**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Determinação das especificações do processo *spray drying* na
obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação
sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica**

Gláucia Karime Braga

**Ribeirão Preto
2005**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Determinação das especificações do processo de *spray drying* na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica.

Gláucia Karime Braga

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira

Ribeirão Preto
2005

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE
QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto/USP

Braga, Gláucia Karime

Determinação das especificações do processo de *spray drying* na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica. Ribeirão Preto, 2005.

82 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Oliveira, Wanderley Pereira.

1. microencapsulação. 2. *spray drying*. 3. secagem.
4. quitosana. 5. cetoprofeno

GLÁUCIA KARIME BRAGA

Determinação das especificações do processo de *spray-drying* na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica.

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a) *Wanderley P. Oliveira*
Orientador(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em 28/02/2005

***“Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória
é o desejo de vencer”***

Gandhi

A Deus,

Pela inspiração, proteção, força e misericórdia.

Aos meus pais, Marlene Torres Braga e José Alescio Braga,

*Pelos conselhos, amor, confiança e incentivo permanente,
minha imensurável gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira pela orientação, apoio, paciência, dedicação e amizade. Estes valores serão sempre lembrados e servirão de referência nas futuras atividades profissionais.

Ao Sr. Franklin C. F. Thomazini (Técnico do Laboratório de Processos Farmacêuticos), por sua colaboração no desenvolvimento do projeto.

Ao Sr. Paulo S. Carvalho, Técnico do Laboratório de Farmacotécnica, pela realização das análises de Calorimetria Exploratória Diferencial.

Aos colegas de Laboratório sempre presentes em todos os momentos.

Aos professores Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley (FCFRP/USP) e Dra. Maria José Vieira Fonseca (FCFRP/USP), pelas correções e relevantes sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

.

A todos os professores e funcionários da FCFRP/USP pela atenção e disponibilidade para contribuir com o desenvolvimento deste trabalho e de outras atividades correlatas, quando solicitados.

À empresa POLYMAR IND. COM. IMP. e EXP. LTDA pela doação da matéria-prima quitosana usada neste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela infra-estrutura e pela oportunidade de realização desse curso de Mestrado.

RESUMO

BRAGA, G.K. **Determinação das especificações do processo de spray-drying na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica.** 2005, 82 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

A liberação local de fármacos na cavidade oral apresenta muitas aplicações, incluindo o controle da dor pós-cirúrgica, tratamento de doenças periodontais e anestesia local. Micropartículas carregadas com anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) produzidas para a liberação sustentada é útil em Odontologia, uma vez que mantém o fármaco em níveis terapêuticos, promove o controle da dor e maior adesão do paciente ao tratamento. Uma vez que o sistema é biodegradável, o paciente não precisa ir ao consultório do dentista para removê-lo. Spray drying, é um dos vários métodos de microencapsulação, é rápido, de fácil operação, ampliação de escala e apresenta condições moderadas de operação. Assim, o objetivo deste trabalho é determinar as especificações do processo de spray-drying na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de fármacos com aplicação odontológica. Quitosana foi utilizada como polímero de revestimento, uma vez que é biodegradável, biocompatível e mucoadesivo. Cetoprofeno foi utilizado como AINE modelo. Testes de qualificação de operação do spray-dryer foram conduzidos em conformidades com os requisitos da ANVISA e FDA. O método de análise de teor de cetoprofeno também foi validado, apresentando precisão, exatidão, linearidade e especificidade adequados ao seu propósito. Com relação ao processo de microencapsulação, a melhor condição operacional no spray-dryer apresenta 100 °C de temperatura de entrada, 5,7 g/min de vazão da bomba peristáltica, 49,2 m³/h de vazão do ar de secagem, 1 mm de diâmetro do bico atomizador e 1,3 de pressão do ar comprimido. As micropartículas obtidas apresentam boa esfericidade e uma superfície lisa. A distribuição granulométrica é estreita, variando de 2,11 a 3,27 µm. Os estudos de liberação in vitro mostram um comportamento linear de dissolução do cetoprofeno encapsulado nas micropartículas, sugerindo que a cinética de liberação do fármaco é governada pela dissolução do fármaco e difusão através da matriz polimérica. Quitosana apresentou influência sobre a liberação do cetoprofeno, uma vez que foi encontrado um T₅₀ de 36,0 h para o fármaco microencapsulado, ao passo que para o fármaco livre o T₅₀ é de apenas 7,84 h.

ABSTRACT

BRAGA, G.K. **Spray-drying: process specifications in manufacturing dental drug loaded-biodegradable microparticles for sustained release purposes.** 2005, 82 p. Dissertation (Master of Science) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

Local release of drugs at oral cavity tissues shows several uses, including post-surgery pain control, periodontal disease treatment and local anesthesia. NSAID loaded-biodegradable microparticles made for a sustained drug release is useful in Dentistry since they keep the drug therapeutic level sustained, promote pain control and patient compliance. Since the system is biodegradable, the patient do not need to go to the dentistry office to remove it. Spray-drying (SD) , one of the several microencapsulation methods, is fast, has easy operation and scale-up and shows mint operating conditions. Thus the aim of this work is to design the spray-drying specifications of manufacturing dental drug loaded-biodegradable microparticles for sustained release purposes. Chitosan was used as the microencapsulation polymer due to its biodegradability, biocompatibility and mucoadhesiveness. Ketoprofen was used as the model NSAID. Operation qualification tests were performed with the spray-dryer as required by ANVISA and FDA. The analytical method for ketoprofen assay was also validated, showing accuracy, precision, linearity and specificity suitable for its purpose. Concerning microencapsulation process, the best SD operating conditions was 100 ° C (inlet), 5,73 g/min (pump flow rate), 49,19 m³/h (air flow rate), 1 mm (nozzle), 1,3 (compressed air). The microparticles delivered show good sphericity and a smooth surface. The size distribution is narrow, ranging from 2,11 to 3,27 µm. *In vitro* release studies show a linear dissolution behavior of cetoprofen-loaded microparticules suggesting the kinetic of drug release is driven by drug dissolution and diffusion through polymer matrix. Chitosan has an influence over the cetoprofen release since a T₅₀ of 36,0 h was found to microparticles while the cetoprofen only has a T₅₀ of 7,84 h.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema ilustrativo de microcápsulas e microesferas	11
Figura 2 -	Estruturas químicas da quitina e quitosana	15
Figura 3 -	Estrutura química geral dos ácidos arilalcanóicos	20
Figura 4 -	Estrutura química do cetoprofeno	22
Figura 5 -	Diagrama esquemático do equipamento <i>spray dryer</i> utilizado	29
Figura 6 -	Curva de titulação potenciométrica da quitosana em excesso de ácido clorídrico	43
Figura 7 -	Curva de calibração da temperatura de entrada (°C) do SD05	49
Figura 8 -	Curva de calibração da temperatura de saída (°C) do SD05	50
Figura 9 -	Curva de calibração da vazão da bomba peristáltica (mL/min) do SD-05 medido com água destilada	51
Figura 10 -	Curva de calibração da vazão do ar de secagem do SD-05	53
Figura 11 -	Relação da absorvância em função da concentração de cetoprofeno em PBS pH 7,4 (262 nm)	55
Figura 12 -	Curva de calibração de cetoprofeno em PBS pH 7,4 (262 nm)	56
Figura 13 -	Distribuição granulométrica dos pós processados	65
Figura 14 -	Curvas de DSC das amostras	67
Figura 15 -	Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura	69
Figura 16 -	Perfis de liberação <i>in vitro</i>	71
Figura 17 -	Linearização dos perfis de liberação <i>in vitro</i>	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Avaliação das propriedades físico-químicas aparência e pH das dispersões de acetato de quitosana em diversas concentrações de quitosana e ácido acético	45
Tabela 2 -	Avaliação da influência do tipo de agitação no tempo de agitação e na aparência da solução de revestimento de quitosana a 2,0% em ácido acético 1,0%	47
Tabela 3 -	Valores de temperatura de entrada programada e de saída observada no <i>spray dryer</i> SD-05 LabPlant relacionados aos valores de temperatura reais medidos com os termopares T ₁ (entrada) e T ₂ (saída)	48
Tabela 4 -	Comparação entre os valores de vazão da bomba descritos no manual de operação do SD-05 e os valores medidos durante a qualificação de operação	51
Tabela 5 -	Comparação entre os valores de vazão do ar descritos no manual de operação do SD-05 e os valores medidos durante a qualificação de operação	52
Tabela 6 -	Valores de absorvância em 262 nm de diferentes soluções em triplicata de cetoprofeno em PBS pH 7,4	55
Tabela 7 -	Valores de absorvância em 262 nm de diferentes soluções em triplicata de cetoprofeno em PBS pH 7,4	56
Tabela 8 -	Determinações de absorvância (262 nm) de 6 soluções padrão de cetoprofeno em PBS pH 7,4 na concentração teórica de 7,5 µg/mL para a verificação da precisão do método de análise de teor de cetoprofeno por espectrofotometria no UV	57
Tabela 9 -	Determinações para a verificação da exatidão do método de análise de teor de cetoprofeno por espectrofotometria no UV	59
Tabela 10 -	Determinações para a verificação da especificidade do método de análise de teor de cetoprofeno por espectrofotometria no UV (262 nm) na presença de excipientes	60
Tabela 11 -	Tempo e rendimento do processo de secagem por <i>spray drying</i> em diversas condições operacionais	62
Tabela 12 -	Aparência, odor, D ₅₀ , % teor total e superficial de cetoprofeno e eficiência de microencapsulação dos pós obtidos por <i>spray drying</i>	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1	<i>SPRAY DRYING</i>	7
2.2	MICROENCAPSULAÇÃO POR <i>SPRAY DRYING</i>	10
2.3	QUITOSANA	14
2.3.1	Produção de quitosana: aspectos econômicos e tecnológicos	16
2.3.2	Aplicações	17
2.4	AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO - ESTEROIDAIIS (AINES)	19
2.5	VALIDAÇÃO	23
3	OBJETIVO	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAL	28
4.1.1	Vidrarias e outros materiais de laboratório	28
4.1.2	Matérias-primas, reagentes e utilidades	28
4.1.3	Equipamentos	29
4.2	MÉTODOS	30
4.2.1	Desenvolvimento da composição para microencapsulação	31
4.2.1.1	Caracterização da quitosana empregada neste trabalho: determinação do grau de desacetilação e perda por dessecação	31
4.2.1.2	Determinação da concentração do polímero quitosana e do solvente ácido acético	32
4.2.1.3	Otimização do método de preparo da solução de revestimento de acetato de quitosana	32
4.2.1.4	Desenvolvimento da composição para microencapsulação propriamente dita	33
4.2.1.4.1	Composição	33
4.2.1.4.2	Método de preparo	33
4.2.2	Qualificação de operação do <i>spray dryer</i> SD-05 LabPlant	34
4.2.2.1	Temperaturas de entrada e de saída	34
4.2.2.2	Vazão da bomba peristáltica	34
4.2.2.3	Vazão do ar de secagem	35

4.2.3	Validação da metodologia de análise de teor de cetoprofeno	35
4.2.3.1	Linearidade	35
4.2.3.2	Confecção da curva de calibração	36
4.2.3.3	Repetibilidade (Precisão)	36
4.2.3.4	Exatidão	36
4.2.3.5	Especificidade	37
4.2.4	Ensaio de microencapsulação por <i>spray drying</i>	37
4.2.5	Caracterização das micropartículas	38
4.2.5.1	Aparência e odor	38
4.2.5.2	Tamanho e distribuição granulométrica	39
4.2.5.3	Morfologia por microscopia eletrônica de varredura	39
4.2.5.4	Teor total de cetoprofeno presente nos pós	39
4.2.5.5	Teor superficial de cetoprofeno presente nos pós	40
4.2.5.6	Porcentagem de eficiência de microencapsulação	40
4.2.5.7	Umidade	40
4.2.5.8	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	41
4.2.5.9	Liberção <i>in vitro</i> de cetoprofeno	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	DESENVOLVIMENTO DA COMPOSIÇÃO PARA MICROEN - CAPSULAÇÃO	43
5.1.1	Caracterização da quitosana empregada neste trabalho: determinação do grau de desacetilação e perda por dessecação	43
5.1.2	Determinação da concentração do polímero de quitosana e do solvente ácido acético e otimização do método de preparo da solução de revestimento	45
5.2	QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO <i>SPRAY DRYER</i> SD-05 LABPLANT	47
5.2.1	Temperaturas de entrada e de saída	48
5.2.2	Vazão da bomba peristáltica	50
5.2.3	Vazão do ar de secagem	52
5.3	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE TEOR DE CETOPROFENO	54
5.3.1	Linearidade	54
5.3.2	Confecção da curva de calibração	56
5.3.3	Repetibilidade (Precisão)	57

5.3.4	Exatidão	59
5.3.5	Especificidade	59
5.4	ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO POR <i>SPRAY DRYING</i> E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS	60
6	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	78

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As patologias odontológicas, como doenças periodontais, dores e quedas de dentes, são reconhecidas como um dos maiores problemas em saúde pública no mundo, não distinguindo idade, etnia, sexo ou nível socioeconômico (VYAS; SIHORKAR; MISHRA, 2000).

A cavidade oral é a via de escolha para a administração de fármacos para tratamento das patologias odontológicas. A liberação de fármacos na cavidade oral pode ser classificada em três categorias: (i) *liberação sublingual*, onde o fármaco exercerá ação sistêmica devido a sua rápida absorção através da mucosa sublingual e prevenção da metabolização de primeira passagem; (ii) *liberação bucal*, onde a absorção do fármaco ocorre através da mucosa das bochechas e (iii) *liberação local*, onde o fármaco é liberado em tecidos específicos da cavidade oral (SHOJAEL, 1998).

A liberação local de fármacos em tecidos da cavidade oral apresenta grande número de aplicações, incluindo o tratamento da dor pós-cirúrgica (ISHIDA; NAMBU; NAGAI, 1982), doenças periodontais (ELKAYAN et al., 1988), anestesia local, tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, afta e estomatite (NAGAI, 1985).

Sistemas biodegradáveis que promovem a liberação local e sustentada de fármacos têm se mostrado eficazes em odontologia, uma vez que proporcionam uma elevada concentração do fármaco no sítio de ação usando menores quantidades do fármaco, o que reduz a probabilidade de efeitos colaterais e tóxicos, além de prolongar o efeito terapêutico.

Partículas poliméricas biocompatíveis, como micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas, constituem, atualmente, promissores sistemas de liberação sustentada de fármacos. Além disso, podem apresentar pequeno tamanho e ser biodegradáveis, podendo ser injetáveis, evitando-se assim, inserções cirúrgicas inconvenientes para colocação/remoção dos sistemas (JALIL; NIXON, 1990).

Sendo assim, o desenvolvimento de um sistema biodegradável de liberação local sustentada de anti-inflamatórios ou anestésicos locais seria vantajoso para a Odontologia, especialmente para o controle da dor pré- e/ou pós-operatória, uma vez que manteria o efeito terapêutico por um período prolongado, proporcionando alívio da dor e maior adesão do paciente ao tratamento. Por ser biodegradável, não é necessário o retorno do paciente ao consultório para remoção do sistema.

O uso de sistemas de liberação sustentada de anti-inflamatórios, além do controle da dor pós-operatória é importante no tratamento de doenças periodontais, uma vez que, bloqueando o processo inflamatório, retarda a destruição do tecido periodontal e até promove regeneração óssea (SALVI; WILLIAMS; OFFENBACHER, 1997). Já liberação sustentada de anestésicos locais, promoveria um maior tempo de anestesia, eliminando tanto o uso de vasoconstritores associados quanto o número de reaplicações.

Inúmeros são os métodos de microencapsulação, a saber: (i) evaporação de solventes; (ii) coacervação (iii) dupla emulsão, (iv) extrusão, (iv) *spray-drying*. Entretanto, o método a ser escolhido deve atender alguns requisitos, tais como (JALIL; NIXON, 1990): (i) tanto a estabilidade quanto a atividade biológica do fármaco não deve ser afetada durante o processo de microencapsulação; (ii) a eficiência da encapsulação deve ser alta; (iii) a qualidade da micropartícula e o perfil

de liberação do fármaco devem ser reprodutíveis; (iv) a micropartícula obtida deve apresentar escoamento livre e não deve se agregar ou se aderir.

Micropartículas biodegradáveis e injetáveis têm sido produzidas pelos métodos de dupla emulsão e coacervação. Entretanto, o processo de coacervação propicia a formação de aglomerados de micropartículas, é de difícil ampliação de escala e requer grande quantidade de solventes orgânicos, os quais podem permanecer residuais nas micropartículas formadas. Já o método de dupla emulsão requer muitas etapas, um controle rígido de temperatura e da viscosidade da emulsão interna (água em óleo), além de ser difícil a encapsulação de fármacos hidrossolúveis. Por outro lado, o processo de *spray drying* é rápido, de fácil operação e ampliação de escala, de condições moderadas e apresenta menor dependência da solubilidade do fármaco e do polímero (TAKADA et al., 1995).

Por definição, *spray drying*, ou secagem por nebulização, é o processo de obtenção de partículas esféricas e de escoamento livre através da atomização de uma solução e/ou suspensão, com formação de gotículas e secagem em uma corrente de ar quente.

Simplificadamente, o processo pode ser descrito como o bombeamento do líquido até o atomizador, onde é aspergido na forma de *spray* até a câmara de secagem, onde é seco pelo ar quente, transformando, assim, gotas líquidas em partículas sólidas, que são recolhidas no ciclone ou em outro sistema de coleta de pó (OAKLEY, 1997).

Um dos pontos críticos do processo é a atomização, uma vez que o tamanho da gota formada está diretamente relacionado com o tamanho da partícula obtida. Como a atomização produz uma grande área superficial entre a gota formada e o meio de secagem, o tempo de secagem é pequeno quando comparado a outras

técnicas, variando de 5 segundos (escala laboratorial) a 50 segundos (escala industrial). Esse fato permite a utilização desse processo na secagem de princípios ativos termosensíveis (OAKLEY, 1997).

Nesse trabalho, é estudada a utilização do processo *spray drying* para o desenvolvimento de sistemas biodegradáveis de liberação local sustentada de anti-inflamatórios não esteroidais. A quitosana foi selecionada como polímero de estudo, devido suas propriedades biodegradáveis, bioadesivas e do grande potencial para o desenvolvimento de sistemas de liberação, associado à elevada disponibilidade e baixo custo.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção apresenta-se uma revisão da literatura sobre tópicos importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 *SPRAY-DRYING*

Por definição, *spray-drying* é o processo de transformação de soluções ou suspensões em partículas secas, formadas a partir da atomização de soluções ou suspensões em um meio aquecido (OAKLEY, 1997).

É um processo contínuo que, em um único ciclo de operação, agrega diferentes etapas como: (i) Alimentação da solução ou suspensão no atomizador; (ii) Atomização; (iii) Mistura do *spray* com o ar de secagem; (iv) Evaporação do solvente; (v) Separação do produto seco.

Simplificadamente, o processo pode ser descrito como o bombeamento da solução ou suspensão até o atomizador (etapa I) onde é aspergida na forma de névoa de gotículas (*spray*) até a câmara de secagem (etapa II), na qual ocorre a evaporação do solvente, ou seja, a secagem pelo ar quente, transformando, assim, gotas líquidas em partículas sólidas (etapas III e IV), que são recolhidas no ciclone ou em outro sistema de coleta de pó (etapa V) (OAKLEY, 1997). Velocidade de alimentação da solução ou suspensão (vazão da bomba peristáltica), diâmetro do bico atomizador, vazão do ar de secagem, pressão do ar comprimido, temperatura de entrada e temperatura de saída são parâmetros do processo que podem ser modulados e que influenciam diretamente na qualidade do produto final. Dessa

forma, estes parâmetros são alvos de testes de qualificação de operação do equipamento.

Um dos pontos críticos do processo de *spray-drying* é a atomização, uma vez que o tamanho da partícula obtida está diretamente relacionado com o tamanho, distribuição, trajetória e velocidade das gotas formadas. O tipo de atomizador também influencia no formato da câmara de secagem. Assim, a seleção do atomizador é a escolha mais importante no *lay-out* de um *spray-dryer* (RÉ, 1998)

No atomizador, a solução ou suspensão alimentada entra em contato com gás pressurizado, criando uma névoa. A névoa é, então, aspergida na câmara de secagem. Espera-se que um atomizador apresente, como características, a formação de gotas de tamanho uniforme, homogeneidade da névoa (*spray*) e menor consumo de energia (FILKOVÁ; MUJUMDAR, 1995). Em geral, são utilizados 3 tipos de atomizadores: atomizador centrífugo (rotatório), pneumático (único fluido), e atomizadores de duplo fluido, a gás comprimido.

Uma vez que a solução ou suspensão foi atomizada na câmara de secagem, deverá ocorrer a mistura da solução/suspensão com o gás de secagem e conseqüente evaporação do solvente. Assim, na câmara de secagem ocorre simultaneamente o transporte de calor e de massa. A maior parte da transferência de calor se dá pelo fornecimento da energia necessária para a evaporação do solvente presente na névoa produzida pela atomização.

Como a evaporação do solvente mantém baixa a temperatura da gota, altas temperaturas de entrada podem ser aplicadas sem afetar significativamente a qualidade do produto. Além disso, o tempo de secagem das gotas é pequeno, permitindo a secagem de materiais termosensíveis (FILKOVÁ; MUJUMDAR, 1995).

Se o ar de secagem se torna saturado com o solvente, não ocorre mais a evaporação.

O desenho de uma câmara de secagem depende: (i) do tipo de atomizador utilizado, uma vez que o ângulo do *spray* determina a trajetória das gotas, ditando o diâmetro e altura da câmara de secagem. (ii) do tipo de sistema de contato gota + ar de secagem

O contato gota + ar de secagem pode ser classificado em 3 tipos: concorrente, contra-corrente e misto. O contato concorrente ocorre quando as gotas caem pela câmara de secagem no mesmo sentido do fluxo de ar de secagem, constituindo-se o sistema mais comum de contato. Dessa forma, a temperatura final do produto é menor que a temperatura de entrada. Já com o contato contra-corrente, o fluxo de ar é contrário à trajetória das gotas e a temperatura final do produto é maior do que a temperatura inicial. Um contato misto é desejado quando o tamanho da câmara é limitado.

A direção do fluxo de ar e a uniformidade da velocidade do ar pela câmara influenciam na qualidade do produto final. O desenho da distribuição do ar quente deve prevenir um superaquecimento local ao mesmo tempo que deve garantir a secagem das partículas antes que alcancem as paredes da câmara de secagem (FILKOVÁ; MUJUMDAR, 1995).

Uma vez que partículas secas são obtidas ocorre a necessidade de separá-las do ar de exaustão. Existem sistemas secos e úmidos de separação de pó. Dentre os separadores secos de pó encontram-se os ciclones, os filtros de manga e os precipitadores eletrostáticos (FILKOVÁ; MUJUMDAR, 1995).

Em um separador do tipo ciclone, utilizado para o desenvolvimento desse trabalho, uma força centrífuga é empregada para mover as partículas para a parede

do ciclone e separá-las do ar de exaustão. As partículas secas giram em forma de espiral em direção à base do ciclone, onde são coletadas em um frasco, deixando o ciclone. O ar de exaustão “limpo” flui para a parte superior também deixando o ciclone.

O processo de *spray-drying* é um processo de grande consumo de energia, residindo aí sua única desvantagem. O grande consumo de energia é devido a necessidade de fornecer calor específico para a evaporação em um curto espaço de tempo, além de perder apreciável quantidade de calor com o ar de exaustão. Entretanto, uma estratégia interessante e simples para se economizar energia durante o *spray-drying* é aumentar a concentração de sólidos dispersos na solução ou suspensão, contando que ela ainda possa ser bombeada (FILKOVÁ; MUJUMDAR, 1995).

2.2 MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY-DRYING*

O processo de microencapsulação tem sido estudado há anos e trata-se do uso de polímeros formadores de filme no aprisionamento de substâncias ativas, com o intuito de: (i) proteger o princípio ativo contra os efeitos da temperatura, umidade e interação com outras substâncias químicas; (ii) alterar as propriedades físico-químicas de uma substância, como converter líquidos ou sólidos pegajosos em pós com escoamento livre; (iii) mascarar sabor ou odor desagradáveis; (iv) controlar a velocidade de liberação do princípio ativo em determinadas condições (RÉ, 1998).

As micropartículas são classificadas em duas categorias, baseadas na arquitetura/distribuição do ativo pelo sistema, a saber (BRANDAU, 2002): (i) Microcápsulas: onde o ativo é concentrado no centro da micropartícula, formando

um núcleo, sendo delimitado por um filme do polímero de revestimento. Também chamado de sistema reservatório. (Figura 1 a);

(ii) Microesferas: onde o ativo é disperso uniformemente pela matriz polimérica. Também chamado de sistema matricial. (Figura 1 b)

Figura 1. Esquema ilustrativo de micropartículas e microesferas (1A: Microcápsula; 1B: Microesfera).

A escolha do polímero de revestimento depende do que se deseja como características para as micropartículas, ou seja, se deseja biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade, liberação sustentada do ativo, etc. Os polímeros mais comuns usados em microencapsulação são os derivados do ácido acrílico/metacrílico, os derivados da celulose, os alginatos, a quitosana, e os derivados dos ácidos polilático/poliglicólico.

Na produção de micropartículas inúmeros métodos podem ser empregados, os quais são divididos em 3 categorias: (i) Métodos Físico-Químicos: coacervação simples e complexa (separação da fase aquosa); evaporação do solvente (separação da fase orgânica); dupla-emulsão; (ii) Método Químico: polimerização interfacial; (iii) Métodos Físicos: *spray-drying*, *spray-coating*, extrusão.

A escolha do método de microencapsulação depende das características do fármaco e do material de revestimento (polímero) bem como das características e da aplicação das micropartículas. Assim, tamanho e distribuição de tamanho das

micropartículas, propriedades físico-químicas do fármaco e do polímero de revestimento, perfil de liberação desejado para o fármaco, escala de produção e custo do processo são alguns parâmetros nos quais a escolha do método deve ser baseada (RÉ, 1998).

Entretanto, o método a ser escolhido deve atender alguns requisitos, tais como (JALIL; NIXON, 1990): (i) tanto a estabilidade quanto a atividade biológica do fármaco não deve ser afetada durante o processo de microencapsulação; (ii) a eficiência da encapsulação deve ser alta; (iii) a qualidade da micropartícula e o perfil de liberação do fármaco devem ser reprodutíveis; (iv) a micropartícula obtida deve apresentar escoamento livre e não deve se agregar ou se aderir.

Micropartículas biodegradáveis e injetáveis têm sido produzidas pelos métodos de dupla emulsão e coacervação. Entretanto, o processo de coacervação propicia a formação de aglomerados de micropartículas, é de difícil ampliação de escala e requer grande quantidade de solventes orgânicos, os quais permanecem residuais nas micropartículas formadas. Já o método de dupla emulsão requer muitas etapas, um controle rígido de temperatura e da viscosidade da emulsão interna (água em óleo), além de ser difícil a encapsulação de fármacos hidrossolúveis. Assim, embora esses métodos físico-químicos têm sido publicados em muitos artigos científicos, tratam-se de processos com grande tempo de duração e de difícil ampliação de escala. Por outro lado, o processo de *spray-drying* oferece a vantagem de formar micropartículas em um único passo, com rapidez, facilidade de operação e ampliação de escala, é realizado com condições moderadas e apresenta menor dependência da solubilidade do fármaco e do polímero (TAKADA et al., 1995). Por esses motivos, o estudo do processo de microencapsulação por *spray-*

drying tem crescido sendo atualmente um importante campo de investigação (RÉ, 1998).

A primeira etapa envolvida no processo de microencapsulação por *spray-drying* é o desenvolvimento da composição a ser atomizada, a qual consiste na preparação da matriz, também chamada de solução do polímero de revestimento, na qual o fármaco será encapsulado. O polímero de revestimento selecionado é geralmente dissolvido em um solvente em que o fármaco é insolúvel (RÉ, 1998). O ativo é, então, adicionado, sob agitação, à solução do polímero de revestimento. A agitação vigorosa proporciona uma dispersão do ativo.

A composição a ser atomizada pode ser um sistema homogêneo (solução) ou heterogêneo (suspensão). No caso de soluções, fármaco e polímero de revestimento estão co-dissolvidos em um sistema comum, o qual é atomizado. Para as suspensões, uma solução polimérica é inicialmente preparada, e as partículas do ativo são adicionadas, sendo dispersas na solução polimérica. A suspensão polímero + fármaco é então atomizada. O fluxo de ar quente entra em contato com as partículas atomizadas, evaporando o solvente. O polímero de revestimento precipita e aprisiona o fármaco disperso na suspensão, formando, geralmente, microesferas. Visto que o *spray-drying* é um processo muito rápido, a arquitetura da gota é fixa e reflete a estrutura da partícula seca formada. As partículas secas, nas quais o fármaco está microdisperso, é coletado por um separador de pós.

Segundo Ré (1998), diferentes condições da formulação da composição podem influenciar a predominância na formação de determinado produto e, conseqüentemente, as propriedades de escoamento das partículas e o perfil cinético de liberação do fármaco aprisionado.

Sabe-se que, produtos microencapsulados obtidos a partir de uma suspensão apresentam melhores propriedades de escoamento e uma menor velocidade de liberação do fármaco. Já a maioria dos produtos obtidos a partir de uma solução, contêm cristais do fármaco na superfície do polímero. Essa morfologia é resultado da formação inicial de uma crosta polimérica sólida, seguida por uma difusão de água da crosta para a superfície, a qual carrega o fármaco dissolvido. Durante a evaporação, os cristais de fármaco são depositados na superfície das micropartículas. As protusões do fármaco na superfície polimérica dá uma maior grau de aspereza/rugosidade ao produto seco, e resulta numa rápida liberação do fármaco (WAN; HENG; CHIA, 1992).

Outro fator importante da formulação que impacta diretamente nas micropartículas é a proporção polímero:fármaco. Quanto maior a porcentagem de polímero na composição, maior a porcentagem de fármaco microencapsulado; além disso, quanto maior a porcentagem de polímero, menos o fármaco fica exposto na superfície da partícula, formando micropartículas com a superfície mais lisa (RÉ, 1998).

2.3 QUITOSANA

A quitosana ou $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-deoxi-D-glucose é um biopolímero polissacarídeo hidrofílico constituído de monômeros de glucosamina e N-acetilglucosamina unidos por uma ligação $\beta(1\rightarrow4)$. É obtida industrialmente pela hidrólise alcalina do grupo aminoacetil da quitina (N-desacetilação) (Figura 2), a qual é o principal componente do exoesqueleto de crustáceos. Dessa forma, a quitosana apresenta-se como um copolímero linear que exhibe propriedades comuns dos

polissacarídeos de ligação $\beta(1\rightarrow4)$ tais como, rigidez da cadeia, capacidade de formar filmes e géis (CHENITE et al., 2000; SORLIER et al., 2003).

Figura 2. Estruturas químicas da quitina e quitosana.

A maioria dos polissacarídeos naturais, como por exemplo a celulose, dextrano, pectina, ácido algínico, agar e agarose, são neutros ou ácidos. Entretanto, a quitosana é um polissacarídeo básico. Essa propriedade permite: (i) formação de sais de polioxi; (ii) contribui para a formação de filmes; (iii) propriedade de quelar metais; (iv) bioadesividade (MAJETI; KUMAR, 2000).

A quitosana é solúvel em ácidos orgânicos diluídos, como ácido acético, ácido fórmico, devido à formação de sais de quitosana. Através da protonação dos grupos amina presentes em meio ácido, a quitosana torna-se e mantém-se solúvel até pH 6,2 através da formação de sais de quitosana. A alcalinização da solução aquosa de quitosana a valores de pH superiores a 6,2 sistematicamente leva à formação de precipitados geleificados (SORLIER et al., 2003).

Como a quitosana apresenta o N na forma de amina primária, este biopolímero sofre reações típicas das aminas, como a formação de base de Schiff. À temperatura ambiente, a quitosana forma aldiminas (reação com aldeídos) e cetiminas (reação com cetonas). A N-alkilquitosana formada da reação com aldeídos entumesce em presença de água, formando filmes (MAJETI; KUMAR, 2000).

O grau de desacetilação informa a porcentagem de N que podem ser protonados, conseqüentemente, fornece uma informação indireta da solubilidade da quitosana. Assim, quanto maior o grau de desacetilação, maior a solubilidade da quitosana. Este indicador pode ser obtido por titulometria (MAJETI; KUMAR, 2000).

O peso molecular médio (M_w) da quitosana pode ser obtido por *light scattering*. Geralmente encontra-se dentro da faixa de 1 a 5×10^5 (MAJETI; KUMAR, 2000).

2.3.1 Produção de quitosana : Aspectos econômicos e tecnológicos

A produção de quitina e quitosana é baseada na utilização do exoesqueleto de crustáceos, como os carangueijos e camarões, pela indústria alimentícia de enlatados, principalmente dos Estados Unidos, Japão e Noruega.

A produção de quitosana a partir do exoesqueleto de crustáceos é economicamente viável, especialmente se a recuperação de carotenóides for incluída. O exoesqueleto contém consideráveis quantidades de astaxantina, carotenóide, este, que não é sintetizado, sendo comercializado como aditivo para a alimentação de peixes em piscicultura, especialmente a de salmões.

O processamento do exoesqueleto dos crustáceos envolve a remoção das proteínas e a dissolução do carbonato de cálcio, presente em altas quantidades. A quitina resultante é, então, desacetilada em 40% de NaOH à 120°C por 3h. Esse tratamento produz quitosana com grau de desacetilação de 70% (MAJETI; KUMAR, 2000).

2.3.2. Aplicações

Devido ao fato de a quitosana apresentar um grande peso molecular, apresentar carga positiva, e ser capaz de formar filmes e géis, esse material tem sido usado extensivamente pela indústria : (i) na remediação de subprodutos tóxicos, como agente para floculação/clarificação de águas residuárias e quelante de metais pesados; (ii) na indústria alimentícia, como constituinte da alimentação humana, principalmente no Japão, e também é usado na clarificação de sucos e cervejas; (iii) na agricultura, como fungicida para proteção da safra de maçãs (ILLUM, 1998).

Recentemente, o uso da quitosana tem sido explorado nas indústrias cosméticas, de produtos odontológicos e oftalmológicos. Nesta última como material para fabricação de lentes de contato, uma vez que possui todas as características necessárias para se fazer lentes de contato: transparência óptica, estabilidade mecânica, correção óptica (fácil ajuste de eixo), permeabilidade gasosa (principalmente ao oxigênio), compatibilidade imunológica (MAJETI; KUMAR, 2000).

Também foi introduzido no mercado de suplementos alimentares o uso da quitosana como adjuvante na perda de peso e diminuição de níveis de colesterol (ILLUM, 1998).

Como a quitosana apresenta-se biologicamente segura, tem sido proposto sua utilização como polímero bioadesivo para liberação na mucosa oral. Além da bioadesão, quitosana inibe a adesão de *Candida albicans* nas células bucais humanas, auxiliando na prevenção ao desenvolvimento de mucosites (SENEL et al., 2000).

Sugere-se, também, que a quitosana possa ser usada para inibir a fibroplasia em compressas e para promover o crescimento e diferenciação de

tecidos. Por ser bioabsorvível, pode ser utilizado em fios cirúrgicos (DODANE; VILIVALAM, 1998).

Na indústria farmacêutica, a quitosana pode apresentar várias aplicações como excipientes para: compactação direta, granulação úmida, géis, filmes, revestimentos e emulsões (ILLUM, 1998). Devido à característica catiônica única e capacidade de formar filmes e géis, a quitosana tem sido extensivamente estudada e avaliada pelo seu potencial no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (SHU; ZHU, 2002; BERNARDO et al, 2003).

Há alguns anos a quitosana tem sido estudada na obtenção de micropartículas com o objetivo de modificar a velocidade de liberação de fármacos. Por exemplo, micropartículas de quitosana oxiquitina podem prolongar a liberação de miconazol em até 20 h (GENTA et al., 2003).

Devido à inibição da adesão de *Candida albicans* em células bucais humanas, presença de atividade bioestimulante nos processos de recuperação de tecidos feridos e à presença de mucoadesividade, a quitosana apresenta grande aplicação na área odontológica (GENTA et al., 2003).

Bernardo et al. (2003) desenvolveram *beads* de quitosana carregados com bupivacaína, a fim de promover uma liberação sustentada desse anestésico local para controle da dor pós-cirúrgica em procedimentos odontológicos. Foi observada uma liberação sustentada da bupivacaína por 120 h. Já Senel et al (2000) avaliaram o uso de gel e filmes de quitosana como sistema de liberação sustentada de clorexidina na cavidade oral. A aplicação da clorexidina à baixas concentrações (0,1%) incorporada a um gel e a filmes de quitosana para tratamento da candidíase na cavidade oral apresentaram resultados promissores. Os filmes de quitosana

sustentaram a liberação da clorexidina por mais de 4 h, o que torna esse sistema vantajoso no tratamento da periodontite.

A quitosana também apresenta grande capacidade de interagir fortemente com diferentes moléculas de caráter aniônico, como por exemplo, citrato, tripolifosfato, visto ser um polímero catiônico (SORLIER et al., 2001). Shu e Zhu (2002) avaliaram o efeito do meio de dissolução, pH e força iônica, sobre a liberação da riboflavina a partir de micropartículas de quitosana com ligação cruzada do tipo iônica com agentes sulfatos, citratos e tripolifosfatos. As micropartículas contendo tripolifosfato como agente de ligações cruzadas apresentam uma liberação de riboflavina no suco entérico de menos de 70% em 24 h.

Face às propriedades biodegradáveis, bioadesivas e do grande potencial para o desenvolvimento de sistemas de liberação, associado à elevada disponibilidade e baixo custo decidiu-se, para o desenvolvimento deste trabalho, utilizar a quitosana como o polímero para microencapsulação de ativos com aplicação odontológica.

2.4 AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS (AINES)

De todos os agentes terapêuticos, os AINES estão entre os mais amplamente utilizados. Os AINES incluem uma variedade de agentes que pertencem a, pelo menos, 7 classes químicas diferentes, a saber: salicilatos, 3,5-pirazolidinodionas, ácidos arilalquílicos (ácidos aril e heteroarilacético e ácidos aril e heteroarilpropionicos), ácidos n-arilantranílicos (ácidos fenâmicos), e oxicans (BORNE, 1998).

Os AINES apresentam 3 tipos principais de ações farmacológicas: (i) ação anti-inflamatória; (ii) ação anti-álgica e (iii) ação anti-pirética. Em geral, todos esses

efeitos estão relacionados com a ação inibitória sobre a enzima araquidonato ciclooxygenase (COX), com conseqüente inibição da produção de prostaglandinas e tromboxanos (RANG; DALE; RITTER, 2001).

A COX apresenta-se em duas isoformas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima constitutiva que está expressa na maioria dos tecidos. Já a COX-2 é induzida nas células inflamatórias quando ativadas, sendo responsável pela produção pelos mediadores prostanóides da inflamação (VANE; BOTTING, 1996). Atualmente, os AINES mais comercializados são inibidores das duas isoformas, embora variem quanto ao grau de inibição (GRISWOLD; ADAMS, 1996).

O maior grupo dos AINES é representado pela classe dos ácidos arilalcanóicos, cuja estrutura química geral está apresentada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura química geral dos ácidos arilalcanóicos.

Fármacos como indometacina, sulindaco, diclofenaco sódico, ibuprofeno, naproxeno, tolmetina e cetoprofeno são alguns exemplos de AINES pertencentes à classe dos ácidos arilalcanóicos.

A relação estrutura-atividade desses agentes é muito similar. Todos esses agentes possuem um centro ácido, representado pela função ácido carboxílico, o

qual apresenta uma relação de similaridade com a função ácido carboxílico presente no ácido araquidônico. Este centro ácido deve estar ligado a um átomo de carbono de distância de uma superfície plana, representada um anel aromático ou heterocíclico. A distância entre esses dois centros (ácido e plano) é crítica para a atividade anti-inflamatória, uma vez que permite a melhor disponibilização das duplas ligações do anel aromático, correlacionando-se com as duplas ligações nas posições 5- e 8- do ácido araquidônico. A substituição de um grupo metil no carbono 2, aumenta a atividade anti-inflamatória, além de formar um centro quiral. Esses compostos de ácido propiônico substituído, com alta potência anti-inflamatória, são denominados *profenos* (BORNE, 1998).

O cetoprofeno, ácido [2-(3-benzoilfenil) propanóico] – Figura 4 - é um dos mais potentes AINE. Apresenta-se como um pó branco, sem odor, praticamente insolúvel em água mas muito solúvel em solventes orgânicos. Foi introduzido no mercado em 1986 e tem ganho grande aceitação desde então. É obtido por síntese a partir do ácido 2-(p-aminofenil) propiônico via um intermediário de tioxantona (BORNE, 1998). Diferente dos outros AINEs, o cetoprofeno, além de inibir a síntese de prostaglandinas, inibe também a síntese de leucotrienos e a migração de leucócitos para a área inflamada. O cetoprofeno estabiliza a membrana lisossomal durante a inflamação resultando em uma menor destruição tecidual. Também tem sido relatada uma atividade antibradicinina, responsável pela ação antiálgica. A bradicinina que é liberada durante a inflamação pode ativar os receptores periféricos da dor.

Figura 4. Estrutura química do cetoprofeno (ácido [2-(3-benzoilfenil) propanóico]).

Com relação à farmacocinética, o cetoprofeno é rapidamente absorvido pela via oral, apresentando pico plasmático entre 0,5 a 2,0 h. Apresenta forte ligação com proteínas plasmáticas (99%) e um $pK_a = 5,94$. É metabolizado por conjugação do ácido carboxílico a glicoronídeos, hidroxilação do anel aromático e redução da função cetona.

Cetoprofeno é indicado para tratamento a longo prazo da artrite reumatóide e osteoartrite, para dores moderadas e para dismenorréia primária. Os ácidos aril-hetero-propionícos são muito utilizados em Odontologia para controle da dor pós-cirúrgica (AVERBUCH; KATZPER, 2000; OLSON et al., 2001) e especula-se sua utilização no tratamento da periodontite (LAWRENCE et al., 1998; PAQUETTE et al, 2000).

Embora a eficácia dos AINEs para o controle da dor aguda e crônica ser bem reconhecido, a administração desses agentes é acompanhada por alguns efeitos colaterais. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que os AINEs aumentam o risco de ulcerações e perfurações do intestino delgado em pacientes tanto sob uso crônico quanto agudo de AINEs. O risco de se apresentar um sangramento do trato gastro-intestinal é aumentado em 5 vezes após a administração oral dos AINEs .

Uma abordagem terapêutica utilizada para superar essas limitações dos AINEs, é maximizar a concentração do fármaco no sítio de ação e minimizar a exposição sistêmica pela administração do fármaco diretamente no sítio de ação.

Dionne et al. (1999) avaliaram a administração de um gel de cetoprofeno diretamente no alveolo de onde havia sido extraído cirurgicamente o terceiro molar e concluíram a grande eficácia anti-álgica desta formulação local, com menores efeitos colaterais quando comparada com a mesma dose administrada oralmente. Além disso, a formulação local foi melhor tolerada, com menor risco para os tratos gastrointestinal e renal.

Assim, sistemas biodegradáveis que promovem a liberação local e sustentada de fármacos têm se mostrado eficazes em odontologia, uma vez que proporcionam uma elevada concentração do fármaco no sítio de ação usando menores quantidades do fármaco, o que reduz a probabilidade de efeitos colaterais e tóxicos, além de prolongar o efeito terapêutico.

2.5 VALIDAÇÃO

A validação é um ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados (ANVISA, 2003)

Assim, a validação permite: (i) aperfeiçoar os conhecimentos dos processos produtivos, assegurando, desta forma, que estão sob controle; (ii) Diminuir os riscos de desvio de qualidade; (iii) Diminuir a quantidade de testes de controle de qualidade nas etapas de controle em processo e no produto acabado.

Sendo parte integrante das Boas Práticas de Fabricação, a validação confirma que determinado processo foi adequadamente desenvolvido e que se

encontra sob controle. Assim, todas as atividades de desenvolvimento de produtos devem ser concluídas com uma fase de validação. Para o desenvolvimento deste trabalho, foi realizada a validação da metodologia analítica utilizada na quantificação do cetoprofeno e a qualificação de operação do equipamento *spray-dryer*.

O objetivo de uma validação de metodologia analítica é demonstrar que determinado método de análise é adequado para seu uso pretendido. Os parâmetros que devem ser considerados durante a validação são: (i) Linearidade e Variação; (ii) Limite de detecção e quantificação; (iii) Precisão; (iv) Exatidão; (v) Especificidade (ANVISA, 2003).

Já a qualificação de equipamentos, ou seja, todas as operações documentadas de acordo com um plano de testes pré-determinados, com critérios de aceitação definidos, é executada com a finalidade de garantir que todos os equipamentos, instalações e utilidades estejam adequados ao uso pretendido (ANVISA, 2003; FDA, 21 CFR 210/211). Assim, a qualificação atesta que todos os aspectos do equipamento, que podem afetar a qualidade do produto, estão corretamente instalados (QI), operam de acordo com as especificações do seu fabricante (QO) e seu desempenho está em conformidade com as especificações estabelecidas para o produto obtido (QP) (ISPE, 2001).

Os ensaios de qualificação do equipamento *spray-dryer* e a validação da metodologia de análise de teor do cetoprofeno propostos neste trabalho estão em conformidade às normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a indústria farmacêutica, a fim de se implementar na pesquisa em escala laboratorial os conceitos e regulamentações sobre qualificação e validação usados na indústria.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é determinar as especificações do processo de *spray-drying* na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos de aplicação odontológica. Como polímero para o desenvolvimento deste trabalho foi empregada a quitosana, devido às propriedades biodegradáveis, bioadesivas e do grande potencial para o desenvolvimento de sistemas de liberação, associado à elevada disponibilidade e baixo custo de obtenção.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

São apresentados nesta seção as principais vidrarias, matérias-primas, reagentes, equipamentos e metodologia experimental que foram utilizados no desenvolvimento desse trabalho.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Vidrarias e outros materiais de laboratório

Foram utilizados os seguintes materiais de laboratório e vidraria: pipetas de vidro, pipetas automáticas, béqueres de vidro e de plástico, bureta, peneira, erlenmeyer, barra imantada, espátulas, placas de Petri, balões volumétricos, papel de filtro (lote H0008 – *SATELIT*), tubos de celulose para diálise membrana plana (*Sigma-Aldrich*)

4.1.2 Matérias-primas, reagentes e utilidades

- Água destilada;
- Ácido Acético Glacial – PA – *Synth* - Lote: 54931 - Fab: Mai/2002 - Val: Mai/2005;
- Quitosana em pó – *Polymar* – Lote: 010603 - Fab: Jun/2003 - Val: Jun/2006;
- Cetoprofeno em pó – *NaturalPharma* – Lote: 020401 Fab: 04/2002 - Val: 04/2007;
- NaH_2PO_4 - *Synth* - Lote: 50919 - Fab: Set/2001 - Val: Set/2005;
- Na_2HPO_4 - *Synth* - Lote: 64903 - Fab: Ago/2003 - Val: Ago/2007;
- NaCl - *VE TEC* - Lote: 012562 - Fab: Ago/2001 - Val: Ago/2004.

4.1.3 Equipamentos

Foi utilizado um *spray-dryer* modelo SD 05 fabricado pela LABPLANT, Reino Unido. A câmara de secagem possui diâmetro de 215 mm e altura de 500 mm. A figura 5 apresenta um diagrama do equipamento utilizado:

Figura 5. Diagrama esquemático do equipamento *spray-dryer* utilizado (Fonte: RATTES, 2004)

Além destes equipamentos, utilizam-se inúmeros outros equipamentos, a maioria dos quais estão listados a seguir:

- Agitador magnético Fisatom, Mod. 753;
- Agitador mecânico Fisatom, Mod.713;
- Balança analítica Marte (500g e 5000g);
- Balança analítica Mettler Tolloed (250g);
- Balança de infravermelho Mettler, Mod. LP11
- Bomba peristáltica COLE-PARMER, Mod. 7553-75;

- Espectrofotômetro UV-VIS HP 8453 operando o *software* HP Chem-Station;
- Estufa de secagem e esterilização Fanem, Mod.315 SE;
- Microscópio eletrônico de varredura DSM 960 Zeiss West Germany;
- Microscópio metalográfico Olympus operando o *software* Image Pro-plus®;
- Sistema de filtração à vácuo;
- Termohigrômetro, Traceable® Higrrometer Thermometer Dew Point;
- Termômetro digital Minipa APPA MT-520;
- Aparelho de Dissolução, modelo 299 da Nova Ética; e,
- Micromanômetro digital FCO 12 Furness Control Limited.
- Calorímetro DSC-50 da Shimadzu

4.2 MÉTODOS

A estratégia metodológica utilizada no desenvolvimento deste trabalho pode ser dividida em 5 etapas, a saber: (i) Desenvolvimento da composição para microencapsulação: etapa onde o polímero é caracterizado e são testadas diferentes concentrações do polímero, do fármaco e do sistema solvente, a fim de se determinar qual melhor composição para os ensaios de microencapsulação; (ii) Qualificação de operação do equipamento *spray-dryer*: etapa onde os parâmetros temperatura de entrada e de saída, vazão da bomba peristáltica e vazão do ar de secagem, que são críticos para a qualidade do produto final, são avaliados. (iii) Validação da metodologia analítica: etapa na qual o método proposto para análise de teor de cetoprofeno presente nas micropartículas é avaliado quanto sua linearidade, precisão, exatidão e especificidade; (iv) Ensaio de microencapsulação

por *spray-drying*: etapa na qual os parâmetros como temperatura de entrada, vazão do ar de secagem, vazão da bomba peristáltica, diâmetro do bico atomizador são modificados e lotes de micropartículas são produzidos; (v) Caracterização das micropartículas: etapa na qual as micropartículas são caracterizadas quanto ao seu tamanho e distribuição granulométrica, umidade, morfologia, comportamento térmico, eficiência de microencapsulação do fármaco e perfil de liberação do fármaco em meio de dissolução biorrelevante.

Através dessa estratégia metodológica pode-se determinar a especificação de processo (temperatura de entrada, vazão do ar de secagem, vazão da bomba peristáltica) que produz as melhores micropartículas, sendo a qualidade do produto final e a velocidade de liberação do fármaco as características chaves para a determinação de tal especificação.

Nesta seção são apresentadas as metodologias referentes ao desenvolvimento da composição para microencapsulação, à qualificação de operação do equipamento *spray-dryer* e à validação da metodologia analítica aos ensaios de microencapsulação por *spray-drying*, ambas em conformidade às normas da ANVISA para a indústria farmacêutica, e à caracterização das micropartículas obtidas.

4.2.1 DESENVOLVIMENTO DA COMPOSIÇÃO PARA MICROENCAPSULAÇÃO

4.2.1.1 Caracterização da quitosana empregada neste trabalho: determinação do grau de desacetilação e perda por dessecação

O grau de desacetilação médio (%GD) foi determinado por titulação ácido-base por excesso, modificando-se o método proposto por Santos et al. (2003).

Foram pesados 200 mg de quitosana e dissolvidos em 40 mL de ácido clorídrico 0,05 mol L⁻¹. A titulação potenciométrica por excesso foi conduzida utilizando hidróxido de sódio 0,17 mol L⁻¹ como titulante. O pH da solução de polímero foi medido a cada adição de 1 mL de titulante.

Para a caracterização da quitosana quanto a perda por dessecação 0,5 g de quitosana foi pesada em uma placa de Petri e colocada em uma estufa de secagem a 105 °C. A amostra foi pesada em tempos determinados até peso constante.

4.2.1.2 Determinação da concentração do polímero quitosana e do solvente ácido acético

Foram preparadas, em erlenmeyers (capacidade = 200 mL), dispersões de quitosana nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 5,0% em soluções de ácido acético a 0,5 e 1,0%. Barras imantadas foram adicionadas aos erlenmeyers, sendo as dispersões agitadas magneticamente por 2 h a 500 rpm à temperatura ambiente.

4.2.1.3 Otimização do método de preparo da solução de revestimento de acetato de quitosana

A fim de otimizar o método de preparo da solução de revestimento de acetato de quitosana, foi preparada uma solução de quitosana a 2,0% em ácido acético a 1,0%, com o auxílio de um agitador mecânico *Fisatom* modelo 713D, com uma haste acoplada a uma hélice naval de aço inox AISI 304 de 6 cm, a solução foi agitada por 30 minutos a 1020 rpm e 15 minutos a 720 rpm, totalizando um tempo de agitação de 45 minutos. O preparo foi conduzido à temperatura ambiente.

4.2.1.4 Desenvolvimento da composição para microencapsulação propriamente dita

A partir dos resultados obtidos nos ensaios realizados na seção 4.2.1.2, foi definida a composição para o desenvolvimento deste trabalho. :

4.2.1.4.1 Composição

Cada 100 mL da formulação contém:

Quitosana pó -----2,0 g

Cetoprofeno -----2,0 g

Solução de ácido acético 1,0% ----- q.s.p.----100,0 mL

4.2.1.4.2 Modo de Preparo:

Em um béquer de plástico, foi adicionado a quitosana em pó e completado o volume com a solução de ácido acético 1,0%. Com o auxílio de um agitador mecânico *Fisaton* modelo 713D, com uma haste acoplada a uma hélice naval de aço inox AISI 304 de 6 cm, a dispersão foi agitada por 30 minutos a 1020 rpm e 15 minutos a 720 rpm, totalizando um tempo de agitação de 45 minutos, a temperatura ambiente. O cetoprofeno foi peneirado em uma placa de Petri, e adicionado lentamente à solução de revestimento de acetato de quitosana 2% sob agitação mecânica a 480 rpm. O tempo de adição do fármaco foi de 30 minutos. Após a adição completa do cetoprofeno, a suspensão permaneceu sob agitação a 480 rpm por mais 30 minutos, após o qual a suspensão encontra-se pronta para ser atomizada.

A proporção de 1:1 cetoprofeno/quitosana foi escolhida para os ensaios de microencapsulação por *spray drying* pois apresenta o maior teor de sólidos.

4.2.2 QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO DO *SPRAY-DRYER* SD-05 LABPLANT

Parâmetros como temperatura de entrada, temperatura de saída, vazão do ar de secagem e vazão da bomba peristáltica, são importantes para as características do produto final sendo, portanto, parâmetros da qualificação de operação. Abaixo está descrita a metodologia utilizada no desafio da operação do equipamento *spray-dryer* SD-05.

4.2.2.1 Temperaturas de entrada e de saída

A fim de verificar se as temperaturas de entrada programadas e de saída mostradas pelo SD-05 são temperaturas reais, dois termopares calibrados foram colocados na entrada da câmara de secagem (T_1) e na saída do tubo de exaustão (T_2).

4.2.2.2 Vazão da bomba peristáltica

A extremidade de entrada da mangueira da bomba peristáltica foi conectada a um béquer contendo água destilada, enquanto que a extremidade de saída foi acoplada a um béquer com peso tarado. A bomba foi acionada nas escalas 10, 20, 30, 35, 40, 45 e 50, conforme o manual de operações do SD-05. Após 1 min de operação da bomba em cada escala, o béquer foi novamente pesado e tarado. Dessa forma, foi possível medir a vazão da bomba peristáltica em g/min em cada ponto da escala. Como o material usado neste experimento foi água destilada, foi considerado um valor de densidade de 1 g/mL. Dessa forma, a medida da vazão da bomba apresenta o mesmo valor tanto em g/min como em mL/min.

4.2.2.3 Vazão do ar de secagem

Um tubo de Pitot, acoplado a um micromanômetro digital, foi posicionado no centro do tubo de exaustão de ar, na direção do pressostato do próprio equipamento SD-05, com o objetivo de medir a velocidade (m/s) com que o ar de secagem passa pelo local. Multiplicando-se a velocidade do ar (m/s) pela área da secção transversal ($\pi \times R^2$ em m^2) e pelo fator de conversão (3600 s), obtem-se a vazão do ar de secagem (m^3/h). Dessa forma, para cada ponto da escala de vazão do ar do SD-05, foi medida a velocidade do ar e calculada a vazão do ar de secagem em m^3/h .

4.2.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE TEOR DE CETOPROFENO

A análise de teor de cetoprofeno está conforme o método de Çomoglu; Gonul; Baykara (2003).

Durante a validação dessa metodologia analítica, os seguintes parâmetros foram considerados: (i) Linearidade e Variação; (ii) Precisão; (iii) Exatidão; (iv) Especificidade. A metodologia para avaliação de cada parâmetro está em conformidade às normas da ANVISA para a validação de métodos analíticos na indústria farmacêutica e encontra-se descrita abaixo:

4.2.3.1 Linearidade

Uma solução-estoque na concentração de 1 mg/mL de cetoprofeno em salina tampão fosfato (PBS) pH 7,4 foi analiticamente preparada. Desta solução, foram preparadas, por diluição em PBS pH 7,4 e em *triplicata*, soluções nas concentrações

de 0,01; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,00; 2,50 ; 5,00 ; 7,50 ; 10,00 ; 12,50; 20,00; 50,00 e 100,00 $\mu\text{g/mL}$, as quais tiveram os valores de absorvância em 262 nm determinados por espectrofotometria no UV, tendo o PBS pH 7,4 como branco. Os valores de absorvância médios (y) obtidos foram relacionados em gráfico como uma função da concentração (x).

4.2.3.2 Confecção da curva de calibração

Uma solução-estoque na concentração de 1 mg/mL de cetoprofeno em salina tampão fosfato (PBS) pH 7,4 foi analiticamente preparada. Desta solução, foram preparadas, por diluição em PBS pH 7,4 e em *triplicata*, soluções nas concentrações de 2,5 ; 5,0 ; 7,5 ; 10,0 ; 12,5 $\mu\text{g/mL}$, as quais tiveram os valores de absorvância em 262 nm determinados por espectrofotometria no UV, tendo o PBS pH 7,4 como branco. Os valores de absorvância médios (y) obtidos foram relacionados em gráfico como uma função da concentração (x).

4.2.3.3 Repetibilidade (Precisão)

A fim de se determinar a repetibilidade do método, 6 soluções de cetoprofeno em PBS pH 7,4 foram preparadas na concentração de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ e tiveram seus valores de absorvância determinados em UV ($\lambda = 262 \text{ nm}$). As concentrações reais foram calculadas e analisadas estatisticamente, sendo determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

4.2.3.4 Exatidão

A fim de se verificar a exatidão do método, soluções de cetoprofeno em PBS pH 7,4 em 3 concentrações (5,0; 7,5 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas em *triplicata*

(9 determinações) e análises por espectrofotometria no UV ($\lambda = 262 \text{ nm}$). As concentrações reais foram calculadas e analisadas estatisticamente, sendo determinados a média, o desvio padrão (S) e a % de exatidão (% E) de cada concentração.

4.2.3.5 Especificidade

Com o propósito de se determinar a especificidade do método de análise de cetoprofeno por espectrofotometria no UV a seguinte estratégia foi adotada: (i) analisar uma amostra contendo apenas os supostos interferentes; (ii) analisar uma amostra contendo apenas o fármaco cetoprofeno; (iii) analisar uma amostra contendo o fármaco cetoprofeno e os supostos interferentes, que neste caso é apenas o acetato de quitosana.

Dessa forma, foram preparadas: (i) uma suspensão de acetato de quitosana em PBS pH 7,4 na concentração de $8 \mu\text{g/mL}$, a qual foi submetida à agitação magnética (200 rpm) por 2 h; (ii) uma solução de cetoprofeno em PBS pH 7,4 na concentração de $8 \mu\text{g/mL}$ e (iii) uma solução de cetoprofeno ($8 \mu\text{g/mL}$) e acetato de quitosana ($8 \mu\text{g/mL}$) em PBS pH 7,4 .

4.2.4 ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY DRYING*

Sob agitação magnética (200 rpm), a solução de revestimento (acetato de quitosana) e a composição de microencapsulação (suspensão de cetoprofeno + acetato de quitosana na proporção 1:1) foram processadas no *spray dryer* SD-05 LabPlant sob a seguinte condição operacional padrão: 130°C de temperatura de entrada; 1 mm de diâmetro do bico atomizador; 1,3 bar de pressão do ar

comprimido; 5,7 g/min de vazão da bomba peristáltica; 49,2 m³/h de vazão do ar de secagem e 48 toques/min do de-blocker.

A fim de se determinar a melhor condição operacional do *spray-dryer* para a produção de micropartículas, alguns parâmetros foram modificados na condição operacional padrão, a saber: temperatura de entrada (100 e 130 °C); diâmetro do bico atomizador (0,5 mm e 1,0 mm) e vazão da bomba peristáltica (11,3 g/min).

A composição de microencapsulação (suspensão de cetoprofeno + acetato de quitosana na proporção 1:2) foi processada no *spray-dryer* apenas na condição operacional considerada mais adequada.

O rendimento e tempo do processo de secagem foram calculados. Os pós obtidos foram identificados e armazenados em frascos opacos hermeticamente fechados.

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

As micropartículas obtidas foram caracterizadas quanto à aparência, ao odor, ao tamanho e distribuição granulométrica por microscopia óptica, à morfologia por microscopia eletrônica de varredura, ao teor total e superficial de cetoprofeno presente nas micropartículas, eficiência de microencapsulação, à umidade, ao comportamento térmico e à liberação *in vitro* do cetoprofeno. Também foram caracterizados o cetoprofeno, a quitosana e o acetato de quitosana secas no *spray-dryer*.

4.2.5.1 Aparência e odor

Certa quantidade de pó foi espalhada em uma placa de Petri para verificação do aspecto visual e odor.

4.2.5.2 Tamanho e distribuição granulométrica

Certa quantidade de pó foi pulverizada em uma lâmina de vidro sendo observadas em um microscópio óptico acoplado a um sistema de aquisição de imagens. Os tamanhos das partículas foram medidos e a distribuição granulométrica foi determinada.

4.2.5.3 Morfologia por microscopia eletrônica de varredura

A análise da forma e das características de superfície da matéria-prima e das micropartículas obtidas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (DSM 960 – Zeiss). Uma pequena quantidade de pós foi depositado sobre um suporte de amostra contendo fita aderente especial e então procedeu-se ao recobrimento com fina camada (20 nm) de ouro. As amostras assim preparadas foram acondicionadas em um suporte interno ao sistema de microscopia e aguardou-se até que o sistema indicasse nível de vácuo adequado. As fotomicrografias foram obtidas com aumento de 50, 3000, 5000 e 15000 x.

4.2.5.4 Teor total de cetoprofeno presente nos pós

Para análise de teor total de cetoprofeno, foram pesados 20 mg de pó e suspensos em 100 mL de salina tampão fosfato pH 7,40 (PBS), permanecendo sob agitação vigorosa por 24 h à temperatura ambiente. Para controle, foram pesados 10 mg de acetato de quitosana secos no spray dryer, e suspensos em 100 mL de PBS permanecendo em agitação pelo mesmo tempo. Após o período determinado, as amostras foram filtradas em papel de filtro e 2 mL do filtrado foram diluídos em balão volumétrico de 25 mL com PBS e analisados espectrofotometricamente a 262 nm.

Um teor teórico de 8 µg/mL é esperado. Dessa forma, pode-se calcular o teor total em %.

4.2.5.5 Teor superficial de cetoprofeno presente nos pós

Para a análise de teor superficial, foram pesados 10 mg de pós. Os pós foram enxaguados com 10 mL de PBS pH 7,4 e filtrados à vácuo. O filtrado foi analisado espectrofotometricamente a 262 nm. Supondo que todo o cetoprofeno estivesse na superfície, um teor teórico de 8 µg/mL é esperado. Dessa forma, pode-se calcular o teor superficial em %.

4.2.5.6 Porcentagem de eficiencia de microencapsulação

A porcentagem de eficiência de microencapsulação (% E_fM) é calculada pela equação 1:

$$\% E_f M = \{(TCT - TCS) / TCM \text{ teórico}\} \times 100 \quad (1)$$

Onde, TCT = teor cetoprofeno total, TCS = teor de cetoprofeno superficial, TCM teórico = Teor de cetoprofeno microencapsulado teórico.

4.2.5.7 Umidade

A umidade das micropartículas foi determinada com o auxílio de uma balança de infravermelho Mettler LP12. Foram pesados 50 mg de pó e pulverizados sobre o suporte de alumínio. A temperatura foi ajustada para 60 °C e a lâmpada de infravermelho foi ligada, sendo desligada apenas quando o indicador de peso mostrar peso constante.

4.2.5.8 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O equipamento utilizado para a determinação das curvas de DSC foi o DSC-50 Shimadzu. Cerca de 4 mg de amostra foi colocada em um suporte de alumínio para amostras e aquecidas de 20 a 250 °C a uma razão de aquecimento de 5°C min⁻¹ em atmosfera dinâmica de ar, com uma vazão de 50mL min⁻¹. A análise térmica de calorimetria diferencial por varredura foi realizada nas amostras de cetoprofeno, acetato de quitosana spray-dried, mistura física (acetato de quitosana spray-dried + cetoprofeno) e micropartícula de quitosana carregada com cetoprofeno obtida por *spray-drying* na condição de T_{entrada}=100 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; φ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; T_{saída}=68,0 °C.

4.2.5.9 Liberação *in vitro* de cetoprofeno

O estudo da liberação *in vitro* do cetoprofeno foi conduzido em um aparato 2 USP (USP XXVII, 2004) fabricado pela empresa NovaÉtica. Cerca de 200 mg de micropartículas foram acondicionadas em tubos de membranas de diálise celulósicas amarradas com fios de nylon. Os tubos contendo as micropartículas foram inseridos em *sinkers* de aço inox. O estudo foi conduzido a 37 °C ± 2 °C, a uma velocidade de agitação das pás de 100 rpm durante 43,5 h. Salina tampão fosfato (PBS) pH 7,4 foi utilizado como meio de dissolução biorrelevante, sendo que cada cuba de dissolução acondicionava 1000 mL de meio. Em tempos pré-determinados, foram coletados 5 mL do meio de dissolução contendo o fármaco liberado, sendo analisado por espectrofotometria a 262 nm. O volume amostrado foi repostado com meio de dissolução fresco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DA COMPOSIÇÃO PARA MICROENCAPSULAÇÃO

5.1.1 Caracterização da quitosana empregada neste trabalho: determinação do grau de desacetilação e perda por dessecação

A solubilidade da quitosana em água está diretamente relacionada à quantidade de grupos amina protonados. O grau de desacetilação (GD) é uma medida indicadora da porcentagem de grupos amina protonados, fornecendo assim, uma idéia da solubilidade da quitosana (SANTOS et al., 2003).

O grau de desacetilação pode ser determinado pela titulação em excesso. Neste trabalho, a quitosana foi dissolvida em um excesso conhecido de ácido clorídrico e a solução foi então titulada potenciometricamente com hidróxido de sódio. A curva de titulação está apresentada na Figura 6.

Figura 6. Curva de titulação potenciométrica da quitosana em excesso de ácido clorídrico.

Nota-se nesta curva dois pontos de equivalência da titulação. A primeira equivalência refere-se à neutralização do excesso de ácido presente, enquanto que a segunda equivalência refere-se à neutralização da quitosana protonada. A diferença corresponde à quantidade de ácido clorídrico necessária para protonar os grupos amina da quitosana.

O grau de desacetilação foi calculado pela equação 2 abaixo:

$$\%GD = 16,1 \times C_{NaOH} \times (V_2 - V_1) / m \quad (2)$$

Onde, C_{NaOH} é a concentração do titulante NaOH; V_1 é o volume de HCl em excesso (mL); $V_2 - V_1$ é o volume de NaOH utilizado para neutralizar os grupos ácidos da quitosana (mL); M é a massa da quitosana (g).

Dessa forma, foi determinada um grau de desacetilação de aproximadamente 68,5%, o que ilustra a solubilidade da quitosana e a torna adequada para a utilização neste trabalho.

Quanto à perda por dessecação, a umidade foi calculada pela equação 3 abaixo:

$$\% U = \{(P_i - P_f) / m\} \times 100 \quad (3)$$

Onde, P_i é o peso inicial (massa quitosana úmida + massa placa); P_f é o peso final (massa quitosana seca + massa placa); m é a massa teórica de quitosana. Dessa forma, a quitosana utilizada neste trabalho apresenta cerca de 5% de umidade.

5.1.2 Determinação da concentração do polímero quitosana e do solvente ácido acético e otimização do método de preparo da solução de revestimento

A adição de uma solução de ácido acético à quitosana base livre proporciona a formação do sal acetato de quitosana, o qual é mais solúvel em água do que a base livre (CHENITE et al., 2000). Assim, para uma mesma concentração de quitosana, quanto maior a concentração de ácido acético, maior a solubilidade do polímero em água. Isso pode ser comprovado com os resultados presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação das propriedades físico-químicas aparência e pH das dispersões de acetato de quitosana em diversas concentrações de quitosana e ácido acético.

Amostra	Composição	Aparência	pH
1	0,5% Quit : 0,5 HAc	Solução límpida, pouco viscosa	3,80
2	1,0% Quit : 0,5 HAc	Dispersão com poucas partículas em suspensão, com aumento significativo da viscosidade. Não há corpo de fundo.	3,89
3	2,0% Quit : 0,5 HAc	Dispersão muito grosseira com muitas partículas em suspensão e aumento significativo da viscosidade. Não há corpo de fundo.	3,93
4	5,0% Quit : 0,5 HAc	Gel opaco e repleto de partículas. Material muito viscoso com aspecto pegajoso.	4,20
5	0,5% Quit : 1,0 HAc	Solução límpida e pouco viscosa.	3,45
6	1,0% Quit : 1,0 HAc	Solução límpida e pouco viscosa.	3,40
7	2,0% Quit : 1,0 HAc	Solução límpida e pouco viscosa	3,48
8	5,0% Quit : 1,0 HAc	Gel opaco e repleto de partículas. Material muito viscoso com aspecto pegajoso.	3,49

Quit: quitosana; HAc: ácido acético

Como observado acima, para a concentração de 2,0% de quitosana, temos duas dispersões (Amostra 3 e Amostra 7) com características físico-químicas muito diferentes. A amostra 3, contendo 0,5% de ácido acético, apresenta-se como uma dispersão grosseira com muitas partículas em suspensão e com maior viscosidade, embora não haja corpo de fundo. Já a amostra 7, contém 1,0% de ácido acético, apresenta-se como uma solução límpida e pouco viscosa.

Com base nos resultados acima, a amostra 7, ou seja, a solução de 2,0% de quitosana em solução aquosa de ácido acético 1,0%, é que apresentou as melhores características para uma solução de polímero de revestimento a ser usada na microencapsulação. Além disso, segundo Dubay e Parikh (2003), micropartículas de quitosana apenas são formadas se a concentração de quitosana for de no mínimo 1,0 %.

Entretanto, o tempo de preparo de 2 h dessa solução de revestimento é um fator limitante desse processo. Dessa forma, na tentativa de otimizar o método de preparo da solução de revestimento, um novo método foi desenvolvido, utilizando-se ao invés de um agitador magnético um agitador mecânico com uma hélice naval de 6 cm. Com essa modificação, conseguiu-se uma diminuição em 62,5% do tempo de preparo da solução de quitosana 2,0% em ácido acético 1,0% (amostra 9), a qual manteve a mesma aparência da amostra 7, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação da influência do tipo de agitação no tempo de agitação e na aparência da solução de revestimento de quitosana a 2,0% em ácido acético a 1,0%.

Amostra*	Tipo de agitação	Tempo de Agitação (min)	Aparência
7	Magnética	120	Solução límpida pouco viscosa
8	Mecânica c/ hélice naval	45	Solução límpida pouco viscosa

*Composição: 2,0% de quitosana : 1,0% de ácido acético

Face aos resultados expostos acima, a concentração de quitosana em solução aquosa de ácido acético 1,0% a ser utilizada nos ensaios de microencapsulação será a de 2,0%, sendo esta solução preparada com o auxílio de um agitador mecânico acoplado a uma hélice tipo naval. O uso de concentrações maiores de ácido acético foi descartado como forma de prevenir riscos ocupacionais e presença de grande quantidade de resíduo no produto final.

5.2 QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO DO EQUIPAMENTO SPRAY-DRYER SD-05 LAB-PLANT

A qualificação de operação é definida como conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, que determinado equipamento opera corretamente e de acordo com as especificações do fabricante (ANVISA, 2003). O manual de operação do equipamento é a fonte de estudo para se elaborar e aceitar os testes de desafio da operação do equipamento.

Parâmetros como temperatura de entrada, temperatura de saída, vazão do ar de secagem e vazão da bomba peristáltica, são importantes para as características do produto final, logo, são alvos da qualificação de operação. Abaixo estão

apresentados os resultados do desafio da operação do equipamento *spray-dryer* SD-05.

5.2.1 Temperaturas de entrada e de saída

Tabela 3. Valores de temperatura de entrada programada e de saída observada no *spray-dryer* SD-05 LabPlant relacionados aos valores de temperatura reais médios medidos com os termopares T_1 (entrada) e T_2 (saída).

T entrada programada (°C)	T entrada média real (T_1) (°C)	T°C saída observada (°C)	T°C saída média real (T_2) (°C)
50	50,5	40	42,2
80	79,2	54	58,4
100	98,0	65	70,0
120	117,0	77	83,0
140	136,0	86	94,4
160	154,7	98	106,5
180	172,5	112	120,0
200	190,0	126	133,0

Como pode ser observado pela tabela acima, há uma diferença entre a temperatura de entrada programada no SD-05 e a medida pelo termopar T_1 . Dessa forma, uma curva de calibração da temperatura de entrada real *versus* a temperatura de entrada programada (Figura 7) foi construída a fim de se calcular a temperatura de entrada a ser programada no SD-05.

Figura 7. Curva de calibração da temperatura de entrada (T°C) do SD-05.

A temperatura de entrada (°C) a ser programada no *spray-dryer* SD-05 pode ser calculada através da equação 4 abaixo:

$$Y = 1,0715x - 4,9069 \quad (4)$$

Onde, x = temperatura de entrada real (°C) medida com o termopar (T_1); Y = temperatura de entrada programada (°C) no SD-05

Com relação à temperatura de saída também observa-se uma discrepância entre os valores de temperatura observadas no SD-05 e a medidas com o termopar T_2 . Dessa forma, o mesmo raciocínio pode ser feito para a temperatura de saída, sendo necessária a construção de uma curva de calibração da temperatura de saída observada no SD-05 *versus* temperatura de saída real, representada na Figura 8.

Figura 8. Curva de calibração da temperatura de saída (°C) do SD-05

A temperatura de saída real (°C) pode ser calculada através da equação 5 abaixo:

$$Y = 1,0628x + 1,0258 \quad (5)$$

Onde, x = temperatura de saída observada (°C) no SD-05; Y = temperatura de saída real medida com o termopar T_2 .

5.2.2 Vazão da bomba peristáltica

Como pode ser observado pela Tabela 4, há uma diferença significativa entre os valores de vazão (mL/min) da escala do SD-05 e a vazão média medida (mL/min).

Tabela 4. Comparação entre os valores de vazão da bomba descritos no manual de operação do SD-05 e os valores medidos durante a qualificação de operação.

Escala	Vazão Teórica (mL/h)	Vazão Teórica (mL/min)	V ₁ *	V ₂ *	V ₃ *	V**
0	0	0	0	0	0	0
10	350	5,83	6,16	6,60	6,45	6,40
20	600	10,00	15,88	15,87	15,75	15,83
30	1000	16,67	29,74	29,79	29,82	29,78
35	1500	25,00	41,00	41,50	41,27	41,26
40	1900	31,67	54,78	54,78	54,48	54,68
45	3200	53,33	74,10	74,70	74,52	74,44
50	4600	76,67	104,14	104,31	104,29	104,25

*V₁, V₂, V₃ são valores de vazão (mL/min) medidas em triplicata;

**V é a vazão média (mL/min)

Sendo assim, uma curva de calibração escala de vazão da bomba do SD-05 *versus* vazão real da bomba (mL/min) (Figura 9) foi construída a fim de se calcular a vazão real da bomba peristáltica usada nos experimentos. Dessa forma, a correlação vazão da bomba e escala presentes no manual de operação do SD-05 não deverá ser utilizada, sendo substituída pela curva de calibração desta figura.

Figura 9. Curva de calibração da vazão da bomba peristáltica (mL/min) do SD-05 medido com água destilada.

A vazão da bomba peristáltica (mL/min) pode ser calculada através da equação 6 abaixo:

$$y = 0,0012x^3 - 0,0375x^2 + 1,0484x \quad (6)$$

Onde x = escala de vazão da bomba peristáltica; Y = vazão da bomba peristáltica (mL/min).

5.2.3 Vazão do ar de secagem

A Tabela 5 mostra a Comparação entre os valores de vazão do ar descritos no manual de operação do SD-05 e os valores médios medidos durante a qualificação. Os resultados apresentados indicam que há uma diferença significativa entre os valores de vazão (m³/h) da escala do SD-05 e a vazão de ar medida (m³/h).

Tabela 5. Comparação entre os valores de vazão do ar descritos no manual de operação do SD-05 e os valores medidos durante a qualificação

Escala	Vazão Teórica (m ³ /h)	Velocidade média do Ar (m/s)	Vazão média Real (m ³ /h)
10	38	3,78	28,87
15	44	4,43	33,84
20	47	4,84	34,24
25	50	5,39	41,18
30	54	5,78	44,17
35	57	6,22	47,56
40	62	6,37	48,67
45	64	6,85	52,34
50	73	6,90	52,74

Sendo assim, uma curva de calibração escala de vazão de ar de secagem do SD-05 *versus* vazão real do ar de secagem (m³/h) (Figura 10) foi construída a fim de

se calcular a vazão real do ar de secagem usada nos experimentos. Dessa forma, a correlação vazão do ar de secagem e escala presentes no manual de operação do SD-05 não deverá ser utilizada, sendo substituída pela curva de calibração da Figura 10.

Figura 10. Curva de calibração da vazão do ar de secagem do SD-05.

A vazão do ar de secagem (m^3/h) pode ser calculada através da equação 7 abaixo:

$$y = -0,0003x^3 + 0,0172x^2 + 0,4011x + 23,632 \quad (7)$$

Onde, x = a escala de vazão do ar de secagem no SD-05; Y = a vazão do ar de secagem (m^3/h). A equação 5 é válida para $10 \leq x \leq 50$.

Através dos testes de qualificação de operação, percebe-se que há discrepâncias entre os valores declarados de vazão de âmbos, bomba peristáltica e ar de secagem, presentes no manual de operações do equipamento *spray-dryer*, além dos valores de temperatura de entrada (programada) e de saída (observada) quando comparados aos valores médios medidos desses parâmetros. Entretanto, este fato não impossibilita o uso do equipamento *spray-dryer* no desenvolvimento deste trabalho, uma vez que curvas de calibração dos valores de temperatura de entrada e saída e vazões da bomba peristáltica e do ar de secagem foram construídas e os resultados são reprodutíveis.

5.3 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE TEOR DE CETOPROFENO

5.3.1 Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

Abaixo estão apresentados os valores de absorvância em 262 nm de diferentes soluções em *triplicata* de cetoprofeno em PBS pH 7,4 (Tabela 6) e o gráfico da absorbância média em função da concentração (Figura 11)

Tabela 6. Valores de absorvância em 262 nm de diferentes soluções em *triplicata* de cetoprofeno em PBS pH 7,4.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs média
0,01	0,000	0,000	0,000	0,000
0,05	0,002	0,002	0,002	0,002
0,10	0,005	0,006	0,006	0,009
0,50	0,032	0,032	0,031	0,031
1,00	0,070	0,070	0,071	0,070
2,00	0,124	0,121	0,124	0,123
2,50	0,149	0,132	0,145	0,142
5,00	0,310	0,292	0,314	0,305
7,50	0,472	0,459	0,470	0,467
10,00	0,645	0,602	0,629	0,625
12,50	0,799	0,785	0,801	0,795
20,00	1,245	1,245	1,221	1,237
50,00	2,846	2,836	2,745	2,809
100,00	3,554	3,525	3,542	3,540

Figura 11. Relação da absorvância em função da concentração de Cetoprofeno em PBS pH 7,4 ($\lambda=262$ nm)

Como pode ser observado pela figura acima, as concentrações relacionadas às absorvâncias de 0,1 a 0,8 apresentam-se em uma faixa da curva aparentemente linear, o que as torna viáveis para a confecção da curva de calibração.

5.3.2 Confeção da curva de calibração

Abaixo estão apresentados os valores de absorvância em 262 nm de diferentes soluções em *triplicata* de cetoprofeno em PBS pH 7,4 (Tabela 7) e o gráfico da absorvância média em função da concentração – curva padrão (Figura 12).

Tabela 7. Valores de absorvância em 262 nm de diferentes soluções em triplicata de cetoprofeno em PBS pH 7,4.

Concentração (µg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs média
2,5	0,149	0,132	0,145	0,142
5,0	0,310	0,292	0,314	0,305
7,5	0,472	0,459	0,470	0,467
10,0	0,645	0,602	0,629	0,625
12,5	0,799	0,785	0,801	0,795

Figura 12. Curva de calibração de cetoprofeno em PBS pH 7,4 ($\lambda = 262$ nm).

Como pode ser observado pela Figura 11, a concentração (C) de cetoprofeno em $\mu\text{g/mL}$ apresenta uma relação linear com a absorvância, podendo ser calculada pela equação 8, a qual apresenta um coeficiente de correlação linear (r^2) 0,9995.

$$Y = (x + 0,0098) / 0,0639 \quad (8)$$

Onde, x = absorvância em ($\lambda = 262 \text{ nm}$); Y = concentração de cetoprofeno em $\mu\text{g/mL}$.

Sendo assim, a curva de calibração apresenta-se linear na faixa de concentração de 2,5 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$, podendo ser utilizada na quantificação do fármaco cetoprofeno analisado por espectrofotometria no UV.

5.3.3 Repetibilidade (Precisão)

A precisão é definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos com amostras de mesma concentração em uma análise. Na Tabela 8 encontram-se 6 medidas de absorvância em 262 nm e respectivos cálculos de concentração de 6 soluções padrão de cetoprofeno na concentração teórica de 7,5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 8. Determinações de absorvância ($\lambda=262 \text{ nm}$) de 6 soluções padrão de cetoprofeno em PBS pH 7,4 na concentração teórica de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ para verificação da precisão do método de análise de teor de cetoprofeno por espectrofotometria no UV.

Amostra	Abs ($\lambda=262 \text{ nm}$)	[] real ($\mu\text{g/mL}$)	Média	Desvio Padrão	Coeficiente de variação
1	0,464	7,41	7,45	0,04037	0,54%
2	0,470	7,51			
3	0,464	7,42			
4	0,449	7,18			
5	0,467	7,46			
6	0,465	7,43			

Abs, absorvância; [], concentração

Nos resultados apresentados na Tabela 8, observa-se que a quarta amostra apresenta um valor de concentração real muito distante do valor teórico. Caso essa determinação seja resultado de um erro pontual, poderia estar comprometendo a precisão do método se fosse levada em consideração nos cálculos de média, desvio padrão e porcentagem de erro dos extremos. Desse modo, a fim de verificar a possibilidade de rejeitar esta determinação, foi necessário aplicar o teste de confiança Q (com nível de 98% de confiança), o qual rejeita valores com base na amplitude das medidas (LEITE, 1998). Aplicando-se este teste concluiu-se que a amostra 4 pode ser rejeitada para os cálculos de média, desvio padrão e coeficiente de variação.

O desvio padrão (S) e o coeficiente de variação (C.V) foram calculados de acordo com as equações 9 e 10 :

$$S = \sqrt{\sum (X - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (9)$$

$$\% C.V = (S / \bar{x}) \times 100 \quad (10)$$

Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Como a variabilidade na análise química de fármacos deve ser pequena, geralmente são encontrados valores de C.V menores que 1% (BOLTON, 1997) não sendo permitido um valor superior a 5% (ANVISA 2003). As 5 determinações obtidas na concentração de trabalho (7,5 µg/mL) apresentam um coeficiente de variação de 0,54%. Deste modo, pode-se inferir que o método proposto apresenta uma precisão adequada para o objetivo de quantificação do fármaco cetoprofeno.

5.3.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Os valores reais de concentração em *triplicata* de 3 concentrações teóricas estão apresentados na tabela 9 abaixo.

Tabela 9. Determinações para verificação da exatidão do método de análise de teor de cetoprofeno por espectrofotometria no UV.

[] Teórica*	Abs 1	[] 1*	Abs 2	[] 2*	Abs 3	[] 3*	[] Real Media*	% E
5,0	0,310	5,00	0,292	4,72	0,314	5,07	4,93	98,6
7,5	0,472	7,54	0,459	7,34	0,470	7,51	7,46	99,5
10,0	0,645	10,25	0,602	9,57	0,629	9,97	9,93	99,3

* Concentração em µg/mL

A % E foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% E = (\text{Valor médio da medida} / \text{Valor Teórico}) \times 100 \quad (11)$$

5.3.5 Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e excipientes (ANVISA, 2003).

Na Tabela 10 abaixo estão apresentadas as absorvâncias em 262 nm de cetoprofeno, acetato de quitosana *spray-dried* + cetoprofeno e acetato de quitosana seco no *spray dryer*.

Tabela 10. Determinações para verificação da especificidade do método de análise de teor de cetoprofeno por espectrofotometria no UV ($\lambda = 262$ nm), na presença de excipientes.

Amostras	Abs
Acetato de quitosana	-0,003
Cetoprofeno	0,501
Acetato de quitosana + cetoprofeno	0,500

Como pode ser observado pela tabela acima, o acetato de quitosana não apresenta absorvância no $\lambda = 262$ nm, ou seja, não interfere no método de análise de teor de cetoprofeno utilizado neste trabalho, o qual mostra-se específico para o cetoprofeno.

Sendo assim, o método de análise de teor de cetoprofeno proposto apresenta linearidade, precisão, exatidão e especificidade adequados, sendo este método considerado apropriado para a análise de cetoprofeno nas micropartículas.

5.4 ENSAIO DE MICROENCAPSULAÇÃO POR *SPRAY-DRYING* E CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

Quando se está desenvolvendo as especificações de um processo em spray dryer, aconselha-se iniciar a triagem das condições operacionais com uma temperatura de entrada intermediária (120 – 180 °C), máxima vazão de ar de secagem, máxima pressão de ar comprimido e uma pequena vazão da bomba peristáltica (LABPLANT). Dessa forma, como condição operacional padrão foi escolhida uma temperatura de entrada intermediária de 130°C, uma pequena vazão

da bomba peristáltica de 5,73 g/min (escala 10 do SD-05), a máxima vazão do ar de secagem de 49,2 m³/h (escala 50 do SD-05), 48 toques/min de de-blocker e 1 mm de diâmetro do bico atomizador.

A escolha por uma temperatura intermediária deve-se ao fato de que uma baixa temperatura de entrada não conseguiria evaporar o solvente, não sendo possível, portanto, a secagem. Entretanto, altas temperaturas podem degradar o produto em processo. Uma pequena vazão da bomba peristáltica propicia uma alimentação lenta da composição a ser atomizada, o que favorece a secagem; enquanto que, grandes vazões levam a um produto com umidade elevada, o qual adere-se nas paredes da câmara de secagem e ciclone. Uma alta pressão de ar comprimido acarretam a redução no diâmetro das gotas atomizadas, elevando a área de transferência de calor e de massa disponível e, conseqüentemente, da taxa de secagem. Dessa forma, quanto maior a pressão de ar comprimido, melhor a eficiência da secagem. Com pequenas vazões do ar de secagem, ocorre uma secagem parcial da suspensão alimentada, fazendo com que haja derramamento de suspensão pelas paredes da câmara de secagem até o tubo coletor de excesso. Vazões elevadas do ar de secagem fornece uma maior quantidade de calor sensível ao sistema, levando a um produto com menor teor de umidade. Outro efeito produzido pelo aumento da vazão de ar é a conseqüente redução do tempo médio de residência de produto no interior da câmara de secagem.

A fim de se determinar a melhor condição operacional do *spray-dryer* para a produção de micropartículas, alguns parâmetros foram modificados na condição operacional padrão, a saber: temperatura de entrada (100 e 130 °C); diâmetro do bico atomizador (0,5 mm) e vazão da bomba peristáltica (11,3 g/min). O rendimento

e tempo do processo de secagem foram calculados e estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Tempo e rendimento do processo de secagem por *spray-drying* em diversas condições operacionais.

Condição operacional	Tempo de secagem (min)	Rendimento (%)
Te=160; Vbp=5,7; Vas=49,2; ϕ =1; P=1,3; Ts=107,3*	18	5
Te=130; Vbp=5,7; Vas=49,2; ϕ =0,5; P=1,3; Ts= 86,1*	-----	-----
Te=130; Vbp=5,7; Vas=49,2; ϕ =1; P=1,3; Ts= 86,1*	20	3
Te=130; Vbp=11,3; Vas=49,2; ϕ =1; P=1,3; Ts= 86,1*	10	8
Te=100; Vbp=5,7; Vas=49,2; ϕ =1; P=1,3; Ts= 68,0*	21	36,8
Te=100; Vbp=5,7; Vas=49,2; ϕ =1; P=1,3; Ts= 68,0**	18	31,2

Te, temperatura de entrada (°C); Vbp, vazão da bomba peristáltica (g/min); Vas, vazão do ar de secagem (m³/h); ϕ , diâmetro do bico atomizador (mm); P, pressão do ar comprimido (bar); * composição, 1:1 cetoprofeno/quitosana ** composição, acetato de quitosana

Como pode ser observado pela tabela acima, os tempos de secagem obtidos estão próximos aos tempos de secagem teóricos, quando foi usado o bico atomizador de 1 mm. Entretanto, quando o diâmetro do bico atomizador de 1 mm foi modificado para 0,5 mm, ocorreu o entupimento do bico com a composição de microencapsulação, logo no início da secagem. O atomizador foi desmontado, desentupido, limpo e novamente montado. Entretanto, ocorreu novo entupimento. Desse modo, o processo foi interrompido definitivamente, o que explica a ausência de resultado para este lote. Dessa forma, descartou-se a possibilidade da modificação do diâmetro do bico atomizador, sendo eleito o diâmetro de 1 mm para continuação dos experimentos.

Durante a secagem do material nas temperaturas de entrada de 160 e 130 °C, houve a deposição de pós em duas regiões do equipamento: frasco coletor (já esperado) e ciclone. No frasco coletor, apenas pequena fração do pó foi depositado, confirmando os baixos rendimentos do processo de secagem apresentados na Tabela 11. Grande fração do pó se depositou no ciclone, sendo descartados para a etapa de caracterização.

Com a modificação da temperatura de entrada para 100 °C, ainda obteve-se um baixo rendimento do processo, entretanto esse rendimento foi cerca de 12 vezes maior que o obtido com as temperaturas maiores. Esse fato pode ser explicado pela ausência de depósito de pó no ciclone, sendo direcionado grande parte para o frasco coletor.

O problema de baixo rendimento do processo de secagem obtido nesses ensaios pode ser contornado em escala industrial com o uso de outros sistemas de coleta de pó, como os filtros de manga, os quais aumentam a coleta do pó, aumentando, conseqüentemente, o rendimento do processo de secagem.

Quanto à aparência e odor, quanto maior a temperatura de entrada maior a coloração bege que os pós apresentam e menor o odor característico de ácido acético presente na composição de microencapsulação, como pode ser visto na Tabela 12.

Tabela 12. Aparência, odor, D_{50} , % teor total e superficial de cetoprofeno, eficiência de microencapsulação e umidade dos pós obtidos por *spray drying*.

Condição	Aparência e odor	Diâmetro D_{50} (μm)	Teor Total (%)	Teor Superficial (%)	Eficiência (%)	Umidade (%)
1*	Pó fino, levemente bege, de aspecto uniforme, sem odor característico.	3,26	82,90	29,20	53,70	6,00
2**	Pó fino, quase branco, aspecto uniforme, odor característico de ácido acético	3,27	82,85	25,70	57,10	8,00
3***	Pó fino, quase branco, aspecto uniforme, odor característico de ácido acético	2,11	81,90	24,00	57,90	12,00
4****	Pó fino, quase branco, aspecto uniforme, odor característico de ácido acético	2,87	87,00	24,70	62,30	9,00

* Tentrada=160 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; Tsaída=107,3 °C

**Tentrada=130 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; Tsaída=86,1 °C

***Tentrada=130 °C; Vazão bomba =11,3 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; Tsaída=86,1 °C

****Tentrada=100 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; Tsaída=68,0 °C

O pó seco à 160 °C de temperatura de entrada, apresenta uma temperatura de saída de 107,3 °C, bem maior do que as temperaturas de saída das demais condições (86,1 e 68,0 °C) e do intervalo de fusão, 93 a 97 °C, do fármaco cetoprofeno (USP XXVII, 2004), o que pode justificar a alteração da coloração deste pó. Já a presença residual do ácido acético, um dos constituintes da composição de microencapsulação, pode ser explicada pelas baixas temperaturas de saída encontradas quando se diminui as temperaturas de entrada.

Como já esperado, também observa-se uma relação inversamente proporcional entre o aumento da temperatura de entrada e a diminuição da umidade. Assim, com a menor temperatura de entrada utilizada (100 °C) determinou-se uma umidade de 9%, enquanto que para a maior temperatura de entrada (160 °C) determinou-se uma umidade de 6%.

O aumento da vazão da bomba peristáltica de 5,7 para 11,3 g/min acarretou na diminuição do tempo de secagem mas não interferiu significativamente no rendimento do processo. Além disso, o aumento da vazão de alimentação causa como consequência uma elevação na umidade do produto, parâmetro que deve ser rigorosamente controlado, já que valores muito altos de umidade podem reduzir a estabilidade do produto.

Com relação à análise de teor total e superficial de cetoprofeno e eficiência de microencapsulação, observou-se uma baixa eficiência de microencapsulação em todas as condições testadas, sendo que a maior eficiência (62,6%) foi alcançada com a temperatura de entrada de 100 °C. Também foi observado que quanto menor a temperatura de entrada, maior a eficiência de microencapsulação.

A distribuição de tamanhos das micropartículas obtidas foi realizada por microscopia ótica e análise de imagens, como descrito na seção 4.2.5.2. A Figura 13 apresenta resultados típicos obtidos.

Figura 13. Distribuição granulométrica dos pós processados nas condições Tentrada=160 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; φ bico=1mm; Pressão ar=1,3; Tsaída=107,3 °C (A); Tentrada=130 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; φ bico=1mm; Pressão ar=1,3; Tsaída=86,1 °C (B); Tentrada=130 °C; Vazão bomba =11,3 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; φ bico=1mm; Pressão ar=1,3; Tsaída=86,1 °C (C) e Tentrada=100 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; φ bico=1mm; Pressão ar=1,3; Tsaída=68,0 °C (D).

Os resultados apresentados na Figura 13, juntamente com os obtidos para todas as condições experimentais utilizadas, evidenciam que o produto obtido nos ensaios realizados apresentam-se finamente divididos e com uma faixa estreita distribuição granulométrica. A maioria dos pós apresentam aproximadamente o mesmo D_{50} de partículas, resultado esperado, uma vez que foram processados com o mesmo diâmetro de bico de atomização e mesma pressão de ar comprimido. Além disso, os diâmetros D_{50} das micropartículas obtidas variam de 2,11 a 3,27 μm , os quais estão em conformidade com os estudos de Muzzarelli C., Muzzarelli R. A. A.; Giunchedi (2004) e Oliveira; Santana; Ré (2004).

A fim de investigar o comportamento das amostras em função da temperatura, foi realizada a análise de calorimetria diferencial por varredura nas amostras de cetoprofeno livre, acetato de quitosana spray-dried, mistura física (acetato de quitosana spray-dried + cetoprofeno livre) e micropartícula de quitosana carregada com cetoprofeno obtida por *spray-drying* na condição de $T_{\text{entrada}}=100\text{ }^{\circ}\text{C}$; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; $T_{\text{saída}}=68,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. A Figura 14 mostra as curvas de DSC na faixa de 20 a 250 $^{\circ}\text{C}$.

Figura 14. Curvas de DSC das amostras de cetoprofeno livre (a), acetato de quitosana *spray-dried* (b), mistura física - acetato de quitosana *spray-dried* + cetoprofeno livre (c) e micropartícula de quitosana carregada com cetoprofeno obtida por *spray-drying* na condição de $T_{\text{entrada}}=100\text{ }^{\circ}\text{C}$; Vazão bomba = 5,7 g/min; Vazão ar = 49,2 m³/h; ϕ bico = 1 mm; Pressão ar = 1,3 bar; $T_{\text{saída}}=68,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (d)

Como pode ser observado pela Figura 14, nas curvas das amostras de acetato de quitosana *spray-dried* e na mistura física, pode ser identificado uma transição endotérmica a 64 °C, o que corresponde ao processo de desidratação (SANTOS et al, 2003), a qual não é identificada na amostra de cetoprofeno livre. Já nas curvas das amostras de cetoprofeno livre e da mistura física, observa-se uma transição endotérmica, na faixa de 83 °C a 105 °C, apresentando pico em 95 °C. Esse comportamento corresponde à fusão do fármaco, que ocorre no intervalo de ocorre 92 a 97°C (USP XXVII, 2004). Essa transição endotérmica não é observada na amostra da micropartícula. Esse fato permite inferir que um novo material foi

obtido, com um comportamento térmico característico, não sendo similar ao fármaco livre, à quitosana ou a mistura física de ambos.

Quanto à morfologia dos pós, fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas e estão apresentadas na Figura 15. A matéria-prima quitosana (Fig. 15 A) apresenta-se como grandes escamas de forma e tamanho irregulares; já a solução de acetato de quitosana seco no spray dryer (Fig. 15 B) apresenta-se como uma micropartícula esférica com uma superfície porosa, repleta de canalículos, estando em conformidade com os estudos de He; Davis e Illum (1999). Já as micropartículas de quitosana carregadas com cetoprofeno obtidas por *spray-drying* (Fig 15 C) apresentam-se como partículas esféricas com superfície extremamente lisa (Fig. 15 D). Observa-se, também, populações de micropartículas de 5 μm cercadas por micropartículas satélites de 2 μm . Tais resultados estão em conformidade com os estudos de Ré (1998), Ganzá-González et al. (1999), He, Davis e Illum (1999) e Bernardo et al. (2003).

Figura 15. Fotomicrografias de microscopia eletrônica por varredura de quitosana matéria-prima em aumento 50x (A); acetato de quitosana spray-dried em aumento 5.000x (B); micropartícula de quitosana carregada com cetoprofeno obtida em spray-dryer a $T_{entrada}=100\text{ }^{\circ}\text{C}$; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar= $49,2\text{ m}^3/\text{h}$; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; $T_{saída}=68,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ em aumento de 3000x (C); superfície da micropartícula de quitosana carregada com cetoprofeno em aumento 15.000x.

Quanto ao estudo de liberação *in vitro* do cetoprofeno encapsulado nas micropartículas de quitosana, este foi conduzido utilizando-se o aparato 2 USP. O meio de dissolução utilizado – salina tampão fosfato (PBS) pH 7,4 – é considerado um meio biorrelevante, uma vez que: (i) o cetoprofeno apresenta-se solúvel neste meio solvente e pH, mantendo, assim, as condições *sink*; (ii) em pH > 6,8 ocorre a geleificação da quitosana; (iii) o PBS é um fluido com características físico-químicas semelhantes ao sangue, presente no alvéolo dental.

Os perfis de liberação *in vitro* do cetoprofeno matéria-prima e presente na mistura física (cetoprofeno + acetato de quitosana spray-dried) e nas micropartículas (1:1 cetoprofeno /acetato de quitosana) obtidas na condição Tentrada=100 °C; Vazão alimentação composição microencapsulante =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3; Tsaída=68,0 °C estão apresentados na Figura 16.

Figura 16. Perfis de liberação *in vitro* do cetoprofeno matéria-prima e presente na mistura física (cetoprofeno + acetato de quitosana secas no *spray dryer*) e nas micropartículas (1:1 cetoprofeno /acetato de quitosana) obtidas na condição Tentrada=100 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; Tsaída=68,0 °C.

Pela figura acima pode ser observado que em menos de 20 h, 100 % do cetoprofeno já havia sido liberado, enquanto que cerca de 70 % do fármaco presente na mistura física e somente 30% do cetoprofeno presente nas micropartículas havia sido liberado. Portanto, torna-se evidente a influência que o polímero quitosana exerce no controle da liberação de fármacos, comportamento compatível com os estudos de Gupta e Kumar (2000), que obtiveram uma liberação constante do fármaco diclofenaco de sódio, a partir de *beads* e microgrânulos de quitosana, por um período de 48h.

Na figura 17 encontra-se a plotagem da raiz quadrada do tempo *versus* a % de liberação do fármaco. O padrão aproximadamente linear observado para dissolução do cetoprofeno presente nas micropartículas, mistura física e matéria-

prima, é uma indicação de que a liberação é função da $\sqrt{t}$. Esse comportamento, sugere uma liberação governada pela dissolução do fármaco e difusão no meio de dissolução através da matrix polimérica (ZAMBITO; DI COLO, 2003). Realizando a regressão linear das curvas acima obtêm-se equações que, com as quais, podem ser calculados o T_{50} , ou seja, o tempo (h) no qual 50% do fármaco foi liberado.

Figura 17. Linearização dos perfis de liberação *in vitro* do cetoprofeno matéria-prima e presente na mistura física (cetoprofeno + acetato de quitosana spray-dried) e nas micropartículas (1:1 cetoprofeno /acetato de quitosana) obtidas na condição Tentrada=100 °C; Vazão bomba =5,7 g/min; Vazão ar=49,2m³/h; ϕ bico=1mm; Pressão ar=1,3 bar; Tsaída=68,0 °C.

Assim, 50 % do cetoprofeno matéria-prima foi liberado em 7,84 h, enquanto que 50% do fármaco microencapsulado é liberado em 36 h. Isso indica que o

processo de microencapsulação foi responsável por prolongar 4,6 vezes a liberação do cetoprofeno quando comparado ao fármaco livre.

O estudo de liberação *in vitro* utilizando o aparato 2 USP proposto neste trabalho foi útil para comparar o perfil de dissolução do fármaco presente nas micropartículas e o do fármaco livre. Dessa forma, o estudo de dissolução foi empregado como um teste de controle de qualidade das micropartículas como ferramenta de avaliação do processo de microencapsulação por *spray drying*. Entretanto, é importante desenvolver aparatos de dissolução que mimetizem as condições *in vivo* nas quais as micropartículas serão administradas, a fim de que se possa realizar uma melhor correlação *in vitro/in vivo* e se possa avaliar melhor aspectos da formulação que interferiram na dissolução do fármaco.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados e discutidos na seção anterior, pode-se concluir que:

6.1. A proporção ideal de quitosana e de ácido acético a ser utilizada como solução de revestimento na microencapsulação por *spray drying* é de 2:1, uma vez que essa solução apresenta boa aparência, viscosidade e é capaz de ser bombeada para o atomizador;

6.2. A substituição do tipo de agitação durante preparo da solução polimérica de revestimento, de magnética para mecânica com hélice tipo naval, foi uma vez que obtem-se uma economia de 62,5% no tempo de preparo da solução;

6.3. Embora os resultados da qualificação de operação do equipamento SD-05 para a vazão da bomba peristáltica, vazão do ar comprimido e temperaturas de entrada e de saída não estejam em concordância com os valores de correspondência no manual de operação, o equipamento SD-05 encontra-se apto para ser utilizado nesses experimentos, visto que curvas de calibração foram criadas para os parâmetros acima citados, não interferindo no andamento dos experimentos;

6.4. O método para análise de teor descrito neste trabalho apresenta-se linear na faixa de concentração de 2,5 a 12,5 µg/mL, a qual foi utilizada na construção da curva de calibração, possuindo precisão, exatidão e especificidade adequados para seu objetivo;

6.5. A análise granulométrica obtida representa um material finamente dividido, com uma estreita faixa de distribuição de tamanhos, o que está em coerência com a literatura;

6.6. A condição operacional de 100 °C de temperatura de entrada, 1 mm de diâmetro do bico atomizador, 5,73 g/min de vazão da bomba peristáltica, 49,19 m³/h de vazão do ar de secagem, pressão de ar comprimido de 1,3 bar e 48 toques/min de de-blocker foi considerada a melhor condição operacional, uma vez que foi suficiente para secar o material sem degradar o fármaco, apresentou o maior rendimento do processo e a maior eficiência de microencapsulação.

6.7. A microscopia eletrônica de varredura mostra que as micropartículas de quitosana carregadas com cetoprofeno apresentam boa esfericidade e superfície completamente lisa, o que está em coerência com a literatura.

6.8. Com o estudo de liberação *in vitro*, observa-se um padrão linear de liberação do cetoprofeno, sugerindo que a liberação seja governada pela dissolução pela dissolução do fármaco e difusão no meio de dissolução através da matriz polimérica. A encapsulação do fármaco na quitosana prolongou a liberação do cetoprofeno em 4,6x quando comparado com o fármaco livre .

Sendo assim, pode-se concluir que o presente trabalho alcançou o objetivo proposto em determinar especificações do processo de *spray drying* na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de fármacos com

aplicação odontológica. Algumas sugestões para continuidade do estudo seriam i) realização de estudos de otimização do processo, visando elevar o rendimento do processo; ii) desenvolvimento de estudos com outros sais de quitosana e antiinflamatórios não esteroidais; e, iii) desenvolver aparatos de dissolução que mimetizem as condições *in vivo* nas quais as micropartículas serão administradas, a fim de que se possa realizar uma melhor correlação *in vitro/in vivo* e se possa avaliar melhor aspectos da formulação que interferiram na dissolução do fármaco.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC 210 de 04/08/2003: Regulamento Técnico das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, agosto, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RE 899 de 29/05/2003. Guia para a validação de metodologia analítica. **Diário Oficial da União**, maio, 2003.
- AVERBUCH, M; KATZPER, M. Baseline pain and response to analgesic medications in the postsurgery dental pain model. **Journal of Clinical Pharmacology**, v 40, p.133-137, 2000.
- BERNARDO, M. V; BLANCO, M.D; SASTRE, R. L; TEIJÓN, C; TEIJÓN, J. M. Sustained release of bupivacaine from devices based on chitosan. **Il Farmaco**, v. 58, p. 1187-1191, 2003.
- BORNE R F . Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **In: FOYE W O, LEMKE T L, WILLIAMNS D A PRINCIPLES OF MEDICINAL CHEMISTRY** Willians & Wilkins 4th edition cap 25, p 535-580, 1998.
- BOLTON, S. Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications. 3rd edition, Marcel Dekker, Inc, 1997.
- BRANDAU T. Preparation of monodisperse controlled release microcapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v 242, p.179 – 184, 2002 .
- CHENITE, A; CHAPUT, C; WANG, D; COMBES, C; BUSCHMANN, M. D; HOEMANN, C. D; LEROUX, J. C; ATKINSON, B. L; BINETTE, F; SELMANI, A . Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v 21, p. 2155-2161, 2000.
- ÇOMOGLU, T; GÖNÜL, N; BAYKARA, T. Preparation and in vitro evaluation of modified release ketoprofen microsponges **IL Farmaco** v 58, p. 101-106, 2003.
- DIONNE, R. A; GORDON, S. M; TAHARA, M; ROWAN, J; TROLULLOS, E. Analgesic efficacy and pharmacokinetics of ketoprofen administered into surgical site. **Journal of Clinical Pharmacology**, v 39, p.131-138, 1999.
- DODANE, V; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **PSTT**, v 1 (6), September, 1998.

- DUBEY, R. R; PARIKH, R. H. Two stage optimization process for formulation of chitosan microspheres. **AAPS Pharmaceutical Science Technology**, v 5 (1), p.1-9, 2003.
- ELKAYAN, R; FRIEDMAN, M; STABHOLZ, A; SOSKOLNE, AW; SELA, M. N; GOLUB, L. Sustained release device containing minocycline for local treatment of periodontal disease. **Journal of Controlled Release**, v 7, p.231-236, 1988.
- FILKOVÁ, I.; MUJUMDAR, A.S. **Industrial Spray Drying systems in Handbook of Industrial Drying**. A.S. Mujumdar Ed. p.742, 1995.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 21 Code of Federal Regulations – Parts 210 & 211
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance For Industry – Q2B – Validation of Analytical Procedures Methodology (1996)
- GENTA, I; PERUGINI, P; MODENA, T; PAVANETTO, F; CASTELLI, F; MUZZARELLI, R. A A; MUZZARELLI, C; CONTI, B. Miconazole-loaded 6-oxychitin-chitosan microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 11-18, 2003.
- GRISWOLD, D. E; ADAMS, J. L. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. **Medical Research Review** v 16, p. 181-206, 1996.
- ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, vol. 15 nº 9, p. 1326-1331, 1998
- INTERNATION SOCIETY OF PHARMACEUTICAL ENGINEERING. Pharmaceutical engineering guides for new and renovated facilities. Vol 5: Commissioning and Qualification, 2001.
- ISHIDA, M; NAMBU, N; NAGAI, T. Mucosal dosage form of lidocaine for toothache using hydroxypropyl cellulose and carbopol. **Chem. Pharm. Bull**, v. 30, p.980-984, 1982.
- JALIL, R; NIXON, JR. Biodegradable poly(lactide acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. **Journal of Microencapsulation**, v 7, p.297-325 , 1990.
- LAWRENCE, H.P; PAQUETTE, D. W; SMITH, P.C; MAYNOR, G; WILDER, R; MANN, G.L; BINDER, T.A; TROULLOS, E; ANNETT, M; FRIEDMAN, M; OFFENBACHER, S. Pharmacokinetics and safety evaluation of ketoprofen gels in subjects with adult

- periodontitis. *Journal of Dentistry Research*, v. 77 (11), November, p.1904-1912, 1998.
- LEITE, F. Validação em Análise química. **Editora Átomo**, 1998.
- MAJETI N V, KUMAR R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v 46, p.1-27, 2000.
- MUZZARELLI, C; MUZZARELLI, R. A A; GIUNCHEDI, P. Spray-dried microspheres of chitosan-polyuronan complexes for drug delivery. **Controlled Release Society**, 31st Annual Meeting, 2004.
- NAGAI, T. Adhesive topical drug delivery system. **Journal of Controlled Release** v2, p.121-134, 1985.
- OAKLEY, D. E. Produce uniform particles by spray-drying. **Chemical engineering progress**, p. 48-54, October, 1997.
- OLIVEIRA, B. I; SANTANA, M. H. A; RÉ, M. I. Spray-dried chitosan cross-linked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. **Drying 2004**, Proceedings of the 14th International Drying Symposium, vol B, p.1166 – 1173, 2004.
- OLSON, N. Z; OTERO, A. M; MARRERO, I; TIRADO, S; COOPER, S; DOYLE, G; JAYAWARDENA, S; SUNSHINE, A. Onset of analgesia for liquid ibuprofen 400 mg, acetaminophen 1000 mg, ketoprofen 25 mg, and placebo in the treatment of postoperative dental pain. **Journal of Clinical Pharmacology** v 41, p. 1238-1247, 2001.
- PAQUETTE, D. W; LAWRENCE, H.P; McCOMBS, G.D; WILDER, R; BINDER, T.A; TROULLOS, E; FRIEDMAN, M; SMITH, P.C; OFFENBACHER, S. Pharmacodynamics of ketoprofen on crevicular fluid prostanoids in adult periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27 (8), p. 558-566, August, 2000
- RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M . Farmacologia. Guanabara Koogan 4a. edição cap 13, p. 189 – 202 , 2001.
- RE, M. I. Microencapsulation by spray-drying. **Drying Technology**, v16 (6), p.1195-1236, 1998.
- SALVI, G. E; WILLIAMS, R.C; OFFENBACHER, S. Nonsteriodal anti-inflammatory drugs as adjuncts in the management of periodontal diseases and peri-implantitis. **Current Opinions in Periodontology** v 4, p.51-58,1997.

- SENEL, S; IKINCI, G; KAS, S; YOUSEFI-RAD, A; SARGON, M. F; HINCAL, A A . Chitosan films and hydrogels of clorexidini gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, p. 197-203, 2000.
- SHOJAEL, A. H. Buccal Mucosa as a route for systemic drug delivery: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.1 (1), p.15-30, 1998.
- SHU, X. Z.; ZHU, K. J. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, p. 217-225, 2002.
- SORLIER, P; ROCHAS, C; MORFIN, I; VITON, C; DOMARD, A . Light scattering studies of the solution properties of chitosans of varying degree of acetylation. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1034-1040, 2003.
- TAKADA S; UDA, Y; TOGUCHI, H; OGAWA, Y. Application of a spray drying technique in the production of TRH-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v 49 (4), p.180-4,1995.
- US PHARMACOPEIA XXVII, NF 22. Ketoprofen . p. 1057, 2004.
- VANE, J. R; BOTTING, R. M. Overview – mechanisms of action of anti-inflammatory drugs. In: **Vane J, Botting, J H, Botting R M (eds) Improved non-steroid anti-inflammatory drugs: COX-2 enzyme inhibitors**. Kluwer Academic Publishers, London cap 1, p 1-27, 1996.
- VYAS, S. P; SIHORKAR, V; MISHRA, V. Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket diseases. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics** v.25, p. 21-42 , 2000.
- WAN, L. S. C; HENG, P. W. S, CHIA, C.G.H. Spray-drying as a process for microencapsulation and the effect of different coating polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v 18 (9), p.997-1011, 1992.
- ZAMBITO, Y; DI COLO, G. Preparation and in vitro evaluation of chitosan matrices for colonic controlled drug delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, vol 6 (2), p. 274-281, 2003.