



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

RAYANE SANTA CRUZ MARTINS DE QUEIROZ ANTONINO

GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO 5CN06-LSVM

**CAMPINA GRANDE – PB
2014**

RAYANE SANTA CRUZ MARTINS DE QUEIROZ ANTONINO

GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO 5CN06-LSVM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientador (a): 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.

A635g Antonino, Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz.
Grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM
[manuscrito] / Rayane Santa Cruz Martins de Queiroz Antonino. -
2014.

60 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. Alginato de sódio 2. Derivado tiofênico 3. Fármacos. I.
Título.

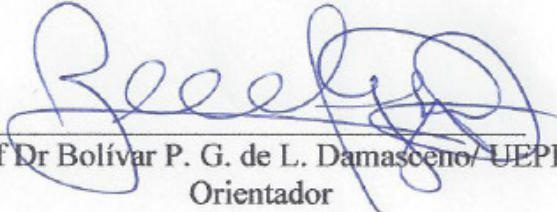
21. ed. CDD 615.1

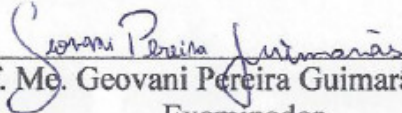
RAYANE SANTA CRUZ MARTINS DE QUEIROZ ANTONINO

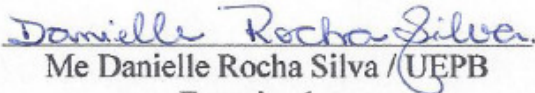
GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO 5CN06-LSVM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Aprovada em 04/04/2014.


Prof. Dr. Bolívar P. G. de L. Damasceno / UEPB
Orientador


Prof. Me. Geovani Pereira Guimarães / UEPB
Examinador


Me. Danielle Rocha Silva / UEPB
Examinadora

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela educação, pelo incentivo e por serem exemplo de seres humanos em minha vida, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida

Aos meus pais pelo exemplo de determinação, força, estudo e responsabilidade.

Aos meus avós maternos, Nilza Maria Santa Cruz Martins e João Martins Feitosa (*in memoriam*) pela criação e por todo o amor que me foi dado quando em vida.

Aos meus irmãos, Thâmisa, Ibysson e Raysse pelo apoio durante toda minha vida.

A meu amigo e companheiro, Ademir, que pacientemente me ajudou para a elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno pela disposição em cooperar com este trabalho.

Aos meus professores da graduação em Farmácia pelos ensinamentos compartilhados e experiências vivenciadas.

As companheiras de trabalho Michelle e Andressa que estiveram presentes em todo o trabalho contribuindo cientificamente e pessoalmente para o desenvolvimento deste.

Aos companheiros de universidade, da turma Farmácia 2009.2 pelos momentos vividos e ensinamentos compartilhados.

A todos os amigos que dedicadamente leram o trabalho e ajudaram com dicas e opiniões.

"A minha cabeça é incapaz de
expressar o meu agradecimento a
Deus. Tudo que há de melhor na
vida, Ele me deu."

Nilza Maria Santa Cruz Martins

RESUMO

O uso de polissacarídeos biodegradáveis no desenvolvimento de novos sistemas transportadores de fármaco tem ganhado bastante aceitação. Os grânulos de hidrogel que contêm 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, visando a proteção do fármaco das reações 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 alvos 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 promissoras devido à 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 óleo em água (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%, como também, desenvolver e validar o método para quantificação do fármaco 5CN06-LSVM. A análise macroscópica, a microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva de raio-x (EDX), a taxa de encapsulação e o intumescimento e erosão foram avaliados. Os grânulos resultantes, com exceção da amostra B, foram ovais, não aglomerados e com uma superfície apresentando fissuras. 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. 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 usage of biodegradable polysaccharides in the development of new conveyor systems of drugs has gained great acceptance. Hydrogel granules containing a therapeutic agent that is formed from the polymer sodium alginate in the presence of divalent ions are studied as a multiparticulate system to controlled release aiming at protecting the drug from adverse reactions of the medium and to improve its fabrication. The vast majority of substances that are used in current therapy derived from the usage of the molecular modification strategy, and the heterocyclic composites that present sulfur atoms in their composition are targets of this strategy, since they present antibacterial, antifungal, antiviral, and antitumor activities. Thiophenes derivatives containing the cycloalkyl group attached to the thiophenic ring present important pharmacological activities, mainly antifungal, being considered important molecules because of its growing demand for new drugs with this activity, however they present limited pharmacokinetic properties because of its highly hydrophobic character. This work aimed at obtaining a multiparticulate system of granules of calcium alginate containing 2-[(2,4-dichloro-benzylidene)-amino]-5,6-dihydro-4H-cyclopentyl[b]thiophene-3-carbonitrile (5CN06-LSVM), a thiophenic derivative, through the method of ionotropic gelation, from an aqueous solution of sodium alginate 3% and oil in water emulsion (O/W) of drug 0.1%, mixed in 5 different proportions (A, B, C, D, and E) with a solution of calcium chloride at 10%. As well as develop and validate the method to quantification of the drug 5CN06-LSVM. Macroscopic analysis, scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive x-ray spectroscopy (EDX), encapsulation rate, swell, and erosion were all evaluated. The resulting granules, with the exception of the sample B, were ovals, not agglomerated, and with a surface presenting cracks. The composite highly hydrophobic can be imprisoned until 67.17% inside the granules. The granules showed low degree of swelling in the solution simulating gastric fluid, but quickly swelled in phosphate buffer pH 7.4 with complete erosion of the polymer network in 60 minutes. It was concluded from this study that it is possible to obtain a multiparticulate system by using a simple, easy, and reproducible method, capable of be utilized for oral administration of hydrophobic drugs.

KEYWORDS: granules, ionotropic gelation, sodium alginate, thiophenic derivative.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistemas matriciais transpotadores de fármaco.	22
Figura 2 - Estrutura química do ácido algínico.	23
Figura 3 – Formação de gel de Alginato de cálcio.	24
Figura 4 - Técnica de preparação de grânulos de hidrogel por gelificação ionotrópica.	26
Figura 5 - Estrutura química de 2-amino-5-metil-tiofeno-3-carbonitrila.	27
Figura 6 - Estrutura química do -[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila.	28
Figura 7 - Espectro de varredura do 5CN06-LSVM observado o comprimento de onda de 393nm correspondendo à absorção máxima do fármaco.	35
Figura 8 - Espectro de varredura das amostras de grânulos contendo 5CN06-LSVM (A) e sem o fármaco (B) no UV MINI - 1240.	36
Figura 9 - Etapas de obtenção de grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM. ...	44
Figura 10 - Análise macroscópica das diferentes amostras de grânulos contendo 5CN06 obtidos por método de gelificação ionotrópica.	47
Figura 11 - Análise morfológica por MEV dos grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM, em aumento 100x (à esquerda) e 500x (à direita).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas do 5CN06-LSVM.....	28
Tabela 2 - Dados utilizados na construção da curva de calibração do 5CN06-LSVM.	37
Tabela 3 - Resultados do ensaio para verificação da exatidão do método.	38
Tabela 4 - Resultados do ensaio para verificação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	39
Tabela 5 - Resultados do ensaio para verificação da robustez do método.	39
Tabela 6 - Formulações com as diferentes proporções de solução de alginato de sódio 3% e emulsão de 5CN06-LSVM 0,1% em cada amostra.	45
Tabela 7 - Percentual em massa dos elementos encontrados na superfície das amostras, por EDX.	50
Tabela 8 - Determinação da taxa de encapsulação dos grânulos contendo o 5CN06-LSVM. .	50
Tabela 9 - Variação de peso dos grânulos após 30 minutos e 3 horas em diferentes meios. ...	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de calibração do 5CN06-LSVM.....	37
--	----

LISTA DE SIGLAS

ABS - Absorbância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BACE 1 - Enzima Beta secretase 1

CaCl₂ - Cloreto de Cálcio

CV% - Coeficiente de Variação

DP - Desvio Padrão

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

FDA - *Food and Drug Administration*

FM - Fórmula Molecular

GAC - Grânulos de Alginato de Cálcio

HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose

HSV 1 - Vírus Herpes Simples 1

IC - Coeficientes angulares

LD - Limite de Detecção

LogP - Coeficiente de Partição

LQ - Limite de Quantificação

LSVM - Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MM – Massa Molecular

NSTF - Novos Sistemas Transportadores de Fármaco

PA – Pró análise

PEO - Óxido de polietileno

pH - Potencial hidrogeniônico

r - Coeficiente de Correlação

r² - Coeficiente de Determinação

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SG - Suco Gástrico

SLC - Sistema de Libertação Controlada

TF - Tampão Fosfato

UEPB - Universidade Estadual da Paraíba

%VP - Percentual de Variação de Peso

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

5-HT₆ - 5- Hidroxitriptofano 6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACO.....	18
2.1.1	Novos Sistemas Transportadores de Fármaco (NSTF).....	19
2.1.1.1	NSTF em base polimérica de origem natural.....	20
2.1.1.2	Alginato.....	22
2.1.2	Grânulos.....	24
2.2	GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA.....	25
2.3	DERIVADOS DO TIOFENO.....	26
2.3.1	Derivado 2-Aminotiofeno (5CN06- LSVM).....	27
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
PARTE I – Desenvolvimento e validação da metodologia analítica de quantificação do 5CN06-LSVM.....		31
1	MÉTODOS.....	32
1.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	32
1.1.1	Determinação do comprimento de onda de detecção.....	32
1.1.2	Validação do método analítico.....	32
1.1.2.1	Seletividade e especificidade.....	32
1.1.2.2	Linearidade.....	33
1.1.2.3	Exatidão.....	33
1.1.2.4	Precisão.....	33
1.1.2.5	Robustez.....	33
1.1.2.6	Limite de detecção.....	34
1.1.2.7	Limite de quantificação.....	34
2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
2.1	DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DE DETECÇÃO.....	35
2.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	35
2.2.1	Especificidade (seletividade).....	35
2.2.2	Linearidade.....	36
2.2.3	Exatidão.....	38
2.2.4	Precisão.....	38
2.2.5	Robustez.....	39
2.2.6	Limite de detecção e quantificação.....	40
3	CONCLUSÃO.....	41
PARTE II – Desenvolvimento e caracterização dos grânulos de alginato de cálcio contendo o fármaco.....		42
1	MÉTODOS.....	43
1.1	PREPARAÇÃO DOS GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO.....	43
1.1.1	Preparação da solução de cloreto de cálcio (CaCl ₂) 10% _(p/v)	43
1.1.2	Preparação da solução de alginato de sódio 3% _(p/v)	43
1.1.3	Preparação da emulsão de 5CN06-LSVM a 0,1% _(p/v)	43
1.1.4	Preparação dos grânulos de alginato de cálcio contendo o 5CN06-LSVM.....	43
1.2	DESENHO DOS EXPERIMENTOS.....	44
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 RAIO-X (EDX).....	45

1.4	TAXA DE ENCAPSULAÇÃO	45
1.5	ESTUDO DE INTUMESCIMENTO E EROSÃO	46
2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
2.1	PREPARAÇÃO DOS GRÂNULOS CONTENDO 5CN06-LSVM	47
2.2	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)	48
2.3	TAXA DE ENCAPSULAÇÃO DOS GRÂNULOS CONTENDO 5CN06-LSVM	50
2.4	TESTE DE INTUMESCIMENTO E EROSÃO	52
3	CONCLUSÕES	54
	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	55

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia farmacêutica anseia pela pesquisa de novos sistemas transportadores de fármacos, visando a melhoria na terapêutica e no bem-estar do paciente. Promovendo assim, pesquisas que busquem novos métodos mais específicos e eficazes para transportarem o fármaco ao sítio alvo no nosso organismo, acarretando menos efeitos colaterais, e chegando ao local de ação em concentrações terapêuticas (LYRA, 2007). Gera-se, desse modo, uma melhoria na qualidade de administração do medicamento ao paciente, facilitando a aceitabilidade e adesão ao tratamento.

Os novos sistemas de vetorização têm como objetivo melhorar a biodisponibilidade, a segurança e garantir maior adesão ao tratamento medicamentoso. Dessa forma, a pesquisa de novos métodos transportadores de fármacos vem ganhando espaço no ramo científico e descobrindo novos meios para promover isto. O uso de polissacarídeos biodegradáveis como polímeros naturais para a formação de grânulos de hidrogel vem ganhando bastante atenção. Estes grânulos como sistemas multiparticulados, nos quais são encapsulados fármacos na sua forma ativa, são bastante produzidos, quando se cita, por exemplo, o alginato de sódio em presença de cátions divalentes, como o cálcio, pelo método de gelificação ionotrópica (LIAKOSA, 2013). Estes sistemas multiparticulados são estudados a fim de promover uma liberação controlada sítio específica, além de proteger os fármacos das condições adversas do meio (JAIN, 2004; KWON, 2005). Os polímeros utilizados não são tóxicos e estão facilmente disponíveis na natureza, e os métodos de preparação são facilmente executáveis e reprodutíveis, o que torna os novos sistemas opções privilegiadas (COIMBRA, 2010).

Mesmo com a complexidade para o estudo de novos fármacos, este ramo da pesquisa se apresenta como uma oportunidade para o desenvolvimento de novos medicamentos. A grande maioria dos medicamentos utilizados atualmente derivou de técnicas de modificação estrutural da molécula, permitindo a modificação de características físico-químicas e farmacológicas. 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.

Estudos relataram diversos benzo[*b*]tiofenos e compostos com grupo 4,5 cicloalquil ligado à porção tiofeno como importantes heterociclos bioativos com atividade potente antifúngica, além de atividade antimicrobiana. 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).

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 a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) possuem uma maior probabilidade de serem acometidos por microrganismos resistentes (LIMA et al., 2006). Assim sendo, a necessidade de novos fármacos com atividade antifúngica justifica a pesquisa destes compostos, e juntamente com a pesquisa de novos sistemas transportadores de fármacos, promove melhoria em características físico-químicas, acarretando alteração na solubilidade, estabilidade e absorção. Tornando, assim, este trabalho relevante para aplicabilidade de grânulos de alginato de cálcio contendo o derivado tiofênico 5CN06-LSVM.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACO

Os medicamentos são vias para o transporte de fármacos, configurando-se como uma forma de administrar estes ao organismo, necessitando ser de forma segura, eficiente e reprodutível. O estudo, desenvolvimento e a formulação da forma farmacêutica apropriada para o medicamento exige abranger alguns aspectos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos de todos os princípios ativos e matérias primas usados no produto, assim como as características anátomo fisiológicas do local de administração, absorção e cinética no organismo. 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; AULTON, 2005).

Assim sendo, os fármacos devem ser liberados de sua forma farmacêutica e serem dissolvidos antes de serem absorvidos para os fluidos do organismo via membranas absorventes como: epitélio da pele, trato gastrointestinal e pulmões. Contudo, existe uma série de barreiras entre o local de administração e o órgão ou tecido alvo, podendo ser, anatômicas, químicas ou biológicas que minimizam 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; AULTON, 2005; PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007).

As formas farmacêuticas chamadas de 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:

- Flutuações de concentrações plasmáticas do fármaco que ocasionam picos com valores que ultrapassam a faixa terapêutica;
- 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 (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2003; PEZZINI, SILVA & FERRAZ, 2007).

Atualmente uma significativa expansão no mercado de novos sistemas farmacêuticos para o transporte de fármaco pode ser percebido. Tendo como objetivo estabelecer o desenvolvimento de novos sistemas visando 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 (NSTF)

Formas farmacêuticas não convencionais ou de liberação modificada, também conhecida como os Novos Sistemas Transportadores de Fármacos (NSTF), diferenciam-se por apresentarem modificação da taxa de liberação ou do local onde a substância ativa é liberada, quando comparadas às formas farmacêuticas convencionais (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002). Aqueles sistemas têm sido largamente estudados e pesquisados, envolvendo uma grande quantidade de modelos, como, os sistemas multiparticulados ou grânulos, micropartículas, microemulsões, nanopartículas, lipossomas, entre outros (SANTOS & CASTANHO, 2002; FORMARIZ et al, 2005; PONGJANYAKU & RONGTHONG,2010; MISHRA, PATEL & TIWARI, 2010).

Os NSTF são os mais indicados para se garantir o objetivo de qualquer terapêutica, transporte do fármaco no local apropriado do organismo e a manutenção da concentração exigida nos níveis terapêuticos. Além disso, apresentam as seguintes vantagens que complementam o interesse do seu desenvolvimento, pesquisa e utilização:

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

O transporte controlado de fármacos para o local desejado de atuação no organismo apresenta-se como um dos maiores objetivos da tecnologia farmacêutica e das pesquisas nessa área. Em sistemas de liberação controlada de fármacos, faz-se necessário a utilização de sistemas, nos quais exista a compatibilidade física e química entre o fármaco veiculado e o

biomaterial, podendo este ser de natureza inorgânica, lipídica, polimérica entre outras. Dentre os antes citados, a pesquisa e estudo envolvendo os biomateriais de natureza polimérica, apresentam-se em maior destaque e com o maior número de investigação científica (SINGH & VYAS, 1996; MULLER et al,2000; UCHEGBU, 2006; GHOSH et al, 2008; SLOWING et al, 2008; BAJPAI et al, 2008; COIMBRA, 2010; GULTEPE et al, 2010)

2.1.1.1 NSTF em base polimérica de origem natural

Os materiais poliméricos, pela sua variedade, versatilidade e propriedades, são a classe de materiais mais investigada no desenvolvimento de NSTF. De fato, o desenvolvimento atual de NSTF mais sofisticados e eficientes anda em paralelo com o desenvolvimento de novos polímeros, desenhados para ter propriedades cada vez mais específicas (KIM et al, 2009; COIMBRA, 2010). Podendo ser encontrada uma grande variedade de polímeros, sintéticos, semissintéticos e naturais no desenvolvimento e pesquisa de NSTF.

Os NSTF's a partir de bases poliméricas podem ser classificados quanto ao mecanismo de transporte do fármaco da matriz polimérica, em: (i) Sistemas de liberação controlados por difusão; (ii) Sistemas de liberação ativados pelo solvente; (iii) Sistemas de liberação controlados por ação química (JAIN, 2004).

Os sistemas de liberação controlados (SLC) por difusão encontram-se divididos em dois tipos: sistemas de reservatório e sistemas matriciais.

Um SLC reservatório consiste num dispositivo constituído por um núcleo de fármaco, no estado líquido ou sólido, rodeado por uma membrana polimérica não biodegradável, através da qual o fármaco se difunde lentamente. Geralmente, estes dispositivos assumem uma geometria esférica, cilíndrica ou na forma de disco. As propriedades do fármaco e da membrana polimérica determinam a taxa de difusão e, conseqüentemente, a taxa de liberação do fármaco.

Num sistema matricial o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou dissolvido numa matriz polimérica, sendo a taxa de liberação controlada pela taxa de difusão do fármaco através dessa mesma matriz.

Nos sistemas de liberação controlados pela absorção de água o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido numa matriz polimérica constituída por um polímero hidrofílico reticulado (hidrogel). Estas matrizes têm a capacidade de absorver uma grande quantidade de água sem se dissolverem sendo que, nestes sistemas, a taxa de liberação do fármaco é essencialmente controlada pela taxa de absorção de água da matriz polimérica (OTTEMBRITE & KIM, 2001; JAIN, 2004; KWON, 2005).

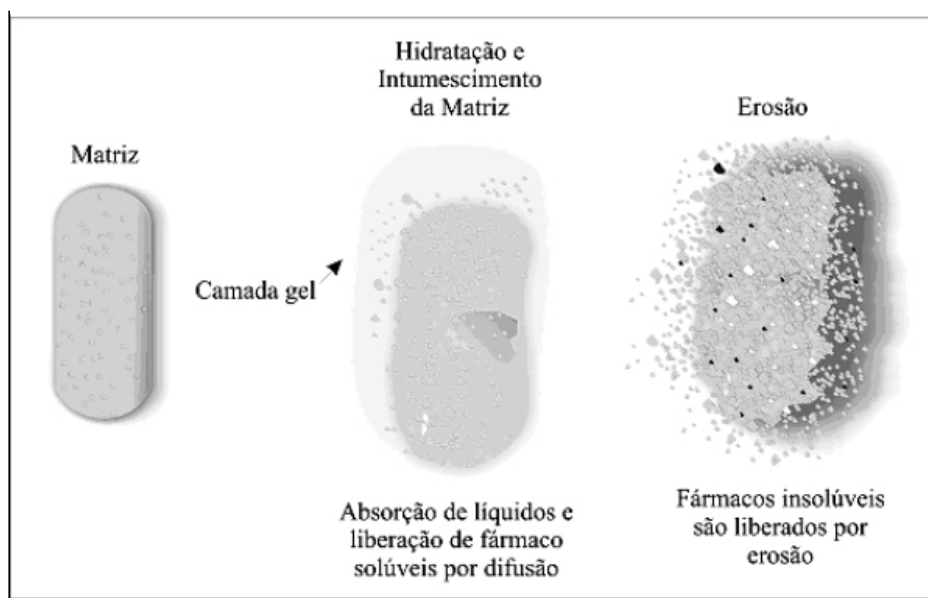
Dessa forma, as matrizes hidrofílicas são constituídas por uma mistura do fármaco com um polímero hidrófilo, onde o fármaco pode se encontrar homogeneamente disperso na matriz polimérica, dentro de um reservatório ou adsorvido em sua superfície, e na sua liberação estão envolvidos processos físicos e 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 transportadores 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 (gomas, 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 transporte 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 transportadores de fármaco.



(FONTE: LYRA et al., 2007)

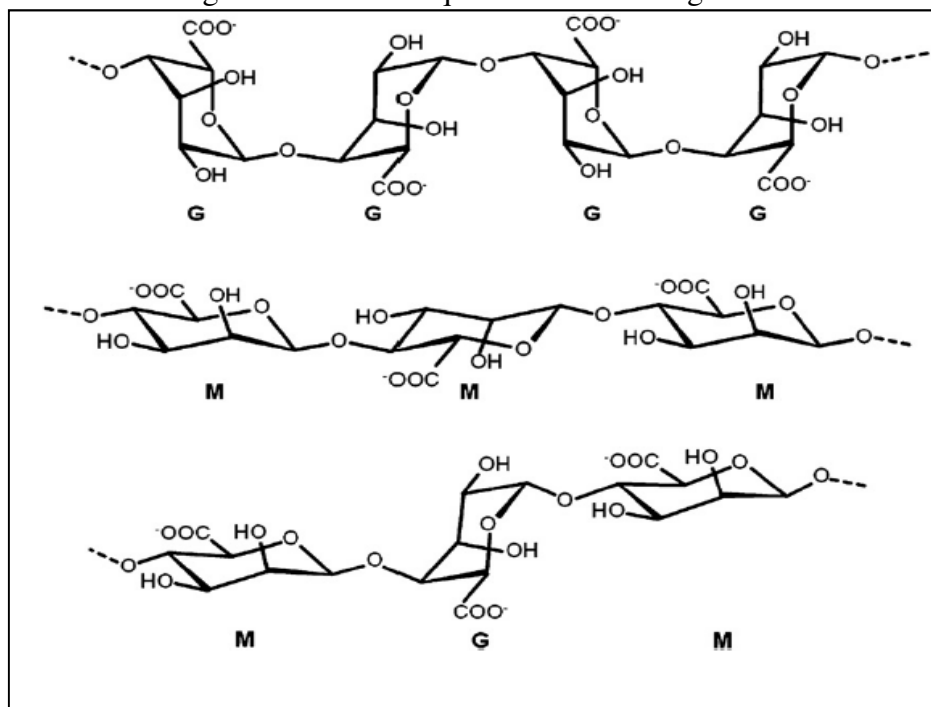
Assim, o conjunto de subunidades de hidrogel que constitui o sistema multiparticulado é um vantajoso sistema transportador de fármaco que pode ser usado pela via oral, permitindo a liberação do fármaco após expansão em contato com o meio de dissolução ou em resposta a estímulos fisiológicos como temperatura,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

2.1.1.2 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. Este é um polissacarídeo, comercialmente disponível na forma de sal de sódio do ácido algínico (alginato de sódio) e, consequentemente, 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 2). 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 2 - Estrutura química do ácido algínico.

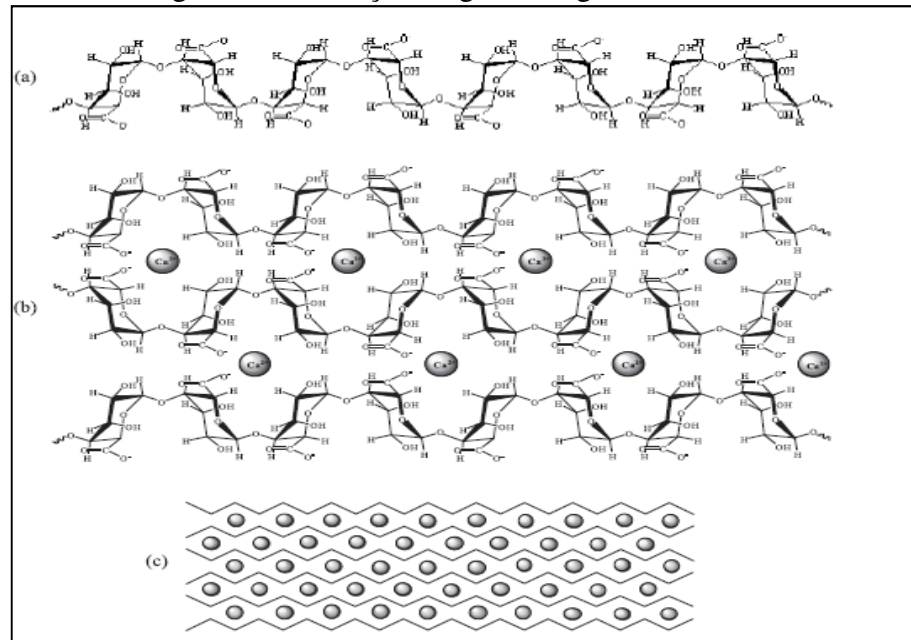


(FONTE: LEE & MOONEY, 2012)

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 3). 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 3 – Formação de gel de Alginato de cálcio.



Legenda: a. Homopolímeros de unidade galurônica 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. (FONTE: KAWAGUTI & SATO 2008).

2.1.2 Grânulos

Nos sistemas multiparticulados, a dose do fármaco está dividida em várias subunidades funcionais de liberação, que podem ser microcomprimidos, *pellets* 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 o transporte de fármacos, tem-se os sistemas matriciais, que utilizam polímeros, geralmente de natureza hidrofílica e inerte, que são substâncias capazes de modular o transporte. 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).

2.2 GELIFICAÇÃO IONOTRÓPICA

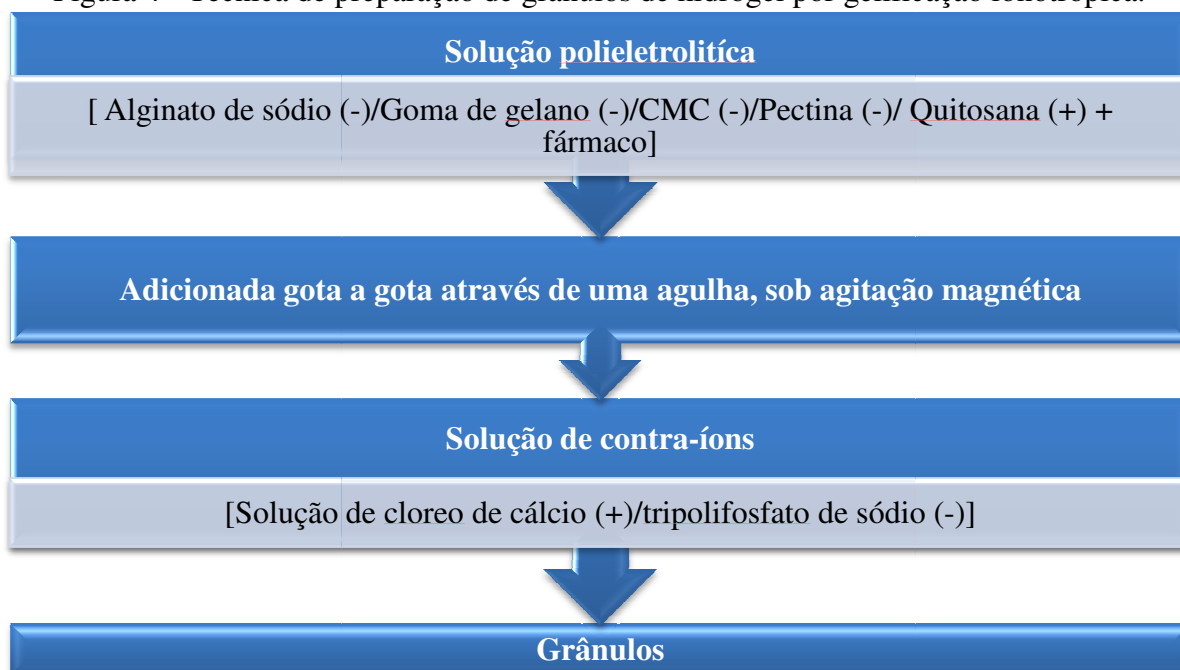
Gelificação ionotrópica é uma técnica bastante utilizada para obtenção de grânulos de hidrogel. Esta se baseia na capacidade de polieletrólitos em realizar ligação cruzada na presença de contra-íons. Os grânulos formados são entidades polimérica hidrófilas que são produzidos pela queda de uma solução 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).

Donbrow (1992) afirma que se pode 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 semissintéticos, 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 4) (AL-KASSAS, AL-GOHARY & AL-FAADHEL, 2007).

Figura 4 - Técnica de preparação de grânulos de hidrogel por gelificação ionotrópica.



(Adaptado de PATIL, CHAVANKE & WAGH, 2012)

2.3 DERIVADOS DO TIOFENO

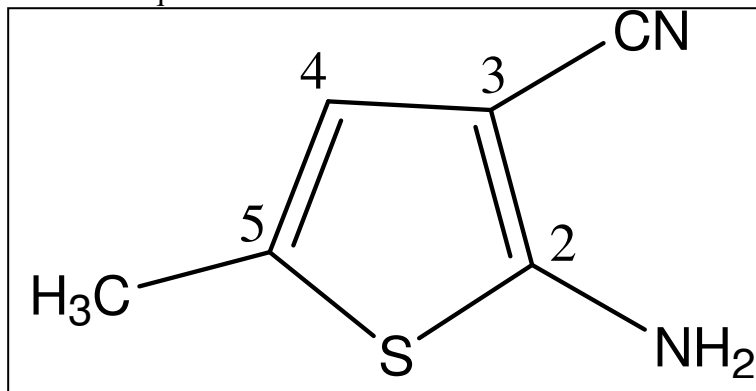
A química medicinal, através da técnica de modificação molecular, permite a obtenção de novos medicamentos. A grande maioria dos fármacos utilizados na terapêutica atual derivaram da utilização da estratégia de modificação molecular, cuja técnica permite fazer o melhoramento da estrutura do protótipo, 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), antimetabólitos, inibidores de cisteína e serina proteases (principalmente a trombina) e antagonistas do receptor 5-hidroxitriptofano 6 (5-HT₆). Podem ser também encontrados em compostos que

apresentam atividades, tais como inibidores da enzima beta secretase 1 (BACE1), agentes anti-inflamatórios, 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.



(FONTE: ChemDraw Ultra 12.0)

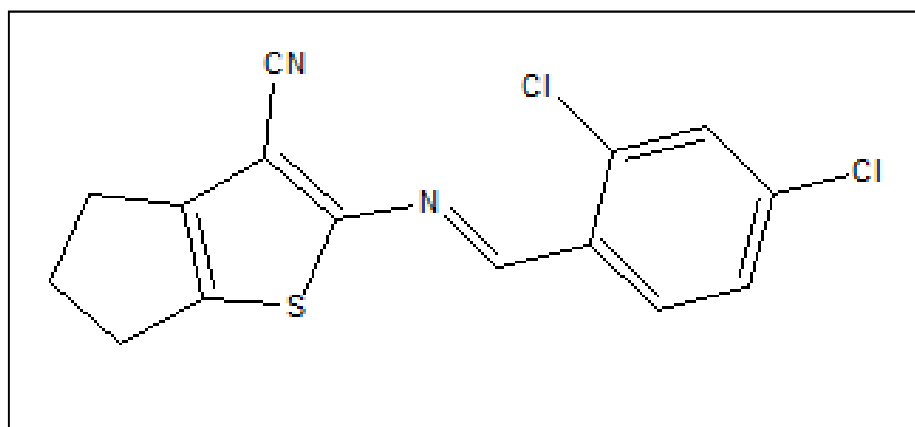
Dados da literatura mostram que os derivados do benzo[b]tiofeno apresentam atividade antifúngica contra espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis*) e espécies do gênero *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, e *A. flavus*) (PINTO et al., 2008).

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, da Universidade Estadual da Paraíba, 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.



(FONTE: ChemDraw Ultra 12.0)

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

Tabela 1 - Características físico-químicas do 5CN06-LSVM.

Derivado tiofênico	Aparência	Faixa de Fusão (°C)	F.M.	LogP	M.M. (g/mol)
5CN06-LSVM	Pó Amarelo	Polimorfo A: 186.5-189 Polimorfo B 189-191	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ SCl ₂	5,98	320

Legenda: F.M: fórmula molecular, LogP: Coeficiente de partição da molécula, M.M.: massa molecular (FONTE: ARAÚJO, 2010).

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 uma possibilidade 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 (5CN06-LSVM), visando um sistema multiparticulado para o transporte de fármaco de baixa solubilidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir GAC contendo 5CN06-LSVM através da técnica de gelificação ionotrópica;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica de quantificação do 5CN06-LSVM;e
- Avaliar e caracterizar as partículas obtidas quanto a seus aspectos macroscópicos, morfológicos, taxa de encapsulação e capacidade de intumescimento;

**PARTE I – Desenvolvimento e 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 encapsulação do sistema desenvolvido. A validação foi realizada conforme a RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (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 10 µg/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° 899/2003, 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 encapsulação 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 80 µg/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 de determinação (r²). A curva de calibração foi construída plotando-se os valores referentes às absorbâncias 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 coeficientes de variação (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 (LD) 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 (Equação 2):

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

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 (Equação 3):

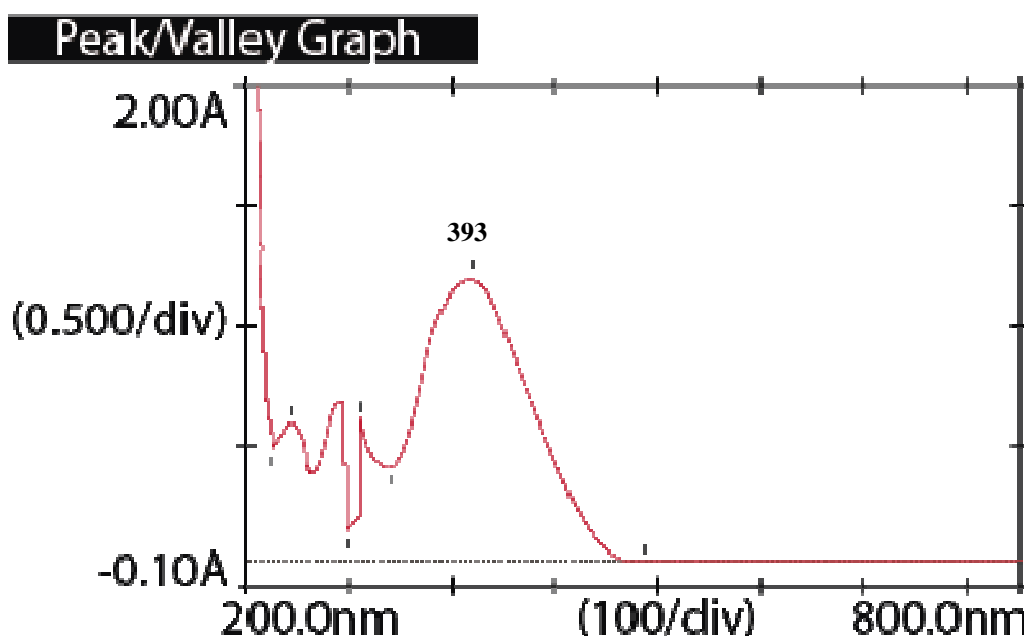
$$LQ = 10x \frac{DP}{IC} \quad (3)$$

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 µg/mL, determinou-se o comprimento de onda ($\lambda = 393\text{nm}$), 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 à absorção máxima do fármaco.



(FONTE: dados da pesquisa)

2.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

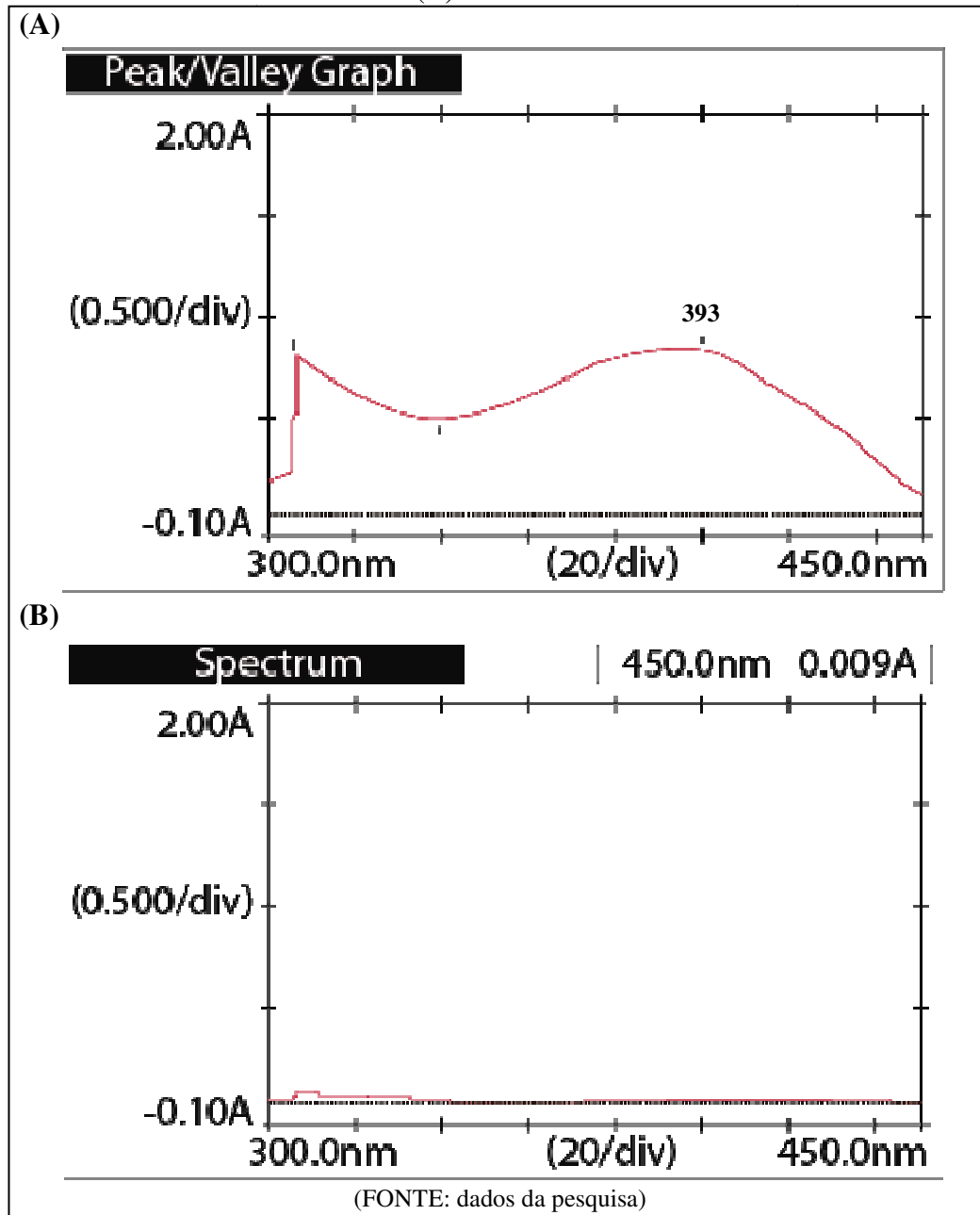
Conforme descrito anteriormente, o método desenvolvido nesse trabalho para a quantificação do 5CN06-LSVM foi validado segundo os parâmetros seletividade (especificidade), linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária), robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

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.



2.2.2 Linearidade

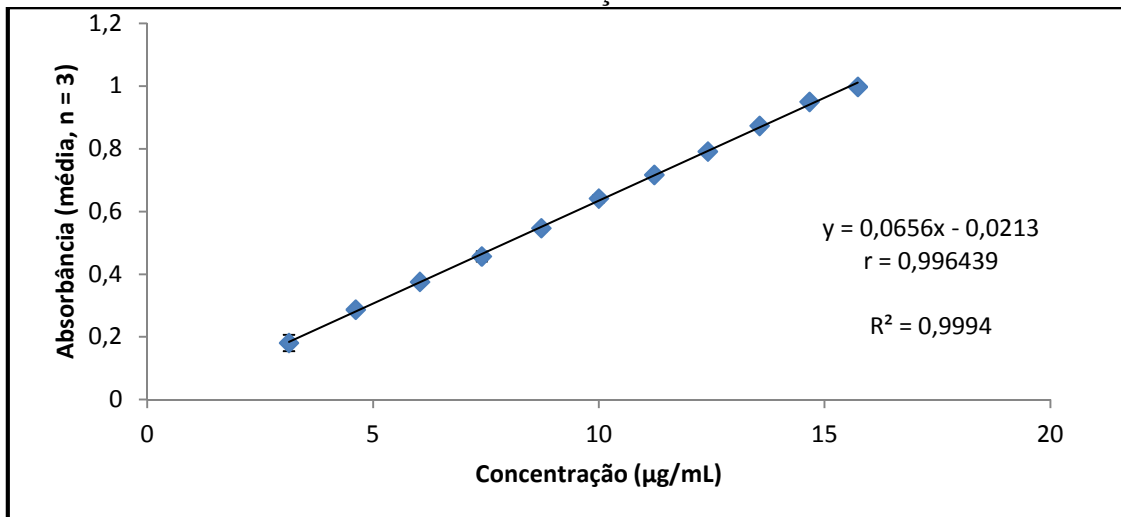
Os resultados obtidos das leituras das 11 diferentes concentrações do fármaco, em triplicata são mostrados na Tabela 2 e a curva obtida, assim como o coeficiente de correlação linear e a equação da reta são apresentados no gráfico 1.

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

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	DP	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

Legenda: Abs = absorvância; DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação
(FONTE: dados da pesquisa)

Gráfico 1 - Curva de calibração do 5CN06-LSVM.



(FONTE: dados da pesquisa)

O método apresentou-se linear em uma faixa de 3 a 16 $\mu\text{g/mL}$. 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° 899/2003 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 foi considerado exato, visto que se encontram dentro do limite estabelecido pela RE N° 899/2003 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

Legenda: DP= Desvio Padrão
(FONTE: dados da pesquisa)

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	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 \pm 0,197	2,01	98,06
	Dia 2	10	9,829 \pm 0,059	0,6	98,29

Legenda: DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de variação.
(FONTE: dados da pesquisa)

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 10 $\mu\text{g/mL}$ 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 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	10,00	10,144	10,00
Concentração obtida (média \pm DP; n=3)	9,951 \pm 0,177	10,144 \pm 0,153	10,225 \pm 0,078
Precisão (%)	1,78	1,51	0,77
Exatidão (%)	99,51	101,44	102,25

Legenda: F1= fabricante 1 (FMaia); F2= fabricante 2 (J.T. Baker)
(FONTE: dados da pesquisa)

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 próximos a 100%.

2.2.6 Limite de detecção e quantificação

Os resultados encontrados para limite de detecção, que representa a menor quantidade que o método é capaz de identificar foi de $0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$, e para limite de quantificação, que é a menor quantidade que o método pode quantificar na amostra foi de $0,81 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3 CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido se mostrou seletivo, específico, preciso, exato e robusto de acordo com a RE N° 899/2003 da ANVISA, podendo-se concluir que ele é adequado para quantificação do 5CN06-LSVM durante os estudos para verificação da taxa de encapsulação, bem como para o possível 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

1 MÉTODOS

1.1 PREPARAÇÃO DOS GRÂNULOS DE ALGINATO DE CÁLCIO

1.1.1 Preparação da solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 10%_(p/v).

Inicialmente, pesou-se 10 g de cloreto de cálcio anidro pró análise (PA) (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 um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água purificada.

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

Inicialmente, pesou-se 3 g de alginato de sódio PA (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), que foi solubilizado com água purificada, até o volume de 100 mL, sob aquecimento a 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 2000 rpm.

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

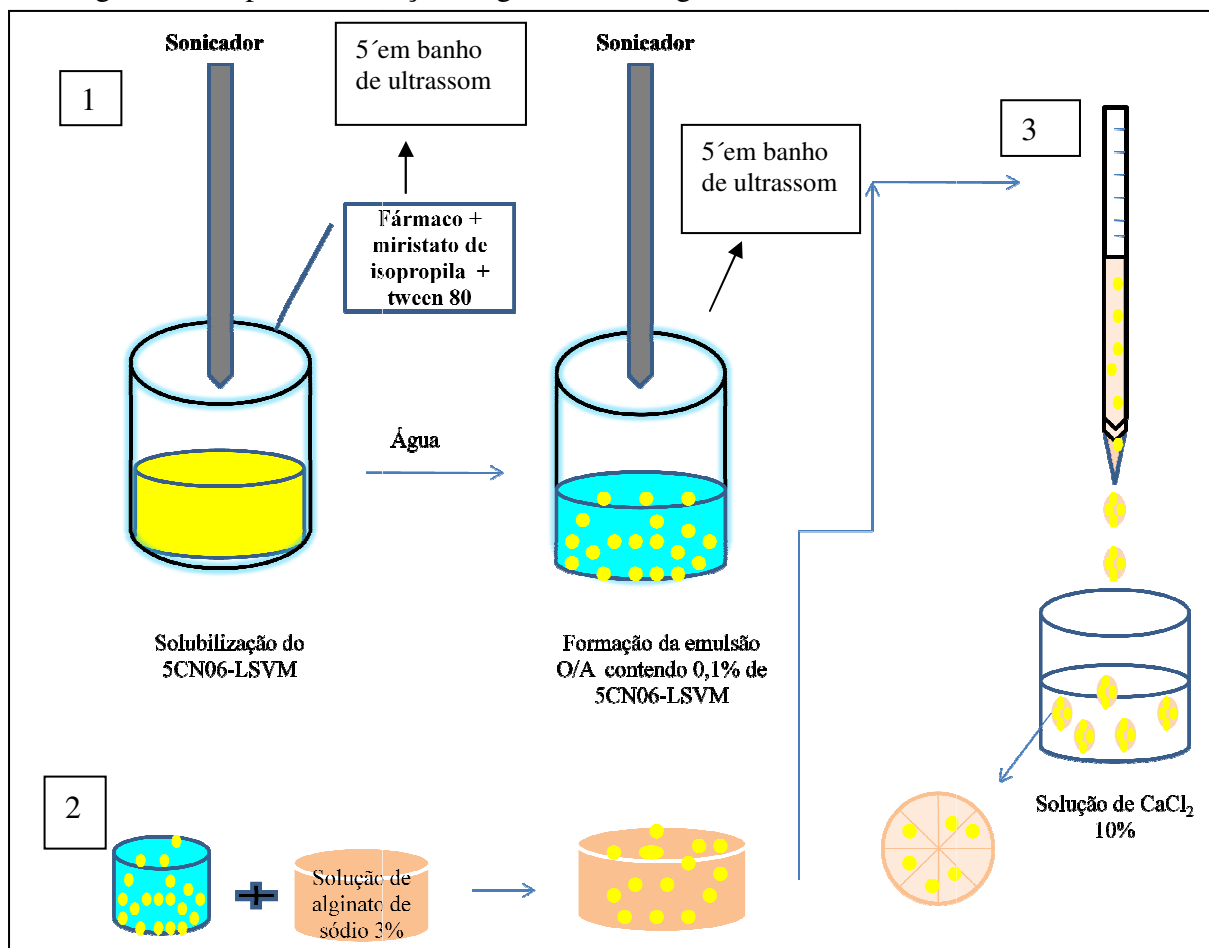
Pesou-se 0,02 g de 5CN06-LSVM, 6 g de miristato de isopropila (Via Farma, São Paulo, SP, Brasil), 3 g de polissorbato 80 (Tween 80[®], Via Farma, São Paulo, SP, Brasil) e 10,98 mL de água purificada. Inicialmente, misturou-se o polissorbato 80, o miristato de isopropila e o fármaco (5CN06-LSVM) em um 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 9). 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 µL, 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 9 - Etapas de obtenção de grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM.



Legenda: 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. (FONTE: dados da pesquisa)

Os grânulos de 5CN06-LSVM foram mantidos na solução de CaCl_2 por 30min, separados por tamização e lavados 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 colocados 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

(FONTE: dados da pesquisa)

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 RAIO-X (EDX)

A análise morfológica dos grânulos de alginato de cálcio carregadas com o 5CN06-LSVM foi realizada 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 TAXA DE ENCAPSULAÇÃO

Para quantificação do teor de 5CN06-LSVM nos grânulos, uma massa de aproximadamente 0,25 g 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 10 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. As amostras foram então diluídas para se obter uma concentração teórica de 10 µg/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 10 µg/mL.

1.5 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 2,0 g de cloreto de sódio em 7,0 mL de HCl concentrado (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) em 1,0 L de água purificada, a solução TF foi preparada a partir de soluções de fosfato de potássio monobásico anidro (Dinâmica Diadema - SP, Brasil) e fosfato de sódio bibásico anidro (VETEC, Duque de Caxias- RJ, Brasil). Em intervalos de 30, 60, 90, 120 e 180 minutos, os grânulos foram retirados da solução, 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

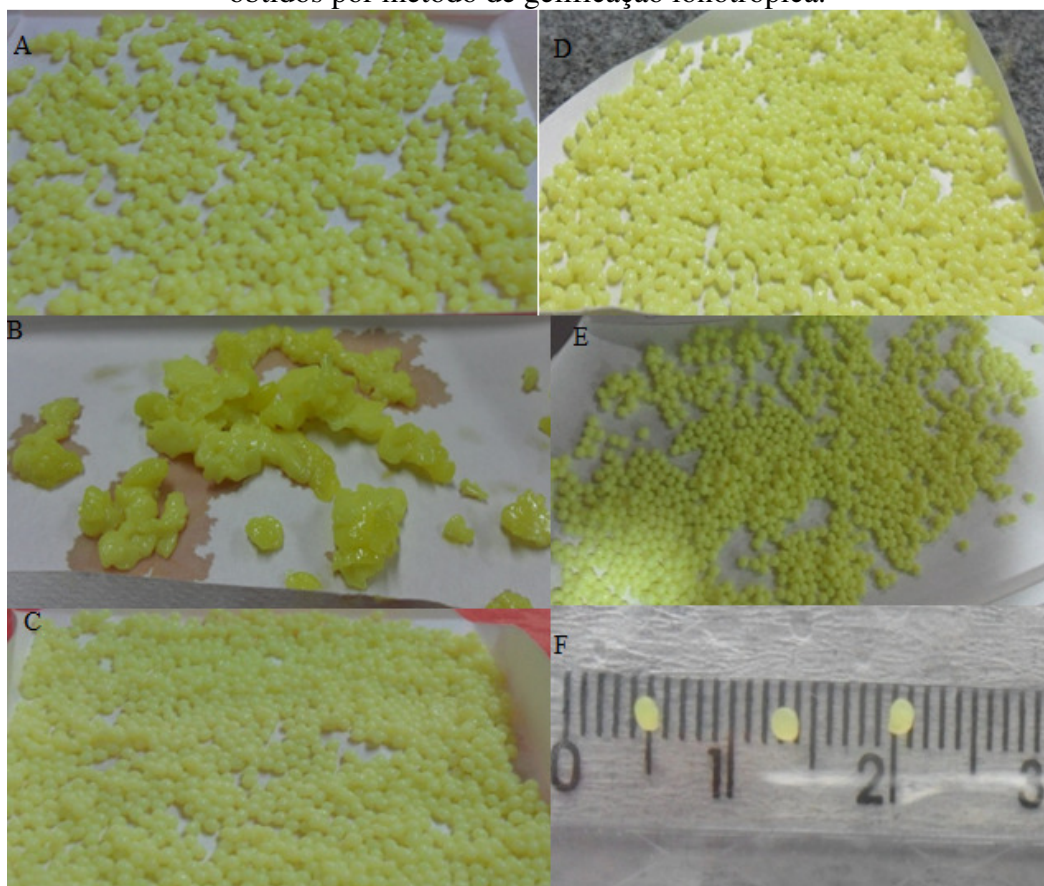
Pi = Peso inicial

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 PREPARAÇÃO DOS GRÂNULOS 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 óleo em água (O/A) que continha o fármaco de baixa solubilidade devidamente emulsionado no sistema. 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 à cor do fármaco, aproximadamente esféricas e sem agregados. Contudo, 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 à pequena proporção da massa polimérica utilizada em relação à massa de emulsão contendo o fármaco (Figura 10).

Figura 10 - Análise macroscópica das diferentes amostras de grânulos contendo 5CN06 obtidos por método de gelificação ionotrópica.



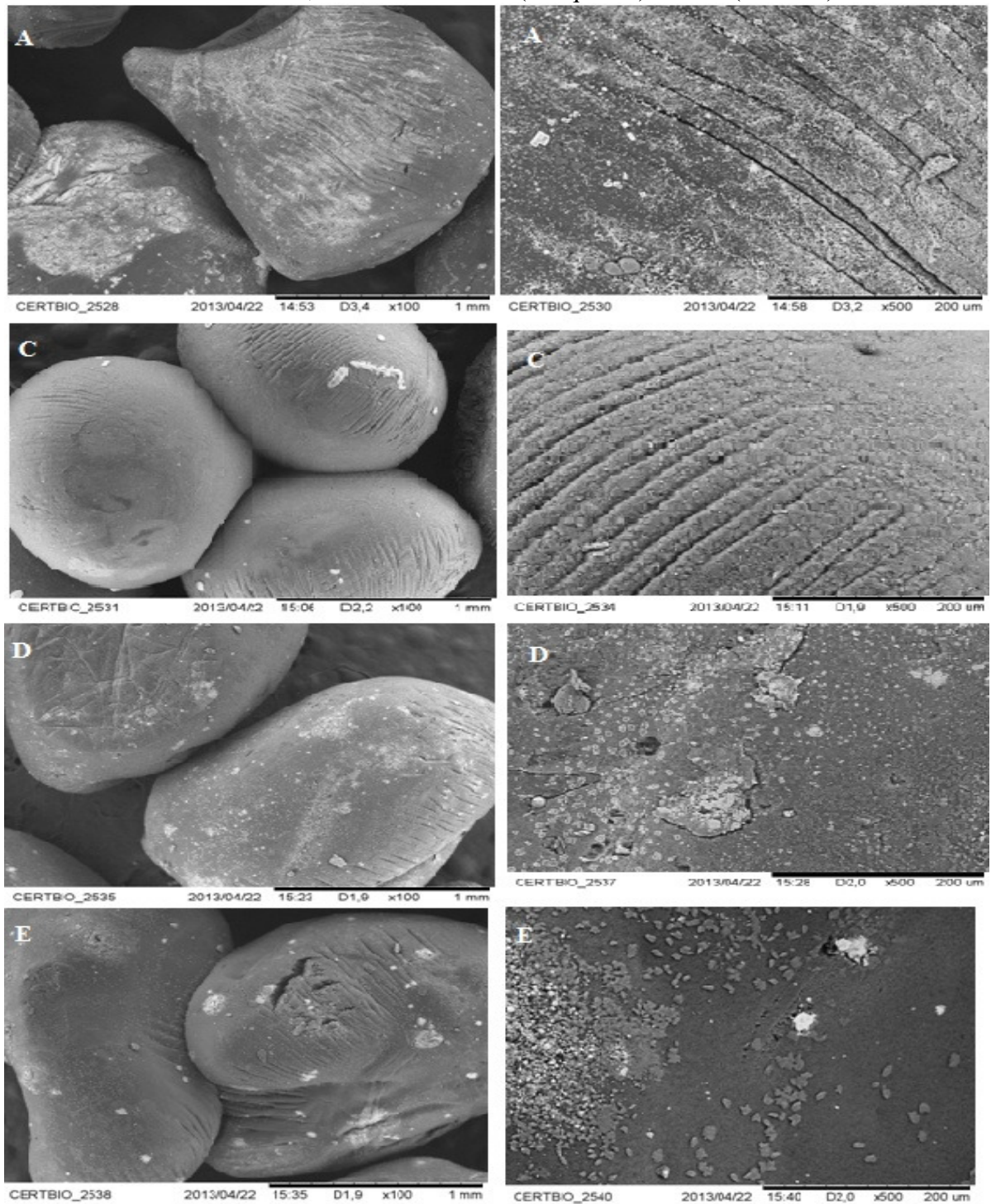
Legenda: A: amostra A; B: amostra B; C: amostra C; D: amostra D; E: amostra E; F= Grânulos contendo 5CN06 em escala centimétrica. (FONTE: dados da pesquisa)

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 serem incorporados em uma solução polimérica, formar novos sistemas transportadores visando, sobretudo, melhorar sua atividade terapêutica e condicionar o local e a velocidade de transporte 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, (Figura 11), 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 cloreto 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 11 - Análise morfológica por MEV dos grânulos de alginato de cálcio contendo 5CN06-LSVM, em aumento 100x (à esquerda) e 500x (à direita).



(FONTE: dados da pesquisa)

Na análise de EDX, 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.

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

Legenda: C: Carbono; O: Oxigênio; Ca: Cálcio; Cl: Cloro; Na: Sódio.
(FONTE: dados da pesquisa)

2.3 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 UV-VIS, descrito anteriormente. A percentagem de fármaco presente nas amostras analisadas é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Determinação da taxa de encapsulação dos grânulos contendo o 5CN06-LSVM.

Amostras	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL) Média ± DP (n=3)	Teor de 5CN06-LSVM nos grânulos (%)
A	10	5,44 ± 0,76	54,42
C	10	5,73 ± 0,10	57,26
D	10	5,81 ± 0,09	58,07
E	10	6,57 ± 0,04	65,7

Legenda: DP: Desvio Padrão.
(FONTE: dados da pesquisa)

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 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 percentualmente inferior a amostra E. Constata-se a necessidade de uma concentração adequada entre a relação polímero:emulsão e a solução gelificante. Uma vez que, a amostra D apresenta o triplo de massa de polímero:emulsão, almejava-se obter a melhor taxa de encapsulação do fármaco. Contudo, os resultados não mostraram isto. Confirmando a ressalva

anterior para a necessidade de condições adequadas de proporção entre polímero;emulsão e a solução gelificante. Haja vista, que foi utilizada a mesma concentração e volume de solução gelificante para todas as amostras, foi, portanto, insuficiente a concentração de cloreto de cálcio em solução para gelificar os grânulos, acarretando numa menor taxa de agregação polimérica, gerando maior números de poros, e conseqüentemente, menor taxa de encapsulação do fármaco contido no sistema emulsionado.

Vários estudos utilizando polissacarídeos (alginato de sódio, quitosana e quitina) e um método semelhante ao deste trabalho para se obter partículas transportadoras 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 à 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 ions 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.

2.4 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 transporte do fármaco.

Neste estudo, no qual utilizamos uma concentração de 10%_(p/v) de solução de CaCl_2 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 9. 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. 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, no qual, notou-se que os grânulos 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 transporte, pois tem grande influência no comportamento de transporte 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 ($-\text{COOH}$) 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 (EL-GIBALY, 2002; LOPES, LOBO & COSTA, 2005).

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 9 - 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	30,2±0,06	101,83±0,18	Desintegração
C	28,9±0,04	25,4±0,08	204,67±0,25	Desintegração
D	42,57±0,02	41,3±0,02	125,0±0,17	Desintegração
E	35,82±0,02	27,92±0,01	91±0,06	Desintegração

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

(FONTE: dados da pesquisa)

3 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste estudo, parece-nos lícito afirmar 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 aplicável a vários sistemas. 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. Morfologicamente, as amostras, com exceção da B, apresentaram grânulos similares, ovais, com superfície lisa, e algumas fissuras.

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 consequentemente no período de liberação do fármaco, visando um sistema multiparticulado para o transporte do 5CN06-LSVM.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- 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 pharmaceuticals**, 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**. 8 ed . São Paulo. 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. Artmed: p. 678, 2005.
- BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S., Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science** 2008, 33, (11), 1088-1118. 17.
- 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 desenvolvimento 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.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlados de fármacos com base em polímeros de origem natural**. Dissertação apresentada para colação de grau de doutor pelo curso de Engenharia Química pela Universidade de Coimbra, Portugal, p.29-50, 2010.

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.

GHOSH, P.; HAN, G.; De, M.; KIM, C. K.; ROTELLO, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2008, 60, (11), 1307-1315.

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.

GULTEPE, E.; NAGESHA, D.; SRIDHAR, S.; AMIJI, M., Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2010, 62, (3), 305-315.

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.

JAIN, K. K., Ed. Drug Delivery Systems. **CRC Press**: Boca Raton, 2004.

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.

KIM, S.; KIM, J.-H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K., Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 2009, p. 71, 420-430

KWON, G. S., Ed. **Polymeric drug delivery systems**. Taylor & Francis: NY, 2005.

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

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 2000, 50, (1), 161-177.

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.

OTTEMBRITE, R. M.; KIM, S. W., Eds. **Polymeric Drugs & Drug Delivery Systems**. CRC Press: Boca Raton, 2001.

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 gelspheres. **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, p. 596, 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 gelificação ionotrópica.** (Dissertação) apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 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. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1868-1873, 2010.

SINGH, R.; VYAS, S. P., Topical liposomal system for localized and controlled drug delivery. **Journal of Dermatological Science** 1996, 13, (2), 107-111.

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

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.

SLOWING, I. I.; VIVERO-ESCOTO, J. L.; WU, C.-W.; LIN, V. S. Y., Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews** 2008, 60, (11), 1278-1288

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.

UCHEGBU, I., Introduction. In **Polymers in drug delivery**, Uchegbu, I.; Schatzlein, A., Eds. Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

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.