmente enxugados em papel toalha e pesados. A variação do peso das amostras foi calculada pela Equação 4 abaixo.

$$\% \text{ variação de peso} = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100 \quad (4)$$

Pf = Peso Final

Pi = Peso inicial

1.7 ANÁLISE TÉRMICA [CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TG)]

As curvas DSC foram obtidas através de um calorímetro exploratório diferencial modelo DSC Q20 acoplado a um sistema de resfriamento RCS 90 (TA Instruments, New Castle, DE, Estados Unidos) em atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50mL/min; razão de aquecimento 10°C/min até 600°C. As amostras, em torno de 2,0 mg, foram colocadas em células de alumínio hermeticamente fechada, calibrada com padrões de índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$) e zinco ($T_{\text{fusão}} = 419,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$) metálicos com pureza de 99,99%. O fluxo de calor e a entalpia foram calibrados empregando-se o ΔH fusão do índio metálico ($28,58 \pm 0,3\text{J/g}$) nas mesmas condições das amostras.

As curvas TG do fármaco de dos grânulos foram obtidas através de um analizador térmico simultâneo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, DE, Estados Unidos), sob fluxo de nitrogênio de 50mL/min e razão de aquecimento de 10°C/min até 600°C em cadinho de alumina e massa de amostra em torno de 5mg. Antes dos ensaios foi verificado a calibração do equipamento empregando uma amostra padrão de oxalato de cálcio monoidratado sob as mesmas condições experimentais.

1.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos das amostras nos ensaios de rendimento, taxa de encapsulação e estudo de intumescimento e erosão foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. Os resultados foram considerados significantes quando $P < 0,05$.

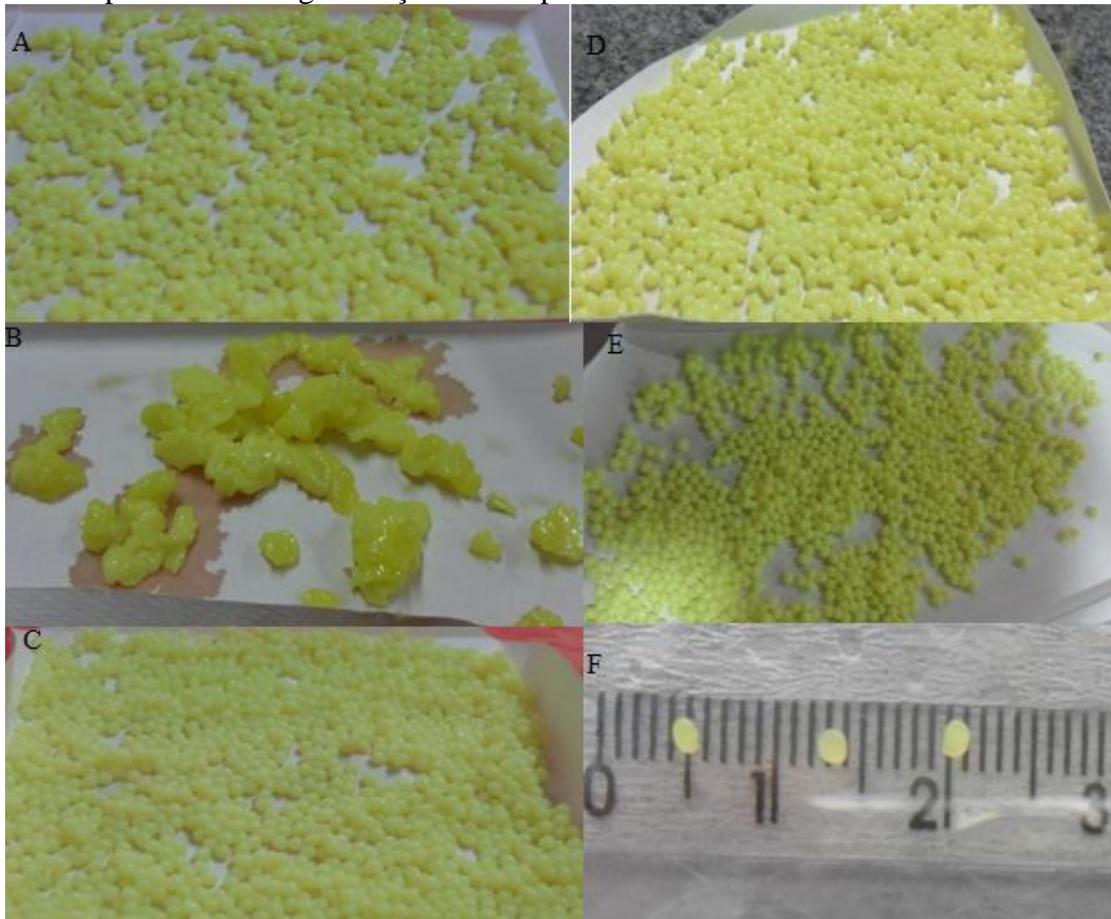
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 PREPARAÇÃO DO GRÂNULO CONTENDO 5CN06-LSVM

Os grânulos de alginato de cálcio, com exceção para a amostra B, foram possíveis de serem obtidos por gelificação ionotrópica a partir de um sistema emulsionado O/A que continha o fármaco de baixa solubilidade em água na fase interna. Observa-se que a concentração de polímero utilizada, a concentração de CaCl_2 e o tempo de contato com esta solução gelificante foram suficientes para se obter partículas macroscopicamente homogêneas, amareladas devido a cor do fármaco, aproximadamente esféricas e sem agregados.

A amostra B, apresentou-se com coloração amarelada, totalmente disforme, semelhante a uma massa aglomerada, sendo uma exceção às demais, e por isso foi desconsiderada do estudo. Podemos ponderar que a amostra B apresentou uma intensa aglomeração, com perda da forma dos grânulos, possivelmente, devido a pequena proporção da massa polimérica utilizada em relação à massa de emulsão contendo o fármaco (Figura 11).

Figura 11 - Análise macroscópica das diferentes amostras de grânulos contendo 5CN06 obtidos por método de gelificação ionotrópica



A: amostra A; B: amostra B; C: amostra C; D: amostra D; E: amostra E; F= Grânulos contendo 5CN06.

Os grânulos obtidos por gelificação ionotrópica agem como sistemas transportadores de fármacos e apresentam vantagens que justificam sua aplicação, dentre elas, a estabilidade física, química e biológica, facilidade de obtenção, boa reprodutibilidade e facilidade na transposição de escala (SILVA et al., 2010). Os sistemas emulsionados com fases aquosas e oleosas podem ser aplicados a uma variedade de substâncias bioativas, podendo, ao ser incorporados em uma solução polimérica, formar novos sistemas transportadores visando, sobretudo, melhorar sua atividade terapêutica e condicionar o local e a velocidade de liberação do fármaco (SINHA et al., 2004).

2.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)

A análise através do MEV para as amostras A, C, D e E, conforme Figura 12, analisadas em aumento de 100x (à esquerda) e 500x (à direita), demonstrou grânulos similares, ovais,

com superfície lisa, porém com fissuras. As amostras apresentaram pontos esbranquiçados em sua superfície, provavelmente pela presença de resquícios de íons cloro e cálcio que pode não ter sido eliminados totalmente com a lavagem dos grânulos após sua formação. A análise de EDX, Tabela 7, mostra o percentual em massa dos elementos presentes na superfície das amostras analisadas.

Figura 12- Análise morfológica por MEV dos grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM, em aumento 100x (à esquerda) e 500x (à direita).

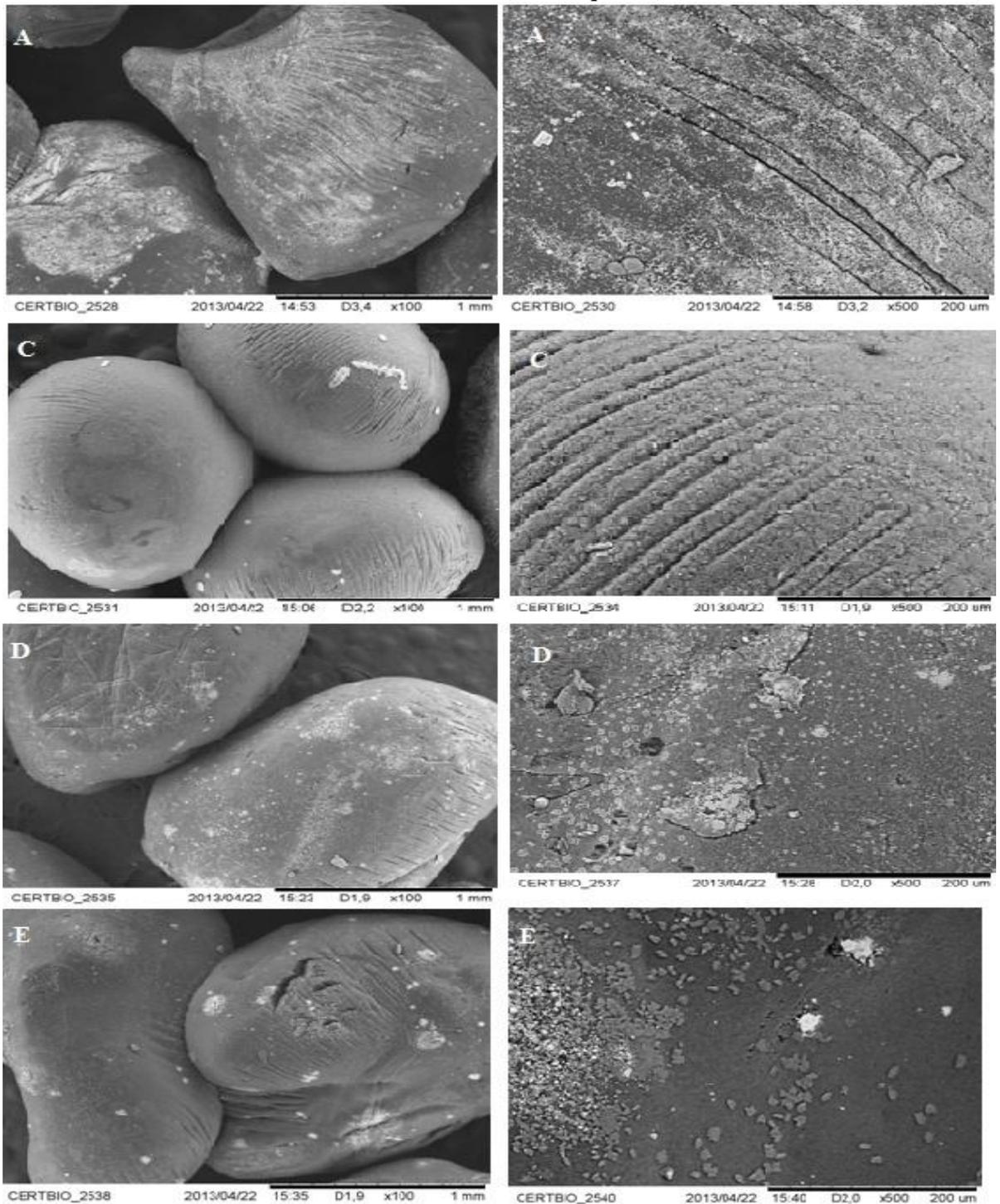


Tabela 7. Percentual em massa dos elementos encontrados na superfície das amostras, por EDX

Amostras	% C	% O	% Ca	% Cl	% Na
A	49,6	28,7	14,1	7,5	0
C	60,5	25,4	5,5	8,6	0
D	55,1	21,8	8,5	12,9	1,7%
E	63,9	26,2	5,5	4,4	0

C: carbono; O: oxigênio; Ca: Cálcio; Cl: cloro; Na: sódio

Observa-se que apenas a amostra D apresentou um pequeno percentual de sódio em sua superfície demonstrando que nem todos os íons presentes no alginato de sódio foram substituídos pelos íons cálcio, visto que essa amostra apresentava maior quantidade de alginato de sódio, e a solução 10% de cloreto de cálcio não foi suficiente para realizar completamente a troca de íons.

2.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO

A maioria das amostras apresentou rendimento acima de 80%. A perda de massa que ocorre durante o processo de produção, principalmente devido ao resto de mistura de alginato e emulsão que fica retida na bureta causou uma diminuição no rendimento.

A análise de variância (ANOVA) revelou diferença estatística significativa entre os rendimentos das diferentes amostras de grânulos, com valor de $p=0,00125$. O teste de Tukey apresentou que os rendimentos para os pares de formulações A e E bem como C e D são estatisticamente iguais. As formulações C e D, apesar das diferentes razões (polímero:emulsão), a quantidade de polímero é a mesma, o que sugere que este componente quando alterado pode exercer maior influência no rendimento dos sistemas. Este fato pode ter ocorrido devido a uma retenção de umidade pelo polímero hidrofílico utilizado, visto que nestas amostras a quantidade de polímero era maior que nas demais. O tempo de secagem, igual para todas as amostras pode ter sido insuficiente para as amostras C e D, provavelmente por essa maior retenção de umidade. Os rendimentos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Determinação da massa esperada, massa obtida e rendimento.

Amostras	Rendimento (%) ($n=2 \pm DP$)
A	$79,50 \pm 0,03^a$
C	$108 \pm 0,014^b$
D	$99,50 \pm 0,035^b$
E	$84,50 \pm 0,021^a$

$p < 0,05$ – ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si.

2.4 TAXA DE ENCAPSULAÇÃO DOS GRÂNULOS CONTENDO 5CN06-LSVM

A quantificação do teor de 5CN06-LSVM nos grânulos foi realizada empregando-se o método validado para quantificação do fármaco por espectrofotometria, descrito anteriormente. A percentagem de fármaco presente nas amostras analisadas é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Determinação da taxa de encapsulação dos grânulos contendo o 5CN06-LSVM

Amostras	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$) Média \pm dp (n=3)	Teor de 5CN06-LSVM nos grânulos (%)
A	10	5,44 \pm 0,76	54,42 ^a
C	10	5,73 \pm 0,10	57,26 ^a
D	10	5,81 \pm 0,09	58,07 ^a
E	10	6,57 \pm 0,04	65,7 ^b

p<0,05 – ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si.

A quantidade de fármaco, altamente hidrofóbico, que se conseguiu encapsular nos grânulos durante o processo de gelificação do alginato com íons Ca^{2+} se manteve acima de 50%, valor este considerado satisfatório.

A ANOVA revelou diferença estatística significativa para taxa de encapsulação dos grânulos, com valor de $p=0,03663$. No entanto, foi observado pelo teste de Tukey que apenas a amostra E difere das demais. A amostra E apresenta o dobro da razão solução polimérica:emulsão (1:1) em relação à amostra A; esta condição foi ideal para se obter a melhor taxa de encapsulação. Infere-se que apenas o aumento da razão polímero:emulsão não seria responsável por tal diferença, visto que a amostra D apresenta o triplo desta razão e, mesmo assim, apresentou-se estatisticamente igual a A. O que pode-se inferir é que existe uma concentração ótima na qual o encapsulamento teve maior valor e acima da qual não há mais influência destes fatores para o parâmetro analisado.

Vários estudos utilizando polissacarídeos (alginato de sódio, quitosana e quitina) e um método semelhante ao deste trabalho para se obter partículas de liberação de fármaco, apresentaram variações significativas na taxa de encapsulação do fármaco, sendo encontrados taxa de 4,2% até 96% (YU et al., 2008; SIVADAS et al., 2008).

O estudo de Yu et al. (2008), obteve partículas com dois diferentes fármacos de baixa massa molecular e baixa solubilidade, que apresentaram taxa de encapsulação variando de 4,5 a 11,2%, demonstrando que a massa molecular influenciava na baixa taxa de encapsulação, e

que o fármaco com menor solubilidade em água apresentava menor capacidade de ser incorporado ao sistema.

Queiroz (2011), apresentou em seu estudo uma variação de 69,4 a 81,18% na taxa de encapsulação dos grânulos obtidos com sete diferentes fármacos. Essa diferença estava relacionada a lipofilicidade e solubilidade em água dos compostos, sugerindo uma influencia direta da lipofilicidade quando o coeficiente de partição ($\log P$) do fármaco era maior que 1; e influenciado pela solubilidade em água quando o $\log P$ era menor que 1. Compreendeu-se ainda em seu estudo, que a investigação de grandezas como solubilidade e $\log P$ dos compostos são importantes, pois podem contribuir para uma melhor compreensão do comportamento dos fármacos em sistemas binários óleo/água.

O 5CN06-LSVM apresenta um $\log P$ de 5,98, o que pode ter influenciado de forma positiva em sua encapsulação.

Jay & Saltzman (2009), obtiveram partículas de alginato com diferentes íons reticulantes (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+}) e observaram que a taxa de encapsulação das partículas era influenciada pelo tipo de íon utilizado. A taxa encontrada para as partículas formada a partir da reação com íons Ca^{2+} foi de 80 %.

Alguns estudos demonstram que a concentração de CaCl_2 influencia na taxa de encapsulação do fármaco, porém há contradições, visto que em Takka, Ocak & Acarturk (1998), o aumento na concentração de CaCl_2 ocasionou um aumento na taxa, enquanto que no estudo de Jay & Saltzman (2009), a concentração não influenciou na taxa de encapsulação.

Segundo Ghosal & Ray (2011), o tempo de contato com a solução de cloreto de cálcio após a formação dos grânulos é um parâmetro importante na avaliação da taxa de encapsulação. Ele relata em seu estudo uma eficiência na encapsulação acima de 78% quando o tempo de contato foi de 30min.

2.5 TESTE DE INTUMESCIMENTO E EROSÃO

Em sistemas hidrogéis, o grau de intumescimento é reflexo da concentração do agente reticulante (CaCl_2), havendo uma diminuição do grau de intumescimento quando o tempo de contato com a solução reticulante e a concentração nesta solução aumentam até certa razão (WEI et al., 2011).

Ghosal & Ray (2011) relatam que a matriz de grânulos de alginato sofre uma combinação de intumescimento com erosão e rápida destruição. Mas a combinação de outros componentes na matriz como o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) pode diminuir a erosão e destruição da matriz, o que influencia na razão de liberação do fármaco.

Neste estudo, onde utilizamos uma concentração de 10%_(p/v) de solução de CaCl₂ e tempo de reticulação de 30min, a variação de peso dos grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM avaliados em solução de simulação de SG e em TF estão apresentados na Tabela 10. Observa-se que os grânulos quando em SG sofrem rápido, porém pequeno intumescimento causado provavelmente pela penetração da água nos espaços vazios da rede polimérica desidratada, permitindo inferir que estes grânulos possuem baixa capacidade de intumescimento em meio ácido. Após 3h, observou-se que os grânulos tiveram uma pequena redução na %VP, que não foi estatisticamente significativo, com exceção da amostra E (p=0,00028). Entretanto, esta diminuição pode ser justificada pela ação do protonamento que ocorre nos grupos carboxílicos do alginato, o que diminui a repulsão eletrostática entre estes grupos, impedindo a entrada de moléculas de água e favorecendo o encolhimento dos grânulos. O comportamento deles difere totalmente quando em TF pH 7,4, em que observamos que elas intumescem significativamente em 30min. Entretanto, o inchaço é acompanhado de desintegração e perda estrutural das partículas após este período, confirmando o que relata Ghosal & Ray (2011). Desta forma, o comportamento de intumescimento é uma importante propriedade para os sistemas de liberação, pois tem grande influência no comportamento de liberação do fármaco (Wang et al., 2010).

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Huang, Xiao & Lang (2012). Estes autores explicam que o comportamento em pH baixo se deve à formação de ácido algínico insolúvel devido ao protonamento de grupos carboxílicos (-COOH) do alginato, enquanto que em tampão fosfato pH 6,8, os grupos carboxílicos do alginato são ionizados (-COO⁻) aumentando assim as forças de repulsão eletrostática intermolecular. Com isso, mais água pode entrar na estrutura da matriz acarretando maior intumescimento.

A erosão, a difusão e o intumescimento das matrizes são os vários mecanismos pelos quais os sistemas matriciais podem controlar a liberação das substâncias ativas. A predominância de um destes mecanismos depende das propriedades do polímero empregado no sistema, bem como das características do meio onde o sistema se encontra. De modo geral, quando as estruturas matriciais entram em contato com o meio de dissolução (ou fluido biológico) podem manter a sua estrutura mais ou menos constante ao longo de todo o processo de dissolução ou podem sofrer um fenômeno de intumescimento e, posteriormente, de erosão (LOPES, LOBO & COSTA, 2005; EL-GIBALY, 2002).

A análise das diferentes amostras em SG indica que a maior quantidade de polímero e a proporcionalidade 1:1 de polímero e emulsão provavelmente influenciou positivamente no intumescimento da amostra D. Em TF observou-se que a amostra que apresentou maior

quantidade de polímero e maior proporção de polímero: emulsão foi a que teve maior taxa de intumescimento (amostra C).

Tabela 10. Variação de peso dos grânulos após 30 minutos e 3 horas em diferentes meios.

Amostra	%VP SG Média+DP (n=3)*		%VP TF Média+DP(n=3)	
	30´	3h	30´	3h*
A	35,5±0,01 ^a	30,2±0,06 ^a	101,83±0,18 ^a	Desintegração
C	28,9±0,04 ^b	25,4±0,08 ^a	204,67±0,25 ^b	Desintegração
D	42,57±0,02 ^c	41,3±0,02 ^b	125,0±0,17 ^c	Desintegração
E	35,82±0,02 ^a	27,92±0,01 ^a	91±0,06 ^d	Desintegração

%VP= variação de peso; SG = Suco Gástrico; TF = Tampão Fosfato pH 7,4; * os grânulos desintegram completamente em 1h;

p<0,05 – ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si.

2.6 ANÁLISE POR TERMOGRAVIMETRIA (TG) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As temperaturas das análises termogravimétricas dos grânulos deste estudo estão representadas na Tabela 11. Todas as amostras apresentaram uma primeira etapa, com bastante perda de massa, provavelmente ocorreu o fenômeno de dessorção da água, o que pode ser justificada visto que os grânulos são produzidos a partir de uma emulsão O/A. Além disso, o alginato é um polímero hidrofílico que pode aderir moléculas de água em sua superfície, podendo ter ocorrido também início da decomposição do polímero com quebra de ligações glicosídicas do polissacarídeo levando a formação de intermediários. No segundo estágio de decomposição, houve, provavelmente, a degradação do polissacarídeo e degradação dos produtos intermediários, semelhante ao encontrado em Zhang et al. (2011). Nesta etapa, provavelmente, também ocorreu degradação do fármaco e dos outros componentes da formulação dos grânulos, deixando no final um resíduo carbonáceo. Ao comparar a análise termogravimétrica das amostras A, C, D e E com a análise do fármaco puro 5CN06-LSVM, observamos que o fármaco se degradou em etapa única cuja temperatura inicial de degradação foi inferior às temperaturas iniciais na etapa de degradação dos grânulos, sugerindo uma interação entre os componentes que pode ser favorável visto que retarda a degradação do fármaco, indicando uma melhora em sua estabilidade.

As curvas termogravimétricas podem ser observadas nas Figuras 13 a 17.

Tabela 11. Dados da análise termogravimétrica de amostras A, C, D, E e 5CN06-LSVM puro.

Amostras	Eventos	Variação da temperatura ($\Delta T^{\circ}/C$)	Perda de massa % (mg)	Resíduo % (mg)
A	1° etapa	30- 217	61,53(3.47)	17,65(0.9552mg)
	2° etapa	233-399	15,22(1.048)	
C	1° etapa	30-217	60,87(3.426)	20,76(1.191mg)
	2° etapa	225-399	14,87%(1.191)	
D	1° etapa	30-221	66,18(3.330)	11,82(0.6383)
	2° etapa	231-405	16,97(1.107)	
E	1° etapa	32 - 209.93	64,45(3.616)	14,03(0.7859)
	2° etapa	230-394	20,00(1.120)	
5CN06-LSVM	1° etapa	278,13 - 307,13	72,51(3.635)	12,03(0.6030)
	2° etapa	-		

Figura 13- Termogramas TG e DTG (A) e DSC (B) do 5CN06-LSVM

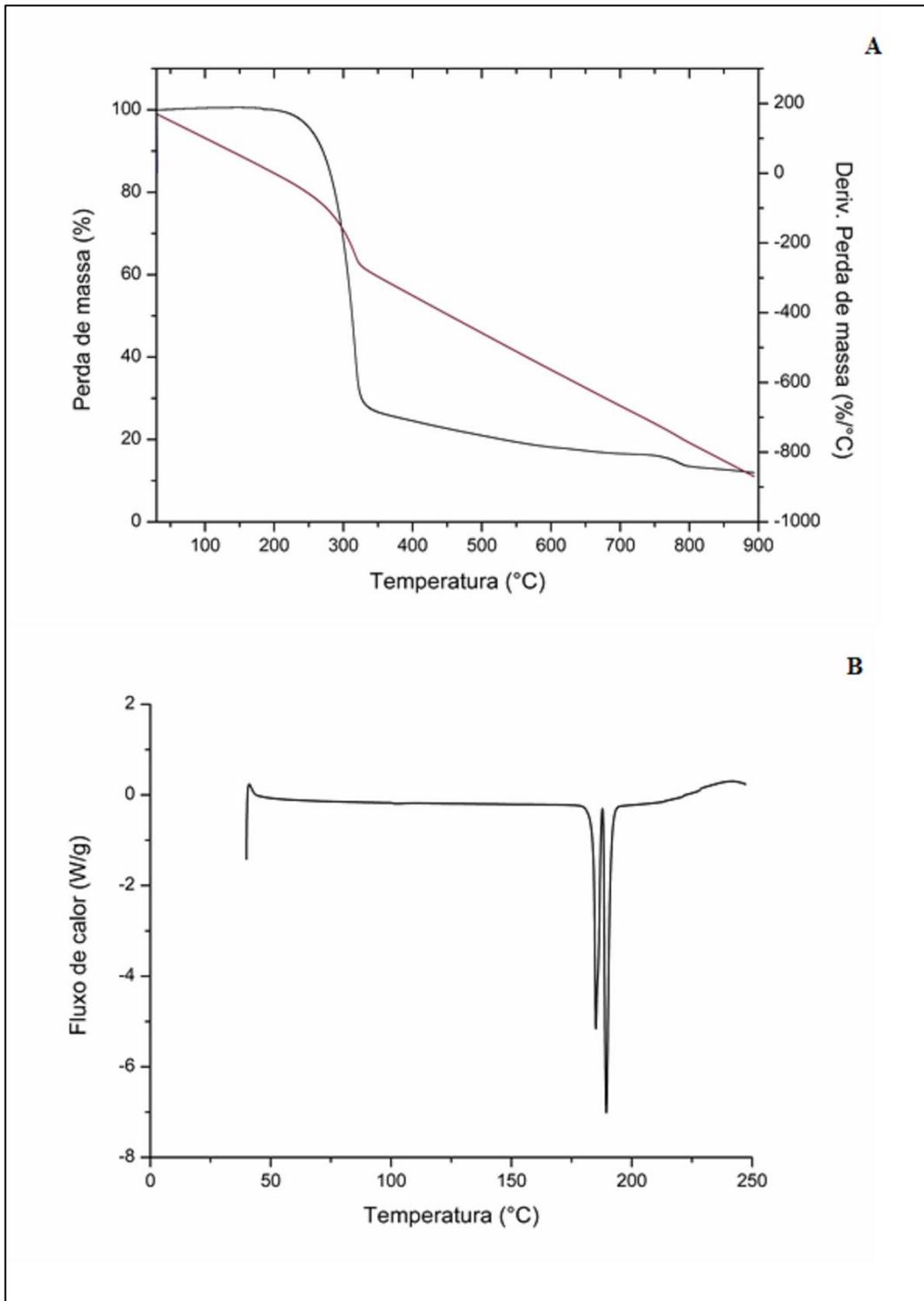


Figura 14- Curvas termogravimétricas (amostra A)

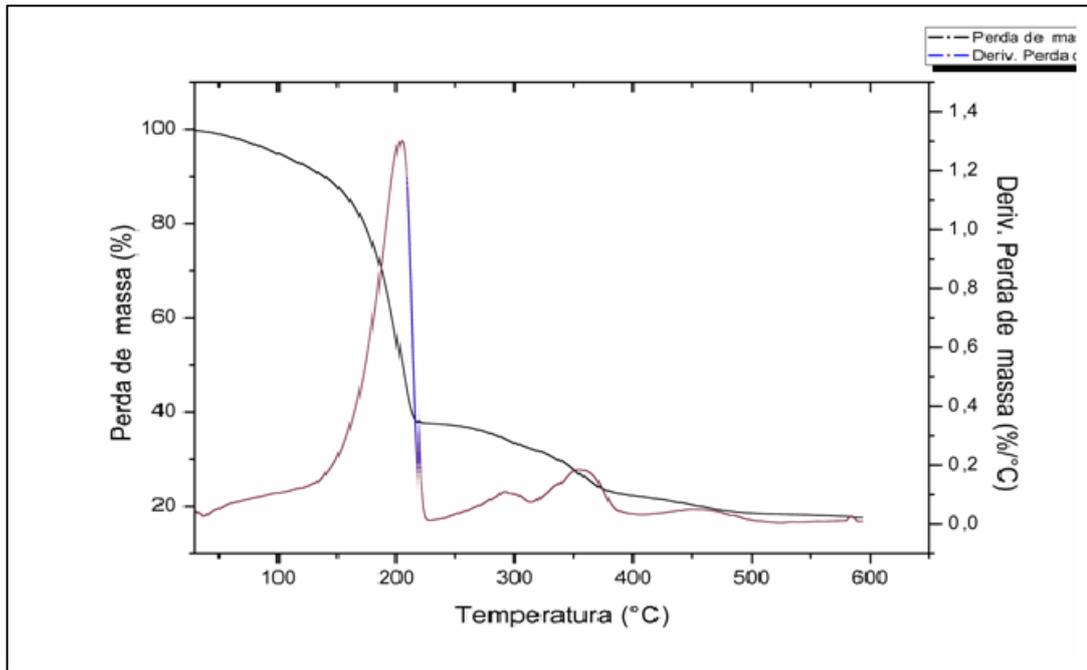


Figura 15- Curvas termogravimétricas (amostra C)

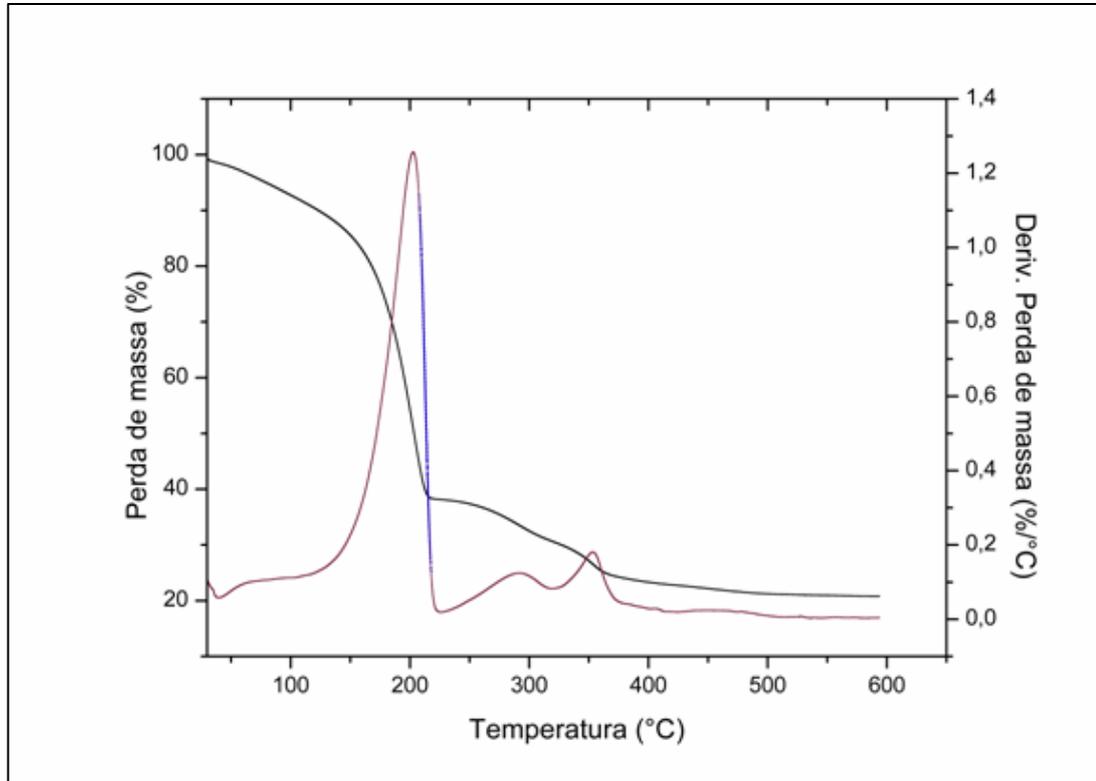


Figura 16- Curvas termogravimétricas (amostra D)

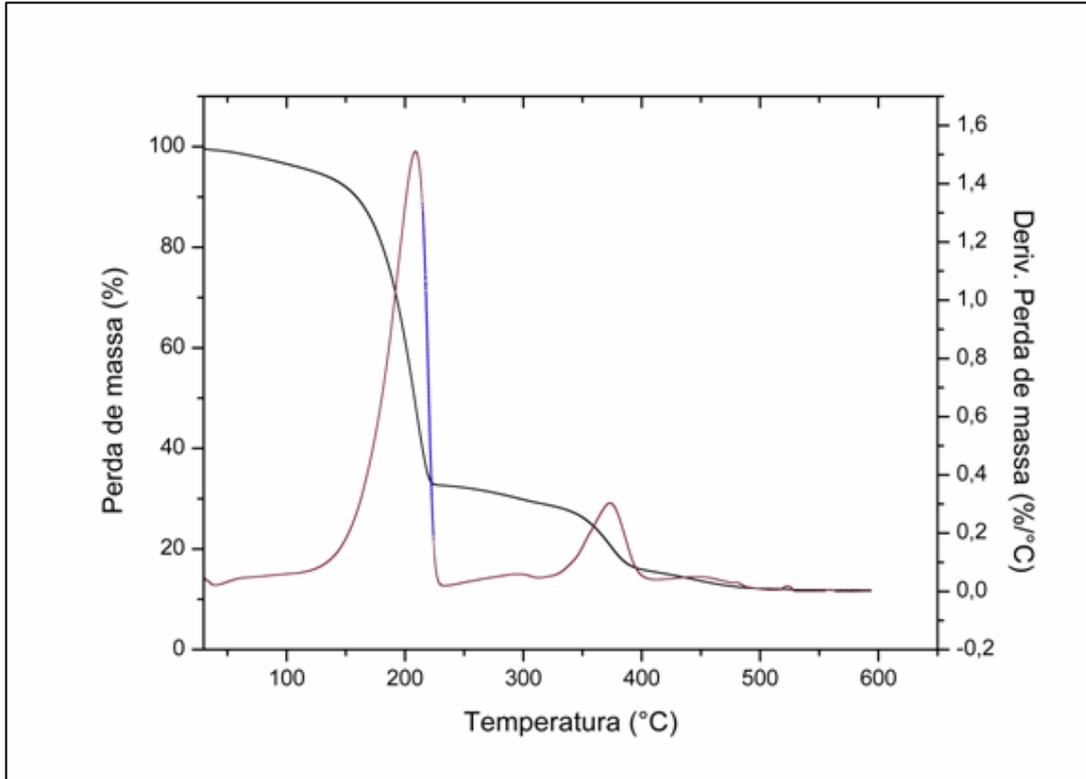
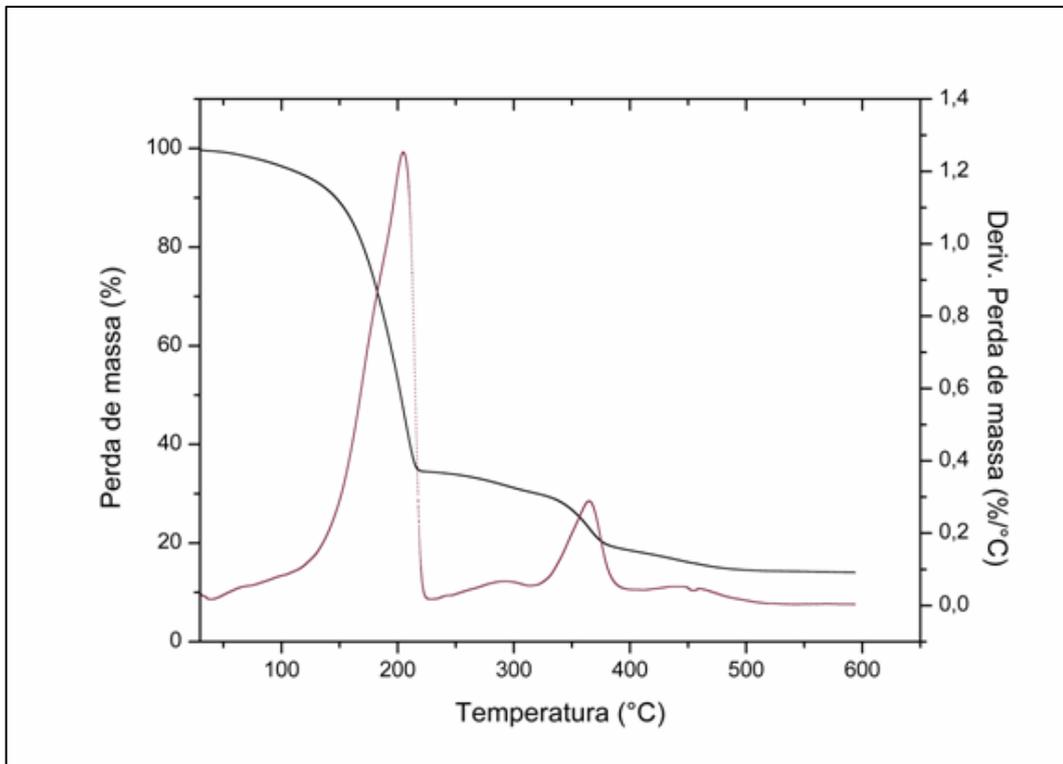


Figura 17- Curvas termogravimétricas (amostra E)



Eventos termodinâmicos tais como o ponto de fusão, podem indicar a identidade e a pureza do fármaco. Normas compendiais têm sido estabelecidas para a fusão ou temperatura de ebulição das substâncias. Estas transições ocorrem em faixas de temperaturas específicas, contribuindo para a identificação e caracterização das substâncias (USP, 2007).

As curvas DSC de todas as amostras (Figuras 18, 19, 20, 21) e do alginato de sódio (Figura 22) apresentam uma mudança na linha de base, em uma temperatura em torno de 152°C que, provavelmente, corresponde a temperatura de transição vítrea (Tg) do polímero. Essa temperatura variou um pouco na amostra E (159°C). Segundo Lopes, Lobo & Costa (2005), a temperatura Tg dos polímeros hidrofílicos é influenciada por vários fatores, dos quais se destaca a presença de líquidos plastificantes. As moléculas desses líquidos são, normalmente, de dimensões reduzidas e ficam retidas entre as cadeias poliméricas, afastando-as uma das outras, o que reduz as forças de atração intermoleculares polímero-polímero, aumentando a mobilidade das cadeias. A Tg varia de polímero para polímero e depende da temperatura e das interações termodinâmicas do sistema polímero-água. Podem ser observados ainda nas curvas de DSC dois picos referentes ao ponto de fusão do fármaco (Figura 13), que a presença de um polimorfo, visto que apresenta dois picos próximos a 186 e 191, estas temperatura sofre um pouco de variação quando observamos as amostras A, C, D e E, visto que pode prevalecer um ou outro polimorfo, ou mesmo alguma interação entre os componentes da formulação que interfere na fusão do fármaco. As curvas mostram ainda outros picos endotérmicos referentes aos outros componentes da formulação.

Figura 18- Curvas DSC dos grânulos de alginato de cálcio contendo fármaco (amostra A)

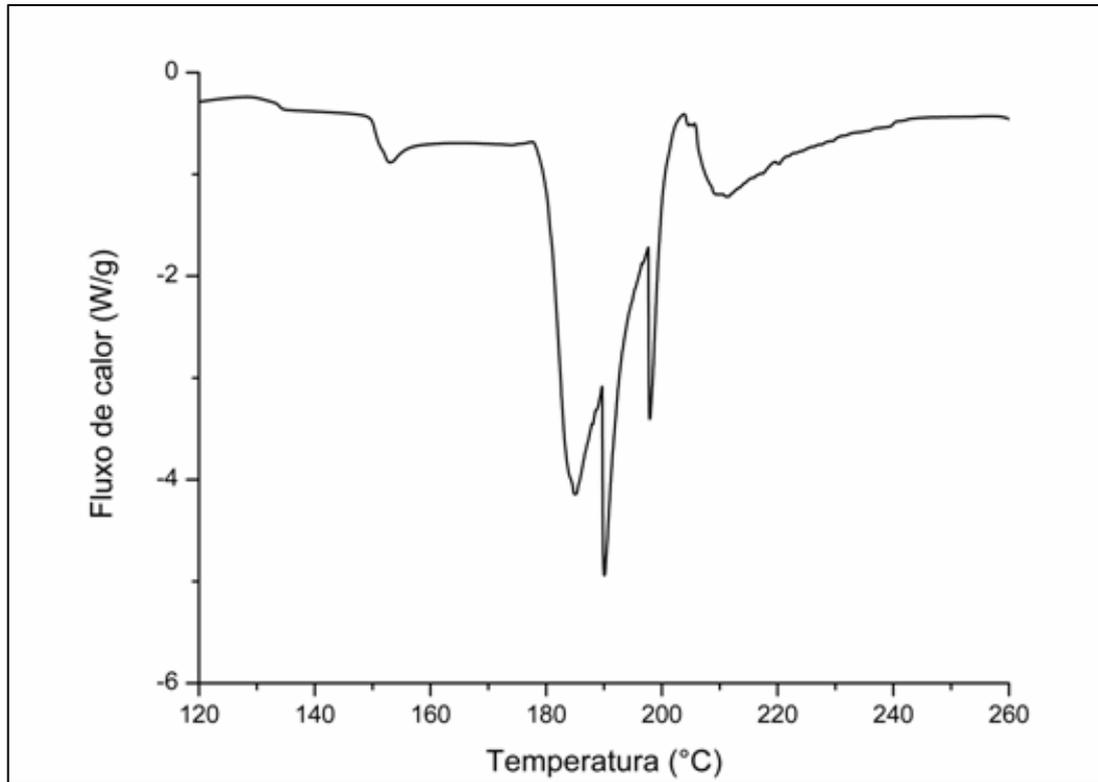


Figura 19- Curvas DSC dos grânulos de alginato de cálcio contendo fármaco (amostra C)

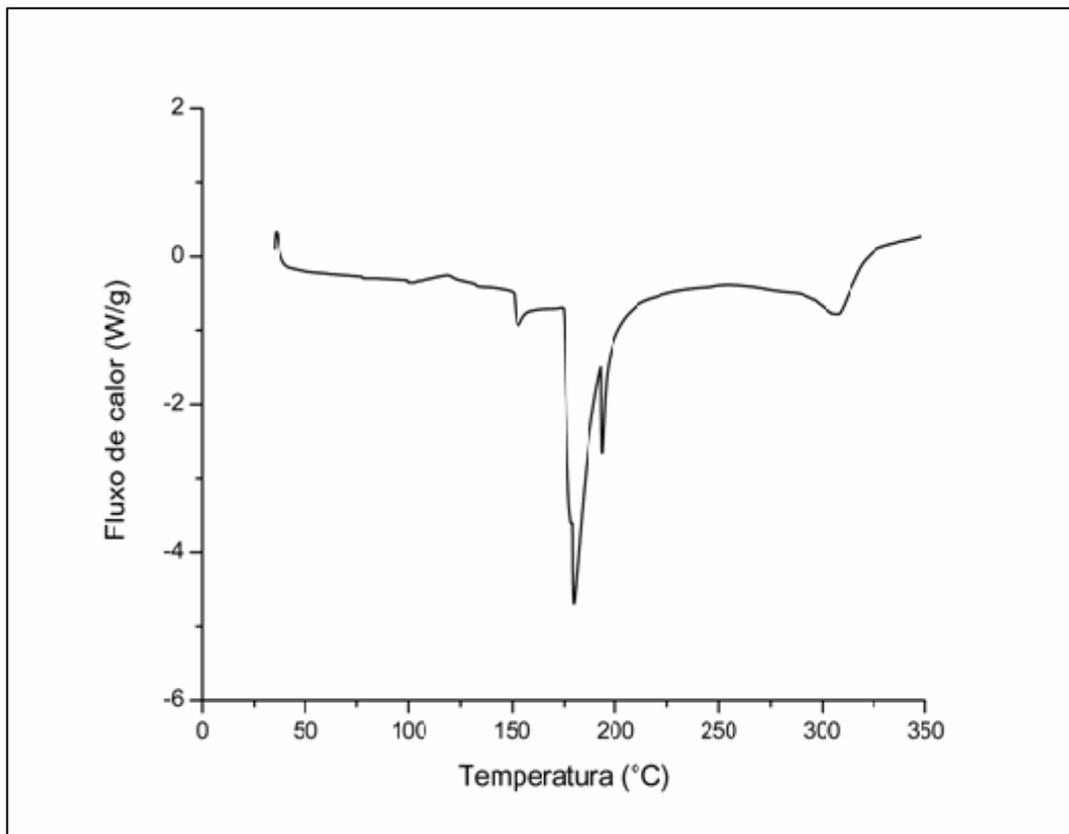


Figura 20- Curvas DSC dos grânulos de alginato de cálcio contendo fármaco (amostra D)

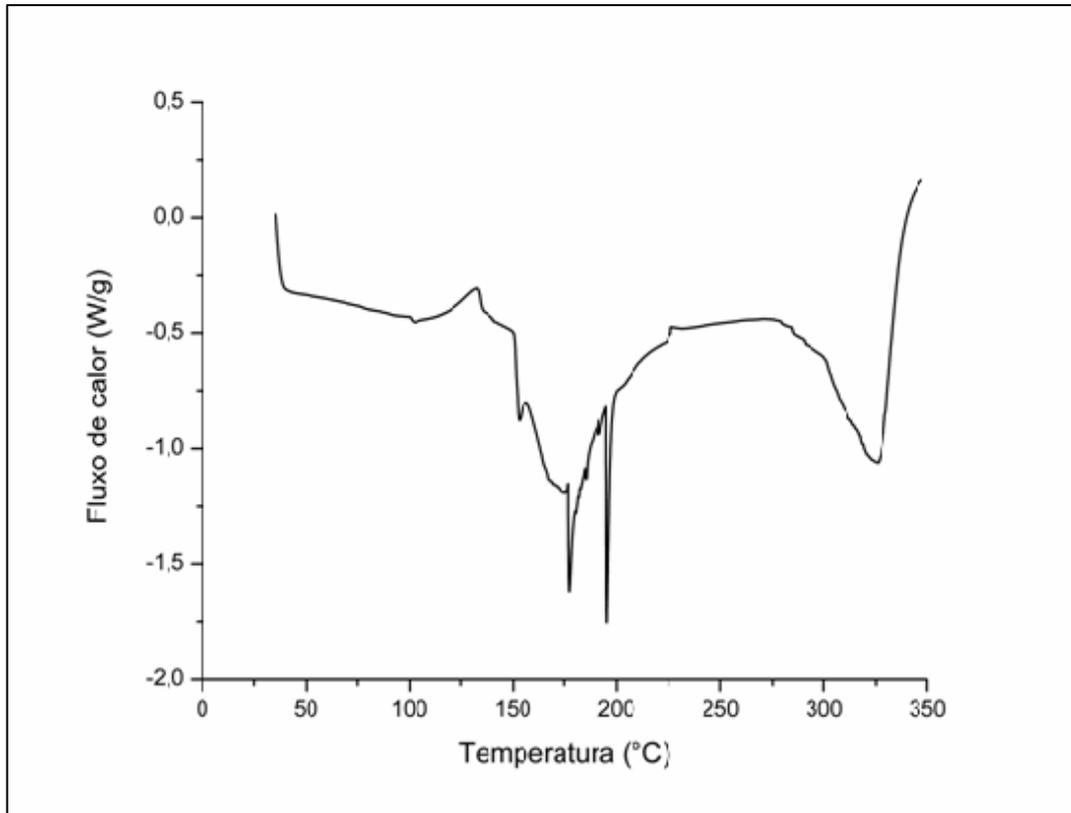


Figura 21- Curvas DSC dos grânulos de alginato de cálcio contendo fármaco (amostra E)

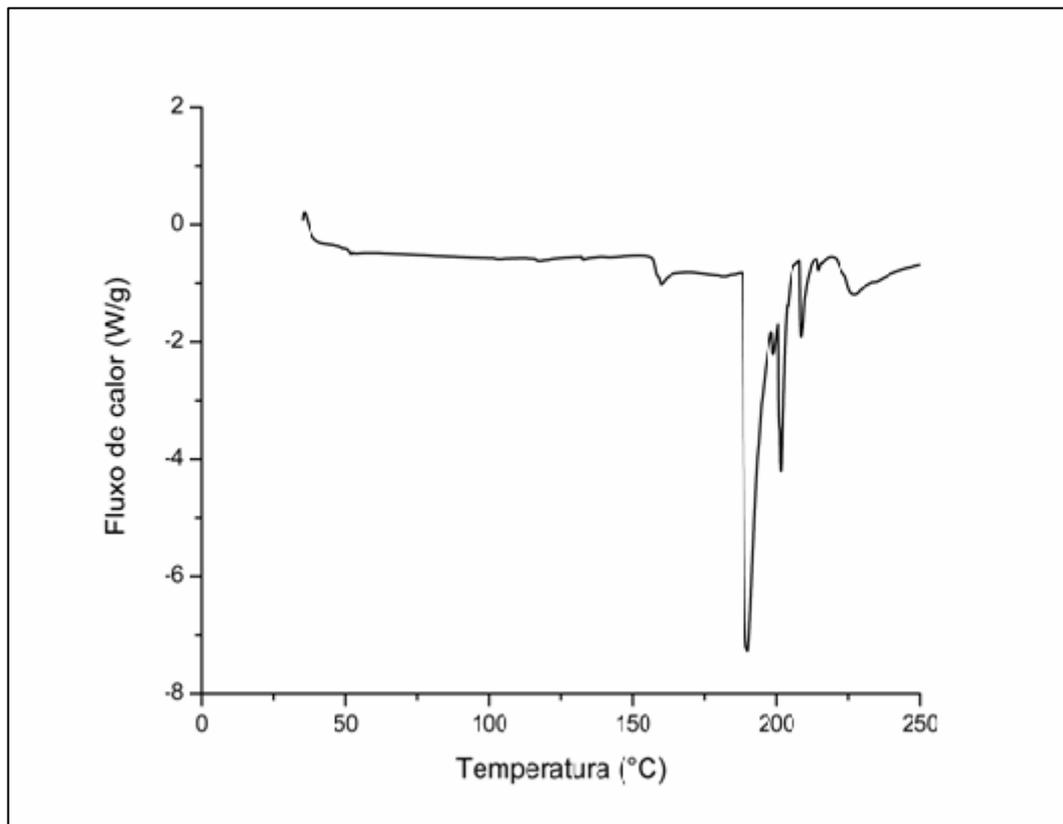
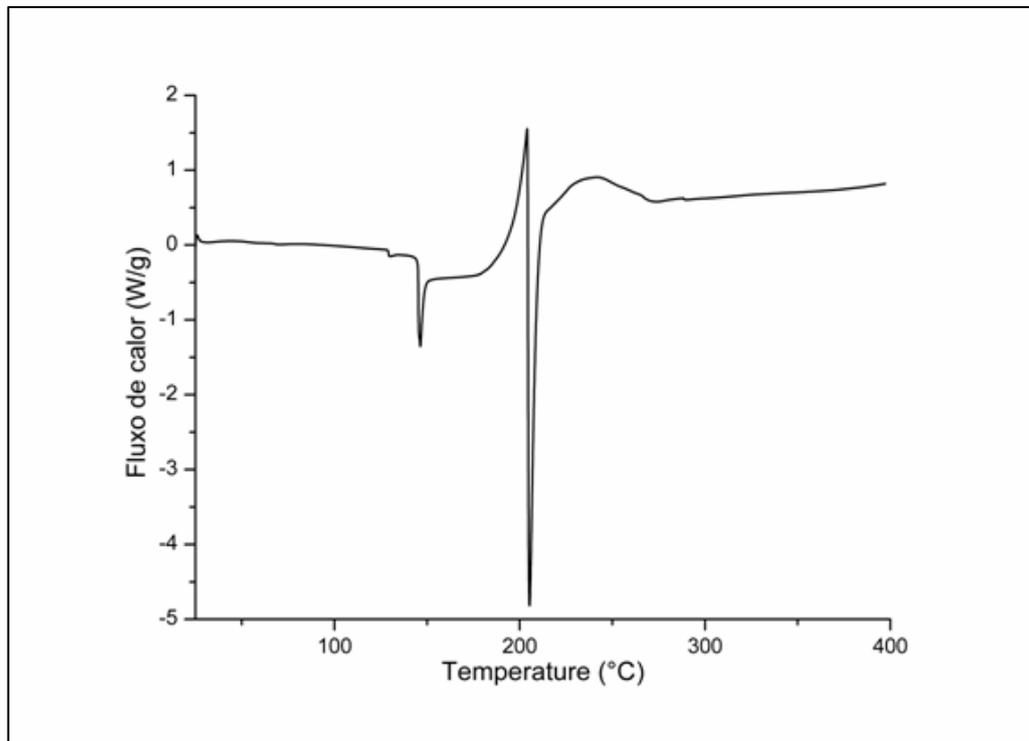


Figura 22 - Curvas DSC do alginato de sódio puro



3. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que foi possível obter sistemas multiparticulados biodegradáveis com as formulações A, C, D e E, a partir de uma emulsão contendo fármaco e um biopolímero, pelo método de gelificação ionotrópica, de forma fácil, simples, reprodutível, custo reduzido e com bons rendimentos. Todas as amostras, com exceção da B, apresentaram boa capacidade de encapsulação do fármaco altamente hidrofóbico, com destaque para amostra E que apresentou uma melhor taxa de encapsulação. Esta encapsulação do LSVM-5CN06 demonstrou ser benéfico para o fármaco, pois, como apresentando pela análise termogravimétrica, os grânulos aumentaram sua estabilidade térmica.

Este sistema é um promissor sistema de liberação para administração oral dos novos compostos derivado do tiofeno com ação antifúngica. Os estudos de intumescimento e erosão sugerem ainda que o sistema desenvolvido seja aprimorado a fim de estender o tempo de erosão dos grânulos o que influenciará conseqüentemente no período de liberação do fármaco.

4. REFERÊNCIAS

- AL-KASSAS, R. S.; AL-GOHARY, O.; AL-FAADHEL, M. M. **Controlling of systemic absorption of gliclazide through incorporation into alginate beads**. International journal of pharmaceutics, v. 34, p. 230–237, 2007
- AMICI, E. et al. **Alginate gelation in microfluidic channels**. Food Hydrocolloids, v. 22, p. 97-104, 2008.
- ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo, 8 ed., ed. Premier, 2000.
- ARAÚJO, R. S. A. **Obtenção e avaliação da atividade antifúngica de derivados sintéticos do tiofeno**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- ASLANI, P., KENNEDY, R. A. **Effect of gelation conditions and dissolution media on the release of paracetamol from alginate gel beads**. Journal of Microencapsulation, v 13, p. 601–614, 1996.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2º ed, Porto Alegre, ed. Artmed, p. 678, 2005.
- BAJPAI, S. K.; SHARMA, S. **Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions**. Reactive & Functional Polymer, v. 59, p. 129-140, 2004.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal - As bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Porto Alegre, ed. Artmed. 2001.
- BAUMGARTNER, S. et al. **Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time**. International Journal of Pharmaceutics, v.195, p. 125-135, 2000.
- BOYLAN, J. C. et al. **Microsphere technology and applications**. In: Encyclopedia of Pharmaceutical technology. NewYork, ed. Marcel Dekker, v. 10, p. 1-29, 1994.
- BRASIL. Resolução N° 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2003.
- BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimeno de novos fármacos e medicamentos**. ed. UNIVALI, p. 239, 2003
- CHAN, L. W.; JIN, Y.; HENG, P. W. S. **Cross-linking mechanisms of calcium and zinc in production of alginate microspheres**. International Journal of Pharmaceutics, v.242, p. 255-258, 2002.
- CHAVANPATIL, M. D. et al. **Polymer-surfactant nanoparticles for sustained release of water-soluble drugs**. Journal of Pharmaceutical Science, v. 96, n.12, p. 3379-389, dezembro, 2007.

DONBROW, M. **Introduction and overview.** In: Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy. Boca Raton, ed. CRC Press, p. 1-14, 1992.

EL-GIBALY, I., **Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use:** comparison with non-floating chitosan microspheres. International Journal of Pharmaceutics, v. 249, p.7-21, 2002.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. **Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophene series: a structure-activity evaluation study.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.14, n. 23, p.5831-5833, 2004.

FIALHO, S. L. et al. **Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular.** Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, v. 66, p. 891-896, 2003.

FORMARIZ, T. P. et al. **Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. v. 41, n. 3, julho/setembro, 2005.

GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B. **“Smart” polymers and what they could do in biotechnology and medicine.** Trends Biotechnology, Amsterdam, v. 17, p.335-340, 1999.

GHOSAL, K., RAY, S. D. **Alginate/hydrophobic HPMC (60M) particulate systems: New matrix for site-specific and controlled drug delivery.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 47, n. 4, p. 833 – 844, outubro/dezembro, 2011.

GOHEL, M. C., BARIYA, S. H. **Fabrication of Triple-Layer Matrix Tablets of Venlafaxine Hydrochloride Using Xanthan Gum.** AAPS PharmSciTech, v. 10, n. 2, p. 624-630, 2009

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. **Protein release from alginate matrices.** Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v. 31, p. 267-285, 1998.

HUANG, X., XIAO, Y., LANG, M. **Micelles/sodium-alginate composite gel beads: A new matrix for oral drug delivery of indomethacin.** Carbohydrate Polymers, v. 87, p. 790-798, 2012.

JAY, S. M., SALTZMAN, W. M.. **Controlled delivery of VEGF via modulation of alginate microparticle ionic crosslinking.** Journal of Controlled Release, v. 134, p. 26–34, 2009.

KAWAGUTI, H.Y & SATO, H.H. **Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana.** Química nova , v. n.1, p 134-143, 2008.

KIM, C. K.; LEE, E.J. **The controlled release of blue dextran from alginate beads.** International Journal Pharmaceutics, Amsterdam, v. 79, p. 11-19, 1992.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Fundamentos de Metodologia Científica**. São Paulo, 6 ed. ed. Atlas, 315p. 2006.

LEE, K.Y.; MOONEY, D. J. **Alginate**: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 7, p. 106– 126, 2012.

LIAKOSA, I. et al. **Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads**. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, p. 176– 183, 2013.

LIMA, I. O. et al. **Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida***. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, n. 2, p.197-201, Abril/Junho, 2006.

LIMA, L. M. **Química Medicinal Moderna**: Desafios e contribuição brasileira, *Química Nova*, v.30, n.6, 1456-1468, 2007.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. **Formas farmacêuticas de liberação modificada**: polímeros hidrofílicos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 41, n. 2, abril/junho, p. 143-154, 2005.

LYRA, M. A. M. et al. **Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos**. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.26, n 5, p. 784-93, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M. E., VEIGA, F. **A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 4, outubro/dezembro, 2002.

MCCARRON, P. A., et al. **Evaluation of a water-soluble bioadhesive patch for photodynamic therapy of vulval lesions**. *International journal of pharmaceutics*. v. 293.1, p. 11-23, 2005.

MENDONÇA-JR, F. J. B. et al. **Synthesis and Evaluation of the Antifungal Activity of 2-(Substituted-Amino)-4,5-Dialkyl-Thiophene-3-Carbonitrile Derivatives**. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.30, n. 8, 2011.

MIRANDA, A.; MILLÁN, M.; CARABALLO, I. **Study of the critical points of HPMC hydrophilic matrices for controlled drug delivery**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 311, p. 75–81, 2006.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. **Colloidal nanocarriers**: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 6, p. 9–24, 2010.

MONTANARI, C. A. **Química Medicinal**: contribuição e Perspectiva no desenvolvimento da Farmacoterapia. *Química Nova*, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.

O'Hagan, D. T. **Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 34, p. 305-320, 1998.

OLIVEIRA, A. G. et al. **Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos**. Química. Nova, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, J. G. B. **Síntese, Purificação, Caracterização Estrutural e Avaliação da Citotoxicidade de Novos Derivados 2-[(Benzilideno)Amino]-5,6-Diidro-4h-Ciclopenta[B]Tiofeno-3-Carbonitrila em Bioensaios de *Artemia Salina***. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2011.

PARAI, K. M. et al. **Thiophene containing triarylmethanes as antitubercular agents**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 18, p. 289-292, 2008.

PATIL, P.; CHAVANKE, D.; WAGH, M. **A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastro retentive gelispheres**. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 4, Suppl 4, 2012.

PEPPERMAN, A.B.; KUAN, J.W.; MCCOMBS, C. **Alginate controlled release formulations of metribuzin**. Journal Controlled Release, v. 17, p. 105–112, 1991.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara koogan, 596p, 2005.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. **Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43, n. 4, p. 491-502, outubro/dezembro, 2007.

PINTO, E. et al. **Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on thebenzo[b]thiophene moiety**. Bioorganic& Medicinal Chemistry, v.16. p.8172-8177, 2008.

PIOVESAN, A.;TEMPORINI, E. R. **Pesquisa exploratória: procedimento metodológico para o estudo de fatores humanos no campo da saúde pública**. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.29, n. 4, Agosto, 1995.

PONGJANYAKU,T.; RONGTHONG, T. **Enhanced entrapment efficiency and modulated drug release of alginate beads loaded with drug–clay intercalated complexes as microreservoirs**. Carbohydrate Polymers, v. 81, p. 409–419, 2010.

QUEIROZ, L. R. T.,**Avaliação De Sistemas Sólidos Particulados, Gastrorretensivos flutuantes, obtidos por geleificação ionotrópica**.(Dissertação) apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, Socrocaba, SP, 2011.

RUIZ, J. A.. **Metodologia Científica: guia para eficiência nos estudos**. 5.ed. São Paulo, ed. Atlas, 181p. 2002.

RYU, C. K. et al. **Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[b]thiophenes**. Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters, v.15, n. 10, p. 2617-20, 2005.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. **Lipossomas: a bala mágica acertou?** Química Nova, v. 25, n. 6 B, p. 1181-1185, 2002.

SCOTTI, L. et al. **Experimental Methodologies and Evaluations of Computer-Aided Drug Design Methodologies Applied to a Series of 2-Aminothiophene Derivatives with Antifungal Activities.** *Molecules*, v.17,p. 2298-2315, 2012.

SHI, P. et al. **Parametric analysis of shape changes of alginate beads.** *Powder Technology*, v. 210, p. 60–66, 2011.

SILVA, M. S. et al. **Nanopartículas de Alginato como Sistema de Liberação para o herbicida Clomazone.** *Quimica Nova*, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. **The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 34, p. 285-304, 1998.

SINHA, V. R. et al. **Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview.** *International Journal Pharmaceutics*, v. 278, p. 1-23, 2004.

SIQUEIRA, G. et al. **Aplicação de α -oxocetenoditiocetais em síntese orgânica.** *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 707-715, 2010.

SIVADAS, N. et al. **A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 358, p. 159–167, 2008.

SUGAWARA, S.; IMAI, T.; OTAGIRI, M. **The controlled release of prednisolone using alginate gel.** *Pharmaceutical Research*, v. 11, p. 272–277, 1994.

TAKKA, S.; OCAK, O. H.; ACARTURK, F. **Formulation and investigation of nicardipineHCl–alginate gel beads with factorial design-based studies.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 6, p. 241–246, 1998.

TAVARES, L. C. **QSAR: A abordagem de hansch.** *Quimica Nova*, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

USP 30 – NF 25: The United States pharmacopeia and the national formulary. Rockville: United States Pharmacopeia Convention Inc., 2007

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. **Aplicações Farmacêuticas de Polímeros.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WANG, Q. et al. **Preparation and swelling properties of pH-sensitive composite hydrogel beads based on chitosan-g-poly (acrylic acid)/vermiculite and sodium alginate for diclofenac controlled release.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, n. 3, p. 356–362, 2010.

WEI, L. et al. **Degradation controllable biomaterials constructed from lysozyme-loaded Ca-alginate microparticle/chitosan composites.** *Polymer*, v. 52, p. 5139 -5148, 2011.

YU, C. Y. et al. **Sustained release of antineoplastic drugs from chitosan-reinforced alginate microparticle drug delivery systems.** International Journal of Pharmaceutics, v. 357, p. 15–21, 2008.

ZHANG, J. et al. **Pyrolysis products and thermal degradation mechanism of intrinsically flame-retardant calcium alginate fibre.** Polymer Degradation and Stability, v. 96, p. 936-942, 2011.