



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**ANDRESSA FERREIRA VIEIRA**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *BEADS* COMO SISTEMA  
TRANSPORTADOR PARA O 5CN05-LSVM**

CAMPINA GRANDE – PB  
2014

ANDRESSA FERREIRA VIEIRA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *BEADS* COMO SISTEMA  
TRANSPORTADOR PARA O 5CN05-LSVM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia com especialização Generalista da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

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

CAMPINA GRANDE – PB  
2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

V658o Vieira, Andressa Ferreira

Obtenção e caracterização de beads como sistema transportador para o 5cn05-lsvm [manuscrito] / Andressa Ferreira Vieira. - 2014. 49 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

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

1. Fármacos. 2. Gelificação ionotrópica. 3. Gastrorresistente.  
I. Título.

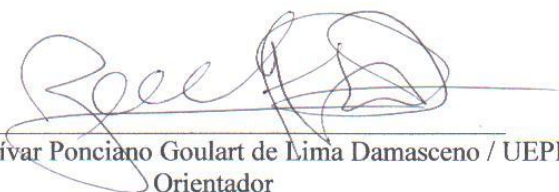
21. ed. CDD 615.1

ANDRESSA FERREIRA VIEIRA

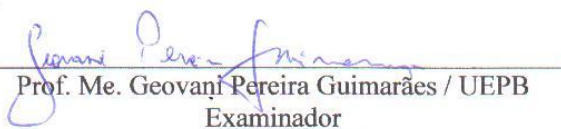
**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *BEADS* COMO SISTEMA  
TRANSPORTADOR PARA O 5CN05-LSVM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia com especialização Generalista da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

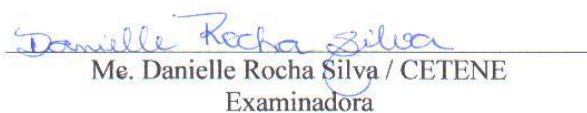
Aprovada em 19/02/2014.



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno / UEPB  
Orientador



Prof. Me. Geovani Pereira Guimarães / UEPB  
Examinador



Me. Danielle Rocha Silva / CETENE  
Examinadora

## DEDICATÓRIA

Dedico esta grande vitória,

À Deus, pelo dom da vida, por ter me protegido em uma cidade diferente da qual residia, por ter me feito suportar a saudade, as doenças, as tristezas, as angústias, e todos os momentos difíceis.

Aos meus queridos pais Ronaldo e Zélia, que nunca mediram esforços para fornecer tudo que realmente é importante, obrigada pela dedicação e confiança que sempre depositaram em mim. Os senhores não são somente pais, mas amigos e companheiros em todos os momentos da minha vida. Sem esta base, esta referência, eu não teria chegado até aqui. Com o amor de vocês minha caminhada foi, e será para sempre determinada e prazerosa.

Ao meu irmão Anderson, que tanto amo, que faz as minhas férias serem momentos de descontração e alívio, diante de todos os períodos de estudos acelerados, que passo distante dele.

Ao meu amado Gabriel, pela força, por enxugar muitas das minhas lágrimas, por dividir o pesado fardo de um relacionamento à distância, e compartilhar os melhores e piores momentos destes cinco anos. Por me animar quando pensava que não ia conseguir, e por sempre querer o melhor para mim. Pelo melhor abraço, aquele capaz de aliviar meu cansaço.

Aos meus tios, Tonho, Neidinha, Fátima e Ferreira (*in memoriam*) e ao meu Padrinho Taumaturgo, pelo apoio financeiro e emocional em muitas etapas do meu estudo, desde o maternal até a universidade. Obrigada por acreditarem no meu potencial e na minha vontade de vencer, vocês fazem parte da minha história.

A minha avó Ester, por sempre ter zelado por mim, ser minha amiga e grande educadora.

As minhas amigas Jéssica e Wilma, presentes de Deus que ganhei na universidade, por terem sido minha família nos momentos em que a verdadeira estava distante. Obrigada por me ajudarem a carregar a bagagem de morar fora, ela se tornou mais leve, e passou mais rápido com a ajuda de vocês.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, que sempre esteve aberto para uma conversa. Obrigada pela confiança de sempre, pela paciência prestada e aprendizado adquirido diante os testes realizados em nossos estudos, quais permitiram que eu alcançasse essa etapa tão importante na minha vida.

Aos meus familiares, meus pais, meu irmão, tios e avó, que são o meu alicerce, e sempre se mostraram prontamente dispostos a me ajudar em todas as minhas necessidades e que, sem os mesmos, eu não conseguiria esta realização.

Ao meu grande amor, que sempre se mostrou determinado a vencer esta batalha comigo.

As companheiras e amigas de laboratório, Michelle e Rayane, por toda a ajuda e os bons momentos vivenciados ao longo da nossa jornada acadêmica.

A todos os professores e funcionários do Curso de Farmácia pela boa convivência e aprendizado em todos os dias desses cinco anos de vida universitária.

A todos pertencentes à Turma 2009.2, concluintes 2014.1, pelos momentos vividos e todo apoio e amizade oferecidos durante a graduação.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da concretização deste trabalho, e que não estão citadas nominalmente, meu sincero agradecimento.

A Deus por todas as graças concedidas e por permitir que eu conquistasse essa vitória.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

## RESUMO

A pesquisa sistemática para a obtenção de novos sistemas transportadores de fármacos é de fundamental importância frente às modificações biológicas que as enfermidades trazem com cada evolução. Esses novos sistemas podem ser executados por meio de vários processos. A 5CN05-LSVM é uma molécula bioativa com comprovada atividade antifúngica *in vitro*, baixa solubilidade e, possivelmente, baixa permeabilidade. O presente trabalho teve por objetivo incorporar a 5CN05-LSVM em um novo sistema transportador de fármaco, chamado *beads*. O processo de obtenção das *beads* foi seguido pelo método de gelificação ionotrópica, com formação de grânulos com formato esférico, advindas de reação com solução de polímero alginato de sódio (3,5%) e solução de cloreto de cálcio (10%). As partículas contendo o fármaco foram obtidas utilizando uma emulsão com o mesmo previamente disperso. A metodologia seguiu-se em desenvolver 4 diferentes proporções (A, B, C e D), através de um planejamento fatorial. A morfologia, o rendimento dos grânulos, a taxa de carregamento e o intumescimento dos grânulos, foram avaliados. Os grânulos resultantes foram ovais, não aglomerados com superfície apresentando fissuras. O rendimento variou entre 71,83% a 93,11% e a taxa de carregamento obteve um valor máximo de 79,39% de encapsulação. Os grânulos mostraram baixo grau de intumescimento na solução de simulação do fluido gástrico, mas em tampão de fosfato intumesceram de maneira rápida, com erosão completa da rede polimérica em 75 minutos para amostra A e B e 90 minutos para amostra C e D. Concluiu-se com este estudo que foi possível obter um sistema multiparticulado gastrorresistente utilizando um método simples, fácil e reprodutível; possível de ser colocado em uma forma farmacêutica para administração oral de fármacos hidrofóbicos.

**Palavras-chaves:** Planejamento fatorial, gelificação ionotrópica, gastrorresistente.



## ABSTRACT

This systematic research in order to obtain new drug delivery systems is extremely important as we face biological changes that illness brings with each evolution. These new systems can be run through various processes. The 5CN05-LSVM is a bioactive molecule with proven antifungal activity in vitro, low solubility and possibly low permeability. The present study aimed to incorporate 5CN05-LSVM on a new drug carrier system, called beads. The process of carrying out the beads was followed by the method of ionotropic gelation, forming hydrogel particles with spherical shape, resulting from reaction with the polymer solution sodium alginate (3.5%) and solution of calcium chloride (10%). The particles containing the drug were obtained using an emulsion with the same previously dispersed. The methodology followed to develop four different ratios (A, B, C and D) using a factorial design. The morphology, the yield of beads, the loading rate and swelling of the granules were evaluated. The resulting granules were oval, not agglomerated with surface fissures. Yields ranged from 71.83% to 93.11% and the obtained maximum load value of 79.39% encapsulation. The granules showed a low degree of swelling in the solution simulating the gastric fluid, but swelled in phosphate buffer quickly, with complete erosion of the polymer network in 75 minutes for sample A and B and 90 minutes for sample C and D. It was concluded with this study it was possible to get a gastro multiparticulate system using a simple, easy and reproducible method, can be placed in a dosage form for oral administration of hydrophobic drugs.

**Keywords:** Factorial design, ionotropic gelation, gastro.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1- Quantidade de solução de alginato de sódio e de emulsão contendo 5CN05- LSVM, para formarem as <i>beads</i> conforme os níveis do Planejamento fatorial. ....         | 26 |
| Tabela 2- Proporção conforme o planejamento fatorial da quantidade usada de solução de alginato de sódio e de emulsão contendo 5CN05, para o método de Gelificação Ionotrópica. | 26 |
| Tabela 3- Dados utilizados na construção da curva de calibração do 5CN05-LSVM. ....   | 34 |
| Tabela 4- Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método. ....   | 35 |
| Tabela 5- Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....  | 36 |
| Tabela 6- Resultados do ensaio para verificação da robustez do método. ....   | 36 |
| Tabela 7- Formulações com as diferentes proporções de solução de alginato de sódio 3,5% e emulsão de 5CN05-LSVM 0,1% em cada amostra. ....                                      | 37 |
| Tabela 8- Determinação da taxa de carregamento dos grânulos contendo o 5CN05-LSVM...  | 38 |
| Tabela 9- Determinação do cálculo de rendimento. ....   | 41 |
| Tabela 10- Variação de peso dos grânulos após 30 minutos e 2 horas em diferentes meios. ..  | 43 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1- Relação entre o alginato de sódio e o cloreto de cálcio, formando ligações cruzadas, originando grandes teias tridimensionais que se tornam viscosas / gel..... | 19 |
| Figura 2- Estrutura química da molécula do 5CN05-LSVM. ....   | 22 |
| Figura 3- Fluxograma de obtenção dos grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN05-LSVM. ....   | 28 |
| Figura 4- Análise macroscópica das diferentes amostras de grânulos contendo 5CN05-LSVM obtidos por método de gelificação ionotrópica. ....                                | 31 |
| Figura 5- Espectro de varredura do 5CN05-LSVM no UV MINI - 1240 (Shimadzu), onde pode ser observado o $\lambda$ máximo de absorção em 388nm. ....                         | 32 |
| Figura 6- Espectro de varredura das amostras de grânulos contendo o fármaco 5CN05-LSVM. ....  | 33 |
| Figura 7- Espectro de varredura das amostras de grânulos sem o fármaco (branco). ....   | 33 |
| Figura 8- Curva de calibração do 5CN05-LSVM ....  | 34 |
| Figura 9- Análise morfológica por MEV dos grânulos de alginato de cálcio contendo o fármaco 5CN05-LSVM. ....  | 40 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |   |
|------------------|---|
| 5CN05            | 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3 carbonitrila |
| $\mu\text{g/ml}$ | Microgramas/Mililitro   |
| mg/ml            | Miligramas/Mililitro  |
| $\mu\text{m}$    | Micrômetro  |
| Abs              | Absorbância   |
| CV               | Coefficiente de Variação  |
| DP               | Desvio Padrão   |
| LSVM             | Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas                                     |
| MEV              | Microscopia Eletrônica de Varredura   |
| nm               | Nanômetro   |
| O/A              | Óleo em água  |
| REA              | Relação Estrutura Atividade   |
| rpm              | Rotações por minuto   |
| SLFs             | Sistema de Liberação de Fármacos  |
| UV-VIS           | Ultravioleta Visível  |
| $\lambda$        | Lambda  |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2</b> | <b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1      | SISTEMAS POLIMÉRICOS .....  | 17        |
| 2.1.1    | Gelificação Ionotrópica .....   | 17        |
| 2.1.2    | Esferas - <i>Beads</i> de alginato de cálcio (Sistema matricial).....   | 18        |
| 2.2      | INFECÇÕES FÚNGICAS.....   | 19        |
| 2.3      | DERIVADO TIOFÊNICO .....  | 20        |
| 2.3.1    | 5CN05-LSVM .....  | 21        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>  | <b>23</b> |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 23        |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 23        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>24</b> |
| 4.1      | MATERIAIS PARA PRODUÇÃO E ESTUDO DAS <i>BEADS</i> .....   | 24        |
| 4.1.1    | Equipamentos .....  | 24        |
| 4.1.2    | Substâncias .....   | 24        |
| 4.1.3    | Diversos .....  | 25        |
| 4.1.4    | Software.....   | 25        |
| 4.2      | MÉTODOS.....  | 26        |
| 4.2.1    | Preparação das <i>beads</i> .....   | 26        |
| 4.2.1.1  | Planejamento fatorial .....   | 26        |
| 4.2.1.2  | Preparação da solução de cloreto de cálcio a 10% .....  | 27        |
| 4.2.1.3  | Preparação da solução de alginato de sódio 3,5% .....   | 27        |
| 4.2.1.4  | Preparação da emulsão contendo 5CN05 à 0,1% .....   | 27        |
| 4.2.1.5  | Preparação das partículas pelo método de gelificação ionotrópica (BOYLAN et al, 1994) .....                                   | 27        |
| 4.2.2    | Desenvolvimento e validação para quantificação do 5CN05-LSVM.....   | 28        |
| 4.2.2.1  | Desenvolvimento do método analítico .....   | 28        |
| 4.2.2.2  | Validação do método analítico .....   | 29        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>31</b> |
| 5.2      | PREPARAÇÃO DAS <i>BEADS</i> CONTENDO O FÁRMACO 5CN05-LSVM.....  | 31        |
| 5.3      | DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....  | 32        |
| 5.3.1    | Determinação do comprimento de onda de detecção .....   | 32        |
| 5.3.2    | Especificidade (seletividade).....  | 32        |
| 5.3.3    | Linearidade .....   | 33        |
| 5.3.4    | Exatidão .....  | 35        |
| 5.3.5    | Precisão.....   | 35        |
| 5.3.6    | Robustez .....  | 36        |
| 5.3.7    | Limite de Detecção .....  | 36        |
| 5.3.8    | Limite de Quantificação .....   | 37        |
| 5.4      | CARACTERIZAÇÃO DOS GRÂNULOS ( <i>BEADS</i> ) DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO O FÁRMACO 5CN05-LSVM.....                         | 37        |
| 5.4.1    | Desenho dos experimentos .....  | 37        |
| 5.4.2    | Determinação da Taxa de Carregamento.....   | 37        |
| 5.4.3    | Análise Morfológica dos grânulos de Alginato de Cálcio contendo 5CN05-LSVM por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 39        |
| 5.4.4    | Determinação do Rendimento .....  | 40        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 5.4.5    | Estudo de Intumescimento e Erosão.....  | 41        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>                   | <b>44</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>45</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa e o desenvolvimento de fármacos representam o primórdio para obtenção de medicamentos. Os fármacos obtidos dificilmente são administrados como substâncias químicas isoladas, mas sim, inclusos em uma forma farmacêutica (CECHINEL; BRESOLIN, 2003).

A tecnologia farmacêutica tem inovado em sofisticados sistemas transportadores de fármacos. Abordando a investigação de melhorias na liberação, biodisponibilidade e/ou dissolução dos fármacos (STREISAND; STANLEY, 1995; ASTIER, 2006). Como afirma Damasceno (2010), inúmeros destes avanços tecnológicos têm como principais fatores a redução da toxicidade dos fármacos, facilitando a adesão do paciente ao tratamento e a finalidade de melhorar o tratamento das doenças no que diz respeito ao aumento da eficácia.

A grande maioria dos fármacos utilizados na terapêutica atual derivou da utilização da estratégia de modificação molecular, técnica que 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 (REA) (LIMA, 2007).

Em se tratando de melhora no combate as enfermidades, as infecções fúngicas têm sido estudadas com frequência, tendo em vista que são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos (ARAÚJO et al., 2004). Uma grande preocupação no tratamento dessas infecções é o número restrito de drogas antifúngicas eficazes, visto que muitas das atualmente disponíveis são tóxicas, são fungistáticas e não fungicidas ou levam ao desenvolvimento da resistência, além de apresentarem um limitado espectro de atividade, baixa distribuição tecidual, fraca penetração no sistema nervoso central (SNC), ou custo elevado (NETO et al., 1997; RYBAK; AKINS, 2001; KATRITZKY et al., 2008).

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 recentes

relatam que diversos benzo[*b*]tiofenos e compostos com grupo 4,5 cicloalquil ligado à porção tiofeno possuem importantes heterociclos bioativos com atividades antimicrobianas e potentes atividade antifúngicas (FERREIRA et al, 2004; RYU et al., 2005; MENDONÇA-JR et al., 2011).

Um veículo advindo de avanços na área farmacêutica são as esferas (*beads*), formadas por sistemas matriciais nos quais os agentes ativos (AA) encontram-se uniformemente dispersos e/ou dissolvidos numa rede polimérica (GIUNCHEDI; CONTE, 1995; KAS; ONER, 2000). As *beads* podem ser homogêneas ou heterogêneas dependendo se a substância ativa se encontra no estado molecular (dissolvido), ou na forma de partículas (suspensão) (AFTABROUCHAD; DOELKER, 1992).

Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver novos sistemas transportadores de fármacos, *beads* de alginato de cálcio, contendo o fármaco antifúngico derivado do tiofeno 5CN05-LSVM, tendo em vista a urgente necessidade de melhoras na farmacoterapia destas afecções.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Sistemas Poliméricos

A junção da ciência de polímeros com as ciências farmacêuticas contribuíram de forma grandiosa em termos de “inovação” (forma, tamanho, superfície e flexibilidade no estado físico) no *design* e desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (SLFs) (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

Segundo Oliveira e Lima (2006), para se chegar ao mecanismo desejado de liberação do fármaco, os polímeros sintéticos podem ter suas propriedades moldadas ou pode-se trabalhar com uma mistura de polímeros que apresentem propriedades diversas e, com a modificação da proporção destes na formulação, pode-se chegar ao sistema de liberação que satisfaça às necessidades do formulador.

O Alginato é um biopolímero extraído de diferentes espécies de macroalgas, principalmente algas marrons, tais como, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystid pyrifera* (GOMBOTZ; WEE, 1998). Quimicamente é um polissacarídeo aniônico com uma estrutura (Figura 1) linear compreendida por ligações glicosídicas (1→4) de unidades de β-D-ácido manurônico e α-L-gulurônico, as quais podem variar em composição e sequência, arranjadas em blocos ao longo da cadeia (ZHANG; CHENG; YING, 2006).

Alguns autores como Rowe, Sheskey e Weller (2003), enfatizam que o alginato de sódio é usado em muitas formulações farmacêuticas tanto para uso oral quanto tópico, acrescentando ainda sua utilização na preparação de formulações orais de liberação controlada por retardar a dissolução de fármacos presentes em comprimidos, cápsulas e suspensões aquosas. Também funciona como agente estabilizador para emulsões do tipo óleo em água (O/A). Esses autores citam ainda a respeito da adesividade dos hidrogéis de alginato de sódio, como também a liberação do fármaco a partir de comprimidos adesivos para a mucosa oral.

Características como a ação gelificante e espessante, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxidez tornam o alginato de sódio um material interessante para inúmeras aplicações (LIMA; ANDREANI; SOLDI, 2007).

#### 2.1.1 Gelificação Ionotrópica

Gelificação ionotrópica é uma técnica de obtenção de grânulos de hidrogel, que são estruturas poliméricas tridimensionais contendo elevada quantidade de água. A técnica baseia-se na capacidade dos polieletrólitos em fazer ligação cruzada na presença de contra-íons. As partículas formadas são entidades polimérica hidrófilas, reticuladas. Os grânulos são produzidos pela queda de uma solução de polímero-fármaco em uma solução aquosa de cátions polivalentes. Os cátions difundem-se para as gotas poliméricas carregadas com o fármaco, formando uma rede ionicamente reticulada tridimensional (PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012).

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

O método baseia-se na gelificação ionotrópica do alginato e consiste em incorporar o material a encapsular em uma 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 (BURGESS; HICKEY, 1994). O alginato gelifica após ligação dos íons bivalentes de cálcio aos blocos de ácido gulurônico das cadeias de alginato constituindo o modelo da “caixa de ovos” (GOMBOTZ; WEE, 1998). Sendo as partículas assim obtidas relativamente grandes, foram desenvolvidas variantes do método.

### **2.1.2 Esferas - *Beads* de alginato de cálcio (Sistema matricial)**

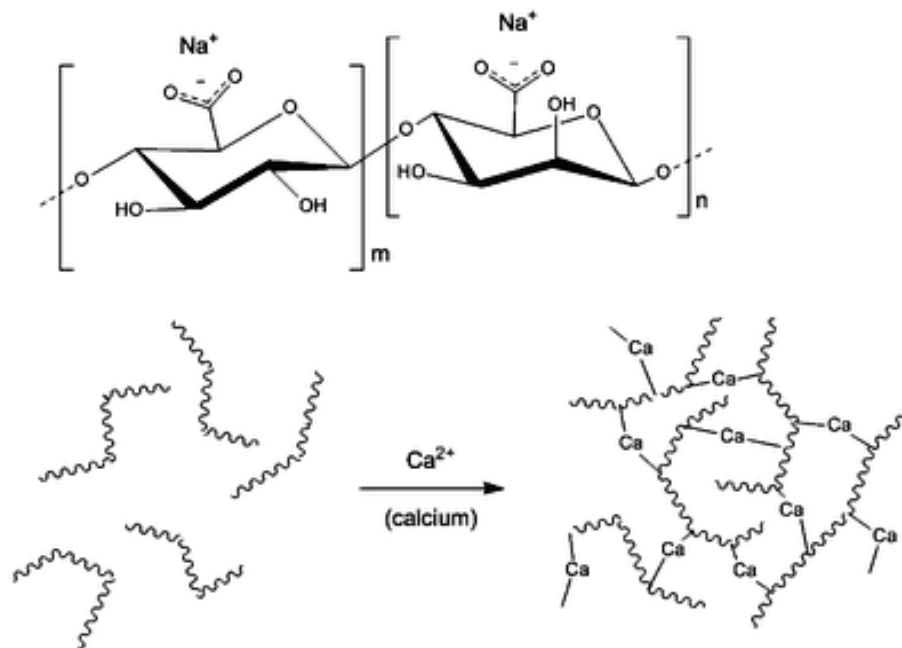
Os sistemas matriciais são mecanismos para se obter múltiplas unidades e sustentar a liberação de fármacos que utilizam substâncias capazes de modular essa liberação, geralmente polímeros de natureza hidrofílica ou inerte tem se destacado, sendo uma das estratégias mais empregadas, devido às vantagens inerentes: eficácia, baixo custo, produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais, aceitação da *Food and Drug Administration* (FDA) e aplicabilidade para fármacos com extenso limite de solubilidade (LOPES; LOBO; COSTA, 2005; MIRANDA; MILLÁN; CARABALLO, 2006).

As formas farmacêuticas multiparticuladas 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).

A formação do sistema matricial, através da técnica de gelificação ionotrópica, acontece após a reação química do polímero alginato de sódio, com a solução de  $\text{CaCl}_2$ , obtendo como produto alginato de cálcio (Esquema 1).

**Esquema 1-** Reação de obtenção do alginato de cálcio.



**Figura 1-** Relação entre o alginato de sódio e o cloreto de cálcio, formando ligações cruzadas, originando grandes teias tridimensionais que se tornam viscosas / gel.

Fonte: Figura adaptada de <http://www.fooducation.org/2009/02/my-first-spherification.html>> Acesso: 18 de Março, 2013.

Os alginatos, polímeros polianiônicos, ao entrarem em contato com cátions bivalentes (por exemplo,  $\text{Ca}^{+2}$ ) causam gelificação ionotrópica, formando junções intercadeias entre os íons bivalentes do cálcio e os blocos gulurônico das cadeias de alginato, possibilitando a incorporação de fármacos ou outras moléculas bioativas em sua matriz polimérica através, principalmente, de interações eletrostáticas e forças de Van der Waals (BOYLAN et al., 1994; GOMBOTZ; WEE, 1998; CHAVANPATIL et al., 2007; SHI et al., 2011)

## 2.2 Infecções Fúngicas

Os fungos são de forma geral, organismos do meio externo excetuando-se algumas espécies de *Candida*. Desta forma, os fungos que entram em contato com o ser humano e animais podem causar alguns danos, que podem variar de micoses superficiais benignas (e.g. piedra nigra) até infecções mais severas (e.g. murcomicoses) (HAZEN, 1995). *Candida* e *Aspergillus* permanecem como a causa da maioria das infecções fúngicas, mas outros patógenos fúngicos menos comuns e emergentes estão sendo cada vez mais diagnosticados (KLEPSER, 2011).

A incidência de infecções fúngicas invasivas causadas por patógenos oportunistas, frequentemente caracterizada por altas taxas de mortalidade tem aumentado progressivamente ao longo das últimas três décadas (KONTOYIANNIS; MANTADAKIS; SAMONIS, 2003).

O surgimento de resistência fúngica aos antimicóticos clinicamente disponíveis como poliênos (anfotericina B), fluocitosina, azóis (fluconazol, miconazol e voriconazol) e equinocandinas (caspofungina), se tornou um problema de saúde pública no mundo (HE et al, 2003; HERNANDEZ et al, 2004; MOUDGAL et al., 2005; KROGH-MADSEN et al., 2006).

Há uma clara necessidade para a descoberta de novas estruturas com propriedades antifúngicas que possam levar ao desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas e tratamento de micoses. Uma característica estrutural presente em vários compostos biologicamente ativos com ação antifúngica é a presença do anel tiofeno (MEOTTI et al., 2003).

### 2.3 Derivado Tiofênico

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

Vários heterocíclicos 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-ditio-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 emtricitabina (Emtriva®) que é um antirretroviral que atua na inibição

da enzima transcriptase reversa do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), impedindo a replicação viral (SIQUEIRA et al., 2010).

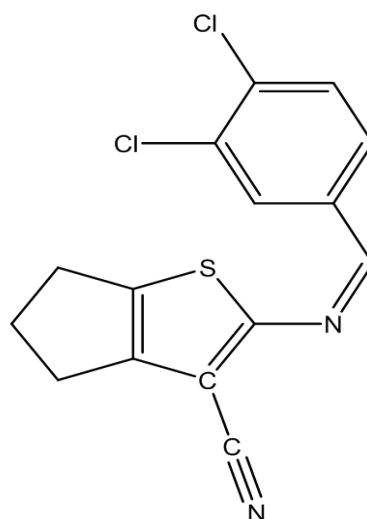
Na avaliação da atividade de compostos diarilamínicos contendo o núcleo benzo[b]tiofeno em sua estrutura, foi evidenciado que a natureza do esqueleto diarilamínico e os diferentes substituintes empregados ocasionaram variações tanto na seletividade quanto no tipo de atividade biológica. Sendo possível adquirir compostos com atividade frente a bactérias e outros com atividade antifúngica, com diferentes graus de potência (FERREIRA et al., 2004)

O derivado do benzo[b]tiofeno apresenta moderada 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-Junior et al. (2011), em que a atividade antifúngica de compostos derivados do tiofeno foi testada contra 44 cepas de fungos, incluído espécies *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 5CN05-LSVM

A molécula utilizada neste trabalho trata-se de um derivado 2-amino tiofeno com comprovada atividade antifúngica *in vitro* (MENDONÇA JUNIOR et al., 2011; SOUZA et al., 2012). A molécula estudada, a 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila, referida como 5CN05 (Figura 2), apresenta-se caracterizada macroscopicamente como um pó amorfo de coloração amarela. Apresenta como fórmula molecular  $C_{15}H_{10}N_2SCl_2$ ; massa molecular 320 g/mol e ponto de fusão entre 190-194 °C. Suas características biofarmacêuticas não estão elucidadas, principalmente no que se refere a permeabilidade. Contudo, o valor de seu coeficiente de partição ( $\log P = 5,98$ ) serve como indício de que a molécula possa apresentar baixa solubilidade e permeabilidade (GUIMARÃES, 2013).



**Figura 2-** Estrutura química da molécula do 5CN05-LSVM.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Produzir e caracterizar partículas poliméricas contendo um derivado tiofênico, 5CN05-LSVM, visando à obtenção de um sistema multiparticulado para liberação de fármaco de baixa solubilidade.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Produzir partículas de alginato de cálcio contendo 5CN05-LSVM através da técnica de gelificação ionotrópica;
- Desenvolver e validar a quantificação do fármaco no método utilizado;
- Avaliar e caracterizar as partículas obtidas quanto a seus aspectos macroscópicos, sua morfologia, taxa de encapsulação, rendimento e capacidade de intumescimento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais para produção e estudo das *beads*

#### 4.1.1 Equipamentos

- Agitador mecânico (FISATON 713 D); São Paulo - SP, Brasil
- Agitador magnético com aquecimento (IKA® RH BASIC 1); Campinas - SP, Brasil
- Balança analítica (OHAUS, AR 2140); Barueri - SP, Brasil
- Balança semi-analítica BEL Mark 500 (Bel®); De Pere, EUA
- Banho Maria (Solab SL 155/10); Piracicaba- SP, Brasil
- Sonda de ultrassom (Sonicador Unique Modelo Desruptor); Indaiatuba - SP, Brasil
- Banho de ultrassom (Unique USC 2800 A); Indaiatuba - SP, Brasil
- Espectrofotômetro UV/Visível UV mini 1240 Shimadzu; São Paulo - SP, Brasil
- Máquina digital (Sony Steady Shot DSC-S1900 10.1 mega pixels);
- Microscópio Eletrônico de Varredura (modelo TM-1000, marca Hitachi); Krefeld, Alemanha
- Purificador de água Osmose Reversa OS10 LX (GEHAKA®); São Paulo - SP, Brasil

#### 4.1.2 Substâncias

- 5CN05 (Grupo de Pesquisa LSVM-UEPB)
- Alginato de sódio P.A (Sigma-Aldrech); São Paulo - SP, Brasil
- Cloreto de cálcio anidro P.A (Dinâmica); Diadema - SP, Brasil
- Clorofórmio P.A. (Fmaia); São Paulo - SP, Brasil
- Acetonitrila grau cromatográfico (J.T. Baker); EUA
- Acetonitrila UV/HPLC (Vetec, Brasil)
- Polissorbato 80 (Via Farma); São Paulo- SP, Brasil
- Triglicerídeo de Ácido Cáprico (Via Farma); São Paulo- SP, Brasil
- Água deionizada obtida através de osmose reversa (GEHAKA, Brasil).
- Fosfato de sódio Bibásico anidro – (VETEC) Duque de Caxias- RJ, Brasil
- Fosfato de potássio monobásico anidro – (Dinâmica)- Diadema - SP, Brasil



- Ácido Clorídrico (VETEC) - Duque de Caxias- RJ, Brasil

#### **4.1.3 Diversos**

- Dessecador,
- Papel filtro;
- Ponteira de micropipeta (10 $\mu$ L);
- Peneira de malha fina;
- Suporte universal,
- Bureta;
- Béqueres;
- Recipientes plásticos;
- Seringas de 5 ml e 10 ml;
- Bastão de vidro;
- Vidros de relógio,
- Papel manteiga.

#### **4.1.4 Software**

Excel – Windows 7

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparação das *beads*

#### 4.2.1.1 Planejamento fatorial

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

Na realização dos testes, o volume de solução do polímero Alginato de Sódio, e a quantidade de emulsão contendo o fármaco 5CN05-LSVM variaram de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$  (Tabela 1).

**Tabela 1-** Quantidade de solução de alginato de sódio e de emulsão contendo 5CN05- LSVM, para formarem as *beads* conforme os níveis do Planejamento fatorial.

| FATORES                | NÍVEIS     |           |
|------------------------|------------|-----------|
|                        | -1 (Baixo) | +1 (Alto) |
| Alginato de Sódio      | 10ml       | 15ml      |
| Emulsão com 5CN05-LSVM | 5ml        | 10ml      |

Conforme o planejamento do estudo foi utilizado  $2^2 = 4$  ensaios, cujas composições estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2-** Proporção conforme o planejamento fatorial da quantidade usada de solução de alginato de sódio e de emulsão contendo 5CN05, para o método de Gelificação Ionotrópica.

| Solução de Alginato de Sódio (ml) |    | Emulsão com 5CN05-LSVM (ml) |    |
|-----------------------------------|----|-----------------------------|----|
| -1                                | 10 | -1                          | 5  |
| -1                                | 10 | +1                          | 10 |
| +1                                | 15 | -1                          | 5  |
| +1                                | 15 | +1                          | 10 |

#### **4.2.1.2 Preparação da solução de cloreto de cálcio a 10%.**

Foram pesados em um béquer 10g de cloreto de cálcio utilizando balança semi-analítica. A essa massa foi acrescentada água destilada e  $\text{CaCl}_2$  dissolvido com auxílio de um bastão de vidro. A solução resultante foi transferida para um balão de 100ml sendo completado até a aferição com água destilada.

#### **4.2.1.3 Preparação da solução de alginato de sódio 3,5%.**

Uma alíquota de 3,5g de alginato de sódio foi pesada em balança semi-analítica e dissolvida em 96,5g de água destilada a temperatura de 70°C, sendo agitada até dissolução total do polímero. A solução foi então submetida a agitação mecânica a 2.000rpm durante 10 minutos e posteriormente deixada em repouso por 24 horas.

#### **4.2.1.4 Preparação da emulsão contendo 5CN05 à 0,1%.**

Foram pesados em balança analítica, 30% do óleo Triglicérides de Ácido Cáprico, 15% de Tween 80, 0,1% do 5CN05-LSVM, e o restante da proporção de água destilada. O óleo e o tensoativo foram rapidamente homogeneizados manualmente com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, foi adicionado o fármaco à mistura, e continuou-se a homogeneização. O conteúdo foi levado ao sonicador e passou por 3 ciclos de (1min.), na potência de 65W, seguida de 3 banhos de ultrassom por (1min.), que foram intercalados com o sonicador, procedimento realizado para que o fármaco fosse disperso nos outros componentes.

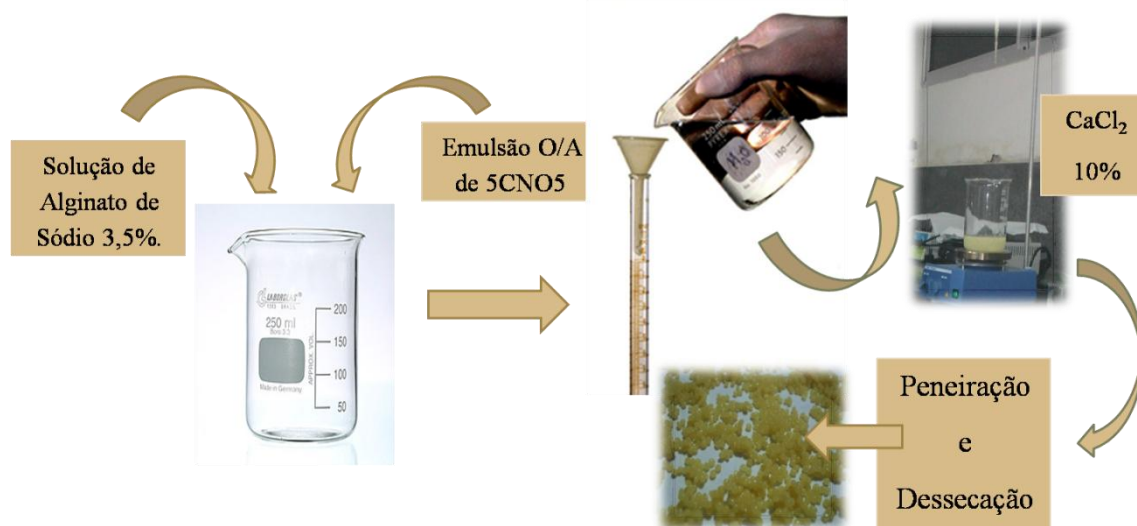
Posteriormente, a água foi sendo adicionada aos poucos e homogeneizada com bastão seguindo novamente para o sonicador. Esse processo seguiu-se até a completa solubilização de todas as substâncias presentes, obtendo uma emulsão que após 24 horas em repouso manteve-se estável, não havendo separação de fases.

#### **4.2.1.5 Preparação das partículas pelo método de gelificação ionotrópica (BOYLAN et al, 1994)**

Na preparação do 5CN05-LSVM encapsulado foi misturada à solução de alginato de sódio a 3,5%, a emulsão contendo o 5CN05-LSVM a 0,1%, sendo esta mistura homogeneizada manualmente. Em seguida gotejou-se a mistura com auxílio de uma bureta de vidro, com uma ponteira de 10 $\mu\text{L}$  acoplada a sua ponta, em uma solução de cloreto de cálcio

(CaCl<sub>2</sub>) a 10%, e manteve-se sob agitação magnética até cessar o gotejamento. Após esta etapa, as esferas formadas mantiveram-se em repouso na solução de CaCl<sub>2</sub> por 30 minutos.

Em seguida, as *beads* de alginato de cálcio constituídas de 5CN05-LSVM, foram mantidas sem agitação. Logo após, elas foram separadas da solução de CaCl<sub>2</sub> por filtração utilizando peneira, e lavadas com água destilada em abundância para que todo o cloreto de cálcio que estava na superfície fosse eliminado. Posteriormente as partículas foram espalhadas sobre um papel filtro e mantidas a temperatura ambiente até a retirada do excesso de umidade, evidenciado pela secagem do papel. Então elas eram transferidas para um dessecador onde ficavam no processo de secagem por cinco dias (120 horas), sendo apenas trocada a sílica (Figura 3).



**Figura 3-** Fluxograma de obtenção dos grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN05-LSVM.

## 4.2.2 Desenvolvimento e validação para quantificação do 5CN05-LSVM

Devido a inexistência de métodos normalizados ou farmacopéicos para avaliação do 5CN05-LSVM em produtos farmacêuticos, faz-se necessário desenvolver e validar metodologias analíticas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV/VIS) para quantificação desta molécula no sistema em estudo (GUIMARÃES et al., 2013).

### 4.2.2.1 Desenvolvimento do método analítico

A fim de se definir o comprimento de onda de detecção para análise quantitativa do fármaco no sistema, foi realizada inicialmente uma varredura espectrofotométrica de soluções contendo o fármaco entre os comprimentos de onda de 300 a 600nm, como afirma Guimarães et al., (2013), para isso foi utilizada uma solução de 1mg/mL do 5CN05-LSVM em clorofórmio, e diluições da mesma no solvente acetonitrila.

#### **4.2.2.2 Validação do método analítico**

A validação foi realizada conforme a RE 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, com o objetivo de demonstrar que o método é apropriado para a determinação quantitativa do fármaco e assegurar a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). 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.

A seletividade do método foi avaliada pela comparação das curvas espectrais obtidas da análise de amostras dos grânulos sem o fármaco (amostra branca) e dos grânulos contendo o fármaco.

O parâmetro de linearidade deve ser avaliado a partir da análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, sendo os resultados tratados por métodos estatísticos adequados para a determinação do coeficiente de correlação ( $r$ ), intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O coeficiente de correlação deve ser no mínimo, 0,99 (BRASIL, 2003).

Para a construção das curvas analíticas foram realizadas soluções padrão ( $n=3$ ) de 1mg/mL obtida pela dissolução de 10mg do 5CN05 em 10mL de clorofórmio. . Em seguida, diluiu-se 750 $\mu$ L desta solução em 10mL de acetonitrila, obtendo-se uma solução (S1) com concentração de 75 $\mu$ g/mL. A partir desta solução (S1) foram feitas diluições seriadas em acetonitrila, sendo obtidas 16 concentrações teóricas (4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 18, 19, 20 $\mu$ g/mL). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente para determinação da equação da reta (método dos mínimos quadrados) e dos coeficientes de correlação e determinação. 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.

A exatidão do método foi determinada por intermédio de análises em três diferentes níveis de concentração, sendo uma em baixa, uma em média e outra em alta concentração (6,

12, 18 $\mu\text{g/mL}$ ), em três repetições e expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

A precisão do método espectrofotométrico foi determinada avaliando a precisão intermediária (precisão inter-corrída), através da leitura em sextuplicata na concentração do ponto médio da curva de calibração (12 $\mu\text{g/mL}$ ), e a repetitividade (precisão intra-corrída), da respectiva concentração, em dois dias distintos por dois analistas diferentes; sendo expressas como coeficiente de variação (CV%) segundo a fórmula:  $CV = DP/CMD$ , em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

A robustez do método foi observada através de variações ocasionadas pela marca do solvente acetonitrila adquirida por dois diferentes fornecedores, e por dois diferentes aparelhos espectrofotométricos.

O limite de detecção é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser detectado pelo método que está sendo validado, porém não necessariamente quantificado. Ele pode ser calculado por meio da razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração do ensaio de linearidade e média dos coeficientes angulares das curvas multiplicados por 3,0 (Equação 1).

(1)

Onde:

LD= Limite de detecção;

DP= Desvio Padrão;

IC= Média os coeficientes angulares das respectivas curvas.

O limite de quantificação (Equação 2) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, sendo calculado da mesma forma que o limite de detecção, porém, multiplicando-se os valores por 10,0 (Brasil, 2003).

(2)

Onde:

LQ= Limite de Quantificação;

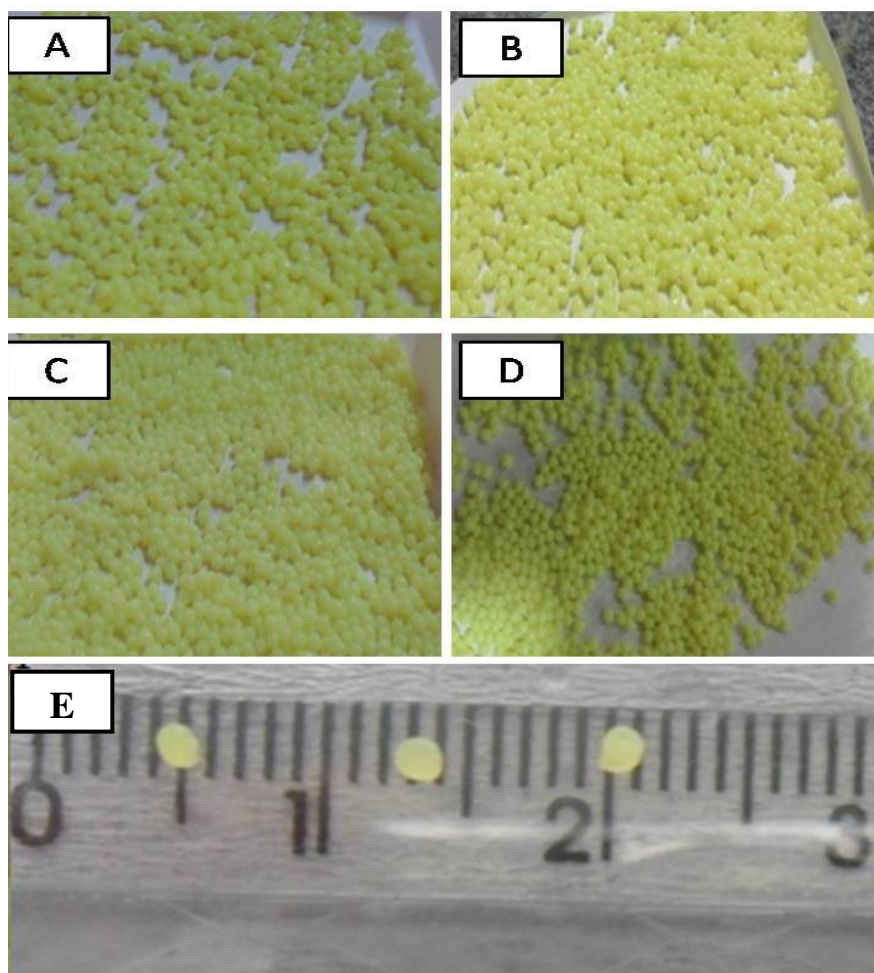
DP= Desvio Padrão;

IC= Média os coeficientes angulares das respectivas curvas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2 Preparação das *beads* contendo o fármaco 5CN05-LSVM

Os grânulos de alginato de cálcio foram possíveis de serem obtidos por gelificação ionotrópica a partir de um sistema emulsionado O/A que continha o fármaco de baixa solubilidade disperso na fase interna. Observa-se que a concentração de polímero utilizada, a concentração de  $\text{CaCl}_2$ , e o tempo de reação com esta solução gelificante foram suficientes para se obter partículas macroscopicamente homogêneas, amareladas devido a cor do fármaco, aproximadamente esféricas e sem agregados (Figura 4).



**Figura 4-** Análise macroscópica das diferentes amostras de grânulos contendo 5CN05-LSVM obtidos por método de gelificação ionotrópica.

Legenda: A: amostra A; B: amostra B; C: amostra C; D: amostra D; E: Grânulos contendo 5CN05-LSVM escolhidos aleatoriamente comparados em uma escala centimétrica.

Os grânulos obtidos por gelificação ionotrópica podem ser utilizados como sistemas transportadores de fármacos por apresentarem 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).

### 5.3 Desenvolvimento do método analítico

#### 5.3.1 Determinação do comprimento de onda de detecção

Através da varredura espectrofotométrica na faixa de 300 a 600nm, utilizando uma solução de 5CN05-LSVM 10 $\mu$ g/mL, determinou-se o comprimento de onda  $\lambda$ = 388nm, onde o fármaco apresentou pico de absorção máxima. Este valor de  $\lambda$  foi considerado adequado para detecção do fármaco, utilizando um espectrofotômetro com detector UV-VIS, no desenvolvimento e validação do método analítico (Figura 5).



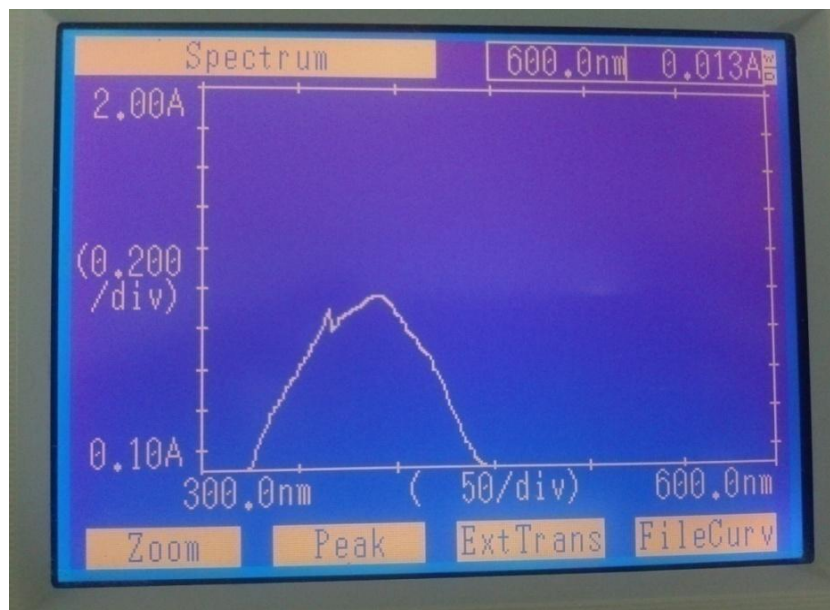
**Figura 5-** Espectro de varredura do 5CN05-LSVM no UV MINI - 1240 (Shimadzu), onde pode ser observado o  $\lambda$  máximo de absorção em 388nm.

#### 5.3.2 Especificidade (seletividade)

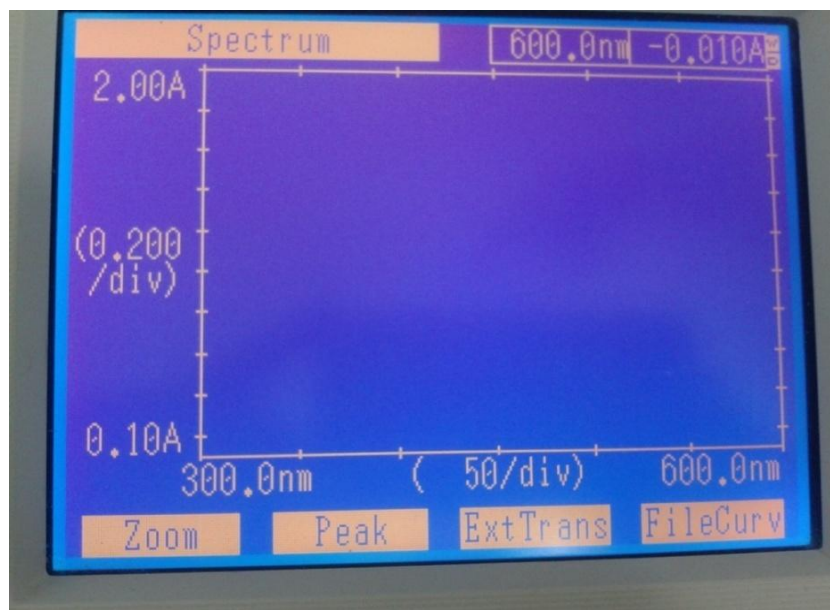
A metodologia desenvolvida demonstrou ser seletiva, uma vez que no comprimento de onda encontrado para o fármaco (388nm) não foram evidenciados picos interferentes relacionados aos componentes da formulação. Este fato é evidenciado ao comparar os



espectros das amostras dos grânulos contendo o fármaco, com os espectros das amostras dos grânulos sem o fármaco (Figura 6 e 7, respectivamente).



**Figura 6-** Espectro de varredura das amostras de grânulos contendo o fármaco 5CN05- LSVM.



**Figura 7-** Espectro de varredura das amostras de grânulos sem o fármaco (branco).

### 5.3.3 Linearidade

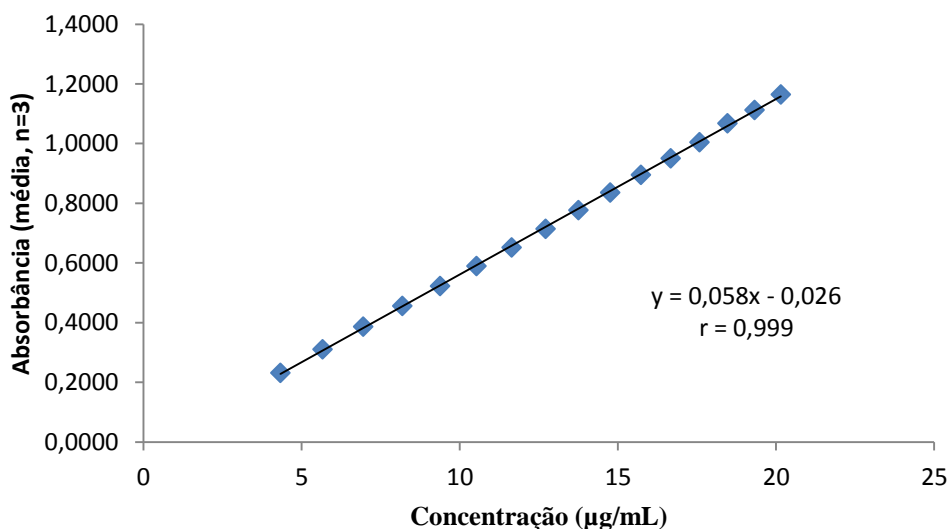
Os resultados obtidos das corridas das 16 diferentes concentrações do fármaco, em triplicata são mostrados na Tabela 3, a curva obtida, assim como o coeficiente de correlação linear e a equação da reta são apresentados na Figura 8.

**Tabela 3-** Dados utilizados na construção da curva de calibração do 5CN05-LSVM.

| Concentração (µg/mL) | Abs 1  | Abs 2  | Abs 3  | Média  | DP*    | CV* (%)    |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|
| 4                    | 0,2310 | 0,2290 | 0,2360 | 0,2320 | 0,0036 | 1,55411693 |
| 6                    | 0,3060 | 0,3180 | 0,3090 | 0,3110 | 0,0062 | 2,00803794 |
| 7                    | 0,3920 | 0,3880 | 0,3810 | 0,3870 | 0,0056 | 1,4386988  |
| 8                    | 0,4650 | 0,4550 | 0,4490 | 0,4563 | 0,0081 | 1,77127183 |
| 9                    | 0,5360 | 0,5210 | 0,5120 | 0,5230 | 0,0121 | 2,31823244 |
| 11                   | 0,6050 | 0,5850 | 0,5800 | 0,5900 | 0,0132 | 2,24216213 |
| 12                   | 0,6680 | 0,6470 | 0,6420 | 0,6523 | 0,0138 | 2,11489035 |
| 13                   | 0,7320 | 0,7120 | 0,7000 | 0,7147 | 0,0162 | 2,26200665 |
| 14                   | 0,7960 | 0,7730 | 0,7630 | 0,7773 | 0,0169 | 2,1768508  |
| 15                   | 0,8540 | 0,8340 | 0,8210 | 0,8363 | 0,0166 | 1,98763773 |
| 16                   | 0,9090 | 0,8890 | 0,8890 | 0,8957 | 0,0115 | 1,2892079  |
| 17                   | 0,9670 | 0,9410 | 0,9450 | 0,9510 | 0,0140 | 1,4721346  |
| 18                   | 1,0240 | 0,9930 | 0,9980 | 1,0050 | 0,0115 | 1,14351527 |
| 18                   | 1,0750 | 1,0670 | 1,0630 | 1,0683 | 0,0115 | 1,07572497 |
| 19                   | 1,1280 | 1,1000 | 1,1110 | 1,1130 | 0,0115 | 1,03255422 |
| 20                   | 1,1800 | 1,1430 | 1,1720 | 1,1650 | 0,0121 | 1,03482143 |

\*Abs = Absorbância; \*DP= Desvio Padrão; \*CV= Coeficiente de variação

Para o coeficiente de variação o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%, segundo a RE nº899/2003, o que se confirma, nos valores demonstrados na Tabela 3, a regularidade da afirmativa.

**Figura 8-** Curva de calibração do 5CN05-LSVM

O método apresentou-se linear em uma faixa de 4 a 20µg/mL. A curva analítica ( $y = 0,058x - 0,026$ ), obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de

correlação ( $r$ ) igual a 0,999, estando em concordância com os critérios estabelecidos pela RE 899/2003 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.

### 5.3.4 Exatidão

O resultado das análises em triplicata das 3 concentrações (baixa, média e alta) do 5CN05-LSVM, conforme pode ser observado na Tabela 4, mostra que o método em análise pode ser considerado exato, visto que se encontraram dentro dos limites estabelecidos pela RE 899/2003 que é de 98 a 102% (BRASIL, 2003).

**Tabela 4-** Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.

| Parâmetro       | Concentração Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Concentração Obtida (média $\pm$ DP*; n=3) | Exatidão (%) |
|-----------------|---|--|--------------|
| <b>Exatidão</b> | 6,00                                      | 5,8965 $\pm$ 0,0020                        | 98,2750      |
|                 | 12,00                                     | 11,9258 $\pm$ 0,0032                       | 99,3816      |
|                 | 18,00                                     | 18,1344 $\pm$ 0,0115                       | 100,7466     |

\*DP: Desvio Padrão

### 5.3.5 Precisão

A Tabela 5 expressa os valores obtidos durante a determinação da precisão do método. Foram determinadas a repetibilidade (inter-corrída) e a precisão intermediária (intra-corrída). Conforme a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2003), a repetibilidade do método foi avaliada a partir da injeção em sextuplicata do ponto médio da curva de calibração (12 $\mu\text{g/mL}$ ). Já para a precisão intermediária, as amostras foram analisadas em dias distintos e por analistas diferentes.

**Tabela 5-** Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

| Analista   | Dia   | Concentração nominal ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | Concentração obtida (média $\pm$ DP*; n=6) | Precisão (CV* %) | Exatidão (%) |
|------------|-------|--|--|------------------|--------------|
| Analista 1 | Dia 1 | 12   | 11,9603 $\pm$ 0,0053                       | 0,7914           | 99,66        |
|            | Dia 2 | 12   | 11,9482 $\pm$ 0,0183                       | 2,7441           | 99,57        |
| Analista 2 | Dia 1 | 12   | 11,9603 $\pm$ 0,0031                       | 0,4568           | 99,67        |
|            | Dia 2 | 12   | 11,9483 $\pm$ 0,0205                       | 3,0653           | 99,57        |

\*DP: Desvio Padrão; \*CV: Coeficiente de Variação

O coeficiente de variação seguiu-se com um valor menor que 5, e a exatidão continuou demonstrando-se próxima a 100%, condizentes com a RE n° 899/2003 .

### 5.3.6 Robustez

Ao observar os resultados apresentados na Tabela 6, constatou-se que o método apresentou robustez intrínseca, uma vez que ao analisar amostras na concentração de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$  em triplicata e em diferentes condições (diferentes fabricantes do solvente, e diferentes espectrofotômetros), as respostas mantiveram-se dentro das especificações exigidas pela legislação.

**Tabela 6-** Resultados do ensaio para verificação da robustez do método.

| Modificações  | Solvente acetonitrila (F1)* | Solvente acetonitrila (F2)* | Espectro (E1)(F1)*   | Espectro (E2)(F2)*   |
|---|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------|
| Concentração Nominal ( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) | 12,00                       | 12,00                       | 12,00                | 12,00                |
| Concentração Obtida (média $\pm$ DP*; n=3)            | 11,9086 $\pm$ 0,1770        | 13,0568 $\pm$ 0,0076        | 11,9086 $\pm$ 0,1770 | 10,5810 $\pm$ 0,0015 |
| Precisão (CV*, %)                                     | 0,4829069                   | 1,042917                    | 0,4829069            | 0,259489             |
| Exatidão (%)  | 100,76                      | 108,80                      | 100,76               | 88,175               |

\*F1= Fabricante 1 (Vetec); \*F2= Fabricante 2 (J.T. Baker); \*CV: Coeficiente de Variação; \*DP: Desvio Padrão

### 5.3.7 Limite de Detecção

Para este método o limite de detecção encontrado, foi 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.3.8 Limite de Quantificação

O limite de quantificação obtido foi de  $1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 5.4 Caracterização dos grânulos (*beads*) de alginato de cálcio contendo o fármaco 5CN05-LSVM

### 5.4.1 Desenho dos experimentos

Neste estudo foram preparadas 4 formulações diferentes para obtenção dos grânulos, variando-se as quantidades de solução de alginato de sódio 3,5% (p/p) e da emulsão contendo 5CN05-LSVM 0,1% (p/v), de acordo com a Tabela 7. Nesta avaliação foi mantida constante a concentração de  $\text{CaCl}_2$  a 10%.

**Tabela 7-** Formulações com as diferentes proporções de solução de alginato de sódio 3,5% e emulsão de 5CN05-LSVM 0,1% em cada amostra.

| Amostras | Polímero<br>(solução de alginato de sódio 3,5%) | Ativo em estudo<br>(emulsão de 5CN05-LSVM 0,1%) |
|----------|---|---|
|          | Quantidade (ml)                                 | Quantidade (ml)                                 |
| <b>A</b> | 10  | 5   |
| <b>B</b> | 10  | 10  |
| <b>C</b> | 15  | 5   |
| <b>D</b> | 15  | 10  |

### 5.4.2 Determinação da Taxa de Carregamento

Para determinação da taxa de carregamento, uma massa fixa 0,1g de grânulos contendo o fármaco foi triturada em clorofórmio. 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  $12\mu\text{g/mL}$ . Esse procedimento foi realizado com cada amostra separadamente, em triplicata. As soluções foram lidas em espectrofotômetro.

A taxa de carregamento foi expressa como resultado percentual entre a concentração obtida de 5CN05-LSVM em relação à concentração teórica de  $12\mu\text{g/mL}$ .

A porcentagem de fármaco presente nas amostras analisadas é apresentada na Tabela 8.

**Tabela 8-** Determinação da taxa de carregamento dos grânulos contendo o 5CN05-LSVM.

| AMOSTRAS | CONCENTRAÇÃO TEÓRICA ( $\mu\text{g/ml}$ ) | CONCENTRAÇÃO OBTIDA ( $\mu\text{g/ml}$ )<br>MÉDIA $\pm$ DP* (N=3) | TAXA DE CARREGAMENTO (%) |
|----------|---|---|--------------------------|
| A        | 12  | 6,7806 $\pm$ 0,0049   | 56,5051                  |
| B        | 12  | 9,1786 $\pm$ 0,0049   | 76,4881                  |
| C        | 12  | 8,8129 $\pm$ 0,0028   | 73,44104                 |
| D        | 12  | 9,5272 $\pm$ 0,0084   | 79,39342                 |

\*DP: Desvio Padrão

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 carregamento 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 baixo peso molecular e baixa solubilidade, que apresentaram taxa de carregamento variando de 4,5 a 11,2%, demonstrando que o peso molecular influenciava na baixa taxa de encapsulação, e que o fármaco com menor solubilidade em água apresentava menor capacidade de ser incorporado ao sistema.

Segundo o exposto, a quantidade de fármaco que se conseguiu incorporar nas *beads* de alginato de cálcio durante o processo de gelificação do alginato com íons  $\text{Ca}^{++}$  obteve resultados superiores a 50%, a amostra D apresentou quase 80% de taxa de carregamento, valor este considerado satisfatório, tendo em vista a hidrofobicidade da molécula em estudo.

Queiroz (2011), apresentou em seu estudo uma variação de 69,4 a 81,18% na taxa de carregamento dos grânulos obtidos com 7 diferentes fármacos. Segundo a autora, essa diferença estava relacionada a lipofilicidade e solubilidade em água dos compostos, sugerindo que a taxa de carregamento foi influenciada pela 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.

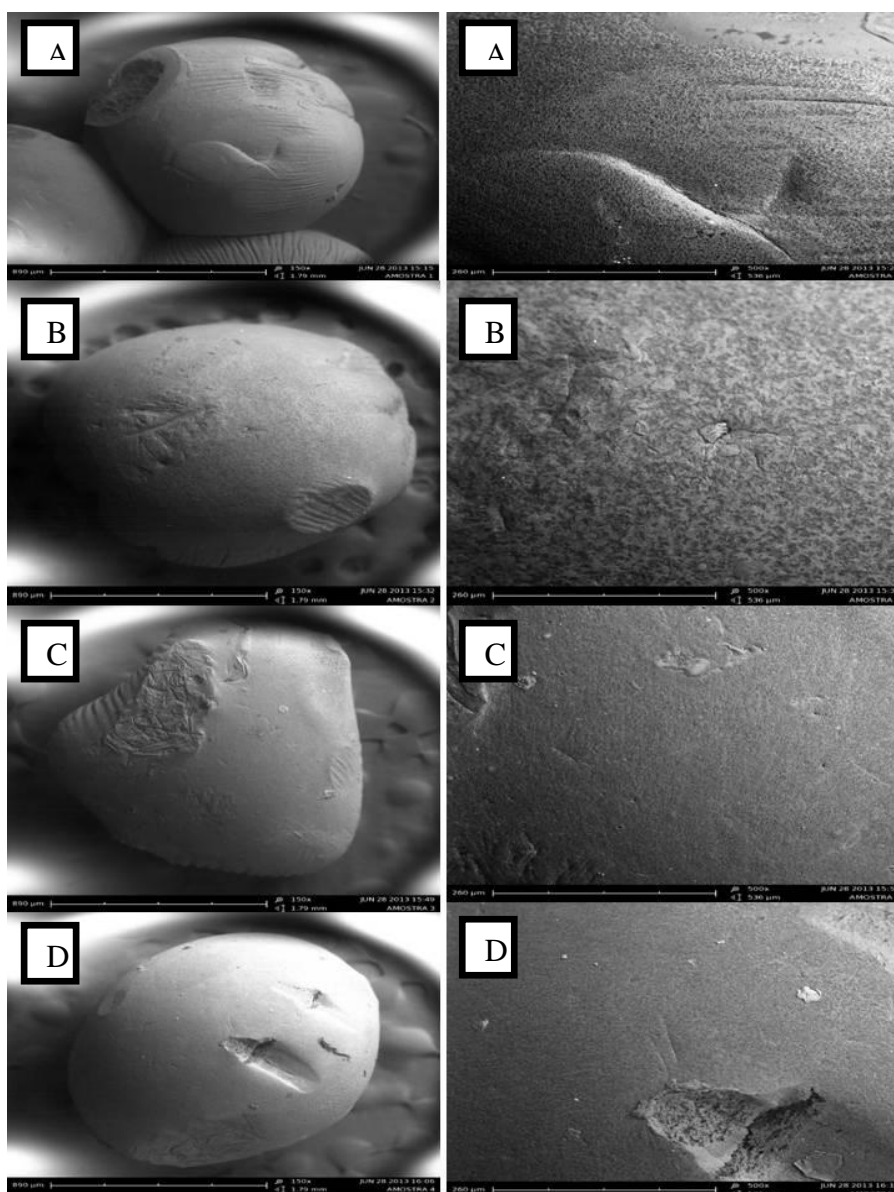
Jay e Saltzman (2009), obtiveram partículas de alginato com diferentes íons reticulantes ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ ) e observaram que a taxa de carregamento das partículas era influenciada pelo tipo de íon utilizado.

Alguns estudos demonstram que a concentração de  $\text{CaCl}_2$  influencia na taxa de carregamento do fármaco, porém há contradições, visto que em Takka, Ocak e Acarturk (1998), o aumento na concentração de  $\text{CaCl}_2$  ocasionou um aumento na taxa, enquanto que no estudo de Jay e Saltzman (2009), a concentração não influenciou na taxa de carregamento.

Segundo Ghosal e Ray (2011), o tempo de reação com a solução de cloreto de cálcio após a formação dos grânulos é um parâmetro importante na avaliação da taxa de carregamento. Ele relata em seu estudo uma eficiência na encapsulação acima de 78% quando o tempo de reação foi de 30 minutos, parâmetro esse seguido no estudo.

#### **5.4.3 Análise Morfológica dos grânulos de Alginato de Cálcio contendo 5CN05-LSVM por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).**

A análise morfológica dos grânulos de alginato de cálcio carregadas com o 5CN05-LSVM foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) com aumentos de 150x e 500x. A análise demonstrou grânulos aparentemente similares, ovais, com superfície lisa, porém com fissuras. As amostras apresentaram pontos esbranquiçados em sua superfície, provavelmente pela presença de resquícios de íons cloro que pode não ter sido eliminados totalmente com a lavagem dos grânulos após sua formação (Figura 9).



**Figura 9-** Análise morfológica por MEV dos grânulos de alginato de cálcio contendo o fármaco 5CN05-LSVM.

Legenda: Aumento de 150x (à esquerda) e de 500x (à direita).

#### 5.4.4 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, 5CN05-LSVM, Ácido Cáprico e Tween 80), sendo expresso em termos percentuais (Tabela 9).



**Tabela 9-** Determinação do cálculo de rendimento.

| AMOSTRAS | RENDIMENTO % |
|----------|--------------|
| A        | 80,79        |
| B        | 75,82        |
| C        | 93,11        |
| D        | 71,83        |

As amostras apresentaram rendimento acima de 70%. A perda de massa que ocorre durante o processo de produção, acontece principalmente devido ao resto de mistura de alginato e emulsão que ficam retidas na bureta, ocasionando a diminuição no rendimento. A amostra C foi a que obteve maior rendimento, podendo ter sido ocasionado pelo melhor escoamento na bureta. 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.

#### 5.4.5 Estudo de Intumescimento e Erosão

A capacidade de intumescimento e a erosão dos grânulos de alginato contendo o fármaco foram avaliadas pelo percentual de variação de peso (%VP) dos grânulos quando estes eram colocados em solução (meio 1, meio 2 e meio 3). Foram pesados cuidadosamente 0,05g de grânulos secos e colocados em 3 meios diferentes. O meio 1 foi uma solução de simulação do fluido gástrico (FG) sem pepsina, o meio 2 uma solução tampão fosfato pH 7,4 (TF), e o meio 3 continha água destilada. A solução de simulação do FG foi preparada por dissolução de 2g de cloreto de sódio em 7mL de HCl concentrado em 1L de água purificada, a solução TF foi preparada a partir de soluções de fosfato de potássio monobásico e bibásico.

Em intervalos de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos, os grânulos foram retirados, sutilmente enxugados em papel toalha e pesados. A variação do peso das amostras foi calculada conforme Equação 3.

Onde:

$P_f$  = Peso Final;

$P_i$  = Peso inicial.

Segundo Wang et al., (2010), o comportamento de intumescimento é uma importante propriedade para o sistema de liberação, pois tem grande influência no perfil de liberação do fármaco.

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 um 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 (EL-GIBALY, 2002; LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Em sistemas hidrogel, o grau de intumescimento é reflexo da concentração do agente reticulante ( $\text{CaCl}_2$ ), 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).

Nesse teste, que foi utilizada uma concentração de 10% (p/v) de solução de  $\text{CaCl}_2$  e tempo de reticulação de 30 minutos, a variação de peso dos grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN05-LSVM avaliados em solução de simulação de fluido gástrico (FG), tampão fosfato (TF) e água, estão sumarizados na Tabela 10. Observa-se que as esferas quando em meio de simulação de fluido gástrico sofreram 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, permanecendo praticamente sem alteração até as 2h de estudo.

O comportamento das partículas é totalmente diferente quando em TF pH 7,4, onde observou-se que elas intumescem significativamente em 30 minutos, cerca de três a quatro vezes mais que o acontecido na simulação do fluido gástrico quando comparado o mesmo espaço de tempo. Posteriormente, o intumescimento é acompanhado de desintegração e perda estrutural das partículas após 30 minutos de observação, confirmando o que diz Ghosal, Ray (2011).

O uso de polímeros formadores de hidrogel representa uma alternativa promissora como materiais para encapsulação. Os alginatos e poloxâmeros incham e gelificam na água retendo

uma significante fração de água nas suas estruturas sem dissolver (GOMBOTZ; HOFFMANN 1986). Quando o meio utilizado foi água, não houve mudança significativa dos grânulos, apenas provável preenchimento dos espaços vazios existentes na rede polimérica, como citado no meio de fluido gástrico (Tabela 10).

**Tabela 10-** Variação de peso dos grânulos após 30 minutos e 2 horas em diferentes meios.

| Amostras | % VP<br>FG | % VP<br>FG | % VP<br>TF | % VP<br>TF        | % VP<br>Água | % VP<br>Água |
|----------|------------|------------|------------|-------------------|--------------|--------------|
|          | 30´        | 2h         | 30´        | *90´, 105´ e 120´ | 30´          | 2h           |
| A        | 56         | 52         | 212        | Desintegração     | 34           | 46           |
| B        | 38         | 40         | 124        | Desintegração     | 44           | 82           |
| C        | 70         | 56         | 274        | Desintegração     | 38           | 44           |
| D        | 56         | 54         | 164        | Desintegração     | 62           | 54           |

% VP= variação de peso; FG = Fluido Gástrico pH 1,2; TF = Tampão Fosfato pH 7,4; \* as partículas degradaram-se em 90 minutos.

## 6 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido se mostrou seletivo, específico, preciso, exato e robusto, podendo-se concluir que ele é adequado para quantificação do 5CN05-LSVM durante os estudos para verificação da taxa de carregamento.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que foi possível obter sistemas multiparticulados biodegradáveis a partir de uma emulsão contendo fármaco e um biopolímero, pelo método de gelificação ionotrópica, de forma fácil, simples, reprodutível, com custo reduzido e bons rendimentos. Todas as amostras apresentaram boa capacidade de incorporação do fármaco altamente hidrofóbico, com destaque para amostra D que apresentou uma melhor taxa de encapsulação. Os testes de intumescimento e erosão mostraram que o sistema é resistente ao fluido gástrico.

Sendo portanto um promissor sistema de liberação sítio-específico para administração oral dos novos compostos derivado do tiofeno com ação antifúngica, tendo em vista sua liberação a nível intestinal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTABROUCHAD, C.; DOELKER, E. Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs. **STP Pharma Sci.**, Paris, v. 2, p. 365-380, 1992.

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.

ARAÚJO J.C.L.V., LIMA E.O., CEBALLOS B.S.O., FREIRE K.R.L., et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista Patol Trop**, v. 33, p. 55-64, 2004.

ASTIER, A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 64, n. 1, p. 23-35. 2006.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal - As bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. Porto Alegre: Editora Artmed. 2001.

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

BOYLAN, J. C.; BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. SWARBRICK, J. Microsphere technology and applications. In: **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. New York: Marcel Dekker, v. 10, p. 1-29, 1994.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2003.

BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C., eds. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. New York: Marcel Dekker, v. 10, p. 1-29, 1994.

CECHINEL F. V.; BRESOLIN, T. M. B. **Ciências Químico-Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: Editora Univali, p. 24-31, 2003.

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, 2007.

DALMORA, M. E., et al. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, n. 1, p. 45-55. 2001.

DAMASCENO, B. P. G. L. **Sistemas microemulsionados como carreador lipídico para fármacos insolúveis**. 2010. 61f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2010.

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.; CALHELHA, R. C.; ESTEVINHO, L. M.; QUEIROZ, M-J. R. P. 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.

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, 2011.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: overview. **STP Pharma Sci.**, v.5, p. 276-290, 1995.

GOMBOTZ, W. R.; HOFFMANN, A. S.; Immobilization of biomolecules and cells on and within synthetic polymeric hydrogels, in: N.A. Peppas (Ed.), **Hydrogels in Medicine and Pharmacy**, CRC Press Boca Raton, p. 95 – 126, 1986.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, San Diego, v. 31, p. 267- 285, 1998.

GUIMARÃES, G. P. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsão antifúngica contendo derivado de tiofeno**. 2013. 120f. (Dissertação) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, 2013.

GIMARÃES, G. P.; PATRIOTA, Y. G.; SILVA, N. E. S; SOUSA, C.E.M.; MENDONÇA-JUNIOR, F.J. B., et al. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. No prelo 2014.

HAZEN K. C. New and emerging pathogen yeasts. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, p. 462-478, 1995.

HE, Y. et al. 2-piperidin-4-yl-benzimidazoles with broad spectrum antibacterial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 19, p. 3253-3256, 2003.

HERNANDEZ, S. et al. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: Correlating clinical outcome with laboratory susceptibility testing of three isogenic isolates serially obtained from a patient with progressive *Candida* esophagitis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 1382-1383, 2004.

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.

KAS, H. S.; ONER, L. Microencapsulation using coacervation / phase separation: an overview of the technique and applications. In: WISE, D. L., ed. **Handbook of Pharmaceutical controlled release technology**. New York: Marcel-Dekker, p. 301-328, 2000.

KATRITZKY, A. R. et al. QSAR modeling of the antifungal activity against *Candida albicans* for a diverse set of organic compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 7055-7069, 2008

KLEPSEK, M. P. The value of amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. **Journal of Critical Care**, v. 26, p. 255, 2011.

KONTOYIANNIS, D. P; MANTADAKIS, E.; SAMONIS, G. Systemic mycoses in the immunocompromised host: an update in antifungal therapy. **Journal Hosp. Infect**, v. 53, p. 243-58, 2003.

KROGH-MADSEN, M. et al. Amphotericin B and caspofungin resistance in *Candida glabrata* isolates recovered from a critically ill patient. **Clin Infect Dis**, v. 42, p. 938-944, 2006.

LIMA, A. M. F.; ANDREANI L. E SOLDI V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 832-837, 2007.

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, 2006.

LIMA, L. M.; Química Medicinal Moderna: Desafios e contribuição brasileira, **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 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, p. 143-154, 2005.

MENDONÇA-JUNIOR, F.J. B.; LIMA-NETO, R.G.; OLIVEIRA, T.B.; LIMA, M.C.A., 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.

MEOTTI, F. C. et al. Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 37, p. 37- 44, 2003.

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

MOUDGAL, V. et al. Multiechinocandin and multiazole-resistant *Candida parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 767-769, 2005.

NETO, M. M. et al. Candidíase em pacientes transplantados renais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 485-491, 1997.

OLIVEIRA R. B.; LIMA E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.

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

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, 2007.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery, **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, p. 447-451, 2001.



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.

QUEIROZ, L. R. T., **Avaliação De Sistemas Sólidos Particulados, Gastrorretensivos flutuantes, obtidos por geleificação ionotrópica**. 2011. 95f. (Dissertação) apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2011.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; WELLER, P. J. **Handbook of pharmaceutical excipients**. Great Britain: Pharmaceutical Press. 4ed. 2003.

RYBAK, M. J.; AKINS, R. L. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate glycopeptide resistance: clinical significance and treatment options. **Drugs**, v. 61, p. 1-7, 2001.

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

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. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SIQUEIRA, G. et al. Aplicação de  $\alpha$ -oxocetenoditiocetais em síntese orgânica, **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, 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.

SOUZA, B.C.C.; OLIVEIRA, T.B.; AQUINO, T.M.; LIMA, M.C.A., et al. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Acta Pharmaceutica**, v. 62, p. 221-236, 2012.

STREISAND, J. B. e T. H. STANLEY. Newer drug delivery systems. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 6, n. 2, p.113-120, 1995.

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

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