UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados

Katyana França Bonini Camilo

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados

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

Área de concentração: Medicamentos
e Cosméticos.

Orientada: Katyana França Bonini Camilo

Orientador: Prof.Dr.Osvaldo de Freitas

Ribeirão Preto
2007

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

Camilo, Katyana França Bonini

Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados.
Ribeirão Preto, 2007.
147 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Freitas, Osvaldo de

1. Pectina. 2. Caseína. 3. Microencapsulação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Katyana França Bonini Camilo

Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados

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

Área de concentração: Medicamentos
e Cosméticos.

Orientador: Prof.Dr.Osvaldo de Freitas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.

Dr

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus

*Por não me abandonar nos momentos difíceis e por
ter permitido que eu chegasse até aqui*

Ao meu marido Marden

*A sua presença em minha vida, me
proporcionou confiança e segurança.*

*Agradeço sua dedicação e estímulo
me ajudando a alcançar mais um
objetivo.*

Te amo muito.

Ao Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Um agradecimento especial, àquele que com sua simplicidade e sabedoria teve talento para transmitir seus ensinamentos e experiências.

Sua orientação e apoio foram os estímulos para a concretização desta conquista.

Meu muito obrigado.

As amigas Flávia e Bruna

*Sem a ajuda, o incentivo e a dedicação de vocês,
talvez eu não tivesse vencido esta etapa.*

As alegrias de hoje também são suas.

Obrigada

Agradecimentos

A minha Mãe que abriu para mim os caminhos da pesquisa incentivando-me a prosseguir nesta jornada, fossem quais fossem os obstáculos, agradeço esta conquista com profunda admiração.

A minha tia Rosane, minha gratidão pela ajuda, dedicação e carinho que contribuíram para a finalização deste trabalho.

Aos colegas, Camila Fracalossi, Camila Areda e Alessandra, minha gratidão pelo afeto, paciência e esforço ou mesmo o simples convívio que me levaram a concluir este trabalho.

Aos Srs. José Maria Puga e José Orestes pela colaboração nas atividades laboratoriais.

Ao Rod que, com carinho, esteve sempre por perto me auxiliando com muita sabedoria.

Aos amigos Vânia, Marise, Marilisa, Maria, Nilva, João Carlos, Maçao, Robison, Carlos, Adriana pelas palavras de incentivo e pelo apoio em todos os momentos

Aos demais colegas da UNAERP pela amizade e compreensão em todos os momentos

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP meu muito obrigado pelas informações e orientações sempre precisas.

RESUMO

CAMILO KATYANA, F.B. **Complexo pectina/caseína: aspectos básicos e aplicados.** 2007. p 147. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Os sistemas de liberação de fármacos são parte integrante da investigação farmacêutica. Grande ênfase tem sido dada à utilização de polímeros hidrofílicos naturais como carreadores devido às vantagens inerentes a seu baixo custo, biocompatibilidade e segurança de uso. Os objetivos principais deste trabalho foram a preparação e avaliação de sistemas microparticulados a base de pectina e caseína e o estudo da liberação *in vitro* do aciclovir contido nas micropartículas. Esses sistemas visam uma liberação prolongada do fármaco aumentando sua biodisponibilidade oral. O efeito de parâmetros como pH, força iônica, viscosidade, proporção e concentração total de polímeros foi avaliado. A melhor condição para ocorrência da coacervação foi determinada por mobilidade eletroforética, rendimento do coacervado e microscopia ótica. A pectina e a caseína podem interagir formando complexos insolúveis. A formação do complexo coacervado foi espontânea e ocorreu em condições brandas no intervalo de pH em que os polímeros encontram-se carregados com cargas opostas. As dispersões foram secas em *Spray dryer*, resultando em partículas bastante pequenas ($\geq 6\mu\text{m}$) e homogêneas. Através da microscopia ótica foi possível observar que o fármaco se encontrava no interior das micropartículas. O pH (4,0-5,0) do meio influenciou decididamente a formação dos complexos coacervados, e a melhor relação mássica para o par pectina/caseína foi 1:1. Proporções superiores ou inferiores reduziram significativamente a extensão da coacervação. O aumento no teor de sólidos totais (4-8% p/v) bem como a adição de sal (0-120 mMol) não suprimiu a formação ou a estabilidade do sistema. Foram preparadas matrizes hidrofílicas contendo as micropartículas encapsuladas com aciclovir. O estudo de dissolução *in vitro* demonstrou que a liberação do aciclovir foi mais lenta nos sistemas matriciais e microparticulados do que a do fármaco livre. Entretanto, as matrizes apresentaram perfis de liberação sustentada mais adequados do que os sistemas microparticulados.

Palavras chaves: Pectina; caseína; microencapsulação; coacervação

ABSTRACT

CAMILO KATYANA, F.B. **Pectin/casein complex: basic and functional aspects.** 2007. p 147. Thesis (PhD). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Drug delivery systems became an integral part of pharmaceutical research. The use of natural hydrophilic polymers as drug carriers has received considerable attention in the last few years, especially from the viewpoint of cost, environmental concerns and safety. The main purpose of this study was to report and discuss the preparation of a microparticulate system by mixing the negatively charged pectin and the amphoteric casein and also the *in vitro* evaluation of polymeric microparticulate systems loaded with acyclovir. Such drug delivery system was conceived to prolong the therapeutic activity of acyclovir and increase its oral bioavailability. The influence of pH, total biopolymers concentration, viscosity of dispersions, pectin/casein ratio and ionic strength were reported. Zeta potential measurements and dry coacervate yield were used to determine the optimal conditions for complex coacervation and were supplemented by optical microscopy. Pectin/casein in aqueous mixture may interact and form insoluble complexes. The complex formation was spontaneous and occurs under mild conditions. The phenomenon of complex coacervation mainly occurs at a pH range when both polyelectrolytes carry opposite charges. Microparticulate preparations were spray dried and results showed that the microparticles obtained were always quite small, the diameters of 80% of the particles did not exceed 6µm, and physicochemical characterization showed that the drug was homogeneously dispersed inside the microparticles. Pectin/casein ratio and pH range were found to mainly affect the microparticles formation and encapsulation efficiency. The complex coacervation was dependent on pH (4,0-5,0) and the optimum pectin/casein ratio was 1:1. Superior or inferior proportion significantly decreased the coacervate yield. Increasing in total biopolymer concentration (4-8% w/v) and salt addition (0-120 mMol) did not inhibit the formation and stability of pectin/casein systems. Hydrophilic matrices containing acyclovir loaded microparticles were also prepared. The *in vitro* dissolution profile of acyclovir from the microparticulate systems and matrices were slower than that for the free drug. However, the sustained release characteristic was more prominent in matrices than in microparticles formulations.

Keywords: Pectin; casein; microencapsulation; coacervation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfis hipotéticos de concentrações de um fármaco na circulação sistêmica, resultantes da administração de uma forma farmacêutica convencional (a) e de uma forma farmacêutica de liberação controlada (b).	04
Figura 2. Representação esquemática da estrutura obtida nos processos de microencapsulação. Microesfera (matricial); Microcápsula (reservatório).	08
Figura 3. Representação esquemática do comportamento de dispersões aquosa de misturas de polissacarídeos e proteínas.	19
Figura 4. Representação esquemática do fenômeno de separação de fases classificado como coacervação complexa.	20
Figura 5. Curva padrão do aciclovir em meio ácido (HCl 0,1 M).	53
Figura 6. Curva padrão do aciclovir em tampão fosfato pH $6,8 \pm 0,1$.	55
Figura 7. Curva padrão do aciclovir em tampão fosfato isotônico pH $7,4 \pm 0,1$.	56
Figura 8. Medidas do potencial zeta das dispersões aquosas de pectina após ajuste em vários pHs.	59
Figura 9. Medidas do potencial zeta das dispersões aquosas de caseína após ajuste em vários pHs.	60
Figura 10. Perfis de mobilidade eletroforética em função do pH para as dispersões aquosas de pectina (—○—), caseína (—□—).	62
Figura 11. Fotomicrografias representativa das dispersões de pectina/caseína (1:1) <i>in natura</i> em vários pHs.	67
Figura 12. Fotomicrografias das dispersões de pectina/caseína <i>in natura</i> com diferentes teores de sólidos totais.	72
Figura 13. Fotomicrografias dos sistemas organizados contendo partícula líquida. A (pH 8,0), B (pH 3,5).	73
Figura 14. Viscosidade das dispersões de pectina/caseína em vários pHs.	77
Figura 15. Influência do pH e do teor de sólidos na complexação.	78

Figura 16a. Influência da relação pectina/caseína na obtenção dos sistemas.	82
Figura 16b. Influência da relação pectina/caseína na obtenção dos sistemas.	83
Figura 17. O efeito da força iônica na extensão da coacervação.	85
Figura 18. Fotomicrografia das micropartículas inertes, secas em <i>spray dryer</i> e ressuspensas em água destilada.	86
Figura 19. Fotomicrografias das micropartículas inertes, secas em <i>spray dryer</i> e ressuspensas em soluções aquosas contendo diferentes concentrações de NaCl.	87
Figura 20. Fotomicrografias das micropartículas inertes, secas em <i>spray dryer</i> e ressuspensas em HCL 0,1M (a) e tampão fosfato 0,2 M (b).	88
Figura 21. Perfil granulométrico das micropartículas inertes pH 8,0 (A) e pH 4,8 (B).	90
Figura 22. Esfericidade das micropartículas inertes em pH 8,0 (A) e pH 4,8 (B).	91
Figura 23. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas inertes (6%), em pH 8,0, pH 4,8.	92
Figura 24. Fotomicrografias dos cristais de aciclovir, (A) obtido do fabricante (B) “micronizado” em moinho de bola.	93
Figura 25. Fotomicrografias das micropartículas carregadas. Micropartículas <i>in natura</i> com aciclovir preparadas no primeiro método (MCP1).	98
Figura 26. Fotomicrografias das micropartículas carregadas. Micropartículas <i>in natura</i> com aciclovir preparadas no segundo método (MCP2).	99
Figura 27. Fotomicrografias das micropartículas carregadas. Micropartículas <i>in natura</i> com aciclovir preparadas no terceiro método (MCP3).	100
Figura 28. Fotomicrografias das micropartículas carregadas. Micropartículas <i>in natura</i> com aciclovir preparadas no quarto método (MCP4).	101
Figura 29. Fotomicrografia das micropartículas carregadas, secas em <i>spray dryer</i> , e ressuspensas em água destilada.	102
Figura 30. Fotomicrografia representativa das micropartículas (MCP4 60%) após extração exaustiva em meio ácido.	105
Figura 31. Perfis de liberação do fármaco contido nas micropartículas, em meio ácido.	107

Figura 32. Perfis de liberação do fármaco contido nas micropartículas (MCP4 60% e MCP4Q 60%) em meio ácido.	111
Figura 33. Perfis de liberação do aciclovir contido nas matrizes, em meio ácido HCl 0,1M (2h) e após a adição de tampão fosfato de sódio tribásico 0,2 M (10h).	114
Figura 34. Perfis de captação de água (intumescimento) e de erosão das matrizes. (A) - matrizes obtidas a partir das micropartículas (MCP4 60%), (B) - matrizes obtidas a partir da mistura física (MF).	118
Figura 35. Perfis de liberação do aciclovir contido nas dispersões de micropartículas (MCP4 60% e MCP4Q 60%).	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas obtidos à partir de proteína/polissacarídeos, parâmetros estudados.	22
Tabela 2. Aplicação da Microencapsulação em diversos setores.	23
Tabela 3. Solubilidade do aciclovir em diferentes meios de dissolução.	52
Tabela 4. Parâmetros analíticos avaliados na padronização de metodologia em meio ácido.	54
Tabela 5. Parâmetros analíticos avaliados na padronização de metodologia em tampão fosfato 0,2 M pH 6,8.	55
Tabela 6. Parâmetros analíticos avaliados na padronização de metodologia em tampão fosfato isotônico pH 7,4.	57
Tabela 7. Correlação entre os valores de mobilidade eletroforética (potencial zeta) e de rendimento do coacervado seco, nas formulações contendo 6% p/v de sólidos totais.	1
Tabela 8. Determinação do rendimento e da recuperação do fármaco das micropartículas secas em <i>spray dryer</i> .	03
Tabela 9. Determinação e comparação da recuperação do fármaco das micropartículas <i>in natura</i> sem e após revestimento com quitosana, e das micropartículas revestidas secas em <i>spray dryer</i> .	10
Tabela 10. Características de liberação do aciclovir nas matrizes.	20

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistemas de liberação de modificada – considerações gerais	1
1.2. Sistemas de microencapsulação de fármacos	5
1.3. Propriedades dos polímeros utilizados na obtenção das micropartículas	10
1.3.1. Pectina	10
1.3.2. Caseína	13
1.3.3. Quitosana	15
1.4. Interações entre proteína e polissacarídeo	18
1.4.1. Coacervação complexa: principais parâmetros que influenciam a formação do complexo proteína/polissacarídeo	20
1.4.2. Coacervação complexa: principais aplicações	23
1.5. Aciclovir	24
2. OBJETIVO	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL	29
3.1. Matérias-primas	29
3.2. Equipamentos	29
4. METODOLOGIA	31
4.1. Caracterização do fármaco modelo, aciclovir	31
4.1.1. Solubilidade do fármaco	31
4.1.2. Quantificação do fármaco	31

4.2. Validação do método para quantificação do aciclovir	32
4.3. Estudos do processo de coacervação – obtenção do complexo coacervado	34
4.3.1. Determinação do potencial zeta	34
4.3.2. Estudo das melhores condições de preparo para obtenção do complexo coacervado	35
4.3.3. Determinação da extensão da complexação/coacervação	36
4.3.4. Determinação da viscosidade das dispersões de pectina/caseína	37
4.4. Secagem das micropartículas <i>in natura</i>	38
4.5. Avaliação da integridade das micropartículas inertes (pH)	39
4.6. Avaliação da integridade das micropartículas inertes (força iônica)	39
4.7. Caracterização das micropartículas inertes	39
4.7.1. Determinação do tamanho de partícula e esfericidade	39
4.8. Morfologia das micropartículas inertes	40
4.8.1. Microscopia eletrônica de varredura	40
4.9. Redução no tamanho dos cristais de aciclovir	40
4.10. Estudo da influência das condições de preparo das micropartículas na encapsulação do fármaco	41
4.11. Estudo da influência da concentração do fármaco no rendimento e na eficiência da encapsulação	43
4.11.1. Determinação do conteúdo total de fármaco nas micropartículas secas	43
4.12. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do aciclovir contido nas micropartículas	45
4.13. Preparação da micropartículas carregadas com aciclovir e revestidas com solução de quitosana	45
4.14. Obtenção de comprimidos matriciais	46
4.14.1. Confeção das matrizes	46
4.15. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do aciclovir contido nas	47

micropartículas, com alteração do pH.	
4.16. Estudos de intumescimento e erosão das matrizes	47
4.17. Cálculo da cinética das reações de liberação e mecanismos que controlam a liberação	49
4.18. Determinação do conteúdo total e da eficiência da encapsulação do aciclovir contido nas micropartículas em dispersão	50
4.19. Estudos <i>in vitro</i> de liberação do aciclovir contido das dispersões de micropartículas	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. Caracterização do fármaco modelo, aciclovir	52
5.1.1. Solubilidade do fármaco	52
5.2. Validação do método para quantificação do aciclovir	52
5.2.1. Padronização do método em meio ácido	52
5.2.2. Padronização do método em tampão fosfato 0,2M pH 6,8	54
5.2.3. Padronização do método em tampão fosfato isotônico pH 7,4	56
5.3. Estudos do processo de coacervação: obtenção do complexo coacervado	57
5.3.1. Determinação do potencial zeta (mobilidade eletroforética)	57
5.4. Estudos das melhores condições de obtenção do complexo coacervado	65
5.4.1. Influência das condições de preparo do complexo	66
5.5. Determinação da viscosidade das dispersões de pectina/caseína	75
5.6. Determinação da extensão da coacervação (rendimento do coacervado seco)	77
5.6.1. Influência do pH e do teor de sólidos	77
5.6.2. Influência da relação mássica entre os polímeros pectina/caseína	79
5.6.3. Efeito da força iônica na extensão da coacervação	84
5.7. Avaliação da resistência das micropartículas secas, submetidas a diferentes condições de força iônica e pH	86
5.8. Determinação do tamanho de partículas e esfericidade	89

5.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	92
5.10. Redução no tamanho dos cristais de aciclovir (moinho de Agatha)	93
5.11. Estudo da influência das condições de preparo das micropartículas na encapsulação do fármaco	94
5.12. Estudo da influência da concentração do fármaco no rendimento e na eficiência da encapsulação (conteúdo do fármaco)	102
5.13. Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i>	105
5.14. Confeção dos comprimidos matriciais	112
5.15. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do aciclovir contido nas matrizes, com alteração do pH	113
5.16. Estudos de intumescimento (GI%) e erosão (GE%)	116
5.17. Cálculo da cinética das reações de liberação e mecanismos que controlam a liberação do fármaco	120
5.18. Estudos de liberação <i>in vitro</i> do aciclovir contido nas dispersões de micropartículas	122
6. CONCLUSÕES	124
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

1. Introdução

1.1. Sistemas de liberação modificada – considerações gerais

A Tecnologia Farmacêutica tem dedicado atenção especial ao desenvolvimento e à avaliação de sistemas ou dispositivos de liberação que proporcionem uma cinética de liberação da substância ativa, de acordo com as necessidades clínicas e farmacocinéticas.

Para muitas enfermidades, o regime terapêutico ideal é aquele mediante o qual a concentração terapêutica de fármaco requerida é atingida de modo imediato no (s) local (is) de ação e, depois, é mantida constante durante todo o tempo de tratamento (LORDI, 2001). Concentrações plasmáticas do fármaco no estado estacionário podem ser alcançadas prontamente e, a seguir mantidas, por meio da administração repetida de formas farmacêuticas convencionais, entretanto, existem inúmeras limitações potenciais associadas a essa sistemática. Forma farmacêutica convencional é aquela delineada para liberar rapidamente a dose total de fármaco, logo após ter sido administrada e, ainda que o fármaco liberado esteja na forma terapeuticamente ativa e disponível para a absorção e ação sistêmica imediata. Essas formas farmacêuticas apresentam limitações, entre outras: a) para fármacos com baixa biodisponibilidade e tempos de meia-vida biológica curtos, doses freqüentes são necessárias para manutenção da concentração plasmática no estado estacionário e dentro da faixa terapêutica; b) para a manutenção da concentração plasmática é necessária a administração de dose (s) sucessiva (s), o que conduz a variações da concentração plasmática do fármaco e conseqüentemente no (s) local (is) de ação, entre as administrações; c) estas variações proporcionam períodos onde os valores de $C_{máx}$ e $C_{mín}$ estão fora da faixa terapêutica, ou seja, períodos sobremedicado ou submedicado, respectivamente e, d) aumento

da frequência de esquecimento e possibilidade de período noturno sem dose (AULTON, 2005).

Essas limitações, associada à falta de adesão do paciente ao regime de tratamento de doses freqüente, é a causa mais comum para a falha ou ineficiência terapêutica. Tais fatos levam os pesquisadores a delinear preparações de liberação modificada (sustentada).

A pesquisa e o desenvolvimento com escopo na liberação modificada de fármacos não se restringem aos novos fármacos, mas também na otimização de fármacos já existentes devido à necessidade de desenvolvimento de sistemas apropriados, principalmente para a liberação de peptídeos e proteínas biologicamente ativos. Incluindo entre outros, agentes antivirais, imunomoduladores e vacinas, para os quais, de forma geral, as formulações convencionais não são apropriadas.

Quando os objetivos são alcançados, os sistemas de liberação modificada (sustentada ou prolongada ou controlada) apresentam vantagens, quando comparados a outros de dosagem convencional. Sendo as principais, a) redução dos efeitos adversos, devido à manutenção da concentração plasmática do fármaco por longo período ou direcionado; b) redução de dose ou frequência de administração e c) maior adesão ao tratamento por parte do paciente.

A terminologia dos medicamentos de liberação modificada muitas vezes é ambígua, entretanto, cada sistema objetiva eliminar as mudanças cíclicas na concentração do fármaco observadas após administração de um sistema de liberação convencional (Figura 1). Uma variedade de expressões foi criada para descrever esses sistemas, entre elas, as mais utilizadas são:

- Liberação retardada – indica que o fármaco não é liberado imediatamente após a administração, mas um tempo depois, por exemplo, comprimidos de revestimento entérico e cápsulas de liberação pulsátil;

- Liberação prolongada – indica que o fármaco é disponibilizado para a absorção por um período mais prolongado do que a partir de uma forma farmacêutica convencional. Entretanto fica implícito que o início da ação é retardado, por causa da velocidade de liberação global mais lenta a partir da forma farmacêutica;
- Liberação controlada - refere-se a formas farmacêuticas que liberam o fármaco em uma velocidade constante e proporcionam concentração plasmática constante pelo tempo pré-determinado.
- Liberação sustentada – indica uma liberação inicial de fármaco suficiente para disponibilizar a dose terapêutica logo após a administração, a qual é seguida de uma liberação gradual do fármaco, por um período estendido, sendo que essa liberação pode ocorrer em uma velocidade pré-definida (LORDI, 2001; OFORI-KAWAKYE *et al.*, 2001).

Figura 1. Perfis hipotéticos de concentrações de um fármaco na circulação sistêmica, resultantes da administração de uma forma farmacêutica convencional (a) e de uma forma farmacêutica de liberação controlada (b).

No transcurso das últimas décadas foram disponibilizados no mercado vários produtos de liberação sustentada, alguns bem sucedidos e outros potencialmente fatais. Como desvantagens destas formas farmacêuticas podem citar: a) a interrupção do tratamento não leva a um fim imediato da ação terapêutica; b) o alto custo dessas formas farmacêuticas e, c) fármacos que possuem meia-vida plasmática longa, não são bons candidatos para esses sistemas (LORDI, 2001; PICOS *et al.*, 2000).

Em termos gerais, os fármacos mais apropriados para compor estes sistemas, são aqueles que possuem as seguintes características: a) velocidade média de absorção e excreção; b) absorção em doses relativamente pequenas; c) margem de segurança relativamente larga; d) utilização principalmente no tratamento de doenças crônicas (ANSEL *et al.*, 2000).

Algumas estratégias podem ser aplicadas para uma liberação contínua do fármaco, podendo ser baseadas na modificação do fármaco ou da forma farmacêutica. Dentre as estratégias baseadas na modificação do fármaco têm-se as alterações das propriedades físicas e/ou químicas. A formação de complexos visa alterar estas características, deve-se lembrar, entretanto, que essa técnica só é possível de se aplicar em fármacos que contenham grupos funcionais adequados (SOUL-LAWTON *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2000). Já para a modificação da forma farmacêutica existem diversas maneiras, entre elas, grânulos encapsulados, comprimidos matriciais, comprimidos revestidos com filmes e a microencapsulação (LORDI, 2001; OFORI-KAWAKYE *et al.*, 2001; OFORI-KAWAKYE *et al.*, 2003).

1.2. Sistemas de microencapsulação de fármacos

Um dos grandes desafios para qualquer país no mundo atual é tornar seus produtos mais competitivos através de inovação tecnológica que agrega valor econômico e

funcionalidade às matérias-primas pré-processadas. Entre as tecnologias com grande potencial nesse sentido está a microencapsulação de materiais ativos, de modo a obter as propriedades funcionais desejadas, a qual, além do setor farmacêutico é aplicável a outros não menos importantes, como o alimentício e agropecuário.

Na área Farmacêutica, a tecnologia de preparação de sistemas de liberação modificada (sustentada e controlada) representa uma das fronteiras da ciência que envolve um vasto campo de estudos e que, atualmente, tem reunido muitos esforços na área de micropartículas. Este empenho por parte dos pesquisadores se justifica a medida que a utilização destes sistemas é considerada uma das alternativas viáveis para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de formulações, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, o aumento da eficiência terapêutica de substâncias já utilizadas no tratamento de grandes variedades de doenças, oferecendo portanto, várias vantagens quando comparado aos sistemas convencionais de administração de fármacos. É importante ressaltar que as micro/nanopartículas passaram a ser largamente utilizadas na área farmacêutica não só como sistemas para a liberação modificada de uma grande variedade de fármacos, mas ainda com os mais diferentes propósitos: 1) mascaramento de sabor e odor desagradáveis - alcalóides e sulfas; 2) promove estabilidade química, física e biológica do fármaco; 3) proteção de fármacos lábeis – vitaminas, enzimas, hormônios e outros nutrientes; 4) conversão de líquidos em sólidos; 5) proteção de substâncias voláteis que são facilmente oxidadas; 6) na prevenção de incompatibilidades entre substâncias contidas na mesma formulação; 7) isolamento de tecidos – encapsulação de hemácias; 8) biotecnologia – diagnóstico, terapia gênica (administração de vacinas gênicas) e biossíntese (SHAHIDI; HAN, 1993; WHORTON; REINECCIUS, 1995; RÉ, 1998; PICOS *et al.*, 2000; BAKAN, 2001).

É importante, neste momento, definirmos alguns termos relacionados à microencapsulação.

O conceito de “microcápsula” surgiu da mimetização do modelo celular. Neste, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes, exerce ao mesmo tempo outras funções como controlar a entrada e saída de material na célula. De modo semelhante, a microcápsula consiste, em geral, de uma camada de polímero que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa (gotículas líquidas ou partículas sólidas) evitando os efeitos prejudiciais de sua exposição na forma livre. Essa membrana desfaz-se sob estímulo específico, liberando a substância no local e/ou momento ideal (DONBROW, 1992).

O termo micro/nanopartículas é genérico, sendo usado de acordo com o tamanho da partícula a que se está referindo. Partículas com diâmetro menor que 1 μm são consideradas nanopartículas, enquanto que partículas cujo diâmetro é maior ou igual a 1 μm são denominadas de micropartículas. Existe certa controvérsia com relação ao tamanho limite para as micropartículas, uma vez que alguns autores consideram partículas de 1 mm como micropartículas. O termo micro/nanopartícula aplicado à liberação modificada é amplo e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes micro/nanoesfera e micro/nanocápsulas.

Denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado na matriz polimérica (COUVRER *et al.*, 1996). Dessa forma obtêm-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. As micro/nanoesferas diferem das micro/nanocápsulas por constituírem sistemas de matrizes sólidas onde um material polimérico forma uma rede tridimensional, na qual a substância ativa pode ser adsorvida, incorporada ou ligada covalentemente na superfície da partícula, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos (OLIVEIRA *et al.*, 1992). As micro/nanocápsulas, ao contrário, constituem sistemas reservatórios, onde é possível identificar-se um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Nesse caso, a substância ativa encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo. A diferença morfológica entre a forma de microesfera (sistema

polimérico matricial) e microcápsula (sistema polimérico do tipo reservatório) está ilustrada na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática da estrutura obtida nos processos de microencapsulação. Microesfera (matricial); Microcápsula (reservatório).

O fármaco deve ser liberado de uma forma reprodutível e previsível e, dependendo dos processos e materiais utilizados na produção das partículas, a liberação do conteúdo encapsulado pode ocorrer por pressão, fricção, forças de abrasão, ação enzimática, bioerosão ou difusão da substância ativa, entre outros (ANDRÉO-FILHO; OLIVEIRA, 1999; BAKAN, 2001; SHU *et al.*, 2001).

Vários métodos são utilizados na obtenção de sistemas multiparticulados, sendo a escolha dependente das características físico-químicas do fármaco e do polímero, da utilização pretendida para o sistema e da viabilidade de utilização em larga escala.

Os mais utilizados são:

1) Métodos físicos: Os métodos físicos são baseados nos processos clássicos de secagem, sendo, portanto, os de maior viabilidade em larga escala. O mais utilizado é o *spray drying* (secagem em spray). Neste processo, o fármaco e o polímero encapsulador são dispersos em solvente adequado, e a dispersão final é atomizada em uma câmara de secagem,

na qual ocorre a rápida secagem e, portanto solidificação das gotículas, formando o sistema multiparticulado no qual o fármaco está inserido (FILKOVÁ; MUJUMDAR, 1995). Outro método utilizado é o revestimento em Leito fluidizado ou Leito de jorro. Neste método as partículas são mantidas em suspensão por um fluxo contínuo de ar, sobre as quais é atomizado o revestimento (ANDRÉO-FILHO; OLIVEIRA, 1999; BAKAN, 2001).

2) Métodos físico-químicos: De um modo geral, estes métodos estão baseados na dispersão do fármaco juntamente com o polímero encapsulador, em solvente apropriado, seguida pela adição à mistura, sob agitação, de um não solvente. Neste meio impróprio pode ocorrer a precipitação do polímero ou ainda a separação de fases (coacervação). De qualquer modo o polímero se reorganiza de modo a reduzir sua interação com o meio. Nesta reorganização o fármaco dissolvido é aprisionado no interior da matriz polimérica. O processo de coacervação (separação de fase associativa) pode ser dividido em: simples (por mudança de pH, força iônica e/ou temperatura) ou complexa (complexação ou neutralização mútua entre dois polieletrólitos carregados com cargas opostas) (KRUIF; TUINIER, 2001; KO *et al.*, 2002). Para aumentar a estabilidade do complexo formado, em alguns casos, um composto de reticulação (na maioria das vezes glutaraldeído) é então adicionado para tornar o polímero insolúvel, formando uma parede enrijecida ao redor do núcleo.

Fármacos, quando encapsulados no interior de matrizes poliméricas, não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico como quando em solução. Assim, o polímero tem que se dissolver ou desintegrar-se para que o fármaco possa ser liberado, ou então o fármaco tem que dissolver e difundir através da matriz hidratada. De qualquer modo, a liberação do fármaco para o meio fisiológico é estendida a um tempo muito maior comparado ao fármaco na sua forma livre, sendo esta característica um dos principais fatores para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas multiparticulados de liberação modificada.

Os sistemas multiparticulados obtidos pelos métodos físico-químicos podem ser secos pelos métodos convencionais de secagem, tais como *spray drying* ou leiteo fluidizado.

Qualquer que seja o método utilizado, os pontos críticos para a eficácia do sistema de liberação são as características físico-químicas e a compatibilidade biológica do polímero utilizado. Inúmeros compostos poliméricos naturais ou sintéticos, biodegradáveis ou não, estão disponíveis no mercado. No entanto, há uma forte tendência de utilização de polímeros naturais (intactos ou modificados) com consagrado uso alimentar, para compor ou serem utilizados como excipientes no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação sustentada e/ou sítio específica de fármacos (THAKUR *et al.*, 1997).

Entre estes polímeros podemos citar a pectina, a quitosana e a caseína, os quais possuem disponibilidade de grupos funcionais, possibilitando a interação entre eles e/ou modificações em maior ou menor extensão, o que permite adequá-los ao sistema de liberação planejado.

Os polímeros que formam hidrogéis, como a pectina, apresentam como inconveniente à possibilidade de liberação do fármaco por difusão através da matriz hidrofílica e/ou por erosão da matriz durante a passagem pelo TGI. Este inconveniente pode ser parcialmente controlado através de modificações químicas nos polímeros naturais, entre as quais aquelas proporcionadas por agentes de reticulação (que promovem “cross-linking” entre cadeias) e a complexação entre polímeros por ação ou não de um agente reticulador. É esperado que o complexo apresente características físico-químicas adequadas para compor sistemas de liberação modificada.

1.3. Propriedades dos polímeros utilizados na obtenção das micropartículas

1.3.1. Pectina

As pectinas constituem uma classe de polissacarídeos complexos encontrados na parede celular de plantas superiores (NORTHCOTE, 1992; MURALIKRISHNA; TARANATHAN, 1994). É predominantemente um polímero linear de resíduos do ácido D-galacturônico em ligação α (1-4) e contém quantidades variadas de substituintes metil-éster, dependendo da fonte natural ou método de preparação (THAKUR et al., 1997).

A pectina pode formar complexos com outros polímeros, em função de seu balanço de cargas, que se apresenta positivo em pHs elevado e negativo em pHs baixo. Devido a essas características eletrostáticas e de formação de géis, a pectina intacta ou modificada e pectina associada a outros polímeros naturais ou sintéticos tem sido avaliada como material de revestimento de formas farmacêuticas sólidas, sistemas matriciais, e mais recentemente, como sistemas microparticulados. Com o intuito de conferir à forma farmacêutica, uma liberação sustentada e/ou direcionada do fármaco, cólon específico. Porém, estas estratégias ainda não resultaram na obtenção de sistemas totalmente eficazes.

ASHFORD et al. (1993) demonstraram que, somente revestimentos espessos com pectina, podem proporcionar proteção às condições do trato gastrointestinal superior. A redução da espessura do filme de revestimento pode ser obtida com a mistura de pectina e um polímero semi-sintético insolúvel em água, por exemplo: a etil-celulose, sendo a proteção dependente da concentração de etil-celulose (WAKERLY et al., 1996). Por outro lado, a adição de etil-celulose possivelmente pode reduzir a velocidade de hidrólise enzimática da pectina. Estudos evidenciaram que comprimidos matriciais de pectinato de cálcio não proporcionaram proteção, pois 80% do fármaco foi liberado em aproximadamente 6 horas de estudo (WAKERLY et al., 1997).

FERNANDEZ-HERVAS e FELL (1998) obtiveram um complexo polieletrólito (PEC) formado pela mistura de pectina e quitosana com potencial para utilização em sistemas de liberação colônica de fármacos.

Sistemas multiparticulados à base de pectina amidada também têm sido extensivamente avaliados como alternativa para liberação sustentada ou direcionada do fármaco. MUNJERI *et al.* (1998) prepararam “beads” a partir de hidrogéis à base de pectina amidada contendo cloroquina. O sistema proporcionou uma liberação sustentada da cloroquina, demonstrando ainda que a maior liberação do fármaco ocorreu em meio simulando o fluido intestinal.

LIU e KRISHNAN (1999) desenvolveram sistemas de liberação particulados “beads” composto por pectina e alginato revestidos com poli-lisina. Os resultados demonstraram que o sistema foi promissor para a liberação de fármacos que são pouco absorvidos após a administração oral.

Comprimidos revestidos com filme composto a base de pectina/quitosana/hidroxipropilmetilcelulose resistiram à passagem pelo trato gastrointestinal superior, e foram hidrolisados por enzimas produzidas pela microbiota colônica (MACLEOD *et al.*, 1999a). O perfil de liberação do fármaco foi sigmoidal, sendo que a velocidade e extensão de liberação aumentaram após a entrada no cólon (MACLEOD *et al.*, 1999a).

Microsféricas a base de pectina contendo piroxicam, proporcionaram maior retenção do fármaco no local de ação (córnea) quando comparado a uma formulação comercial (referência), a maior retenção foi atribuída às características bioadesivas da pectina (GIUNCHEDI *et al.*, 1999).

OFORI-KWAKYE e FELL (2001) estudaram a influência do pH e da proporção de hidroxipropilmetilcelulose, nas características de permeabilidade de filmes contendo misturas de pectina/quitosana. A permeabilidade mínima ocorreu em meio ácido pH 3,0, devido a maior interação entre os grupos carboxílicos ionizados da pectina ($pK_a = 3,6 - 4,1$) e os grupos amino ionizados presentes na quitosana ($pK_a = 6,3$) resultando na formação do complexo insolúvel (PEC). Comprimidos com revestimento espesso desse filme,

apresentaram maior absorção de água e menor velocidade de liberação do fármaco (OFORI-KWAKYE; FELL, 2003).

WONG *et al.* (2002) prepararam microesferas de pectina por gelificação ionotrópica, visando uma liberação controlada dos fármacos sulfanilamida, a sulfaguanidina e sulfatiazol. Os fármacos menos solúveis (sulfaguanidina e sulfatiazol) proporcionaram maior rendimento de encapsulação.

HIORTH *et al.* (2003) avaliaram filmes compostos por pectina e quitosana preparados pelo método de *spray drying*. Eles investigaram a permeabilidade destes filmes, variando a fonte de pectina e seu grau de metoxilação e amidação, o grau de deacetilação da quitosana, e a proporção dos polímeros. O filme mais promissor com menor permeabilidade foi composto por pectina cítrica não amidada com baixo grau de metoxilação, quitosana com maior grau de deacetilação, contendo maior proporção de pectina que quitosana.

A interação entre pectina e quitosana na formação de géis (o efeito da concentração de quitosana na geleificação de dispersões concentradas de pectina), as propriedades reológicas, bem como as propriedades estruturais e dinâmicas de misturas aquosas de pectina e quitosana foram estudadas por (HIORTH *et al.*, 2003; MARUDOVA *et al.*, 2004; HIORTH *et al.*, 2005). A quitosana age como um agente de “cross-linking” nas dispersões de pectina, esta ação é dependente do grau de ionização, ou seja, da densidade de cargas disponíveis da pectina.

1.3.2. Caseína

A caseína é uma glicofosfoproteína encontrada no leite. A caseína de origem bovina é constituída por quatro cadeias denominadas: α_{s1} , α_{s2} , β e κ , com peso molecular total de aproximadamente 86.240 e ponto isoeletrico em 4,55. A cadeia α_{s1} apresenta 199 resíduos de

aminoácidos, predominando os aminoácidos com características ácidas, possuindo duas regiões hidrofílicas e três regiões hidrofóbicas, além de alguns sítios fosforilados. A fração α_{s2} contém 207 aminoácidos, com três regiões com grupamentos fosfato e com uma seqüência interna homóloga. A cadeia β é constituída por 209 aminoácidos com 16,7% de prolina, conferindo a hidrofobicidade à cadeia. A κ -caseína apresenta sítios glicosilados, dando-lhe características de uma glicoproteína e é constituída por 169 resíduos de aminoácidos (FIAT; JOLLÉS, 1989).

No desenvolvimento de sistemas microparticulados para uma liberação modificada, o grande desafio é a manutenção da integridade da parede que controla a saída do material. Isso exige, em muitos casos, que o material usado na confecção da parede seja insolúvel ou parcialmente insolúvel.

Várias proteínas devido às suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, funcionais, como formação de gel e emulsificação, oferecem uma boa opção de material de cobertura. A gelatina, a albumina, a caseína, proteínas do soro de leite, da soja, vêm sendo estudadas como material de cobertura para microencapsulados. Além das vantagens tecnológicas apresentadas por esses polímeros, eles são componentes naturais, de consagrado uso alimentar, não sendo esperada reações tóxicas, diferentes de alguns polímeros sintéticos, que muitas vezes não são permitidos, ou têm seu uso limitado, devido a uma possível toxicidade (LEE; ROSENBERG, 2000).

Devido a sua natureza anfipática, ou seja, caráter anfótero (carga negativa acima do seu ponto isoelétrico e carga positiva abaixo deste) e por sua capacidade formadora de filme, a caseína vem sendo estudada como material para preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos (De CARVALHO, 1996), obtenção de sistemas matriciais (HERNANDES *et al.*, 1998), e também na preparação de microcápsulas (CHEN *et al.*, 1987;

LATHA; JAYAHIRSHNAN, 1994; BAYOMI *et al.*, 1998; SANTINHO *et al.*, 1999; SANTINHO *et al.*, 2002).

1.3.3. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo policatiônico que pode ser obtido por deacetilação da quitina de cascas de crustáceos. A quitosana é um copolímero linear de resíduos de N-acetilglicosamina e glicosamina em ligação β - (1-4).

O termo quitosana é usado para descrever uma família de polímeros com diferentes pesos moleculares (50 KDa a 2000 KDa). A quitosana é insolúvel em pH neutro e alcalino, mas forma sais com ácidos inorgânicos e orgânicos tais como ácido glutâmico, láctico, acético e clorídrico. Em solução, os grupos amino do polímero são protonados e o polissacarídeo solúvel resultante é carregado positivamente. Os sais de quitosana são solúveis em água e esta solubilidade depende do grau de deacetilação e do pH. Devido às suas propriedades de formação de filme, geleificação e de bioadesão, este polímero tem sido extensivamente utilizado pela indústria farmacêutica como excipiente para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos (YAO *et al.*, 1995; ILLUM, 1998).

Estudos em ratos demonstraram que a quitosana é atóxica, com uma DL_{50} de 16g/Kg. Testes clínicos não relataram qualquer reação alérgica ou inflamatória após a aplicação tópica ou a ingestão, comprovando assim a sua inocuidade ou segurança de uso (TOZAKI *et al.*, 2002; WONG *et al.*, 2002).

A quitosana é biodegradada *in vivo* por hidrólise enzimática e a principal enzima envolvida neste processo é a lisozima, a qual é altamente concentrada na mucosa, e também por enzimas secretadas pela microbiota colônica. A cinética de degradação parece estar inversamente relacionada ao grau de cristalinidade e este último é controlado principalmente

pelo grau de acetilação. Formas com baixo grau de deacetilação exibem as menores taxas de degradação e vice-versa (LORENZO-LAMOSA *et al.*, 1998).

Assim como a pectina, a quitosana sozinha ou associada “cross-linking” a outros polímeros naturais ou sintéticos tem sido avaliada como material na preparação de sistemas de liberação sustentada e/ou direcionada de fármacos, tais como revestimentos, matrizes, “beads” e, mais recentemente, micropartículas.

Nas últimas décadas grande ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de sistemas de liberação, utilizando biopolímeros como a quitosana, alginatos, goma-guar, dextrans, e a pectina (SHAHIDI; HAN, 1993; LORENZO-LAMOSA *et al.*, 1998).

REMUNÁN-LÓPES e BODMEIER (1996) estudaram a influência da composição e de variáveis no processo (pH, temperatura de coacervação, tempo de incubação) na formação do complexo de coacervação entre polímeros com cargas opostas, quitosana e gelatina. A formação do complexo foi dependente da concentração e proporção dos polímeros na formulação. A formação do coacervado ocorreu em soluções muito diluídas, ou seja, com concentrações baixas de quitosana (0,05-0,5%). O pH ótimo para a coacervação foi entre 5,25 e 5,5, que corresponde um valor acima do pI da gelatina e corresponde ao pH de precipitação da quitosana. Os resultados finais demonstraram que este sistema é promissor para a encapsulação de vários fármacos.

GENTA *et al.* (1997) prepararam microesferas de quitosana contendo aciclovir com o objetivo de promover uma liberação sustentada do fármaco e aumentar a sua biodisponibilidade na cavidade ocular. A liberação *in vitro* foi mais lenta, quando comparada a do fármaco em sua forma livre. Os resultados da administração ocular *in vivo* (coelhos), demonstraram uma manutenção de altas concentrações de aciclovir.

REMUNÁN-LÓPES e BODMEIER (1997) investigaram as propriedades mecânicas, de fixação de água e permeabilidade de filmes contendo quitosana, glutamato e

alginato, obtidos por método de evaporação do solvente e “cross-linking” com seus íons ligantes, tripolifosfato (TPP) e cloreto de cálcio (CaCl_2), respectivamente. Os resultados demonstraram que as características de permeabilidade e intumescimento dos filmes foram dependentes do pH e da concentração do agente de “cross-linking”.

BAYOMI *et al.* (1998) preparam microesferas de caseína e quitosana por coacervação em meio aquoso para liberação sustentada de diltiazem. Eles avaliaram a influência da concentração dos polímeros e o tempo de agitação no perfil de liberação do fármaco. A liberação do fármaco foi sustentada com o aumento da concentração de caseína e tempo de agitação. Entretanto, com o aumento da concentração de quitosana houve maior liberação do fármaco.

Micropartículas de quitosana e Eudragit® L-100 e S-100, contendo diclofenaco de sódio, foram obtidas a partir das técnicas de *spray-drying* e evaporação do solvente. Os resultados demonstraram que ocorreu uma combinação de mecanismos de liberação, ou seja, dissolução do revestimento de Eudragit (pH-dependente), intumescimento da quitosana e difusão do diclofenaco através do gel formado. Além disso, os espectros de infravermelho (IV) revelaram uma interação entre os grupos carboxílicos presentes no Eudragit e os grupos amino da quitosana, a qual também influenciou no controle de liberação do fármaco (LORENZO-LAMOSA *et al.*, 1998).

A enzima urease foi encapsulada em microesferas de carboximetilcelulose e alginato revestidas com quitosana. O revestimento com o polímero quitosana melhorou a resistência mecânica das microesferas e aumentou a capacidade de imobilização enzimática (ELCIN; ELCIN, 2000).

Além dos sistemas de liberação citados nos trabalhos acima, vários outros têm sido propostos contendo como polímero predominante a quitosana, entre eles: filme de quitosana em ligação cruzada com citrato (SHU *et al.*, 2001); cápsulas de quitosana revestidas com

ftalato de Hidroxipropilmetilcelulose para liberação colônica (TOZAKI *et al.*, 2002); microcápsulas de alginato revestidas com quitosana para liberação de proteína soro albumina bovina (VANDRERBERG *et al.*, 2001), “beads” de pectina revestidos com quitosana para liberação de proteínas (KIM *et al.*, 2003), micropartículas de quitosana e tripolifosfato contendo felodipina para liberação controlada (KO *et al.*, 2002), filmes compostos pela mistura de pectina e quitosana obtidos por *spray drying* (HIORTH *et al.*, 2003), nanopartículas de glucomannan com quitosana para liberação controlada de proteína albumina bovina (DU *et al.*, 2005), nanopartículas de quitosana e β -lactoglobulina como carreadores de substâncias nutracêuticas (CHEN *et al.*, 2005).

1.4. Interações entre proteína e polissacarídeo

As proteínas e os polissacarídeos classificam-se como biopolímeros e são encontrados com grande frequência em estruturas fundamentais que compõem diferentes organismos vivos. Uma grande variedade de produtos alimentícios tem em sua composição ingredientes como proteínas e polissacarídeos. A interação entre proteína e polissacarídeo exerce influência direta sobre as propriedades macroscópicas dos alimentos, tais como fluidez, estabilidade, textura e sensação bucal. Segundo TOLSTOGUZOV (1991) e SCHMITT *et al.* (1998), a mistura de biopolímeros são, em sua grande maioria, instáveis visto que são susceptíveis ao fenômeno de separação de fases. A separação de fases pode ocorrer através de dois caminhos distintos: 1) incompatibilidade termodinâmica (segregação), também conhecida como separação de fase segregativa e 2) complexação (coacervação complexa), conhecida por separação de fases associativa, como ilustra a Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática do comportamento de dispersões aquosas de misturas de polissacarídeos e proteínas (adaptado de TOLSTOGUZOV, 1991).

Para o caso em que exista incompatibilidade entre os biopolímeros, por exemplo, predominância de repulsão de cargas entre os mesmos, após a separação, a dispersão apresenta duas fases sendo uma rica em proteína e a outra em polissacarídeo. Ao contrário, caso predomine a atração entre os biopolímeros em virtude de interações eletrostáticas (quando os dois polímeros apresentam grupos funcionais carregados com cargas opostas), ocorre a separação de fases do tipo associativa, também conhecida como coacervação complexa, resultando na formação do complexo proteína/polissacarídeo (coacervado) (SCHMITT *et al.*, 1998). Verifica-se também a separação da mistura em duas fases, uma fase

rica em polímero, e outra constituída essencialmente pelo solvente, conforme ilustra a Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática do fenômeno de separação de fases classificado como coacervação complexa (adaptado de KRUIF *et al.*, 2004).

1.4.1. Coacervação complexa - principais parâmetros que influenciam a formação do complexo proteína/polissacarídeo

Os polieletrólitos, também conhecidos como hidrocolóides (polímeros de origem natural) são macromoléculas que contém um grande número de grupos funcionais carregados ou que, em condições favoráveis, tornam-se carregados. Estas macromoléculas podem ser constituídas por poliânions ou policátions, dependendo do grupo funcional disponível na molécula. A interação entre dois polieletrólitos apresentando cargas de sinal oposto possibilita a formação do complexo em decorrência da neutralização mútua das espécies (BURGESS, 1990). Diversos parâmetros físico-químicos interferem no grau de interação entre as espécies, favorecendo ou suprimindo a formação do complexo coacervado.

A separação de fase ou coacervação pode ser induzida pela ação de um agente externo que promova interação iônica entre os polímeros. Como o grau de dissociação (ionização) dos grupos funcionais e, portanto, a densidade líquida de carga associada varia em

função do pH é evidente que a variação do pH (intervalo de pH), pode influenciar no processo.

A formação do complexo é influenciada por parâmetros intrínsecos dos polímeros, como a estrutura e a densidade de cargas. Por outro lado, estes fatores podem ser influenciados por parâmetros externos como a força iônica e os valores de pH (DICKINSON, 1998). A força iônica do meio, a natureza e concentração dos polieletrólitos presentes em solução e a razão entre os polímeros desempenham importância relevante para evitar a supressão do fenômeno (BURGESS; CARLESS, 1984). Parte-se do pressuposto que deva haver uma equivalência elétrica entre as espécies para que ocorra o que denominamos de ponto ótimo para formação do complexo coacervado.

BENICHOU, ASERIN e GARTI (2002) afirmaram que, em proporções adequadas de biopolímeros e sob condições específicas (pH, força iônica, temperatura e procedimento de mistura), as proteínas e polissacarídeos formam complexos com propriedades funcionais melhores em comparação às proteínas e polissacarídeos utilizados separadamente.

Para efeito de ilustração da versatilidade de sistemas preparados a partir da interação entre proteína e polissacarídeo, a tabela abaixo apresenta uma compilação de publicações em literatura especializada.

Tabela 1. Sistemas obtidos á partir de proteína/polissacarídeos, parâmetros estudados.

Sistema	Técnicas/Métodos	Parâmetros	Referência
Gelatina/Goma arábica	Microscopia óptica, Viscosidade, Turbidimetria	pH, força iônica, Pr:Ps, Cp	BUNGENBERG (1949)
Gelatina/Goma arábica	Mobilidade eletroforética	pH, força iônica, pI da gelatina, Pr:Ps	BURGESS e CARLESS (1984)
Gelatina/Gelatina	Mobilidade eletroforética	pH, força iônica, temperatura, Pr:Ps, concentração de gelatina, tempo, teor do fármaco	BURGESS e CARLESS (1985)
Gelatina/Gelatina	Mobilidade eletroforética Rendimento do coacervado	pH, força iônica, temperatura, tempo, tratamento das soluções de gelatina	BURGESS e CARLESS (1986)
Gelatina/ Goma arábica BSA/ Goma arábica	Mobilidade eletroforética Rendimento do coacervado	pH, força iônica, tempo, Cp	BURGESS (1990)
BSA/ Goma arábica	Mobilidade eletroforética Rendimento do coacervado	pH, força iônica, tempo, Cp	BURGESS (1991)
Gelatina/ Goma arábica BSA/ Goma arábica	Preparo das microcápsulas Tamanho de partícula, Microscopia eletrônica de varredura	pH, Pr:Ps, velocidade de agitação, tempo	BURGESS (1994)
β -lg/ pectina (alta e baixa metoxilação)	Titulação potenciométrica, Ultrafiltração	pH, Pr:Ps, NaCl, uréia, temperatura	GIRARD et al. (2002)
β -lg/Goma arábica	Microscopia confocal, Turbidimetria	pH, Pr:Ps=1:1 e 2:1	SANCHES et al. (2002a)
β -lg/Goma arábica	Microscopia confocal, Turbidimetria	pH 4.2 ou 4.5, Cp = 1%, 5%, tempo, Pr:Ps, quantidade de β -lg, complexada	SCHMITT et al. (2001a)
β -lg/Goma arábica	Espectroscopia no infravermelho	pH, Pr:Ps, quantidade de β - lg, complexada	SCHMITT et al. (2001b)
BSA/ Alginato (ácido algínico)	Mobilidade eletroforética Rendimento do coacervado	pH, força iônica, Cp	SINGH e BURGESS (1989)
Caseína (micelas)/Pectina	Microscopia confocal, Turbidimetria	tempo, Cp de pectina,	TUINIER et al (2002)
BSA/ pectina, alginato, CMC	Titulação potenciométrica	pH, Pr:Ps, força iônica	IMESON et al. (1977)

1.4.2. Coacervação complexa: Principais aplicações

A formação de complexos coacervados tem por finalidade melhorar as características funcionais dos polímeros de origem. A potencialidade de aplicação decorre do fato de que certas propriedades do complexo formado apresentam-se superiores em relação aos materiais de partida isolados. Diversos setores industriais utilizam o processo de coacervação complexa como ferramenta tecnológica para a encapsulação de agentes ativos. Dentre os principais destacam-se: nutrição e alimentos, higiene pessoal e cosmético, agropecuário, fármacos e medicamentos, entre outros (SCHMITT *et al.*, 1998).

Para efeito de ilustração da versatilidade de aplicações, a tabela 2 apresenta uma compilação de publicações em literatura especializada.

Tabela 2. Aplicação da Microencapsulação em diversos setores.

Sistema	Agente encapsulado	Aplicação	Referência
Gelatina/Goma arábica	sulfametoxazol	Farmacêutica	TAKENAKA et al. (1980,1981)
Gelatina/Goma arábica	indometacina	Farmacêutica	TAKEDA et al. (1981)
Gelatina/Goma arábica	óleo com drogas lipofílicas	Farmacêutica	JIZOMOTO et al. (1993)
Gelatina/Goma arábica	cetoprofeno	Farmacêutica	PALMIERI et al. (1996)
Gelatina/Goma arábica	fragrâncias	Cosmética	FLORES et al. (1992)
Gelatina/Goma arábica	óleos	Farmacêutica	LAMPRECHT et al. (2000, 2001)
Gelatina/Pectina	sulfamerazina	Farmacêutica	MCMULLEN et al. (1984)
Alginato/Pectina/Goma gelana	óleos e proteínas	Alimentícia	MUKAI-CORRÊA et al. (2004, 2005)
Blend de polímeros	oleoresina de páprica	Alimentícia	RODRIGUEZ-HUEZO et al. (2004)

1.5. Aciclovir

O aciclovir, 9-[(2-hidroxietoxi)metil]guanina é um análogo sintético de nucleosídeos purínicos com atividade antiviral. É considerado um dos agentes antivirais mais eficaz e seletivo contra todos os tipos de vírus do herpes simples, tipo 1 (HSV1) e tipo 2 (HSV2) e também contra o vírus da Varicella Zoster (VZV), sendo esta atividade altamente seletiva para as células infectadas (ELION, 1982; LASKIN *et al.*, 1982; PRENTICE, 1983).

O herpes simples (HSV) causa uma variedade de infecções, incluindo: herpes cutânea ou orofacial, herpes genital, Varicella Zoster, keratose herpética, entre outras. Existe uma ampla evidência na eficácia clínica do aciclovir, sendo utilizado em vários tratamentos de acordo com o tipo de infecção, como: 1) tratamento tópico da keratose herpética (pomada oftálmica, contendo 3% do aciclovir, administrada cinco vezes ao dia, durante 7 dias); 2) tratamento tópico do herpes genital (5% do aciclovir em propilenoglicol para ser aplicado cinco vezes ao dia, por 5-10 dias), 3) tratamento sistêmico contra herpes genital (infusão intravenosa, na forma de sal sódico, com doses correspondendo a 5mg/kg, administrada a cada 8 hs, durante 5 dias), ou por via oral (doses de 200mg, cinco vezes ao dia por um período de 5-10 dias), 4) tratamento da herpes labial (creme contendo 5% de aciclovir, aplicado cinco vezes ao dia, por 5 dias), 5) pacientes imunocompetentes ou imunocomprometidos com o vírus do herpes simples ou herpes Zoster necessitam de tratamento com aciclovir por período de seis meses (MARTINDALE, 1989; B.P PHARMACEUTICAL CODEX, 1994; De RUITER; THIN, 1994).

O aciclovir é um fármaco de natureza hidrofílica e anfótera, ou seja, contém dois grupos ionizáveis. Os valores de pKa são 2,4 para a protonação e 9,2 para a desprotonação.

O aciclovir é pouco solúvel em água e salina tamponada (1,3mg/mL), a solubilidade aumenta em soluções contendo etanol ou polietilenoglicol (aproximadamente 2,7mg/mL)

(COOPER *et al.*, 1985; VOLPATO *et al.*, 1995, 1998).

A via oral é preferida em relação a parenteral devido aos riscos de toxicidade local, entretanto, quando administrado por via oral é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal, com uma biodisponibilidade variando entre 15-30% (De MIRANDA, 1983; FLETCHER; BEAN, 1985), o tempo médio de meia vida plasmático é de aproximadamente 3 horas, fazendo com que seja necessário freqüentes administrações (200 mg, 5x ao dia, durante 10 dias), provocando efeitos colaterais como náuseas, diarreia e dores de cabeça.

Devido a baixa permeabilidade, o aciclovir é lentamente e pouco absorvido quando administrado em formas farmacêuticas de uso tópico e oftálmico (BANMEET *et al.*, 2002; JAIN *et al.*, 2005).

Na tentativa de minimizar os inconvenientes relacionados à estrutura molecular do aciclovir, e, portanto, visando melhorar a biodisponibilidade do fármaco, vários autores têm avaliado a utilização de carreadores (promotores de absorção e lipossomas), pró-fármacos (LAW *et al.*, 2000; BANMEET *et al.*, 2002; JAIN *et al.*, 2005), sistemas para a liberação prolongada de aciclovir, utilizando na obtenção destes sistemas polímeros de origem natural, como a pectina e a quitosana para a administração oftálmica do fármaco (GENTA *et al.*, 1997; CONTI *et al.*, 1997), microesferas compostas por etil-celulose para administração oral (CHEU *et al.*, 2000), filmes e matrizes compostos por quitosana e ácido poliácrico para liberação vaginal e bucal do aciclovir (ROSSI *et al.*, 2003; SANDRI *et al.*, 2004), micropartículas de PLGA, onde De JALÓN *et al.* (2001, 2003), demonstraram o aumento da eficácia tópica ao comparar o uso de um sistema microparticulado contendo o aciclovir em relação à administração do fármaco em suspensão.

A absorção limitada, devido às características da estrutura molecular, associada ao tempo de meia-vida biológica curto, conduz a administrações freqüentes para manter a concentração plasmática do fármaco em níveis terapêuticos. A freqüência de administração,

aliada ao tempo de tratamento é a principal causa da não adesão pelos pacientes. Fármacos com estas características são bons modelos e/ou candidatos para o desenvolvimento de formulações que proporcionem a liberação contínua do fármaco.

Inúmeros compostos poliméricos naturais ou sintéticos biodegradáveis ou não estão disponíveis no mercado. No entanto há uma forte preferência pela utilização de polímeros naturais de consagrado uso alimentar (intactos ou modificados) na preparação de sistemas multiparticulados. Entre os polímeros mais estudados estão a caseína, pectina e a quitosana, que em condições apropriadas de pH e força iônica, em solução aquosa apresentam cargas líquidas opostas, que do ponto de vista teórico seriam apropriados para a obtenção de micropartículas por coacervação complexa.

Baseado nestas considerações, e especialmente de fármaco hidrofílico e nas características do complexo pectina/caseína o racional desta proposta foi o estudo das características físico-químicas do complexo pectina/caseína e condições de obtenção que possibilitassem a encapsulação do aciclovir. Visando com o sistema microparticulado uma melhor distribuição do fármaco no local de ação, maior contato do fármaco com a superfície absorviva, devido à propriedade biomucoadesiva dos polissacarídeos (pectina e quitosana), obtendo assim uma formulação que proporcione maior biodisponibilidade do aciclovir e redução da frequência de administração.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Estudo de parâmetros básicos relacionados ao complexo pectina/caseína e aplicação no desenvolvimento de sistemas microparticulados para liberação sustentada de aciclovir.

2.2. Objetivos específicos:

Os objetivos específicos compreendem:

- Avaliar a mobilidade eletroforética dos polímeros em dispersão.
- Estudar a formação e obtenção do complexo polieletrólítico.
- Preparar as micropartículas inertes e carregadas, por coacervação complexa.
- Secagem por atomização em *spray dryer*.
- Avaliar a integridade das micropartículas inertes, em diferentes condições de pH e força iônica.
- Caracterizar os sistemas quanto à morfologia e granulometria.
- Avaliar as características de superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Avaliar o processo de encapsulação do fármaco.
- Preparar as micropartículas carregadas com o aciclovir e revestir com solução de quitosana.
- Determinar o conteúdo (teor) de aciclovir e a eficiência de encapsulação nos sistemas obtidos.

- Determinar o perfil de liberação do fármaco *in vitro* a partir das formulações, utilizando meios de dissolução que simulam as condições de pH do suco gástrico e entérico.
- Determinar o grau de intumescimento e erosão dos sistemas matriciais obtidos.
- Determinar a cinética e mecanismos de liberação do fármaco.
- Determinar o perfil de liberação do fármaco *in vitro* a partir das dispersões de micropartículas.

3. Material

3.1. Matérias-primas

- Pectina cítrica GENU® tipo USP (ref. 13596), grau de esterificação de 68% e peso molecular médio maior que 10^5 (fornecida gentilmente pela CPKelco, Brasil S/A).
- Caseína bovina (lote HA04037), Wenda Int.Trade Co.
- Aciclovir, Sigma Chemical, USA.
Lote 117F0756-A4669-Acycloguanosine, (99,6% de pureza, de acordo com o fornecedor).
- Aciclovir, grau farmacêutico, Galena, do Brasil.
- Quitosana (Hydagen® CMPF), Cognis, Brasil.
Grau de deacetilação DEA-80%, de acordo com o fornecedor (fornecida gentilmente pela Cognis, Brasil).

Obs: Todos os outros reagentes foram grau P.A ou equivalente.

3.2. Equipamentos

- Agitador mecânico Heidolph.
- Espectrofotômetro Beckman DU® 640.
- Centífuga Exelsa Baby II 206-R, FANEM.
- Microscópio Leica MPS 30.
- Moinho de bola, KM1 Lamedid S. A.
- Aparelho de *spray dryer* (LM-MSD 1.0, Labmac do Brasil Ltda).
- Potencial zeta, ZS90nano, Malvern.
- **Reômetro Rheotest, modelo 2.1.**

- **Microscópio Olympus, Bx60.**
- BAL-TEC SCD 050 sputter-coater
- Microscópio eletrônico de varredura (Jeol ® JSM-T330A)
- Aparelho de dissolução SOTAX AT7
- Bomba a vácuo (GALAI-DP)

4. Metodologia

4.1. Caracterização do fármaco modelo, aciclovir

4.1.1. Solubilidade do fármaco

Para determinação da solubilidade do fármaco em água destilada, tampão fosfato 0,2M (pH $6,8 \pm 0,1$), tampão fosfato isotônico (pH $7,4 \pm 0,1$) e HCl 0,1 M (pH $1,2 \pm 0,1$), uma quantidade em excesso do fármaco foi mantida sob agitação em um dos solventes até o equilíbrio (24 h). Após centrifugação e filtração, o fármaco foi quantificado no filtrado por espectrofotometria a 256 nm (espectrofotômetro Beckman DU[®] 640). As determinações foram realizadas em triplicatas.

4.1.2. Quantificação do fármaco (Determinação do pico de absorção máxima na região do UV e curva padrão do aciclovir)

Inicialmente foi realizado um espectro de varredura (200 - 400 nm) das soluções aquosas (HCl 0,1M, tampão fosfato 0,2 M e tampão fosfato isotônico pH 7,4) contendo o aciclovir em espectrofotômetro (Beckman DU[®] 640). O pico de absorção máxima ocorreu em 256 nm. A fim de descartar qualquer tipo de interferência dos polímeros, foi realizada a leitura à 256 nm das dispersões contendo os polímeros nos respectivos meios.

A curva padrão foi realizada com diluições da solução estoque de aciclovir, em triplicatas de diluição, no intervalo de 2 a 16 µg/mL em HCL 0,1 M (pH $1,2 \pm 0,1$) e tampão fosfato 0,2 M (pH $6,8 \pm 0,1$), e no intervalo de 4 a 20µg/mL em tampão fosfato isotônico (pH $7,4 \pm 0,1$). A leitura da absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro

(Beckman DU[®] 640) a 256 nm.

A curva padrão foi obtida relacionando-se os valores correspondentes à concentração do aciclovir ($\mu\text{g/mL}$) no eixo das abscissas (x) e os valores correspondentes à absorbância (nm) no eixo das ordenadas.

4.2. Validação do método para quantificação do aciclovir

A padronização da metodologia foi realizada em HCL 0,1 M ($\text{pH } 1,2 \pm 0,1$), tampão fosfato 0,2 M ($\text{pH } 6,8 \pm 0,1$) e tampão fosfato isotônico ($\text{pH } 7,4 \pm 0,1$). Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão intra-corrida (repetibilidade) e precisão inter-corrida, exatidão, limites de detecção e quantificação, de acordo com os procedimentos recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, descritos na Resolução nº899, de 29 de maio de 2003.

Linearidade

A linearidade de determinado procedimento analítico é a sua capacidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (coeficiente de correlação).

Para determinação da linearidade foram feitas análises de seis concentrações diferentes e construída uma curva padrão média que representa a média de 5 determinações ($n=5$). O valor mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$.

Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

A precisão intra-corrida foi avaliada em três concentrações diferentes (baixa, média e alta) com cinco réplicas de cada (n=5) e a precisão inter-corridas foi avaliada nas mesmas concentrações, em 5 dias diferentes (n=5).

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \text{DP}/\text{CMD} \times 100 \text{ (eq. 1)}$$

Onde, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável considerado foi de 5%.

Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado sob as condições experimentais estabelecidas, e foi determinado pela equação:

$$\text{LD} = \text{DP} \times 3 / \text{IC} \text{ (eq. 2)}$$

Onde, LD é o limite de detecção, DP é o desvio padrão obtido a partir da análise de 10 amostras de branco e IC é a inclinação da curva de calibração.

Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito contido na amostra que possa ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, e foi determinado pela equação:

$$LQ = DP \times 10 / IC \text{ (eq. 3)}$$

Onde, LQ é o limite de quantificação, DP é o desvio padrão obtido a partir da análise de 10 amostras de branco e IC é a inclinação da curva de calibração.

Exatidão

A exatidão do método é a proximidade dos resultados por ele obtida ao valor verdadeiro. A exatidão foi verificada em três concentrações (baixa, média e alta), com cinco réplicas cada e foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

4.3. Estudos do processo de coacervação – obtenção do complexo coacervado

A avaliação da potencialidade de certo par poliânion/policátion para formação de coacervados exige como ponto de partida inicial, a determinação de uma relação mássica entre as espécies e também de um intervalo de pH funcional que possibilitem a ocorrência do fenômeno de separação de fases (estudos de pré-formulação). Algumas metodologias experimentais têm sido propostas com o intuito de viabilizar a identificação do chamado “ponto ótimo”. No escopo deste trabalho metodologias distintas foram implementadas para a aquisição de dados e comparadas entre si de forma a identificar suas potencialidades e/ou limitações para o desenvolvimento de formulações otimizadas.

4.3.1. Determinação do Potencial Zeta (mobilidade eletroforética)

A carga dos políons na dispersão pode afetar o processo de coacervação (BURGESS; CARLESS, 1984). A mobilidade eletroforética (potencial zeta) surge como uma opção para avaliação da densidade de carga elétrica associada. Como ponto de partida, inicialmente, foi realizada a medida do potencial zeta (ZS90nano, Malvern) das dispersões aquosas contendo os polímeros isolados.

A preparação das amostras restringiu-se à solubilização de 1g das espécies de interesse em um volume total de 100mL de água purificada. Para determinação do potencial zeta nas dispersões, o ajuste de pH, necessário para a realização da medida foi feito por meio da adição de ácido acético 0,5 M ou NaOH 4 M, conforme a necessidade. A dispersão final foi então diluída 20 vezes em solução aquosa de NaCl 10 μ M antes de ser injetada no equipamento. O ensaio foi realizado em triplicata e a medida do potencial zeta foi considerada como a média de cinco determinações.

Posteriormente, foi realizada a medida do potencial zeta das dispersões de pectina/caseína, seguindo o procedimento descrito acima.

4.3.2. Estudo das melhores condições de preparo para obtenção do complexo coacervado

a) Pectina e Caseína (1:1) foram dispersas juntas em água em concentrações de sólidos totais de 2, 4, 6, e 8% p/v. O pH da dispersão foi elevado e mantido em $8,0 \pm 0,2$ com adição de solução de NaOH 4 M sob agitação mecânica (agitador Heidolph), velocidade de 400 rpm, por um período de 6 h a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após este período a dispersão final foi acidificada lentamente, em agitação constante, usando uma solução de ácido acético 0,5 M ajustando o

pH até $4,8 \pm 0,1$. O sistema foi mantido em agitação constante por mais 6 h a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

b) Pectina e Caseína foram dispersas separadamente, nas mesmas proporções e concentração de sólidos totais utilizadas anteriormente. O pH de cada dispersão foi ajustado e mantido em $8,0 \pm 0,2$, em seguida, a dispersão de caseína foi vertida sobre a dispersão de pectina em agitação (400 rpm). A dispersão final foi então acidificada lentamente, usando uma solução de ácido acético 0,5 M ajustando o pH até $4,8 \pm 0,1$. A formação de sistemas organizados no intervalo de pH (8,0, 7,0, 6,0, e $4,8 \pm 0,1$) foi monitorada por avaliação microscópica óptica convencional.

4.3.3. Determinação da extensão da complexação/coacervação: rendimento (peso do coacervado seco)

A hipótese que rege a implementação desta metodologia como ferramenta para a identificação do “ponto ótimo” de coacervação centra-se no fato de que esta técnica permite a quantificação do fenômeno por meio da determinação do peso (g) do coacervado na fase rica em polímero (s), ou seja, deste modo ela fornece subsídios da ocorrência da separação de fases (coacervação) e do rendimento do processo (BURGESS, 1990).

Amostras (10g) das dispersões contendo os polímeros foram centrifugadas por 40 minutos à 3500 rpm e em seguida foram mantidas em geladeira por 24 h para assegurar a complexação por completo. A fase líquida superior foi removida com o auxílio de uma pipeta, e o precipitado (coacervado) foi ressuspenso em 3,0 mL de água destilada e acondicionada em placas de petri mantidas em estufa a 50°C até peso constante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A extensão da coacervação (% p/v) foi obtida relacionando-se o peso do coacervado seco com o total de sólidos inicialmente adicionados à dispersão. As variáveis estudadas foram:

a) Influência do pH e do teor de sólidos no processo de coacervação. O rendimento do coacervado foi determinado variando o teor de sólidos da dispersão (4, 6 e 8 % p/v) em diferentes valores de pH (4 - 8), mantendo a relação mássica entre os polímeros 1:1.

b) Influência da relação mássica pectina/caseína. A partir dos resultados obtidos nas primeiras séries dos ensaios contendo diferente teor de sólidos totais, fixou-se a concentração em 6% (p/v). A fim de investigar a influência da relação mássica pectina/caseína (1:5, 1:2, 1:1) na obtenção e morfologia das partículas, bem como na extensão da coacervação, o rendimento do coacervado e o potencial zeta das dispersões foram determinados nos pHs 8,0 e $4,8 \pm 0,2$. A formação e a morfologia dos sistemas obtidos foi monitorada por microscopia óptica convencional.

c) Influência da força iônica no processo de coacervação. A partir dos resultados obtidos, neste ensaio o rendimento do coacervado foi determinado nas dispersões contendo crescentes concentrações de força iônica (0-100 mM de NaCl), mantendo constante o pH (4,0) e o teor de sólidos da dispersão em 6,0% (p/v).

4.3.4. Determinação da viscosidade das dispersões de pectina/caseína

A hipótese que rege a implementação da viscosimetria como ferramenta para a identificação do “ponto ótimo” de coacervação centra-se no fato de que, caso predomine a atração entre os biopolímeros em virtude de interações eletrostáticas, ocorre à separação de

fases do tipo associativa, resultando na formação do complexo proteína/polissacarídeo (coacervado). Verifica-se então a separação da mistura em duas fases. No entanto, uma fase rica em polímero(s) ($\uparrow$ viscosidade) e outra fase diluída, constituída essencialmente pelo solvente, portanto ($\downarrow$ viscosidade). Esta medida indica a presença de macromolécula livre, que não formou coacervado complexo, e serve como confirmação e/ou comparação com os resultados obtidos na mobilidade eletroforética e na extensão da coacervação.

Para o estudo da viscosidade as dispersões aquosas de pectina/caseína (1:1) foram preparadas nas concentrações de sólidos totais de 4, 6 e 8 % (p/v). As amostras foram homogeneizadas em agitador mecânico por 6 h. A seguir, o pH desejado (condições de pH iguais a 8, 7, 6, 5 e 4) foi ajustado com NaOH 4 M ou ácido acético 0,5 M quando necessário. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e deixadas em repouso em geladeira por 24 h para assegurar a complexação por completo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A viscosidade aparente das dispersões (fase diluída), a taxa de cisalhamento versus tensão de cisalhamento foi obtida em reômetro modelo Rheotest, utilizando dispositivo de medição com cilindros. As análises foram realizadas na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, após repouso da amostra por 12 h.

4.4. Secagem das micropartículas inertes *in natura*

Após a obtenção dos complexos coacervados (micropartículas *in natura*), as dispersões aquosas de pectina/caseína foram secas por atomização em *spray dryer* (modelo LM-MSD 1.0, Labmac do Brasil Ltda), com as seguintes características: câmara de secagem com altura de 50 cm e 9 cm de diâmetro, acoplada a uma base cônica com ângulo de 60° , bico atomizador do tipo duplo fluído, com mistura externa e orifício de saída de 1,2 mm. As condições operacionais utilizadas foram: temperatura do ar de entrada 100°C e saída $65^\circ\text{C} \pm$

2°C, pressão do ar comprimido 2 Kg/cm², pressão de ar 60 SCFH e vazão de alimentação da dispersão 3ml/min, regulada por bomba peristáltica (BACARAT, 2004).

4.5. Avaliação da integridade das micropartículas inertes submetidas a diferentes condições de pH

A fim de avaliar a resistência dos sistemas estudados nos diferentes meios de dissolução, após a secagem em spray dryer as micropartículas (50 mg) foram resuspensas nas soluções (6 mL): água destilada, HCL 0,1 M (pH 1,2 ± 0,1) e tampão fosfato 0,2 M (pH 6,8 ± 0,1). Em seguida as amostras foram agitadas em vórtex por 5 minutos e mantidas em repouso por 2 h. A integridade dos sistemas foi monitorada por microscopia óptica convencional e as fotografias foram obtidas no aumento de 200 vezes.

4.6. Avaliação da integridade das micropartículas inertes submetidas a diferentes condições de força iônica

A fim de avaliar a resistência dos sistemas desenvolvidos frente a diferentes condições de força iônica [NaCl], após a secagem em spray dryer as micropartículas (50 mg) foram resuspensas em soluções aquosas adicionadas de diferentes concentrações do sal: 20; 40; 60; 80; 100; 120 mMol. Em seguida as amostras foram agitadas em vórtex por 5 minutos e mantidas em repouso por 2 h. A integridade dos sistemas foi monitorada por microscopia óptica convencional e as fotografias foram obtidas no aumento de 200 vezes.

4.7. Caracterização das micropartículas inertes

4.7.1. Determinação do tamanho de partículas

A análise granulométrica das partículas foi obtida por microscopia óptica com luz incidente (microscópio Olympus, Bx60), e os diâmetros médio e máximo, foram avaliados com o auxílio do programa Image Pro-Plus.

As micropartículas secas obtidas a partir das dispersões em pHs 4,8 e 8,0, foram dispersas sobre uma lâmina de vidro utilizando uma bomba a vácuo (Galai PD-10) em ambiente fechado. A distribuição do tamanho das partículas foi expressa em % de frequência e % de frequência acumulada, sendo utilizado no estudo, uma média de 1000 partículas para análise de cada amostra.

A esfericidade das partículas também foi calculada através da fórmula:

$$\text{Esfericidade} = \frac{\text{Diâmetro médio}}{\text{Diâmetro máximo}} \quad (\text{eq. 5})$$

e, expressa em % de frequência.

4.8. Morfologia das micropartículas inertes

4.8.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da topografia externa foi realizada por fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura.

As amostras de micropartículas secas foram distribuídas sobre uma fita de cobre dupla-face, aderidas a um suporte de metal, e então, recobertas com ouro a vácuo (BAL-TEC SCD 050 sputter-coater) e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol ® JSM-T330A), utilizando-se um aumento de 2500 a 4000 vezes.

4.9. Redução no tamanho dos cristais de aciclovir (moinho de Agatha)

Considerando o tamanho das micropartículas obtidas nos ensaios anteriores e a fim de proporcionar uma boa eficiência de encapsulação do fármaco no sistema, foi realizada a redução no tamanho dos cristais do aciclovir (lote obtido do fornecedor). Uma quantidade suficiente do fármaco foi adicionada em moinho de Agatha, durante 24 h.

4.10. Estudo da influência das condições de preparo das micropartículas na encapsulação do fármaco

As micropartículas carregadas foram obtidas utilizando-se quatro condições de preparo com o objetivo de avaliar a influência destas condições de obtenção do complexo na encapsulação do aciclovir. Em todos os ensaios implementados foi mantida a relação mássica entre os polímeros de 1:1, o teor de sólidos totais foi fixado em 6% (p/v) e a concentração de aciclovir adicionada às dispersões nos primeiros ensaios foi de 30% p/p em relação ao teor de sólidos da dispersão. A agitação foi mantida em 400 rpm (Agitador mecânico Heidolph) e a temperatura em $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os valores de pH desejados foram obtidos com a adição de NaOH 4,0 M e ácido acético 0,5 M, quando necessário.

Primeiro método

Dispersou-se a caseína e a pectina juntas em água destilada com agitação mecânica constante. O pH da mistura foi ajustado para $8,0 \pm 0,2$ e mantido assim por 6 h. Após esse período, ainda sob agitação constante, adicionou-se o aciclovir à dispersão mantendo a agitação por mais 2 h. Em seguida, o pH do meio foi abaixado lentamente até $4,8 \pm 0,2$ e mantido sob agitação por mais 6 h. Estas micropartículas denominamos como **MCP1**.

Segundo método

Dispersou-se a pectina em água destilada ($\text{pH } 3,6 \pm 0,1$) sob agitação mecânica constante. Adicionou-se o aciclovir à dispersão mantendo a agitação durante um período de 6h. Após esse período adicionou-se a caseína também já dispersa em solução aquosa ($\text{pH } 8,0$), e ajustou-se o pH da dispersão final para $8,0 \pm 0,2$, mantendo o sistema em agitação por mais 6 h. Em seguida, ainda sob agitação constante, o pH do meio foi abaixado lentamente até $4,8 \pm 0,2$ mantido sob agitação por mais 6 h. Estas micropartículas denominamos como **MCP2**.

Terceiro método

Dispersou-se o aciclovir com a caseína em solução aquosa ($\text{pH } 8,0$), sob agitação mecânica constante, mantendo o pH da dispersão em $8,0 \pm 0,2$ por um período de 6 h. Após este período, sob agitação, adicionou-se a pectina já dispersa, ajustando o pH da dispersão final em $8,0 \pm 0,2$ por mais 6 h. Em seguida, ainda sob agitação constante, o pH do meio foi abaixado lentamente até $4,8 \pm 0,2$ mantido sob agitação por mais 6 h. Estas micropartículas denominamos como **MCP3**.

Quarto método

Dispersou-se separadamente a caseína e a pectina em água destilada, em agitação mecânica constante. Após completa solubilização, o pH de cada dispersão foi ajustado para $6,8 \pm 0,5$ com adição de solução de NaOH 4,0 M ou ácido acético 0,5 M, quando necessário. Em seguida, sob agitação, adicionou-se o aciclovir na dispersão de caseína mantendo a agitação por mais 15 minutos. Após este período, sob agitação, a dispersão de pectina foi vertida sobre a dispersão de caseína contendo o fármaco e mantida sob agitação por mais 30

minutos antes de ser acidificada. A dispersão final foi então gotejada lentamente em uma solução de ácido acético 0,5 M. Estas micropartículas denominamos como **MCP4**.

A formação de sistemas organizados em todas as condições realizadas e etapas do processo foi monitorada por avaliação microscópica óptica convencional.

As dispersões de pectina/caseína contendo as micropartículas carregadas (**MCP4**) foram escolhidas e secas por atomização em *spray dryer* (modelo LM-MSD 1.0, Labmac do Brasil Ltda), para isso foram utilizadas as mesmas condições operacionais descritas no item 4.4.

4.11. Estudo da influência da concentração do fármaco no rendimento e na eficiência da encapsulação (recuperação total)

Neste estudo investigou-se o efeito da variação na concentração de aciclovir, no rendimento e na eficiência de encapsulação do fármaco nas micropartículas obtidas. Para isso foram avaliadas três formulações. A condição de obtenção escolhida foi a utilizada no *quarto método* (**MCP4**), descrito no item anterior (4.10.). A concentração do fármaco foi variada em 30%, 60%, 100% (p/p) em relação ao teor de sólidos da dispersão (fixado em 6% p/v).

4.11.1. Determinação do conteúdo total de fármaco nas micropartículas secas (recuperação)

Para a determinação do conteúdo total de fármaco contido nos sistemas, foram realizados dois ensaios comparativos. No primeiro, uma amostra (50 mg) de micropartículas

secas foi dispersa em solução aquosa de tampão fosfato 0,2 M, pH $6,8 \pm 0,1$ (onde ocorre rompimento das partículas) e então submetida à agitação em vórtex por cinco minutos e, em seguida centrifugada (Excelsa Baby II 206-R, Fanem) a 4000 rpm por 10 minutos. A quantidade de fármaco contida no sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (Beckman DU[®] 640) a 256 nm. A absorção de cada amostra foi corrigida fazendo-se a leitura contra um branco (micropartículas inertes).

No segundo ensaio foi realizada a recuperação do fármaco por extração exaustiva em meio ácido. Uma amostra (50 mg) de micropartículas secas foi dispersa em solução de HCl 0,1 M e então submetida à agitação em vórtex por cinco minutos e, em seguida centrifugada (Excelsa Baby II 206-R, Fanem) a 4000 rpm por 10 minutos. As micropartículas foram lavadas seguindo o mesmo procedimento por mais seis vezes. A quantidade de fármaco contida no sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (Beckman DU[®] 640) a 256nm. A absorção de cada amostra foi corrigida fazendo-se a leitura contra um branco (micropartículas inertes).

As quantificações das amostras foram realizadas em triplicata. A somatória do material recuperado nas extrações em meio ácido, bem como na extração em tampão fosfato foi considerado como o aciclovir total recuperado na amostra. Após a última extração em meio ácido, foi realizada a microscopia óptica do precipitado para confirmar a ausência de cristais do fármaco dentro ou aderido na superfície das micropartículas e ainda confirmar a integridade das mesmas.

O teor do fármaco foi determinado pela fórmula:

$$\text{Teor recuperado (\%)} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{eq. 6})$$

Paralelamente, foi realizada a quantificação (massa equivalente a contidas nas micropartículas) do teor (pureza) do fármaco na forma livre (lote obtido do fornecedor) nas soluções extrativas. O teor do fármaco foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\text{concentração da amostra}}{\text{concentração do padrão}} \times 100 \quad (\text{eq. 7})$$

4.12. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do aciclovir contido nas micropartículas

A liberação do fármaco das micropartículas carregadas (30%, 60%, 100% p/p) foi realizada em “sink conditions” no aparelho de dissolução SOTAX AT7. Para isso, 50 mg de micropartículas secas foram pesadas e acondicionadas no aparato 1 (cestas adaptadas), que foi então adicionado nas cubas de dissolução. Foi utilizado como meio de dissolução, 500 mL de HCl 0,1 M pH $1,2 \pm 0,1$, simulando as condições de pH do suco gástrico. O teste foi realizado em triplicata, sob condições de temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e velocidade de agitação de 50 rpm, seguindo as especificações da Farmacopéia Americana 23^{ed}.

As alíquotas (5 mL) foram retiradas periodicamente (15-360 min), filtradas em papel de filtro quantitativo Whatman 44. Em seguida, foi realizado a reposição do meio de dissolução. A quantidade de fármaco liberada foi quantificada em espectrofotômetro a 256 nm. As concentrações foram calculadas através da curva padrão, avaliando-se assim a porcentagem de liberação do fármaco por unidade de tempo e o perfil de liberação do aciclovir nas micropartículas.

Um controle positivo foi feito com o aciclovir livre (massa equivalente/lote fornecedor). A absorção de cada amostra foi corrigida fazendo-se a leitura contra o branco (micropartículas vazias).

4.13. Preparação das micropartículas carregadas com aciclovir e revestidas com solução de quitosana

A partir dos resultados dos ensaios anteriores, as micropartículas carregadas (**MCP4 60%** p/p de aciclovir), foram revestidas com solução de quitosana a fim de observar possíveis alterações no perfil de liberação do fármaco.

A dispersão obtida foi lavada com água destilada por três vezes em centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos. Após a lavagem o precipitado foi separado e o sobrenadante foi então centrifugado novamente a fim de recuperar as micropartículas remanescentes. Após a última lavagem as micropartículas carregadas (precipitado) foram adicionadas em agitação na solução de quitosana 1% p/v em ácido acético 0,5 M. A relação de quitosana/complexo foi de 1:12.

A mistura final foi mantida em agitação a 400 rpm por 3 h, e em seguida, mantida em geladeira por 24 h. Após este período a dispersão foi seca em *spray dryer* conforme descrito no item 4.4.

Para a determinação do conteúdo total de fármaco contido nos sistemas, o procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.11.1 e a liberação do fármaco das micropartículas conforme procedimento descrito no item 4.12.

Estas micropartículas denominamos de **MCP4Q 60%**.

4.14. Obtenção de comprimidos matriciais

4.14.1. Confecção das matrizes

Os comprimidos matriciais foram obtidos mediante a compactação direta do pó obtido com as micropartículas secas (**MCP4 60% e MCP4Q 60%**). Para efeito de comparação foi realizada a compactação direta da simples mistura física do pó contendo os polímeros e o fármaco, com massas equivalentes ao contido nas micropartículas carregadas. Foi utilizado um par de punções de diâmetro de 10 mm, planos, adaptado a uma prensa hidráulica (Carver Laboratories Press), com força correspondente a 4000 libras. O peso médio das matrizes obtidas foi de 550 mg.

4.15. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do aciclovir contido nas matrizes, com alteração do pH

As matrizes obtidas pela compactação direta também foram avaliadas no aparelho de dissolução SOTAX AT7. Para isso, as matrizes ($\cong 550$ mg (equivalentes a $\cong 190$ mg de aciclovir) foram adicionadas às cubas de dissolução, utilizando o aparato 2 (pá), agitação de 50rpm e temperatura de $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Neste estudo, seguindo as especificações da Farmacopéia Americana 23^{ed} para ensaios de liberação lenta, foi utilizado como meio de dissolução 750ml de HCl 0,1 M (pH $1,2 \pm 0,1$) durante 2 h, e em seguida foi adicionado às cubas 250 mL de tampão fosfato de sódio tribásico 0,2 M, ajustando o pH do meio para $6,8 \pm 0,1$, conduzindo o estudo por mais 10 h.

As alíquotas (5 mL) foram retiradas periodicamente, filtradas em papel de filtro quantitativo Whatman 44, em seguida foi realizado a reposição do meio de dissolução. A quantidade de fármaco liberada foi quantificada em espectrofotômetro a 256 nm. As concentrações foram calculadas através da curva padrão, avaliando-se assim a (%) de liberação do fármaco por unidade de tempo, e o perfil de liberação do aciclovir nas formulações.

Um controle positivo foi feito com comprimidos de aciclovir (medicamento

genérico, 200 mg). A absorção de cada amostra foi corrigida fazendo-se a leitura contra o branco (matriz composta pelas micropartículas inertes e matriz composta pela simples mistura física inerte).

4.16. Estudos de intumescimento (GI%) e erosão (GE%) das matrizes

Essa determinação foi feita baseando-se no trabalho publicado por EFENTAKIS *et al.* (2000). A taxa de penetração do meio do teste dentro das matrizes e a taxa de erosão foram determinadas depois da imersão destas nos meios de dissolução.

As matrizes secas foram colocadas dentro das cestas (utilizadas no aparelho de dissolução, Sotax AT7) e pesadas em balança analítica. Em seguida, as cestas foram imersas nas cubas de dissolução, utilizando agitação de 50 rpm e temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Neste estudo foi utilizado como meio teste, 750 mL de HCl 0,1 M (pH $1,2 \pm 0,1$) durante 2 h, e em seguida foi adicionado às cubas 250 mL de tampão fosfato de sódio tribásico 0,2 M, ajustando o pH do meio para $6,8 \pm 0,1$, conduzindo o estudo por mais 8 h.

Após o intervalo de tempo selecionado, a cesta foi retirada e ligeiramente seca em papel absorvente para remover o excesso de água e, em seguida, pesada para registrar a diferença de massa comparada à amostra que não foi submetida ao teste.

Posteriormente, as amostras foram então secas em estufa à 60°C, até peso constante para possibilitar o cálculo da erosão. Três diferentes amostras foram medidas para cada intervalo de tempo.

O aumento de peso devido à captação de líquido (GI%) foi determinado seguindo a equação:

$$GI = (PF - Pi) / Pi \times 100 \quad (\text{eq. 8})$$

Onde, GI, é a porcentagem do grau de intumescimento, Pi é o peso inicial da matriz seca e Pf

é o peso da matriz hidratada, depois de determinado período de tempo.

E a perda de peso (GE%) foi determinada seguindo a equação:

$$GE = (PF - Pi) / Pi \times 100 \quad (\text{eq. 9})$$

Onde, GE, é a porcentagem do grau de erosão, Pi é o peso inicial da matriz seca e Pf é o peso da matriz após secagem em estufa, depois de determinado período de tempo.

4.17. Cálculo da cinética das reações de liberação e mecanismos que controlam a liberação

A cinética das reações de liberação foi analisada aplicando três modelos matemáticos, visando à determinação da ordem do processo:

- 1) Cinética de ordem zero: para cada formulação foram plotados gráficos de tempo *versus* quantidade total (Qx) menos quantidade dissolvida do fármaco (Q) (t x Qx-Q);
- 2) Cinética de 1º ordem: para cada formulação foram plotados gráficos de tempo *versus* log da quantidade remanescente (t x log % ND);
- 3) Modelo de Higuchi: para cada formulação foram plotados gráficos da raiz quadrada do tempo *versus* quantidade dissolvida do fármaco ($\sqrt{t}$ x %D);

O modelo mais adequado para descrever a cinética de dissolução do aciclovir para cada formulação foi selecionado após a construção dos gráficos acima mencionados e análise de regressão linear realizado no intervalo em que as formulações permaneciam liberando o fármaco. Essa seleção foi baseada nos valores de r^2 provenientes da regressão linear.

Além desta avaliação, foi calculado o valor de n , a partir da equação de KORSMEYER *et al.* (1983).

$$Mt/M_{\infty} = Kt^n \quad (\text{eq. 10})$$

Onde, Mt = quantidade de fármaco liberado no tempo t; M_{∞} = quantidade total do

fármaco; K = constante de cinética; n = expoente que caracteriza o mecanismo de transporte de liberação do fármaco.

Quando o valor de $n=0,45$, predomina o transporte caso I (difusão Fickiniana), de $0,45 < n < 0,89$ indica uma cinética do tipo anômala (não Fickiniana), e $n=0,89$ indica contribuição do transporte caso II, mecanismo tipo erosional.

4.18. Determinação do conteúdo total e da eficiência de encapsulação do aciclovir contido nas micropartículas em dispersão (recuperação)

Para a determinação do conteúdo total (recuperação) e da eficiência de encapsulação de fármaco contido nos sistemas em dispersão, foi realizada a extração exaustiva em meio ácido, para isso, uma amostra (1mL) de micropartículas *in natura* (**MCP4 60% e MCP4Q 60%**) foi dispersa em solução de HCl 0,1 M, e então submetida à agitação em vórtex por cinco minutos e em seguida centrifugada (Excelsa Baby II 206-R, Fanem) a 4000 rpm por 10 minutos. As micropartículas foram lavadas seguindo o mesmo procedimento por mais seis vezes (extração exaustiva). A quantidade de fármaco contida no sobrenadante após cada extração foi determinada em espectrofotômetro (Beckman DU[®] 640) a 256 nm. A absorção de cada amostra foi corrigida fazendo-se a leitura contra um branco (dispersão das micropartículas inertes).

As quantificações das amostras foram realizadas em triplicata. A somatória do material recuperado nas extrações em meio ácido, foi considerada como o aciclovir total recuperado na amostra. Após a última extração em meio ácido, foi realizada a microscopia óptica do precipitado para confirmar a ausência de cristais do fármaco e ainda confirmar a integridade dos sistemas.

O teor do fármaco foi determinado pela fórmula:

$$\text{Teor recuperado (\%)} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{eq. 11})$$

$$\text{EE (\%)} = \% \text{ total do fármaco recuperado} - \% \text{ livre do fármaco} \quad (\text{eq. 12})$$

Onde, % livre do fármaco = concentração do fármaco obtido na 1ª lavagem (extração HCl 0,1 M).

4.19. Estudos *in vitro* de liberação do aciclovir contido nas dispersões de micropartículas

Foram realizados estudos de liberação *in vitro* do fármaco contido nas dispersões de micropartículas (**MCP4 60% e MCP4Q 60%**).

Foi utilizada uma célula de difusão adaptada contendo membrana de acetato de celulose com área de difusão de 3 cm². O compartimento receptor (cuba) foi preenchido com 350 mL de tampão fosfato isotônico pH 7,4 ± 0,1.

Um total de 1 mL (≅1g) da formulação foi homogeneizado em 2 mL de água destilada e então aplicado sobre a membrana. Os experimentos foram realizados a 37 ± 0,1°C por 8 h, sob velocidade de agitação constante de 100 rpm. Em tempos pré-determinados alíquotas (1 mL) da solução receptora foram coletadas e filtradas para posterior quantificação do fármaco em espectrofotômetro a 256 nm. Após a retirada das amostras, houve a reposição do meio de dissolução.

Um controle positivo foi feito com uma suspensão aquosa de aciclovir (massa equivalente). A absorção de cada amostra foi corrigida fazendo-se a leitura contra o branco (dispersão de micropartículas inertes).

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização do fármaco modelo, aciclovir.

5.1.1 Solubilidade do fármaco

A solubilidade do aciclovir em água, HCl 0,1 M pH $1,2 \pm 0,1$, Tampão fosfato 0,2 M pH $6,8 \pm 0,1$ e tampão fosfato isotônico pH $7,4 \pm 0,1$ está descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Solubilidade do aciclovir em diferentes meios de dissolução.

Solvente	Dados experimentais	Literatura
Água	1,6 mg/mL	1,3 mg/mL Pouco solúvel
HCl 0,1 M	16,5 mg/mL	Muito solúvel
Tampão fosfato 0,2 M pH 6,8	2,0 mg/mL	Pouco solúvel
Tampão fosfato isotônico pH 7,4	2,8 mg/mL	1,3 mg/mL Pouco solúvel

5.2. Validação do método para quantificação do aciclovir

5.2.1. Padronização do método em meio ácido

O espectro de varredura da solução aquosa (HCL 0,1 M) de aciclovir mostrou maior absorbância em 256 nm e as leituras realizadas para a construção da curva padrão foram feitas neste comprimento de onda.

A curva padrão obtida em meio ácido está apresentada na Figura 5 e representa a média de 5 determinações. A equação da reta também pode ser observada na mesma figura e como pode ser verificado pelo valor de r , o método apresentou linearidade.

Figura 5. Curva padrão do aciclovir em meio ácido (HCl 0,1 M).

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,22µg/mL e 0,73µg/mL, respectivamente.

A Tabela 4 apresenta os valores de desvio padrão relativo intra-corrida e inter-corrida, assim como os valores de exatidão calculados nas concentrações estudadas. O método foi preciso apresentando valores de desvio padrão relativo inferior a 5% em todas as concentrações e por isso foi considerado satisfatório.

A determinação da exatidão nas concentrações estudadas apresentou valores entre 98,3% e 102,37%.

Tabela 4. Parâmetros analíticos avaliados na padronização de metodologia em meio ácido.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão Relativo intra-corrida	Exatidão (%) Intra-corrida	Desvio Padrão Relativo inter- corrida	Exatidão (%) Inter-corrida
4,0 $\mu\text{g/mL}$	0,54	99,27	3,70	99,10
10,0 $\mu\text{g/mL}$	0,46	98,64	0,81	98,30
16,0 $\mu\text{g/mL}$	0,22	102,37	2,99	100,41

5.2.2. Padronização do método em tampão fosfato 0,2 M pH $6,8 \pm 0,1$

O espectro de varredura da solução aquosa (tampão fosfato 0,2 M) de aciclovir mostrou maior absorbância em 256 nm e as leituras realizadas para a construção da curva padrão foram feitas neste comprimento de onda.

A curva padrão obtida em tampão fosfato está apresentada na Figura 6 e representa a média de 5 determinações. A equação da reta também pode ser observada na mesma figura e como pode ser verificado pelo valor de r , o método apresentou linearidade.

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 0,34 $\mu\text{g/mL}$ e 1,134 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 6. Curva padrão do aciclovir em tampão fosfato pH $6,8 \pm 0,1$.

A Tabela 5 apresenta os valores de desvio padrão relativo intra-corrida e inter-corrida, assim como os valores de exatidão calculados nas concentrações estudadas. O método foi preciso apresentando valores de desvio padrão relativo inferior a 5% em todas as concentrações e por isso foi considerado satisfatório.

A determinação da exatidão nas concentrações estudadas apresentou valores entre 98,73% e 100,00%.

Tabela 5. Parâmetros analíticos avaliados na padronização de metodologia em tampão fosfato 0,2 M.

Concentração (µg/mL)	Desvio Padrão Relativo intra-corrida	Exatidão (%) Intra-corrida	Desvio Padrão Relativo inter- corrida	Exatidão (%) Inter-corrida
4,0µg/mL	0,48	98,95	1,87	99,88
10,0µg/mL	1,25	98,73	4,27	99,35
16,0µg/mL	0,62	99,36	0,86	100,0

5.2.3. Padronização do método em tampão fosfato isotônico pH $7,4 \pm 0,1$

O espectro de varredura da solução aquosa (tampão fosfato isotônico) de aciclovir mostrou maior absorbância em 256 nm e as leituras realizadas para a construção da curva padrão foram feitas neste comprimento de onda.

A curva padrão obtida em tampão fosfato isotônico está apresentada na Figura 7 e representa a média de 5 determinações. A equação da reta também pode ser observada na mesma figura e como pode ser verificado pelo valor de r , o método apresentou linearidade.

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $0,031\mu\text{g/mL}$ e $0,1036\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 7. Curva padrão do aciclovir em tampão fosfato isotônico pH $7,4 \pm 0,1$.

A Tabela 6 apresenta os valores de desvio padrão relativo intra-corrida e inter-corrida, assim como os valores de exatidão calculados nas concentrações estudadas. O método

foi preciso apresentando valores de desvio padrão relativo inferior a 5% em todas as concentrações e por isso foi considerado satisfatório.

A determinação da exatidão nas concentrações estudadas apresentou valores entre 97,91% e 105,31%.

Tabela 6. Parâmetros analíticos avaliados na padronização de metodologia em tampão fosfato isotônico.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio Padrão Relativo intra-corrida	Exatidão (%) Intra-corrida	Desvio Padrão Relativo inter-corrida	Exatidão (%) Inter-corrida
4,0 $\mu\text{g/mL}$	2,19	105,31	3,49	100,18
8,0 $\mu\text{g/mL}$	1,62	103,04	3,39	97,91
20,0 $\mu\text{g/mL}$	0,63	103,58	1,71	101,23

5.3. Estudos do processo de coacervação: obtenção do complexo coacervado

5.3.1. Determinação do potencial zeta (mobilidade eletroforética)

Nos colóides hidrofílicos (hidrocolóides), a afinidade que as partículas possuem pela água resulta da presença de certos grupos polares na superfície das partículas. As cargas localizadas na superfície (cargas primárias), devido à dissociação dos grupos polares são responsáveis por um campo eletrostático que é fator determinante da estabilidade do sistema coloidal. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície, portanto, a carga primária das partículas atrai carga oposta, e teoricamente, poderia ser completamente

neutralizada pelos íons de cargas opostas (LE ROY BOEHM; FESSI, 2000).

Diferentes metodologias experimentais têm sido propostas buscando mecanizar e otimizar o desenvolvimento de formulações (relação mássica entre os polieletrólitos) e também estabelecer as condições de processo (ex: intervalo de pH, força iônica) adequadas para a encapsulação de ativos de interesse por meio do processo de coacervação complexa. Uma primeira metodologia avaliada no escopo deste trabalho corresponde a determinação da mobilidade eletroforética (potencial zeta) da espécie coloidal em solução para diferentes condições de pH do meio com o intuito de identificar e, portanto, inferir a melhor condição de pH para ocorrer a complexação, ou seja, o ponto de equivalência elétrica para um dado sistema (par) de interesse. O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão.

A representação gráfica dos valores de mobilidade eletroforética (potencial zeta) das soluções contendo a espécie coloidal em função do pH pode ser observada nas figuras a seguir.

Figura 8. Medidas do potencial zeta das dispersões aquosas de pectina após ajuste em vários pHs.

Figura 9. Medidas do potencial zeta das dispersões aquosas de caseína após ajuste em vários pHs.

Para efeito de ilustração destaca-se o exemplo de uma proteína dispondo de grupos funcionais amina (-NH_2) e carboxila (-COOH) ao longo de sua estrutura. A redução do pH promove a redução do grau de dissociação do grupo carboxílico ($\text{-COO}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{-COOH}$) ao mesmo tempo que promove elevação do grau de ionização dos grupos amina ($\text{-NH}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{-NH}_3^+$). Tomando-se como exemplo um polissacarídeo dispondo de grupos funcionais carboxila, tem-se que a elevação do pH promove elevação do grau de dissociação do grupo carboxílico ($\text{-COO}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{-COOH}$). A condição para a qual fica preservada a neutralidade elétrica de uma dada espécie denomina-se ponto isoelétrico (pI).

A Figura 10 apresenta os perfis de mobilidade eletroforética em função do pH para as amostras dos polímeros pectina e caseína. O ponto isoelétrico experimentalmente identificado para a amostra de caseína corresponde a aproximadamente $\text{pH}=4,7$ (Figura 9), e sendo uma proteína, destaca-se que a macromolécula apresenta densidade de carga positiva (líquida) para condições de pH ácidos com relação ao pI e uma densidade de carga negativa (líquida) para condições de pH básicos com relação ao pI. Acima do seu ponto isoelétrico, ($\text{pI} = 4,6$, dados da literatura científica) apresenta valor de potencial zeta negativo, como confirmado experimentalmente, e abaixo do pI, teoricamente apresenta valor de potencial zeta positivo. Entretanto abaixo do pI, nas condições utilizadas, a caseína precipita, tornando impossível a realização da determinação experimental do potencial zeta abaixo deste pH.

Para o polissacarídeo pectina, podemos observar que a partir do pH 3,0, próximo ao pK_a da pectina (3,6 – 4,1, dados da literatura científica) a amostra já apresenta um valor de potencial zeta ligeiramente negativo, o qual é intensificado em módulo a medida que o valor de pH da dispersão é elevado e os grupos carboxílicos já se encontram na forma dissociada (-COO^-), (Figura 9).

Considerando-se a necessidade de neutralização mútua das espécies dispondo de cargas de sinais opostos tem-se que o intervalo de pH funcional para o sistema em questão

corresponde a valores de pH próximos e inferiores a 4,7. A maior interação (coacervação máxima) entre os polímeros deve ocorrer no pH da dispersão em que os colóides encontram-se carregados com densidade de cargas iguais, porém opostas (ponto de equivalência), provavelmente próximo ao pH 4,0.

Figura 10. Perfis de mobilidade eletroforética em função do pH para as dispersões aquosas de pectina (—○—), caseína (—□—).

Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura. A interação entre a pectina e a proteína do suco de tomate foi relatada inicialmente por TAKADA e NELSON (1983). Esses autores demonstraram que o maior nível de interação por carga ocorre quando o valor de pH da dispersão encontra-se entre o ponto isoelétrico da proteína (pI) e o pKa da pectina, enquanto as interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio formam-se entre a pectina e a proteína, quando os valores de pH encontram-se acima do pI da proteína.

A interação entre a caseína e a pectina vem sendo exaustivamente explorada na área alimentícia (DICKINSON, 1998; SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998;

MAROZIENE; KRUIF, 2000; SEDLMAYER *et al.*, 2004; EINHORN-STOLL *et al.*, 2005), sobretudo em produtos lácteos acidificados, tais como iogurtes, nos quais a pectina desempenha um papel importante no processo de estabilização da caseína, garantindo as características originais desejáveis dos produtos durante a sua validade. Foi demonstrado que, nestes sistemas, no intervalo de pH (4,0-5,3) a pectina adsorve na superfície das micelas de caseína presentes no leite evitando a floculação e agregação das mesmas. Entretanto, isto só ocorre nesta estreita faixa de pH próximo ao pI da proteína, onde as mesmas se encontram com um balanço de cargas opostas, promovendo a adsorção do polissacarídeo (MAROZIENE; KRUIF, 2000; KRUIF; TUINIER, 2001; TUINIER *et al.*, 2002; TROMP *et al.*, 2004).

A interação entre a proteína e o polissacarídeo e, portanto, a estabilidade dos produtos lácteos acidificados é dependente do pH, da concentração e do tipo de pectina utilizada, da força iônica no meio e também do processo de homogeneização e tratamento térmico utilizado. Como estes produtos podem ser comercializados na forma fresca ou pasteurizados, recentemente SEJERSEN *et al.* (2006) estudaram a influência da concentração de pectina (alta metoxilação) e do tratamento térmico na estabilidade destes produtos. A avaliação foi realizada através da medida de mobilidade eletroforética (potencial zeta) e microscopia óptica das amostras.

Nos estudos realizados com o leite reconstituído sem a adição de pectina, o valor do potencial zeta obtido na amostra do leite em pH 6,7 (pH natural) foi de $-34,6 \text{ mV} \pm 3,6$, o qual é numericamente semelhante ao encontrado em nossos estudos. À medida que a amostra foi acidificada (pH 4,7 – pH 4,05), o valor do potencial muda de negativo para positivo, com pI em pH 4,4 apresentando um valor de potencial de $+20 \text{ mV} \pm 2$ em pH 4,05. A adição de pectina (pH 4,05) em ambos os leites acidificados, tratados e não tratados termicamente,

promove uma alteração significativa no valor do potencial zeta, que muda de positivo para negativo.

Os resultados obtidos em nosso estudo estão de acordo com os dados de outros autores (PARKER, 1994; ROLLIM, 2002). Isto provavelmente ocorre pela eletroadsorção das moléculas de pectina carregadas negativamente nas micelas de caseína. Ainda no estudo desenvolvido por SEJERSEN *et al.* (2006), os autores demonstraram que quanto maior a concentração de pectina adicionada, mais negativo em módulo o valor do potencial zeta, indicando maior adsorção do polissacarídeo. Estes dados são confirmados na microscopia óptica que demonstra que o aumento da concentração de pectina promove diminuição na capacidade de floculação das micelas de caseína e conseqüentemente o sistema torna-se estável.

O tratamento térmico no leite acidificado contendo pectina resulta numa diminuição numérica do valor do potencial, provavelmente pela dessorção parcial e/ou rearranjo da pectina. Isto explica a maior floculação e agregação das micelas e, portanto, maior instabilidade do sistema.

Ainda recentemente YE *et al.* (2006) avaliaram a formação de nanopartículas através da complexação eletrostática entre caseinato de sódio e goma arábica. Os autores monitoraram a formação dos complexos no intervalo de pH (2-7) e verificaram a influência da força iônica e do teor de sólidos totais na complexação, através das medidas de turbidimetria e da mobilidade eletroforética e compararam com os resultados de microscopia. A solução de caseinato de sódio (0,1% p/v) apresentou valor de potencial zeta negativo na faixa de pH 5,4 – 6,5, com valores de aproximadamente -28 mV. O ponto isoelétrico da amostra foi obtido em pH 4,7 e, à medida que a solução foi acidificada, o valor do potencial mudou de negativo para positivo, apresentando um valor de potencial de +16 mV $\pm$ 2 em pH 4,0 e + 25 mV em pH 2,0. A adição de goma arábica (0,1% e 0,5% p/v) promove um abaixamento no ponto

isoelétrico do complexo para pH 3,0 e pH 2,5, respectivamente. Ainda nesse estudo, fica claro que o aumento na concentração de goma arábica no sistema resulta na necessidade de valores de pH mais baixo para a ocorrência da neutralização entre as espécies.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo e são bem semelhantes aos nossos dados de mobilidade eletroforética no intervalo de pH de 6,5-4,7. Essa semelhança deve-se principalmente ao fato dos autores também utilizarem caseinato de sódio na obtenção do complexo. Infelizmente nos nossos estudos não foi possível determinar as mudanças na mobilidade eletroforética abaixo do pI da amostra de caseína (caseinato de sódio), uma vez que ocorreu a precipitação da proteína.

5.4. Estudos das melhores condições de obtenção do complexo coacervado

De acordo com a proposta apresentada por BURGESS e CARLESS (1984), a relação existente entre os valores de mobilidade eletroforética para uma dada condição de pH equivale a relação mássica entre as espécies necessária para satisfação da condição de equivalência elétrica exigida pelo sistema para ocorrência do fenômeno de coacervação complexa, ou seja, ressalta-se a coincidência (em módulo) dos valores de mobilidade eletroforética para as duas espécies de interesse. A aquisição preliminar de dados por intermédio da metodologia acima descrita, impossibilitou-nos inferir o chamado “ponto ótimo”, melhor condição de pH, ou seja, o ponto de equivalência elétrica para o par de interesse e com isso a melhor relação poliânion:polycation, devido a impossibilidade de determinar o potencial zeta das amostras de caseína abaixo do pI, como já citado anteriormente. É valioso destacar que a proposta apresentada por BURGESS e CARLESS (1984) leva em consideração que a mobilidade eletroforética seja função única e exclusiva da densidade de carga elétrica associada, ignorando a possível contribuição de efeitos estéricos (conformação das macromoléculas), normalmente envolvidos quando considerados proteínas e polissacarídeos.

Como não existem dados na literatura demonstrando a utilização da pectina e da caseína (caseinato de sódio) juntas formando complexos coacervados (separação de fase associativa), portanto, como referência optamos por utilizar os resultados obtidos nos estudos de estabilização dos produtos lácteos acidificados pela pectina, bem como os dados obtidos em estudos que utilizaram nos sistemas caseinato de sódio ou a β - Lactoglobulina isolada do soro de leite, complexada com outros polissacarídeos (carragenina ou goma arábica). Como já descrito anteriormente, na maioria dos trabalhos realizados fica evidente que na faixa de pH próxima ao pI da caseína (4,5 – 5,5) ocorre a adsorção da pectina pelas micelas de caseína. Apesar de utilizarmos caseinato de sódio (agregados) e não propriamente o leite (caseína micelar), a nossa hipótese foi que nesta faixa de pH poderia ocorrer a complexação e posterior coacervação com o par utilizado no nosso sistema.

Como ficou inviável determinar a melhor relação poliânion:polication por intermédio da metodologia do potencial zeta, inicialmente optamos por trabalhar com a relação mássica entre os polímeros de 1:1 e variar o teor de sólidos totais da dispersão. Entretanto, é valioso ressaltar que os dados obtidos com a mobilidade eletroforética forneceram subsídios para posterior comparação com os resultados obtidos por outras metodologias que foram implementadas na sequência do trabalho.

5.4.1. Influência das condições de preparo do complexo

Como descrito no item 4.3.2, o hidrogel pôde ser obtido de duas maneiras. Pectina e caseína (1:1) foram dispersas juntas em água em concentrações de sólidos totais de 2, 4, 6, 8 % (p/v). O pH foi elevado com adição de solução de NaOH 4 M e mantido em $8,0 \pm 0,2$ por 6h sob agitação mecânica, velocidade de 400 rpm, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após este período, foi adicionado ácido acético 0,5 M e o pH foi reduzido a $4,8 \pm 0,1$. O hidrogel pôde ainda ser

obtido dispersando-se a pectina e a caseína separadamente, nas mesmas proporções e concentrações de sólidos totais e somente depois de acertado o pH de cada dispersão para 8,0, a caseína foi vertida sobre a pectina em agitação. O pH da dispersão final foi então reduzido a $4,8 \pm 0,1$ com ácido acético 0,5 M. Vale ressaltar que a necessidade do pH alcalino (8,0) ocorre porque nesse pH a caseína se encontra completamente dispersa.

Qualquer que seja a condição de preparo do complexo, dispersando os polímeros juntos, ou separadamente, e em seguida ajustando o pH da dispersão próximo a pH $8,0 \pm 0,2$, ocorreu a formação de sistemas microestruturados (Figura 11). Entretanto, quando os polímeros são dispersos juntos, foi necessário um tempo maior de agitação para a obtenção dos sistemas, ao contrário, quando dispersos separadamente e em seguida misturados, a formação foi imediata (espontânea).

Figura 11. Fotomicrografias representativa das dispersões de pectina/caseína (1:1) *in natura* em vários pHs. Aumento de 400X.

incompatibilidade termodinâmica (TOLSTOGUZOV, 1991; GRINBERG; TOLSTOGUZOV,

1997; DOUBLIER *et al.*, 2000). Quando as interações polímero-solvente estão favorecidas em detrimento às interações entre os dois polímeros (incompatibilidade termodinâmica - repulsão de cargas), a separação de fases diz-se segregativa e, neste caso, cada uma das fases é mais concentrada num dos biopolímeros.

Já a complexação ocorre quando a interação entre os dois biopolímeros é favorecida, podendo levar à formação de complexos solúveis (fase única) ou complexos insolúveis (separação de fase associativa/ coacervação), dependendo da afinidade entre os polímeros e o solvente. Na complexação, o sistema constituído por uma única fase é obtido quando os polímeros carregam cargas opostas, porém desiguais em número, possibilitando a solubilização do complexo por interação com as moléculas do solvente. Ao contrário, na separação de fase associativa, formam-se coacervados entre o polissacarídeo e a proteína, e a coacervação máxima ocorre quando os polímeros apresentam cargas iguais e opostas, tornando o complexo insolúvel.

De acordo com vários autores, o fenômeno de incompatibilidade termodinâmica é observado nos estudos em que se utiliza a pectina na estabilização do leite (acidificação). Acima do pH 5,3, o polissacarídeo não adsorve nas micelas de caseína levando a uma separação de fase segregativa (DICKINSON, 1998; SYRBE; BAUER; KLOSTERMEYER, 1998; MAROZIENE; KRUIF, 2000; KRUIF; TUINIER, 2001; TUINIER; ROLLIN; KRUIF, 2002; SEDLMAYER *et al.*, 2004; TROMP *et al.*, 2004; EINHORN-STOLL *et al.*, 2005; SEJERSEN *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstram que em valores de pH (pH 6,0-8,0) acima do ponto isoelétrico da caseína, houve a formação de sistemas microestruturados. No entanto, as fotomicrografias obtidas (Figura 11) revelam que, nesta faixa de pH, as estruturas formadas encontram-se numa situação “instável”, ou seja, com partículas coalescendo uma com as outras ou mesmo rompendo-se. Neste pH os dois biopolímeros, tanto a pectina (pKa 3,6 – 4,1)

quanto a caseína (pI 4,7) encontram-se carregados com carga residual negativa. Entretanto, é necessário ressaltar que alguns aminoácidos básicos da caseína como a lisina e a arginina, ainda estão carregados positivamente (pI igual a 9,74 e 10,76 respectivamente).

O fenômeno de complexação acima do pI da proteína já foi descrito anteriormente por NOGUCHI (1959) e PARK *et al.* (1992), utilizando polímeros sintéticos, e recentemente também foi descrito por alguns autores utilizando polímeros naturais (SCHMITT *et al.*, 2001a; WEINBRECK *et al.*, 2003, 2004; YE *et al.*, 2006). Os autores sugerem que a formação do complexo próximo ao pI da proteína (5,0-5,5) pode ser possível devido à presença de regiões carregadas positivamente na molécula de proteína, conhecidas como “patches” (domínios). Embora a carga resultante seja negativa, a presença destas regiões promove a complexação via atração eletrostática. No caso do complexo pectina/caseína, nós atribuímos estes “patches” aos resíduos de aminoácidos básicos, lisina (pI 9,74) e arginina (pI 10,76), presentes na caseína. É possível, portanto, que nestas condições ocorra a interação eletrostática entre os nitrogênios quaternários carregados positivamente (aminoácidos) e os grupos carboxílicos ionizados da pectina. Nesta condição, as forças resultantes da repulsão entre as cargas são intensas e as forças de atração são menores possibilitando a formação de complexos solúveis, sem a ocorrência de separação de fases (incompatibilidade termodinâmica) macroscópica. Quando o pH é elevado para próximo a $11,0 \pm 0,5$ onde praticamente todos os aminoácidos estão carregados com carga negativa, ou ainda, quando utilizamos a caseína acilada, as estruturas organizadas se desfazem.

Nos estudos citados anteriormente (SCHMITT *et al.*, 2001a; WEINBRECK *et al.*, 2003, 2004; YE *et al.*, 2006) os autores comprovam através da turbidimetria, mobilidade eletroforética e microscopia, que em pH maior que o pH_c (pH de formação do complexo solúvel), onde ambos os polímeros encontram-se carregados com cargas negativas ocorre a separação de fases segregativa. A formação de complexos solúveis (pH_c=5,5), ocorre num

intervalo próximo ao pI da proteína e, subsequentemente em $\text{pH} \approx 4,8-3,0$ ocorre a coacervação complexa ou separação de fase do tipo associativa.

Nas condições estudadas em nosso trabalho, no sistema pectina/caseína aparentemente não ocorre à separação de fase segregativa (incompatibilidade termodinâmica). Vale ressaltar que o sistema estruturado não é observado nas dispersões isoladas. A elucidação sobre como estes polímeros se organizam nesta faixa de pH acima do ponto isoelétrico da caseína requer a implementação de novas metodologias (diagrama de fases/cinética de separação e/ou geleificação).

Propomos as seguintes hipóteses. A primeira é que possa estar ocorrendo uma complexação superficial, ou seja, como a caseína é uma molécula anfótera (sendo que os aminoácidos hidrofóbicos contribuem com aproximadamente 40% dos aminoácidos totais), enquanto sua porção hidrofílica interage com a pectina (molécula hidrofílica), sua porção hidrofóbica tende a se “esconder” voltando-se para dentro, formando, portanto, estruturas esféricas. Isso só é possível devido aos aminoácidos carregados com cargas positivas.

A segunda é que devido à alta viscosidade do meio, e ao fato da pectina formar um gel bem viscoso, não ocorre a incompatibilidade termodinâmica (segregação), mas a formação de um sistema ternário emulsionado do tipo A/A, onde a pectina (geleificada) se encontra na fase externa ou contínua, e a caseína na fase interna ou dispersa. A separação de fase segregativa pode ser interrompida quando ocorre a geleificação de um ou dois componentes da mistura (DOUBLIER *et al.*, 2000; TURGEON *et al.*, 2003). Neste caso, as cinéticas de separação e de geleificação determinarão a heterogeneidade da microestrutura e as propriedades do gel formado.

Neste intervalo de pH a carga global é negativa e as forças de repulsão são predominantemente maiores, há um excesso de cargas não neutralizadas que favorece a acessibilidade do solvente o que permite uma alta interação entre os domínios hidrofílicos do

complexo e a água. O complexo torna-se, portanto, parcialmente solúvel. Simultaneamente, as interações eletrostáticas atrativas entre os resíduos de aminoácidos da caseína carregados positivamente e os grupos carboxílicos dissociados da pectina são favorecidas, favorecendo a formação de complexos insolúveis. De algum modo o sistema encontra-se em equilíbrio, e as partículas estão em constante coalescência e ruptura.

Além das possíveis interações eletrostáticas fracas, uma outra possível interação foi postulada em nosso laboratório (BACARAT, 2004; LOPES, 2004), em que o aminoácido lisina é capaz de interagir covalentemente com o grupo éster da pectina para formar amida em meio alcalino e temperatura ambiente (reações típicas de ésteres com nucleófilos). LOPES (2004) analisou o complexo pectina/caseína por deconvolução de espectros obtidos na região do infravermelho e verificou uma banda adicional de amida que pode ser atribuída à interação entre o grupo metil-éster da pectina e o ϵ -amino grupo da lisina presente na caseína.

A formação de complexos entre a pectina extraída da maçã e a proteína isolada de soro de leite foi avaliada por ZALESKA, RING e TOMASIK (2000) mediante eletrossíntese das misturas aquosas. A formação do complexo seguiu equação cinética de primeira ordem. As interações mais fortes entre a pectina e a proteína envolveram grupos carboxílicos da pectina e as ligações peptídicas da proteína.

A adição da solução ácida ao meio e, portanto, a redução do pH favorece as interações de cargas entre os polímeros e diminui a interação polímero/água. À medida que o pH da dispersão é reduzido, mais grupos positivos da caseína tornam-se disponíveis, diminuindo a interação água/polímero e aumentando a interação polímero/polímero. Esta maior interação provoca uma diminuição do tamanho das partículas e promove o espessamento de sua parede, tornando-as mais rígidas e estáveis, impedindo seu rompimento e coalescência (Figura 12). O equilíbrio é então deslocado para a formação do complexo insolúvel (coacervado).

Figura 12. Fotomicrografias das dispersões de pectina/caseína *in natura* com diferentes teores de sólidos totais. Aumento de 400X.

Em pH 8,0 as estruturas formadas, apesar de instáveis englobam partículas líquidas (oleosas), como pode ser observado na Figura 13, ver detalhes das paredes dos sistemas em pH 8,0 e pH 3,5.

Figura 13. Fotomicrografias dos sistemas organizados contendo partícula líquida. Aumento de 400X. A (pH 8,0), B (pH 3,5).

Nas condições utilizadas pectina/caseína 1:1, o acréscimo no teor de sólidos totais (2%, 4%, 6%, 8% p/v), influenciou decisivamente na formação do complexo coacervado até a concentração de 2% de sólidos totais, ou seja, em concentrações consideradas diluídas ($\geq 2\%$) não foi possível visualizar (micropartículas) através da microscopia óptica a formação dos sistemas. A partir desta concentração, houve a formação espontânea dos sistemas organizados independente do teor de sólidos totais da dispersão e o intervalo de pH para ocorrência da formação do complexo solúvel e, subsequentemente, para a coacervação não foi alterado. A medida que aumentamos o teor de sólidos da dispersão a microscopia óptica revela o aumento no tamanho das partículas, independente do pH (Figura 12). Não foi possível determinar com confiabilidade e precisão o tamanho das partículas (Zeta Sizer/ equipamento), quando em dispersão (*in natura*) à medida que elas se encontram em intensa coalescência e ruptura e também devido à alta viscosidade do meio.

A influência do teor de sólidos na formação do complexo coacervado entre os biopolímeros, heparina – gelatina, gelatina – quitosana, caseína – quitosana e caseinato de sódio - goma arábica foi investigado por BURGESS e TSUNG (1996), REMUNÁN-LÓPEZ e BODMEIER, (1996), BAYOMI *et al.* (1998) e YE *et al.* (2006), respectivamente. O aumento na concentração de sólidos totais também proporcionou a obtenção de partículas maiores. A grande maioria dos estudos entre biopolímeros (proteína/polissacarídeo) encontrada na literatura foi realizada com teor de sólidos totais abaixo do utilizado em nossos experimentos. Vale ressaltar que na maior parte destes estudos o aumento no teor de sólidos ($>2-4\%$) levou à supressão da coacervação.

Diversos parâmetros físico-químicos interferem no grau de interação entre as espécies, favorecendo ou suprimindo a formação do complexo coacervado. Considerando que parâmetros como pH, força iônica, teor de sólidos e as proporções entre os biopolímeros podem ser manipulados para modificar várias características físico-químicas, tais como, ponto

isoelétrico, dispersividade e viscosidade de dispersões poliméricas (SCHMITT *et al.*, 1998), foram implementados alguns experimentos a fim de avaliar se a variação de pH, teor de sólidos, a proporção entre os polímeros e a adição de sal [NaCl] no meio, influencia e/ou altera a efetividade da coacervação (extensão da coacervação), bem como a estrutura morfológica e a uniformidade das partículas. Alguns ensaios foram realizados com o complexo pectina/caseína *in natura* e outros após a secagem.

5.5. Determinação da viscosidade das dispersões de pectina/caseína

A viscosidade de uma “solução” de biopolímeros depende primeiramente da concentração dos biopolímeros (teor de sólidos), da estrutura dos polímeros (tamanho, forma, flexibilidade molecular) e da extensão da interação biopolímero(s)/solvente. Altas viscosidades normalmente são encontradas em sistemas compostos por moléculas com alto peso molecular, alta flexibilidade e hidrofília, como é o caso dos polissacarídeos (goma xantana, quitosana, pectina) e proteínas denaturada (ex: caseínas) (SCHMITT *et al.*, 1998).

A Figura 14 apresenta a viscosidade das dispersões de pectina/caseína à temperatura ambiente (25°C) em vários pHs. Em todas as figuras foi possível visualizar o aumento substancial no valor da viscosidade a medida que a concentração de sólidos aumenta. Observando-se a Figura 14 podemos comparar a diferença de viscosidade entre o pH 8,0 e 4,0. Independente do teor de sólidos na dispersão, o complexo em pH 8,0, apresentou uma viscosidade maior do que em pH 4,0. Em pH 8,0 como a interação ou organização entre os dois biopolímeros ainda não é bem definida ou estruturada e como discutimos anteriormente, existe um excesso de cargas não neutralizadas, ocorre, portanto a maior interação polímero solvente o que justifica a viscosidade maior nesse pH. Outro fato que deve ser mencionado é que ao mesmo tempo as interações entre as cadeias de pectina estão favorecidas levando a

formação do gel. Estes resultados reforçam ainda mais a hipótese de que neste intervalo de pH (6,0-8,0) a pectina esteja situada na superfície ou ainda na fase contínua do sistema formado.

À medida que reduzimos o valor de pH (4,0-5,0) a caseína se torna mais positivamente carregada, aumentando a interação com os grupos carboxílicos ionizados da pectina, desfavorecendo as interações entre as cadeias de pectina, levando a separação de fase associativa (coacervação complexa). Este fenômeno provoca, portanto um decréscimo no valor da viscosidade da fase diluída. A aparência da mistura pectina/caseína mudou de opalescente (pH 8,0-6,0) para uma dispersão branca leitosa (pH 5,0-4,0) onde o sistema nitidamente separa em duas fases (coacervação máxima), estabelecendo-se rapidamente um equilíbrio entre uma fase rica em coacervado e outra fase diluída, pobre em polímeros.

BUNGENBERG (1949), NIXON e NOUH (1978) e BURGESS (1990) relataram um decréscimo considerável na viscosidade (fase diluída) de sistemas obtidos com goma acácia e gelatina no pH da dispersão em que ocorreu a máxima coacervação.

Como demonstrado, o aumento no teor de sólidos promove um aumento considerável no valor da viscosidade da dispersão, portanto, nos estudos realizados na encapsulação do fármaco optamos por trabalhar com o teor de sólidos intermediário (6% p/v) pelo fato de não ser tão viscoso dificultando a etapa de acidificação e posterior secagem no spray, e ao mesmo tempo ser adequada para proporcionar uma espessa e densa matriz polimérica que sustente a liberação do fármaco veiculado.

Figura 14. Viscosidade das dispersões de pectina/caseína em vários pHs.

5.6. Determinação da extensão da coacervação (rendimento do coacervado seco)

5.6.1. Influência do pH e do teor de sólidos

O efeito da variação do pH na extensão da coacervação entre os biopolímeros gelatina - goma acácia foi investigada por BURGESS e CARLESS, (1984), BURGESS (1990) e BURGESS e TSUNG (1996), e pelo sistema gelatina – quitosana por REUMUNÁN-LÓPEZ e BODMEIER (1996). A influência do pH do meio na extensão da coacervação (rendimento do coacervado seco) foi avaliada nas dispersões de pectina/caseína (1:1), contendo teor de sólidos totais de 4%, 6% e 8% (p/v). Como já era esperado, acima do pH neutro (6,0), após a centrifugação das amostras não foi possível visualizar nitidamente a sedimentação (coacervado), confirmando a formação de complexo solúvel e não complexo insolúvel (separação de fases associativa), tendendo, portanto, a geleificação do sistema independente do teor de sólidos na dispersão (Figura 15). Neste intervalo de pH (6,0-8,0) as

interações entre os biopolímeros e as moléculas de água estão favorecidas, aumentando, portanto, a viscosidade do meio. Após a ultracentrifugação das amostras, foi possível observar um pouco de sedimento, porém não é considerado coacervado. No intervalo de pH (4,0-5,0) as forças de atração entre os biopolímeros estão favorecidas conduzindo a formação do complexo insolúvel. O aumento no teor de sólidos na dispersão não influenciou na extensão da coacervação, ou seja, no pH máximo de coacervação (pH 4,0) o rendimento manteve-se praticamente constante e apresentou valores em torno de 21,7% (Figura 15). Os nossos resultados foram semelhantes aos dados obtidos pelos autores (BURGESS; CARLESS, 1984; BURGESS, 1990; BURGESS; TSUNG 1996; REMUNÁN-LÓPEZ; BODMEIER, 1996), os mesmos demonstraram que no intervalo de pH favorável para a ocorrência do fenômeno da coacervação ocorreu o rendimento máximo e que acima ou abaixo deste intervalo o rendimento foi insignificante, ou devido à geleificação do sistema, ou pela formação de complexos solúveis ou pela incompatibilidade termodinâmica. Os autores ainda demonstraram que o aumento no teor de sólidos também não afetou o rendimento do coacervado que se manteve constante.

Figura 15. Influência do pH e do teor de sólidos na complexação.

5.6.2. Influência da relação mássica entre os polímeros pectina/caseína

Indiscutivelmente a proporção proteína/polissacarídeo na composição da formulação é um fator que afeta determinantemente a extensão da coacervação (SCHMITT *et al.*, 1998, REMUNÁN-LÓPEZ; BODMEIER, 1996). Para cada par (espécies) estudado, a coacervação máxima é obtida numa determinada proporção.

Após a definição de fixarmos o teor de sólidos da dispersão (6% p/v) e como forma de avaliar a melhor relação polication/poliânio a fim de satisfazer a condição de equivalência elétrica nula, foi realizado a microscopia óptica das dispersões contendo o par de interesse pectina/caseína, dispondo de diferentes relações mássicas. Além disso, de forma a realizar uma análise comparativa foi determinado o potencial zeta e o rendimento do coacervado seco das amostras em questão.

As Figuras 16 a e b apresentam o conjunto de resultados obtidos para as condições de pHs 8,0 e 4,8. No nosso sistema pectina/caseína, o excesso da proteína, não promove a separação de fase associativa, ou seja, coacervação, e ainda, como pode ser observado a redução do pH leva a formação de agregados, decorrente da precipitação da proteína não complexada com a pectina, como ocorre no processo de estabilização da caseína em produtos lácteos. Quando a concentração de polissacarídeo adicionada não é suficiente ocorre a agregação das micelas de caseína, causando a instabilidade do sistema (MAROZIENE; KRUIF, 2000; TUINIER; ROLIN; KRUIF, 2002; TROMP *et al.*, 2004; SEJERSEN *et al.*, 2006). A elevação da concentração de pectina na dispersão favorece a ocorrência da coacervação e promove um aumento considerável na viscosidade. A microscopia óptica revela que a melhor relação (estudada) encontrada no sistema pectina/caseína foi 1:1, no qual as partículas se encontram mais isoladas, homogêneas e esféricas. O excesso de um dos biopolímeros pode levar à neutralização parcial das cargas, e como consequência a formação

de complexos solúveis. Já o excesso dos dois biopolímeros pode proporcionar a supressão do fenômeno de coacervação á medida que a competição pelas moléculas do solvente é maior.

Para efeito de comparação, a Tabela 7 ilustra a correlação entre os valores de mobilidade eletroforética (potencial zeta) e de rendimento do coacervado seco experimentalmente determinado. Ressalta-se a inviabilidade prática de constatação da condição de mobilidade eletroforética nula, ($mV=0$) nas condições avaliadas. A redução do valor de pH das dispersões é dificultada à medida que ocorre a formação de um sistema tampão (ácido acético/acetato de sódio). Devemos considerar que a determinação da mobilidade eletroforética de sistemas (alto teor de sólidos) contendo espécies dispondo de cargas elétricas com sinais opostos oferece como resultado um valor médio característico para a formulação e não garante, necessariamente, que haja interação e neutralização entre as mesmas. As diferenças estruturais entre as macromoléculas e o possível efeito de conformação espacial não devem ser desconsiderados visto a possível contribuição oferecida.

A proposta complementar foi a aplicação da determinação (quantificação) do coacervado seco, na condição de pH favorável a coacervação. Infelizmente como já era previsto (microscopia óptica) as formulações contendo maior proporção de caseína precipitaram, e, portanto, o alto rendimento se deu pela formação de agregados e não micropartículas. Por outro lado, as dispersões com maior proporção de pectina apresentavam uma viscosidade extremamente elevada dificultando a quantificação (micropartículas no sobrenadante), pondo em xeque a veracidade dos resultados.

De acordo com os dados demonstrados e assumindo as limitações nos procedimentos avaliados, entendemos que a formulação dispondo de relação pectina/caseína 1:1, proporciona os melhores resultados em termos de rendimento (19,4%p/p). Uma análise comparativa com os resultados de microscopia óptica e mobilidade eletroforética, nos levaram

a concluir que esta formulação foi a mais adequada para a nossa proposta de encapsulação dos cristais de aciclovir e, portanto, decidimos trabalhar com ela nas etapas seguintes.

Tabela 7. Correlação entre os valores de mobilidade eletroforética (potencial zeta) e de rendimento do coacervado seco nas formulações contendo 6% p/v de sólidos totais.

pH $4,8 \pm 0,2$

Formulação Mpectina/Mcaseína	Mobilidade eletroforética potencial zeta (mV)	Rendimento do coacervado seco (%p/p)
1:5	----	caseína precipitada
1:2	$-30,9 \pm 0,5$	caseína precipitada
1:1	$-20,2 \pm 0,5$	$19,4\% \pm 0,1$

Formulação Mcaseína/Mpectina	Mobilidade eletroforética potencial zeta (mV)	Rendimento do coacervado seco (%p/p)
1:5	$-35,4 \pm 3,5$	alta viscosidade
1:2	$-34,9 \pm 2,0$	alta viscosidade
1:1	$-20,2 \pm 0,5$	$19,4\% \pm 0,1$

Figura 16a. Influência da relação pectina/caseína na obtenção dos sistemas.

Figura 16b. Influência da relação pectina/caseína na obtenção dos sistemas.

5.6.3. Efeito da força iônica na extensão da coacervação

Existe uma vasta literatura que avalia o efeito da força iônica na coacervação complexa entre biopolímeros (JOSEPH; VENKATARAM, 1995; REMUNÁN-LÓPEZ; BODMEIER, 1996; VANDENBERG *et al.*, 2001). A presença de sais neutros em quantidades que variam de 20-100 mMol podem influenciar no processo da coacervação complexa devido à separação das cargas dos eletrólitos (REMUNÁN-LÓPEZ; BODMEIER, 1996; DICKINSON *et al.*, 1998).

O efeito da força iônica na coacervação complexa entre os biopolímeros, gelatina - goma acácia e gelatina - quitosana foi investigado por BURGESS e CARLESS, (1985) e REMUNÁN-LÓPEZ e BODMEIER (1996), respectivamente. A formação do complexo proteína/polissacarídeo é mediada principalmente pela atração eletrostática entre os polímeros. A atração entre os poliíons e a tendência a formar coacervados diminuiu com o aumento da força iônica no meio. Assim, a neutralização de cargas por meio da adição de íons pode levar a redução na extensão da coacervação ou até mesmo suprimi-la (BURGESS, 1990).

O efeito na variação da força iônica das dispersões de pectina/caseína (1:1) contendo 6% (p/v) de sólidos totais em pH 4,0 (máxima coacervação), sobre o rendimento do coacervado, está demonstrado na Figura 17. Inesperadamente, a adição de quantidades crescentes de cloreto de sódio a dispersão (5-100 mM) não afetou a efetividade da coacervação. Entretanto, vale ressaltar, que a grande maioria dos estudos que avaliam o efeito da força iônica na coacervação entre biopolímeros foi realizada com teor de sólidos totais muito abaixo do utilizado em nossos experimentos. De acordo com WEINBRECK (2003), a alta concentração de sólidos na dispersão parece estabilizar as interações eletrostáticas entre os polímeros. É possível que a quantidade de sal adicionada não tenha sido suficiente para

desestabilizar as interações entre a pectina e a caseína no teor de sólidos utilizado e no pH testado, e assim sendo, o rendimento do coacervado permaneceu estável. Seria difícil e imprudente chegar a uma conclusão final sobre o efeito da adição de sal sobre a coacervação no sistema, entretanto, aparentemente, o complexo pectina/caseína é resistente à adição de cátions monovalentes.

Figura 17. O efeito da força iônica na extensão da coacervação.

O método de preparação do complexo utilizado neste trabalho destaca-se pela simplicidade no preparo, a facilidade na obtenção do complexo coacervado e principalmente no emprego da química limpa. Como o sistema formado continua em dispersão a próxima etapa foi à realização da secagem em *spray dryer*.

A dispersão quando submetida ao processo de secagem mantém a integridade das partículas, como pode ser visto na (Figura 18).

Figura 18. Fotomicrografia das micropartículas inertes, secas em *spray dryer* e ressuspensas em água destilada. Aumento de 200X.

5.7. Avaliação da resistência das micropartículas secas, submetidas a diferentes condições de força iônica e pH

Após a secagem as micropartículas inertes (50 mg) foram ressuspensas e mantidas durante 2 h em solução aquosa contendo NaCl em diferentes concentrações: 20, 40, 60, 80, 100, 120 mMol, ou seja, condições onde variando a força iônica do meio possibilitariam a avaliação da resistência das partículas. O mesmo procedimento foi realizado com as micropartículas submetidas em meios: HCl 0,1 M pH 1,2 e tampão fosfato 0,2 M pH 6,8. A integridade do sistema foi monitorada por microscopia óptica convencional.

Ficou visualmente claro que, independentemente da concentração de sal adicionada ao meio (água) as partículas se mantiveram íntegras, como pode ser visto nas fotomicrografias, (Figura 19). Quando as micropartículas foram submetidas aos diferentes

meio de dissolução, o sistema manteve-se íntegro em meio ácido, porém se desfez em tampão fosfato (Figura 20).

De alguma maneira, os íons fosfatos (PO_4^{3-}), presentes no meio, interferem na interação entre o polissacarídeo e a proteína, ou competindo na interação eletrostática ou promovendo um excesso de cargas negativas que proporcionam maior acessibilidade pelo solvente.

Figura 19. Fotomicrografias das micropartículas inertes, secas em *spray dryer* e ressuspensas em soluções aquosas contendo diferentes concentrações de NaCl. Aumento de 200X.

Figura 20. Fotomicrografias das micropartículas inertes, secas em *spray dryer* e ressuspensas em HCL 0,1M (a) e tampão fosfato 0,2 M (b), aumento de 200X.

5.8. Determinação do tamanho de partícula e esfericidade

Foi avaliado o tamanho e a esfericidade das micropartículas secas obtidas a partir das dispersões em pH 4,8 e 8,0. Em pH 8,0 as partículas apresentaram tamanhos variando de 0,5 a 13µm, com maior percentual de frequência (74%) de 5 a 9 µm (Figura 21A), enquanto que em pH 4,8 as mesmas apresentaram tamanhos variando de 1 a 8 µm, com maior percentual de frequência (80%) de 3 a 6 µm (Figura 21B). Estes resultados confirmam os dados obtidos pela microscopia óptica das dispersões *in natura*, ou seja, à medida que ocorre a redução no pH do meio, ocorre também a redução no tamanho das partículas.

A acidificação do sistema não só reduz o tamanho das partículas como torna a distribuição de tamanho mais homogênea. Essa diferença pode ser justificada pela intensa coalescência e ruptura do sistema quando em pH 8,0.

A determinação da esfericidade das partículas secas reforça os resultados obtidos anteriormente, pois, como pode ser observado nas Figuras 22 A e B, em pH 4,8 o maior percentual (85%) de micropartículas apresentaram valor de esfericidade próximo a 1, enquanto que em pH 8,0 ocorre a perda de esfericidade, pois, apenas 5% do sistemas apresentaram valor próximo a 1.

Todos estes dados corroboram com os resultados encontrados nas metodologias implementadas anteriormente, ou seja, a coacervação (pH 4,0-5,0) promove maior rigidez da matriz polimérica formada e homogeneidade no tamanho das partículas.

Figura 21. Perfil granulométrico das micropartículas inertes pH 8,0 (A) e pH 4,8 (B).

Figura 22. Esfericidade das micropartículas inertes em pH 8,0 (A) e pH 4,8 (B).

5.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia externa das micropartículas inertes está apresentada na Figura 23. A grande maioria das micropartículas apresentou forma esférica, com paredes lisas e íntegras, sem aparente porosidade. As micropartículas obtidas a partir das dispersões de pectina/caseína em pH 8,0 (A,B) apresentaram tamanhos maiores em relação à aquelas obtidas em pH 4,8 (C,D), confirmando com isto os resultados demonstrados nos estudos de tamanho de partículas.

Algumas partículas apresentaram cavidades (depressões) na superfície, este tipo de estrutura pode ter sido atribuído à forte contração (encolhimento) das gotículas no processo de secagem (Ré, 1998), principalmente por se tratar de micropartículas inertes (vazias).

Figura 23. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas inertes (6%), em pH 8,0 (A -3500X 10KV), (B -4000X 10KV); pH 4,8 (C - 4000X 10KV), (D - 2500X 10KV).

5.10. Redução no tamanho dos cristais de aciclovir (moinho de Agatha)

Considerando o tamanho das micropartículas obtidas e a fim de proporcionar uma boa eficiência de encapsulação do fármaco nos sistemas, foi realizada a redução no tamanho dos cristais de aciclovir. Uma quantidade suficiente do fármaco foi adicionada em moinho de Agatha, durante 24 h. A redução no tamanho dos cristais foi eficiente como pode ser observado na Figura 24.

Figura 24. Fotomicrografias dos cristais de aciclovir, (A) obtido do fabricante (B) “micronizado” em moinho de bola. Aumento de 400X.

5.11. Estudo da influência das condições de preparo das micropartículas na encapsulação do fármaco

As micropartículas carregadas com o fármaco foram obtidas utilizando-se quatro condições de preparo com o objetivo de avaliar a influência destas condições de obtenção do complexo na eficiência de encapsulação do aciclovir. Inicialmente, nos ensaios implementados existiu a necessidade de se ajustar o pH da dispersão final até 8,0 antes da etapa de acidificação, pelo fato de que nesta faixa de pH a incorporação do fármaco seria facilitada devido à instabilidade termodinâmica das microestruturas formadas e também para melhor solubilização da caseína. Portanto, o que tentamos comparar e avaliar foi se poderia existir uma interação irreversível entre o fármaco com os grupos funcionais presentes na dispersão contendo o (s) polímero (s) (caseína ou pectina ou caseína/pectina) antes da formação das estruturas em pH 8,0. O que se pode observar pelos resultados obtidos nas três primeiras condições, é que, independente do momento em que o fármaco foi incorporado, houve a formação das microestruturas. Porém, neste pH alcalino do mesmo modo observado antes do carregamento do fármaco, elas não se encontram definidas, coalescendo-se e rompendo-se. Neste pH a grande maioria dos cristais do fármaco se encontra fora ou aderido na superfície das estruturas, como pode ser visto nas Figuras 25, 26, 27A.

Ao adicionarmos a solução ácida à dispersão final, à medida que o pH é abaixado lentamente os sistemas se tornam mais rígidos, bem menores e a parede mais definida (com exceção da terceira condição). Infelizmente, como já era esperado, a grande parte dos cristais do fármaco permanece na superfície externa, apenas alguns que estavam situados na superfície interna das mesmas quando em pH alcalino, foram encapsulados e puderam ser visualizados no interior das partículas através do microscópio óptico (Figuras 25, 26B).

O aciclovir (ACV) é um agente antiviral, análogo sintético de um nucleosídeo natural, a desoxiguanina, em que o carboidrato da molécula é acíclico. Sendo um fármaco com propriedade anfotérica, a molécula de ACV (KOZJEK, 1988; VOLPATO *et al.*, 1995, 1998; SHAFATI; CLARK, 2006) apresenta duas constantes de ionização: 9,2-9,35 (ácida) e 2,2-2,4 (básica), determinadas através de espectrofotometria no UV. Desta maneira, dependendo do pH da dispersão em que o fármaco se encontra ele pode agir como ácido ou base fraca. A acidez do composto é proveniente da protonação do oxigênio ligado ao N1 do anel pirimídico, enquanto suas propriedades básicas estão em função do N9 do anel imidazólico. No intervalo de pH (7,4-8,0) o aciclovir se encontra 98% na forma não ionizada (COOPER *et al.*, 1985; VOLPATO *et al.*, 1995, 1998), e nós acreditávamos que deste modo (reduzindo a interação de cargas com os polímeros) facilitaria a encapsulação do fármaco no interior do sistema, no entanto não foi o que ocorreu.

Como em pH ácido o composto se encontra carregado positivamente, ou seja, altamente polar, esperava-se que pudesse haver interação entre o fármaco e os grupos carboxílicos ionizados na dispersão de pectina em $\text{pH} \approx 3,6$. Esta interação, de alguma maneira, poderia suprimir a formação das micropartículas. No entanto pelo fato de ter que ajustar o pH da dispersão final para 8,0, essa interação que deveria ocorrer se desfaz.

Como ainda não elucidamos com clareza como esses polímeros estão se organizando, a compreensão exata da interferência do pH (grupos funcionais/cargas) e da conformação dos biopolímeros na encapsulação do fármaco fica dificultada.

Como descrito anteriormente, nós acreditamos que a pectina (molécula hidrofílica) está situada na parte externa da microestrutura, enquanto a caseína por ser uma macromolécula anfótera (sendo que os aminoácidos hidrofóbicos contribuem com aproximadamente 40% dos aminoácidos totais) possui a porção hidrofílica interagindo com a pectina e a sua porção hidrofóbica voltando-se para o interior, formando estruturas esféricas

como ocorre no processo de estabilização da caseína em produtos lácteos (MAROZIENE; KRUIF, 2000; TUINIER; ROLLIN; KRUIF, 2002; TROMP *et al.*, 2004). Como o fármaco utilizado apresenta características hidrofílicas, a afinidade que o mesmo apresenta pela molécula de pectina situada na superfície e pelo meio aquoso é bem maior do que pelo interior (mais hidrofóbico) da microestrutura. Isso contribuiria para a baixa encapsulação do fármaco.

Apesar das reconhecidas potencialidades terapêuticas do aciclovir e ainda de fármacos com características estruturais semelhantes (compostos por ácidos nucleicos, oligonucleotídeos) diversas aplicações permanecem limitadas pela reduzida penetração intracelular. O caráter hidrofílico e polianiónico (ON) limita o seu transporte intracelular em decorrência da repulsão eletrostática com as membranas celulares. A fim de contornar estes inconvenientes diversas estratégias tem sido utilizadas, entre elas, modificações químicas na molécula, associação do fármaco com lipídeos catiónicos e a mais promissora a utilização de carreadores poliméricos com características catiónicas.

Depois de inúmeros ensaios sem sucesso, conseguimos aperfeiçoar a encapsulação. Após várias tentativas, modificando a estratégia inicial, ou seja, associando a quitosana, utilizando fosfolípídeo (lecitina), alterando o pH da dispersão e outras mais, percebemos que ao adicionarmos a dispersão de pectina na dispersão de caseína contendo o fármaco, a dispersão final apresentou um pH em torno de 6,75. Ao observarmos no microscópio óptico, a grande maioria dos cristais se encontrava no interior ou na superfície interna das micropartículas.

Como pode ser observado na Figura 28 A, o fator determinante para a encapsulação do fármaco no nosso sistema (pectina/caseína) é o pH do meio. Realizamos vários ensaios ajustando o pH das dispersões no intervalo de 6,0 – 7,0, a efetiva encapsulação só ocorre na

estreita faixa de 6,75-6,85. Acima ou abaixo deste intervalo grande parte dos cristais se encontra fora ou aderidos à superfície externa das partículas.

A fim de verificar a possível interação eletrostática entre o fármaco e o sistema, realizamos medidas do potencial zeta de soluções contendo o fármaco (pH 9,5, pH 6,8 e pH 3,0) e da dispersão dos polímeros contendo o fármaco (pH 6,8).

Como já era esperado em função do seu $pK_{a1} \sim 2,4$ de protonação, em pH 3,0 o aciclovir apresentou um valor de potencial zeta positivo + 35,8mV. Já em pH 9,5 o valor do potencial zeta já se encontra ligeiramente negativo -21,0mV devido ao seu $pK_{a2} \sim 9,2$ de desprotonação. No pH 6,8 o valor encontrado foi discretamente negativo, ou seja, -12,5mV. Portanto acreditamos que, nesta faixa de pH (6,75 -6,8), o aciclovir se encontra próximo ao ponto isoelétrico e talvez este maior equilíbrio (neutralização) de cargas, associada com mudanças na organização dos polímeros neste intervalo de pH, provocou a maior eficiência de encapsulação.

A dispersão contendo estas micropartículas (MCP4) foi escolhida e submetida ao processo de secagem em spray dryer. As partículas perderam um pouco a forma esférica, tornando-se mais ovaladas, porém mantiveram a integridade estrutural. A maioria dos cristais do fármaco se encontrava no interior da partícula, ou aderido na superfície (Figura 29).

Figura 25. Fotomicrografias das micropartículas carregadas. Micropartículas *in natura* com aciclovir preparadas no primeiro método (MCPI). Aumento de 400X

Figura 26. Fotomicrografias das micropartículas carregadas. Micropartículas *in natura* com aciclovir preparadas no segundo método (MCP2). Aumento de 400X.

Figura 27. Fotomicrografias das micropartículas carregadas. Micropartículas *in natura* com aciclovir preparadas no terceiro método (MCP3). Aumento de 400X.

Figura 28. Fotomicrografias das micropartículas carregadas. Micropartículas *in natura* com aciclovir preparadas no quarto método (MCP4). Aumento de 400X.

Figura 29. Fotomicrografia das micropartículas carregadas, secas em *spray dryer*, e ressuspensas em água destilada. Aumento 400X.

5.12. Estudo da influência da concentração do fármaco no rendimento e na eficiência da encapsulação (conteúdo do fármaco)

A influência da concentração do fármaco na eficiência de encapsulação e no rendimento foi avaliada em três formulações. A condição de obtenção das micropartículas carregadas foi a utilizada no *quarto método (MCP4)*. A concentração do fármaco variou em 30%, 60%, 100% (p/p) em relação ao teor de sólidos da dispersão (fixado em 6% p/v). A Tabela 8 mostra os resultados de recuperação do fármaco nas diferentes condições.

Tabela 8. Determinação do rendimento e da recuperação do fármaco das micropartículas secas em *spray-dryer*.

Formulação	Rendimento (%)	Solução extrativa	Recuperação (%)	Extrações
Aciclovir -livre		HCL 0,1N	88,2 ± 0,42	
Aciclovir -livre		Tampão fosfato pH 6,8	86,5 ± 0,98	
MCP4 30%	16 ± 0,54	HCl 0,1N	79,6 ± 0,65	6
MCP4 30%	16 ± 0,54	Tampão fosfato pH 6,8	67,5 ± 1,24	3
MCP4 60%	22 ± 1,21	HCl 0,1N	81,3 ± 0,54	6
MCP4 60%	22 ± 1,21	Tampão fosfato pH 6,8	68,2 ± 0,83	3
MCP4 100%	29 ± 1,36	HCl 0,1N	82,8 ± 1,12	6
MCP4 100%	29 ± 1,36	Tampão fosfato pH 6,8	68,6 ± 1,03	3

Para a determinação do conteúdo total de fármaco contido nos sistemas, foram realizados dois ensaios comparativos, ou seja, as extrações foram realizadas em solução de tampão fosfato 0,2 M pH 6,8 ± 0,1 (rompimento das partículas) e também em solução de HCl 0,1 M. A recuperação do aciclovir foi praticamente a mesma, independente da concentração de fármaco adicionada, variando de (79,6-82,8%) em meio ácido e (67,5-68,6%) em tampão fosfato. O aumento da relação polímero/fármaco possibilita um maior envolvimento do fármaco pelo (s) polímero (s) encapsulador, agindo como uma barreira protetora, prevenindo a difusão do fármaco para o meio aquoso, aumentando a eficiência de encapsulação do fármaco a medida que aumenta esta relação. Entretanto, no nosso sistema isto não ocorreu. É valioso comentar que o aciclovir é pouco solúvel em água e, provavelmente, por este motivo as diferenças de encapsulação foram insignificantes.

Em tampão fosfato, como já era previsto, todas as micropartículas romperam-se e portanto, logo na primeira extração, praticamente todo o conteúdo de aciclovir na amostra foi recuperado. Entretanto, realizamos mais duas extrações com o restante do precipitado (muito pouco) e a somatória final (recuperação total) obtida foi inferior ao teor do fármaco na forma livre. Em meio ácido, devido ao fato das micropartículas se manterem íntegras, realizamos extrações exaustivas (6 lavagens) com as amostras. O conteúdo final de fármaco obtido nas micropartículas foi muito próximo ao obtido na recuperação do fármaco na forma livre. Em meio ácido, a recuperação foi maior em relação ao tampão. Isto provavelmente deve-se ao fato da maior solubilidade do fármaco neste meio de dissolução (HCl 0,1M).

Comparando a recuperação do fármaco nos meios de dissolução em relação ao teor do fármaco na forma livre, podemos concluir que a mesma foi efetiva, considerando as perdas normais no processo de secagem.

Após a última extração em meio ácido, foi realizada a microscopia óptica do precipitado para confirmar a ausência de cristais do fármaco dentro ou aderido nas micropartículas e, ainda, confirmar a integridade das mesmas como pode ser observado na Figura 30.

O rendimento do processo foi dependente da concentração do aciclovir no sistema. O aumento na concentração do fármaco promoveu maior obtenção do pó (**MCP4 100%**). Isso já era esperado, pois a alta eficiência de encapsulação das partículas as torna mais pesadas, proporcionando maior rendimento após a secagem no *spray dryer*. Entretanto, de maneira geral, o rendimento foi baixo devido à alta adesividade da dispersão na câmara de secagem. O aumento na temperatura de entrada do ar, de 100°C para 150°C, promove um ligeiro aumento no rendimento, porém insignificante.

Figura 30. Fotomicrografia representativa das micropartículas (MCP4 60%) após extração exaustiva em meio ácido. Aumento de 400X.

5.13. Estudo do perfil de liberação *in vitro*

Após o desenvolvimento do sistema, o teste de avaliação do perfil de liberação *in vitro* serve para avaliar a quantidade de substância ativa liberada por unidade de tempo. Os estudos realizados *in vitro* constituem um controle qualitativo do sistema de liberação e fornecem subsídios para o aperfeiçoamento do sistema, bem como para posterior estudo *in vivo*.

O sucesso do método é atingido quando as condições experimentais são adequadas, simulando ao máximo as condições *in vivo*, ou seja, temperatura próxima da fisiológica, sistema de agitação que permite homogeneização da solução receptora e meio de dissolução adequado. A metodologia exige ainda que as condições de "sink" sejam atendidas; ou seja,

que a concentração da substância ativa liberada no meio de dissolução não exceda 10% da sua concentração de saturação nesse meio.

Foi realizada a liberação do fármaco contido nas micropartículas secas em meio ácido. O ensaio de dissolução não foi realizado em tampão fosfato, pois, como demonstrado anteriormente, neste meio as micropartículas se rompem. A porcentagem de liberação foi calculada com base na quantidade teórica do fármaco e não na quantidade do fármaco obtido na recuperação.

Na Figura 31 estão representados os perfis de dissolução em meio ácido das formulações de micropartículas contendo diferentes concentrações do fármaco.

A liberação do fármaco contido nas micropartículas com maior concentração de aciclovir (**MCP4 100%**) foi mais rápida (burst release effect) comparado às demais formulações. De um modo geral, fica evidente que o aumento na concentração do fármaco promove uma maior velocidade de liberação. A liberação com característica sustentada foi mais proeminente nas formulações contendo menores concentrações de aciclovir. As características hidrofílicas e a alta solubilidade do fármaco em meio ácido contribuem para a maior velocidade de liberação do fármaco das micropartículas. Outro fato importante a ser considerado é que as moléculas do fármaco podem se encontrar dispersas no interior da matriz, aderidas à superfície ou, ainda, associadas (interagindo) com os grupos funcionais presentes no material polimérico. Em meio ácido, como discutido anteriormente, esta interação não é favorável, pois os polímeros se encontram na forma não dissociada, o mesmo ocorrendo com o fármaco e, portanto, a alta liberação também pode ser parcialmente atribuída à maior disponibilidade do fármaco à difusão. Nossos resultados estão de acordo com vários autores (CHEU *et al.*, 2001; WONG *et al.*, 2002; ROKHADE *et al.*, 2006), que utilizaram o mesmo fármaco (aciclovir) em diferentes sistemas microencapsulados, ou seja, quanto maior

a concentração do fármaco no sistema, maior a velocidade de liberação e, ainda, quanto maior a extensão da interação fármaco/polímero, menor a velocidade de liberação e vice-versa.

Os perfis de liberação do fármaco contido nas micropartículas (**MCP4 30%** ou **MCP4 60%**) foram muito semelhantes. Em 2 h do ensaio de dissolução, os sistemas liberaram aproximadamente 62% do aciclovir. Em 6 h do estudo, praticamente todo conteúdo do fármaco (obtido na recuperação) foi liberado.

Apesar da rápida liberação, fica claro que fármacos quando encapsulados no interior de matrizes poliméricas, não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico como quando em solução. Assim, o polímero tem que dissolver ou desintegrar para que o fármaco possa ser liberado ou então o fármaco tem que dissolver/e ou difundir do interior da matriz.

De qualquer modo, a liberação do fármaco para o meio fisiológico é estendida a um tempo maior comparado ao fármaco na forma livre, como mostra a Figura 31.

Figura 31. Perfis de liberação do fármaco contido nas micropartículas, em meio ácido.

A partir dos resultados dos ensaios anteriores e na tentativa de se obter uma matriz polimérica mais eficiente que pudesse promover uma velocidade de liberação do fármaco mais lenta e sustentada, as micropartículas carregadas (**MCP4 60%**) foram revestidas com uma solução de quitosana como descrito no item 4.13.

Vários autores (MACLEOD *et al.*, 1999a; HIORTH *et al.*, 2003; OFORI-KWAKYE; FELL, 2003; MARUDOVA *et al.*, 2004; HIORTH *et al.*, 2005) têm avaliado a interação entre a pectina e a quitosana, principalmente na tentativa de reduzir a permeabilidade de filmes compostos por diferentes proporções destes polímeros, associados ou não a outros polímeros sintéticos como a hidroxipropilmetilcelulose. Estes pesquisadores demonstraram e concluíram que os polissacarídeos pectina e quitosana podem interagir formando um complexo iônico que influencia na integridade do filme formado e limita a difusão do fármaco, reduzindo a permeabilidade dos filmes, principalmente em meio ácido pH 3,0, onde ocorre maior interação entre os grupos carboxílicos ionizados da pectina ($pK_a = 3,6 - 4,1$) e os grupos amino ionizados presente na quitosana ($pK_a = 6,3$), resultando na formação do complexo insolúvel. A quitosana age como um agente de “cross-linking” nas dispersões de pectina, esta ação é dependente do grau de ionização, ou seja, da densidade de cargas disponíveis da pectina.

Como a dispersão obtida com as micropartículas de pectina/caseína em pH 4,8 apresenta um valor de potencial zeta negativo e, ainda, acreditando na hipótese da pectina estar situada na parte externa das mesmas, a adição da solução de quitosana carregada com grupos amino ionizados poderia interagir com os grupos carboxílicos (em excesso) da pectina.

Realizamos vários ensaios adicionando diferentes concentrações (0,15-0,5%) de quitosana, com intensidade de agitação diferente (agitador mecânico, turrax), gotejando a solução de quitosana, ou vice-versa. Entretanto ocorreu a formação de um gel rígido. Com

estes resultados decidimos por lavar a dispersão na tentativa de reduzir um pouco o excesso de pectina ou mesmo caseína no meio.

A dispersão obtida foi então lavada com água destilada por três vezes em centrífuga. Após a lavagem o precipitado foi separado e o sobrenadante foi então centrifugado novamente a fim de recuperar as micropartículas remanescentes. Após a última lavagem as micropartículas carregadas foram adicionadas em agitação forte na solução de quitosana a 1% p/v em ácido acético 0,5 M. A mistura final foi mantida em agitação por 3 h e em seguida, mantida em geladeira por 24 h. Após este período a dispersão foi seca em *spray dryer*. Antes da secagem, uma amostra da dispersão foi visualizada em microscópio óptico e foi possível observar uma fina camada translúcida que constatamos ser quitosana. Devido à alta viscosidade da dispersão, não foi possível determinar o potencial zeta das micropartículas revestidas e, portanto, verificar uma alteração do valor de negativo para positivo.

Para a determinação do conteúdo total de fármaco contido nos sistemas, o procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.1.1 e a liberação do fármaco das micropartículas conforme procedimento descrito no item 4.12.

Após a secagem, foi recuperada em torno de 55% da quantidade teórica do fármaco, independente do solvente extrator. Portanto, a recuperação do aciclovir nestas micropartículas (**MCP4Q 60%**) foi inferior em relação às micropartículas sem quitosana. A redução na recuperação foi atribuída ao processo de lavagem anterior à etapa de revestimento com a solução de quitosana, pois ao determinar a recuperação do material *in natura* (dispersão **MCP4 60%** e **MCP4Q 60%**) podemos descartar outros interferentes (processo de secagem).

Tabela 9. Determinação e comparação da recuperação do fármaco das micropartículas *in natura* sem e após revestimento com quitosana, e das micropartículas revestidas secas em *spray-dryer*.

Formulação	Rendimento (%)	Solução extrativa	Recuperação (%)	Extrações
MCP4Q 60% <i>in natura</i>		HCl 0,1 M	58,6 ± 1,50	6
MCP4Q 60% <i>in natura</i>		Tampão fosfato pH 6,8	55,5 ± 1,24	3
MCP4Q 60% seca	10 ± 1,65	HCl 0,1 M	55,3 ± 0,54	6
MCP4Q 60% seca	10 ± 1,65	Tampão fosfato pH 6,8	54,2 ± 0,87	3
MCP4 60% <i>in natura</i>		HCl 0,1 M	87,8 ± 1,15	6
MCP4 60% <i>in natura</i>		Tampão fosfato pH 6,8	78,6 ± 1,13	3

O rendimento após a secagem das micropartículas revestidas com quitosana foi ainda mais baixo do que os encontrados anteriormente sem quitosana, em torno de 10%, o que já era esperado considerando a alta adesividade deste polímero. Na parede da câmara de secagem formou-se um “filme” de micropartículas.

Foi realizado o ensaio para avaliar a liberação do fármaco contido nas micropartículas secas (**MCP4Q 60%**) em meio ácido, a fim de comparar com os resultados das mesmas micropartículas, porém sem quitosana. A porcentagem de liberação foi calculada com base na quantidade teórica do fármaco e não na quantidade do fármaco obtido na recuperação.

A velocidade de liberação inicial e o perfil de liberação do fármaco contido nas micropartículas (**MCP4Q 60%** ou **MCP4 60%**) em meio ácido foram muito semelhantes, como mostra a Figura 32.

Figura 32. Perfis de liberação do fármaco contido nas micropartículas (MCP4 60% e MCP4Q 60%) em meio ácido.

Em meio ácido, pH~1,2, a pectina se encontra na forma não dissociada e a quitosana se encontra protonada, ou seja, neste pH a formação do complexo eletrostático não é favorecida. A quitosana e o fármaco sendo solúveis em HCl 0,1 M proporcionaram uma maior permeabilidade e, conseqüentemente, uma maior liberação do fármaco. Em 2 h do ensaio de dissolução os sistemas contendo quitosana liberaram aproximadamente 55% do fármaco, o que, de acordo com a recuperação experimentalmente realizada, já representa 100% do aciclovir contido na amostra. Após este período, podemos observar um platô de liberação, constatando e reafirmando o conteúdo de fármaco encontrado nas micropartículas.

Como discutido anteriormente, na maioria dos trabalhos citados que utilizam a associação destes polímeros, houve uma redução na liberação do fármaco. Entretanto, são

formas farmacêuticas diferentes (comprimidos revestidos com filmes), contendo diferentes proporções e espessuras dos polímeros e nos estudos a avaliação foi realizada em pH 3,0, ou seja, favorável às interações entre os polímeros. No nosso sistema microparticulado composto inicialmente pela interação pectina/caseína não foi possível experimentalmente conseguir avaliar maiores proporções de quitosana (revestimento) devido a alta viscosidade proporcionada ao meio e demais particularidades (intervalo de pH) necessárias para a obtenção do sistema.

5.14. Confeção dos comprimidos matriciais

Nas duas décadas passadas, as matrizes hidrofílicas tornaram-se muito populares na formulação de formas farmacêuticas de liberação modificada. A elaboração destes sistemas constituídos por diversos tipos de polímeros é opção interessante, sendo uma das estratégias mais empregadas com o intuito de prolongar a liberação de um fármaco. As matrizes são consideradas sistemas monolíticos preparadas pela compressão da mistura do polímero (s) e do fármaco. Do ponto de vista tecnológico o desenvolvimento de comprimidos matriciais apresenta vantagens como: versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais (LOPES *et al.*, 2005). Com este tipo de sistema são obtidas formas farmacêuticas de liberação prolongada que podem ser classificadas quanto a estrutura da matriz e sua cinética de liberação (PRISTA *et al.*, 1990).

Como os sistemas microparticulados desenvolvidos não mostraram capacidade suficiente de retenção do fármaco decorrente principalmente da maior área superficial, liberando quase a totalidade de seu conteúdo nas primeiras 4 h do ensaio de dissolução, as micropartículas secas foram empregadas na confeção das matrizes no intuito de avaliar se os comprimidos obtidos a partir das mesmas proporcionariam uma menor velocidade de

liberação inicial e ao mesmo tempo uma cinética de liberação sustentada do fármaco por um período mais prolongado. Foi realizada a confecção das matrizes mediante a compactação direta do pó obtido das micropartículas secas (**MCP4 60%** e **MCP4Q 60%**) e para efeito de comparação entre as formulações foi realizada a compactação direta da simples mistura física (**MF**) do pó contendo os polímeros e o fármaco com massas equivalentes ao contido nas micropartículas.

5.15. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do aciclovir contido nas matrizes, com alteração do pH

O estudo de liberação do fármaco foi conduzido inicialmente em 750mL de ácido clorídrico 0,1 M por 2 h, em seguida 250mL de fosfato de sódio tribásico 0,2 M foi adicionado ao meio de dissolução e o pH ajustado para 6,8. O ensaio foi conduzido por mais 10 h.

De um modo geral, comparando-se os perfis de liberação do fármaco das matrizes compostas pelos sistemas microparticulados (**MCP4 60%** e **MCP4Q 60%**) com o das matrizes compostas pela simples mistura física (**MF** e **MFQ**), ou seja, cada qual preparadas com a mesma proporção de polímeros e fármaco, observa-se que a liberação do fármaco foi mais lenta nas matrizes obtidas a partir dos sistemas microparticulados, destacando o papel majoritário deste sistema, no controle da liberação do fármaco (Figura 33).

Figura 33. Perfis de liberação do aciclovir contido nas matrizes, em meio ácido HCl 0,1M (2h) e após a adição de tampão fosfato de sódio tribásico 0,2 M (10h).

Nas matrizes sem quitosana a quantidade de aciclovir liberado aumenta linearmente em função do tempo. Entretanto, fica evidente que as matrizes contendo as micropartículas proporcionaram uma menor velocidade de liberação do fármaco durante todo o período, alcançando em 12 h de estudo, um valor de liberação de aproximadamente 70% (praticamente 100% do aciclovir recuperado experimentalmente na amostra).

O mecanismo de liberação do fármaco a partir de matrizes poliméricas pode ser descrito através de dois fenômenos: o primeiro ocorre quando moléculas do solvente se movem em direção ao interior da matriz polimérica, definindo uma frente do solvente, com velocidade particular e, simultaneamente, ocorre um intumescimento, que aumenta com o tempo em direção contrária; o segundo mecanismo envolve o desenrolamento e a erosão do polímero (VARGAS; GHALY, 1999).

Segundo EFENTAKIS *et al.* (2000) quando polímeros hidrofílicos entram em contato com o líquido, eles se hidratam e uma camada de gel é formada. A formação dessa

camada é essencial para manutenção da liberação controlada em formas farmacêuticas sólidas. A espessura da camada hidratada determina a difusão das moléculas do fármaco através da massa do (s) polímero (s) dentro do meio líquido, mas difusão não é o único mecanismo que controla a liberação. A velocidade e a extensão da liberação do fármaco também dependem do intumescimento e da erosão provocada em uma preparação polimérica hidratada. O fármaco contido no comprimido é então liberado através da camada de gel e ocorre um prolongamento em sua liberação.

Visivelmente as matrizes sem quitosana apresentaram rápida hidratação e intumescimento na exposição ao fluido, havendo a formação de uma camada de gel. Isto pode resultar em um correspondente aumento no caminho difusional do fármaco e reduzir a sua velocidade de liberação.

A avaliação das matrizes contendo quitosana resultou em perfis semelhantes às demais. No entanto, a velocidade de liberação do fármaco foi bem mais rápida. Essas formulações não apresentaram boa capacidade de intumescimento, ou seja, não foi observada a formação homogênea da camada de gel. Logo na primeira hora, as matrizes apresentaram estruturas quebradiças, porosas e com fissuras, o que provavelmente resultou numa liberação inicial maior do fármaco. Em meio ácido pH 1,2, como discutido anteriormente, a quitosana se encontra ionizada, portanto, nós esperávamos que a presença da mesma na composição da matriz proporcionasse maior intumescimento, e conseqüentemente a redução na velocidade de liberação, porém não foi o que ocorreu. Provavelmente, devido a sua alta solubilidade em meio ácido e quantidade insuficiente nas formulações, proporcionou uma distribuição não uniforme, permanecendo em pontos isolados. Não houve, portanto a formação homogênea da camada de gel, responsável pela prevenção da desintegração. Com isso, essas matrizes não foram capazes de reter o fármaco, e nem manter a integridade da matriz, pois a partir da quarta hora do ensaio estas já apresentavam desintegração parcial. A adição de tampão fosfato

ao meio de dissolução provocou um aumento na desintegração dessas matrizes. Isto pode ter ocorrido pela insolubilidade da quitosana que precipita (grupos amino deprotonados), diminuindo a captação de água.

As matrizes obtidas a partir das micropartículas permaneceram íntegras por um tempo maior em relação as matrizes obtidas pela simples mistura física. A formação do complexo insolúvel entre a pectina/caseína favorece a manutenção da estrutura da matriz através do intumescimento, retardando o início do processo de erosão. Ao contrário do sistema microparticulado isolado, no sistema monolítico a velocidade de liberação do fármaco não é influenciada pelo meio de dissolução, ou seja, a matriz obtida proporciona a formação da camada de gel, reduzindo a acessibilidade rápida do solvente, impedindo o rompimento imediato das micropartículas em tampão fosfato.

Ambas as formulações são promissoras no sentido de proporcionar uma liberação sustentada do fármaco, porém as formulações sem quitosana apresentaram uma estrutura matricial mais íntegra e homogênea com perfis de liberação mais adequado.

5.16. Estudos de intumescimento (GI%) e erosão (GE%)

Como as matrizes compostas pelas micropartículas (**MCP4 60%**) juntamente com a matrizes obtidas pela simples mistura física (**MF**) contendo as mesmas proporções de polímeros e fármaco, apresentaram perfis mais promissores na liberação do aciclovir, estas formulações foram avaliadas quanto ao processo de captação de água e de erosão a fim de compreender o (s) mecanismo (s) de liberação do fármaco.

Muitos são os esforços para elucidar os mecanismos de liberação de núcleos ativos a partir de matrizes hidrofílicas. A liberação de solutos a partir de matrizes hidrofílicas é uma interação complexa entre intumescimento, difusão, erosão e relaxação (HARLAND *et al.*,

1988). A penetração gradual de água produz intumescimento para formar uma camada de gel hidratada através da qual o soluto deve passar pela dissolução e difusão para o meio aquoso. Portanto, na prática, matrizes poliméricas, geralmente liberam o soluto via combinação de vários mecanismos (PEPPAS, 1985; PEPPAS; SAHLIN, 1989). A escolha do (s) polímero (s) na formulação da matriz pode fornecer uma combinação apropriada dos mecanismos de intumescimento, de dissolução e/ou de erosão e determina a cinética de liberação do fármaco *in vitro*.

A erosão da matriz, medida através da perda de massa, bem como a captação da água representada pelo aumento da massa dos comprimidos imersos no meio de dissolução em função do tempo, pode ser analisada na Figura 34.

Figura 34. Perfis de captação de água (intumescimento) e de erosão das matrizes. (A) - matrizes obtidas a partir das micropartículas (MCP4 60%), (B) - matrizes obtidas a partir da mistura física (MF).

A observação visual e os dados experimentais obtidos mostraram que estas matrizes apresentaram rápida hidratação e intumescimento na exposição ao fluido. O grau de intumescimento é um importante parâmetro associado ao mecanismo e a cinética de liberação de fármacos a partir de hidrogéis. As propriedades de intumescimento de hidrogéis iônicos são originalmente devido à ionização de seus grupos funcionais pendentes (PEPPAS *et al.*, 2000).

A captação de água ocorreu principalmente nas primeiras 2 h do ensaio, apresentando um aumento considerável no tamanho dos comprimidos, e em seguida, a capacidade de intumescimento da matriz chegou então a um limite. As matrizes obtidas a partir dos sistemas microparticulados resultaram em formulações com boa capacidade de intumescimento apresentando uma viscosa camada nos bordos dos comprimidos ao longo das primeiras 6 h do ensaio, e foi visivelmente maior do que a observada nas matrizes obtidas pela simples mistura física. Provavelmente a melhor forma e homogeneidade das matrizes devido à presença das micropartículas (menor tamanho médio das partículas) permitiram uma melhor distribuição do pó na formulação e com isso uniformidade na hidratação dos polímeros no meio de dissolução. A espessura desta camada de gel que circunda a matriz condiciona a velocidade de dissolução, difusão do fármaco e erosão do sistema (CAVALCANTI *et al.*, 1998). Conseqüentemente estas matrizes apresentaram uma velocidade de liberação do fármaco mais lenta e gradual.

A perda de massa dos comprimidos ocorreu de forma progressiva nas matrizes até o final do ensaio. Entretanto, é preciso ressaltar que durante 6 h de ensaio, ao observar as matrizes obtidas a partir das micropartículas as mesmas apresentavam-se integras, iniciando o processo de erosão. As matrizes confeccionadas com a simples mistura física apresentaram a partir de 4 h de estudo maior processo de erosão, refletindo numa maior liberação do fármaco.

Portanto, os resultados de liberação do fármaco corroboram com os dados obtidos nos estudos de erosão e intumescimento.

5.17. Cálculo da cinética das reações de liberação e mecanismos que controlam a liberação do fármaco

A fim de analisar a cinética e os mecanismos de liberação do aciclovir a partir das formulações que apresentaram características de redução desta liberação, foi avaliado o coeficiente de correlação (r^2) das curvas resultantes, aplicando-se as diferentes equações matemáticas aos dados de dissolução. Os resultados estão na Tabela 10.

Tabela 10. Características de liberação do aciclovir nas matrizes.

Formulação/matriz	r^2_0	r^2_1	r^2	n
(MCP4 60%)	0,9913	0,9908	0,9911	0,8113
(MF)	0,9686	0,9987	0,997	0,7366
(MCP4Q 60%)	0,8124	0,8786	0,9243	0,4812
(MFQ)	0,9339	0,9889	0,9877	0,5726

r^2_0 coeficiente de correlação usando cinética de ordem zero (quantidade liberada (mg) x tempo (horas)); r^2_1 coeficiente de correlação usando cinética de 1ª ordem (log da quantidade remanescente x tempo (horas)); r^2 coeficiente de correlação usando equação de Higuchi (quantidade liberada (mg) x raiz quadrada do tempo).

Os modelos cinéticos foram avaliados por meio da linearização dos dados de dissolução de acordo com o tempo e porcentagem de fármaco liberada. Utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson (r^2) para a escolha do modelo cinético mais adequado, que se aproxima da perfeita linearidade. Os resultados da linearização dos perfis de dissolução apresentados na Tabela 10 demonstraram que nas formulações compostas pela simples

mistura física (com ou sem a presença de quitosana), o gráfico de cinética de primeira ordem apresentou os maiores valores de r^2_1 . Para as formulações **MCP4 60%** e **MCP4Q 60%**, a melhor linearidade foi alcançada no gráfico de ordem zero e modelo de Higuchi, respectivamente. Estes resultados sugerem que o mecanismo de liberação do fármaco pode diferir com a mudança nas formulações das matrizes.

O modelo de Higuchi descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Esse modelo pode ser usado para descrever a dissolução de fármacos a partir de diversas formas farmacêuticas de liberação modificada (MANADAS *et al.*, 2002; COSTA; LOBO, 2001). As formas farmacêuticas que liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo desde que sua área não se modifique e que não sejam atingidas condições de equilíbrio seguem a cinética de ordem zero, ideal para as formas farmacêuticas de liberação prolongada (MANADAS *et al.*, 2002). Considerando-se que os modelos de zero ordem e Higuchi são mais adequados a perfis de dissolução de produtos de liberação sustentada, as matrizes estudadas contendo as micropartículas apresentam o perfil de dissolução junto ao modelo cinético em acordo com a aplicação proposta.

Usando o modelo de KORSMEYER *et al.* (1983), foi plotado M_t/M versus log de tempo e obtido os valores de n entre 0,4812 e 0,8113 (Tabela 10), caracterizando uma cinética do tipo anômala (não-fickiniana) para todas as formulações, sugerindo a existência de mais de um mecanismo envolvido no processo de liberação do fármaco. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos nos estudos de erosão e intumescimento, ou seja, como estes dois mecanismos podem operar simultaneamente eles podem contribuir de maneira global na liberação do aciclovir das formulações. Nas matrizes com quitosana os valores de n ficaram mais próximos do mecanismo do tipo difusional, ao contrário, nas matrizes sem quitosana, os valores de n ficaram mais próximos do mecanismo do tipo erosional. Um cuidadoso balanço

entre difusão e erosão é necessário para otimizar uma cinética de liberação de ordem zero, á medida que a água penetra na interface entre o gel e o meio que o cerca. Desta forma, deve ocorrer uma liberação linear do fármaco devido à sincronização entre o inchamento e a erosão do polímero, mantendo a camada constante de gel (PEPPAS *et al.*, 2000).

Tais resultados indicam o potencial do complexo insolúvel pectina/caseína empregado na elaboração das formulações, no controle da liberação do aciclovir.

5.18. Estudos de liberação *in vitro* do aciclovir contido nas dispersões de micropartículas

O aciclovir é considerado um agente antiviral eficaz e seletivo contra as infecções cutâneas causada pelo vírus do herpes simples, tipo 1 (HSV1) que possui o seu local de ação na epiderme basal. Devido às características da estrutura molecular, e, portanto, baixa permeabilidade, o aciclovir é lentamente e mal absorvido quando administrado em formas farmacêuticas de uso tópico (PARRY *et al.*, 1992; VOLPATO *et al.*, 1998). Várias estratégias tem sido avaliadas na tentativa desenvolver uma preparação tópica eficaz, em alguns estudos a utilização de diferentes veículos, promotores de absorção, carreadores e ainda a aplicação da iontoforese têm demonstrado maior disponibilidade e permanência do fármaco no seu local de ação (VOLPATO *et al.*, 1995, 1998; DE JÁLON *et al.*, 2001).

Foram realizados estudos de liberação *in vitro* do fármaco contido nos sistemas microparticulados através de membrana sintética, a fim de avaliar a influência dos sistemas estruturados sobre a liberação do fármaco. Os perfis de liberação do aciclovir contido nas micropartículas e na suspensão (controle) estão demonstrados na figura abaixo.

Os sistemas microparticulados conseguem retardar uma alta liberação inicial (burst release) do fármaco quando comparado ao fármaco na forma livre (suspensão). Esta diferença

na liberação durante a primeira hora ocorre pelo fato da maioria dos cristais do fármaco se encontrar no interior da matriz polimérica, como pode ser observado na microscopia óptica.

Apesar dos sistemas não resistirem ao tampão fosfato (como demonstrado anteriormente), é necessário um tempo para que o meio de dissolução consiga penetrar, e as micropartículas se desintegrarem e/ou o fármaco se difundir. Em 2 h de ensaio as micropartículas já apresentavam cerca de 60% de liberação do fármaco. Nos sistemas contendo quitosana este valor já representa o conteúdo total recuperado experimentalmente, os sistemas sem quitosana (MCP4 60%) continuaram liberando de forma sustentada o fármaco até 8 h.

Figura 35. Perfis de liberação do aciclovir contido nas dispersões de micropartículas (MCP4 60% e MCP4Q 60%).

6. Conclusões

Considerando as variáveis estudadas, podemos concluir:

- As características dos polímeros nos permitem obter sistemas multiparticulados espontaneamente em condições brandas e limpas.
- Em valores de pH (pH 6,0-8,0) acima do ponto isoelétrico da caseína, houve a formação de sistemas organizados. No entanto, nesta faixa de pH, as estruturas formadas encontram-se numa situação “instável”, ou seja, com partículas coalescendo uma com as outras ou mesmo rompendo-se. A medida que se reduz o pH, as interações eletrostáticas entre a pectina e a caseína aumentam e as micropartículas se tornam mais rígidas e homogêneas.
- O pH do meio influencia o processo de coacervação (rendimento do coacervado). Em pH 4,0 ocorreu a coacervação máxima entre os polímeros.
- O teor de sólidos totais da dispersão influenciou decisivamente na formação do complexo coacervado. Em concentrações consideradas diluídas ($\geq 2\%$) não foi possível visualizar as micropartículas através da microscopia óptica.
- A melhor relação mássica encontrada para o par pectina/caseína foi 1:1, no qual as partículas se encontram mais isoladas, homogêneas e esféricas.
- Os métodos utilizados para a caracterização das micropartículas (MEV e análise da distribuição e tamanho de partículas) mostraram que as estruturas são esféricas, possuem uniformidade de tamanho e superfície lisa.
- As partículas *in natura* e carregadas com o fármaco possuem formas definidas e esféricas e são resistentes ao processo de secagem.
- A variação da força iônica no meio não interfere na integridade dos sistemas, porém em diferentes condições de pH (tampão fosfato), essa integridade é afetada.
- O pH das dispersões de partida, e, portanto, o pH da dispersão final é fator determinante na encapsulação do aciclovir.

- O aumento na concentração do fármaco no sistema promove uma maior velocidade de liberação.
- A adição da solução de quitosana nos sistemas pectina/caseína não proporcionou a retenção do fármaco.
- Os perfis de liberação do fármaco contido nas micropartículas com e sem quitosana foram muito semelhantes, em 6 h do estudo, praticamente todo conteúdo do fármaco foi liberado.
- As matrizes compostas pelas micropartículas proporcionaram uma liberação sustentada do fármaco, porém as formulações sem quitosana apresentaram uma estrutura matricial mais íntegra e homogênea com perfis de liberação mais adequado.
- Considerando-se que os modelos de zero ordem e Higuchi são mais adequados a perfis de dissolução de produtos de liberação sustentada, as matrizes estudadas contendo as micropartículas apresentam o perfil de dissolução junto ao modelo cinético em acordo com a aplicação proposta.

7. Referências Bibliográficas

ANDRÉO FILHO, N.; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos.

Infarma, Brasília, v. 9, n. 1/5, p. 18-21, 1999.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V. **Farmacotécnica: formas**

farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6ªed. São Paulo: Premier, 2000.

568 p.

ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos. Resolução - RE nº 899 de 29 de maio

de 2003. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> >.

ASHFORD, M.; FELL, J. T.; ATTWOOD, D.; SHARMA, H.; WOODHEAD, P. J. In vivo

investigation into the suitability of pH-dependent polymers for colonic targeting. **Int J**

Pharm, Amsterdam, v.95, p. 193-199, 1993.

AULTON, MICHAEL E. **Delineamento de formas farmacêuticas**.– 2ªed. – Porto Alegre:

Artmed, 2005, p.298-315.

BAKAN, J.A. Microencapsulação. In: LACHMAN, L.; LEIBERMAN, H. A.; KANIG, J. L.

Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian,

v.2, 2001, p.707-735.

BANMEET, S.A.; ASHIM, K.M. Mechanism of corneal permeation of L-valyl ester of

acyclovir: targeting the oligopeptide transporter on the rabbit cornea. **Pharm Res**, v.19,

n.8, p.1194-1201, 2002.

BARACAT, M.M. **Preparação e avaliação de microcápsulas à base de pectina**. Tese

(Doutorado em Fármaco e Medicamentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de

Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

- BAYOMI, M.A.; AL-SUWAYEH, S.A.; EL-HELW, A.M.; MESNAD, A.F. Preparation of casein-chitosan microspheres containing diltiazem hydrochloride by an aqueous coacervation technique. **Pharm Acta Helv**, v.73, p. 187-192, 1998.
- BENICHO, A.; ASERIN, A.; GARTI, N. Protein polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. **J Disper Sci Technol**, v. 23, n. 1-3, p. 93-123, 2002.
- BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Collagens Microparticles: Carriers for Glucocorticosteroids. **Eur J Biopharm Pharm**, v.45, n.1, p.23-29, 1998.
- BEUTNER, K. R.; FRIEDMAN, D. J.; FORSZPANI, C.; ANDERSEN, P. L.; WOOD, M. J. Valaciclovir compared with acyclovir for improved therapy for herpes zoster in immunocompetent adults. **Antimicrob Agents Ch**, Washington, v.39, n.7, p.1546-1553, 1995.
- B.P.PHARMACEUTICAL CODEX, pp.711-713, 1994.
- BULGARELLI, E.; FORNI, F.; BERNABEI, M. T. Effect of matrix composition and process conditions on casein-gelatin beads floating properties. **Int J Pharm**, v.198, n.2, p.157-65, 2000.
- BUNGENBERG de JONG, H.G. In: KRUYT, H. R. **Colloid Science**. New York: Elsevier 1949; vol. 2, 232-258, 335-432.
- BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. **J Colloid Interf Sci**, v.98, n.1, p.1-8, 1984.
- BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules. **Int J Pharm**, v.27, p.61-70, 1985.
- BURGESS, D.J. Practical analysis of complex coacervate systems. **J Colloid Interf Sci**, v.140, n.1, p. 227-238, 1990.

- BURGESS, D.J.; KWOK, K.K.; MEGREMIS, P.T. Characterization of albumin – acacia complex coacervation. **J Pharm Pharmacol**, v. 43, p.232-236, 1991.
- BURGESS, D.J.; SINGH, O.N. Spontaneous formation of small sized albumin/acacia coacervate particles. **J Pharm Pharmacol**, v.45, p. 586-591, 1992.
- BURGESS, D.J. Complex coacervation: microcapsule formation. In: Dubin, P.; Bock, J.R.; Davis, R.; Schulz, D.N.. **Macromolecular complexes in chemistry and biology**. Thies, C. (Ed). Springer Verlag: Berlin. Chapter 17, p. 285-300, 1994.
- BURGESS, D.J.; TSUNG, M. Preparation and stabilization of heparin/gelatin complex coacervate microcapsules. **J Pharm Sci**, v.86, n.5, 1997.
- CAVALCANTI, O.A.; CABRAL, L.M.; BAUDNER, B.C.; MURTAS, E.; RICCIERI, F.M.; ALHAIQUE, F. A galactomannan from the seeds of *Prosopis juliflora* DC: studies for a new sustained release matrix. **Acta Technologiae et Legies Medicament**, v.9, n.3, p.149-159, 1998.
- CHEN, Y.; WILLMOTT, N.; ANDERSON, J.; FLORENCE, A.T. Comparasion of albumin and casein microspheres as a carrier for doxorubicin. **J Pharm Pharmacol**, London, v. 39, n. 12, p. 978-985, 1987.
- CHEN, L.; SUBIRADE, M. Chitosan/ β -lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. **Biomaterials**, v.26, p.6041-6053, 2005.
- CHEU, S.J.; CHEN, R.R.L.; CHEN, P.F.; LIN, W.J. *In vitro* modified release of acyclovir from ethyl cellulose microspheres. **J Microencapsul**, v.18. n.5, p.559-565, 2001.

- COOPER, E.R.; MERRITT, E.W.; SMITH, R.L. Effect of fatty acids and alcohols on the penetration of acyclovir across human skin in vitro. **J Pharm Sci**, v.74, n.6, p.688-689, 1985.
- CONCEIÇÃO, E.D. **Desenvolvimento e avaliação de pectina USP modificada por caseína**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2002.
- CONTI, B.; BUCOLO, C.; GIANNAVOLA, C.; PUGLISI, G.; GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: in vitro/ in vivo evaluation. **Eur J Pharm Sci**, v.5, n.5, p.287-293, 1997.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur J Pharm Sci**, v. 13, p. 123-133, 2001.
- COUVRER, P.; COVARRAZE, G.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Nanoparticles: preparation and characterization. In: **Microencapsulation methods and industrial applications**. New York: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 183-211.
- CUNHA, R.L.; MAIALLE, K.G.; MENEGALLI, F.C. Evaluation of the drying process in spouted bed and spout fluidized bed of xanthan gum: focus on product quality. **Powder Technol**, v.107, n.3, p.234-242, 2000.
- DAVIS, S.S.; HARDY, J.G.; FERA, J.W. Alimentary tract and pancreas: Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. **Gut**, London, v.27, p.886-892, 1986.
- De CARVALHO, J.S. **Caracterização de filmes de caseína e caseína acilada**. Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

- De JALÓN, E.G.; BLANCO-PRÍETO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. **J Control Release**, v.75, p.191-197, 2001.
- De JALÓN, E.G.; BLANCO-PRÍETO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture. **Eur J Pharm Biopharm**, Amsterdam, v.56, p.183-187, 2003.
- De MIRANDA, P.; BLUM, M.R. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. **J Antimicrob Chemoth**, v.12 (suppl.B), p.29-37, 1983.
- De RUITER, A.; THIN, R.N. Genital herpes, a guide to pharmacological therapy. **Drugs**, v.47, p.297-304, 1994.
- DICKINSON, E.; SEMENOVA, M.G.; ANTIPOVA, A.S.; PELAN, E.G. Effect of high-methoxy pectin on properties of casein-stabilized emulsions. **Food Hydrocolloid**, v.12, p.425-432, 1998.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloid**, v. 17, p.25-39, 2003.
- DONBROW, M. **Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy**. CRC Press, Inc. Boca Raton, p.347, 1992.
- DOUBLIER, J.L.; GARNIER, C.; RENARD, D.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions. **Curr Opin Colloid in**, v. 5, n. 3-4, p. 202-214, 2000.
- DRESSMAN, J.B.; BASS, P.; RITSCHER, W.A.; FRIEND, D.R.; RUBINSTEIN, A. Gastrointestinal parameters that influence oral medications. **J Pharm Sci**, Washington, v. 82, p.857- 871, 1993.

- DU, J.; ZHANG, S.; SUN, R.; ZHANG, L.; XIONG, C.; PENG, Y. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. II. Release of albumin *in vitro*. **J Biomed Mater Res B**, v. 72, p. 299-304, 2005.
- EFENTAKIS, M.; KOUTLIS, A.; VLACHOU, M. Development and evaluation of oral multiple-unit and single unit hydrophilic controlled-release systems. **AAPS Pharmscitech**, v.1, n.4, p.34, 2000.
- EINHORN-STOLL, U.; ULBRICH, M.; SEVER, S.; KUNZEK, H. Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating. **Food Hydrocolloid**, Oxford, v.19, p.329-340, 2005.
- ELCIN, A. E.; ELCIN, Y. M. Polycation-coated polyanion microspheres of urease for urea hydrolysis. **Artif Cell Blood Sub**, v.28, n.1, p.95-111, 2000.
- EL-GIBALY, I. Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticulates as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.232, p. 199-211, 2002.
- ELLION, G.B. Mechanism of action and sensitivity of acyclovir. **Am J Med**, v. 73, p.7-13, 1982.
- EPSTEIN, N; GRACE, J. R. Spouting of particulate solids. In: FAYED, M.; OTTEN, L. **Handbook of particle Science and Tecnhnology**. New York, p.532-567, 1997.
- EVANS, D.F.; PYE, G.; BRAMLEY, R.; CLARK, A.G.; DYSON, T.J.; HARDCASTLE, J.D. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subject. **Gut**, London, v.29, n.8, p.1035-1041, 1998.
- FERNANDEZ-HERVAS, M.J.; FELL, J.T. Pectin/chitosan mixture as coatings for colon-specific drug delivery: an in vitro evaluation. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.169, p.115-119, 1998.

- FIAT, A-M.; JOLLÈS, P. Casein of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. **Mol Cell Biochem**, Paris, v. 87, n. 1, p. 5-30, 1989.
- FILKOVÁ, I.; MUJUMDAR, A.S. Industrial Spray Drying System. In: **Handbook of Industrial Drying**. A.S. Mujumdar Ed., 1995, p.742.
- FLETCHER, C.; BEAN, B. Evaluation of oral acyclovir therapy. **Drug Intell Clin Pharm**, v.19, p. 518-524, 1985.
- FLORES, R.J.; WALL, M.D.; CARNAHAN, D.W.; OROFINO, T.A. An investigation of internal phase losses during the microencapsulation of fragrances. **J Microencapsul**, v.9, n.3, p.287-307, 1992.
- GENTA, I.; CONTI, P.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F.; SPADARO, A.; PUGLISI, G. Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. **J Pharm Pharmacol**, London, v. 49, p.737-742, 1997.
- GIBALDI, M. Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991, p. 124-145.
- GIRARDI, M.; TURGEON, S.L.; GAUTHIER, S.F. Interbiopolymer complexing between B-lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. **Food Hydrocolloid**, v.16, p.585-591, 2002.
- GIUNCHEDI, P.; CONTE, U.; CHETONI, P.; SAETTONE, M.F. Pectin microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits. **Eur J Pharm Sci**, v.9, p. 1-7, 1999.
- GRINBERG, V.Y.; TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloid**, v. 11, n. 2, p. 145-158, 1997.

- HARLAND, R.S; GAZZANIGA, A; SANGALLI, M.E; COLOMBO, P; PEPPAS, N.A.
Drug-polymer matrix swelling and dissolution. **Pharm Res**, v.5, p.488-494, 1988.
- HEJAZI, R.; AMIJI, M. Stomach-specific anti-H pylori therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. **Int J Pharm**, v.187, p.53-65, 2002.
- HERNANDES, J.M.M.; FREITAS, O.; PEREIRA, N.L. The potencial use of casein and casein modified as matrix delivery systems. **Bolletino Chemico Farmaceutico**, Milão, v.137, p. 362-366, 1998.
- HIORTH, M.; KJONIKSEN, A.; NYSTROM, B.O.; ROOTS, J. Thermoreversible gelation of aqueous mixtures of pectin and chitosan. **Rheology. Biomacromolecules**, v.4, p. 337-343, 2003.
- HIORTH, M., THO, I.; SANDE, A.S. The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method. **Eur J Pharm Biopharm**, v.56, p. 175-182, 2003.
- HIORTH, M.; KØNIKSEN, A.L.; KNUDSEN, K.D.; SANDE, S.A.; NYSTRÖM, B. Structural and dynamical properties of aqueous mixtures of pectin and chitosan. **Eur Polym J**, v.41, p. 1718-1728, 2005.
- ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharm Res**, v.15, n.9, p.1326-1331, 1998.
- IMESON, A.P.; LEDWARD, D.A.; MITCHELL, J.R. On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. **J Sci Food Agric**, v.28, p.661-667, 1977.
- JAIN, S.K.; JAIN, R.K.; CHOURASIA, M.K.; JAIN, A.K.; CHALASANI, K.B.; SONI, V.; JAIN, A. Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for

- controlled systemic delivery of acyclovir sodium. **AAPS Pharmscitech**, v.6, n.1. p.35-41, 2005.
- JAMES, J.; TAS, J. Protein staining methods. In: JAMES, J.; TAS, J. **Histochemical protein staining methods**. New York: Oxford University Press, 1984, p.27.
- JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharm Res**, v.10, n.8, p. 1115-1122, 1993.
- JOSEPH, I; VENKATARAN, S. Indomethacin sustained release from alginate-gelatin or pectin-gelatin coacervates. **Int J Pharm, Amsterdam**, v.126, p.161-168, 1995.
- KAMNEV, A.A.; COLINA, M.; RODRIGUEZ, J.; PTITCHKINA, N.M.; IGNATOV, V.V. Comparative spectroscopic characterization of different pectins and their sources. **Food Hydrocolloid**, v.12, p. 263-271, 1998.
- KIM, T.H.; PARK, Y.H.; KIM, K.J.; CHO, C.S. Release of albumin from chitosan-coated pectin beads *in vitro*. **Int J Pharm, Amsterdam**, v.250, n.2, p.371-383, 2003.
- KO, J.A.; PARK, H.J.; HWANG, S.J.; PARK, J.B.; LEE, J.S. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.249, p.165-174, 2002.
- KORSMEYER, R.W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.15, p.25-35, 1983.
- KOZJEK, F. The effect of physicochemical properties of acyclovir and deoxiacyclovir on the *in vitro* diffusion. **Acta Pharm Jugosl**, v.38, p.61-69, 1988.

- KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; GUDMUNDSSON, Ó.S.; INGVARSDÓTTIR K. Release of diltiazem from eudragit microparticles prepared by spray-drying. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 137, p. 159-165, 1996.
- KRUIF, C.G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloid**, Oxford, v.15, n.4-6, p.555-563, 2001.
- KRUIF, C.G.; WEINBRECK, F.; VRIES, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Curr Opin Colloid in**, v.9, p.340-349, 2004.
- LAMPRECHT, A.; SCHAFFER, U.F.; LEHR, C.M. Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Int J Pharm, Amsterdam**, v.196, n. 2, p.223-226, 2000.
- LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.F.; LEHR, C.M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for $\dot{U} - 3$ unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **J Microencapsul**, v.18, n.3, p.347-357, 2001.
- LASKIN, O.L.; LANGSTRETH, J.A.; SRAL, R.; DEMIRANDA, P.; KEENEY, R.; LIETMAN, P.S. Pharmacokinetics and tolerance of acyclovir, a new antiherpes virus agent in humans. **Antimicrob Agents Ch**, v.21, p. 393-398, 1982.
- LATHA, M.S.; JAYAKRISHNAN, A. Glutaraldehyde cross-linked bovine casein microspheres as a matrix for the controlled release of theophylline: In-vitro studies. **J Pharm Pharmacol**, London, v. 46, n. 1, p. 8-13, 1994.
- LAW, S.L.; HUANG, K.J.; CHIANG, C.H. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery Corneal penetration and absorption. **J Control Release**, v.63, p.135-140, 2000.

- LEE, S.J.; ROSENBERG, M. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v. 33, p. 80-88, 2000.
- LE ROY BOEHM, A.L.; FESSI, H. Applications pharmaceutiques du potentiel zéta – intérêt pour la caractérisation des vecteurs colloïdaux. *J Pharm Belg*, v.55, n.2, p. 40-48, 2000.
- LI, S.; WANG, X.; ZHANG, X.; YANG, R.; ZHANG, H.; ZHU, L.; HOU, X. Studies on alginate-chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits. *J Control Release*, v.84, p.87-98, 2002.
- LIM, S.T.; MARTIN, G.P.; BERRY, D.J.; BROWN, M.B. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *J Control Release*, Amsterdam, v.66, n.3, p.281-292, 2000.
- LIU, P.; KRISHNAN, T.R. Alginate-pectin-poly-lysine particulate as a potencial controlled release formulation. *J Pharm Pharmacol*, London, v.51, n.2, p.141-149, 1999.
- LIU, L.; FISHMAN, M.L.; KOST, J.; HICKS, K.B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, v.24, p. 3333-43, 2003.
- LOPES, A.A. **Preparação e caracterização físico-química do complexo pectina-caseína e avaliação de algumas propriedades funcionais.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas: Fármacos e Medicamentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.2, p.143-154, 2005.

- LORDI, N.G. Formas farmacêuticas de liberação prolongada. In Lanchman, L.; Leiberman, H.A.; Kanig, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.2, p. 737-781, 2001.
- LORENZO-LAMOZA, M.L.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M.J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. **J Control Release**, Amsterdam, v.52, p.109-118, 1998.
- MACLEOD, G.S.; FELL, J.T.; COLLET, J.H.; SHARMA, H.L.; SMITH, A.M. Selective drug delivery to the colon using pectin:chitosan:hydroxypropylmethylcellulose film coated tablets. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.187, n.2, p.251-257, 1999a.
- MACLEOD, G.S.; FELL, J.T.; COLLET, J.H. An in vitro investigation into the potencial for bimodal drug release from pectin/chitosan/HPMC-coated tablets. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.188, n.1, p.11-18, 1999b.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, 2002.
- MCMULLEN, J.N.; NEWTON, D.W.; BECKER, C.H. Pectin-gelatin complex coacervates II: Effect of microencapsulated sulfamerazine on size, morphology, recovery, and extraction of water-dispersible microglobules. **J Pharm Sci.**, v.73, n.12, p.1799-1803, 1984.
- MAROZIENE, A.; KRUIF, C.G. Interaction of pectin and casein micelles. **Food Hydrocolloid**, v.14, p.391-394, 2000.
- MARTINDALE. The Extra Pharmacopoeia. 29 ed, 1989.
- MARUDOVA, M.; MaCDOUGALL, A.J.; RING, S.G. Pectin-chitosan interactions and gel formation. **Carbohydr Res**, v.339, p. 1933-1939, 2004.

- MORRIS, G.A. The self-assembly and structure of caseins in solution. **Biotechnol Gent Eng Rev**, v.19, p. 357-76, 2002.
- MUJUMDAR, R.S. Spouted bed technology: a brief review. In: MUJUMDAR, A.S. **Drying'** **84**, New York: Hemisphere Pub., 1984, p.151-157.
- MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A.S.; ALVIM I.D; GROSSO C.R.F. Controlled release of Protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. **Current Drug Delivery**, v 1, n. 3, p265-273, 2004.
- MUKAI-CORRÊA R.; PRATA, A.S.; ALVIM I.D.; GROSSO, C.R.F. Caracterização de Microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por geleificação iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p. 73-80, 2005.
- MUNJERI, O.; COLLET, J.H.; FELL, J. Hidrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. **J Control Release**, Amsterdam, v.46, n.3, p.273-278, 1997.
- MUNJERI, O.; HODZA, P.H.; OSIM, E.E.; MUSABAYANE, C.T. An investigation into the suitability of amidated pectin hidrogel beads as a delivery matrix for chloroquine. **J Pharm Sci**, Washington, v.87, n.8, p.905-910, 1998.
- MURALIKRISHNA, G.; TARANATHAN, R. N. Characterization of pectin polysaccharides from pulse husks. **Food Chem.**, Cambridge, v.50, p.91-97, 1994.
- NIXON, J.R.; NOUH, A. The effect of microcapsule size on the oxidative decomposition of core material. **J Pharm Pharmacol**, v.30, p. 533-7, 1978.
- NOGUCHI, H. Interactions of serum albumin and synthetic polyelectrolytes in various buffer systems. **J Phys Chem-US**, v.64, p.185-187, 1959.

- NORTHCOTE, D.H. Chemistry of plant cell wall. **Ann Rev Plant Physio**, California, v.23, p.113-119, 1992.
- NUGENT, L.; JAIN, R. Extravascular diffusion in normal and neoplastic tissues. **Cancer Res**, Baltimore, v.44, p. 238-244, 1984.
- OFORI-KWAKYE, K.; FELL, J.T. Biphasic drug release: the permeability of films containing pectin, chitosan and HPMC. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.226, n.1-2, p.139-145, 2001.
- OFORI-KWAKYE, K.; FELL, J.T. Biphasic drug release from film-coated tablets. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.251, p.431-440, 2003.
- OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; BUENO, J.H.F.; EVANGELISTA, R.C. Micro e nanocapsulas. Um eficiente sistema com dimensões reduzidas para liberação controlada e direcionamento de fármacos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.14, p. 37-49, 1992.
- PALMIERI, G.F.; MARTELL, S.; LAURI, D.; WEHRLE, P. Gelatin – Acacia complex coacervation as a method for ketoprofen microencapsulation. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 22 (9-10), p.951-957, 1996.
- PARK, J.M.; MUHOBERAC, B.B.; DUBIN, P.L.; XIA, J. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. **Macromolecules**, v.25, p. 290-295, 1992.
- PARKER, A.; BOULENGUER, P.; KRAVTCHENKO, T.P. Effect of the addition of high methoxyl pectin on the rheology and colloidal stability of acid milk drinks. In *Food Hydrocolloids: Structure, Properties and Functions*; Nishinari K., Doi E., Eds.; **Plenum Press**, New York, p.307-312, 1994.

- PATEL, D.; SMITH, A.W.; GRIST, N.; BARNETT, P.; SMART, J.D. An in vitro mucosal model predictive of bioadhesive agents in the oral cavity. **J Control Release**, v.61, p. 175-183, 1999.
- PEPPAS, N.A. Analysis of fickian and no-fickian drug release from polymers. **Pharm Acta Helv**, v.60, p.110-111,1985.
- PEPPAS, N.A.; SAHLIN, J.J. A simple equation for description os solute release. III. Coupling of difusion and relaxation. **Int J Pharm**, v.57, p.169-172, 1989.
- PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **Eur J Pharm Biopharm**, v.50, p.27-46, 2000.
- PEREYRA, R.; SCHMIDT, K.A.; WICKER, L. Interaction and stabilization of acidified casein dispersions with low and high methoxyl pectins. **J Agr Food Chem**, v.45, p.3448-3451, 1997.
- PICOS, D.R.; CARRIL, M.G.; MENA, D.F.; De LA FUENTE, L.N. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parental. **Revista Cubana de Farmacia.**, Habana, v.34, p. 70-77, 2000.
- PRENTICE, H.G. Use of acyclovir for prophylaxis of herpes infections in severly immunocompromised patients. **J Antimicrob Chemoth**, v.12, p.153-159, 1983.
- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.3, 1990.
- RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. In: RÉ, M.I. **Dry Technol**. Marcel Dekker Inc., v.16, n.6, p.1195-1236, 1998.

- REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; BODMEIER, R. Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.135, p. 63-72, 1996.
- REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; BODMEIER, R. Mechanical water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. **J Control Release**, Amsterdam, v.44, p.215-225, 1997.
- ROBINSON, D.H; MAUGER, J.W. Drug delivery systems. **Am J Hosp Pharm**, Whashington, v.48 (suppl 1), p. s14-s23, 1991.
- RODRIGUES-HUEZO M.E.; PREDROZA-ISLAS R.; PRADO-BARRAGAM L.A.; BERISTAIN C.I. VERNON-CARTER E.J. Microencapsulation by spray drying of multiple emultions containing carotenoids. **J Food Sci**, v. 69, p.351-359, 2004.
- ROKHADE, A.P.; PATIL, S.A.; AMINABHAVI, T.M. Synthesis and characterization of semi-interpenatrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. **Carbohydr Polym**. In Press, 2006.
- ROSSI, S.; SANDRI, G.; FERRARI, F.; BONFERONI, M.C.; CARAMELLA, C. Buccal delivery of acyclovir from films based on chitosan and polyacrylic acid. **Pharm Dev Technol.**, v.8, n.2, p.199-208, 2003.
- SANCHEZ, C.; RENARD, D. Stability and structure of protein-polysaccharide coacervates in the presence of protein aggregates. **Int J Pharm**, v.242, p.319-324, 2002.
- SANDRI, G., ROSSI, S.; FERREIRA, F.; BONFERONI, M.C.; MUZZARELLI, C.; CARAMELLA, C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. **Eur J Pharm Sci.**, v.21 (2-3), p.351-9, 2004.

- SANTINHO, A.J.P.; PEREIRA, N.L.; de FREITAS, O.; COLLETT, J.H. Influence of formulation on the physicochemical properties of casein microparticles. **Int J Pharm**, v.186, p. 191-198, 1999.
- SANTINHO, A.J.P.; UETA, J.M.; FREITAS, O.; PEREIRA, N.L. Physicochemical characterization and enzymatic degradation of casein microcapsules prepared by aqueous coacervation. **J Microencapsul**, v.19, n.5, p. 549-558, 2002.
- SASTRY, S.V.; NYSHADHAM, J.R.; FIX, J.A. Recent technology advances in oral drug delivery: a review. **PSTT**, Oxford, v.3, n.4, p.138- 145, 2000.
- SCHMITT, C.; SANCHES, C.; DESORBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharides complexes: a review. **Crit Rev Food Sci Nutrit**, v. 38, n.8, p.689-753, 1998.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; LAMPRECHT, A.; RENARD, D.; LEHR, C-M.; DE KRUIF, C.G.; HARDY, J. Study of α -lactoglobulin / acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. **Colloid Surface B**, v.20, p.267-280, 2001a.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESPOND, S.; RENARD, D.; ROBERT, P.; HARDY, J. Structural modification of α -lactoglobulin as induced by complex coacervation with acacia gum. In Dickinson, E.; Miller R. (Eds) **Food Colloids 2000 – Fundamentals of formulation**. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 323-331, 2001b.
- SCHORSCH, C.; JONES, M.G.; NORTON, I.T. Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. **Food Hydrocolloid**, v.13, p.89-99, 1999.
- SELDMEYER, F; BRACK, M.; RADEMACHER, B.; KULOZIK, U. Effect of protein composition and homogenisation on the stability of acidified milk drinks. **Int Dairy J**,

- v.14, p.331-336, 2004.
- EJERSEN, M.T.; SALOMONSEN, T.; IPSEN, R.; CLARK, R.; ROLIN, C.; ENGELSEN, S.B. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. **Int Dairy J.** In Press, 2006.
- SHAFATI, A.R.; CLARK, B. Determination of acyclovir and its related substance guanine in bulk drug and tablet preparation by capillary electrophoresis. **Iranian Journal Pharmaceutical Research**, v.2, p.71-75, 2003.
- SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.3, n.6, p.501-547, 1993.
- SHOJAEI, A.H.; ZHOU, S.L.; LI, X. Transbuccal delivery of acyclovir (II): Feasibility, system design, and *in vitro* permeation studies. **J Pharm Sci**, v.1, n.2, p.66-73, 1998.
- SHU, X. Z.; ZHU, K. J.; SONG, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.212, p. 19-28, 2001.
- SINGH, O.N.; BURGESS, D.J. Characterization of albumin-alginate acid complex coacervation. **J Pharm Pharmacol**, v.41, p. 670-673, 1989.
- SOUL-LAWTON, J.; SEABER, E.; ON, N.; WOOTTON, R.; ROLAN, P.; POSNER, J. Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-Valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. **Antimicrob Agents Ch**, Washington, v.39, p.2759-2764, 1995.
- STAGNI, G.; ALI, M. E.; WENG, D. Pharmacokinetics of acyclovir in rabbit skin after IV-bolus, ointment, and iontophoretic administrations. **Int J Pharm**, Amsterdam, v.274, p.201-211, 2004.

- STEINGRIMSDOTTIR H.; GRUBER. A.; PALM. C.; GRIMFORS G.; KALIN. M.; EKSBERG, S. Bioavailability of acyclovir after oral administration of acyclovir and its prodrug valaciclovir to patients with leucopenia after chemotherapy. **Antimicrob Agents Ch**, v.44, p. 207-209, 2000.
- SYRBE, A.; BAUER, W.J.; KLOSTERMEYER, N. Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **Int Dairy J**, Oxford, v. 8, n.3, p. 179-193, 1998.
- TAKADA, N.; NELSON, P.E. Pectin-protein interaction in tomato products. **J Food Sci**, Chicago, v. 48, n. 5, p. 1408-1411, 1983.
- TAKEDA, Y.; NAMBU, N.; NAGAI, T. Microencapsulation and bioavailability in beagle dogs of indomethacin. **Chem Pharm Bull**, v.29, n.1, p. 264-267, 1981.
- TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S.Y. Micromeritic properties of sulfamethoxazole microcapsules prepared by gelatin – acacia coacervation. **J Pharm Sci**, v.69, n.5, p.513-516, 1980.
- TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S.Y. Electrophoretic properties of sulfamethoxazole microcapsules and gelatin – acacia coacervates. **J Pharm Sci**, v.70, p.302-305, 1981.
- THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HONDA, A. Chemistry and uses of pectin - A review. **Crit Rev Food Sci**, v.37, n.1, p.47-73, 1997.
- THE MERCK INDEX. An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13th ed, 2001.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, pp.1746-1747, 23rd ed, 1995.
- TOLSTOGUZOV, V.B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloid**, v.4, p. 429-468, 1991.

- TOZAKI, H.; ODORIBA, T.; OKADA, N.; FUJITA, T.; TERABE, A.; SUZUKI, T.; OKABE, S.; MURANISHI, S.; YAMAMOTO, A. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats. **J Control Release**, Amsterdam, v.82, p.51-61, 2002.
- TROMP, R.H.; De VELDE, F.; RIEL, J.V.; PAQUES, M. Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and polysaccharides. **Food Res Int**, v. 34, p.931-938, 2001.
- TROMP, R.H.; KRUIF C.G., VAN EIJK, M., ROLIN, C. On the mechanism of stabilization of acidified milk drinks by pectin. **Food Hydrocolloid**, v.18, p.565-572, 2004.
- TUINIER, R.; ROLIN, C.; KRUIF, C.G. Eletrosorption of pectin onto casein micelles. **Biomacromolecules**, v.3, p.632-638, 2002.
- TURGEON, S.L.; BEAULIEU, M.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. **Curr Opin Colloid in**, v. 8, p. 401-414, 2003.
- VANDENBERG, G. W.; DROLET, C.; SCOTT, S. L.; DE LA NOUE, J. Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/ intestinal simulation. **J Control Release**, Amsterdam, v.77, p.297-307, 2001.
- VARGAS, C. I.; GHALY, E.S. Kinetic release of theophylline swellable matrices. **Drug Dev Ind Pharm**, v.25 (9), p.1045-50, 1999.
- VOLPATO, N.M.; SANTI, P; COLOMBO, P. Iontophoresis enhances the transport of acyclovir through nude mouse skin by electroosmosis, v.12, n.12, p.1623-1627, 1995.

- VOLPATO, N.M.; NICOLI, S.; LAURERI, C.; COLOMBO, P.; SANTI, P. In vitro acyclovir distribution in human skin layers after transdermal iontophoresis. **J Control Release**, v.50, p.291-296, 1998.
- WAKERLY, Z.; FELL, J. T.; ATTWOOD, D.; PARKINS, D. Pectin/ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery. **Pharm Res**, New York, v.13, n.8, p.1210-1212, 1996.
- WAKERLY, Z.; FELL, J.T.; ATTWOOD, D.; PARKINS, D. Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery. **J Pharm Pharmacol**, London, v. 49, n.6, p.622-625, 1997.
- WANG, Y.; KIMURA, K.; DUBIN, P. L.; JAEGER, W. Polyelectrolyte-MicelleCoacervation: Effects of Micelle Surface Charge Density, Polymer MolecularWeight, and Polymer/Surfactant Ratio. **Macromolecules**, v.33, p. 3324-3331, 2000.
- WEINBRECK, F.; DE VRIES, R.; SCHROOYEN, P.; DE KRUIF, C.G. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. **Biomacromolecules**, v.4, n.2, p.293-303, 2003.
- WEINBRECK, F.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBJIN, G.W.; DE KRUIF, C.G. Complexation of whey proteins with carrageenan. **J Agr Food Chem**, v.52, p.3550-3555, 2004.
- WHORTON , C.; REINECCIUS, G.A. Evaluation of the mechanisms associated with the release of encapsulated flavor materials from maltodextrin matrices. In: Risch, S.J.; Reineccius, G.A (Eds.). **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**. American Chemical Society, Washington, DC. p.143-160, 1995.

- WONG, T.W.; CHAN, L.W.; KHO, S.B.; HENG, P.W.S. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. **J Control Release**, Amsterdam, v. 84, p.99-114, 2002.
- YAO, K.D.; PENG, T.; YIN, I.J.; XU, M.X. Microcapsules/Microspheres related to chitosan. **Macromol Chem Phys**, C35, p.155-180, 1995.
- YE, A.; FLANAGAN, J.; SINGH, H. Formation of stable nanoparticles via electrostatic complexation between sodium caseinate and gum arabic. **Biopolymers**, v.82, p.121-133, 2006.
- ZALESKA, H.; RING, S.G.; TOMASIK, P. Apple pectin complexes with whey protein isolate. **Food Hydrocolloid**, v.14, n.4, p. 377-382, 2000.