UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Otimização da terapia da tuberculose: desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em nanotecnologia

Gilsane Garcia Moraes

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Otimização da terapia da tuberculose: desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em nanotecnologia

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Gilsane Garcia Morais

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Maldonado Marchetti

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Morais, Gilsane Garcia

Otimização da terapia da tuberculose: desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em nanotecnologia. Ribeirão Preto, 2011.

100 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonado.

1. Micropartículas. 2. Quitosana. 3. Isoniazida.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gilsane Garcia Moraes

Otimização da terapia da tuberculose: desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em nanotecnologia.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Maldonado
Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus amados pais, Gilton e Arminda, por tudo que representam: amor, incentivo, apoio em todos os momentos e força para superação de obstáculos. Aos meus queridos irmãos, Giuliano, Ariane e Ariadne, sempre amigos e presentes, pelo amor, confiança e torcida. Devo tudo a vocês.

Agradecimentos

À minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Juliana Maldonado Marchetti, pela oportunidade e contribuição no meu crescimento científico e pessoal, pelo seu exemplo de dignidade e competência, por me acolher sempre com respeito, carinho, paciência, incentivo, e amizade. Obrigada!

Aos funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, José Orestes Del Ciampo e Henrique Diniz, pelas análises realizadas, suporte técnico, companheirismo e amizade.

Aos químicos Rodrigo Ferreira Silva e Lourivaldo dos Santos Pereira da FFCLRP pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e difração de raios-X.

A todos os funcionários da FCFRP, em destaque aos da Pós-Graduação e Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto, pela atenção e dedicação.

Às alunas Marcela Olaia Machado e Flavia de Faria Caetano pelo acompanhamento nos experimentos de DSC e spray-drying, respectivamente.

A todos os amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, por terem me recebido com carinho, pelo auxílio prestado, pelos bons momentos de trabalho e amizade, em especial à Juliana Saraiva, Marina e Samantha, pela colaboração com esse trabalho.

Aos meus amigos: Carol, Danny, Dalmira, Gislaine, Gra, Janaína, Juliana, Juliane, Maira, Marisa, Paula, Renata, Tiago, pelos momentos felizes, apoio nos momentos difíceis e compreensão pela ausência, enfim, pela amizade.

A Capes e USP pelo suporte e financiamento desse trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, o meu profundo respeito, carinho e gratidão.

RESUMO

MORAIS, G. G. **Otimização da terapia da tuberculose: desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em nanotecnologia.** 2011. 100 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Novos sistemas de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica de muitos fármacos no tratamento de diferentes patologias. Os sistemas microparticulados têm despertado grande interesse devido a suas propriedades, suas vantagens sobre os sistemas de distribuição convencional e, conseqüentemente, melhoria na adesão ao tratamento. As micropartículas de quitosana são exploradas como sistemas de liberação sítio-específico, devido suas propriedades biodegradáveis, biocompatíveis e mucoadesivas. Assim, visando o tratamento da tuberculose, que atualmente é causa prevalente de morte considerando as doenças infecciosas no mundo, neste trabalho micropartículas constituídas de quitosana foram desenvolvidas para veicular isoniazida. A isoniazida, uma hidrazida do ácido isonicotínico, é uma dos fármacos mais poderosos entre os fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose devido à sua alta eficiência, baixa dose e de baixo custo, tornando-o um bom candidato para o desenvolvimento de uma formulação de liberação sítio-específica. Por spray-drying, as micropartículas inertes e com isoniazida obtidas apresentaram-se esféricas e com ampla distribuição de tamanho de partículas que variou entre 5 e 12 μm , potencial zeta positivo e elevada eficiência de encapsulação. O perfil liberação *in vitro* em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 apresentou formação de produto de degradação, sendo confirmado por espectrometria de massa como o ácido isonicotínico. Entretanto, a isoniazida mostrou ter uma liberação rápida (1 hora) a partir das micropartículas de quitosana em meio aquoso. Dessa forma, as micropartículas de quitosana desenvolvidas constituem um sistema promissor para veiculação da isoniazida e administração pulmonar e, finalmente, melhoria da terapia da tuberculose. Ademais, adequações do método deverão ser testadas considerando a via de administração pretendida, bem como será necessária a realização de estudos *in vivo* para avaliar o comportamento dos sistemas desenvolvidos em condições fisiológicas reais e a biodisponibilidade e biodistribuição do fármaco no organismo.

Palavras-chave: Micropartículas. Quitosana. Isoniazida.

ABSTRACT

MORAIS, G. G. **Optimization of tuberculosis therapy: development of delivery systems based in nanotechnology**. 2011. 100 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

New drug delivery systems have been developed in order to improve the therapeutic efficacy of many drugs in the treatment of different pathologies. Microparticles have attracted great interest due to its properties, its advantages over conventional delivery systems and, consequently, better treatment adherence. The chitosan-based microparticles are exploited as delivery systems for site-specific, because their biodegradable, biocompatible and mucoadhesive properties. Thus, chitosan-based microspheres containing isoniazid were developed to target the treatment of tuberculosis, which is currently prevalent cause of death considering infectious diseases in the world. Isoniazid, an isonicotinic acid hydrazide, is one of the most powerful drugs among first-line drugs used to treat tuberculosis due to its high efficiency, low dose and low cost, making it a good candidate for the development of site-specific delivery system. By spray-drying, the isoniazid-loaded and free microparticles obtained presented wide size particle distribution with particle size ranging between 5 and 12 μm , spherical morphology, positive zeta potential and high encapsulation efficiency. The *in vitro* release profile in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 showed the formation of degradation product, which was confirmed by mass spectrometry as isonicotinic acid. However, isoniazid release from the microparticles was fast (1 hour) in water. Thus, the developed chitosan microparticles are a promising system as a vehicle to isoniazid and pulmonary administration, and ultimately to improve the therapy of tuberculosis. Moreover, adaptations of the method should be tested considering the intended route of administration and it will be necessary to perform *in vivo* studies to evaluate the behavior of the systems developed under physiological conditions and actual bioavailability and biodistribution of the drug in the body.

Keywords: Microparticles. Chitosan. Isoniazid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo dos tipos de micropartículas: microesferas (matriz polimérica) e microcápsulas (sistema reservatório envolvido por uma membrana polimérica externa)	20
Figura 2. Estrutura da quitosana.....	21
Figura 3. Representação esquemática da preparação de micropartículas pelo método de coacervação simples	23
Figura 4. Fotografia do equipamento Spray-dryer laboratorial, marca Lemarq.....	24
Figura 5. Incidência estimada da TB em 2009.....	26
Figura 6. Esquema básico para tratamento da tuberculose (casos novos) em adultos e adolescentes	27
Figura 7. Estrutura da isoniazida	27
Figura 8. Figura ilustrativa dos processos de deposição de partículas no trato respiratório.....	29
Figura 9. Representação gráfica do comprimento de onda (λ) <i>versus</i> absorvância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de isoniazida a 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4	47
Figura 10. Representação do cromatograma da solução de isoniazida na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 obtido por CLAE. Fase móvel constituída de metanol e fosfato 0,02 M na proporção 15:85 e coluna RP18 encapada Lichrocart® Purospher® Star (Merck, 250 x 4 mm, 5 μm).....	48
Figura 11. Curva de calibração da isoniazida (0,5 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$) em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 obtida por CLAE. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de três determinações (n=3)	50
Figura 12. Curva de calibração da isoniazida (0,5 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$) em água ultra pura (MilliQ®) obtida por CLAE. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de três determinações (n=3).....	50
Figura 13. Curva de calibração da isoniazida (0,5 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$) em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 obtida por espectrofotometria. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de três determinações (n=3)	50
Figura 14. Curva turbidimétrica do sulfato de sódio. A = quitosana polymar A, B = quitosana polymar B	57

Figura 15. Fotomicrografias das micropartículas inertes obtidas por coacervação simples, obtidas por MEV. Aumento de 10000X. (a) amostra A (quitosana polymar A); (b) amostra B (quitosana polymar B)	58
Figura 16. Fotomicrografias das micropartículas contendo o fármaco obtidas por coacervação simples, obtidas por MEV. Aumento de 10000X. (a) amostra PACF (quitosana polymar A e com isoniazida); (b) amostra PBCF (quitosana polymar B e com isoniazida).....	58
Figura 17. Fotomicrografias das micropartículas inertes obtidas por spray-drying, obtidas por MEV. Aumento de 10000X. (a) amostra I (quitosana polymar A a 1%); (b) amostra III (quitosana polymar A a 2%); (c) amostra V (quitosana polymar B a 1%); (d) amostra VII (quitosana polymar B a 2%).....	60
Figura 18. Fotomicrografia do pó da isoniazida, obtida por MEV. Aumento de 5000X	61
Figura 19. Fotomicrografias das micropartículas contendo o fármaco obtidas por spray-drying, obtidas por MEV. Aumento de 10000X. (a) amostra II (quitosana polymar A a 1% e contendo isoniazida); (b) amostra IV (quitosana polymar A a 2% e contendo isoniazida); (c) amostra VI (quitosana polymar B a 1% e contendo isoniazida); (d) amostra VIII (quitosana polymar B a 2% e contendo isoniazida).....	61
Figura 20. Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra I (micropartícula inerte com quitosana polymar A a 1%) obtida por spray-drying	65
Figura 21. Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra III (micropartícula inerte com quitosana polymar A a 2%) obtida por spray-drying	65
Figura 22. Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra V (micropartícula inerte com quitosana polymar B a 1%) obtida por spray-drying	65
Figura 23. Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra VII (micropartícula inerte com quitosana polymar B a 2%) obtida por spray-drying	66
Figura 24. Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra II (micropartícula com quitosana polymar A a 1% e isoniazida) obtida por spray-drying	66
Figura 25. Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra IV (micropartícula com quitosana polymar A a 2% e isoniazida) obtida por spray-drying	66
Figura 26. Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra VI (micropartícula com quitosana polymar B a 1% e isoniazida) obtida por spray-drying	67

Figura 27. Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra VIII (micropartícula com quitosana polymar B a 2% e isoniazida) obtida por spray-drying	67
Figura 28. Padrão de difração de raios-X do pó do fármaco livre. ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer.....	71
Figura 29. Padrão de difração de raios-X do pó da quitosana. Quit A = quitosana polymar A; Quit B= quitosana polymar B.....	72
Figura 30. Padrão de difração de raios-X do pó das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida obtidas por spray-drying. A1% = quitosana polymar A; B1%= quitosana polymar B	72
Figura 31. Padrão de difração de raios-X do pó das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida obtidas por spray-drying, da quitosana e mistura física de quitosana e isoniazida. A1% = micropartículas com quitosana polymar A; Quit A = quitosana polymar A; MF A= mistura física de quitosana polymar A e isoniazida.....	73
Figura 32. Padrão de difração de raios-X do pó das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida obtidas por spray-drying, da quitosana e mistura física de quitosana e isoniazida. B1% = micropartículas com quitosana polymar B; Quit B = quitosana polymar B; MF B= mistura física de quitosana polymar B e isoniazida.....	73
Figura 33. Curvas termoanalíticas obtidas por DSC do fármaco livre. ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer.....	75
Figura 34. Curvas termoanalíticas obtidas por DSC da quitosana, das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida, do fármaco livre e da mistura física de quitosana e isoniazida. Quit A = quitosana polymar A; A1% = micropartículas com quitosana polymar A, ISN= isoniazida e MF A= mistura física de quitosana polymar A e isoniazida	75
Figura 35. Curvas termoanalíticas obtidas por DSC da quitosana, das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida, do fármaco livre e da mistura física de quitosana e isoniazida. Quit B = quitosana polymar B; B1% = micropartículas com quitosana polymar B, ISN= isoniazida e MF B= mistura física de quitosana polymar B e isoniazida	76
Figura 36. Curvas termoanalíticas obtidas por DSC das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida. A1% = micropartículas com quitosana polymar A e isoniazida, B1% = micropartículas com quitosana polymar B e isoniazida.....	76
Figura 37. Estudo <i>in vitro</i> da quantificação do fármaco livre em função do tempo na temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS). ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer; C0/C= concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$) no tempo 0/ concentração ($\mu\text{g/mL}$) em determinado tempo (n=3).....	78

Figura 38. Estudo *in vitro* da quantificação do fármaco livre em função do tempo na temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS). ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer; C0/C= concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$) no tempo 0/ concentração ($\mu\text{g/mL}$) em determinado tempo (n=3)..... 79

Figura 39. Gráfico representativo do perfil de liberação da isoniazida a partir das micropartículas de quitosana obtidas por spray-drying, da mistura física e do fármaco livre. ISN= isoniazida na forma livre como comercializada; FSD = isoniazida processada no spray-dryer; A1%= micropartícula de quitosana Polymar A a 1% e contendo isoniazida; B1%= micropartícula de quitosana polymar B a 1% e contendo isoniazida; B+F= mistura física de isoniazida e quitosana B. Meio receptor: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) (n=5)..... 81

Figura 40. Gráfico representativo do perfil de liberação da isoniazida a partir das micropartículas de quitosana obtidas por spray-drying, da mistura física e do fármaco livre. ISN= isoniazida na forma livre; B+F= mistura física de isoniazida e quitosana polymar B; B1%= micropartícula de quitosana polymar B a 1% e contendo isoniazida Meio receptor: água (n=3)..... 81

Figura 41. Mecanismos de liberação de fármacos a partir de micropartículas 83

Figura 42. Representação dos cromatogramas obtidos por CLAE na liberação da isoniazida a partir das micropartículas de quitosana B a 1% em tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) nos tempos de 5 minutos, 8 horas, 12 horas e 24 horas de liberação. Tempo de corrida: 7 minutos..... 86

Figura 43. Espectro de massa de alta resolução ESI-TOF do ácido isonicotínico em solução metanólica 86

Figura 44. Reação de hidrólise da isoniazida, favorecida pela quitosana 87

Figura 45. Reação de equilíbrio químico da forma molecular e iônica da isoniazida..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições cromatográficas testadas utilizando-se a Lichrocart® Purospher® Star (Merck, 250 x 4 mm, 5 µm) e pré-coluna 4 x 4 mm (5 µm).....	35
Tabela 2 – Protocolo experimental para a obtenção da curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio	39
Tabela 3 – Constituintes e respectivas quantidades utilizados na preparação das micropartículas de quitosana por coacervação simples	40
Tabela 4 – Constituintes utilizados na preparação das micropartículas de quitosana por spray-drying.....	41
Tabela 5 – Parâmetros utilizados para a elaboração da curva analítica da isoniazida em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 ou água ultra pura (MilliQ®) por CLAE e por espectrofotometria. Os resultados apresentados representam a média ± desvio padrão de três determinações (n=3)	51
Tabela 6 – Valores obtidos na avaliação da precisão (CV%) e exatidão (E%) intra-ensaio por CLAE (n=10)	52
Tabela 7 – Valores obtidos na avaliação da precisão (CV%) e exatidão (E%) intra-ensaio por espectrofotometria (n=10)	52
Tabela 8 – Valores obtidos na avaliação da precisão (CV%) e exatidão (E%) inter-ensaio por CLAE (n=5)	53
Tabela 9 – Valores obtidos na avaliação da precisão (CV%) e exatidão (E%) inter-ensaio por espectrofotometria (n=3)	53
Tabela 10 – Valores obtidos na avaliação da robustez para análise da isoniazida por CLAE.....	54
Tabela 11 – Valores obtidos na avaliação da especificidade e seletividade da solução de isoniazida meio contendo micropartículas inertes de quitosana (n=3). ..	55
Tabela 12 – Porcentagem de isoniazida dissolvida nos estudos de determinação da solubilidade da isoniazida em PBS 10 mM pH 7,4 por agitação magnética e dissolutor (n=3).....	56
Tabela 13 – Tamanho de partículas (µm) e distribuição granulométrica (%) referentes às amostras I, III, V, e VII (micropartículas inertes obtidas por spray-drying)	67
Tabela 14 – Tamanho de partículas (µm) e distribuição granulométrica (%) referentes às amostras II, IV, VI e VIII (micropartículas com isoniazida obtidas por spray-drying)	68

Tabela 15 – Valores de rendimento de processo (R%) e eficiência de encapsulação (EE%) obtidos para as amostras I, III, V, e VII (micropartículas inertes obtidas por spray-drying) e às amostras II, IV, VI e VIII (micropartículas com isoniazida obtidas por spray-drying).....	68
Tabela 16 – Potencial zeta referente às amostras I, III, V, e VII (micropartículas inertes) e II, IV, VI e VIII (micropartículas com isoniazida), obtidas por spray-drying	70
Tabela 17 – Estudo <i>in vitro</i> da quantificação do fármaco livre em função do tempo na temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) (n=3)	78
Tabela 18 – Estudo <i>in vitro</i> da quantificação do fármaco livre em função do tempo na temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) (n=3)	79
Tabela 19 – Estudo <i>in vitro</i> do perfil de liberação da isoniazida (ISN) a partir das micropartículas obtidas por spray-drying, da mistura física e do fármaco livre. Meio receptor: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) ou água (H ₂ O) (n=5 para meio PBS e n=3 para meio água)	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A1%	Micropartículas de quitosana A a 1% e isoniazida
A2%	Micropartículas de quitosana A a 2% e isoniazida
A	Quitosana Polymar A
B1%	Micropartículas de quitosana B a 1% e isoniazida
B2%	Micropartículas de quitosana B a 2% e isoniazida
B	Quitosana Polymar B
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Precisão (coeficiente de variação)
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EE	Eficiência de Encapsulação
E%	Exatidão
FDA	Food and Drug Administration
FSD	Isoniazida após ser processada no spray-dryer
H ₂ O	Água
ISN	Isoniazida como comercializada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF A	Mistura física de quitosana A e isoniazida
MF B	Mistura física de quitosana B e isoniazida
MP	Micropartículas
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
Na ₂ HPO ₄	Solução fosfato de sódio 0,02M
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NP	Nanopartículas
PACF	Formulação com quitosana polymar A e isoniazida
PBCF	Formulação com quitosana polymar B e isoniazida
PBS	Tampão Fosfato Salino
<i>r</i>	Coeficiente de correlação linear
R(%)	Rendimento do processo de microencapsulação

RP	Fase Reversa
TB	Tuberculose
USP	UNITED STATES PHARMACOPEIA
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
WHO	Organização Mundial de Saúde
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1. Sistemas de Liberação de Fármacos.....	19
1.1.1. Micropartículas poliméricas	20
1.1.2. Microencapsulação	22
1.1.2.1. Coacervação simples.....	23
1.1.2.2. Spray-drying.....	24
1.2. Tuberculose pulmonar	25
1.2.1. Isoniazida: quimioterapia da tuberculose.....	27
1.3. Liberação pulmonar de fármacos.....	28
 2. OBJETIVOS	 31
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 33
3.1. Material	33
3.1.1. Matérias-primas e reagentes	33
3.1.2. Equipamentos	33
3.2. Métodos	34
3.2.1. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do fármaco utilizando as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de Espectrofotometria na região UV	34
3.2.1.1. Determinação do espectro de absorção na região UV da isoniazida.....	35
3.2.1.2. Validação do método analítico	36
3.2.1.2.1. Curva de calibração e linearidade.....	36
3.2.1.2.2. Precisão e exatidão	36
3.2.1.2.3. Robustez.....	37
3.2.1.2.4. Especificidade e seletividade	37
3.2.2. Determinação da solubilidade do fármaco	38

3.2.3. Método de microencapsulação	38
3.2.3.1. Coacervação simples.....	38
3.2.3.1.1. Curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio	39
3.2.3.1.2. Preparo das micropartículas	40
3.2.3.2. Spray-drying.....	40
3.2.4. Rendimento do processo de microencapsulação	42
3.2.5. Determinação da eficiência de encapsulação.....	42
3.2.6. Caracterização físico-química das partículas	42
3.2.6.1. Estudo da morfologia das partículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
3.2.6.2. Análise da distribuição do tamanho das partículas	43
3.2.6.3. Determinação do potencial zeta.....	43
3.2.6.4. Análise de difração de raios-X	43
3.2.6.5. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	44
3.2.7. Estudo <i>in vitro</i> de liberação.....	44
3.2.7.1. Estudo de estabilidade do fármaco.....	44
3.2.7.2. Estudo <i>in vitro</i> do perfil de liberação do fármaco a partir do sistema microparticulado	44
3.2.8. Espectrometria de Massas de Alta Resolução	45
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 47
4.1. Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do fármaco utilizando as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de Espectrofotometria na região UV	47
4.2. Determinação da solubilidade do fármaco	55
4.3. Preparação e avaliação das partículas obtidas por coacervação simples	56
4.4. Preparação e avaliação das micropartículas obtidas por spray-drying	58
4.5. Estudo <i>in vitro</i> do perfil de liberação do fármaco a partir do sistema microparticulado	77
4.6. Estudo da degradação da isoniazida por Espectrometria de Massas de Alta Resolução	84
 5. CONCLUSÕES.....	 89
 REFERÊNCIAS	 92

1. Introdução e Revisão da Literatura

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – Sistemas de Liberação de Fármacos

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos teve um aumento expressivo de estudos com sucesso na obtenção de seus resultados (ALENCASTRE et al., 2006; MARCHETTI; SARAIVA, 2009). Esse crescente interesse se deve principalmente as suas vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, bem como menor tempo e custo requerido em comparação ao desenvolvimento de novos medicamentos baseados em uma nova molécula ativa (MARCHETTI; SARAIVA, 2009).

O que torna os sistemas de liberação de fármacos interessantes é a possibilidade de modificar, controlar ou sustentar a liberação do fármaco no organismo (RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006a), proteger fármacos sensíveis (LEE; CHO; CHO, 2004; MARCHETTI; SARAIVA, 2009; PRABAHARAM; MANO, 2005), aumentar a absorção (BERNKOP-SCHÜRCH; KAST; GUGGI, 2003) e direcionar a liberação para local de ação (BARRATT, 2003; MANCA et al., 2008).

Com essa otimização da liberação é possível reduzir a frequência de administração, minimizar os efeitos colaterais (BARRATT, 2003; LIRA et al., 2009) e as variações na concentração plasmática do fármaco, melhorando a biodisponibilidade do fármaco tanto local quanto sistêmica (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2000a; BARRATT, 2003; MARCHETTI; SARAIVA, 2009).

Dessa forma, é possível obter medicamentos mais eficazes e melhorar a adesão do paciente ao tratamento (BUSZELLO; MÜLLER, 2000; RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006a, 2006b).

Os sistemas de liberação podem ser administrados por diferentes vias, como oral, parenteral, nasal, pulmonar e tópica (LIRA et al., 2009; MANCA et al., 2008; MARCHETTI; SARAIVA, 2009; MARTINAC et al., 2005). Entretanto, é necessário um estudo detalhado quanto aos constituintes dos sistemas, tamanho das partículas e seleção adequada do sistema de liberação em função da via de administração e ação pretendida (BARRATT, 2003; MARCHETTI; SARAIVA, 2009).

Uma variedade de sistemas de liberação tem sido desenvolvidos, como lipossomas (ZARU et al., 2007), micelas (LEE; CHO; CHO, 2004), nanopartículas

(RICCI-JÚNIOR; MARCHETTI, 2006a) e micropartículas (LIRA et al., 2009; PIMENTEL et al., 2007).

A escolha pelo sistema microparticulado balisou-se na patologia e na via de administração pretendidas.

1.1.1 – Micropartículas poliméricas

O principal interesse no desenvolvimento de micropartículas poliméricas é a modificação da liberação do fármaco e o direcionamento para o sítio de ação (MARTINAC et al., 2005). Isso é conseguido devido suas características de tamanho e do polímero. O tamanho dessas partículas é na faixa de 1 e 1000 μm , podendo ser determinado de acordo com a finalidade de seu desenvolvimento e o processo de obtenção (SILVA et al., 2003). Além disso, as micropartículas são sistemas estáveis durante seu preparo, armazenamento e aplicação (MARCHETTI; SARAIVA, 2009).

As micropartículas poliméricas são partículas sólidas podendo encapsular o fármaco na matriz do polímero, sendo assim denominadas de microesferas ou encapsular o fármaco no núcleo das partículas que é revestida com o polímero, formando então as microcápsulas (MARCHETTI; SARAIVA, 2009; PIMENTEL et al., 2007; SILVA et al., 2003). As microesferas podem ser homogêneas, quando o fármaco está solúvel na matriz polimérica, ou heterogêneas, que contém o fármaco disperso no polímero (SILVA et al., 2003).

Figura 1 – Esquema ilustrativo dos tipos de micropartículas: microesferas (matriz polimérica) e microcápsulas (sistema reservatório envolvido por uma membrana polimérica externa) (PIMENTEL et al., 2007)

Uma série de polímeros naturais ou sintéticos pode ser utilizada na obtenção das micropartículas, entretanto, os polímeros biodegradáveis têm sido os preferidos (AGNIHOTRI; AMINABHAVI, 2004; BRAGA; OLIVEIRA, 2007; MANCA et al., 2008). Isso pode ser observado pelos inúmeros estudos de micropartículas envolvendo os

polímeros de ácido láctico (PLA), de ácido poliglicólico (PGA) e seus co-polímeros (PLGA) (MANCA et al., 2008; MARCHETTI; SARAIVA, 2009; MINARINI, 2006; DUTT; KHULLER, 2001), e quitosana, que são polímeros biocompatíveis (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; LIRA et al., 2009; SINHA et al., 2004).

Dentre os polímeros biodegradáveis, a quitosana é uma escolha quando se deseja sistemas com mucoadesão e promotores de absorção (BERNKOP-SCHÜRCH; BURJAK et al., 2001; HE; DAVIS; ILLUM, 1999).

A quitosana, derivada da quitina por parcial desacetilação, é um polissacarídeo catiônico devido grupos amino livre (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; PRABAHARAM; MANO, 2005; RANDO; BRANDT; FERREIRA, 2004). Composta de copolímeros de glicosamina e N-acetilglicosamina, apresenta propriedades variadas quanto a viscosidade, grau de desacetilação e massa molecular (LIRA, 2007; SINGLA; CHAWLA, 2001; THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001).

A solubilidade da quitosana é dependente principalmente do grau de desacetilação, sendo aquelas com alto grau de desacetilação insolúveis em água. Entretanto, isso pode ser modificado pela adição de ácido acético na dispersão aquosa de quitosana (AGNIHOTRI; AMINABHAVI, 2004; AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; RANDO; BRANDT; FERREIRA, 2004; SINGLA; CHAWLA, 2001).

Figura 2 – Estrutura da quitosana (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004)

Como a quitosana apresenta característica catiônica, ela tem sido utilizada como constituinte de sistemas de liberação mucoadesivos, pois pode interagir com o muco e membrana mucosa que tem carga negativa e assim promover a adesão (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; PRABAHARAM; MANO, 2005). A propriedade mucoadesiva da quitosana é interessante, pois pode promover um aumento no tempo de contato e, conseqüentemente, maior tempo disponível

para liberar o fármaco (MARTINAC et al., 2005). A mucoadesão também é interessante para o direcionamento para o local de ação, por exemplo, quando uma liberação nasal ou pulmonar é desejada (HE; DAVIS; ILLUM, 1999; HUANG; CHIANG; YEH, 2003; SINGLA; CHAWLA, 2001).

Aliada a propriedade mucoadesiva da quitosana, observa-se também a capacidade de melhorar a absorção de fármacos hidrofílicos (SINGLA; CHAWLA, 2001; SINHA et al., 2004). O mecanismo pela qual a quitosana pode promover uma melhora na absorção é através do aumento da permeabilidade da membrana mediante abertura das junções intercelulares (tight junctions) (PRABAHARAM; MANO, 2005; SALAMAT-MILLER; JOHNSTON, 2005; SINGLA; CHAWLA, 2001; THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001).

O uso da quitosana em micropartículas tem sido observado em vários estudos, como de He; Davis e Illum (1999) e Huang; Chiang e Yeh (2003), devido suas características biocompatíveis, biodegradáveis, bioadesivas, baixo custo e baixa toxicidade, sendo possível obter sistemas com liberação modificada e sítio-específica e, conseqüentemente, otimizar a terapia de muitas patologias (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; MARTINAC et al., 2005; SHI; TAN, 2002; THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001).

1.1.2 – Microencapsulação

A microencapsulação de fármacos é um processo de obtenção de partículas do fármaco encapsuladas, geralmente, pela utilização de polímero (FLORENCE; ATTWOOD, 2003a; MARCHETTI; SARAIVA, 2009).

A microencapsulação é possível devido uma variedade de métodos físicos e químicos existentes, como emulsão e evaporação de solventes, coacervação simples e complexa, spray-drying, polimerização, entre outros (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; MARCHETTI; SARAIVA, 2009; SINHA et al., 2004).

O que define a escolha do método é, inicialmente, o objetivo do desenvolvimento das partículas e as características pretendidas. Em seguida, o tamanho requerido das partículas e propriedades do material polimérico e fármaco devem ser considerados (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

Neste trabalho, os métodos de coacervação simples e spray-drying foram utilizados para a obtenção de micropartículas de quitosana.

1.1.2.1 – Coacervação simples

A coacervação simples é uma técnica onde as micropartículas são obtidas pela precipitação do polímero. A alteração da solubilidade do material polimérico e, posterior precipitação, ocorre pela adição de sal ou álcool (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; MAGDASSI; VINETSKY, 1996; PENICHE et al., 2003; SILVA et al., 2003; SINHA et al., 2004), alteração do pH do meio (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; MAGDASSI; VINETSKY, 1996; PENICHE et al., 2003) ou alteração da temperatura (FLORENCE; ATTWOOD, 2003a; SILVA et al., 2003). Com a precipitação do polímero ocorre a encapsulação do fármaco. Nessa técnica é necessário um controle intenso das condições experimentais e conhecimento das características do polímero e formação do coacervato (FLORENCE; ATTWOOD, 2003a).

Alguns estudos têm sido realizados visando a obtenção de micropartículas de quitosana mediante a utilização dessa técnica. Berthold, Cremer e Kreuter (1996) obtiveram micropartículas de quitosana com prednisolona usando a coacervação simples. A precipitação polímero nesse estudo foi conseguida pela adição de sulfato de sódio.

Lourenço (2006) também utilizou a coacervação simples com adição de sulfato de sódio para desenvolver micropartículas de quitosana com encapsulação de dimetilaminoetanol (DMAE).

Figura 3 – Representação esquemática da preparação de micropartículas pelo método de coacervação simples

1.1.2.2 – Spray-drying

Spray-drying é uma técnica utilizada para secar materiais. A secagem ocorre rapidamente quando o material atomizado entra em contato com meio gasoso, geralmente ar, aquecido (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; BRAGA; OLIVEIRA, 2007; HE; DAVIS; ILLUM, 1999).

A microencapsulação obtida por esse método produz partículas com distribuição de tamanho relativamente uniforme através da atomização da solução ou dispersão contendo polímero e o fármaco. As partículas são coletadas na forma de pó seco (FLORENCE; ATTWOOD, 2003a; PENICHE et al., 2003; SILVA et al., 2003).

O tamanho das partículas obtidas pode ser controlado por alguns parâmetros, como o diâmetro do bico atomizador, a temperatura, tempo de evaporação do solvente, entre outros, o que torna essa técnica vantajosa (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; SILVA et al., 2003; SOUZA, 2009), além de ser simples e rápida (SILVA et al., 2003; SOUZA, 2009).

Figura 4 – Fotografia do equipamento Spray-dryer laboratorial, marca Lemarq (SOUZA, 2009)

Na literatura encontra-se uma variedade de micropartículas obtidas por esse método (HE; DAVIS; ILLUM, 1999; HUANG; CHIANG, YEH, 2003). Martinac et al. (2005) utilizaram a técnica de spray-drying para obter micropartículas de quitosana com encapsulação de loratadina.

Oliveira, Santana e Ré (2004) obtiveram micropartículas de quitosana com características adequadas quanto ao tamanho e morfologia mediante a utilização desse mesmo método.

Stulzer et al. (2007) relatam que as micropartículas de quitosana obtidas por spray-drying apresentaram elevada eficiência de encapsulação.

1.2 – Tuberculose pulmonar

Nesse trabalho, as micropartículas de quitosana foram desenvolvidas visando o tratamento da tuberculose (TB), que ainda hoje constitui um problema de saúde em todo o mundo.

A existência da TB é antiga, mas ainda, atualmente, milhões de casos novos têm aparecido resultando em morte em vários deles no mundo todo, principalmente em países em desenvolvimento (BRASIL, 2011; MELO et al., 2009; MINARINI, 2006; WHO, 2010; ZHOU et al., 2005). A estimativa da incidência, prevalência e morte por TB tem sido relatada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) e ministério da saúde do Brasil.

A TB é uma doença crônica que ocorre principalmente nos pulmões. A infecção, causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, ocorre pela deposição dos bacilos inalados nos alvéolos pulmonares (MELO et al., 2009; NG et al., 2007; ZHOU et al., 2005).

A transmissão ocorre, principalmente, pela tosse e escarro de pessoas com a doença ativa (bacilíferos) (BRASIL, 2011; MINARINI, 2006). Segundo Brasil (2011), é estimado que os bacilíferos possam contaminar de 10 a 15 pessoas anualmente.

Os bacilos expelidos que são capazes de depositar nos alvéolos apresentam características definidas quanto as gotículas aerolisadas nas quais estão presentes e ao tamanho dessas (até 5 μm) (BRASIL, 2011; DU TOIT; PILLAY; DANCKWERTS, 2006). Essas gotículas, conhecida núcleo de Wells, são ressecadas e contém de 1 a 2 bacilos (BRASIL, 2001; MELO et al., 2009).

Com a deposição das partículas contendo o bacilo, a infecção pode ser contida pelos macrófagos alveolares e respostas imunológicas desencadeadas ou resultar na doença, dependendo da imunidade (BRASIL, 2011; DU TOIT; PILLAY; DANCKWERTS, 2006; MELO et al., 2009; MINARINI, 2006) e da virulência do bacilo (MELO et al., 2009).

Figura 5 – Incidência estimada da TB em 2009 (WHO, 2010)

O aumento de casos incidentes é decorrente do aumento de resistência do bacilo aos fármacos, surgimento do HIV (WHO, 2010), longo tratamento com efeitos colaterais, e conseqüentemente, redução na adesão do paciente ao tratamento (NG et al., 2007; ZHOU et al., 2005). Dessa forma, a importante otimização do tratamento pode ser obtida pelo desenvolvimento de sistemas de liberação visando a liberação pulmonar veiculando fármacos utilizados na terapia atual.

Dessa forma, a importante otimização do tratamento pode ser obtida pelo desenvolvimento de sistemas de liberação visando a liberação pulmonar veiculando fármacos utilizados na terapia atual (ZHOU et al., 2005). Vários estudos têm sido realizados com esse propósito, como Zaru et al. (2007) que avaliaram lipossomas contendo rifampicina para liberação pulmonar e obtiveram alta eficiência de nebulização e integridade, menor toxicidade em relação ao fármaco livre, porém pequena mucoadesão, relatando que esta pode ser modificada. Sharma et al. (2007) obtiveram micropartículas contendo rifampicina e isoniazida que foram administradas por inalação e induziram respostas em macrófagos de animais infectados.

1.2.1 – Isoniazida: quimioterapia da tuberculose

A quimioterapia da TB iniciou-se com a descoberta da estreptomicina em 1944, seguida do ácido paraminosalicílico (1946) e da isoniazida (1952), mudando o cenário histórico da doença no mundo com grande redução da mortalidade (MELO et al., 2009; MINARINI, 2006). Após a descoberta desses fármacos, outros foram desenvolvidos e continuam sendo usados até hoje, entre eles a rifampicina e pirazinamida (BRASIL, 2011; DU TOIT; PILLAY; DANCKWERTS, 2006).

Regime	Fármacos e doses em mg	Faixa de peso	Unidades/dose	Meses
2RHZE Fase intensiva	RHZE 150/75/400/275	20 a 35kg 36 a 50kg >50kg	2 comprimidos 3 comprimidos 4 comprimidos	2
4RH Fase de manutenção	RH ^a 300/200 ou 150/100	20 a 35kg 36 a 50kg >50kg	1 cápsula 300/200 1 cápsula 300/200 + 1 cápsula 150/100 2 cápsulas 300/200	4

Figura 6 – Esquema básico para tratamento da tuberculose (casos novos) em adultos e adolescentes. R= rifampicina, H= isoniazida, Z= pirazinamida e E= etambutol (BRASIL, 2011)

Dentre os fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da TB, a isoniazida está presente nas duas fases do tratamento, fase inicial de 2 meses e fase de manutenção de 4 meses (**Figura 6**) (BECKER et al., 2007; BRASIL, 2011; DU TOIT; PILLAY; DANCKWERTS, 2006; HERYANTO; HASAN; ABDULLAH, 2008; JOSHI et al., 2008). Isso porque é um dos fármacos mais potentes contra TB (DU TOIT; PILLAY; DANCKWERTS, 2006; HERYANTO; HASAN; ABDULLAH, 2008), com alta eficácia, baixa dose, boa tolerância e baixo custo (BECKER et al., 2007; HERYANTO; HASAN; ABDULLAH, 2008; KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988).

A isoniazida se encontra na forma de pó, com fórmula química $C_6H_7N_3O$ e MM 137,14. A solubilidade em álcool, clorofórmio e éter é pequena, porém elevada em água, aproximadamente 125 mg/mL (BECKER et al., 2007; KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988; HANDBOOK ..., 2008; THE MERCK INDEX, 1996; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975).

Figura 7 – Estrutura da isoniazida (HANDBOOK ..., 2008)

Apresenta pequena absorção em pH ácido, visto que nesse pH está na forma protonada ($pK_a = 2$), sendo assim melhor absorvido no intestino do que no estômago (BECKER et al., 2007; JOSHI et al., 2008; RASTOGI et al., 2007).

A isoniazida é eficaz contra microrganismos intracelulares decorrente de sua capacidade de penetrar nas células, e assim facilmente captada pelos bacilos (DU TOIT; PILLAY; DANCKWERTS, 2006; RANG; DALE; RITTER, 1997). É classificada como bactericida (MELO et al., 2009), cujo mecanismo de ação se dá pela inibição da síntese do ácido micólico da parede celular do bacilo, na concentração de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (DU TOIT; PILLAY; DANCKWERTS, 2006; RANG; DALE; RITTER, 1997).

Devido suas propriedades, a isoniazida é considerada como um fármaco candidato em potencial para ser utilizada em sistemas de liberação sítio-específica visando uma melhora na terapia da TB.

1.3 – Liberação pulmonar de fármacos

A via pulmonar tem sido considerada uma interessante alternativa à administração oral e parenteral. É uma via não-invasiva que pode ser utilizada com objetivo de ação local ou sistêmica (HUSSAIN et al., 2004; SUNG; PULLIAM; EDWARDS, 2007; TAYLOR, 2005).

O pulmão, em contato direto com o ambiente, constitui uma via para tratamento (FLORENCE; ATTWOOD, 2003b; YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008), com características favoráveis para liberação de fármacos como baixa atividade enzimática, grande área de contato das suas superfícies, extensa vascularização e fino epitélio alveolar (HUSSAIN et al., 2004; SUNG; PULLIAM; EDWARDS, 2007).

Dessa forma, a liberação pulmonar possibilita reduzir os problemas envolvidos na administração oral, como baixa biodisponibilidade, degradação ou inativação hepática, efeitos colaterais associados a dose administrada, bem como reduzir a concentração sistêmica e, conseqüentemente, melhorar a adesão ao tratamento (CHIEN, 1992; LEAROYD et al., 2008; MANCA et al., 2008; SUNG; PULLIAM; EDWARDS, 2007; TSAPIS et al., 2003).

Entretanto, a eficácia da liberação pulmonar está relacionada a capacidade de penetração no trato respiratório, sendo o tamanho de partículas é um dos fatores mais importantes (FLORENCE; ATTWOOD, 2003b; TAYLOR, 2005).

A deposição das partículas inaladas no trato respiratório ocorre por vários mecanismos, sendo os principais impactação inercial, sedimentação e difusão browniana, que são dependentes principalmente de fatores relacionados ao tamanho de partícula e a formulação (FLORENCE; ATTWOOD, 2003b; TAYLOR, 2005; YANG; PETERS; WILLIAMS III, 2008).

Figura 8 – Figura ilustrativa dos processos de deposição de partículas no trato respiratório (FLORENCE; ATTWOOD, 2003b)

Dessa forma, a utilização de vias alternativas para a liberação de fármacos associada ao desenvolvimento de sistemas de liberação tem atraído considerável interesse na otimização da terapia de muitas patologias.

2. Objetivos

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo geral da pesquisa é o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação da isoniazida para o uso na Terapia da Tuberculose.

2.2 – Objetivos Específicos

2.2.1 Encapsulação da isoniazida em micropartículas de quitosana pelos os métodos de coacervação simples e spray-drying.

2.2.2 Padronização e validação de método analítico para a quantificação do fármaco utilizando as técnicas de CLAE e espectrofotometria no UV.

2.2.3 Determinação do rendimento do processo e da eficiência de encapsulação.

2.2.4 Caracterização físico-química das partículas efetuando-se a análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), determinação do potencial zeta e do tamanho e da distribuição do tamanho das partículas pela técnica de difração de laser, bem como difração de raios-X,

2.2.5 Estudos *in vitro* do perfil de liberação.

3. Material e Métodos

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

3.1.1 – Matérias-primas e reagentes

- Acetonitrila, grau cromatográfico (lote: C03C51 – J.T.Baker)
- Ácido acético, grau cromatográfico (lote: 48418 – Synth)
- Ácido clorídrico, PA (lote: 57219 – Synth)
- Água purificada, obtida em sistema de purificação de água Milli-Q Plus da Millipore
- Cloreto de sódio, PA (lote: 59191 – Synth)
- Cloreto de potássio, PA (lote: 105703 – Synth)
- Fosfato de potássio monobásico anidro, PA (lote: 105427 – Synth)
- Fosfato de sódio bibásico dihidratado, PA (lote: 013705 – Vetec)
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado, PA (lote: 91107 – Synth)
- Isoniazida (lote: 037K0776 – Sigma-Aldrich)
- Metanol, grau cromatográfico (lote: C5093 – Burdick & Jackson)
- Quitosana, grau de desacetilação min. 96,5% (lote: QIN011006 – Polymar)
- Quitosana, grau de desacetilação min. 89,2% (lote: CGA010806 – Polymar)
- Sulfato de sódio, PA (lote: 02122153 – Zilquímica)

3.1.2 – Equipamentos

- Agitador magnético Marte, modelo MAG15
- Agitador mecânico Heidolph, modelo R2R1
- Analisador de partículas por difração a laser Beckman Coulter, modelo LSTM 13 320
- Analisador de partículas Zetasizer Malvern, modelo Nano SZ
- Balança analítica Ohaus, modelo Adventurer, sensibilidade 0,0001 g
- Banho termostatizado Fanem, modelo T14
- Banho ultrassônico Thornton, modelo T14
- Bomba de vácuo Fisatom, modelo 820

- Calorímetro exploratório diferencial Shimadzu[®], modelo DSC-50
- Centrífuga Hettich, modelo Rotofix 32
- Coluna cromatográfica Purospher Star[®] RP 18 4 x 250 mm, 5 µm e coluna de guarda RP 18 4 x 4 mm, 5 µm (Merck)
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu[®] modelo SPD-10AVP composto com detector UV-Vis modelo SPD-10A, bomba peristáltica modelo LC-10 ADVP, injetor Reodyne e integrador modelo CR6-A
- Difratorômetro de Raios-X Siemens, modelo D5005
- Dissolutor Hanson, modelo SR8 Plus
- Espectrofotômetro UV-Vis Femto[®], modelo 800XI
- Espectrômetro de Massas de Alta Resolução Bruker Daltonics, modelo ultrOTOFG - ESI-TOF
- Liofilizador Liobrás, modelo L101
- Microscópio eletrônico de varredura Leica, modelo Stereoscan 440
- Potenciômetro digital Digimed, modelo DM-20
- Sistema de purificação de água Milli-Q Plus – Millipore Corporation
- Spray-dryer Lemarq LM MSD 1.0

3.2 – Métodos

3.2.1 – Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do fármaco utilizando as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de Espectrofotometria na região UV

O desenvolvimento do método analítico para a quantificação do fármaco nos sistemas desenvolvidos, nos ensaios para determinação da eficiência de encapsulação e nos estudos *in vitro* para avaliação do perfil de liberação baseou-se no método descrito por Calleri et al. (2002), Franco e Silva e Santoro (2001) e Mohan, Sharda e Singh (2003), utilizando CLAE de fase reversa, cujos parâmetros cromatográficos foram adaptados.

Para o desenvolvimento e validação do método utilizando CLAE, as análises foram realizadas com cromatógrafo Shimadzu[®] modelo SPD 10 AVP equipado com detector UV-VIS ($\lambda=260$ nm), bomba LC-10 ADVP, injetor Reodyne (loop de 20 µL) e

integrador CR6-A. A separação foi realizada em coluna C₁₈ de fase reversa encapada Lichrocart® Purospher® Star (Merck, 250 x 4 mm, 5 µm) e coluna de guarda 4 x 4 mm (5 µm), a temperatura ambiente controlada (25 ± 1°C). Os parâmetros cromatográficos selecionados foram: fase móvel constituída de metanol e tampão fosfato (Na₂HPO₄ 0,02 M) (15:85 – v/v), fluxo de 1,0 mL/minuto, volume injetado correspondente a 20 µL e tempo de corrida de 7 minutos.

Para o desenvolvimento e validação do método utilizando Espectrofotometria, as análises foram realizadas utilizando um espectrofotômetro da marca Femto 800 XI, com leitura no comprimento de onda (λ) de 260 nm. A solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 foi usada como branco.

Foram pesados exatamente 25 mg do fármaco e solubilizados em 25 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 ou água ultra pura (MilliQ®). Uma alíquota foi retirada e diluída com o mesmo meio, resultando nas concentrações utilizadas. O comprimento de onda sugerido no método foi confirmado como ideal através de varredura espectroscópica. A **Tabela 1** resume as condições analíticas testadas:

Tabela 1 – Condições cromatográficas testadas utilizando-se a Lichrocart® Purospher® Star (Merck, 250 x 4 mm, 5 µm) e coluna de guarda 4 x 4 mm (5 µm)

Componentes da fase móvel (mL)				
Acetonitrila (ACN)	Tampão fosfato 50 mM pH 3,5	Metanol	Solução fosfato de sódio 0,02M (Na ₂ HPO ₄)	Vazão (mL/min)
3	97	-	-	1,0
5	95	-	-	1,0
-	-	40	60	1,0
-	-	25	75	1,0
-	-	15	85	1,0

3.2.1.1 – Determinação do espectro de absorção na região UV da isoniazida

Para determinar o comprimento de onda (λ) onde ocorre maior absorção para a isoniazida, foi realizada a varredura na região UV (190 a 390 nm). A leitura foi realizada em um espectrofotômetro Femto 800 XI, utilizando solução de isoniazida

em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 na concentrações correspondentes a 10, 25 e 50 µg/mL. A solução PBS foi usada como branco.

3.2.1.2 – Validação do método analítico

A validação do método analítico foi baseada no método de padronização externa. Para a validação do método os parâmetros analíticos utilizados foram: linearidade; precisão e exatidão inter ou intra-ensaio; robustez de fluxo, proporções entre os componentes da fase móvel e meio; e seletividade, obedecendo a Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

3.2.1.2.1 – Curva de calibração e linearidade

Para a construção da curva de calibração, foram utilizadas soluções de isoniazida em PBS ou água ultra pura (MilliQ®) nas concentrações correspondentes a 0,5; 0,75; 1; 2; 5; 10 e 15 µg/mL, obtidas a partir da solução estoque contendo 1 mg/mL de isoniazida. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente controlada de 25 °C e em triplicata (n=3). Essas amostras foram analisadas por CLAE e espectrofotometria na região UV, no comprimento de onda de 260 nm, e os resultados obtidos relacionados em um gráfico da concentração da solução pela área do pico ou absorbância.

A determinação da linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta, foi realizada utilizando-se a curva de calibração através do coeficiente de correlação linear (r) e da equação da reta e do cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos da curva.

3.2.1.2.2 – Precisão e exatidão

A precisão (CV%) e a exatidão (E%) do método analítico foram testadas por análises intra-ensaio e inter-ensaio. A precisão está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio, sendo expressa matematicamente através do coeficiente de variação (CV%), calculado pela seguinte fórmula:

$$CV\% = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A exatidão (E%) corresponde à diferença entre o valor obtido após a análise e o valor teórico da amostra, sendo calculada pela fórmula:

$$E\% = (\text{valor obtido} - \text{valor teórico}) / \text{valor teórico} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Para a determinação da precisão e exatidão inter-ensaio, a curva de calibração e os três pontos correspondentes às concentrações de 0,5; 2 e 15 µg/mL foram analisados durante três dias consecutivos (n=3) para espectrofotometria e cinco dias consecutivos (n=5) para CLAE. Para a determinação da precisão e exatidão intra-ensaio, a curva de calibração foi injetada em triplicata e os três pontos selecionados da curva foram injetados 10 vezes em um mesmo dia (n=10).

3.2.1.2.3 – Robustez

A determinação da robustez do método foi realizada avaliando as seguintes variações nas condições analíticas:

- Fluxo da fase móvel: 0,8 mL/min, 1,0 mL/min e 1,2 mL/min
- Proporção entre metanol e tampão fosfato 0,02M: 13:87, 15:85 e 17:83
- Meio de análise: tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 e água ultra pura (MilliQ®).

Foram utilizadas soluções de isoniazida em PBS nas concentrações correspondentes a 0,5; 2; e 15 µg/mL, obtidas a partir da solução estoque contendo 1 mg/mL de isoniazida. A análise foi realizada através da construção da curva de calibração com as três concentrações, da determinação do coeficiente de correlação linear da curva (r) e do CV% obtido. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente controlada de 25 °C e em triplicata (n=3). Essas amostras foram analisadas por CLAE.

3.2.1.2.4 – Especificidade e seletividade

A seletividade é realizada para avaliar possíveis interferentes experimentais. Dessa forma, a determinação da seletividade foi efetuada para solução do fármaco (2 µg/mL) obtidas a partir de soluções de micropartículas inertes de quitosana (A e B). As amostras foram analisadas por CLAE em triplicata (n=3). A avaliação da seletividade é realizada mediante a determinação do teor (%) obtido no experimento em relação a concentração teórica (ANVISA, 2003).

3.2.2 – Determinação da solubilidade do fármaco

Para a determinação da solubilidade do fármaco no meio de dissolução, um excesso de isoniazida (3,0 g precisamente pesados) foi adicionada em 10 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4. Esse experimento foi realizado em triplicata. Cada frasco foi mantido sob agitação magnética por 24 e 48 horas a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). A análise das amostras, previamente filtradas através de membrana de $0,45 \mu\text{m}$, foi realizada por CLAE.

A solubilidade do fármaco foi também avaliada de acordo com as condições experimentais a serem utilizadas no estudo *in vitro* de liberação do fármaco a partir das micropartículas. Esse experimento foi realizado em triplicata, onde 5,0 mg do fármaco introduzidos em uma cesta revestida com membrana de diálise foram adicionados na cuba de vidro âmbar de 150 mL contendo 100 mL da solução receptora, PBS 10 mM pH 7,4. A suspensão formada foi continuamente agitada a velocidade rotacional de 100 rpm, com temperatura rigorosamente mantida em $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Alíquotas de 1,0 mL foram retiradas das cubas para análise após 24 e 48 horas e o mesmo volume foi substituído com PBS pH 7,4. A análise das amostras foi realizada por CLAE (LIRA, 2007; SOUZA, 2009).

3.2.3 – Método de microencapsulação

3.2.3.1 – Coacervação simples

As condições iniciais de preparo das micropartículas de quitosana contendo ou não o fármaco foram baseadas no método proposto por Berthold, Cremer e Kreuter (1996) e adaptado por Lourenço (2006). Por esta técnica, as partículas são obtidas mediante solubilização do polímero e fármaco, seguida da adição de um agente capaz de precipitar o polímero originando assim derivados insolúveis e resultando na formação das partículas com o fármaco encapsulado.

O polímero usado, a quitosana, foi solubilizado em solução aquosa de pH ácido e adicionada de uma solução de sulfato de sódio, como agente precipitante, sob agitação mecânica constante (400 rpm) mantida assim por 1 hora.

Algumas variáveis podem afetar esse processo, como a quantidade do agente precipitante, bem como a massa molecular e a proporção da quitosana. Assim, parâmetros como o tipo de quitosana e a quantidade do agente precipitante (sulfato

de sódio) a ser utilizado foram testados para adequação das condições para o preparo das partículas.

Inicialmente alguns ensaios foram realizados com o intuito de se determinar o ponto de precipitação do polímero para que se estabelecesse a quantidade de sulfato de sódio a ser utilizada.

3.2.3.1.1 – Curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio

Para determinar a quantidade de sulfato de sódio necessária utilizou-se a técnica de turbidimetria, conforme Lourenço (2006). Em 50 ml de solução de quitosana 0,25% (m/v) foram adicionados volumes crescentes de solução de sulfato de sódio 20% (m/v), conforme protocolo apresentado na **Tabela 2**. Em seguida efetuou-se a leitura das amostras em 500 nm em espectrofotômetro Femto 800 XI.

Os dados obtidos foram relacionados em um gráfico da porcentagem de sulfato de sódio pela absorvância lida (nm). Este procedimento foi realizado com 2 tipos de quitosana: Polymar A (grau de deacetilação de no mínimo 96,5 % e de alta densidade- 0,79 g/ml) e Polymar B (grau de deacetilação de no mínimo 89,2 % e de baixa densidade- 0,33 g/ml).

Tabela 2 – Protocolo experimental para a obtenção da curva de precipitação do polímero pelo sulfato de sódio

Volume adicionado de solução de Na ₂ SO ₄ 20% (mL)	% de Na ₂ SO ₄ na solução de quitosana (m/v)
0	0
0,25	0,1
0,5	0,2
0,75	0,3
1,0	0,4
1,25	0,5
1,5	0,6
2,0	0,8
5,0	2,0
8,0	3,2

3.2.3.1.2 – Preparo das micropartículas

Para o preparo das partículas foi dissolvido 0,125 g de quitosana em 50 mL de solução aquosa contendo 2% de ácido acético (v/v). Para as micropartículas contendo isoniazida, 31,25 mg do fármaco (proporção fármaco:polímero 1:4) foi adicionado após solubilização da quitosana sob agitação mecânica a velocidade constante de 400 rpm até completa solubilização. Uma solução de sulfato de sódio 20% (m/v), quantidade determinada pela curva de precipitação, que para a quitosana polymar A foi 0,6% (1,5 mL) e para polymar B 0,8% (2,0 mL), foi gotejada sobre a solução de quitosana sob agitação mecânica a velocidade constante de 400 rpm, que foram mantidos por 1 hora.

As matérias-primas utilizadas com suas respectivas quantidades estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Constituintes e respectivas quantidades utilizados na preparação das micropartículas de quitosana por coacervação simples

Constituintes	A	B	PACF	PBCF
Quitosana Polymar A	0,125 g	-	0,125 g	-
Quitosana Polymar B	-	0,125 g	-	0,125 g
Isoniazida	-	-	31,25 mg	31,25 mg
Ácido acético	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Sulfato de sódio	1,5 mL	2,0 mL	1,5 mL	2,0 mL
Água ultra pura (MilliQ®)	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

* Polymar A (grau de deacetilação de no mínimo 96,5 % e de alta densidade- 0,79 g/mL) e Polymar B (grau de deacetilação de no mínimo 89,2 % e de baixa densidade- 0,33 g/mL).

3.2.3.2 – Spray-drying

As micropartículas foram obtidas por spray-drying, processo amplamente utilizado como método de encapsulação. As condições iniciais de preparo das micropartículas de quitosana contendo ou não o fármaco foram baseadas no método proposto por Braga e Oliveira (2007), He, Davis e Illum (1999) e Tsapis et al., 2003.

Inicialmente foi preparada uma solução do polímero, quitosana, contendo ou não o fármaco. Em seguida, a solução obtida foi processada no spray-dryer LM MSD 1,0 Lemarq sob a seguinte condição operacional padrão: 100 °C de temperatura de entrada; 0,7 mm de diâmetro do bico atomizador; 60 L/min de pressão do ar comprimido; 6 mL/min de vazão da bomba peristáltica; 40 psi de vazão do ar de secagem. Os pós obtidos foram coletados via ciclone. Durante todo o processo a solução foi mantida sob agitação magnética.

A solução (250 mL) foi preparada solubilizando a quitosana em solução aquosa de pH ácido sob agitação mecânica constante (400 rpm) até completa solubilização. Nas formulações contendo o fármaco, esse foi adicionado após solubilização do polímero mantendo a agitação mecânica constante (400 rpm) até completa solubilização.

Como a massa molecular e a proporção da quitosana, bem como a proporção de sólidos, podem afetar esse processo de microencapsulação, dois tipos de quitosana e proporções de sólidos foram testados visando à obtenção de adequado rendimento de processo com partículas com características desejadas. As matérias-primas utilizadas com suas respectivas quantidades estão apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Constituintes utilizados na preparação das micropartículas de quitosana por spray-drying

Constituintes	Quantidade (%)							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Quitosana Polymar A	1	1	2	2	-	-	-	-
Quitosana Polymar B	-	-	-	-	1	1	2	2
Ácido acético	2	2	4	4	2	2	4	4
Isoniazida	-	0,25	-	0,5	-	0,25	-	0,5
Água ultra pura (MilliQ®)	100	100	100	100	100	100	100	100

* Polymar A (grau de deacetilação de no mínimo 96,5 % e de alta densidade- 0,79 g/mL) e Polymar B (grau de deacetilação de no mínimo 89,2 % e de baixa densidade- 0,33 g/mL).

3.2.4 – Rendimento do processo de microencapsulação

A massa das partículas foi pesada para cálculo do rendimento do processo. O rendimento foi calculado pela equação (3):

$$R(\%) = (M_S/M_F) \times 100, \quad \text{(Equação 3)}$$

onde: R(%) = rendimento do processo, MS = massa de partículas recuperada após o processo de secagem e MF = massa de quitosana mais a massa do fármaco da formulação (RICCI-JÚNIOR, 2005).

3.2.5 – Determinação da eficiência de encapsulação

Uma quantidade conhecida (5 mg) de micropartículas de quitosana contendo o fármaco foi transferida para tubo de ensaio. Foram adicionados 10 mL de solução de ácido clorídrico para rompimento das micropartículas e extração do fármaco. A amostra foi agitada por 1 minuto, com auxílio de agitador de tubos e, em seguida, colocada no banho de ultrassom por 30 minutos. Após rompimento das partículas, o volume (25 mL) foi completado com solução tampão PBS ou água ultra pura (MilliQ®) e a amostra foi filtrada, através de membrana de 0,45 µm e recolhida em balão volumétrico (25 mL). O preparo das amostras foi realizado em triplicata (n=3). A quantificação do fármaco foi efetuada por CLAE. A eficiência de encapsulação foi calculada pela equação (3):

$$EE = (M_1/M_2) \times 100, \quad \text{(Equação 4)}$$

onde: EE = eficiência de encapsulação, M₁ = massa de fármaco encontrado nas micropartículas e M₂ = massa do fármaco da formulação (LIRA, 2007; LOURENÇO, 2006; RICCI-JÚNIOR, 2005).

3.2.6 – Caracterização físico-química das partículas

3.2.6.1 – Estudo da morfologia das partículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das micropartículas foi avaliada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (Stereoscan 440, Leica). As partículas foram fixadas sobre

um porta-amostras, recobertas com ouro e examinadas no microscópio eletrônico (RICCI-JÚNIOR, 2005).

3.2.6.2 – Análise da distribuição do tamanho das partículas

Para a determinação do tamanho e distribuição de tamanho das micropartículas foi utilizado o analisador de tamanho de partícula por difração de laser, modelo LSTM 13 320, Beckman Coulter. Os dados são enviados para um computador que fornece valores de diâmetro médio (nm) e de porcentagem de distribuição granulométrica.

A análise da distribuição do tamanho de partículas foi realizado com as partículas dispersas em metanol.

3.2.6.3 – Determinação do potencial zeta

A determinação do potencial zeta é um parâmetro importante na caracterização das partículas, uma vez que esse tem influência na adesão de sistemas de liberação de fármacos em superfícies biológicas. Assim, o potencial zeta das partículas foi determinado por espectroscopia de correlação-fóton (Zeta-sizer 3000 HSA, Malvern Instruments) à temperatura de 25 °C. As amostras foram dispersas em 1,2 mL de água ultra pura (MilliQ[®]) (MARTINAC et al., 2005).

3.2.6.4 – Análise de difração de raios-X

Os difratogramas de amostras em pó das micropartículas contendo o fármaco, fármaco livre, polímero isolado e mistura física fármaco:polímero foram obtidos utilizando um difratômetro de raios-X modelo Siemens D 5005, que utilizada fonte de cobre e monocromador de grafite, selecionando a radiação K_{α1} do Cu com comprimento de onda de 1,5406 Å. Os difratogramas foram coletados em uma faixa de ângulo (2θ) de 2 a 50° a uma velocidade de 0,02° s⁻¹, operando com voltagem de 40 kV e 30 mA.

3.2.6.5 – Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Curvas termoanalíticas das micropartículas contendo o fármaco, fármaco livre, polímero isolado e mistura física fármaco:polímero foram obtidos utilizando DSC-50 Shimadzu, programa TA 50WS, sob fluxo de nitrogênio de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de 10 °C até atingir 350 °C. Amostras de 4 mg foram pesadas em recipientes de alumínio e fechadas.

3.2.7 – Estudo *in vitro* de liberação

3.2.7.1 – Estudo de estabilidade do fármaco

Visando avaliar eventuais alterações na quantificação do fármaco no decorrer do tempo e temperatura utilizada no estudo do perfil de liberação, uma solução contendo isoniazida (10 µg/mL) em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 foi colocada em banho termostatizado a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. As amostras (2 mL) foram retiradas do banho em intervalos de tempo pré-estabelecidos e analisadas por metodologia analítica adequada (CLAE). A relação da quantificação do tempo inicial e em determinado tempo foi utilizada para a construção do gráfico em função do tempo (**Equação 5**) (FLORENCE; ATTWOOD, 2003c). Esse experimento foi realizado em triplicata para soluções feitas com fármaco como comercializado (ISN) e após ser processado no spray-dryer (FSD).

$C_0/C = \text{concentração inicial no } t_0 / \text{concentração em } t$ (**Equação 5**)

onde: t_0 = tempo inicial (0 h), t = determinado tempo do experimento, concentração = µg/mL.

3.2.7.2 – Estudo *in vitro* do perfil de liberação do fármaco a partir do sistema microparticulado

O estudo do perfil de liberação e as condições experimentais estabelecidas foram baseados nos trabalhos de Lagarce et al. (2005) e Ricci-Júnior (2005), que utilizam um dissolutor (SR8 Plus da Hanson Research) constituído por um banho termostatizado, onde cubas de vidro âmbar contendo o meio receptor e o sistema de

liberação em estudo estavam imersas. Alíquotas do meio foram retiradas em intervalos de tempo pré-estabelecidos e repostas pelo meio inicial.

Sendo assim, 100 mL da solução receptora, tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 ou água, foram transferidas para uma cuba de vidro âmbar de 150 mL. A cuba foi imersa no banho termostatizado do dissolutor para equilíbrio da temperatura a qual foi rigorosamente mantida em $37 \pm 1^\circ\text{C}$. As amostras foram introduzidas em uma cesta revestida com membrana de diálise, que foi adicionada na solução receptora (100 mL). A suspensão formada foi continuamente agitada a velocidade rotacional de 100 rpm. Em intervalos pré-estabelecidos alíquotas de 1,0 mL foram retiradas das cubas para análise e o mesmo volume foi substituído com a mesma solução receptora (tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 ou água. As condições de “sink” foram mantidas no teste, considerando a solubilidade do fármaco no meio dissolutor.

Esse experimento foi realizado para as micropartículas contendo o fármaco (5,0 mg) e para o fármaco livre (1,0 mg). A concentração do fármaco liberado na solução receptora foi quantificada através de metodologia analítica adequada (CLAE). As concentrações calculadas foram utilizadas para a construção do gráfico do perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas.

3.2.8 – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Os espectros foram obtidos em espectrômetro de alta resolução da marca Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA), modelo ultrOTOF_Q - ESI-TOF, nas seguintes condições experimentais: fluxo de bomba de infusão: 300 µl/h, fase móvel para a solubilização: metanol:água (90:10), modo de detecção foi positivo para a amostra. A calibração interna foi feita com uma solução de NA-TFA a 10mg/ml (TOF). Nitrogênio (160°C) foi utilizado como gás de nebulização e secagem. Os espectros foram gentilmente obtidos pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e José Carlos Tomaz do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP.

4. Resultados e Discussão

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação do fármaco utilizando as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de Espectrofotometria na região UV

O desenvolvimento do método analítico para quantificação da isoniazida foi iniciado com a pesquisa de trabalhos e compêndios relacionados à determinação desse fármaco visando o delineamento dos parâmetros cromatográficos a serem utilizados.

Dessa forma, com o objetivo de determinar o comprimento de onda que resulta em maior absorbância foi efetuada a varredura do espectro de absorção na região de comprimento de onda da luz ultravioleta (190– 390 nm) da isoniazida em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 na concentrações correspondentes a 10, 25 e 50 µg/mL. A varredura foi realizada em um espectrofotômetro Femto 800 XI, e solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 utilizada como branco.

Segundo essa análise a solução apresentou absorbância máxima a 260 nm (**Figura 9**). Esse valor do pico de absorção máximo encontra-se próximo ao encontrado na literatura (266 nm) (THE MERCK INDEX, 1996). Valores ligeiramente diferentes podem ocorrer, devido à dissoluções, pontes de hidrogênio, interação com o solvente e temperatura (LIRA, 2007). Calleri et al. (2002) determinaram o comprimento de onda 261 nm para a quantificação da isoniazida. O mesmo ocorreu em estudo feito por Franco e Silva e Santoro (2001) (261 nm). Lucinda-Silva e Evangelista (2003) utilizaram 260 nm para analisar soluções de isoniazida.

Figura 9 – Representação gráfica do comprimento de onda (λ) versus absorbância (ABS), realizada no espectrofotômetro em função da determinação da varredura no espectro ultravioleta (UV), da solução de isoniazida a 10,0; 25,0 e 50,0 µg/mL em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4

A técnica mais utilizada encontrado na literatura para quantificação da isoniazida é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa por ser sensível, reprodutível, e eficiente. Alguns parâmetros cromatográficos podem ser modificados visando melhorar a detecção e a separação do fármaco, como a composição e a proporção dos constituintes da fase móvel (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Após a determinação do comprimento de onda no qual a isoniazida em solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 apresenta maior absorbância, realizou-se o teste para a determinação da fase móvel a ser utilizada nas demais análises através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A fase móvel inicialmente testada era constituída de uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato 50 mM pH 3,5 na proporção 3:97 (v/v). Visando melhorar o tempo de retenção, essa proporção foi modificada para 5:95 e novamente testada. Os resultados obtidos estavam de acordo com aqueles encontrados por Calleri et al. (2002) e Mohan, Sharda e Singh (2003), que também utilizaram essa fase móvel para quantificar a isoniazida. Com essa fase móvel obteve-se tempo de retenção que não foi próximo ao volume morto, porém havia ainda a necessidade de obter pico sem cauda, assim outra fase móvel foi avaliada. Essa constituiu de metanol e tampão fosfato 0,02 M na proporção de 50:50. Franco e Silva e Santoro (2001) também utilizaram essa fase móvel para avaliar a isoniazida e obtiveram resultados semelhantes.

Entretanto, a proporção da fase móvel metanol e tampão fosfato 0,02 M foi alterada para 25:75 e, posteriormente, para 15:85 visando melhorar o tempo de retenção. Com a proporção 15:85, obteve-se tempo de retenção de 4,1 minutos e pico simétrico sem a presença de cauda, sendo adequado para os propósitos da pesquisa (**Figura 10**). Assim, essa fase móvel foi escolhida para realizar as demais análises.

Figura 10 – Representação do cromatograma da solução de isoniazida na concentração de 2 µg/ml em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 obtido por CLAE. Fase móvel constituída de metanol e fosfato 0,02 M na proporção 15:85 e coluna RP18 encapada Lichrocart® Purospher® Star (Merck, 250 x 4 mm, 5 µm)

Após a determinação do comprimento de onda de absorção máxima da isoniazida e da definição da fase móvel a ser utilizada nas análises por CLAE, iniciou-se o processo de validação do método analítico. O objetivo da validação é demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida (ANVISA, 2003). Assim, a validação do método analítico é importante, pois garante o sucesso da sua utilização e dos resultados obtidos a partir desses.

O processo de validação foi iniciado pela construção da curva de calibração e determinação de sua linearidade. A determinação da linearidade da curva de calibração foi realizada empregando-se a equação da reta ($y=bx+a$), o coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente de variação (CV%), na faixa de concentração de 0,25 a 100 µg/mL.

A relação entre um determinado parâmetro como concentração e sua resposta analítica é linear quando o valor de r da curva for superior a 0,99. O valor de r da curva indica que o método é linear no intervalo de concentração analisado (SOUZA, 2009).

Assim, esse método de análise demonstrou linearidade nas concentrações de 0,5 a 15 µg/mL, com coeficiente de variação (CV%) de 0,48% e coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,9999 (**Figura 11**).

A curva de calibração da isoniazida foi construída a partir de soluções diluídas em tampão fosfato salino 10 mM pH 7,4 ou água ultra pura (MilliQ®) nas concentrações de 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 15,0 µg/mL, em triplicata ($n=3$). As padronizações foram realizadas partindo-se de quantidades conhecidas de isoniazida obtidas a partir de uma solução estoque (1 mg/mL) (padronização externa). As leituras foram realizadas por CLAE e por espectrofotometria, no comprimento de onda de 260 nm.

A concentração (µg/mL) e valores de área do pico (**Figuras 11 e 12**) ou absorbância (**Figura 13**) obtidos foram relacionados em um gráfico para a obtenção da curva de calibração da isoniazida e submetidos a análise de regressão linear para obter-se a equação da reta que estão representadas nas **Figuras 11, 12 e 13**.

As curvas de calibração obtidas apresentaram coeficiente de variação (CV%) de 0,48% a 0,84% e coeficiente de correlação linear (r) igual ou superior a 0,9999 (**Tabela 5, Figuras 11, 12 e 13**), indicando linearidade dos dois métodos utilizados no intervalo das concentrações testadas, pois atende as exigências da ANVISA (2003), que considera uma relação linear quando o valor de r for superior a 0,99.

Figura 11 – Curva de calibração da isoniazida (0,5 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$) em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 obtida por CLAE. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de três determinações ($n=3$)

Figura 12 – Curva de calibração da isoniazida (0,5 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$) em água ultra pura (MilliQ®) obtida por CLAE. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de três determinações ($n=3$)

Figura 13 – Curva de calibração da isoniazida (0,5 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$) em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 obtida por espectrofotometria. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de três determinações ($n=3$)

Tabela 5 – Parâmetros utilizados para a elaboração da curva analítica da isoniazida em tampão fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 ou água ultra pura (MilliQ®) por CLAE e por espectrofotometria. Os resultados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de três determinações (n=3)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	CLAE						Espectrofotometria		
	PBS 10 mM pH 7,4			água ultra pura (MilliQ®)			PBS 10 mM pH 7,4		
	Área média	Desvio padrão	CV (%)	Área média	Desvio padrão	CV (%)	ABS média	Desvio padrão	CV (%)
0,5	14517	84	0,58	15362	279	1,82	0,018	0	0
0,75	21932	140	0,64	23462	150	0,64	0,024	0	0
1,0	30844	185	0,60	32961	222	0,67	0,032	0,001	3,57
2,0	59073	291	0,49	65628	240	0,37	0,066	0,001	0,88
5,0	154565	316	0,20	164265	933	0,57	0,153	0	0
10,0	314716	1053	0,33	333559	1932	0,58	0,300	0,003	0,96
15,0	469791	2540	0,54	497938	2015	0,40	0,452	0,001	0,34
Média			0,48			0,72			0,84

Os resultados referentes à avaliação da precisão e exatidão intra e inter-ensaio foram baseados na determinação de CV% e E% obtidos empregando-se as equações 1 e 2 do item **3.2.1.2.2** e estão relacionados nas **Tabelas 6, 7, 8 e 9**.

O processo de validação é importante para detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas que o método é capaz de fornecer resultados confiáveis. É necessário validar o método analítico em termos de precisão e exatidão, curva de calibração e linearidade (LIRA, 2007). A precisão de um método analítico é definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos entre as várias medidas efetuadas com a mesma amostra e pode ser expressa como a porcentagem do coeficiente de variação (CV%). A exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor de referência, ou seja, a relação entre o valor obtido e o valor teórico (ANVISA, 2003). A ANVISA (2003) recomenda que o CV% e o E% devem ser estabelecidos de acordo com os propósitos da pesquisa. Segundo Causon et al. (1997), os valores médios de CV% e E% não devem exceder 15%. Nessa pesquisa 10% é considerado como o limite máximo para CV% e E%. Assim, com os valores encontrados (**Tabelas 6, 7, 8**

e 9), que atendem os limites estabelecidos, foi possível validar os métodos analíticos para a quantificação da isoniazida.

Tabela 6 – Valores obtidos na avaliação da precisão (CV%) e exatidão (E%) intra-ensaio por CLAE (n=10)

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área média	Desvio padrão	CV (%)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	E (%)
PBS 10 mM pH 7,4	0,5	13991	107,2	0,77	0,543	8,54
	2,0	56429	762,84	1,35	1,98	-0,79
	15,0	444667	4907,78	1,10	15,17	1,14
Média				1,07		2,96
água ultra pura (MiliQ®)	0,5	15289	299,60	1,96	0,474	-5,13
	2,0	66244	642,85	0,97	2,00	0,21
	15,0	498841	4970,15	1,00	14,99	-0,06
Média				1,31		-1,66

Tabela 7 – Valores obtidos na avaliação da precisão (CV%) e exatidão (E%) intra-ensaio por espectrofotometria (n=10)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área média	Desvio padrão	CV (%)	Concentração obtida ($\mu\text{g/mL}$)	E (%)
0,5	0,0183	0,0005	2,64	0,48	-4,00
2,0	0,0667	0,0005	0,72	2,09	4,67
15,0	0,4532	0,00155	0,34	14,98	-0,16
Média			1,24		0,17

Tabela 8 – Valores obtidos na avaliação da precisão (CV%) e exatidão (E%) inter-ensaio por CLAE (n=5)

	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área média	Desvio padrão	CV (%)	Concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	E (%)
PBS 10 mM pH 7,4	0,5	13944	460,74	3,30	0,525	4,96
	2,0	56116	2058,99	3,67	1,96	-1,76
	15,0	437993	23486,39	5,36	15,00	-0,01
Média				4,11		1,06
água ultra pura (MiliQ®)	0,5	15634	482,57	3,09	0,481	-3,80
	2,0	65948	456,50	0,69	2,00	0,14
	15,0	498350	3468,40	0,70	15,03	0,17
Média				1,49		-1,16

Tabela 9 – Valores obtidos na avaliação da precisão (CV%) e exatidão (E%) inter-ensaio por espectrofotometria (n=3)

Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área média	Desvio padrão	CV (%)	Concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	E (%)
0,5	0,018	0,0012	6,67	0,49	-2,06
2,0	0,0644	0,0029	4,50	2,03	1,29
15,0	0,452	0,0054	1,19	14,95	-0,31
Média			4,12		-0,36

Os dois métodos (CLAE e espectrofotometria) utilizados nesse trabalho para a quantificação da isoniazida foram validados em termos de precisão e exatidão intra- e inter-ensaio, linearidade e curva de calibração. Entretanto, a CLAE foi selecionada para dar continuidade nesse estudo e ser utilizado nos ensaios de determinação da eficiência de encapsulação e nos estudos *in vitro* para avaliação do perfil de liberação. Isso porque a CLAE é um método analítico que apresenta alta sensibilidade, pequeno volume de amostra e alta seletividade para resolução de

misturas, sendo uma das técnicas mais utilizadas na separação, identificação e quantificação de fármacos (LIRA, 2007).

Considerando que o método analítico pode sofrer pequenas alterações nas condições analíticas é necessário avaliar a robustez do método, ou seja, avaliar a capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando a confiabilidade do mesmo durante seu uso (ANVISA, 2003). As variações nos parâmetros analisadas foram o fluxo da fase móvel, a variação na proporção da fase móvel e o meio de análise. Os resultados podem ser observados pela **Tabela 10**, onde é possível verificar que os valores de r obtidos foram superior a 0,99. Esses resultados indicam que a linearidade do método no intervalo testado não foi influenciada pelas variáveis estudadas. Assim o método satisfaz os requisitos necessários para avaliação da robustez.

Tabela 10 – Valores obtidos na avaliação da robustez para análise da isoniazida por CLAE

Parâmetros		r
Fluxo da fase móvel	0,8 mL/min	0,9997
	1,0 mL/min	0,9999
	1,2 mL/min	1
CV (%)		0,01
Proporção da fase móvel	13:87 MEOH:Na ₂ HPO ₄	0,9999
	15:85 MEOH:Na ₂ HPO ₄	1
	17:83 MEOH:Na ₂ HPO ₄	1
CV (%)		0,01
Meio de análise	PBS 10 mM pH 7,4	0,9999
	água ultra pura (MiliQ [®])	1
CV (%)		0,01

Durante o processo de validação do método analítico avaliou-se ainda a especificidade e seletividade, que é a habilidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas,

produtos de degradação e componentes da matriz, assegurando que a medida não é influenciada por substâncias interferentes. A análise quantitativa pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou adjuvantes e amostras não contaminadas, visando demonstrar que o resultado não é afetado por esses constituintes (ANVISA, 2003).

Os resultados obtidos para solução de isoniazida em meio contendo micropartículas inertes de quitosana (A e B) estão apresentados na **Tabela 11**. O método mostrou ser específico, demonstrando não ter interferência nas análises da matéria-prima utilizada na obtenção das micropartículas (quitosana A e B), visto que está dentro do limite preconizado pela ANVISA (2003) de 80 a 120% da concentração teórica.

Tabela 11 – Valores obtidos na avaliação da especificidade e seletividade da solução de isoniazida meio contendo micropartículas inertes de quitosana (n=3)

Tipo de quitosana	% em relação à concentração teórica
A	98,5 ± 0,79
B	97,82 ± 0,22

4.2 – Determinação da solubilidade do fármaco

Como os estudos de liberação visam quantificar o fármaco liberado a partir das micropartículas, é importante avaliar a solubilidade do fármaco no meio receptor utilizado nesses estudos de liberação.

O estabelecimento das condições experimentais é extremamente importante para garantir a veracidade dos resultados obtidos. A escolha do meio de dissolução deve ser criteriosa para garantir a solubilização completa do fármaco liberado à partir do sistema desenvolvido. O método exige ainda que as condições de "sink" sejam atendidas, ou seja, a concentração do fármaco liberado no meio de dissolução não deve exceder a 10 % da sua concentração de saturação nesse meio, por se tratar de um sistema fechado.

Conforme dados da literatura, a isoniazida, fármaco hidrossolúvel, apresenta elevada solubilidade em água (125 mg/mL à temperatura de 25 °C) (BECKER et al., 2007). Os resultados obtidos no experimento para determinar a solubilidade da isoniazida em tampão fosfato salino 10 mM pH 7,4 e para determinar as condições experimentais a serem utilizadas no estudo *in vitro* de liberação, confirmam esses dados e estão apresentados na **Tabela 12**. Pode-se verificar que o meio de dissolução utilizado (PBS) foi capaz de solubilizar o fármaco estudado.

Tabela 12 – Porcentagem de isoniazida dissolvida nos estudos de determinação da solubilidade em PBS 10 mM pH 7,4 por agitação magnética e dissolutor (n=3)

Tempo	% dissolvida		Concentração dissolvida (mg/mL)	
	Agitação magnética	dissolutor	Agitação magnética	dissolutor
24 horas	64,73 ± 11,47	78,75 ± 2,66	194,20 ± 34,4	0,039 ± 0,001
48 horas	65,82 ± 7,51	97,28 ± 2,66	197,47 ± 22,52	0,049 ± 0,001

* Agitação Magnética: 100% = 300 mg /mL; dissolutor: 100% = 0,05 mg/mL ou 50 ug/mL

4.3 – Preparação e avaliação das partículas obtidas por coacervação simples

A microencapsulação por coacervação simples ocorre pela precipitação do material polimérico ao redor do material a ser encapsulado. Isso ocorre através de mudança de temperatura, do solvente ou da adição de uma substância capaz de induzir a precipitação (FLORENCE; ATTWOOD, 2003a; SINHA et al., 2004)

Assim, com intuito de produzir micropartículas por coacervação simples, inicialmente determinou-se a concentração de sulfato de sódio necessária para precipitar o polímero. Os dados obtidos nas análises por turbidimetria, apresentados na **Figura 14**, mostram a relação entre a absorbância e a concentração de sulfato de sódio utilizada para os dois tipos de quitosana utilizadas, Polymar A e Polymar B (respectivamente A e B).

Os resultados permitiram estabelecer a concentração de sulfato de sódio a ser utilizada para a precipitação do polímero, ficando estabelecida a porcentagem de 0,6 para a quitosana A e 0,8 para a quitosana B. Esses resultados estão de acordo

com o encontrado por Lourenço (2006) que utilizou 0,8% de sulfato de sódio na solução de quitosana (0,25%).

Um dos fatores que influenciam a solubilidade da quitosana é a adição de sal, pois diminui as forças iônicas (repulsão) existentes entre as moléculas mudando a conformação da quitosana de estendida para espiral podendo levar a precipitação (efeito salting-out) (SINGLA; CHAWLA, 2001).

Figura 14 – Curva turbidimétrica do sulfato de sódio. A = quitosana polímero A, B = quitosana polímero B

Após o preparo das micropartículas, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura para avaliar a formação dessas micropartículas e sua morfologia. A lavagem das partículas se deu submetendo-as a 3 ciclos de centrifugação (2451g) por 30 minutos sendo o sobrenadante removido e substituído por água ultra pura (MilliQ®). Entretanto, não foi possível observar claramente a formação das micropartículas, visto que estas estavam recobertas por filme que não foi retirado através da lavagem.

Isso pode ser decorrente de aglomeração e não formação de micropartículas, uma vez que outros estudos relatam a necessidade de adicionar outras substâncias com a finalidade de evitar a formação de aglomerados e formação de partículas com parede rígida, recorrendo a utilização de tensoativos ou glutaraldeído. Porém, a vantagem desse processo é evitar o uso de substâncias tóxicas como solventes orgânicos e glutaraldeído para a obtenção de micropartículas (BERTHOLD; CREMER; KREUTER, 1996; LOURENÇO, 2006; SINHA et al., 2004;).

Dessa forma, essa análise indica que o método de coacervação simples não foi adequado para a obtenção desses sistemas (**Figuras 15 e 16**). Por esse motivo optou-se por outro método de obtenção de micropartículas, o spray-drying.

Figura 15 – Fotomicrografias das micropartículas inertes obtidas por coacervação simples, obtidas por MEV. Aumento de 10000X. (a) amostra A (quitosana polymar A); (b) amostra B (quitosana polymar B)

Figura 16 – Fotomicrografias das micropartículas contendo o fármaco obtidas por coacervação simples, obtidas por MEV. Aumento de 10000X. (a) amostra PACF (quitosana polymar A e com isoniazida); (b) amostra PBCF (quitosana polymar B e com isoniazida)

4.4 – Preparação e avaliação das micropartículas obtidas por spray-drying

O estudo morfológico é efetuado para determinação da forma das partículas. A forma esférica é desejável porque a esfera é uma forma regular que facilita o fluxo das partículas em meio líquido. Outra avaliação que deve ser feita quanto às micropartículas é o tamanho e sua distribuição de tamanho, uma vez que o estudo propõe o desenvolvimento de partículas de tamanho micrométrico para administração pulmonar (RICCI-JÚNIOR, 2005).

A morfologia das micropartículas obtidas por spray-drying foi avaliada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura. Através dessa análise foi possível observar a formação das micropartículas, indicando que a utilização do spray-drying como método de microencapsulação realmente possibilitou a formação desses sistemas (**Figuras 17 a 19**).

Essa análise revelou que as micropartículas obtidas são esféricas. Pelas figuras pode-se observar que as micropartículas com o fármaco encapsulado tiveram superfície lisa, o que não ocorreu com as micropartículas sem o fármaco.

Comportamento semelhante tem sido relatado na literatura. He, Davis e Illum (1999) obtiveram micropartículas de quitosana por spray-drying com morfologia semelhante, ou seja, quando famotidina estava presente as partículas apresentavam superfície lisa, ao passo que micropartículas sem o fármaco apresentaram superfície irregular. Martinac et al. (2005) quando prepararam micropartículas de quitosana por spray-drying observaram formação de partículas esféricas com superfície irregular e lisa para aquelas sem loratadina e aquelas com loratadina, respectivamente. Relatam ainda a presença de cristais do fármaco na superfície das micropartículas contendo o fármaco. Guerrero et al. (2010) também observaram a alteração da superfície das micropartículas de quitosana obtidas por spray-drying decorrente da presença do fármaco cetotifeno. Weerakody et al. (2008) prepararam micropartículas de quitosana com ácido lipóico por essa mesma técnica. As micropartículas com o ácido lipóico exibiram superfície lisa e sem o ácido lipóico a superfície era irregular. Esses estudos indicam que a incorporação do fármaco tem influência significativa na formação das micropartículas, podendo alterar a morfologia da sua superfície.

Segundo Martinac et al. (2005) e Vehring (2008), partículas obtidas por spray-drying podem apresentar essas diferenças na morfologia e superfície devido a evaporação, composição do solvente e constituintes usados no desenvolvimento das partículas.

Uma descrição detalhada desse processo na formação das partículas durante o spray-drying não foi encontrada, entretanto, estudos experimentais tem sido realizados para avaliar a evaporação e formação das partículas, sendo a razão entre taxa de evaporação e movimento difusional dos constituintes reconhecidamente importantes. Vários estudos mostram que a cinética de precipitação e cristalização afetam a taxa de evaporação, que é determinada pelas propriedades do soluto e do solvente e parâmetros do processo, influenciando a morfologia das partículas. Assim

as características dos constituintes da partícula podem influenciar a taxa de evaporação resultando na obtenção de partículas com morfologia irregular. Na literatura existem numerosos exemplos que se enquadram nessa categoria, como partículas de peptídeos, proteínas ou polímeros. Entretanto, a adição de fármaco pode alterar a taxa de evaporação e o movimento difusional dos constituintes e assim alterar a morfologia das partículas, com obtenção de partículas com superfície lisa (VEHRING, 2008).

Segundo Martinac et al. (2005) a obtenção de micropartículas com superfície irregular é devido ao “encolhimento” das micropartículas após a formação do envoltório que ocorre inicialmente no processo de evaporação, e a adição do fármaco impede que isso ocorra.

Figura 17 – Fotomicrografias das micropartículas inertes obtidas por spray-drying, obtidas por MEV. Aumento de 10000X. (a) amostra I (quitosana polymar A a 1%); (b) amostra III (quitosana polymar A a 2%); (c) amostra V (quitosana polymar B a 1%); (d) amostra VII (quitosana polymar B a 2%)

Figura 18 – Fotomicrografia do pó da isoniazida, obtida por MEV. Aumento de 5000X

Figura 19 – Fotomicrografias das micropartículas contendo o fármaco obtidas por spray-drying, obtidas por MEV. Aumento de 10000X. (a) amostra II (quitosana polymar A a 1% e contendo isoniazida); (b) amostra IV (quitosana polymar A a 2% e contendo isoniazida); (c) amostra VI (quitosana polymar B a 1% e contendo isoniazida); (d) amostra VIII (quitosana polymar B a 2% e contendo isoniazida)

O tamanho das micropartículas é um fator importante na velocidade de liberação do fármaco a partir delas, bem como no direcionamento para o sítio de ação quando o objetivo é a liberação pulmonar. As partículas maiores geralmente liberam compostos encapsulados mais lentamente e por um período de tempo maior, quando outras características como a massa molecular do polímero e a distribuição do fármaco pela partícula são similares (HE; DAVIS; ILLUM, 1999; MINARINI, 2006).

A análise do tamanho e distribuição de tamanho das micropartículas foi realizada por técnica de difração de laser. Os resultados da distribuição de tamanho das micropartículas inertes, preparadas com os dois tipos de quitosana polymar (A e B) e nas concentrações de 1 e 2%, referentes às amostras I, III, V e VII estão apresentados na **Tabela 13** e nas **Figuras 20, 21, 22 e 23**. Os resultados da distribuição de tamanho das micropartículas contendo isoniazida, preparadas com os dois tipos de quitosana polymar (A e B) e nas concentrações de 1 e 2%, referentes às amostras II, IV, VI e VIII estão apresentados na **Tabela 14** e nas **Figuras 24, 25, 26 e 27**.

Como pode ser observado nas figuras e nas tabelas, a distribuição de tamanho encontrada para as partículas foi ampla, porém com elevada porcentagem de tamanho menor que 10 μm . Além disso, a adição de isoniazida influenciou nos tamanho das micropartículas, promovendo o aumento do diâmetro das mesmas, o que está de acordo com outros estudos realizados. O mesmo comportamento foi observado por He, Davis e Illum (1999). Em seu estudo, os autores observaram que micropartículas de quitosana preparadas por spray-drying apresentaram aumento em seus tamanhos quando o fármaco foi adicionado e encapsulado, sugerindo que a incorporação de um fármaco pode influenciar a formação das micropartículas e suas características.

Guerrero et al. (2010) encontraram diferenças significativas no tamanho de partículas com fármaco encapsulado e sem ele quando prepararam micropartículas de quitosana contendo cetotifeno por spray-drying. A presença do fármaco aumentou o tamanho das micropartículas. Kosaraju, D'Ath e Lawrence (2006) também observaram que a adição de fármaco aumentou o tamanho das micropartículas obtidas por spray-drying. Nesse estudo, Kosaraju, D'Ath e Lawrence (2006) obtiveram micropartículas com distribuição de tamanho não uniforme, sugerindo que esse resultado pode ser explicado pelo efeito de agregação das

micropartículas e/ou partículas não encapsuladas, visto que esse perfil não é encontrado para micropartículas produzidas por esse método. Esse método proporciona a obtenção de micropartículas com distribuição de tamanho estreita, como encontrado por Manca et al. (2008), Martinac et al. (2005) e Ventura et al. (2008), entre outros.

O menor tamanho das partículas sem o fármaco em comparação àquelas contendo o fármaco pode estar relacionado à observação feita na análise morfológica por Martinac et al. (2005), ou seja, estar relacionada ao “encolhimento” das micropartículas após a formação do envoltório que ocorre inicialmente no processo de evaporação, ao passo que isso não ocorre quando o fármaco é adicionado. Entretanto, o tamanho pode também estar relacionado à viscosidade da solução, pois segundo He, Davis e Illum (1999) e Oliveira, Santana e Ré (2004) o tamanho médio das gotas atomizadas, geralmente, é proporcional à viscosidade do líquido e, de acordo com Lira et al. (2009) a adição do fármaco pode aumentar a viscosidade da dispersão resultando no aumento do tamanho da partículas.

Apesar dos valores de diâmetro médio obtidos estarem de acordo com dados publicados em outros estudos que utilizaram o mesmo método, a ampla distribuição de tamanho obtida não é desejável, pois a área superficial é um fator importante no perfil de liberação de fármacos. Portanto, para estarem adequados com os propósitos desta pesquisa, a administração pulmonar e direcionamento da ação da isoniazida, algumas alterações quanto à distribuição e ao tamanho das micropartículas devem ser efetuadas. Algumas variáveis deverão ser estudadas, como tamanho do bico atomizador, porém não foram realizadas devido aos problemas obtidos com o equipamento.

Pode ser observado ainda (**Figuras 23 e 25 e Tabelas 13 e 14**) que a adição de isoniazida não influenciou no tamanho das micropartículas desenvolvidas com 2 % de quitosana B, ou seja, não foi observado o aumento do seu tamanho. Esse comportamento pode ser decorrente de uma pequena taxa de encapsulação do fármaco, uma vez que, comparando com aquelas desenvolvidas com 1% de quitosana, que tem maior concentração de polímero, e conseqüentemente, maior viscosidade e maiores tamanhos de partículas (SINGLA; CHAWLA, 2001).

Dessa forma, seguiu as análises das micropartículas determinando a eficiência de encapsulação e cálculo do rendimento do processo mediante a pesagem da massa das partículas obtidas por spray-drying. Os valores para a

eficiência de encapsulação (EE%) e rendimento do processo para essas partículas encontram na **Tabela 15**. Pode-se observar pela **Tabela 15**, que as partículas desenvolvidas com quitosana B a 2% obtiveram menores valores de eficiência de encapsulação, confirmando a observação feita na determinação de seus tamanhos médios.

O valor de eficiência de encapsulação pode ser considerado elevado, levando-se em conta outros estudos com mesmas características. Entretanto, essa determinação considerou a quantidade total de fármaco na partícula devido a impossibilidade de separar o fármaco superficial e o encapsulado decorrente da alta solubilidade do fármaco e do polímero em meio aquoso.

As formulações tiveram um baixo rendimento de processo na faixa de 20 a 26%. Entretanto, esse comportamento também foi observado em outros estudos. Braga e Oliveira (2007) obtiveram baixo rendimento de processo (30%) quando prepararam micropartículas por spray-drying utilizando mesma temperatura de entrada e parâmetros semelhantes. Sugeriram que isso ocorre porque o pó é carregado pelo gás efluente e não coletado pelo ciclone, porém, nesse caso, o baixo rendimento observado em laboratório pode ser facilmente corrigido durante a transferência para escala industrial através do uso de sistemas de coleção mais eficientes.

Martinac et al. (2005) obtiveram rendimento na faixa de 30-54% quando prepararam micropartículas de quitosana por spray-drying, entretanto consideraram como um rendimento relativamente alto considerando o método empregado. Além disso, relataram que a perda durante esse processo é devido a adesão do pó na parede do ciclone, à pequena quantidade de material sólido e à perda das maiores e menores partículas pelo sistema de exaustão do aparato do spray-dryer. Observaram também que o rendimento do processo foi maior para as micropartículas sem o fármaco, entretanto, consideraram essa diferença foi insignificante, visto que o rendimento foi determinado principalmente pelas características tecnológicas do método empregado. Com esse resultado observado, as micropartículas preparadas com 2% de polímero, ou seja, que tiveram um aumento da proporção de sólidos, não foram utilizadas nos experimentos de liberação *in vitro*, pois essas formulações foram preparadas visando aumentar o rendimento do processo.

Figura 20 – Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra I (micropartícula inerte com quitosana polymar A a 1%) obtida por spray-drying

Figura 21 – Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra III (micropartícula inerte com quitosana polymar A a 2%) obtida por spray-drying

Figura 22 – Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra V (micropartícula inerte com quitosana polymar B a 1%) obtida por spray-drying

Figura 23 – Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra VII (micropartícula inerte com quitosana polymar B a 2%) obtida por spray-drying

Figura 24 – Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra II (micropartícula com quitosana polymar A a 1% e isoniazida) obtida por spray-drying

Figura 25 – Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra IV (micropartícula com quitosana polymar A a 2% e isoniazida) obtida por spray-drying

Figura 26 – Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra VI (micropartícula com quitosana polymar B a 1% e isoniazida) obtida por spray-drying

Figura 27 – Gráfico representativo da distribuição de tamanho de partículas referente à amostra VIII (micropartícula com quitosana polymar B a 2% e isoniazida) obtida por spray-drying

Tabela 13 – Tamanho de partículas (μm) e distribuição granulométrica (%) referentes às amostras I, III, V, e VII (micropartículas inertes obtidas por spray-drying)

Amostras	Diâmetro médio (μm)	Desvio padrão (μm)	Distribuição granulométrica (%)	
			< 1 μm	< 10 μm
I	5,734	3,838	5,96	84,6
III	5,741	4,229	5,32	85,3
V	7,554	6,313	4,62	74,3
VII	6,460	5,497	4,56	82,6

I = quitosana polymar A (1%), III = quitosana polymar A (2%), V = quitosana polymar B (1%), VII = quitosana polymar B (2%).

Tabela 14 – Tamanho de partículas (μm) e distribuição granulométrica (%) referentes às amostras II, IV, VI e VIII (micropartículas com isoniazida obtidas por spray-drying)

Amostras	Diâmetro médio (μm)	Desvio padrão (μm)	Distribuição granulométrica (%)	
			< 1 μm	< 10 μm
II	11,14	9,836	6,58	57,5
IV	11,54	9,279	6,11	53,1
VI	9,645	6,999	5,55	58,3
VIII	6,658	4,453	7,00	75,1

II = quitosana polymar A (1%) e contendo isoniazida, IV = quitosana polymar A (2%) e contendo isoniazida, VI = quitosana polymar B (1%) e contendo isoniazida, VIII = quitosana polymar B (2%) e contendo isoniazida.

Tabela 15 – Valores de rendimento de processo (R%) e eficiência de encapsulação (EE%) obtidos para as amostras I, III, V, e VII (micropartículas inertes obtidas por spray-drying) e às amostras II, IV, VI e VIII (micropartículas com isoniazida obtidas por spray-drying)

Composição (%)						
Amostras	Quitosana Polymar A	Quitosana Polymar B	Ácido acético	Isoniazida	R %	EE %
I	1	-	2	-	24,92	-
II	1	-	2	0,25	23,47	73,67
III	2	-	4	-	21,68	-
IV	2	-	4	0,5	20,87	70,20
V	-	1	2	-	25,95	-
VI	-	1	2	0,25	24,43	78,94
VII	-	2	4	-	26,02	-
VIII	-	2	4	0,5	23,55	67,97

A obtenção de micropartículas com carga positiva é de grande importância para o propósito dessa pesquisa, uma vez que carga positiva da quitosana é necessária para a interação com o muco e mucosa, que apresentam carga negativa,

e conseqüentemente, a bioadesão (HE; DAVIS; ILLUM, 1999; MARTINAC et al., 2005).

Dessa forma a determinação do potencial zeta das micropartículas obtidas por spray-drying foi realizada em água a 25 °C e os valores obtidos estão apresentados na **Tabela 16**. Todas as micropartículas preparadas apresentaram potencial zeta positivo, correspondendo ao esperado, pois essa característica tem sido demonstrada por outros autores em muitos estudos.

De acordo com Manca et al. (2008) e Martinac et al. (2005), o grupo amino da quitosana é o responsável pelo potencial zeta positivo. Martinac et al. (2005) relatam também em seu estudo que o fármaco superficial pode alterar o valor do potencial zeta determinado, assim como a isoniazida apresenta potencial zeta positivo, sua adição aumentou o potencial zeta, o que pode ser observado na **Tabela 16**. He, Davis e Illum (1999) também obtiveram resultados semelhantes quando caracterizaram micropartículas de quitosana obtidas por spray-drying.

Manca et al. (2008) também observaram em seu estudo sobre as micropartículas de quitosana contendo rifampicina produzidas pelo mesmo método de encapsulação que o aumento da quantidade de quitosana aumentou o valor do potencial zeta positivo. Os grupos amino da quitosana além de serem responsáveis pela carga positiva das micropartículas também são pela interação dos fármacos e outros componentes das micropartículas. Além disso, eles sugerem que os valores de potencial zeta são relacionados a quantidade de fármaco encapsulada nas partículas, sendo que o fármaco adsorvido na superfície da partícula pode influenciar a carga de superfície das partículas.

Tabela 16 – Potencial zeta referente às amostras I, III, V, e VII (micropartículas inertes) e II, IV, VI e VIII (micropartículas com isoniazida), obtidas por spray-drying

Amostras	Composição (%)				Potencial zeta
	Quitosana Polymar A	Quitosana Polymar B	Ácido acético	Isoniazida	
I	1	-	2	-	29,8 ± 6,32
II	1	-	2	0,25	39,1 ± 4,03
III	2	-	4	-	33,5 ± 6,70
IV	2	-	4	0,5	44,2 ± 3,28
V	-	1	2	-	31,3 ± 9,68
VI	-	1	2	0,25	45,2 ± 3,8
VII	-	2	4	-	29,9 ± 10,7
VIII	-	2	4	0,5	40,8 ± 5,56
ISN	-	-	-	-	41,4 ± 5,56

*ISN = isoniazida na forma livre.

A análise de raios-X fornece informações importantes quanto a cristalinidade do material em estudo e, conseqüentemente, possíveis alterações desses quando submetidos, por exemplo, a processos como spray-drying e microencapsulação.

Substâncias no estado sólido pode apresentar características cristalinas ou amorfas e, em alguns casos, ambos. Um cristal tem um arranjo ordenado das moléculas e átomos, mantidos em contato através interações não covalentes. Por outro lado, sólidos amorfos são caracterizadas por um estado aleatório (STULZER et al., 2009).

Os difratogramas do fármaco livre na forma como comercializado (ISN) e após ser submetido à secagem no spray-dryer (FSD) (**Figura 28**) demonstram que ambos possuem padrão cristalino com picos estreitos e bem definidos, característico da natureza cristalina do fármaco. Os ângulos 2θ do picos da isoniazida variaram entre 10° e 50° , estando de acordo com aqueles encontrados por Devi e Maji (2009) e Silva (2010). O processo de spray-drying aumentou a cristalinidade do fármaco, uma vez que quanto maior a intensidade do pico, mais espacialmente organizado as estruturas dos cristais do fármaco (SILVA, 2010).

Os difratogramas das quitosanas (**Figura 29**) mostraram que estas substâncias se encontram no estado amorfo, ou seja, não apresentam picos definidos o que é característico desses materiais (COUTO, 2010; STULZER et al., 2009).

Nos difratogramas das micropartículas (A e B 1%) (**Figuras 30, 31 e 32**) pode-se observar que a intensidade dos picos do fármaco diminuiu, sendo diferentes do fármaco. Segundo Stulzer et al. (2009), isso indica que o fármaco passou por uma transição de estado cristalino para amorfo, ou seja, foi parcialmente transformado em forma amorfa. Couto (2010) também observou esse comportamento relatando que houve uma progressiva amorfização. Assim, esses difratogramas sugerem a encapsulação da isoniazida e não uma perda de fármaco, uma vez que foi possível determinar a eficiência de encapsulação. Devi e Maji (2009) e Silva (2010) atribuíram isso a encapsulação da isoniazida nas micropartículas. Isso também pode ser confirmado quando comparamos os difratogramas das micropartículas com aqueles das misturas físicas (**Figuras 31 e 32**), que corresponderam a uma sobreposição dos difratogramas da quitosana e isoniazida, mostrando não ter perda do fármaco quando a quitosana está presente, sugerindo dessa forma amorfização devido imcroencapsulação.

Figura 28 – Padrão de difração de raios-X do pó do fármaco livre. ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer

Figura 29 – Padrão de difração de raios-X do pó da quitosana. Quit A = quitosana polymar A; Quit B= quitosana polymar B

Figura 30 – Padrão de difração de raios-X do pó das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida obtidas por spray-drying. A1% = quitosana polymar A; B1%= quitosana polymar B

Figura 31 – Padrão de difração de raios-X do pó das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida obtidas por spray-drying, da quitosana e mistura física de quitosana e isoniazida. A1% = micropartículas com quitosana polymer A; Quit A = quitosana polymer A; MF A= mistura física de quitosana polymer A e isoniazida

Figura 32 – Padrão de difração de raios-X do pó das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida obtidas por spray-drying, da quitosana e mistura física de quitosana e isoniazida. B1% = micropartículas com quitosana polymer B; Quit B = quitosana polymer B; MF B= mistura física de quitosana polymer B e isoniazida

Com o intuito de confirmar os dados da difração de raios-X e eficiência de encapsulação e caracterizar as micropartícula, a análise utilizando a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada.

Curvas termoanalíticas do fármaco exibiram pico endotérmico correspondente a fusão em 172,5 °C tanto para o fármaco livre na forma como comercializado (ISN) quanto após ser submetido à secagem no spray-dryer (FSD), indicando que o processo de spray-drying não alterou o comportamento térmico do fármaco (**Figura 33**). Essa curva está de acordo com as curvas encontradas em outros estudos da isoniazida. Silva (2010) obteve curvas endotérmicas de fusão similares com pico na faixa de 170 a 173 °C. Freire et al. (2009) relataram que a isoniazida exibiu uma curva endotérmica de fusão entre 171-178 °C. The Merck Index (1996) e Handbook of Anti-Tuberculosis Agents (2008) relatam que a isoniazida tem ponto de fusão a 171,4 °C.

As curvas termoanalíticas da quitosana (**Figuras 34 e 35**) não mostraram a presença de pico endotérmico. Lira et al. (2007) em análise de calorimetria da quitosana obteve curva semelhante e relatou ser característica de materiais amorfos. O mesmo aconteceu com as micropartículas (**Figuras 34, 35 e 36**) que exibiram curva termoanalíticas sem presença de pico da quitosana, sugerindo a encapsulação do fármaco que está na forma amorfa (BERTHOLD; CREMER; KREUTER, 1996). Stulzer et al. (2009) sugerem que isso pode acontecer devido interações do fármaco com o polímero ou possível formação de um sistema amorfo, como a encapsulação nas micropartículas. Entretanto, essa interação pode ser descartada, pois a mistura física mostrou curva com a presença do pico endotérmico de fusão no mesmo intervalo de temperatura (**Figuras 34 e 35**) e a encapsulação foi confirmada anteriormente em outros estudos. Além disso, Lira et al. (2007) relatam que a interação do fármaco com o polímero pode ser observada por um desvio no pico de fusão, o que não ocorreu nesse estudo.

Estes dados da análise de calorimetria confirmam os resultados de difração de raios-X e eficiência de encapsulação. Não foi possível observar interações entre o fármaco e polímero através desses estudos.

Figura 33 – Curvas termoanalíticas obtidas por DSC do fármaco livre. ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer

Figura 34 – Curvas termoanalíticas obtidas por DSC da quitosana, das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida, do fármaco livre e da mistura física de quitosana e isoniazida. Quit A = quitosana polymar A; A1% = micropartículas com quitosana polymar A, ISN= isoniazida e MF A= mistura física de quitosana polymar A e isoniazida

Figura 35 – Curvas termoanalíticas obtidas por DSC da quitosana, das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida, do fármaco livre e da mistura física de quitosana e isoniazida. Quit B = quitosana polymar B; B1% = micropartículas com quitosana polymar B, ISN= isoniazida e MF B= mistura física de quitosana polymar B e isoniazida

Figura 36 – Curvas termoanalíticas obtidas por DSC das micropartículas com quitosana a 1% e isoniazida. A1% = micropartículas com quitosana polymar A e isoniazida, B1% = micropartículas com quitosana polymar B e isoniazida

4.5 – Estudo *in vitro* do perfil de liberação do fármaco a partir do sistema microparticulado

Sistemas de liberação com quitosana vêm sendo explorados visando a obtenção de um perfil de liberação desejável e adequado com seus propósitos, uma vez que as micropartículas desse polímero podem modular a liberação de vários fármacos, bem como aumentar sua biodisponibilidade. Dessa forma, o estudo de liberação *in vitro* é de suma importância durante o desenvolvimento desse sistemas, pois fornece informações sobre a disponibilização do fármaco a partir dos sistemas de liberação, sendo considerados fundamentais na elaboração de novos veículos carreadores.

Considerando que a maioria dos fármacos está sujeita a alguma degradação química, principalmente em meio líquido, e a isoniazida é conhecida passível de sofrer hidrólise, estudos de estabilidade desse fármaco no meio receptor e condições utilizados nos estudos de liberação foram efetuados.

Com o intuito de verificar o comportamento do fármaco nas condições de temperatura, tempo e meio utilizados no estudo do perfil de liberação, a isoniazida como comercializada (ISN) e processada no spray-dryer (FSD) em PBS pH 7,4 foi submetida a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e monitorada por 24 horas. No decorrer desse tempo um perfil da quantificação do fármaco foi traçado (**Figuras 37 e 38**). Pode ser evidenciado através das **Figuras 37 e 38** que o fármaco não sofreu alteração na sua quantificação em função do tempo e temperatura utilizados no experimento. Com esses resultados, o estudo do perfil de liberação da isoniazida pode ser definido e realizado.

Figura 37 – Estudo *in vitro* da quantificação do fármaco livre em função do tempo na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS). ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer; C0/C= concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$) no tempo 0/ concentração ($\mu\text{g/mL}$) em determinado tempo (n=3)

Tabela 17 – Estudo *in vitro* da quantificação do fármaco livre em função do tempo na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) (n=3)

25 °C		Tempo (h)											
		0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	8	12	24	
ISN	1	0,99	1,00	1,00	1,03	1,04	1,13	0,99	1,00	0,99	1,00	1,00	
	C0/C	2	1,01	1,00	1,00	1,02	1,00	1,07	1,00	0,99	1,01	1,00	1,00
	3	1,00	0,99	1,00	0,96	1,01	1,02	1,01	0,99	1,01	1,03	1,01	
	média	1,00	0,99	1,00	1,00	1,02	1,07	1,00	0,99	1,00	1,01	1,00	
	desvio	0,01	0,02	0,00	0,04	0,02	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	CV%	1,19	1,78	0,2	3,72	2,04	5,09	1,30	0,69	1,12	1,49	0,82	
FSD	1	1,02	1,01	1,01	1,00	1,02	1,03	1,01	1,02	1,04	1,05	1,03	
	C0/C	2	1,01	1,01	1,01	1,02	1,02	1,01	1,02	1,02	1,05	1,02	1,04
	3	1,01	1,01	1,01	1,01	1,02	1,02	1,02	1,02	1,03	1,03	1,03	
	média	1,01	1,01	1,01	1,01	1,02	1,02	1,02	1,02	1,04	1,03	1,03	
	desvio	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	
	CV%	0,37	0,27	0,49	0,76	0,30	0,75	0,74	0,31	0,98	1,12	0,57	

*ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer; C0/C= concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$) no tempo 0/ concentração ($\mu\text{g/mL}$) em determinado tempo; CV%= coeficiente de variação.

Figura 38 – Estudo *in vitro* da quantificação do fármaco livre em função do tempo na temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS). ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer; C0/C= concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$) no tempo 0/ concentração ($\mu\text{g/mL}$) em determinado tempo (n=3)

Tabela 18 – Estudo *in vitro* da quantificação do fármaco livre em função do tempo na temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Meio de dissolução: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) (n=3)

37 °C		Tempo (h)											
		0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	8	12	24	
ISN	1	1,02	1,00	1,00	1,053	1,12	1,02	1,01	1,00	1,04	1,03	1,03	
	C0/C	2	0,99	1,00	1,01	1,02	1,09	1,02	1,00	1,01	1,04	1,05	1,06
	3	0,99	1,01	1,07	1,10	1,06	1,01	0,99	0,99	0,99	1,02	1,10	
	Média		1,00	1,00	1,03	1,05	1,08	1,02	1,00	1,00	1,02	1,03	1,06
	Desvio		0,02	0,01	0,04	0,04	0,03	0,00	0,01	0,01	0,03	0,01	0,03
	CV%		1,86	0,72	3,49	3,42	2,63	0,27	1,17	1,12	3,07	1,44	3,05
FSD	1	1,02	1,00	1,02	1,06	1,03	1,01	1,02	1,04	1,05	1,03	1,09	
	C0/C	2	1,01	1,01	1,01	1,03	1,09	1,02	1,04	1,03	1,03	1,06	1,06
	3	1,01	1,01	1,03	1,03	1,05	1,03	1,01	1,07	1,07	1,04	1,04	
	Média		1,01	1,00	1,02	1,04	1,05	1,02	1,02	1,05	1,05	1,04	1,06
	Desvio		0,00	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03
	CV%		0,40	0,59	1,00	1,24	2,94	1,10	1,44	1,79	1,75	1,47	2,45

*ISN= isoniazida como comercializada; FSD= isoniazida processada no spray-dryer; C0/C= concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$) no tempo 0/ concentração ($\mu\text{g/mL}$) em determinado tempo; CV%= coeficiente de variação.

O estudo do perfil de liberação da isoniazida foi realizado retirando-se alíquotas de 1 mL do meio nos tempos de 5; 15 e 30 minutos; 1; 2; 3; 4; 8; 12 e 24 horas. A porcentagem de isoniazida liberada determinada por CLAE foi utilizada para a construção do gráfico do perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir das micropartículas e do fármaco livre (**Figura 39**).

Pela **Figura 39** é possível observar que 100% do fármaco foi liberado no intervalo de 1 hora, mantendo essa concentração até 12 horas tanto para o fármaco como comercializado (ISN) quanto àquele submetido ao processo de spray-drying (FSD), indicando que o processo não teve influência no perfil de liberação da isoniazida. Esse comportamento não foi reproduzido para a isoniazida a partir das micropartículas (B 1%), que foi gradativamente aumentando até 1 hora (aproximadamente 88%), e após esse tempo a concentração quantificada foi diminuindo, indicando uma provável degradação do fármaco, uma vez que as condições de “sink” foram mantidas nesse estudo, ou seja, a concentração no meio receptor foi menor que 10% da solubilidade do fármaco.

O mesmo procedimento foi realizado com as micropartículas desenvolvidas com quitosana A 1%. O perfil obtido foi o mesmo (**Figura 39**), indicando que o tipo da quitosana (A ou B) não apresentou influencia nesse comportamento de liberação.

Assim, visando elucidar o perfil obtido com as micropartículas, outras análises foram realizadas para as amostras preparadas com quitosana B, uma vez que micropartículas com quitosana B apresentaram diâmetros menores e eficiência de encapsulação maior.

O estudo do perfil de liberação foi realizado com mistura física de fármaco e quitosana (B), que apresentou o mesmo comportamento das micropartículas, porém com liberação mais rápida (99% em 15 minutos). Como a proporção do polímero e fármaco na mistura física foi a mesma que nas micropartículas, esse perfil obtido com a mistura física indica que o processo de spray-drying não teve influência no perfil de liberação da isoniazida quando a quitosana estava presente.

Dessa forma, o meio receptor foi alterado, com intuito de verificar se o perfil de liberação seria reproduzido. Utilizando a água (pH 6,0) como meio receptor, observa-se que a liberação do fármaco livre e a partir da mistura física (quitosana B e isoniazida) chegou a 100% em 15 minutos e, a partir das micropartículas B1% aproximadamente 100% em 1 hora, sendo mantida assim até 24 horas de análise (**Figura 40**). Através desse estudo evidenciamos que a isoniazida tem uma liberação

a partir das micropartículas de quitosana rápida, atingindo sua concentração máxima em 1 hora.

Figura 39 – Gráfico representativo do perfil de liberação da isoniazida a partir das micropartículas de quitosana obtidas por spray-drying, da mistura física e do fármaco livre. ISN= isoniazida na forma livre como comercializada; FSD = isoniazida processada no spray-dryer; A1%= micropartícula de quitosana Polymar A a 1% e contendo isoniazida; B1%= micropartícula de quitosana polymar B a 1% e contendo isoniazida; MF B= mistura física de isoniazida e quitosana B. Meio receptor: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) (n=5)

Figura 40 – Gráfico representativo do perfil de liberação da isoniazida a partir das micropartículas de quitosana obtidas por spray-drying, da mistura física e do fármaco livre. ISN= isoniazida na forma livre; MF B= mistura física de isoniazida e quitosana polymar B; B1%= micropartícula de quitosana polymar B a 1% e contendo isoniazida. Meio receptor: água (n=3)

Tabela 19 – Estudo *in vitro* do perfil de liberação da isoniazida (ISN) a partir das micropartículas obtidas por spray-drying, da mistura física e do fármaco livre. Meio receptor: tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) ou água (H₂O) (n=5 para meio PBS e n=3 para meio água)

Meio receptor	Amostras	Tempo									
		5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	8 h	12 h	24 h
PBS	concentração média	3,23	4,08	4,58	4,84	4,82	4,37	4,26	3,04	1,96	0,94
	A1% desvio padrão	0,07	0,30	0,49	0,50	0,51	0,20	0,18	0,36	0,21	0,25
	% liberada	43,90	55,79	62,78	66,34	66,13	60	58,43	41,81	27,01	13,01
	CV%	2,18	7,4	10,73	10,44	10,58	4,69	4,23	11,76	11	26,20
	concentração média	5,41	6,45	6,89	6,92	6,57	6,05	5,55	4,44	2,97	0,76
	B1% desvio padrão	0,37	0,44	0,39	0,43	0,35	0,39	0,47	0,36	0,5	0,18
	% liberada	68,56	82,36	88,15	88,51	84,08	77,48	71,06	57	38,25	9,99
	CV%	6,84	6,82	5,65	6,22	5,33	6,42	8,57	8,13	17,09	23,56
H ₂ O	concentração média	5,73	7,28	7,57	7,8	8	8,01	8,04	8,08	8,03	8,04
	B1% desvio padrão	0,24	0,31	0,32	0,34	0,54	0,5	0,28	0,29	0,48	0,30
	% liberada	72,57	93	96,78	99,75	102,32	102,50	102,87	103,38	102,74	102,82
	CV%	4,23	4,23	4,24	4,39	6,76	6,24	3,50	3,61	5,99	3,79
	concentração média	9,24	10,00	10,13	10,19	10,09	10,20	10,18	10,20	10,24	10,22
	MFB desvio padrão	0,59	0,59	0,44	0,41	0,35	0,33	0,34	0,39	0,29	0,32
	% liberada	92,43	100,97	102,27	102,88	101,92	103,01	102,84	102,99	103,39	103,23
	CV%	6,44	5,93	4,33	3,99	3,51	3,25	3,33	3,80	2,88	3,09
	concentração média	8,74	9,97	9,92	9,99	10,03	10,09	10,23	10,09	10,17	10,15
	ISN desvio padrão	0,44	0,29	0,35	0,24	0,23	0,22	0,30	0,32	0,32	0,25
	% liberada	87,4	100,54	100,16	100,86	101,26	101,93	103,34	101,92	102,74	102,52
	CV%	5,02	2,88	3,49	2,37	2,28	2,20	2,90	3,18	3,14	2,49

* A1%= micropartícula com quitosana polymar A a 1% e isoniazida; B1%= micropartícula com quitosana polymar B a 1% e isoniazida; MFB= mistura física de isoniazida e quitosana polymar B; ISN= isoniazida na forma livre; CV%= coeficiente de variação. A concentração média é expressa como µg/mL.

A liberação do fármaco a partir de micropartículas de quitosana depende de vários fatores como a morfologia, tamanho de partículas e propriedades físico-químicas do fármaco e a liberação *in vitro* também depende do pH, da polaridade e presença de enzimas no meio de dissolução. A liberação do fármaco a partir de micropartículas de quitosana envolve três mecanismos diferentes: (a) liberação da a partir da superfície das partículas, (b) difusão através da matriz intumescida e (c) liberação devido à erosão do polímero (**Figura 41**). Na maioria dos casos, a liberação do fármaco segue mais de um tipo de mecanismo. No caso da liberação a partir da superfície, o fármaco adsorvido instantaneamente dissolve quando entra em contato com o meio dissolutor. Fármacos encapsulados nas camadas superficiais das partículas também segue esse mecanismo. Esse tipo de liberação leva a efeito “burst”. A liberação por difusão envolve três etapas: primeiro a água penetra nas micropartículas causando o intumescimento da matriz, depois, ocorre a conversão da matriz polimérica em matriz esponjosa de nominada “rybbery”, e o terceiro passo é a difusão do fármaco através dessa matriz. Nesse caso, a liberação é lenta no início e depois torna-se mais rápida (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004).

He, Davis e Illum (1999) observaram que a liberação de cimetidina a partir de microesferas de quitosana teve efeito “burst” nas fases iniciais de dissolução. A maior parte do fármaco foi liberada dentro de alguns minutos quando as partículas foram preparadas por spray-drying. Entretanto, no presente estudo não foi possível determinar a cinética de liberação do fármaco, pois a liberação ocorreu de forma muito rápida.

Figura 41 – Mecanismos de liberação de fármacos a partir de micropartículas (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004)

Esse perfil de liberação obtido é adequado aos propósitos dessa pesquisa, visto que essas micropartículas têm sido desenvolvidas nesse estudo visando uma futura administração pulmonar, como todo fármaco disponibilizado para ação em até 1 hora.

Considerando que as micropartículas entre em contato com o muco presente no pulmão, que tem pH 7,4, teoricamente, a liberação da isoniazida a partir das micropartículas ocorre dentro de uma hora e não sofre degradação nesse tempo, podendo assim exibir sua ação rapidamente. Além disso, em casos de tuberculose pulmonar onde existem lesões caseosas, fechadas, esse problema seria minimizado, uma vez que essas lesões se caracterizam por ter pH neutro ou ácido com pouca oferta de oxigênio e multiplicação do bacilo de forma lenta e intermitente, sendo responsáveis pelos bacilos persistentes que provocam recaídas e recidivas (MELO et al., 2009).

Outro aspecto a ser considerado é o valor de pH do tecido pulmonar. Segundo Effros e Chinard (1969) o valor de pH do tecido pulmonar é levemente ácido comparado com o pH sanguíneo, que foi determinado em seu estudo como pH $6,69 \pm 0,07$ quando o pH arterial está entre 7,38 e 7,43. Dessa forma, as micropartículas de quitosana não exibiriam os problemas observados nos estudos de liberação.

4.6 – Estudo da degradação da isoniazida por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Como a quantidade liberada de fármaco em tampão fosfato salino pH 7,4 foi gradativamente diminuindo após 1 hora, a análise por espectrometria de massa foi efetuada, visando determinar a causa desse comportamento que é de suma importância para essa pesquisa.

A espectrometria de massas é uma técnica bastante utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais de vários compostos, fornecendo a relação m/z (massa/carga) de íons que são gerados do composto por uma fonte de ionização, onde a massa do íon é relacionada a massa do composto (DAVIS; FREARSON, 1987).

As amostras coletadas da liberação que tiveram suas concentrações diminuídas, ou seja, apresentaram surgimento de segundo pico em CLAE (tempo de

retenção em 2,8 minutos) (**Figura 42**) foram selecionadas e separadas pelo mesmo método (CLAE). Essas amostras coletadas após separação foram analisadas por espectrometria de massa.

Guedes (2006) em análise cromatográfica da isoniazida também observou a presença de um pico com tempo de retenção menor do que ao da isoniazida descrevendo como o ácido isonicotínico.

O espectro de massa obtido está apresentado na **Figura 43**. Pode-se observar nesse espectro a presença de um pico intenso em 124 m/z , que foi atribuído ao ácido isonicotínico, que é um produto da hidrólise da isoniazida com massa molecular de 123,11 segundo The Merck Index (1996). Guedes (2006) também identificou o pico intenso em 124 m/z como sendo do ácido isonicotínico. Dessa forma, por essa análise foi possível determinar a massa do composto identificando-o como o ácido isonicotínico.

Isso confirma os dados teóricos que relatam que derivado amídico presente no ativo é muito mais estável que a maioria dos derivados de ácido carboxílico como ésteres ou cloretos de ácidos (ALLINGER et al., 1978). Por essa razão a estrutura não sofreu reação de hidrólise com PBS pH 7,4. Por outro lado, na presença de quitosana, a molécula sofreu reação de hidrólise, provavelmente pela polarização das ligações. A quitosana pode tornar mais efetivas as ligações de hidrogênio e por essa razão aumentar a carga residual positiva sobre o carbono carboxílico, tornando agora a reação de hidrólise possível (**Figura 44**).

Figura 42 – Representação dos cromatogramas obtidos por CLAE na liberação da isoniazida a partir das micropartículas (B1%) em tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) nos tempos (t) de 5 minutos, 8 horas, 12 horas e 24 horas de liberação. Tempo de corrida: 7 minutos

Figura 43 – Espectro de massa de alta resolução ESI-TOF do ácido isonicotínico em solução metanólica

Figura 44 – Reação de hidrólise da isoniazida, favorecida pela quitosana

O estudo de liberação da isoniazida pode ser explicado pela interação do fármaco (polar) com a quitosana (polar) no processo de dissolução que ocorre através de forças intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio, o que diminui graus de liberdade de rotação da ligação $C=O$ (sítio reacional) com o anel aromático e amida facilitando o ataque da OH^- do meio (pH 7,4), levando a hidrólise da isoniazida em pH 7,4, que tem como produto a hidrazina ($NH_2 - NH_2$) e ácido isonicotínico (**Figura 44**). O mesmo ocorre com a mistura física de quitosana e isoniazida. Entretanto, o perfil de liberação obtido para o fármaco (ISN e FSD) em PBS pH7,4 pode ser entendido, pois sem a quitosana a isoniazida encontra-se em equilíbrio químico da forma molecular e iônica (**Figura 45**) dificultando a hidrólise da amida, que ocorre apenas em pH elevados (hidrólise básica). No caso da liberação do fármaco em água (pH 6,0), o perfil obtido é explicado pelo pH do meio, uma vez que a hidrólise da isoniazida ocorre em pH básico.

Figura 45 – Reação de equilíbrio químico da forma molecular e iônica da isoniazida

5. Conclusões

5 – CONCLUSÕES

Com base nas metodologias selecionadas e nos resultados experimentais obtidos, concluímos que:

A técnica de coacervação simples não mostrou-se adequado para a obtenção dos sistemas pretendidos, mas o método desenvolvido utilizando a técnica de spray drying demonstrou que pode ser utilizado com sucesso porque resultou na obtenção das micropartículas com morfologia adequada além de bom rendimento de processo e eficiência de encapsulação. Adequações do método devem ser realizadas objetivando a redução do tamanho de partícula, considerando a via de administração pretendida.

O método analítico desenvolvido por CLAE para a quantificação da isoniazida mostrou-se adequado e confiável para as análises do fármaco livre e a partir das micropartículas, uma vez que apresentou linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão. O método utilizando a técnica de Espectrofotometria no UV foi validado mas não utilizado devido à menor sensibilidade.

As técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC), potencial zeta, tamanho e distribuição do tamanho das partículas pela técnica de difração de laser e difração de raios-X permitiram caracterizar as micropartículas. A caracterização físico-química mostrou que o fármaco manteve suas propriedades inalteradas após o processo de encapsulação, demonstrando que o método desenvolvido para sua obtenção foi adequado.

Os estudos de liberação *in vitro* mostraram que as micropartículas de quitosana obtidas por spray-drying foram capazes de modificar a liberação da isoniazida em comparação ao fármaco livre. Entretanto, apresentaram perfil de liberação rápido;

O estudo de espectrometria de massa identificou o produto de degradação da isoniazida quando associada a quitosana em tampão fosfato salino pH 7,4 formado a partir de 1 hora.

As micropartículas de quitosana obtidas podem ser consideradas sistemas promissores para otimização da terapia da tuberculose pelo direcionamento da isoniazida ao seu sítio de ação por via pulmonar, podendo minimizar problemas decorrentes do fármaco e longo tratamento, e assim melhorar a adesão do paciente. Adequações do método deverão ser estudadas e testadas considerando a via de administração pretendida

A realização de estudos *in vivo* será necessária para avaliar o comportamento dos sistemas desenvolvidos em condições fisiológicas reais e avaliar a biodisponibilidade e biodistribuição do fármaco no organismo.

Referências

REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S. A.; AMINABHAVI, T. M. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 96, p. 245-259, 2004.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 100, p. 5-28, 2004.

ALENCASTRE, J. B.; BENTLEY, M. V. L. B.; GARCIA, F. S.; MOROGAS, M.; VILADOT, J. L.; MARCHETTI, J. M. A study of the characteristics and *in vitro* permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 69-76, 2006.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. Reações de ácidos carboxílicos e seus derivados. In:_____. **Química orgânica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. p. 472-503.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. Sólidos perorais, cápsulas, comprimidos e sistemas de liberação controlada. In:_____. **Farmacotécnica – formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000. p. 236-250a

ANVISA. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=15132.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, p. 21–37, 2003

BECKER C.; DRESSMAN, J. B.; AMIDON, G. L.; JUNGINGER, H. E.; KOPP, S.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; STAVCHANSKY, S.; BARENDIS, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Isoniazid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 96, n. 3, p 522–531, 2007.

BERNKOP-SCHÜRCH, A.; KAST, C. E.; GUGGI, D. Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: thiomers/GSH systems. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 93, p. 95-103, 2003.

BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 17-25, 1996.

BRAGA, G. K.; OLIVEIRA, W. P. Manufacturing drug loaded chitosan microspheres by spray drying: development, characterization, and potential use in dentistry. **Drying Technology**, Washington, v. 25, p. 303–310, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Tuberculose. Brasil: Ministério da Saúde. 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527. Acesso em: 04 fev. 2011.

BURJAK, M.; BOGATAJ, M.; VELNAR, M.; GRABNAR, I.; MRHAR, A. The study of drug release from microspheres adhered on pig vesical mucosa. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 224, p. 123-130, 2001.

BUSZELLO, K.; MÜLLER, B. W. Emulsions as drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**. New York: Marcel Dekker, 2000. v. 105, p. 191-228.

CALLERI, E.; DE LORENZI, E.; FURLANETTO, S.; MASSOLINI, G.; CACCIALANZA, G. Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in a pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 29, p. 1089–1096, 2002.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analyses – viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHIEN, Y. W. Mucosal Drug Delivery: Potential routes for non invasive systemic administration. In: _____. **Novel drug delivery systems**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1992. v. 50, p. 197-228.

COUTO, W. F. **Complexo de dendrímeros e ciclodextrinas com aplicação farmacêutica: síntese e caracterização**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

DAVIS, R.; FREARSON, M. Introduction. In: _____. **Mass spectrometry**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 1-23.

DEVI, N.; MAJI, T. K. Preparation and Evaluation of Gelatin/Sodium Carboxymethyl Cellulose Polyelectrolyte Complex Microparticles for Controlled Delivery of Isoniazid **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 10, n. 4, p. 1412-1419, 2009.

DU TOIT, L. C.; PILLAY, V.; DANCKWERTS, M. P. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. **Respiratory Research**, London, v. 7, p. 1-18, 2006.

DUTT, M.; KHULLER, G. K. Sustained release of isoniazid from a single injectable dose of poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles as a therapeutic approach towards tuberculosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, p. 115-122, 2001.

EFFROS, R. M.; CHINARD, F. P. The in vivo pH of the extravascular space of the lung. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 48, p. 1983-1996, 1969.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Polímeros e macromoléculas. In:_____. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. p. 413-491, 2003a.

_____. Absorção e vias de administração de drogas. In:_____. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. p. 493-586, 2003b.

_____. Estabilidade de drogas. In:_____. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, p. 155-218, 2003c.

FRANCO E SILVA, F. C.; SANTORO, M. I. R. M. Determinação da isoniazida e rifampicina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 37, p. 52, 2001.

FREIRE, F. D.; ARAGÃO, C. F. S.; LIMA e MOURA, T. F. A.; RAFFIN, F. N. Thermal studies of isoniazid and mixtures with rifampicin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, p. 333–336, 2009.

GUEDES, A. A. **Atividade catalítica de metaloporfirinas na oxidação de hidrocarbonetos e do fármaco antituberculose isoniazida**. 2006. 204 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

GUERRERO, S.; TEIJÓN, C.; MUÑIZ, E.; TEIJÓN, J. M.; BLANCO, M. D. Characterization and in vivo evaluation of ketotifen-loaded chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1006-1013, 2010.

HANDBOOK of anti-tuberculosis agents. Isoniazid. **Tuberculosis** (Edinburg), Edinburg, v 88, n 2, p. 112–116, 2008.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 187, p. 53-65, 1999.

HERYANTO, R.; HASAN, M.; ABDULLAH, E. C. Solubility of isoniazid in various organic solvents from (301 to 313) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 53, n. 8, p. 1962–1964, 2008.

HUANG, Y. -C.; CHIANG, C. -H.; YEH, M. -K. Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying method. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 20, n. 2, p. 247–260, 2003.

HUSSAIN, A.; ARNOLD, J. J.; KHAN, M. A.; AHSAN, F. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 94, p. 15-24, 2004.

JOSHI, A.; PUND, S.; NIVSARKAR, M.; VASU, K.; SHISHOO, C. Dissolution test for site-specific release isoniazid pellets in USP apparatus 3 (reciprocating cylinder): Optimization using response surface methodology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 69, p. 769–775, 2008.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Tuberculostáticos e hansenostáticos. In:_____. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 560-574.

KOSARAJU, S.L.; D'ATH, L.; LAWRENCE, A. Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 163-167, 2006.

LAGARCE, F.; RENAUD, P.; NICOLAS, G.; RICHARD, J.; MENEI, P.; BENOIT, J. Baclofen loaded microspheres: preparation and efficacy testing in a new rabbit model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 59, p. 449-459, 2005.

LEAROYD, T. P.; BURROWS, J. L.; FRENCH, E.; SEVILLE, P. C. Chitosan-based spray-dried respirable powders for sustained delivery of terbutaline sulfate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 68, p. 224–234, 2008.

LEE, J.; CHO, E. C.; CHO, K. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 94, p. 323– 335, 2004.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para a veiculação de ácido retinóico na pele**. 2007. 142 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

LIRA, A. A. M.; NANCLARES, D. M. A.; FEDERMAN NETO, A.; MARCHETTI, J. M. Drug-polymer interaction in the all-trans retinoic acid release from chitosan microparticles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, 899–903, 2007.

LIRA, A. A. M.; ROSSETTI, F. C.; NANCLARES, D. M. A.; FEDERMAN NETO, A.; BENTLEY, M. V. L. B.; MARCHETTI, J. M. Preparation and characterization of chitosan-treated alginate microparticles incorporating all-trans retinoic acid. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 26, n. 3, p. 243-250, 2009.

LOURENÇO, V. A. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de dimetilaminoetanol (DMAE) na pele**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

LUCINDA-SILVA, R; M.; EVANGELISTA, R. C. Microspheres of alginate-chitosan containing isoniazid. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 20, n. 2, p 145–152, 2003.

MAGDASSI, S.; VINETSKY, Y. Microencapsulation of oil-in-water emulsions by proteins. In: BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**, New york: Marcel Dekker, 1996. v. 73, p. 21-33.

MANCA, M-L.; MOURTAS, S.; DRACOPOULOS, V.; FADDA, A. M.; ANTIMISIARIS, S. G. PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery? A comparative study of particle stability during nebulization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, p. 220–231, 2008.

MARCHETTI, J. M.; SARAIVA, J. Sistemas de liberação: Estratégias para medicamentos eficazes. In: STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 72-95.

MARTINAC, A.; FILIPOVIĆ-GRČIĆ, J.; VOINOVICH, D.; PERISSUTTI, B.; FRANCESCHINIS, E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 29, p. 69-77, 2005.

MELO, F. A. F.; SAVIOLI, M. T. G.; RODRIGUES, D. S.; KATZ, M. H.; ALMEIDA, E.A.; DUARTE, H. Tuberculose. In: LOPES, A. C. **Tratado de clínica médica**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2009. v. 2, p. 2659-2684.

MINARINI, P. R. R. **Desenvolvimento de micropartículas poliméricas carreando um análogo sintético de neoglicana para uso na terapia da tuberculose**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MOHAN, B.; SHARDA, N.; SINGH, S. Evaluation of the recently reported USP gradient HPLC method for analysis of anti-tuberculosis drugs for its ability to resolve degradation products of rifampicin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 31, p. 607-612, 2003.

NG, K. -Y.; ZHOU, H.; ZHANG, Y. L.; HYBERTSON, B.; RANDOLPH, T.; CHRISTIANS, U. Quantification of isoniazid and acetylisoniazid in rat plasma and alveolar macrophages by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with on-line extraction. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 847, p. 188–198, 2007.

OLIVEIRA, B. F.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. In: INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM (IDS 2004), 14., 2004, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 2004. v. 8, p. 1166-1173.

PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; PENICHE, H.; ACOSTA, N. Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 3, p. 511-520, 2003.

PIMENTEL, L. F.; JÁCOME JR., A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007.

PRABAHARAN, M.; MANO, J. F. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. **Drug Delivery**, Philadelphia, v. 12, p. 41–57, 2005.

RANDO, D. G.; BRANDT, C. A.; FERREIRA, E. I. Use of *N*-methylene phosphonic chitosan to obtain an isoniazid prodrug. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 335-344, 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Agentes antibacterianos. In: _____. **Farmacologia**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 572-592.

RASTOGI, R.; SULTANA, Y.; AQIL, M.; ALI, A.; KUMAR, S.; CHUTTANI, K.; MISHRA, A. K. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 334, p. 71–77, 2007.

RICCI-JÚNIOR, E. **Micropartículas de ácido poli (D,L láctico-co-glicólico) contendo zinco (II) ftalocianina para uso na terapia fotodinâmica**. 2005. 114 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

RICCI-JÚNIOR, E.; MARCHETTI, J. M. Preparation, characterization, photocytotoxicity assay of PLGA nanoparticles containing zinc (II) phtalocyanine for photodynamic therapy use. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 23, n. 5, p. 523-538, 2006a.

_____. Zinc (II) phtalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 310, p. 187-195, 2006b.

RICCI-JÚNIOR, E.; LUNARDI, L. O.; NANCLARES, D. M. A.; MARCHETTI, J. M. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 288, p. 235-244, 2005.

SALAMAT-MILLER, N.; JOHNSTON, T. P. Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 294, p. 201-216, 2005.

SHARMA, R.; MUTTIL, P.; YADAV, A. B.; RATH, S. K.; BAJPAI, V. K.; MANI, U.; MISRA, A. Uptake of inhalable microparticles affects defence responses of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, p. 499–506, 2007.

SHI, X-Y.; TAN, T-W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of vitamin D₂. **Biomaterials**, Guildford, v. 23, p. 4469-4473, 2002.

SILVA, A. M. **Estudo para o desenvolvimento de comprimidos dose fixa combinada (DFC) 3 em 1 para o tratamento da tuberculose**. 2001. 156 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 53, p. 1047–1067, 2001.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 274, p. 1-33, 2004.

SOUZA, M. C. **Microencapsulação do sulfóxido do albendazol: uma estratégia para a otimização da terapia das parasitoses**. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Basics of separation. In: _____. **Practical HPLC method development**, 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 21-58.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; PARIZE, A. L.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M.C.M. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 387–392, 2009.

SUNG, J. C.; PULLIAM, B. L.; EDWARDS, D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 25, n. 12, p. 563-570, 2007.

TAYLOR, K. Liberação pulmonar de fármacos. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 478-493.

THANOU, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 52, p. 117-126, 2001.

THE MERCK INDEX: An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12. ed. New Jersey: Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, 1996. p. 885-886.

TSAPIS, N.; BENNETT, D.; O'DRISCOLL, K.; SHEA, K.; LIPP, M. M.; FU, K.; CLARKE, R. W.; DEEVER, D.; YAMINS, D.; WRIGHT, J.; PELOQUIN, C. A.; WEITZ, D. A.; EDWARDS, D. A. Direct lung delivery of para-aminosalicylic acid by aerosol particles. **Tuberculosis**, Montevideo, v. 83, p. 379–385, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP), 19. ed. Easton: Mack Printing Company, 1975. p. 272-273, 442.

VENTURA, C. A.; TOMMASINI, S.; CRUPI, E.; GIANNONE, I.; CARDILE, V.; MUSUMECI, T.; PUGLISI, G. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: interaction with biomembrane models and in vitro permeation studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 68, p. 235-244, 2008.

VEHRING, R. Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 25, n. 5, p. 999-1022, 2008.

WEERAKODY, R.; FAGAN, P.; KOSARAJU, S. L. Chitosan microspheres for encapsulation of α -lipoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 357, p. 213-218, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Tuberculosis Control 2010**. Geneva: WHO, 2010. 207 p.

YANG, W.; PETERS, J. I.; WILLIAMS III, R. O. Inhaled nanoparticles - a current review. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 356, n. 1, p. 239-247, 2008.

ZARU, M.; MOURTAS, S.; KLEPETSANIS, P.; FADDA, A. M.; ANTIMISIARIS, S. G. Liposomes for drug delivery to the lungs by nebulization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart v. 67, p. 655–666, 2007.

ZHOU, H.; ZHANG, Y.; BIGGS, D. L.; MANNING, M. C.; RANDOLPH, T. W.; CHRISTIANS, U.; HYBERTSON, B. M.; NG, K-Y. Microparticle-based lung delivery of INH decreases INH metabolism and targets alveolar macrophages. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 107, p. 288-299, 2005.