

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE UM COMPLEXO BIOPOLÍMERO-ÍON
METÁLICO MATRICIAL MICROPARTICULADO PARA ADSORÇÃO
DE SUBSTÂNCIAS**

FRANCELINE REYNAUD

PORTO ALEGRE, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE UM COMPLEXO BIOPOLÍMERO-ÍON
METÁLICO MATRICIAL MICROPARTICULADO PARA ADSORÇÃO
DE SUBSTÂNCIAS**

Tese de doutorado apresentada por
Franceline Reynaud obtenção do TÍTULO
DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadoras:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres

Porto Alegre, setembro de 2009

AGRADECIMENTOS

Às Profas. Adriana R. Pohlmann e Silvia S. Guterres por terem acreditado no meu trabalho, pela oportunidade concedida e exemplo profissional.

Ao Prof. Elias Fattal e ao Dr. Nicolas Tsapis pela orientação dedicada, incentivo à pesquisa.

Aos professores Rui C. R. Beck, Annelise Gerbase e Teresa Dalla Costa pela colaboração científica.

Aos colegas do Laboratório 405 e Laboratoire Physico-Chimie, Pharmacotechnie, Biopharmacie da UMR CNRS 8612, pelo apoio e troca de conhecimentos.

Aos eternos amigos Helder Teixeira, Mariane Lira, Carlos Eduardo Santos Pires, Ricardo Pimenta, Ana Cristina Pinto, Carolina Vimieiro e Irene C. KulKamp, pela amizade e companheirismo.

À minha família pelo apoio incondicional, confiança e amor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo de doutorado sanduíche.

À Universidade do Oeste de Santa Catarina pelo apoio concedido.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	7
1 Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência bacteriana	8
2 Quinolonas	11
3 Sistemas microparticulados	14
4 Micropartículas de quitosana.....	16
4.1 Secagem por aspersão	19
4.2 Quitosana para imobilização de íons metálicos.....	22
4.3 Micropartículas de quitosana-metal para adsorção de fármacos.....	25
CAPÍTULO 1: Micropartículas de quitosana e quitosana-metal preparadas por secagem por aspersão para adsorção do ciprofloxacino.....	26
1.1 APRESENTAÇÃO	27
1.2 METODOLOGIA.....	29
1.2.1 Preparação das micropartículas.....	30
1.2.1.1 Micropartículas de quitosana.....	30
1.2.1.2 Micropartículas de quitosana-íons metálicos.....	30
1.2.1.3 Reticulação das micropartículas de quitosana e quitosana-metal com glutaraldeído	31
1.2.2 Caracterização físico-química das micropartículas.....	31
1.2.2.1 Determinação do grau de desacetilação.....	31
1.2.2.2 Quantificação dos íons metálicos adsorvidos.....	33
1.2.2.3 Avaliação morfológica das micropartículas.....	33
1.2.2.4 Tamanho das partículas e polidispersão.....	34
1.2.3 Estudo da adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de quitosana-metal.....	34
1.2.4 Modelo matemático das isotermas e cinética de adsorção do ciprofloxacino	35
1.2.4.1 Isotermas de adsorção	35
1.2.4.2 Cinética de adsorção	36
1.3 Estudo da seletividade de adsorção do ciprofloxacino.....	37
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
1.3.1 Micropartículas de quitosana e quitosana-metal.....	40

1.3.2 Caracterização das micropartículas de quitosana-metal	42
1.3.2.1.Grau de desacetilação.....	44
1.3.2.2 Morfologia das micropartículas de CH e CH-metal.....	47
1.3.3 Determinação dos metais	49
1.3.3.1 Determinação de Fe total nas micropartículas.....	49
1.3.3.2 Determinação de Zn(II) nas micropartículas.....	50
1.3.4 Adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de CH-metal	51
1.3.4.1 Isotermas de adsorção	54
1.3.4.2 Cinética de adsorção	59
1.3.5 Estudo da seletividade de adsorção do ciprofloxacino.....	62
CAPÍTULO 2: Sistema de liberação colônica, para adsorção seletiva de antimicrobianos residuais ao nível de cólon, baseado em micropartículas adsorventes de quitosana-metal, encapsuladas por uma matriz de pectina.....	65
2.1 APRESENTAÇÃO.....	66
2.2 METODOLOGIA.....	68
2.2.1 Micropartículas adsorventes de quitosana-metal.....	69
2.2.2 Encapsulamento das micropartículas adsorventes de CH-Fe(III) e CH-Zn(II).....	69
2.2.3 Revestimento das esferas de pectina-micropartículas adsorventes.....	69
2.2.3.1 Revestimento com Polietilenoimina (PEI)	70
2.2.3.2 Revestimento com Eudragit® RS	70
2.2.4 Meios digestivos simulados.....	70
2.2.5 Caracterização das esferas de pectina-micropartículas adsorventes.....	71
2.2.5.1 Diâmetro médio.....	71
2.2.5.2 Morfologia interna e externa.....	71
2.2.5.3 Intumescimento.....	72
2.2.5.4 Estabilidade frente aos meios digestivos simulados.....	72
2.2.6 Adsorção do ciprofloxacino pelas esferas pectina-micropartículas adsorventes.....	73
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
2.3.1 Esferas de pectina-micropartículas adsorventes.....	75
2.3.1.1 Caracterização físico-química.....	75
2.3.1.2 Intumescimento.....	78
2.3.1.3 Estabilidade frente aos meios digestivos simulados.....	80
2.3.1.4 Adsorção in vitro do ciprofloxacino.....	82
2.3.2 Esferas de pectina-micropartículas adsorventes revestidas com	83

Polietilenoimina.....	
2.3.2.1 Peso médio das esferas revestidas com PEI	84
2.3.2.2 Estabilidade frente aos meios digestivos simulados	85
2.3.2.3 Adsorção in vitro do ciprofloxacino	86
2.3.3 Esferas de pectina-micropartículas adsorventes revestidas com Eudragit®RS	88
2.3.3.1 Caracterização física	88
2.3.3.2 Intumescimento	90
2.3.3.3 Estabilidade frente aos meios digestivos simulados	92
2.3.3.4 Adsorção in vitro do ciprofloxacino	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anel quinolônico.....	12
Figura 2: Estrutura química do polímero quitosana, onde x= grau de acetilação e n = número de unidades por polímero (Adaptado de RINAUDO, 2006)	17
Figura 1.1: Reação de reticulação das micropartículas de quitosana e quitosana-metal com glutaraldeído	42
Figura 1.2: Determinação potenciométrica do grau de desacetilação das micropartículas de CH antes da reação de reticulação com glutaraldeído.....	44
Figura 1.3: Espectro no infravermelho das micropartículas de CH-Fe(II) (1), CH-Fe(III) (2), CH-Zn(II) (3) e CH (4); (a) iniciais e (b) reticuladas com glutaraldeído.	45
Figura 1.4: Micrografia das micropartículas de quitosana e quitosana-metal, obtidas por secagem por aspersão, (1) CH-Fe(II), (2) CH-Fe(III), (3) CH-Zn(II) e (4) CH, (a) iniciais e (b) reticuladas com glutaraldeído	48
Figura 1.5: Efeito do tempo de contato e da concentração inicial (25 à 400 µg/mL) na adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de CH-Fe(II) (1), CH-Fe(III) (2), CH-Zn(II) (3) e CH (4), em tampão HEPES, pH 6,8; a 37 °C	52
Figura 1.6: Isotermas de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH, em tampão HEPES, pH 6,8; a 37°C	55
Figura 1.7: Forma linearizada da equação da isoterma de Langmuir. Gráfico $1/q_{eq}$ em função de $1/C$, para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH	56
Figura 1.8: Forma linearizada da equação da isoterma de Freundlich. Gráfico $\text{Log}(q)$ em função de $\text{Log}(C)$, para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH	57
Figura 1.9: Estrutura proposta da complexação do ciprofloxacino com as micropartículas de CH-Fe(III)	62
Figura 1.10: Adsorção do ciprofloxacino e da nimesulida pelas micropartículas de CH-Fe(III) (A) e CH-Zn(II) (B), em tampão HEPES, pH 6,8; a 37 °C.....	63
Figura 2.1: MEV da superfície externa das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) (A e C) e CH (B e D)	78
Figura 2.2: Intumescimento das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) (proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6, p/p) e CH (proporção 4:4, p/p), no SIM (pH = 7,4; a 37 °C).....	79
Figura 2.3: Adsorção do ciprofloxacino (µg) por esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH no SIM (pH = 7,4; a 37 °C).....	82
Figura 2.4: Adsorção do ciprofloxacino (µg) por esferas revestidas com PEI contendo micropartículas de CH-Fe(III) em diferentes proporções (5:3, 4:4, 5:5 e 3:6, p/p) no SIM (pH 7,4; a 37 °C)	87

Figura 2.5: MEV das esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Fe(III) sem revestimento (A e D) e revestidas com Eudragit® RS: esferas inteiras (B e E), e corte transversal (C e F).....	90
Figura 2.6: Intumescimento das esferas revestidas com Eudragit® RS contendo micropartículas de CH-Fe(III) (proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6, p/p) e CH (proporção 4:4, p/p), no SIM (pH = 7,4; a 37 °C).....	91
Figura 2.7: Estabilidade das esferas de pectina revestidas com o Eudragit® RS contendo CH-Fe(III) (4 :4, p/p) incubadas por 5h no SIM (pH = 7,4; a 37 °C).....	92
Figura 2.8: Estabilidade das esferas de pectina revestidas com o Eudragit® RS contendo CH-Fe(III) (4 :4, p/p) incubadas no SCM (pH = 6,5; a 37 °C)	93
Figura 2.9: Adsorção do ciprofloxacino (µg) por esferas revestidas com Eudragit® RS contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH no SIM (pH 7,4; a 37°C)	94
Figura 2.10: Adsorção do ciprofloxacino (µg) por esferas não-revestidas (A) e revestidas com Eudragit® RS (B) contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH no SCM (pH 6,5; a 37 °C)	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Influência dos parâmetros de operação: temperatura de entrada e fluxo da bomba de alimentação, no tamanho médio, polidispersão e rendimento de micropartículas de CH-Fe(III), obtidas por secagem por aspersão.....	40
Tabela 1.2: Características físico-químicas das micropartículas de quitosana e quitosana-metal: tamanho médio, polidispersão, obtidos antes e após a reticulação com glutaraldeído.....	43
Tabela 1.3: Grau de desacetilação das micropartículas de CH e CH-metal, antes e após a reação de reticulação com glutaraldeído, obtido através de titulação potenciométrica e espectroscopia no IV.....	46
Tabela 1.4: Capacidade (qeq) de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de quitosana-metal e quitosana no tempo 300 min.....	53
Tabela 1.5: Isotermas de Langmuir e Freundlich: constante das isotermas, parâmetros das equações, coeficientes de correlação e média dos erros percentuais	57
Tabela 1.6: Comparação das constantes de pseudo-primeira e –segunda-ordem e capacidade de adsorção (qeq) experimental e calculado, obtidos para as diferentes concentrações iniciais de ciprofloxacino para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH.....	60
Tabela 2.1: Características físicas das esferas contendo diferentes proporções de pectina e de micropartículas, sendo CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH (p/p).....	76
Tabela 2.2: Estabilidade das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH nos meios digestivos simulados: gástrico (SGM), intestinal (SIM) e colônico (SCM), incubadas a 37 °C.....	81
Tabela 2.3: Peso médio (mg±SD) das esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Fe(III) em diferentes proporções, revestidas com concentrações crescentes de PEI.....	84
Tabela 2.4: Estabilidade das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH, revestidas com diferentes concentrações de PEI nos meios digestivos simulados: gástrico (SGM), intestinal (SIM) e colônico (SCM), incubadas a 37 °C.....	85
Tabela 2.5: Características físicas das esferas revestidas com Eudragit® RS contendo diferentes proporções de pectina e micropartículas de CH-Fe(III) e CH na proporção 4:4 (p/p).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

CH	Micropartícula de quitosana
CH:Pec	Micropartícula de quitosana encapsula pela matriz de pectina
CH-Fe(II)	Micropartícula de quitosana-ferro(II)
CH-Fe(III)	Micropartícula de quitosana-ferro(III)
CH-Fe(III):Pec	Micropartícula de quitosana-ferro(III) encapsula pela matriz de pectina
CH-metal	Complexo de quitosana com íons metálicos
CH-Zn(II)	Micropartícula de quitosana-zinco(II)
CLAE	Cromatografica líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de Variação
GDA	Grau de desacetilação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietilenoimina
q	Capacidade de adsorção
SCM	Meio colônico simulado
SGM	Meio gástrico simulado
SIM	Meio intestinal simulado
SPAN	Polidispersão

RESUMO

Micropartícula de quitosana complexada com íons metálicos [Fe(II), Fe(III), Zn(II)] foram preparadas e caracterizadas a fim de se obter sistemas microparticulados para a adsorção de substâncias. A técnica de preparo utilizada foi a secagem por aspersão, através da qual se obteve micropartículas esféricas colapsadas e com superfície rugosa. O tamanho de partícula foi influenciado tanto pela reação de reticulação com glutaraldeído como pela presença e tipo do metal utilizado para a formação do complexo. A adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas desenvolvidas foi estudada em meio aquoso, O estado de equilíbrio foi influenciado pelo tipo de metal presente na micropartícula e pela concentração inicial de ciprofloxacino na solução. Com o intuito de descrever o mecanismo de adsorção, foram utilizados modelos matemáticos de isoterma de Langmuir e Freundlich, sendo que os dados apresentaram um melhor ajuste para a isoterma de Freundlich. Através da análise de modelos de cinética de *pseudo-primeira-ordem* e *pseudo-segunda-ordem*, verificou-se que os dados melhor se ajustaram ao modelo de *pseudo-segunda-ordem*, indicando que o mecanismo de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas é através de quimissorção. A determinação da capacidade de adsorção do ciprofloxacino, conduzido *in vitro*, demonstrou que as micropartículas de quitosana-Fe(III) e quitosana-Zn(II) apresentam efetividade de adsorção. Com isso as micropartículas de quitosana-Fe(III) foram encapsuladas por uma matriz de pectina, sendo este utilizado para a adsorção de antimicrobianos residuais presentes no cólon. A estabilidade das esferas foi determinada em meios digestivos simulados, onde se verificou uma estabilidade de 1 h e 5 h nos meios gástricos e intestinal, respectivamente. Quando as esferas foram incubadas no meio colônico, observou-se uma degradação dependente da concentração de pectina. Com o intuito de evitar a adsorção do ciprofloxacino no meio intestinal, as esferas foram revestidas com Eudragit® RS. Estudos de adsorção em meio colônico simulado demonstrou que a capacidade de adsorção das micropartículas de quitosana-Fe(III) não é afeta pela encapsulação na matriz de pectina. O sistema desenvolvido demonstra ser promissor para a extração do ciprofloxacino presente no meio colônico simulado.

Palavras chave: micropartículas, quitosana-metal, adsorção, esferas de pectina, ciprofloxacino.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A BIOPOLYMER-METALLIC ION MICROPARTICULATED COMPLEX TO SUBSTANCE ADSORPTION

The aim of this work was to develop, characterize chitosan- metal ion [Fe(II), Fe(III), Zn(II)] microparticle, and evaluate the adsorption capacities of ciprofloxacin by these complexes. The microparticles were prepared by a spray drying method. They showed good sphericity and a roughness surface morphology. The particle size was influenced by crosslinking reaction and by the kind of metal ion onto the microparticle. A batch adsorption system was applied to study the adsorption of ciprofloxacin from aqueous solution by chitosan-metal ion crosslinked microparticle. The adsorption process was fast, and the equilibrium contact times were influenced by the kind of metal ion onto microparticle. The Langmuir and Freundlich adsorption models were used for mathematical description of the adsorption equilibrium, and it was found that experimental data fitted well to Freundlich model. Adsorption models, based on the assumption of the pseudo-first-order and pseudo-second-order mechanism showed that the pseudo-second-order adsorption mechanism is predominant, and the adsorption process appears to be controlled by the chemical reaction. Chitosan-Fe(III) and chitosan-Zn(II) microparticle demonstrated the highest adsorption of ciprofloxacin. Chitosan-Fe(III) microparticle was encapsulated in a pectin matrix. The system was used for the adsorption of colonic residual antibiotics responsible by the emergence of resistance. The stability of the beads was carried out on simulated digestive media. Beads incubated in simulated gastric and intestinal medium were stable for 1 h and 5 h, respectively. When incubated in simulated colonic medium, beads were then degraded by pectinases contained in the medium. Coating with Eudragit[®] RS was needed to prevent the early adsorption of antibiotics in intestinal medium. Adsorption studies in simulated colonic medium show that the adsorption capacity of chitosan-Fe(III) is not modified after encapsulation within pectin beads making the elimination reaching the colon clinically feasible.

Key-words: microparticle, chitosan-metal, adsorption, Pectin beads, ciprofloxacin.

INTRODUÇÃO

Após a descoberta dos antimicrobianos, como a penicilina na década de 1940, a sua utilização na terapêutica não cessa de aumentar. Em função das numerosas aplicações no tratamento de doenças infecciosas, o consumo de antimicrobianos apresenta um acréscimo principalmente a partir dos anos 1980. A exposição constante da população aos antimicrobianos, geralmente associada a uma utilização abusiva, como também por prescrições inadequadas, favoreceu o aparecimento de microorganismos multiresistentes e a sua disseminação no meio ambiente. Desta forma, o alto consumo de antimicrobianos caracteriza um problema maior de saúde pública quando apresenta um risco de evolução através da seleção de bactérias totalmente resistentes aos tratamentos por antimicrobianos (BARBOSA e LEVY, 2000; ANDERSON et al., 2003). Para combater esta multiplicação e disseminação de bactérias resistentes, diversas medidas são tomadas pelas autoridades de saúde visando diminuir o consumo de antimicrobianos e também promover a sua correta utilização (ANDREMONT, 2000; TRÉMOLIÈRES et al., 2005). No entanto, em face da lentidão da modificação de comportamento na utilização dos antimicrobianos, outras soluções devem ser vislumbradas.

Os efeitos adversos da antibioticoterapia ocorrem devido ao efeito deletério que os antimicrobianos residuais, não absorvidos ou excretados pela bile, exercem sobre a flora colônica humana. Diversos estudos conduzidos sobre os β -lactâmicos, classe de antimicrobianos mais prescritos, mostraram que a presença residual do antimicrobiano no cólon e seus efeitos nefastos sobre a flora eram inversamente proporcionais a atividade das β -lactamases sobre a flora colônica. Para minimizar esta resistência bacteriana, estudos recentes realizados por Bourgeois e colaboradores (2005; 2006; 2008) relatam o desenvolvimento de um sistema galênico baseado na liberação de enzimas β -lactamases capazes de degradar os antimicrobianos no cólon. Esse sistema apresentou eficácia frente a antimicrobianos β -lactâmicos. Entretanto, existem classes de antimicrobianos, como as quinolonas, que não são degradadas por enzimas até agora identificadas, logo o sistema não apresentaria eficácia na degradação destes antimicrobianos.

A quitosana é um biopolímero natural, que também pode ser obtido por desacetilação da quitina, polissacarídeo isolado da carapaça de crustáceos e fungos. Dependendo do método de desacetilação utilizado, o polímero da quitosana

pode apresentar entre 50 a 100 % de grupos amino livres (RODRIGUES et al., 1999; RAVI KUMAR, 2000a). Uma característica relevante da quitosana é a formação de complexos estáveis com íons metálicos. Estes complexos são formados através da coordenação dos íons metálicos com o par de elétrons não compartilhados dos grupos amino livres. Alguns destes metais são fortemente retidos e, desta forma, podem ser utilizados para modificar a estrutura polimérica (BURKE et al., 2002; GUIBAL, 2004).

De acordo com pesquisas recentes (GUIBAL, 2004; VARMA et al., 2004; ZHENG et al., 2006), sabe-se que a quitosana contendo íons Cu(II) imobilizados forma complexos estáveis com proteínas devido à presença do nitrogênio em seus resíduos. Já quando a quitosana coordena íons Fe(III), o complexo formado pode ser utilizado para a adsorção de compostos fenólicos e substâncias fosforiladas (RODRIGUES et al., 1998a; BÜRGER et al., 2001).

A utilização de sistemas de liberação controlada envolve um vasto campo de estudos e vários pesquisadores têm investido na área da microencapsulação de fármacos, estudando desde seus diferentes métodos de obtenção, diferentes matrizes constituintes e buscando desenvolver métodos de caracterização eficiente que possibilitem a determinação da funcionalidade das micropartículas (RAVI KUMAR, 2000b). A aplicação farmacêutica de micropartículas de quitosana para sistemas de liberação controlada tem despertado o interesse de diferentes grupos de pesquisa, pois além de propiciar a liberação controlada de vários fármacos e melhorar a biodisponibilidade de substâncias degradáveis, como proteínas, podem ainda aumentar a absorção de substâncias hidrofílicas (HE et al., 1999; SINHA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

A pectina é um polissacarídeo de ocorrência natural encontrada na parede celular de plantas, composto majoritariamente, por ácido galacturônico e o seu éster metílico. É resistente à ação das enzimas presentes no estômago e intestino delgado sendo quase completamente degradada por enzimas pectinolíticas produzidas pela microflora colônica (BOURGEIOS et al., 2006; FREIRE et al., 2006). Deste modo formulações que apresentem a pectina como material de revestimento constituem mecanismos passíveis de maximizar a especificidade na liberação

colônica, assegurando uma proteção eficaz durante o trânsito pelo trato gastrintestinal.

Nesta perspectiva, o objetivo do trabalho é o desenvolvimento de um complexo biopolímero-íon metálico matricial microparticulado, composto de quitosana e íons metálicos, para a extração de antimicrobianos residuais presentes no cólon, a fim de eliminá-los localmente e reduzir seus efeitos secundários. Para garantir uma liberação cólon-específica, as micropartículas de quitosana-metal serão encapsuladas com a pectina.

É importante mencionar que não há relatos na literatura sobre a preparação de micropartículas utilizando como matriz o polímero de quitosana-metal para a adsorção de substâncias ativas até o momento, confirmando o ineditismo desta proposta.

OBJETIVOS

A hipótese de trabalho baseia-se na possibilidade do desenvolvimento inédito de micropartículas compostas de complexos de quitosana e íons metálicos para a adsorção específica e seletiva de fármacos. Desta forma, o trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de um complexo biopolímero-íon metálico matricial microparticulado, composto de quitosana e íons metálicos, para a extração de antimicrobianos residuais presentes no cólon, a fim de eliminá-los localmente e reduzir seus efeitos adversos.

Os objetivos específicos foram:

- Preparar e caracterizar micropartículas de quitosana reticulada contendo diferentes íons metálicos imobilizados [Fe(II), Fe(III) e Zn(II)] utilizando o método de secagem por aspersão;
- Caracterizar as micropartículas de quitosana-metal quanto ao grau de desacetilação, quantificação dos íons metálicos, morfologia, tamanho de partícula e distribuição granulométrica;
- Determinar *in vitro* a capacidade de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas desenvolvidas;
- Determinar, através de isothermas e cinética de adsorção, o mecanismo da adsorção *in vitro* do ciprofloxacino pelas micropartículas desenvolvidas;
- Verificar a especificidade de adsorção do antimicrobiano ciprofloxacino frente ao anti-inflamatório nimesulida;
- Preparar um sistema de liberação colônica contendo micropartículas de quitosana-metal encapsuladas por uma matriz de pectina;
- Caracterizar as esferas de pectina-micropartículas adsorventes quanto ao diâmetro, morfologia, intumescimento e estabilidade frente a meios digestivos simulados;
- Avaliar *in vitro*, a adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas adsorventes de quitosana-metal encapsuladas na matriz de pectina.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência bacteriana

A introdução de antimicrobianos na terapêutica no início dos anos 40 do, caracterizada como o início da “era antibiótica”, trouxe benefícios importantes sobre o estado de saúde da população com considerável erradicação de doenças infecciosas graves, assim como a diminuição de complicações infecciosas presentes em determinadas patologias. Atualmente, os antimicrobianos são utilizados na terapêutica humana (54%) e veterinária (34%). Na veterinária além dos antimicrobianos serem utilizados no tratamento de infecções bacterianas, eles são utilizados também como promotores de crescimento na criação de animais (12%) (BARBOSA e LEVY, 2000; ANDERSON, et al., 2003).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as infecções causam 25 % das mortes em todo o mundo, sendo na ordem de 45 %, nos países em desenvolvimento. A prescrição de antimicrobianos ocorre em aproximadamente 60 % do total das consultas médicas, onde 20 % são prescrições inapropriadas. Além das excessivas prescrições indevidas, outro fator preocupante consiste na automedicação, sendo que 2/3 do consumo total dos antimicrobianos são realizados sem prescrição médica e como agravante, constata-se que a utilização destes medicamentos é realizada de forma incorreta. Dados demonstram que a metade da população compra o antimicrobiano para apenas um dia de tratamento e em torno de 90 % adquire o medicamento para um período igual ou inferior a 3 dias. O uso irracional dos antimicrobianos resulta no gasto de 50 % do total do orçamento destinado aos medicamentos (WHO, 2001).

O uso irracional de agentes antimicrobianos em animais e seres humanos é caracterizado como um grave problema de saúde pública, pois ele resulta no surgimento e disseminação de microorganismos resistentes. O aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos bem com os efeitos adversos destes medicamentos ocasionam um efeito deletério sobre o ecossistema intestinal do homem, principalmente sobre a flora colônica.

A flora contém um grande número de bactérias ($\sim 10^{12}$ UFC/mL) sendo sua composição muito estável em uma pessoa saudável. A flora colônica do homem é essencialmente composta por bactérias anaeróbicas, sendo *Bacteroides*,

Eubacterium, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Endosporus*, *Plectridium* e *Clostridium*. Duas espécies, anaeróbicas facultativas e possivelmente patogênicas, as enterobactérias e os enterococos, estão permanentemente presentes em condição de sub-domínio. Ainda estão presentes, em quantidade minoritária, certas leveduras como a *Candida sp.* (FALK, et al., 1998; CORTIER, 2007).

Uma das principais funções da flora colônica é a resistência à colonização, ou o chamado “efeito de barreira”. Este efeito é devido à presença das espécies anaeróbicas da flora dominante e consiste em impedir a implantação e desenvolvimento de bactérias potencialmente patogênicas. Os mecanismos de controle à colonização por bactérias estranhas à flora colônica, vão desde fenômenos de competição por nutrientes, até bloqueio de sítios de ligação ou ainda produção de substâncias inibidoras de crescimento (FRETER, et al., 1983).

Na terapia com antimicrobianos, uma fração não negligenciável destes medicamentos atingem o cólon sob sua forma ativa. Geralmente esta fração é resultante de uma parte que não foi absorvida a partir de uma administração por via oral, ou mesmo da excreção biliar no tubo digestivo quando a administração é parenteral ou oral (DUCLUZEAU, 1997; ANDREMONT, 2000). De certa forma, a excreção de antimicrobianos residuais ativos na luz do colón desencadeia um desequilíbrio do ecossistema pela destruição parcial ou total da flora colônica, o que resulta numa diminuição da resistência à colonização. Como consequência pode ocorrer o aparecimento de infecções oportunistas, como exemplo clássico pode-se citar a infecção vaginal por *Cândida sp* durante uma antibioticoterapia. O risco do desenvolvimento de infecções oportunistas é ainda maior em pacientes imunodeprimidos e, em particular, em pacientes neutropênicos, os quais apresentam maior susceptibilidade ao aparecimento de infecções intestinais (TANCRÈDE, 1977; ANDREMONT, 2000).

O desenvolvimento da resistência bacteriana é um problema de saúde pública a nível mundial e políticas de controle do desenvolvimento de bactérias multirresistentes devem ter objetivos globais. Entretanto constata-se que o uso indiscriminado de antimicrobianos, principal fator contribuinte ao desenvolvimento da resistência bacteriana, é mais acentuado em países em desenvolvimento. No Brasil, o fato das farmácias comercializarem antimicrobianos livremente e a baixa adesão

dos hospitais aos programas de controle de infecção, indicam a necessidade de buscar novos rumos frente ao uso destes medicamentos (WANNMACHER, 2004). Outra questão importante de ser levantada é o controle do uso veterinário de antimicrobianos. A interação do Ministério da Agricultura com o Ministério da Saúde deveria ser estreitada, de maneira a evitar que problemas de saúde pública possam ser gerados a partir do uso indiscriminado destes produtos em animais.

Na tentativa de resolver ou amenizar a problemática da utilização incorreta dos antimicrobianos visando a reduzir o impacto na saúde pública, três estratégias principais tem sido adotadas: primeiro a caracterização das práticas atuais, através de estudos junto aos prestadores de cuidados, em relação aos seus hábitos de prescrição; segundo, a criação de guias e protocolos para o uso racional de antimicrobianos; e, finalmente, o desenvolvimento de materiais e estratégias educacionais (para médicos e usuários), visando alterar hábitos e comportamentos (BERQUÓ, et al., 2004). Entretanto, em face à lentidão na modificação do comportamento da população na utilização dos antimicrobianos, outras medidas alternativas devem ser buscadas.

Com base no exposto, várias iniciativas têm surgido com o intuito de controlar a emergência da resistência bacteriana em todo o mundo, dentre estas iniciativas destaca-se os estudos realizados por Bourgeois e colaboradores (2005; 2006 e 2008). Com os trabalhos gerados, os autores apresentaram o desenvolvimento de um novo sistema galênico baseado na liberação de enzimas capazes de degradar os antimicrobianos ao nível do cólon. Como os β -lactâmicos constituem 1/3 do total de antimicrobianos consumidos, os autores estudaram o encapsulamento de β -lactamases, enzima capaz de degradar β -lactâmicos, em esferas de pectina.

A pectina é um polissacarídeo natural que apresenta caráter hidrofílico e, quimicamente, consiste numa cadeia linear de moléculas ligadas ao ácido galacturônico cujos ácidos carboxílicos estão parcialmente metoxilados. Alguns destes grupos carboxílicos podem ser convertidos a carboxiamida produzindo amidato de pectina, o qual possibilita a formação de um gel na presença de cátions divalentes como o cálcio (RIDLEY et al., 2001). Através deste mecanismo, é possível preparar esferas de pectina por gelificação iônica na presença de cloreto de cálcio contendo β -lactamases no seu interior (BOURGEOIS et al., 2005).

A gelificação da pectina é dependente da concentração de íons cálcio. O cloreto de cálcio é higroscópico e aumenta a quantidade de água presente nas esferas de pectina, a qual favorece a hidrólise da β -lactamases. Com isto foi necessário o revestir as esferas. Para tal, os autores utilizaram a polietilenoimina, a qual promoveu um maior rendimento da encapsulação da enzima e a estabilidade do sistema no meio intestinal (BOURGEOIS et al., 2006).

As esferas de pectina são susceptíveis de serem degradadas especificamente no cólon, onde existem bactérias que produzem enzimas pectinolíticas, logo as esferas foram protegidas as β -lactamases contra a degradação pelas proteases presentes no trato gastrointestinal. Ao alcançar o cólon, ocorreu uma hidrólise enzimática da pectina com a liberação imediata das β -lactamases, as quais degradaram rapidamente a ampicilina presente no meio. Com isso os autores sugerem que as esferas de pectina permitem a liberação de β -lactamases de maneira específica no cólon, sem que isso se traduza numa modificação da farmacocinética do antimicrobiano co-administrado (BOURGEOIS et al., 2008).

O sistema descrito anteriormente apresentou eficácia frente a antimicrobianos β -lactâmicos. Entretanto, existem classes de antimicrobianos, como as quinolonas, que não são degradadas por enzimas até agora identificadas, logo este sistema não apresentaria eficácia na degradação destes antimicrobianos.

2 Quinolonas

As quinolonas constituem um grupo de antimicrobianos comumente utilizados na clínica. O termo quinolona foi utilizado pela primeira vez em 1949 por Price, que descreveu um derivado alcalóide com estrutura semelhante ao núcleo quinolônico. Desde a introdução na clínica do ácido nalidíxico no início da década de 60 um número relativamente grande de derivados estruturalmente relacionados tem sido sintetizado (SOUSSY, 2001).

O mecanismo de ação das quinolonas consiste na inibição de duas enzimas da família das topoisomerasas, a DNA girase e a topoisomerase IV, sendo estas enzimas essenciais na replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano. A

DNA girase é constituída por 2 subunidades A e 2 subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente, sendo a subunidade A o local específico de ligação das quinolonas. A topoisomerase IV também é constituída de 4 subunidades codificadas pelos genes *parC* e *parE*, sua função é separar moléculas-filhas de DNA interligadas, as quais são produto da replicação do DNA. A resistência bacteriana associada às fluoroquinolonas está relacionada com mutações na subunidade A da DNA girase bacteriana. Os fatores principais que predispõem o desenvolvimento de resistência incluem concentrações subinibitórias do fármaco e terapia prolongada (GILLESPIE e KENNEDY, 1998; SOUZA, et al., 2004).

O estudo da relação estrutura química-atividade biológica desses fármacos levou a síntese de compostos cada vez mais ativos e com maior espectro de ação. Analisando a estrutura química base das quinolonas (**Figura 1**), verifica-se a presença de dois anéis aromáticos acoplados, uma função cetona na posição 4 e uma função carboxílica na posição 3.

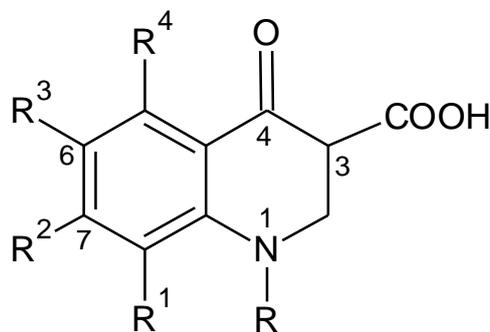


Figura 1: Anel quinolônico.

Várias substituições podem ser realizadas em diferentes posições do anel quinolônico, no entanto as substituições fundamentais para um aumento acentuado da potência e do espectro bacteriano é a inserção de um átomo de flúor na posição 6 e a inserção de um grupo piperazila ou pirrolidinila na posição 7. Outra substituição que favorece o aumento da atividade destes fármacos é a introdução de grupos como etila, ciclopropila, ter-butila e arilas fluorados, na posição 1. A inclusão do átomo de flúor na posição 6 e um grupo piperazinila na posição 7 geram as

fluoroquinolonas, dentre as quais, as mais estudadas e utilizadas estão o ciprofloxacino, o ofloxacino e o norfloxacino (APPELBAUM e HUNTER, 2000; SOUZA, et al., 2004).

As fluoroquinolonas são potentes bactericidas contra *E. coli* e várias espécies de *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Campylobacter* e *Neisseria*. Apresentam ainda uma boa atividade contra estafilococos, incluindo cepas resistentes à meticilina. Com isso, as fluoroquinolonas são fármacos de escolha no tratamento de infecções do trato urinário, prostatites, infecções abdominais, diarreia bacteriana, pneumonia hospitalar, artrite séptica e osteomielite (GOODMAN e GILMAN, 2005).

As propriedades farmacocinéticas das fluoroquinolonas são as grandes responsáveis pelo seu extenso uso na clínica. Dependendo da estrutura química, as fluoroquinolonas podem apresentar um caráter lipofílico, anfótero ou ainda serem ácidos fracos, sendo estas características que determinam a farmacocinética do fármaco.

Em relação ao ciprofloxacino a biodisponibilidade é de 55 a 85 %. Após administração oral o ciprofloxacino é rapidamente absorvido, apresentando níveis séricos máximos de 2,4 µg/mL em aproximadamente 1h 25 min após administração. A absorção do ciprofloxacino ocorre principalmente no duodeno apresentando uma diminuição considerável no jejuno e intestino delgado sendo praticamente nula no cólon. O tempo de meia vida sérica é de aproximadamente 4 h (CRUMP et al., 1983; HARDER et al., 1990). A excreção do ciprofloxacino pode ocorrer tanto por via renal quanto intestinal. Estudos recentes demonstram que a principal via de excreção do ciprofloxacino é a intestinal, atingindo níveis de recuperação deste fármaco a partir das fezes após um período de coleta de 5 dias, correspondentes a 18 % após administração parenteral e 33 % após administração oral.

Considerando que o ciprofloxacino é uma molécula anfótera, em pH 6,0-6,5 (pH do meio colônico) ela apresenta características iônicas, não sendo desta forma reabsorvida no cólon. Esta característica é interessante pois possibilita a utilização deste fármaco para o tratamento de infecções intestinais. Por outro lado, este padrão de eliminação pode explicar o aparecimento de efeitos adversos decorrentes da alteração da flora intestinal (RAMON et al., 1994; 1996; 2001).

A presença de alimentos não interfere na absorção do ciprofloxacino, entretanto o uso concomitante deste fármaco com substâncias como antiácidos ou outros compostos contendo cátions impedem a sua boa absorção devido à formação de complexos (TUREL, 2002; GU e KARTHIKEYAN, 2005).

A formação de complexos entre o ciprofloxacino e diferentes íons metálicos, ocorre devido à presença dos grupos ionizáveis carboxila e amina secundária do anel piperazila, presentes na estrutura do fármaco (UPADHYAY et al., 2006). A estrutura é descrita como um complexo bidentado entre o íon metálico e o fármaco, onde a ligação ocorre entre o oxigênio da posição 4 e outro oxigênio do grupo carboxílico da posição 3. Estes grupos podem formar ligação iônica ou ainda coordenação covalente com um centro catiônico, criando desta forma um complexo do tipo quelato (KMETEC et al., 1999; SADEEK, 2005).

A estabilidade do complexo formado é geralmente dependente da estrutura da química do fármaco, do íon metálico envolvido e das condições do meio, como o pH. Para o ciprofloxacino, a constante de formação do complexo com o Fe(III) é 14,11; em pH 3,25 (URBANIAK, et al., 2007), e esta constante de estabilidade decresce na ordem $Fe(III) \approx Al(III) > Cu(II) > Fe(II) \approx Zn(II) \gg Mg(II) > Ca(II)$ (MA et al., 1997; KMETEC et al., 1999; URBANIAK, 2007).

A capacidade de ligação com a DNA girase bacteriana está diretamente relacionada com a ionização dos grupos carbonila e carboxila. Uma vez que estes mesmos grupos formam quelatos com íons metálicos multivalentes, a formação do complexo ciprofloxacino-metal reduz consideravelmente a interação com a DNA girase, conseqüentemente ocorre uma perda da eficácia terapêutica (TUREL, 2002).

3 Sistemas microparticulados

Os sistemas de liberação sustentada incluem quaisquer sistemas de administração de fármacos que promovam liberação lenta do fármaco por um período prolongado. Se o sistema pode fornecer algum controle, sendo de natureza temporal ou espacial da liberação do fármaco no organismo, mantendo níveis constantes no tecido ou células-alvo, ele é considerado um sistema de liberação

controlada (GRATTARD et al., 2002; VARDE e PACK, 2004). Dentre os sistemas desenvolvidos para veicular e controlar a liberação de fármacos pode-se destacar as micropartículas e as nanopartículas. A incorporação de fármacos nestes sistemas pode resultar em formas de encapsulamento, cujos mecanismos são: adsorção, dissolução ou retenção na matriz (RAVI KUMAR, 2000b; SCHAFFAZICK et al., 2003; FREIBERG e ZHU, 2004).

O termo micropartícula é genérico e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes: microcápsulas e microesferas, ambas apresentando um diâmetro de 1 μm a 1000 μm . Denominam-se microesferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se disperso ou solubilizado na matriz polimérica, constituindo um sistema monolítico. O material polimérico forma uma rede tridimensional, onde o fármaco pode ser adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à superfície da partícula, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos. Por outro lado, as microcápsulas constituem sistemas do tipo reservatórios, onde é possível identificar um núcleo diferenciado. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica (RAVI KUMAR, 2000b; YANG e ALEXANDRIDIS, 2000).

A microencapsulação tem sido o foco de inúmeras pesquisas nos setores farmacêutico e biomédico nas últimas décadas. Estes sistemas vêm sendo desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, pois possibilitam vantagens como a liberação sustentada ou controlada de substâncias ativas, a proteção do conteúdo do núcleo contra efeitos atmosféricos, a proteção de substâncias higroscópicas, a redução da irritação gastrointestinal causada por fármacos administrados por via oral, o mascaramento do sabor e odor, a proteção das propriedades físico-químicas da substância como pH ou propriedades catalíticas, a separação de componentes incompatíveis por razões funcionais e ainda, a melhora das características de fluxo de uma determinada substância (GRATTARD et al., 2002; FREIBERG e ZHU, 2004; VARDE e PACK, 2004).

Os sistemas de liberação de fármacos microparticulados podem ser administrados por diferentes vias, dentre elas destaca-se a oral (VARDE e PACK, 2004). A via oral é preferida devido à facilidade de administração pela maioria dos pacientes, não havendo a necessidade de intervenção de um profissional de saúde.

A microencapsulação evita a degradação do fármaco no trato gastrointestinal superior, efeito este limitante na administração por via oral de fármacos, como proteínas e polipeptídeos, em sistemas de liberação convencionais. Os fatores que controlam a absorção intestinal das micropartículas são o seu tamanho, a natureza do material polimérico, o potencial zeta e a presença de promotores de bioadesão no veículo (DESAI et al., 1996). Outras aplicações de micropartículas envolvem as vias oftálmica (ZIMMER e KREUTER, 1995), intramuscular, pulmonar, nasal e tópica (TAO e DESSAI, 2003; VARDE e PACK, 2004).

Na obtenção de micropartículas tem sido empregada uma grande variedade de materiais poliméricos. A característica essencial do material de revestimento é a sua capacidade de fornecer uma matriz polimérica biodegradável e biocompatível. A biocompatibilidade das micropartículas pode ser alcançada com a utilização de polímeros naturais como a celulose, quitina e quitosana, ou ainda com polímeros semi-sintéticos derivados de monômeros de ocorrência natural como ácido lático e glicólico. Os polímeros derivados de monômeros sintéticos, também são promissores como matrizes de revestimento, entretanto a biocompatibilidade destes é limitada e ainda podem apresentar uma relevante toxicidade (RAVI KUMAR, 2000a, VARDE e PACK, 2004).

4 Micropartículas de quitosana

Polissacarídeos naturais e seus derivados representam um grupo de polímeros largamente utilizados em formas farmacêuticas, sendo preferidos em detrimento de polímeros sintéticos, devido à sua ausência de toxicidade, baixo custo e disponibilidade (RAVI KUMAR 2000a). Dentre os polímeros de origem natural, destaca-se a quitina, a qual é isolada de insetos, crustáceos como o caranguejo e camarão, bem como de fungos como *Aspergillus niger*, sendo assim um dos biopolímeros mais abundantes na natureza (RODRIGUES et al., 1999).

A reação de desacetilação da quitina em soluções alcalinas, onde seus grupamentos acetamida (-NHCOCH₃) são transformados, em graus variados, em grupos amino (-NH₂), dá origem a quitosana (KIMURA, 1999). A quitosana pode ser definida como um copolímero linear de 2-amino-2-desoxi- β -D-glicopiranosose e 2-

acetamida-2-desoxi- β -D-glicopiranoose, de composição variável em função do grau residual de acetilação, cujas unidades são unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ (**Figura 2**) (DODANE e VILIVALAN, 1998; KO et al., 2002; RINAUDO, 2006).

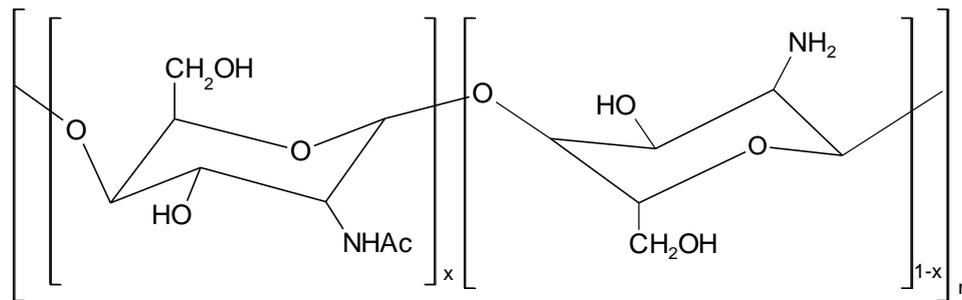


Figura 2: Estrutura química do polímero quitosana, onde x = grau de acetilação e n = número de unidades por polímero (Adaptado de RINAUDO, 2006).

A quitosana tem despontado nos últimos anos como um biomaterial de potencial aplicação principalmente nas áreas médica e farmacêutica, devido as suas características como bioadesividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (DODANE e VILIVALAM, 1998; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2000). Em paralelo, este biopolímero também apresenta uma baixa toxicidade, ausência de alergenicidade, e ainda atividade antimicrobiana, antiulcerogênica e capacidade de adsorção de metais tóxicos como o mercúrio e cádmio (SABNIS e BLOCK, 2000; VOLD et al., 2003).

O caráter catiônico da quitosana e suas características de solubilidade: insolúvel frente a meios básicos ou neutros e solúvel em meio ácido; além da propriedade de formar filmes, géis, esferas e micropartículas permitem a sua utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos (AGNIHOTRI et al., 2004). Estudos relatam a utilização de quitosana para a liberação controlada de fármacos anti-inflamatórios (LORENZO-LAMOSA et al., 1998; CHAMBIN et al., 2006); cimetidina e famotidina (HE et al., 1999); enzimas (KRAJEWSKA, 2004), clorexidina (GIUNCHEDI et al., 2002); vitamina D₂ (SHI e TAN, 2002), antimicrobianos (GENTA et al., 1998; GIUNCHEDI et al., 1998; DENKBAS et al.,

2004; CEVHER et al., 2006), peptídios (BERNKOP-SCHNÜRCH, 2000), dentre outros.

A utilização da quitosana como matriz polimérica para liberação de fármacos apresenta uma grande vantagem frente à utilização de outros sistemas, pois a quitosana apresenta um efeito protetor do fármaco, através da capacidade de formar complexos com as enzimas que degradariam o fármaco, garantindo que este atinja o seu local de ação na dosagem efetiva (BERNKOP-SCHÜRCH, 2000). Outra grande vantagem da quitosana na liberação de fármacos é a sua propriedade mucoadesiva. A mucoadesividade ocorre, pois as cargas positivas da quitosana interagem com as cargas negativas dos resíduos - ácido siálico presentes nas mucosas. Esta interação permite o contato do fármaco com o revestimento mucoso minimizando o trânsito, de forma que um alto gradiente de concentração através da membrana possa ser mantido por longos períodos de tempo (GIUNCHEDI et al., 2002; AGNIHOTRI et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2005).

A concentração de fármaco liberado de micropartículas de quitosana apresenta influência direta de características como tamanho de partícula, densidade, viscosidade, massa molar e grau de desacetilação da quitosana utilizada (SINHA et al., 2004; GUPTA e JABRAIL, 2006a). A massa molar decresce durante o processo de desacetilação, devido ao meio alcalino e o aquecimento. Alguns autores descrevem que a temperatura e o tempo de reação apresentam influência direta nas características físico-químicas da quitosana, que por sua vez influenciam as características funcionais do polímero, como: capacidade de formar ligações com outras moléculas, intumescimento e viscosidade da solução do polímero (KOFUJI et al., 2005).

O grau de desacetilação é caracterizado pela porcentagem de grupos amino livres na superfície da quitosana, que pode ser determinado através de diferentes técnicas, dentre as quais se pode evidenciar a titulação potenciométrica (BROUSSIGNAC, 1968), espectroscopia no infra-vermelho e no ultra-violeta e, ainda, através de técnica de Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C) (BRUGNEROTTO et al., 2001; RINAUDO, 2006; GUPTA e JABRAIL, 2006a).

A variação do grau de desacetilação pode levar a obtenção de micropartículas que propiciem uma liberação sustentada para um fármaco em específico, prolongando o seu tempo de ação, melhorando a sua eficácia e reduzindo os efeitos colaterais (GUPTA e JABRAIL, 2006b). Para a reação de reticulação da quitosana, normalmente são utilizados agentes como o glutaraldeído, formaldeído, gliceraldeído, glioxal e tripolifosfato (OLIVEIRA et al., 2005). A concentração do agente reticulador e o tempo de reação podem apresentar uma influência direta nos aspectos morfológicos das micropartículas de quitosana, como o tamanho da partícula, esfericidade, potencial zeta e o grau de intumescimento (HE et al., 1999; KO et al., 2002)

Outro aspecto que merece ser comentado é a técnica de preparação das micropartículas. A escolha da técnica está relacionada a fatores como a possibilidade de produção em escala industrial, reprodutibilidade de características como tamanho da partícula e uniformidade, mas principalmente, está diretamente relacionada com as características do fármaco a ser encapsulado (FREIBERG e ZHU, 2004). A técnica mais apropriada é aquela que evita a degradação e propicia uma liberação controlada do fármaco, fatores estes que podem ser comprometidos de acordo com condições inerentes de cada processo como, por exemplo, altas temperaturas, presença de solventes orgânicos ou condições que promovam uma interação física (VARDE e PACK, 2004). Dentre as técnicas de preparo pode-se citar: polimerização interfacial, evaporação/extração do solvente, coacervação ou precipitação e ainda a secagem por aspersão (ou *spray-drying*) (RAVI KUMAR, 2000b; SINHA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

4.1 Secagem por aspersão

A secagem por aspersão é uma técnica utilizada pela indústria farmacêutica desde a década de 1940, entretanto, apenas recentemente ela tem sido uma técnica de escolha na preparação de micropartículas. Esta técnica de secagem consiste em três etapas de operação (BARAS et al., 2000; FU et al., 2001; AGNIHOTRI et al., 2004; AMERI e MAA, 2006):

1. Atomização, que é a passagem de uma solução ou suspensão contendo a substância ativa, por um orifício atomizador, para a câmara de secagem;

2. Desidratação ou secagem, onde um fluxo de ar quente promove a rápida secagem das gotículas; e

3. Separação e coleta do material, onde as partículas sólidas secas são separadas num aparato chamado ciclone, e recolhidas num frasco coletor. Ao final do processo as partículas podem apresentar-se na forma de pós finos, granulados ou aglomerados.

Os parâmetros operacionais mais importantes na determinação das características das partículas são o diâmetro do bico e a velocidade de alimentação do atomizador, a pressão e velocidade do soprador de ar comprimido, e ainda temperatura de entrada. Ressalta-se que a temperatura de saída é um parâmetro também importante na determinação das características das partículas obtidas, entretanto este parâmetro não pode ser diretamente regulado, sendo apenas monitorado. Alterações nas condições operacionais de secagem apresentam influência direta nas características do produto obtido. Desse modo, o tamanho de partícula e distribuição granulométrica, porosidade, fluxo, umidade, estabilidade e aparência podem ser modificados e/ou controlados alterando-se os parâmetros do processo (HE et al., 1999; BARRAS et al., 2000; AMERI e MAA, 2006).

Por outro lado, a forma e a morfologia das partículas podem ser afetadas pela composição da formulação e a velocidade de evaporação do solvente. Se a evaporação é muito rápida, as partículas resultantes ficam deformadas ou com defeitos de superfície. Por outro lado, se a secagem é muito lenta, pode resultar em partículas com alto teor de umidade (AMERI e MAA, 2006).

Na literatura, diversos estudos demonstram a preparação de micropartículas de quitosana utilizando a secagem por aspersão como método de preparação. Nesta técnica, a quitosana é primeiramente dissolvida em uma solução de ácido acético, nesta solução é então acrescentado o fármaco, podendo este ser dissolvido ou apenas disperso. Esta solução ou dispersão é atomizada num fluxo de ar comprimido quente. Com este processo ocorre a evaporação imediata do solvente levando a formação de um pó, granulado ou aglomerado. O tamanho das partículas

de quitosana depende diretamente do diâmetro do orifício do atomizador, da velocidade do fluxo e pressão de ar, da temperatura de entrada e da presença e concentração de agente reticulador. O agente de reticulação da quitosana pode ser acrescentado antes da secagem ou após a formação das micropartículas, resultando em micropartículas com características diferentes (HE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2005).

A avaliação das características morfológicas e do tamanho de partículas de quitosana reticulada e quitosana não reticulada para a liberação de cimetidina, famotidina e nizatidina, foi realizada por He e colaboradores (1999). A presença ou não do agente reticulador não influenciou significativamente a morfologia das micropartículas, pois tanto aquelas preparadas com quitosana reticulada como as obtidas com quitosana não reticulada, apresentaram-se esféricas e com superfície lisa. Entretanto, o potencial zeta e o tamanho da partícula foram influenciados pela concentração do agente reticulador, sendo que quanto menor a concentração do reticulador, maiores foram os tamanhos das partículas e os valores de potencial zeta. O estudo também relatou que a velocidade de fármaco liberado foi significativamente influenciada pelo grau de reticulação da quitosana, uma vez que quanto maior o grau de reticulação menor a velocidade de fármaco liberado.

Em outro trabalho utilizando a quitosana, Ganza-Gonzalez e colaboradores (1999) demonstraram que a técnica de secagem por aspensão é rápida, simples e segura para a obtenção de micropartículas de quitosana. Os autores prepararam microesferas de quitosana para a liberação do cloridrato de metoclopramida, utilizando diferentes concentrações de formaldeído como agente reticulador. As microesferas preparadas proporcionaram uma liberação sustentada do fármaco por oito horas, independentemente do pH do meio, sendo que esta liberação sustentada esteve diretamente relacionada com o grau de reticulação da quitosana. Quanto menor o grau de reticulação, mais rápida foi a liberação do cloridrato de metoclopramida.

A técnica de secagem por aspensão também foi utilizada por Oliveira e colaboradores (2005). Neste trabalho foram obtidas micropartículas de quitosana com pequeno tamanho de partícula e boa esfericidade. As micropartículas foram reticuladas com diferentes concentrações de gliceraldeído, sendo avaliados então, o

grau de intumescimento das micropartículas e o potencial zeta. Com o estudo foi demonstrado que tanto o grau de intumescimento como o potencial zeta estão diretamente relacionados com a concentração do reticulador. A relação linear encontrada entre estes parâmetros foi sugerida como uma ferramenta vantajosa no controle de propriedades como permeabilidade e bioadesividade de micropartículas de quitosana preparadas por secagem por aspersão com posterior reticulação com gliceraldeído.

4.2 Quitosana para imobilização de íons metálicos

A quitosana apresenta a possibilidade de modificações estruturais de modo a se obter diversas formas de interação química e resistência mecânica. Estas modificações podem ocorrer devido à presença dos grupos NH_2 livres na cadeia polimérica. Estes grupamentos conferem à quitosana uma característica de nucleofilicidade em pH básico (>7), no qual eles são desprotonados e o par de elétrons não compartilhados pode ocasionar uma variedade de modificações químicas (KUMAR et al., 2000; LIMA e AIROLDI, 2004; MONTEIRO e AIROLDI, 2005).

Uma das modificações que pode ocorrer é a imobilização de íons metálicos. Existem diferentes teorias sobre a estrutura do complexo quitosana-metal, pois alguns experimentos consideram a teoria que dois ou mais grupos amino de uma cadeia linear quelam o íon metálico, formando uma ligação do tipo ponte. Outros estudos indicam que apenas um grupo amino está envolvido na interação e ainda há aqueles que sugerem que os grupamentos amino são os principais sítios reativos, mas a adsorção também é influenciada pelos grupos hidroxilas, principalmente aquelas presentes na posição C-3 (GUIBAL, 2004).

A interação entre a quitosana e o metal pode ocorrer através de diferentes mecanismos, os quais estão diretamente relacionados com o tipo de metal envolvido na reação. O par de elétrons livres do grupamento amino pode ligar metal em pH próximo a neutralidade, entretanto a protonação destes grupos amino em pH ácido proporciona ao polímero a capacidade e, conseqüentemente, o potencial de atrair anions metálicos (VOLD et al., 2003; GUIBAL, 2004).

O tamanho das partículas de quitosana não apresenta influência significativa na saturação da capacidade de adsorção, entretanto esta saturação é dependente da temperatura. Com um aumento de temperatura de reação ocorre um decréscimo da saturação da capacidade de adsorção (MUZZARELLI e ROCCHETTI, 1974). Além da temperatura, a capacidade de adsorção de metais está diretamente relacionada com o grau de reticulação do polímero, normalmente com o aumento do grau de reticulação da quitosana, ocorre uma diminuição da capacidade de adsorção de íons metálicos (KOYAMA e TANIGUCHI, 1986).

A propriedade da quitosana em imobilizar íons metálicos na sua estrutura tem sido explorada para diferentes usos, dentre os quais pode-se citar a utilização do complexo quitosana-metal como fase estacionária para a separação de grupos de compostos que não são eficientemente separados quando se utiliza o polímero sem a adsorção dos metais. Por exemplo, a quitosana contendo íons cobre imobilizados apresenta uma melhor eficiência na separação de uma mistura de isômeros ópticos de aminoácidos (MALINOWSKA e RÓZYLO, 1997).

A utilização da quitosana como suporte para a cromatografia de troca iônica ou como resina quelante é limitada, pois ela possui uma solubilidade em meio ácido (BABA e HIRAKAWA, 1992). Uma solução para este problema seria a reticulação da quitosana, pois através deste processo obtêm-se um polímero insolúvel. Entretanto, como abordado anteriormente este método provocaria uma diminuição na quantidade de metal imobilizado, pois tanto a reticulação como a imobilização de metal, competem pelos grupos NH_2 que estão livres.

Por possuir um grande número de unidades glicosaminas, a quitosana apresenta propriedades químicas que facilitam a obtenção de novos derivados, por meio de síntese orgânica. Tais derivados têm sido preparados com objetivo de diminuir a solubilidade do material e, ao mesmo tempo assegurar uma boa capacidade de pré-concentração de íons metálicos (VOLD et al., 2003). A introdução de certos grupos funcionais na matriz polimérica da quitosana poderia propiciar a interação com uma quantidade significativa de íons metálicos e, conseqüentemente, seria possível empregá-la em processos de pré-concentração de íons (KLUG et al., 1998).

A capacidade de adsorção por íons metálicos pode ser melhorada por modificações através de reações com o grupo amino livre ou por reações com compostos cíclicos no derivado da quitosana levando um grupo fenila substituído na função amina (TONG et al., 1991). No mesmo sentido, RODRIGUES e colaboradores (1998b), descrevem que a modificação da quitosana é feita através da reação de formação de base de Schiff entre os grupos amino da quitosana e os grupos carbonilas da acetona ou aldeído do ligante desejado; descrevem ainda que, geralmente, estas reações são efetuadas em meio orgânico.

Tong e colaboradores (1991) sintetizaram um novo suporte quelante trocador-iônico, através de reações de 2-piridina-carboxialdeído com os grupos NH_2 da quitosana. Com este trabalho foi possível demonstrar que a quitosana contendo o substituinte anel piridínico, possui uma grande capacidade de adsorção e ainda, apresenta uma forte habilidade em quelar vários íons metálicos, exceto o Mn(II) .

Inoue e colaboradores (1996) relataram a síntese de uma resina quelante utilizando a quitosana modificada quimicamente, a qual apresentava uma alta seletividade e capacidade de resistência, através da incorporação de um grande número de grupos funcionais, em posições apropriadas nesta matriz polimérica. Estas modificações permitiram uma configuração adequada para a formação de quelantes estáveis, devido a um grande número de aminas primárias e grupos hidroxílicos.

A resina quelante derivada de quitosana, 2(piridil-metil)quitosana, quando reticulada com glutaraldeído, tem a capacidade de adsorver íons metálicos, especialmente Cu(II) e Ni(II) , em quantidades que podem permitir a sua utilização como adsorvente para cromatografia de afinidade por metal imobilizado (RODRIGUES et al., 1998a). A funcionalização da quitosana com dihidroxibenzaldeído com o objetivo de estudar a adsorção de Cu(II) , Cd(II) , Ni(II) e Zn(II) em soluções aquosas, foi realizada por Klug e colaboradores (1998).

O estudo desenvolvido por Vold e colaboradores (2003) indica que a quitosana apresenta uma seletividade na ligação com diferentes íons metálicos. Esta seletividade pode ser comprovada utilizando métodos potenciométricos e espectrofotométricos, e possui influência direta da forma física da quitosana e do pH

do meio em que é desenvolvida a interação. O estudo demonstrou que em uma solução tendo diferentes íons metálicos, Cu(II), Ni(II), Zn(II) e Cd(II), a quitosana apresenta uma seletividade pelo íons Cu(II).

A imobilização de íons Fe(III) na estrutura polimérica da quitina, possibilita a utilização desta para a separação cromatográfica de compostos fenólicos (RODRIGUES et al., 1999) e compostos de origem natural como é o caso de flavonóides, biflavonóides, terpenos, diterpenos e derivados do ácido gálico (RODRIGUES et al., 1998b; RODRIGUES et al., 2000). A separação cromatográfica é possível, pois ocorre a formação de complexos estáveis entre os centros metálicos presentes na estrutura do polímero e as hidroxilas fenólicas dos compostos.

4.3 Micropartículas de quitosana-metal para adsorção de fármacos

Apesar da quitosana ser amplamente estudada tanto como polímero para imobilização de íons metálicos, como material polimérico para ser utilizado em sistemas de liberação de fármacos, como foi relatado nos itens acima descritos, não são encontrados na literatura trabalhos que enfoquem a obtenção de micropartículas de quitosana-íons metálicos para a utilização como sistemas de adsorção de fármacos. Há apenas o registro de um trabalho desenvolvido por Bürger e colaboradores (2001) que utiliza micropartículas de quitosana-Fe, não como sistema para adsorção de fármacos, e sim, o próprio complexo quitosana-Fe como fonte alternativa para o tratamento de patologias específicas, sendo no caso do trabalho citado, a hiperfosfatemia.

CAPÍTULO 1

Micropartículas de quitosana e quitosana-metal preparadas por secagem por aspersão para adsorção de ciprofloxacino

1.1 APRESENTAÇÃO

Este primeiro capítulo de tese apresenta a possibilidade inédita de adsorver fármacos às micropartículas de quitosana contendo diferentes íons metálicos. Neste caso, tanto o grau de desacetilação quanto a presença, o tipo e a concentração de íon metálico seriam fatores determinantes da capacidade de adsorção da substância. Sendo assim, o objetivo geral foi o desenvolvimento de micropartículas inovadoras à base de quitosana contendo íons metálicos adsorvidos, Fe(II), Fe(III) e Zn(II), sendo estes sítios específicos de ligação para substâncias ativas.

Os metais Fe(II), Fe(III) e Zn(II) foram selecionados, pois de acordo com dados da literatura a formação do complexo entre o ciprofloxacino e os íons metálicos apresenta constante de estabilidade que decresce na ordem: Fe(III) \approx Al(III) > Cu(II) > Fe(II) \approx Zn (II) \gg Mg(II) > Ca(II) (MA et al., 1997; KMETEC et al., 1999; URBANIAK, 2007), desta forma com a utilização do Fe(II), Fe(III) e Zn(II) ocasionaria uma forte interação do ciprofloxacino com as micropartículas.

A substância ativa de escolha foi o antimicrobiano ciprofloxacino, sendo esta escolha baseada na farmacocinética do fármaco. Após administração oral, 33 % da dose inicial do ciprofloxacino são excretadas pelas fezes na sua forma ativa, com isso esse padrão de eliminação pode resultar no aparecimento de efeitos adversos decorrentes da alteração da flora intestinal (RAMON et al., 1994; 1996; 2001).

Sendo assim, no presente capítulo estão descritos o método de preparação, a determinação do grau de desacetilação, quantificação dos íons metálicos, a morfologia o tamanho e distribuição granulométrica de micropartículas de quitosana-metal, sendo quitosana-ferro (CH-Fe(II) e CH-Fe(III)) e quitosana-zinco (CH-Zn(II)). Estão descritos ainda o estudo da capacidade de adsorção *in vitro* do ciprofloxacino pelas micropartículas de quitosana-metal, e aplicação dos mesmos em modelos matemáticos de isotermas e cinética de adsorção

Os estudos apresentados neste capítulo foram realizados no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

1.2 METODOLOGIA

1.2.1 Preparação das micropartículas

Para o desenvolvimento das micropartículas foi selecionada a técnica de secagem por aspersão (*spray-drying*). Esta técnica consiste na passagem da formulação em solução por um orifício atomizador, para uma câmara, onde um fluxo de ar quente promove a rápida secagem das gotículas, resultando desta forma, em partículas sólidas na forma de pó.

1.2.1.1 Micropartículas de quitosana

Inicialmente a quitosana (1 %, p/v) foi solubilizada em uma solução aquosa de ácido acético (1 %, v/v). A solução foi seca em Spray-Dryer (MDS 1.0, LabMaq) sob condições operacionais determinadas experimentalmente.

1.2.1.2 Micropartículas de quitosana-íons metálicos

Para a preparação das micropartículas de quitosana contendo íons metálicos adsorvidos foram utilizados: o polímero quitosana e soluções aquosas contendo os íons metálicos: Fe(II), Fe(III) e Zn(II).

Os complexos quitosana-metal foram preparados de acordo com uma modificação no método previamente descrito por Rodrigues e colaboradores (1999). A quitosana foi dissolvida (1% p/v) numa solução aquosa contendo os sais (FeCl_2 0,1M; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0,1M ou $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0,1M), sendo estas concentrações determinadas através de experimentos previamente realizados e descritos na literatura (RODRIGUES et al., 1999; FAGUNDES et al., 2001; FAGUNDES et al., 2002). O pH das soluções de complexação da quitosana com os íon Fe(II), Fe(III) e Zn(II) foi fixado em 5,0, sendo este pH estabelecido de acordo com os estudos realizados por Ngah e colaboradores (2005) e Sun e Wang (2006). A correção do pH quando necessária, foi realizada pela adição de ácido acético 0,2M. As soluções permaneceram em agitação por um período de 12 h à temperatura ambiente e após

este tempo de reação, foram secas em Spray-Dryer (MDS 1.0, LabMaq) sob condições operacionais determinadas experimentalmente.

1.2.1.3 Reticulação das micropartículas de quitosana e quitosana-metal com glutaraldeído

As micropartículas de quitosana e quitosana-metal, após obtenção por secagem por aspersão, foram suspensas, sob constante agitação, numa solução de glutaraldeído (em acetona). A proporção quitosana:glutaraldeído foi fixada a 1:1 (p/v). Após a agitação por 4 h, as micropartículas foram recuperadas por filtração, lavadas com uma solução etanol:água (2:1, v/v) para remoção do excesso de metal e/ou glutaraldeído, até teste colorimétrico negativo. Finalmente as micropartículas foram secas à pressão reduzida até obtenção de peso constante.

1.2.2 Caracterização físico-química das micropartículas

As micropartículas foram caracterizadas quanto ao grau de desacetilação do polímero quitosana, quantificação dos íons metálicos adsorvidos, morfologia, tamanho de partícula e polidispersão.

1.2.2.1 Determinação do grau de desacetilação

A determinação do grau de desacetilação (GDA) indica a quantidade de grupos amino livres na estrutura polimérica da quitosana. Para a sua determinação pode-se empregar diferentes metodologias, como titulação potenciométrica, análise elementar e a espectroscopia no infra-vermelho (IV). Neste trabalho para a determinação do GDA foi empregada a titulação potenciométrica (BROUSSIGNAC, 1968) e os resultados foram comparados com o GDA obtidos por espectroscopia no IV (TAKANORI et al., 1976).

a) Titulação potenciométrica

O GDA foi determinado segundo o método descrito por Broussignac (1968) o qual envolve a titulação de amostra de quitosana em presença de excesso de ácido forte (HCl) com hidróxido de sódio. Para o cálculo da porcentagem de grupos NH_2 livres, os volumes do primeiro ponto de equivalência V_1 , relacionado com a neutralização do ácido fraco NH_3^+ , e do segundo ponto de equivalência V_2 , relacionado com a neutralização do HCl foram aplicados na Equação (1.1):

$$GDA = \frac{16,1x(V_2 - V_1)xM_b}{m} \quad (1.1)$$

onde: M_b é a molaridade da base, m é a massa (g) da amostra e 16,1 é um valor relacionado com a massa molecular da unidade monomérica da quitosana. V_1 e V_2 são os volumes (mL) correspondentes ao primeiro e segundo ponto de equivalência, respectivamente.

b) Espectroscopia de IV

Para a obtenção dos espectros, as micropartículas foram depositadas diretamente no compartimento de amostras do Spectrum One FT-IR (Perkin Elmer). Os espectros foram obtidos no modo transmitância, cobrindo a faixa de número de onda de 4.000 a 500 cm^{-1} . A intensidade do pico correspondente a amida I (1.655 cm^{-1}) e a intensidade do pico correspondente ao grupo OH (3.450 cm^{-1}), foram utilizadas para calcular o GDA de acordo com a Equação (1.2) (GUPTA et al., 2006a):

$$GDA = \left[1 - \frac{(I_{1655}/I_{3450})}{1,33} \right] x 100 \quad (1.2)$$

onde: I representa a intensidade do pico e o fator 1,33 representa a razão de $I_{1.655}/I_{3.450}$ para o polímero quitosana completamente *N*-acetilado.

1.2.2.2 Quantificação dos íons metálicos adsorvidos

As quantidades de íons metálicos adsorvidos à quitosana foram determinadas por métodos colorimétricos. Primeiramente, as micropartículas de quitosana-metal foram submetidas à hidrólise ácida (100mg/ 5 mL HCL:HNO₃ 1:1). Para cada íon metálico (Fe e Zn) foi utilizado um método colorimétrico específico, conforme descrito a seguir:

- As quantidades de Fe total presentes nas amostras foram determinadas reagindo os íons Fe com 1,10-fenantrolina (5 mM) na presença de hidroxilamina (1,4 M). Através desta reação forma-se complexo colorido cuja absorvância foi determinada com auxílio de espectrofotômetro no comprimento de onda igual a 510 nm (UV-2101PC Shimadzu, Japão) (PYENSON e TRACY, 1945). A quantificação do Fe total foi realizada em triplicata através da curva de calibração obtida com soluções padrão de Fe total apresentando concentrações na faixa de 0,1 a 2,5 µg/mL;
- O Zn(II) presente na amostra foi determinado pelo método colorimétrico desenvolvido e validado por Khoder e colaboradores (2009). Este método é baseado na reação entre os íons Zn(II) e 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) 0,5 (mM) na presença de solução tampão de amônia, pH 10 (em etanol). Através desta reação forma-se um complexo colorido PAN-Zn, cuja absorvância foi medida a 550 nm (UV-2101PC Shimadzu, Japão). A quantificação do Zn(II) foi realizada em triplicata através da curva de calibração obtida com soluções padrão de Zn(II) com concentrações na faixa de 25 a 300 µg/mL.

1.2.2.3 Avaliação morfológica das micropartículas

As micropartículas de quitosana-metal foram analisadas quanto à forma, à superfície e porosidade por Microscopia Eletrônica de Varredura (Joel Scanning Microscope JSM-5800[®]) no Centro de Microscopia da UFRGS. As amostras foram depositadas em *stubs* de metal, usando uma fita adesiva dupla face de carbono e recobertas com uma camada de 4 nm de ouro (Metalizador Jeol Jee 4B SVG-IN[®]).

1.2.2.4 Tamanho das partículas e polidispersão

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das partículas foram determinados por difratometria de laser em Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). O diâmetro médio baseado no volume ($d_{4,3}$) foi utilizado como parâmetro para a avaliação da distribuição de tamanho de partículas. Medidas do diâmetro de partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada ($d_{0,1}$, $d_{0,5}$ e $d_{0,9}$, respectivamente) foram também realizadas. Por meio dessas medidas foi calculado [Equação (1.3)] o SPAN (polidispersão), relaciona os valores encontrados do diâmetro das partículas correspondentes a 10 %, 50 % e 90 % da distribuição acumulada para uma amostra.

$$SPAN = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad (1.3)$$

1.2.3 Estudo de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de quitosana-metal

As micropartículas de quitosana e quitosana-metal (1 mg), preparadas conforme descrito no item 1.2.1.2, foram incubadas em solução tampão HEPES pH 6,8 (1 mL), contendo ciprofloxacino (25 a 400 µg/mL). O sistema foi mantido em agitação tangencial (650 rpm/min) à temperatura de 37 ± 2 °C por 300 min. Amostras foram coletadas em tempos pré-determinados (30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 min), centrifugadas (4.000 rpm por 3 min) e o meio sobrenadante foi separado. A concentração de ciprofloxacino no meio foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), através de método previamente validado.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Waters, utilizando um detector ultravioleta visível com um comprimento de onda de 278 nm. Foi utilizada uma coluna Symmetry[®] C18 (5 µm, 150 x 4.6 mm) e pré-coluna do mesmo material (5 µm), ambas mantidas à temperatura de 40 °C. A fase móvel consistiu de uma mistura isocrática de tampão fosfato (10 mM) e acetonitrila na proporção de 85:15 (v/v), com pH aparente igual a 3,0. O fluxo foi de 1,0 mL/min e o

tempo de análise foi pré-fixado em 10 min. A aquisição e integração dos dados foi realizada pelo software Azur[®].

A capacidade de adsorção (q) do ciprofloxacino pela massa do adsorvente no intervalo de tempo especificado, foi determinada conforme Equação (1.4)

$$q = \frac{C_o - C_t}{m} \quad (1.4)$$

onde: C_o é a concentração inicial de ciprofloxacino (400 µg/mL) e C_t é a concentração não adsorvida (na solução) de ciprofloxacino num determinado intervalo de tempo, e m é o peso de micropartículas utilizado em mg.

1.2.4 Modelo matemático das isotermas e cinética de adsorção do ciprofloxacino

Com o intuito de elucidar o mecanismo de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de quitosana-metal foram utilizados modelos matemáticos de isotermas de adsorção, sendo isoterma de Langmuir e Freundlich, e ainda foram aplicados os modelos de cinética de adsorção de *pseudo-primeira-ordem* e *pseudo-segunda ordem*. Os estudos seguem descritos abaixo.

1.2.4.1 Isotermas de adsorção

No processo de adsorção normalmente são empregados os modelos de isoterma de Langmuir e Freundlich para interpretar os dados experimentais de adsorção (CANTANHEDE et al., 2005; AKSU e TUNÇ, 2005; ACHAK et al., 2009). A avaliação do melhor ajuste dos dados é feita aplicando as equações e verificando o valor do coeficiente de correlação (R^2) e os desvios relativos médios.

A equação de Langmuir é descrita conforme segue na Equação (1.5):

$$q = \frac{K_L C_{eq} M_{max}}{(1 + K_L C_{eq})} \quad (1.5)$$

onde: q é a quantidade do ciprofloxacino adsorvido pelas micropartículas ($\mu\text{g}/\text{mg}$), C_{eq} é a concentração não-adsorvida ($\mu\text{g}/\text{mL}$) (ciprofloxacino na solução). M_{max} e K_L são a quantidade máxima adsorvida ($\mu\text{g}/\text{mg}$) e a constante de Langmuir, respectivamente. M_{max} e K_L podem ser determinados a partir dos coeficientes linear e angular das retas de regressão linear obtidas pelo gráfico $1/q$ em função de $1/C_{eq}$.

A descrição matemática do modelo de Freundlich esta apresentado na Equação (1.6):

$$q = K_F C_{eq}^{1/n} \quad (1.6)$$

onde: K_F e n são as constante de Freundlich relacionadas à capacidade e intensidade de adsorção, respectivamente. Este modelo pode ser linearizado através da sua forma logarítmica e as constantes K_F e n podem ser determinadas a partir dos coeficientes linear e angular da reta de regressão linear.

Os desvios relativos médios entre os valores experimentais e calculados foram calculados segundo a Equação (1.7):

$$\varepsilon(\%) = \frac{\sum_{i=1}^N |(q_{eq,i,exp} - q_{eq,i,calc}) / q_{eq,i,exp}|}{n} \quad (1.7)$$

onde: “exp” e “calc” representam os valores experimentais e calculados, respectivamente e n é o número de dados de adsorção.

1.2.4.2 Cinética de adsorção

Com o intuito de investigar o mecanismo de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de quitosana-metal, sendo transferência de massa (fisissorção) ou

reação química (quimissorção) foram utilizados os modelos de cinética de *pseudo-primeira-ordem* (ZHANG et al., 2003) e *pseudo-segunda-ordem* (HO e McKAY, 1999).

O modelo matemático da cinética de *pseudo-primeira-ordem* está descrito na Equação (1.8):

$$\text{Log}(q_{eq} - q) = \text{Log}q_{eq} - \frac{K_{1,ad}}{2,303}t \quad (1.8)$$

onde: q_{eq} e q representam a quantidade de ciprofloxacino adsorvido (ambos em $\mu\text{g}/\text{mg}$), no tempo de equilíbrio e num determinado tempo (min), respectivamente. $K_{1,ad}$ (min^{-1}) é a constante de equilíbrio da adsorção de *pseudo-primeira-ordem*. A aplicação deste modelo pode ser evidenciada pela linearização dos dados no gráfico $\text{Log}(q_{eq} - q)$ em função do tempo (t). O valor de $K_{1,ad}$ pode ser determinado a partir do coeficiente angular da reta de regressão linear.

O modelo matemático da cinética de *pseudo-segunda-ordem* está apresentado na Equação (1.9):

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{K_{2,ad}q_{eq}^2} + \frac{1}{q_{eq}}t \quad (1.9)$$

onde: $K_{2,ad}$ ($\text{mg} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) é a constante de adsorção de *pseudo-segunda-ordem*. A aplicação deste modelo pode ser evidenciada pela relação linear dos dados no gráfico de t/q em função de t . $K_{2,ad}$ e q_{eq} podem ser determinados a partir dos coeficientes linear e angular da reta de regressão linear.

1.3 Estudo da seletividade de adsorção do ciprofloxacino

Para verificar a seletividade na adsorção, as micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II) preparadas conforme descrito no item 1.2.1.2, foram incubadas em

solução tampão HEPES pH 6,8 (1 mL), contendo ciprofloxacino (400 µg/mL) e nimesulida (100 µg/mL). O sistema foi mantido em agitação tangencial (650 rpm/min) à temperatura de 37 ± 2 °C por 300 min. Amostras foram coletadas em tempos pré-determinados (30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 min), centrifugadas (4.000 rpm por 3 min) e o meio sobrenadante foi separado. A concentração de ciprofloxacino e da nimesulida no meio foi determinada por CLAE, através de método devidamente validado (Anexo I).

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando um detector ultravioleta visível com um comprimento de onda de 278 nm. Foi utilizada uma coluna Symmetry[®] C18 (5 µm, 150 x 4.6 mm) e pré-coluna do mesmo material (5 µm), ambas mantidas à temperatura de 40 °C. A fase móvel consistiu de uma mistura isocrática de tampão fosfato (10 mM) e acetonitrila na proporção de 80:20 (v/v), com pH aparente igual a 3,0. O fluxo foi de 0,8 mL/min e o tempo de análise foi pré-fixado em 7 min.

A capacidade (q) de adsorção do ciprofloxacino e da nimesulida pela massa de micropartículas no intervalo de tempo especificado foi determinada conforme Equação (1.4) descrita anteriormente.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Micropartículas de quitosana e quitosana-metal

Foram preparadas diferentes micropartículas baseadas na formação de complexo entre o polímero quitosana e os íons metálicos Fe(II), Fe(III) e Zn(II), em meio homogêneo, de acordo com modificações do método descrito por Rodrigues e colaboradores (1999).

As micropartículas foram obtidas através da secagem por aspersão. O diâmetro do bico do atomizador, pressão e fluxo de ar utilizados foram: 0,5 mm; 3 bar; 500 NL/h, respectivamente, sendo os mesmos determinados com base em dados da literatura (HE et al., 1999; HUANG et al., 2003). Os parâmetros operacionais temperatura e fluxo da bomba de alimentação de entrada foram otimizados experimentalmente, para isso uma solução aquosa do complexo CH-Fe(III) foi submetida ao processo de secagem por aspersão sob as condições apresentadas na **Tabela 1.1**.

Tabela 1.1: Influência dos parâmetros de operação: temperatura de entrada e fluxo da bomba de alimentação, no tamanho médio, polidispersão e rendimento de micropartículas de CH-Fe(III), obtidas por secagem por aspersão.

Parâmetros de operação		Tamanho médio (μm)	Polidispersão (μm)	Rendimento (%)
Temperatura de entrada ($^{\circ}\text{C}$)	Fluxo (mL/min)			
140	10	27,67	3,63	76
	5	20,47	2,56	70
160	10	-	-	-
	5	24,47	3,14	42

Analisando os dados apresentados na **Tabela 1.1** verifica-se que a temperatura e o fluxo da bomba de alimentação apresentam influências tanto no tamanho médio como no rendimento de obtenção das micropartículas de CH-Fe(III). Comparando o tamanho médio das partículas obtidas com a temperatura de entrada igual a 140 $^{\circ}\text{C}$ sob fluxo de 5 e 10 mL/min, observa-se que no fluxo maior o tamanho da partícula é maior. Este fato pode ser resultante da formação de gotas maiores

durante o processo de secagem. Com o aumento da temperatura de entrada para 160 °C e fluxo de 10 mL/min a obtenção das micropartículas não foi possível, pois sob estas condições a solução do complexo CH-Fe(III) ficou aderida na parede da câmara de secagem. Mantendo esta mesma temperatura e diminuindo o fluxo para 5 mL/min foi possível obter micropartículas com um tamanho médio de aproximadamente 25 µm, entretanto, sob estas condições o rendimento diminuiu consideravelmente. Com base nos dados aqui obtidos, a temperatura de entrada para a obtenção das micropartículas foi estabelecida a 140 °C e o fluxo da bomba de alimentação foi de 5 mL/min.

Inicialmente foram preparadas micropartículas sem a adição de agentes de reticulação. Entretanto, micropartículas de quitosana não podem ser suspensas em meio aquoso, principalmente se o pH for ácido, pois elas intumescem e dissolvem (GENTA et al., 1998, HE et al., 1999). As propriedades de intumescimento e dissolução são dependentes do número de grupamento amino livres na estrutura polimérica (GUPTA e JABRAIL, 2006a). Uma vez que o intuito desse trabalho seria de desenvolver micropartículas que pudessem ser utilizadas para a adsorção de fármacos em meio aquoso, foi necessária a reticulação das micropartículas preparadas. Para a reação de reticulação foi utilizado o glutaraldeído, sendo este o mais relatado na literatura para a reticulação da quitosana. Outro aspecto importante para a seleção do glutaraldeído foi o fato dele não interagir com os íons metálicos utilizados neste trabalho. O fundamento da reação de reticulação da quitosana é a reação entre os grupos aldeídicos do glutaraldeído e a amina livre da quitosana, formando uma imina (Base de Schiff) (GONÇALVES et al., 2005), conforme apresentado na **Figura 1.1**.

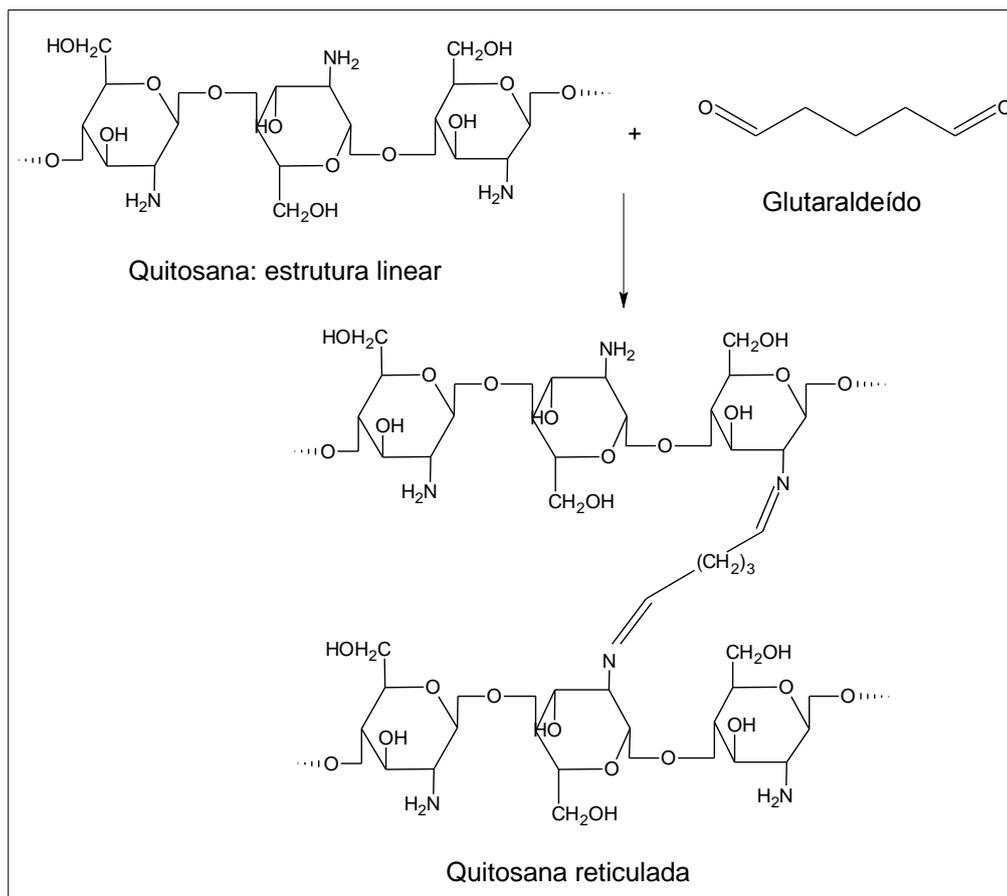


Figura 1.1: Reação de reticulação das micropartículas de quitosana e quitosana-metal com o glutaraldeído.

1.3.2 Caracterização das micropartículas de quitosana-metal

Para a caracterização das micropartículas (reticuladas e não-reticuladas) foram avaliados o tamanho, a polidispersão, a morfologia externa e o grau de desacetilação (GDA), o qual representa a porcentagem de grupos amino livres.

As características físicas, tamanho médio e polidispersão, das micropartículas de quitosana e quitosana-metal, obtidas antes e após a reticulação com glutaraldeído estão apresentadas na **Tabela 1.2**.

Tabela 1.2: Características físicas das micropartículas de quitosana e quitosana-metal: tamanho médio e polidispersão, obtidas antes e após a reticulação com glutaraldeído.

Micro-partículas	Antes da reticulação com glutaraldeído					Após a reticulação com glutaraldeído				
	d _{0,1} (μm)	d _{0,5} (μm)	d _{0,9} (μm)	d _{4,3} * (μm)	Span**	d _{0,1} (μm)	d _{0,5} (μm)	d _{0,9} (μm)	d _{4,3} * (μm)	Span**
CH-Fe(II)	2,6 $\pm 0,02$	9,8 $\pm 0,34$	185,4 $\pm 8,65$	54,8 $\pm 2,05$	18,5 $\pm 0,34$	1,6 $\pm 0,01$	4,3 $\pm 0,01$	151,6 $\pm 4,60$	36,7 $\pm 0,39$	34,5 $\pm 1,03$
CH-Fe(III)	1,9 $\pm 0,13$	6,0 $\pm 0,36$	167,7 $\pm 20,98$	42,9 $\pm 4,21$	27,4 $\pm 2,10$	1,4 $\pm 0,01$	4,6 $\pm 0,01$	30,5 $\pm 2,46$	29,5 $\pm 0,54$	6,2 $\pm 0,53$
CH-Zn(II)	0,7 $\pm 0,01$	3,8 $\pm 0,04$	9,6 $\pm 0,33$	20,8 $\pm 1,59$	2,3 \pm 0,07	1,1 $\pm 0,02$	4,5 $\pm 0,10$	12,5 $\pm 2,07$	20,1 $\pm 2,07$	2,4 $\pm 0,05$
CH	0,7 $\pm 0,01$	2,6 $\pm 0,02$	183,7 $\pm 12,93$	36,1 $\pm 1,61$	68,7 $\pm 5,38$	0,7 $\pm 0,01$	2,9 $\pm 0,08$	8,7 $\pm 1,29$	27,4 $\pm 4,83$	2,7 $\pm 0,37$

*Tamanho médio. ** Polidispersão, calculada através da Equação (1.3).

Analisando os resultados da **Tabela 1.2**, verifica-se que as micropartículas inicialmente apresentaram um diâmetro médio ($d_{4,3}$) variando entre 20 e 55 μm e a polidispersão (Span) variando entre 2 a 69 μm . A formulação de micropartículas que apresentou a maior polidispersão foi a CH, a qual foi preparada sem a presença de íons metálicos. Por outro lado, a formulação com menor polidispersão e diâmetro médio foi a CH-Zn(II).

Por sua vez, as micropartículas após reticulação com glutaraldeído apresentaram uma variação de diâmetro médio entre 20 a 37 μm e valores de polidispersão entre 13 a 27 μm . Entre as diferentes micropartículas reticuladas com glutaraldeído, verifica-se que o diâmetro médio apresentou valores próximos e a polidispersão foi baixa, excetuando a formulação de CH-Fe(II) para a qual a polidispersão foi em torno de 34 μm . Comparando as micropartículas iniciais e as reticuladas com glutaraldeído, observa-se que o tamanho foi influenciado pela reação de reticulação, sendo que com a reticulação, o tamanho das micropartículas diminuiu, exceto para CH-Zn(II).

1.3.2.1 Grau de desacetilação

O grau de desacetilação ou percentual de grupos amino livres é influenciado tanto pela formação de complexo entre a quitosana e os metais, bem como pela reação de reticulação. No presente trabalho foi utilizado a proporção de grupos aldeídicos:amino de 1:1, pois de acordo com dados da literatura, nesta proporção ocorre a formação da rede de reticulação, impedindo a solubilização das micropartículas em meio aquoso, sem apresentar influência importante na capacidade de adsorção dos metais (SUN e WANG, 2006).

Para a determinação do GDA foi empregada a titulação potenciométrica, descrita por Broussignac (1968) e os resultados foram comparados com o GDA calculado a partir de dados dos espectros no IV das amostras (TAKANORI et al., 1976).

O grau de desacetilação das micropartículas de CH foi determinado potenciomatricamente através da Equação (1.1) onde a diferencial dos volumes dos dois pontos de equivalência (V_1 e V_2) (**Figura 1.2**) corresponde à quantidade de grupos amino presentes na amostra (BROUSSIGNAC, 1968).

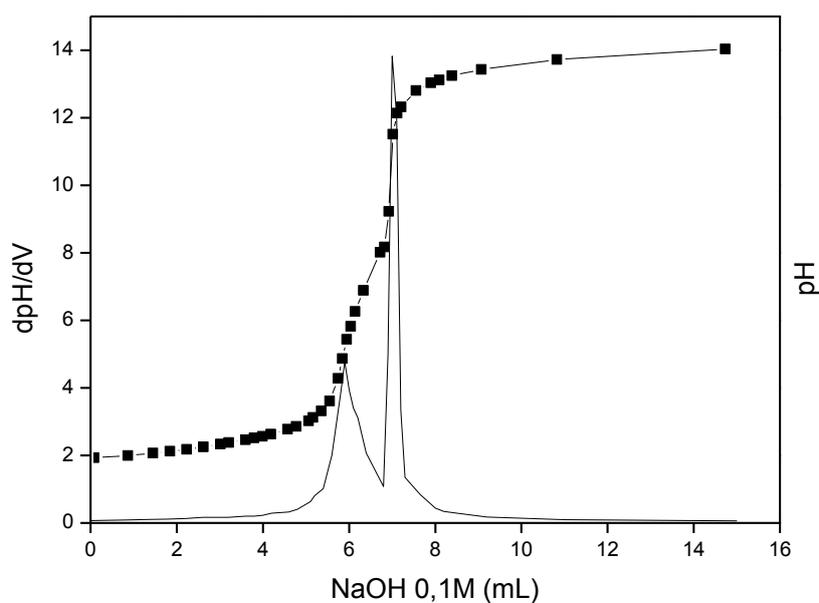


Figura 1.2: Determinação potenciométrica do grau de desacetilação das micropartículas de CH antes da reação de reticulação com glurataldeído.

Através dos dados obtidos a partir da curva resultante do cálculo da diferencial do pH em razão da diferencial do volume (dpH/dV), apresentadas na **Figura 1.2**, verifica-se que, antes da reação de reticulação com glutaraldeído, as micropartículas de CH apresentaram uma porcentagem de grupos aminos livres igual a 72 %. Após a reação de reticulação esta porcentagem diminuiu para 20 %. O mesmo procedimento e calculo foram realizados para determinar os GDAs das micropartículas de CH-Fe(II), CH-Fe(III) e CH-Zn(II). O GDA foi em todos os casos determinado antes e após a reação de reticulação com glutaraldeído. As porcentagem de grupos amino livres para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III) e CH-Zn(II) estão apresentados na **Tabela 1.3**, a seguir.

O GDA das micropartículas também foi determinado por espectroscopia no IV, onde a razão entre o valor da intensidade correspondente à banda de amida I (1.655 cm^{-1}) e o valor da intensidade dos grupos hidroxila (3.450 cm^{-1}) está relacionado ao grau de desacetilação da quitosana. Esses dados foram aplicados na Equação (1.2) para calcular o GDA das micropartículas. Os espectros no IV das micropartículas estão apresentados na **Figura 1.3**.

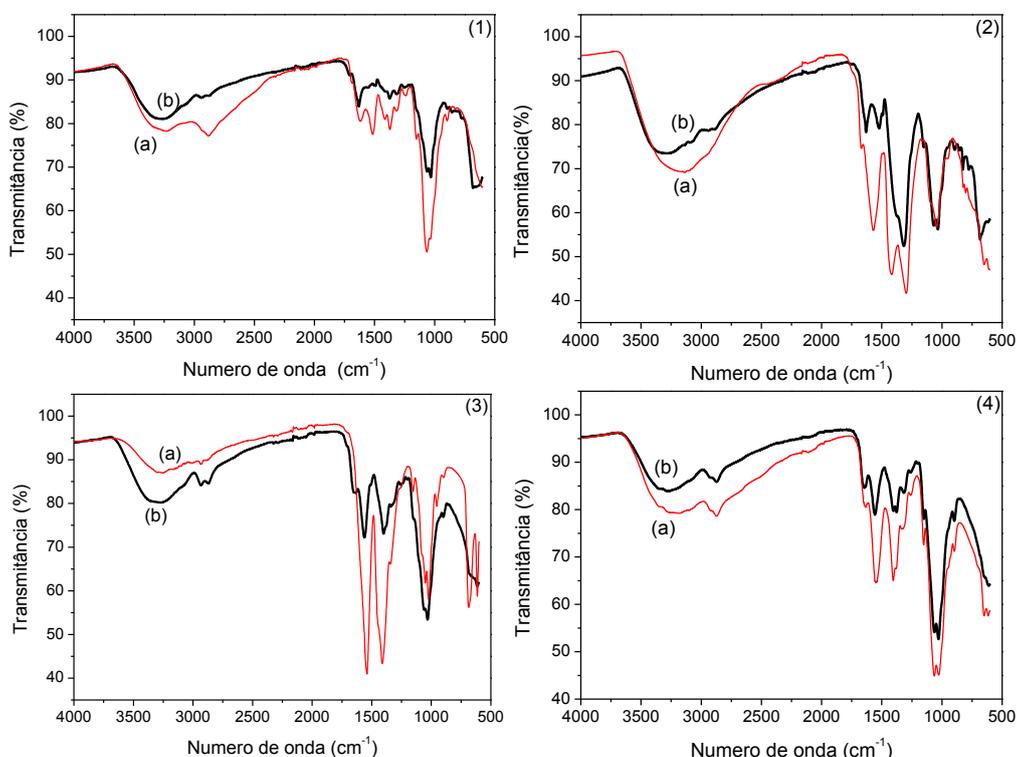


Figura 1.3: Espectro no infravermelho das micropartículas de CH-Fe(II) (1), CH-Fe(III) (2), CH-Zn(II) (3) e CH (4); (a) iniciais e (b) reticuladas com glutaraldeído.

Os espectros no IV mostram que em todas as amostras estão presentes bandas nas regiões próximas de 900 a 1.050 cm^{-1} sendo estas bandas características de sacarídeos. Atribui-se as bandas em 2.864 cm^{-1} e 2.932 cm^{-1} às deformações assimétrica e simétrica de C-H de grupos alifáticos, enquanto que a absorção larga em 3.450 cm^{-1} correspondente aos grupos hidroxila livre. A banda em 1.084 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento do grupo C-O-H.

Analisando os espectros das micropartículas reticuladas com glutaraldeído, verifica-se a presença de uma fraca banda próxima a região 1.600 cm^{-1} , a qual representa a formação de grupos imina (C=N), comprovando que a reação de reticulação com glutaraldeído ocorreu. Nestes mesmos espectros não há evidências das bandas características relacionadas ao grupo aldeído próximo a 1.720 cm^{-1} , indicando que o glutaraldeído livre, que não reagiu com a quitosana, foi removido com o processo de lavagem.

A **Tabela 1.3** apresenta o GDA das micropartículas, antes após a reação de reticulação com glutaraldeído, determinados através do método de titulação potenciométrica e Espectroscopia no IV.

Tabela 1.3: Grau de desacetilação das micropartículas de CH e CH-metal, antes e após a reação de reticulação com glutaraldeído, obtido através de titulação potenciométrica e espectroscopia no IV.

Micropartículas	Antes da reticulação com glutaraldeído		Após a reticulação com glutaraldeído	
	Titulação Potenciométrica (%)	Espectroscopia IV (%)	Titulação Potenciométrica (%)	Espectroscopia IV (%)
CH-Fe(II)	30	23	27	22
CH-Fe(III)	17	19	12	14
CH-Zn(II)	22	25	10	13
CH	72	76	20	26

Comparando os GDAs das micropartículas de CH-Fe(II), CH-Fe(III) e CH-Zn(II) com o GDA das micropartículas de CH (**Tabela 1.3**) antes da reação de reticulação com glutaraldeído, verifica-se que a porcentagem de grupos os amino livres diminuiu consideravelmente. A diminuição do número de grupos amino livres indica que o complexo quitosana-metal é formado entre estes grupos da estrutura da quitosana e os íons metálicos. Analisando os valores de GDA das micropartículas antes e após a reticulação com glutaraldeído, observa-se valores muito próximos, com exceção das micropartículas de CH-Zn(II). Comparando os valores de GDA obtidos através das duas técnicas de determinação, verifica-se que os valores obtidos através dos espectros no IV são próximos aos valores obtidos através da titulação potenciométrica.

1.3.2.2 Morfologia das micropartículas de CH e CH-metal

As morfologias das micropartículas de quitosana e de quitosana-metal foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e suas micrografias estão apresentadas na **Figura 1.4**.

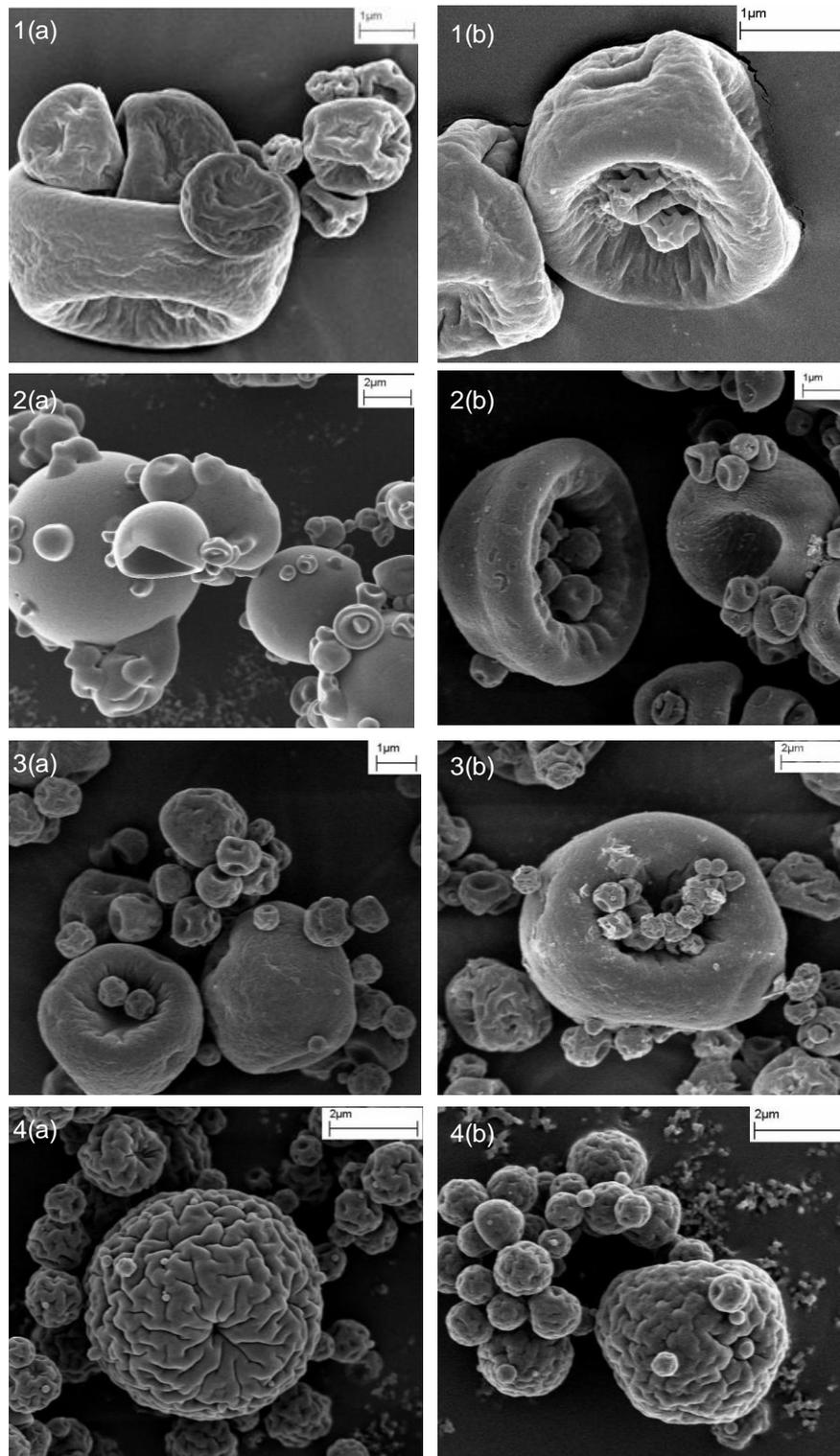


Figura 1.4: Micrografia das micropartículas de quitosana e quitosana-metal, obtidas por secagem por aspersão, (1) CH-Fe(II), (2) CH-Fe(III), (3) CH-Zn(II) e (4) CH, (a) iniciais e (b) reticuladas com glutaraldeído.

Analisando as imagens apresentadas na **Figura 1.4**, verifica-se que as micropartículas de CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) apresentam uma forma esférica

colapsada e as micropartículas de CH apresentam-se esféricas. Observa-se ainda que as micropartículas apresentaram uma superfície rugosa, exceto a CH-Fe(III) [Fig. 1.4 2(a) e 4(b)]. A rugosidade da superfície foi influenciada pela presença e pelo tipo de metal utilizado no processo. As micropartículas de CH apresentaram superfície nitidamente mais rugosa do que aquelas preparadas empregando-se Fe(II), Fe(III) ou CH-Zn(II). Ao serem comparadas as imagens das micropartículas iniciais (a) com as reticuladas com glutaraldeído (b), verifica-se que o processo de reticulação não apresentou influência nem na forma da micropartículas e nem na rugosidade.

1.3.3 Determinação dos metais

A determinação dos metais nas micropartículas foi realizada através de métodos colorimétricos específicos para cada íon metálico. A determinação foi realizada em triplicata através das curvas de calibração obtidas a partir de soluções padrões dos íons metálicos.

1.3.3.1 Determinação de Fe total nas micropartículas

A quantidade de íons ferro total presente nas amostras CH-Fe(II) e CH-Fe(III) foi determinada através de método colorimétrico usando 1,10-fenantrolina, descrito por Peynson e Tracy, (1945). A quantificação foi realizada em triplicata, através de curva de calibração obtida com soluções padrão de Fe total na faixa de concentração compreendida entre 0,1 a 2,5 µg/mL. A equação de regressão linear da curva de calibração está apresentada na Equação (1.10), onde o y corresponde à absorbância (nm) e o x é a concentração de Fe total (µg/mL). O coeficiente de correlação obtido foi de $R^2 = 0,9999$, comprovando a adequação do método no intervalo avaliado.

$$\begin{aligned} y &= 0,1998x + 0,0016 \\ R^2 &= 0,9999 \end{aligned} \tag{1.10}$$

A partir da Equação (1.10) foram determinadas as quantidades de Fe total nas micropartículas, sendo estas iguais a 45 mg/g para a formulação CH-Fe(II) e de 130 mg/g para CH-Fe(III). A quantidade de Fe total teórico na amostra deveria ser de 360 mg/g, com base neste dado verifica-se que a porcentagem de complexação foi de aproximadamente 36 % e 12 % de ferro adicionado, para as micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Fe(II), respectivamente.

Com isto, constata-se que as micropartículas preparadas com FeCl_2 (0,1M) apresentam uma porcentagem de complexação do metal relativamente menor quando comparadas às micropartículas preparadas com $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (0,1M). O aumento da quantidade de íons Fe adsorvidos à superfície polimérica da quitosana pode ocorrer em algumas situações, tais como: aumento do grau de desacetilação, aumento da concentração do metal na solução ou, ainda, alteração do pH do meio reacional (BURKE et al., 2002). Na realização deste estudo, todos estes parâmetros foram mantidos iguais, variando-se apenas o sal (FeCl_2 e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) utilizado. Com isso sugere-se que, no presente estudo, a adsorção de íons Fe no polímero quitosana tenha sido influenciada pelo estado de oxidação do metal utilizado ou pelo tipo do sal de ferro utilizado.

1.3.3.2 Determinação de Zn(II) nas micropartículas

A quantidade de íons Zn(II) presentes nas micropartículas de CH-Zn(II) foi determinado por colorimetria através da formação de um complexo colorido como produto da reação do Zn(II) com PAN. A absorbância da coloração da solução foi medida a 560 nm usando um espectrofotômetro UV. A quantificação foi realizada em triplicata, através de curva de calibração obtida com soluções padrão de Zn(II) na faixa de concentração compreendida entre 25 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A equação de regressão linear da curva de calibração está apresentada na Equação (1.11), onde o y corresponde à absorbância (nm) e o x é a concentração de Zn(II) ($\mu\text{g}/\text{mL}$). O coeficiente de correlação obtido foi de $R^2 = 0,9977$, comprovando a adequação do método no intervalo avaliado.

$$\begin{aligned}y &= 0,002x + 0,0041 \\ R^2 &= 0,9977\end{aligned}\tag{1.11}$$

A partir da Equação (1.11) determinou-se que as micropartículas de CH-Zn(II) reticuladas com glutaraldeído apresentam 87 mg/g, correspondendo a 22 % do Zn(II) adicionado.

1.3.4 Adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de CH-metal

A adsorção do ciprofloxacino em meio aquoso, foi estudada usando as micropartículas de CH-Fe(II), CH-Fe(III) e CH-Zn(II). Para evidenciar a importância da presença dos íons metálicos na adsorção do fármaco em questão, o estudo também foi conduzido com as micropartículas de CH.

O efeito do tempo de contato e a influência da concentração inicial do fármaco na capacidade adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas estão apresentados na **Figura 1.5**. Foram utilizadas concentrações iniciais crescentes de ciprofloxacino na solução, sendo 25, 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL, sendo estas concentrações limitadas pela solubilidade do fármaco no meio.

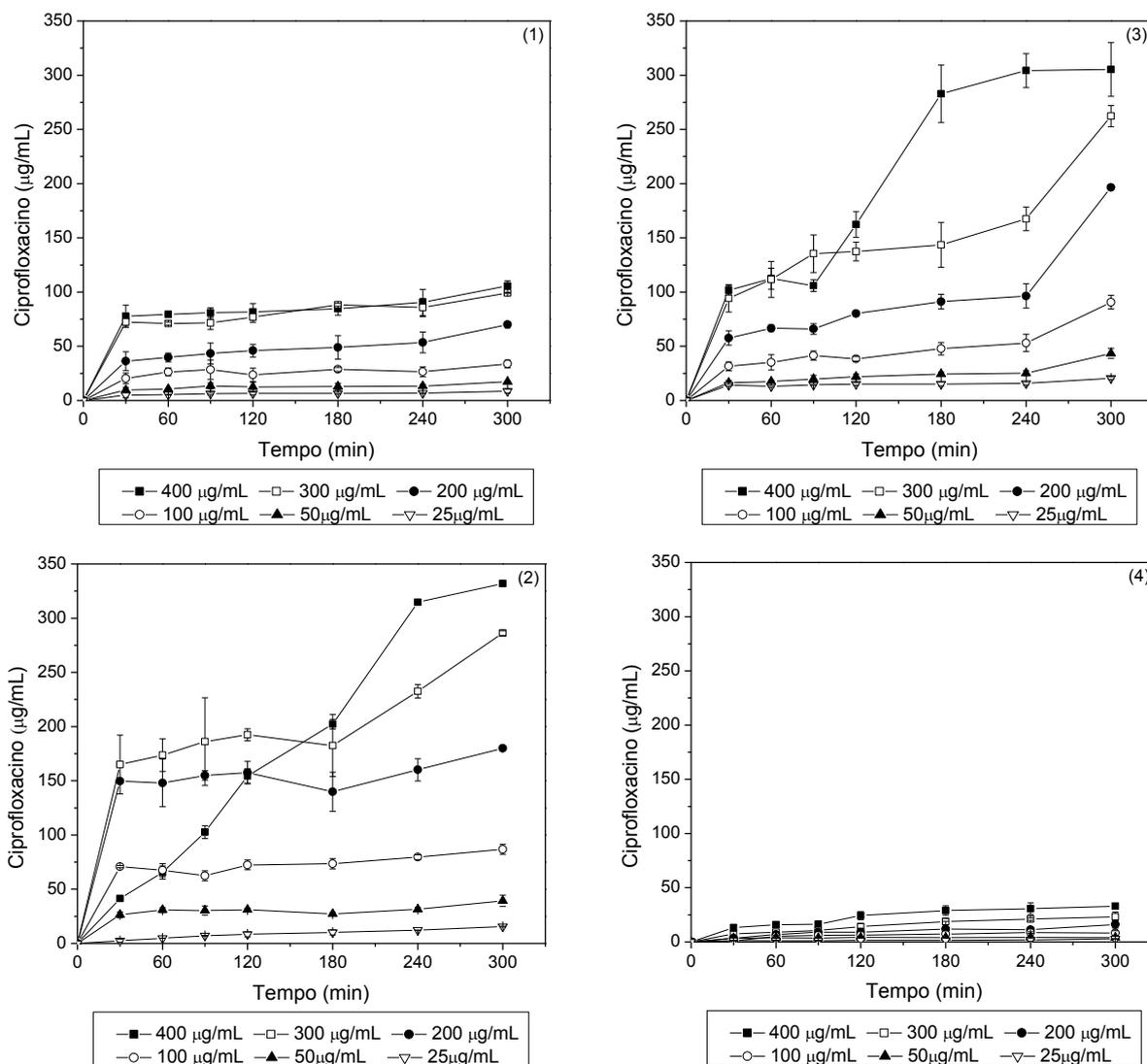


Figura 1.5: Efeito do tempo de contato e da concentração inicial (25 a 400 µg/mL) na adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de CH-Fe(II) (1), CH-Fe(III) (2), CH-Zn(II) (3) e CH (4), em tampão HEPES, pH 6,8; a 37°C.

Ao iniciar o ensaio de adsorção, os sítios de ligação presentes na superfície das micropartículas estavam desocupados, o que provoca uma rápida taxa de adsorção do ciprofloxacino após 30 min, como pode ser observado nas **Figuras 1.5 (1), (2) e (3)**. Com o aumento do tempo de contato os sítios de ligação livres vão sendo gradativamente ocupados, chegando a um estado de equilíbrio aos 180 min para as micropartículas CH-Fe(II) e CH [**Fig. 1.5 (1) e (4)**].

Por outro lado, o tempo necessário para atingir um estado de equilíbrio na adsorção pelas micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II) demonstra ser dependente da concentração inicial do ciprofloxacino no meio. Para baixas concentrações de

ciprofloxacino (25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) o estado de equilíbrio foi alcançado aos 120 min e 180 min para CH-Fe(III) e CH-Zn(II), respectivamente [Fig. 1.5 (2) e (3)]. Já para concentrações mais altas (200; 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$) este estado foi atingido a 300 min. Após estes tempos de contato, não foi observada uma melhora significativa na capacidade de adsorção do fármaco. Esta observação pode ser confirmada pela concentração de ciprofloxacino adsorvido em 5, 8 e 24 h. Neste caso foram utilizadas concentrações iniciais de ciprofloxacino iguais a 400 $\mu\text{g/mL}$ e a adsorção foi conduzido apenas para as micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II). As micropartículas de CH-Fe(III) apresentaram capacidade de adsorção equivalente a 305, 320 e 304 $\mu\text{g/mL}$ em 5, 8 e 24 h, respectivamente. No mesmo sentido, as micropartículas de CH-Zn(II) apresentaram capacidades de adsorção de 330, 325 e 328 $\mu\text{g/mL}$ em 5, 8 e 24 h respectivamente.

A concentração inicial pode influenciar a resistência da transferência de massa entre o estado líquido e a fase sólida. Para verificar esta influência, foi analisado o efeito da concentração inicial, 25, 50, 100, 200, 300 e 400 $\mu\text{g/mL}$ (p/v) do ciprofloxacino no tempo 300 min. A capacidade de adsorção no tempo de 300 min (q_{300}), para cada adsorvente está representado na **Tabela 1.4**.

Tabela 1.4: Capacidade de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de quitosana-metal e quitosana no tempo 300 min.

Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)	CH-Fe(II)		CH-Fe(III)		CH-Zn(II)		CH	
	q_{300} ($\mu\text{g/mg}$)	Adsorção (%)						
25	8,7 \pm 1,75	38,3	20,5 \pm 1,22	84,7	15,5 \pm 0,36	65,2	2,8 \pm 0,13	12,6
50	17,2 \pm 0,47	39,6	43,4 \pm 4,68	94,9	39,4 \pm 5,10	82,3	4,1 \pm 1,00	8,5
100	33,8 \pm 3,67	61,0	90,6 \pm 6,19	46,4	86,7 \pm 4,58	90,9	8,16 \pm 2,17	8,8
200	69,9 \pm 2,78	36,8	196,5 \pm 1,23	98,2	180,1 \pm 1,21	90,1	16,1 \pm 3,33	8,5
300	99,2 \pm 0,65	39,7	262,3 \pm 9,73	90,3	286,2 \pm 2,25	95,4	23,1 \pm 4,41	9,3
400	105,7 \pm 4,61	66,9	305,3 \pm 24,8	21,2	332,1 \pm 1,51	83,1	32,9 \pm 1,51	8,4

Através da análise dos resultados, verifica-se que a porcentagem de adsorção do ciprofloxacino aumenta com o aumento da concentração inicial do fármaco. A porcentagem de adsorção de cada micropartícula foi calculada pela concentração de ciprofloxacino adsorvido em relação à quantidade inicial do fármaco. Para as

micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II), a capacidade de adsorção, aumenta de 20 a 305 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e de 15 a 332 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente. Para CH-Fe(II) o aumento foi de 9 a 105 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e de 3 a 33 $\mu\text{g}/\text{mg}$ para micropartículas de CH. As capacidades de adsorção para as micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II) são maiores quando comparadas às capacidades de adsorção de CH-Fe(II) e de CH.

Segundo dados da literatura (AKSU e TUNÇ, 2005) a variação da capacidade de adsorção entre os diferentes adsorventes pode estar relacionada à diferença da composição química, superfície da micropartícula e, ainda, ao número e a distribuição dos sítios de ligação. Estes fatores apresentam influência direta no mecanismo de adsorção. O mecanismo de adsorção pode ser através de transferência de massa, conhecida como fisissorção, ou ainda pode ser através de reação química entre o composto e o adsorvente, neste caso sendo chamada de quimissorção (ACHAK et al., 2009). Para investigar qual o é mecanismo de adsorção entre o ciprofloxacino e as micropartículas de quitosana-metal, foram utilizados modelos matemáticos de isothermas de adsorção.

1.3.4.1 Isothermas de adsorção

As curvas de adsorção foram obtidas através da capacidade de adsorção [obtidas através da Equação(1.4)] no tempo 300 min em função da concentração inicial de ciprofloxacino (25 à 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ressalta-se que na realização dos experimentos a concentração inicial de ciprofloxacino foi variada, enquanto que a massa das micropartículas foi mantida constante (1mg/mL).

A **Figura 1.6** apresenta os resultados experimentais obtidos para a adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH, em tampão HEPES, pH 6,8 a 37 °C, no tempo de equilíbrio 300 min.

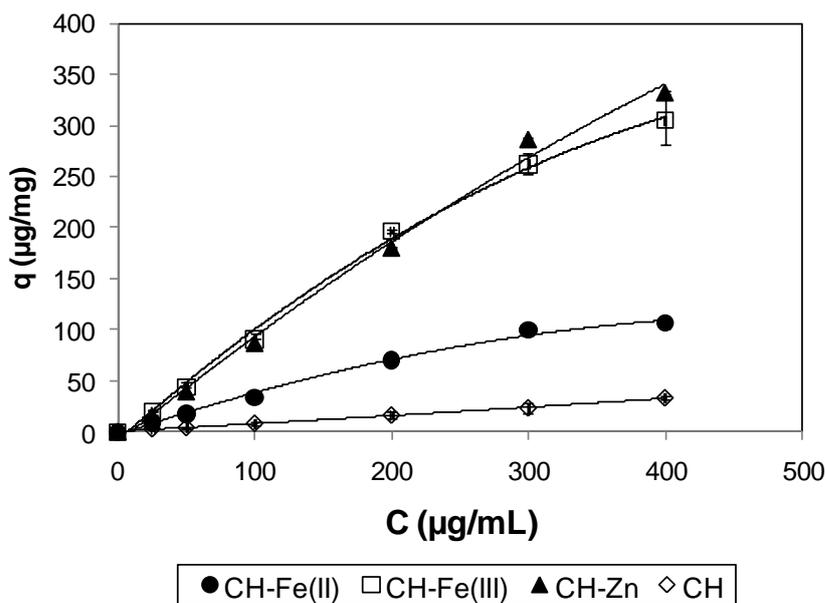


Figura 1.6: Isotermas de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH, em tampão HEPES, pH 6,8; a 37°C.

Analisando os dados apresentados na **Figura 1.6** verifica-se que as isotermas são positivas, regulares e côncavas em relação ao eixo abscissas. Para a faixa de concentração de ciprofloxacino empregada (25 à 400 µg/mL), limitada pela solubilidade do fármaco no meio (tampão HEPES; pH 6,8; a 37 °C), não foi observado saturação do sistema, este fato indica que, nas condições experimentais usadas não ocorre a formação de uma monocamada completa do ciprofloxacino ocupando todos os sítios de ligação das micropartículas.

Com o intuito de descrever as interações entre o ciprofloxacino e as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH, os dados experimentais foram ajustados às equações de Langmuir e Freundlich. Estes modelos foram utilizados devido a facilidade de transformar as equações para a forma linear e, conseqüentemente, os parâmetros puderam ser estimados graficamente.

A **Figura 1.7** apresenta a forma linearizada da curva $1/q$ em função de $1/C$, obtida pela aplicação da equação de Langmuir para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH.

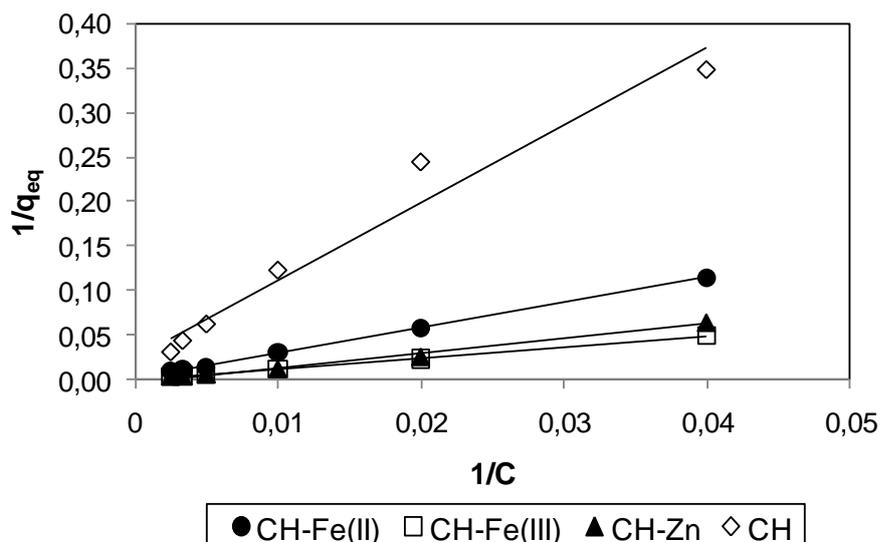


Figura 1.7: Forma linearizada da equação da isoterma de Langmuir. Gráfico $1/q_{eq}$ em função de $1/C$, para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH.

O modelo de Langmuir foi desenvolvido assumindo que todos os sítios de adsorção são equivalentes e a superfície é uniforme, a adsorção ocorre apenas até a formação de uma monocamada, e que uma molécula liga-se a um sítio independentemente dos demais, ou seja, não importa se estão ou não ocupados (AKSU, 2005).

A **Figura 1.8** apresenta a forma linearizada da curva $\text{Log}(q)$ em função de $\text{Log}(C)$, obtida pela aplicação da equação de Freundlich para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH. O modelo de Freundlich foi desenvolvido assumindo que a adsorção ocorre em sítios de ligação heterogêneos com uma distribuição não uniforme na superfície das micropartículas. Este modelo descreve uma adsorção reversível e não se restringe a formação de uma monocamada (ACHAK et al., 2009).

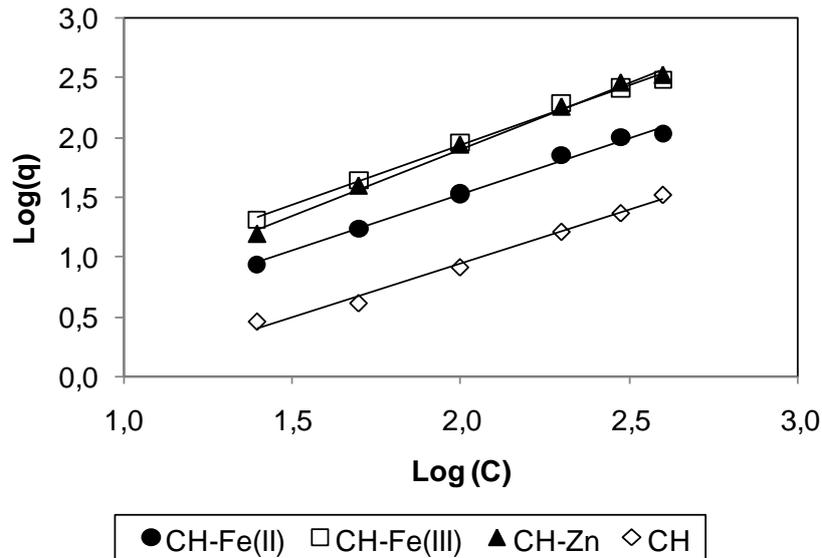


Figura 1.8: Forma linearizada da equação da isoterma de Freundlich. Gráfico $\text{Log}(q)$ em função de $\text{Log}(C)$, para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH.

Através das análises das regressões lineares das retas apresentadas nas **Figuras 1.7 e 1.8**, foram estimadas as constantes de adsorção do ciprofloxacino, os parâmetros das equações e os coeficientes de correlação para cada micropartícula CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH, sendo os resultados apresentados na **Tabela 1.5**. Esta tabela apresenta ainda a média dos erros percentuais [calculado de acordo com a Equação (1.7)].

Tabela 1.5: Isotermas de Langmuir e Freundlich: constante das isotermas, parâmetros das equações, coeficientes de correlação e média dos erros percentuais.

Micropartículas	Isoterma Langmuir				Isoterma Freundlich			
	M_{\max} ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	K_L	R_1^2	$\varepsilon(\%)$	K_F	n	R_2^2	$\varepsilon(\%)$
CH-Fe(II)	909,1	0,0004	0,9997	20,22	0,4417	0,94	0,9932	6,13
CH-Fe(III)	1666,7	0,0005	0,9987	47,89	0,8713	0,99	0,9444	6,05
CH-Zn(II)	322,6	0,0019	0,9893	53,15	0,4744	1,11	0,9947	7,50
CH	3,97	0,03	0,9609	25,21	0,1383	0,89	0,9900	7,25

Analisando os parâmetros estimados pela aplicação da isoterma de Langmuir, verifica-se que a capacidade máxima de adsorção (M_{max}) das micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH foram 909, 1.666, 322 e 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente (**Tabela 1.5**). A micropartícula que apresentou uma maior capacidade de adsorção do ciprofloxacino foi a CH-Fe(III), seguida da micropartícula de CH-Fe(II) e CH-Zn(II). De acordo com dados da literatura (URBANIÁK et al., 2007) sabe-se que quinolonas formam complexos com íons metálicos, sendo a estabilidade do complexo formado dependente da estrutura da quinolona, do íon metálico envolvido, e das condições experimentais, como o pH do meio. No caso do ciprofloxacino as constantes de estabilidade da formação de complexo com metais decrescem na ordem $\text{Fe(III)} \approx \text{Al(III)} > \text{Cu(II)} > \text{Fe(II)} \approx \text{Zn(II)} > \text{Mg(II)} > \text{Ca(II)}$ (TUREL, 2002; KMETEC et al., 1999). A sequência obtida com as capacidades máximas de adsorção das micropartículas, apresentadas acima, demonstrou ser a mesma.

Em relação aos parâmetros estimados pela aplicação da isoterma de Freundlich (**Tabela 1.5**), observa-se que os valores de n estão próximos de 1,0, indicando com isso uma favorável adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas. A K_F foi utilizada como uma medida relativa à capacidade de adsorção. Comparando os valores de K_F das diferentes micropartículas, verifica-se que a CH-Fe(III) apresentou o maior valor [$0,8713 (\mu\text{g}/\text{mg}) \cdot (\text{mg}/\text{mL})^{-1/n}$], indicando desta forma que a intensidade de adsorção do ciprofloxacino por esta micropartícula foi maior.

Comparando os valores de R_1^2 e R_2^2 apresentados na **Tabela 1.5** fica evidente que a adsorção do ciprofloxacino neste estudo apresenta uma boa correlação com ambos os modelos Langmuir e Freundlich. Entretanto, ao analisarmos a média dos erros percentuais relativos constata-se que o modelo Freundlich representa de forma mais satisfatória a adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas. Com isto pode-se dizer que a adsorção do ciprofloxacino ocorre em sítios heterogêneos com distribuição não uniforme, podendo ocorrer mais de uma camada de adsorção.

A literatura (AKSU e TUNÇ, 2005; CANTANHEDE et al., 2005; ACHAK et al., 2009) registra que sistemas adsorptivos cujos adsorvatos sejam constituídos por moléculas pequenas ou por íons em solução apresentam uma certa tendência para seguir o modelo de Langmuir, enquanto que macromoléculas ou polímeros, que

devem apresentar interações mais fracas com a superfície, seguem mais o modelo de Freundlich. Os resultados aqui obtidos corroboram com essa tendência.

1.3.4.2 Cinética de adsorção

As constantes de *pseudo-primeira* e *segunda-ordem* e capacidade de adsorção (q_{300}) experimental e calculado, obtidos para as diferentes concentrações iniciais de ciprofloxacino para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH foram comparados na **Tabela 1.6**.

Os valores das constantes de *pseudo-primeira-ordem* ($K_{1,ad}$) e das capacidades de adsorção ($q_{300, 1, calc}$) foram determinados a partir dos coeficientes angular e linear da reta de regressão linear de $\text{Log}(q_{eq}-q)$ em função de t para as micropartículas em todas as concentrações iniciais de ciprofloxacino estudadas (25 à 400 $\mu\text{g/mL}$) no tempo 300 min. No mesmo sentido, as constantes de *pseudo-segunda-ordem* ($K_{2,ad}$) e as capacidades de adsorção ($q_{300, 2, calc}$) foram determinados a partir dos coeficientes angular e linear da reta de regressão linear do gráfico de t/q em função de t .

Analisando os dados apresentados na **Tabela 1.6**, verifica-se que os valores de $K_{1,ad}$ não demonstraram ser influenciados nem pela concentração inicial de ciprofloxacino nem pelo tipo de micropartícula utilizado. Por outro lado, as constantes de *pseudo-segunda-ordem* apresentam uma tendência a diminuir com o aumento da concentração inicial de ciprofloxacino.

Tabela 1.6: Comparação das constantes de *pseudo-primeira* e *segunda-ordem* e capacidade de adsorção (q_{300}) experimental e calculado, obtidos para as diferentes concentrações iniciais de ciprofloxacino para as micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH.

Micropartículas	C_o ($\mu\text{g/mL}$)	q_{300} ($\mu\text{g/mg}$)	Cinética de pseudo-primeira-ordem			Cinética de pseudo-segunda-ordem		
			$K_{1,ad}(\times 10^{-3}\text{min}^{-1})$	$q_{300,1,calc}$ ($\mu\text{g/mg}$)	R_1^2	$K_{2,ad}(\times 10^{-3}\text{min}^{-1})$	$q_{300,2,calc}$ ($\mu\text{g/mg}$)	R_2^2
CH-Fe(II)	25	8,71	2,76	0,25	0,7487	17,20	6,88	0,9961
	50	17,2	2,76	0,07	0,5627	9,34	13,56	0,9948
	100	33,8	2,30	0,001	0,2172	8,96	27,39	0,9879
	200	69,9	3,22	0,19	0,9907	1,24	54,34	0,9878
	300	99,2	4,60	0,18	0,7662	1,15	88,49	0,9903
	400	105,7	2,76	0,17	0,9236	1,78	90,09	0,9959
CH-Fe(III)	25	20,5	1,84	0,07	0,7232	10,99	15,87	0,9973
	50	43,4	2,07	0,16	0,9558	2,10	26,24	0,9840
	100	90,6	2,07	0,25	0,9452	0,81	54,05	0,9631
	200	196,5	1,61	0,33	0,9572	0,42	101,01	0,9680
	300	262,3	2,53	0,35	0,9222	0,29	169,49	0,9758
	400	305,3	24,64	0,48	0,8474	2,65	307,03	0,9490
CH-Zn(II)	25	15,5	6,22	0,07	0,994	0,66	15,64	0,7373
	50	39,3	0,92	0,01	0,1068	2,07	30,30	0,9883
	100	86,7	4,37	0,14	0,6522	1,47	78,74	0,9891
	200	180,1	1,15	0,17	0,1009	4,44	153,84	0,9903
	300	262,3	3,22	0,33	0,7236	0,35	222,23	0,9669
	400	332,1	12,20	0,44	0,8153	0,01	326,31	0,9620
CH	25	2,8	2,30	0,56	0,7579	25,15	1,83	0,9398
	50	4,1	12,20	0,73	0,6327	44,66	4,20	0,9967
	100	8,1	12,20	0,05	0,9638	0,49	13,64	0,3392
	200	16,1	4,83	0,04	0,8489	1,53	13,66	0,8965
	300	23,1	10,13	0,15	0,9663	0,61	24,44	0,8143
	400	32,9	11,05	0,18	0,9620	0,59	34,73	0,8739

Como apresentado na **Tabela 1.6**, para as micropartícula de CH-Fe(II), CH-Fe(III) e CH-Zn(II), os coeficientes de correlação da cinética de *pseudo-segunda-ordem* são maiores quando comparados com os coeficientes de correlação da cinética de *pseudo-primeira-ordem*. Verifica-se ainda que os valores teóricos de $q_{300,calc}$ para a cinética de *pseudo-segunda-ordem* estão mais próximos dos valores de q_{300} obtidos com os experimentos.

Através destes dados fica evidenciado que o modelo da cinética de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de quitosana-metal obedece a uma cinética de *pseudo-segunda-ordem*, indicando com isso que o mecanismo de adsorção é através de reação química ou seja quimissorção.

Analisando os dados apresentados sugere-se que a capacidade de adsorção está diretamente relacionada com a presença dos íons metálicos, uma vez que as micropartículas de CH sem metal apresentaram a menor capacidade de adsorção. Comparando os resultados das micropartículas CH-Fe(II), CH-Fe(III) e CH-Zn(II), verifica-se que também o tipo do metal apresenta influência direta na quantidade de ciprofloxacino adsorvido.

Considerando que as quinolonas são fármacos que formam complexos com diferentes íons metálicos, sendo que a formação de coordenação é possível, devido a presença de dois grupos ionizáveis no anel quinolínico (**Figura 1**) do fármaco (UPADHYAY et al., 2006). A estrutura é descrita como um complexo bidentado entre o íon metálico e a quinolona, onde a ligação ocorre entre o oxigênio da posição 4 e outro oxigênio do grupo carboxílico da posição 3 (KMETEC et al., 1999; SADEEK, 2005). Com base nestes dados da literatura e considerando que os íons ferro formam preferencialmente complexos octaédricos, foi proposto uma estrutura da complexação do ciprofloxacino com as micropartículas de CH-Fe(III), apresentado na **Figura 1.9**.

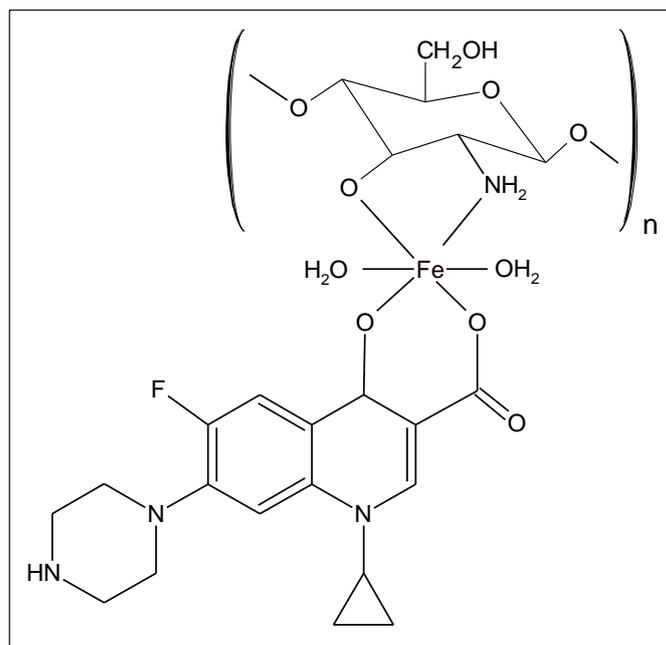


Figura 1.9: Estrutura proposta da complexação do ciprofloxacino com as micropartículas de CH-Fe(III).

1.3.5 Estudo da seletividade de adsorção do ciprofloxacino

Considerando que no tratamento de determinadas tipos de infecções bacterianas, como por exemplo infecções das vias aéreas superiores, preconiza-se a associação de anti-inflamatórios e antimicrobianos, foram realizados estudos de seletividade de adsorção do ciprofloxacino frente à fármacos anti-inflamatórios. Para a realização do estudo selecionou-se a nimesulida, sendo esta um anti-inflamatório não esteroidal que atua na inibição da cicloxigenase, enzima responsável pela síntese de substâncias envolvidas em processos inflamatórios, como as prostaglandinas.

A escolha da nimesulida baseia-se na sua farmacocinética, onde seu tempo de meia vida plasmática é de 3 a 6 h e sua absorção majoritária, 50% da dose administrada por via oral, ocorre a nível intestinal. Com isso sistemas adsorventes presentes a nível intestinal, provocariam uma redução da absorção da nimesulida, alterando com isso a sua farmacocinética com conseqüente alteração da sua eficácia terapêutica.

Para verificar a seletividade de adsorção, as micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II) foram incubadas meio aquoso (tampão HEPES, pH 6,8; a 37 °C) contendo ciprofloxacino (400 µg/mL) e nimesulida (100 µg/mL). A **Figura 1.10** apresenta o perfil de adsorção do ciprofloxacino e da nimesulida.

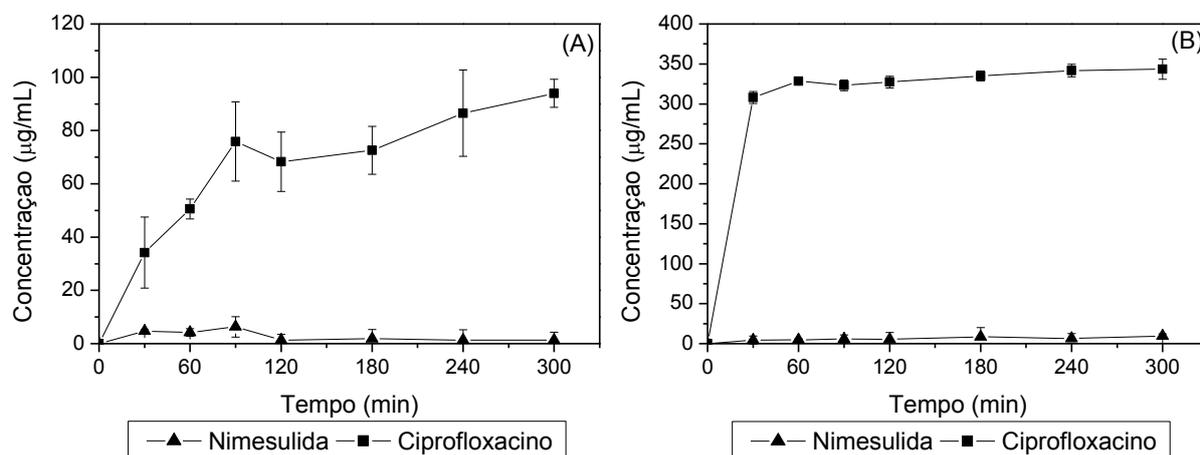


Figura 1.10: Adsorção do ciprofloxacino e da nimesulida pelas micropartículas de CH-Fe(III) (A) e CH-Zn(II) (B), em tampão HEPES, pH 6,8; a 37 °C.

Como pode ser observado na **Figura 1.10** as micropartículas de CH-Fe(III) [**Fig. 1.10 (A)**] adsorveram, ao final de 300 min de incubação, uma concentração de aproximadamente 100 µg/mL e 1,5 µg/mL de ciprofloxacino e nimesulida, respectivamente. Já micropartículas de CH-Zn(II) [**Fig. 1.10 (B)**] adsorveram uma concentração de ciprofloxacino correspondente a 340 µg/mL e 10 µg/mL de nimesulida.

Comparando as concentrações adsorvidas do ciprofloxacino em situação de competição com a nimesulida com as capacidades de adsorção do ciprofloxacino sem competição (**Fig. 1.5**), verifica-se que as micropartículas de CH-Zn(III) adsorveram concentrações aproximadas nas duas situações (\cong 340 µg/mL). Por outro lado, constata-se que as micropartículas de CH-Fe(III) apresentaram uma redução na capacidade de adsorção na ordem de 270 µg/mL.

Analisando os dados apresentados verifica-se que as micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn apresentam pronunciada seletividade de adsorção do ciprofloxacino frente ao anti-inflamatório nimesulida.

CAPÍTULO 2

Sistema de liberação colônica para adsorção seletiva de antimicrobianos residuais ao nível do cólon, baseado em micropartículas adsorventes de quitosana-metal, encapsuladas por uma matriz de pectina

2.1 APRESENTAÇÃO

O segundo capítulo desta tese de doutorado consiste no desenvolvimento de um sistema galênico para uma liberação sito-específica à nível de cólon, de micropartículas adsorventes baseadas na complexo quitosana-metal, para a adsorção seletiva do antimicrobiano ciprofloxacino. O sistema desenvolvido tem o intuito de remover concentrações residuais do ciprofloxacino e evitar com isso o possível desenvolvimento de efeitos adversos ou mesmo evitar que doses subinibitórias propiciem o desenvolvimento de mecanismos de resistência em bactérias potencialmente patogênicas.

baseado na liberação das micropartículas adsorventes para a adsorção unicamente a nível colônico, de um antimicrobiano da família das quinolonas, o ciprofloxacino. O sistema é constituído por micropartículas de quitosana-metal introduzidas em esferas de pectina.

Neste capítulo estão descritos o desenvolvimento e a caracterização do sistema de liberação colônica contendo micropartículas adsorventes de quitosana-metal. Segue também descrito o estudo da capacidade de adsorção *in vitro* em meios digestivos simulados, tanto intestinal como colônico, do antimicrobiano ciprofloxacino pelas esferas desenvolvidas.

Este capítulo foi realizado no Laboratório UMR CNRS 8612 (Physico-Chimie, Pharmaceutique, Biopharmacie), uma Unidade de pesquisa vinculada ao CNRS e localizada na Faculté de Pharmacie da Université de Paris XI, em Châtenay-Malabry, França. O estágio de doutorado-sanduíche foi supervisionado pelo Prof. Dr. Elias Fattal e estava inserido no Projeto CAPES-COFECUB 540/2005, Coordenado pela Profa. Dra. Silvia S. Guterres.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Micropartículas adsorventes de quitosana-metal

Para o desenvolvimento do sistema de liberação colônica foram selecionadas as micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II), pois foram as micropartículas que apresentaram uma melhor capacidade de adsorção *in vitro* do ciprofloxacino, conforme apresentado no Capítulo I. As micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II) foram preparadas e caracterizadas conforme descrito no Capítulo I.

2.2.2 Encapsulamento das micropartículas adsorventes de CH-Fe(III) e CH-Zn(II)

As micropartículas adsorventes de CH-Fe(III) e CH-Zn(II) foram encapsuladas por uma matriz polimérica de pectina através da técnica de gelificação iônica de acordo com modificações no procedimento previamente descrito por Bourgeois e colaboradores (2005). Para isso, numa solução aquosa de pectina foram acrescentados, suspensões aquosas de micropartículas de CH-Fe(III), CH-Zn(II) ou CH. Após homogeneização, com agitação vigorosa em vortex (Whirlimixer, UK), as misturas foram gotejadas, com auxílio de uma bomba peristáltica com um bico injetor de 0,8 mm de diâmetro, numa solução de acetato de zinco (12%, p/v), sob agitação constante e temperatura ambiente.

Através do contato com os íons Zn(II) da solução, a pectina forma esferas geleificadas. Para uma completa geleificação as esferas foram mantidas na solução de Zn(II) por um período de 30 min, sob constante agitação. Após este tempo de contato, as esferas foram então recuperadas por filtração e lavadas com água destilada (3 vezes, sendo mantido em cada durante 1 min a cada vez) para a remoção do excesso de Zn(II). Finalmente, as esferas foram secas a 37 °C por 12 h.

2.2.3 Revestimento das esferas de pectina-micropartículas adsorventes

Com o intuito de evitar uma alteração na biodisponibilidade do ciprofloxacino, foram testados dois polímero de revestimento diferentes, sendo a polietilenoimina

(PEI) e o Eudragit[®] RS. As metodologias específicas para cada tipo de revestimentos são detalhadas a seguir.

2.2.3.1 Revestimento com Polietilenoimina (PEI)

Para o revestimento com PEI, esferas obtidas conforme descrito no item 2.2.2, excetuando o passo de secagem, foram dispersas em uma solução aquosa de PEI. O sistema permaneceu em agitação por 20 min. Após este tempo de contato, as esferas foram recuperadas por filtração e secas a 37 °C por 12h. Foram estudadas concentrações crescentes de PEI, sendo 0,05 à 1,2 %.

2.2.3.2 Revestimento com Eudragit[®] RS

A solução de revestimento foi preparada pela dissolução dos polímeros Eudragit[®] RS e polietilenoglicol (PEG) 300 (5:1, p/v) em uma mistura de acetona e etanol (2:1, v/v). Esferas secas, preparadas conforme descrito no item 2.2.2, foram colocadas num balão rotatório com velocidade ajustada à 20 rpm. A solução de revestimento foi manualmente pulverizada sobre as esferas e, então, foi aplicada uma corrente de ar quente (~ 37 °C) para evaporação do solvente. O revestimento foi conduzido até um aumento de 15 % no peso das esferas.

2.2.4 Meios digestivos simulados

Para a realização dos ensaios descritos neste capítulo, foram preparados meios digestivos simulados, sendo gástrico, intestinal e colônico. A composição de cada meio segue descrita abaixo:

- Meio Gástrico Simulado (SGM): numa solução de NaCl 30 mM foi adicionado HCl concentrado (~ 12 M) até obtenção de um pH igual a 1,2.

- Meio Intestinal Simulado (SIM): numa solução de tampão HEPES 30 mM contendo pancreatina a 1% (p/v) foi acrescentada uma solução de NaOH 0,2 M até obtenção de pH igual a 7,4.
- Meio Colônico Simulado (SCM): numa solução de tampão HEPES/NaCl 10 mM/145 mM, contendo pectinase (5200 PG/mL) foi acrescentada uma solução de NaOH 1 M até obtenção de pH igual a 6,5.

2.2.5 Caracterização das esferas de pectina-micropartículas adsorventes

As esferas foram caracterizadas quanto ao diâmetro, morfologia externa e interna, intumescimento e estabilidade frente aos meios digestivos simulados (gástrico, intestinal e colônico).

2.2.5.1 Diâmetro médio

O diâmetro médio das esferas foi determinado com auxílio de microscópio óptico (Leitz Diaplan, França). O diâmetro de uma esfera individual foi calculado usando uma objetiva pré-calibrada. Os resultados estão expressos em diâmetro médio (μm) \pm desvio padrão. Para a determinação do diâmetro médio foram utilizadas uma amostragem de 30 esferas de 3 lotes diferentes, sendo cada lote composto por um total de 90 a 100 esferas.

2.2.5.2 Morfologia interna e externa

As estruturas externa e interna das esferas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) operado a 3 kV (LEO 9530, Gemini, França). Para a visualização, esferas inteiras e um corte transversal foram depositados em *stubs* de metal, usando uma fita adesiva dupla face de carbono e recobertos com uma camada de 4 nm de platina/paládio sob pressão reduzida (Cressington 208 HR, Eloise, França).

2.2.5.3 Intumescimento

O intumescimento das esferas foi determinado por análise termogravimétrica. As esferas (1 esfera/mL) foram incubadas no SIM, pH 7,4 a 37 °C. Após tempos de contato pré-determinados (30, 60, 120, 180, 240 e 300 min), as esferas foram recuperadas e cuidadosamente secas com papel absorvente, para a remoção do excesso de meio e, então, pesadas em balança analítica. A porcentagem de intumescimento foi calculada de acordo com a Equação (2.1). Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\text{Intumescimento}(\%) = \frac{P_t - P_o}{P_o} \times 100 \quad (2.1)$$

onde: P_o é o peso da esfera seca e P_t é o peso da esfera incubada, num determinado intervalo de tempo, no SIM (pH 7,4) a 37 °C.

2.2.5.4 Estabilidade frente aos meios digestivos simulados

A estabilidade das esferas foi determinada através da desintegração das mesmas quando em contato com os meios digestivos simulados (SGM, SIM e SCM).

Para este ensaio, as esferas foram primeiramente incubadas (1 esfera/mL) no SGM por 1h. Após este tempo, foram transferidas para o SIM, onde a estabilidade foi verificada por um período de 5 h, e finalmente foram transferidas para o SCM, onde permaneceram até completa desintegração. Os sistemas permaneceram em agitação tangencial (650 rpm/min) a 37 °C. A estabilidade das esferas frente cada meio digestivo foi caracterizada como a não desintegração da esfera, ou seja a não liberação das micropartículas adsorvente no meio, cuja visualização foi acompanhada com auxílio de microscópio óptico (Leitz Diaplan, França).

2.2.6 Adsorção do ciprofloxacino pelas esferas de pectina-micropartículas adsorventes

Esferas revestidas e não-revestidas, somando 1 mg em relação às micropartículas adsorventes, foram incubadas em 1 mL do SIM (pH 7,4), contendo ciprofloxacino (400 µg/mL). O sistema foi mantido em agitação tangencial (650 rpm/min) à temperatura de 37 °C por 300 min. Amostras foram coletadas em tempos pré-determinados (60, 120, 180, 240 e 300 min), centrifugadas (4.000 rpm por 3 min) e o meio sobrenadante foi separado.

Após os 300 min de incubação no SIM, as esferas foram transferidas para o SCM (1 mL, pH 7,4) contendo ciprofloxacino (400 µg/mL). O sistema foi submetido às mesmas condições de agitação e temperatura descritos acima, e amostras foram coletadas nos tempos 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 min, centrifugadas (4.000 rpm por 3 min) e o meio sobrenadante foi separado.

As quantidades de ciprofloxacino presentes nos meios sobrenadantes SIM e SCM foram determinadas por CLAE, utilizando os mesmos parâmetros descritos no Capítulo I. As concentrações de ciprofloxacino adsorvido pelas esferas revestidas e não-revestidas e/ou micropartículas adsorventes foram determinadas pela diferença da concentração inicial de ciprofloxacino e a concentração presente nos meios.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento das esferas de pectina-micropartículas adsorventes foram utilizadas as micropartículas de CH-Fe(III) e de CH-Zn(II), sendo estas as micropartículas que apresentaram uma maior capacidade de adsorção *in vitro* do ciprofloxacino, 306 e 330 µg/mg, respectivamente (resultados detalhados no Capítulo I). Foram também desenvolvidas esferas contendo micropartículas de CH sem íons adsorvidos na matriz polimérica da quitosana; estas esferas foram utilizadas como sistema-controle.

As esferas foram preparadas pela técnica de geleificação ionotrópica. De acordo com este método, quando uma solução aquosa de pectina é gotejada em uma solução contendo íons metálicos divalentes, os grupamentos carboxila da pectina, carregados negativamente, são reticulados pelos íons divalentes, resultando na formação de esferas geleificadas (SRIAMORNSAK e NUNTHANID, 1998). Normalmente para a formação de esferas de pectina, são utilizados íons Ca(II) (BOURGEOIS et al., 2006). Na realização do presente trabalho os íons Ca(II) foram substituídos por Zn(II). Esta substituição ocorreu, pois ao reticular a pectina, o Zn(II) forma uma rede de pectinato de zinco estável e resistente à degradação no trato digestivo superior (CHAMBIN et al., 2006), o que favorece a obtenção do objetivo proposto.

2.3.1 Esferas de pectina-micropartículas adsorventes

Serão apresentados a seguir os resultados da caracterização físico-química, a estabilidade frente aos meios digestivos simulados, bem como os perfis de adsorção *in vitro* do ciprofloxacino, pelas esferas de pectina-micropartículas adsorventes.

2.3.1.1 Caracterização físico-química

Para a formação das esferas, foram avaliadas diferentes proporções de micropartículas adsorventes:pectina. Pôde-se observar que quando a suspensão contendo as micropartículas adsorventes é misturada com a solução da pectina, a suspensão final exibe um aumento da viscosidade tempo dependente. A viscosidade

aumenta conforme são aumentadas as concentrações de pectina ou micropartículas, o que sugere uma formação de complexos polieletrólíticos entre as cadeias negativamente carregadas da pectina e a carga positiva das micropartículas tendo o polímero quitosana como base. O aumento da viscosidade dificulta a obtenção de esferas uniformes e com formato regular, sendo assim possível obter esferas de pectina contendo as micropartículas de CH-Fe(III) apenas nas proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6 (micropartícula:pectina, p/p). Para as esferas contendo micropartículas de CH-Zn(II) a única proporção possível foi 1:4 (micropartícula:pectina, p/p).

As características físicas das esferas contendo as micropartículas adsorventes em diferentes proporções de micropartícula:pectina estão apresentadas na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1: Características físicas das esferas contendo diferentes proporções de pectina e de micropartículas, sendo CH-Fe(III), CH-Zn(II) e CH (p/p).

Proporção Micropartícula: pectina	Micropartículas			Tamanho (mm±SD)	Peso (mg±SD)	CV(%) **
	CH-Fe* (mg±SD)	CH-Zn* (mg±SD)	CH* (mg±SD)			
5:3	0,84±0,13	-	-	1,16±0,09	1,36±0,21	15
4:4	0,94±0,03	-	-	1,15±0,01	1,88±0,07	4,0
5:5	1,03±0,07	-	-	1,16±0,05	2,07±0,14	6,5
3:6	0,67±0,02	-	-	1,23±0,05	2,04±0,06	4,0
1:4	-	0,18±0,03	-	1,15±0,03	0,91±0,10	11
4:4	-	-	0,97±0,07	1,60±0,06	1,95±0,13	7,0

* Média da concentração final de micropartícula na esfera;

** Coeficiente de variação do peso das esferas contendo as micropartículas adsorventes, calculado pela divisão do desvio padrão pelo peso médio.

Analisando os resultados apresentados na **Tabela 2.1**, verifica-se que as esferas contendo CH-Fe(III) apresentam um diâmetro médio variando entre 1,16 e 1,23 mm. Este diâmetro foi de 1,15 e 1,60 mm para as esferas contendo CH-Zn(II) e CH, respectivamente. O peso médio foi 1,36, 1,88, 2,07 e 2,05 mg para CH-Fe(III):pectina nas proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6. Já as esferas contendo micropartícula de CH-Zn(II) e CH apresentaram um peso médio igual a 0,91 e 1,95 mg, respectivamente. Observa-se que o peso das esferas aumenta com o aumento

da concentração de pectina, este fato pode estar relacionado com o aumento da viscosidade da suspensão, como relatado acima.

As esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Zn(II) apresentaram-se uniformes e com formato arredondado apenas na proporção 1:4, resultando em média numa concentração de 0,18 mg de micropartículas de CH-Zn(II) por esfera. Esta concentração final de micropartícula na esfera é relativamente baixa. Quanto menor for a concentração da micropartículas na esfera, maior será a quantidade de esferas necessárias para a adsorção do ciprofloxacino. Como foi previamente observado no Capítulo I, uma boa capacidade de adsorção do ciprofloxacino é obtida com 1 mg de micropartículas de CH-Zn(II). Portanto considerou-se a concentração de 0,18mg/esfera de CH-Zn(II) inviável, pois para futura administração *in vivo*, seriam necessárias grandes quantidades de esferas. Desta forma, as esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Zn(II) foram descartadas e os estudos seguiram apenas com as esferas contendo CH-Fe(III) e CH. As esferas de pectina contendo micropartículas de CH na proporção 4:4 (micropartícula:pectina, p/p) foram utilizadas como sistema-controle.

A análise das superfícies externas das esferas contendo as micropartículas de CH-Fe(III) e CH foi realizada por MEV, e as imagens obtidas estão apresentadas na **Figura 2.1**.

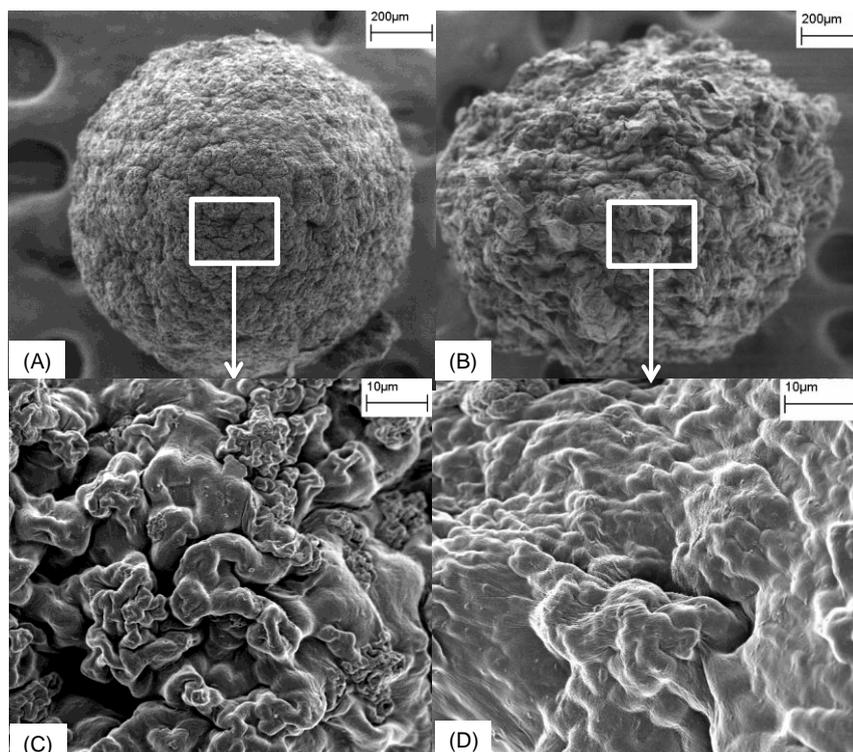


Figura 2.1: MEV da superfície externa das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) (A e C) e CH (B e D).

Através da análise das imagens da **Figura 2.1**, pode-se verificar que as esferas contendo tanto as micropartículas de CH-Fe(III) (A e C) e CH (B e D) apresentam uma formato arredondado, com superfície rugosa e sem a presença de macroporos passíveis de observação através das imagens obtidas. Não são observadas diferenças entre as morfologias das esferas contendo as diferentes micropartículas (CH-Fe(III) e CH).

2.3.1.2 Intumescimento

O intumescimento das esferas foi determinado gravimetricamente em diferentes intervalos de tempo no SIM (pH 7,4) a 37 °C. A **Figura 2.2** apresenta a porcentagem de intumescimento, calculada de acordo com a Equação 2.1 das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III), nas proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6 (p/p) e CH na proporção 4:4 (p/p).

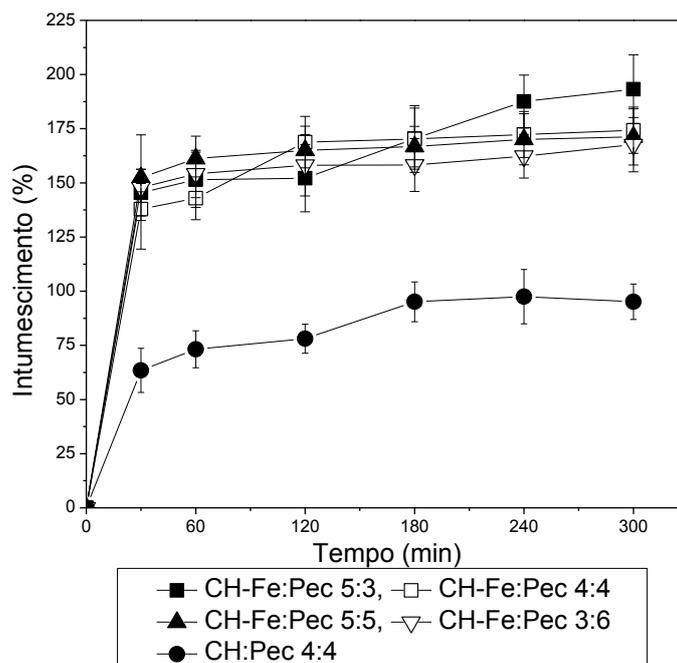


Figura 2.2: Intumescimento das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) (proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6, p/p) e CH (proporção 4:4, p/p), no SIM (pH = 7,4; a 37°C).

Como pode ser observado na **Figura 2.2**, as esferas apresentam uma taxa rápida de intumescimento até atingir um estado de equilíbrio aos 60 min. As esferas contendo micropartículas CH (4:4, p/p) apresentam uma porcentagem de intumescimento de 95 %, enquanto que para as esferas contendo CH-Fe(III) esta porcentagem é de 160 %. A variação na taxa de intumescimento entre as diferentes esferas pode estar relacionada à quantidade de grupos amino livres nas micropartículas de CH-Fe(III) e CH.

Os grupos amino presentes nas micropartículas de CH-Fe(III) e CH e os grupos carboxílicos, carregados negativamente, da pectina podem formar complexos polieletrólíticos. Para a formação destes complexos ocorre uma dissociação parcial dos grupos amino e carboxílico da quitosana e da pectina, respectivamente. Estes grupos livres podem formar ligações de hidrogênio com os grupos –OH dos resíduos de sacarídeos e –COOCH₃ do resíduo da pectina, também presentes nos polímeros. Quando o sistema é submetido à uma faixa de pH entre 3 e 8, os equilíbrios $\text{NH}_2 = \text{NH}_3^+$ da quitosana, e $\text{COOH} = \text{COO}^-$ da pectina se deslocam, podendo ocasionar uma perturbação nas ligações de hidrogênio entre as cadeias. Quando diminuem as

ligações de hidrogênio entre as cadeias, a matriz do complexo polieletrólítico é relaxada, permitindo desta forma a entrada do meio na rede, o que leva ao intumescimento (YAO et al., 1997).

De acordo com dados descritos na literatura (MACLEOD et al., 1999), a mistura quitosana:pectina intumescer com diferentes graus dependendo da quantidade de quitosana e de pectina. No presente estudo, as esferas com diferentes proporções de CH-Fe(III):pectina apresentaram o mesmo perfil de intumescimento. Analisando os dados obtidos, verifica-se que a porcentagem de intumescimento foi maior para as esferas contendo CH-Fe(III) em diferentes proporções, quando comparadas às esferas contendo somente CH. Estes dados sugerem que ocorre uma fraca interação eletrostática entre as micropartículas de CH-Fe(III) e a pectina, a qual pode estar relacionada ao grau de reticulação (GDA = 19%), relatado no Capítulo I) e a presença dos íons Fe(III) adsorvidos na superfície da quitosana, uma vez que estas duas reações (reticulação e imobilização de metais) ocorrem com os grupos amino da quitosana.

2.3.1.3 Estabilidade frente aos meios digestivos simulados

A estabilidade das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH foi determinada por observação macroscópica da desintegração na presença dos meios digestivos simulados à 37 °C. Os resultados estão apresentados na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2: Estabilidade das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH nos meios digestivos simulados: gástrico (SGM), intestinal (SIM) e colônico (SCM), incubadas a 37°C.

Esferas		Meios digestivos simulados		
CH-Fe(III):Pec*	CH:Pec*	SGM (pH 1.2)	SIM** (pH 6.8)	SCM*** (pH 5.5)
5 :3		>1 h	>5 h	1 h 15 min
4 :4		>1 h	>5 h	1 h 30 min
5 :4		>1 h	>5 h	1 h 40 min
3 :6		>1 h	>5 h	2 h
-	4:4	>1 h	>5 h	2 h

* Proporção micropartícula:pectina. ** Esferas transferidas após 1 h de incubação no SGM. *** Esferas transferidas após 1 h de incubação no SGM seguidas de 5 h no SIM.

A estabilidade das esferas foi caracterizada como a não desintegração no meio digestivo simulado. Analisando os resultados apresentados na **Tabela 2.2**, verifica-se que todas as formulações permaneceram intactas por no mínimo 1h no SGM, seguidas de 5 h no SIM. Essa estabilidade no meio gástrico e intestinal não demonstrou ser influenciada nem pelo tipo de micropartícula utilizado [CH ou CH-Fe(III)] nem pelas diferentes proporções CH-Fe(III):pectina. Entretanto, foram observadas diferenças quando as esferas foram incubadas no SCM. Neste caso, para as esferas contendo CH-Fe(III), com o aumento da concentração de pectina, aumenta o tempo de desintegração das mesmas.

Comparando o tempo de desintegração das esferas contendo CH e CH-Fe(III) na mesma proporção micropartículas: pectina (4:4, p/p), verifica-se uma diferença de 30 min a mais para as esferas contendo CH em relação aquelas contendo CH-Fe(III). Este resultado corrobora com a hipótese levantada anteriormente da interação eletrostática entre os polímeros quitosana e pectina. A interação entre as micropartículas de CH e a pectina é relativamente mais forte daquela interação formada entre as micropartículas de CH-Fe(III) e pectina, esta diferença de interação ocorre pois a complexação da quitosana com íons Fe(III) reduz o número de grupos NH_3^+ disponíveis para interagir com os grupos COO^- da pectina.

2.3.1.4 Adsorção *in vitro* do ciprofloxacino

Para o estudo da adsorção colônica do ciprofloxacino foram selecionadas as esferas contendo as micropartículas de CH-Fe(III) na proporção 4:4 (p/p) micropartículas:pectina. Foi selecionada esta proporção, pois com ela, foi possível a obtenção de esferas com uma maior quantidade de micropartículas encapsuladas, apresentando uma melhor uniformidade, menor coeficiente de variação (**Tabela 2.1**) e boa estabilidade frente ao SGM e SIM e, ainda, um tempo de degradação no SCM compatível para futura administração *in vivo* (**Tabela 2.2**).

O estudo da adsorção do ciprofloxacino foi conduzido pela incubação de esferas de CH-Fe(III):pectina (4:4, p/p) primeiramente no meio intestinal. Foi incubada uma quantidade de esferas correspondente a aproximadamente 1 mg de micropartículas de CH-Fe(III), sendo esta a quantidade mínima necessária para uma eficácia de adsorção, conforme foi apresentado anteriormente no Capítulo I. Para verificar a influência dos íons Fe(III) na adsorção do ciprofloxacino, foram utilizadas esferas contendo micropartículas de CH como sistema controle. O perfil de adsorção do ciprofloxacino no meio intestinal pelas esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH, está apresentado na **Figura 2.3**.

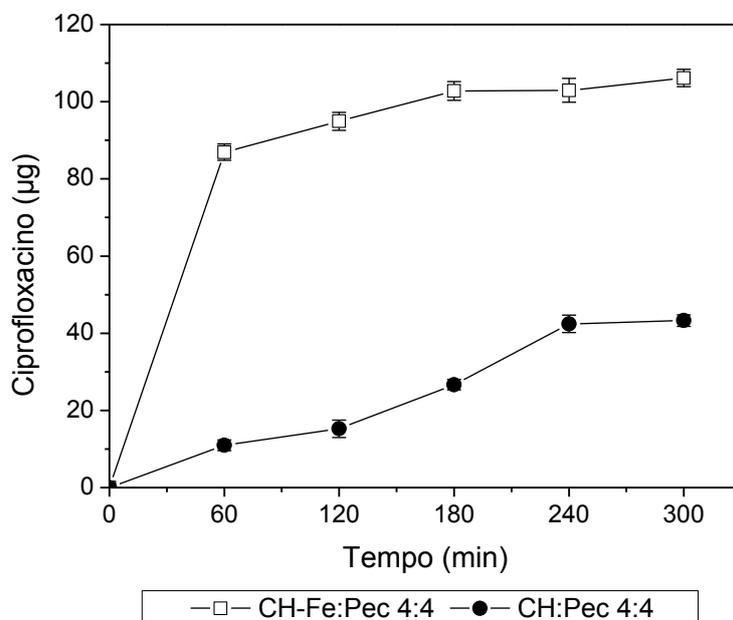


Figura 2.3: Adsorção do ciprofloxacino (µg) por esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH no SIM (pH 7,4; a 37°C).

Analisando os dados apresentados na **Figura 2.3** verifica-se que as esferas contendo as micropartículas de CH-Fe(III) e CH adsorvem 106 µg e 43 µg, respectivamente, o que corresponde a aproximadamente 26 e 11 % da quantidade inicial de ciprofloxacino. Na realização deste estudo as esferas permaneceram intactas sem ocorrer a liberação das micropartículas no meio, como relatado anteriormente no estudo de estabilidade (**Tabela 2.2**); logo, a adsorção do ciprofloxacino pode estar relacionada ao intumescimento das esferas, o que permitiu a difusão do ciprofloxacino do meio para o interior da rede da esfera.

Como o intuito é co-administrar as esferas de pectina contendo as micropartículas de CH-Fe(III) com a terapia convencional de ciprofloxacino, é essencial prevenir a adsorção do fármaco durante seu trânsito no trato digestivo superior, e adsorver apenas a concentração residual presente no cólon. Com os resultados obtidos, constata-se que as esferas não previnem a adsorção do ciprofloxacino no meio intestinal, fato este que poderia levar a uma alteração da biodisponibilidade do fármaco, o que poderia resultar em alteração da eficácia terapêutica.

Para evitar a possível alteração da biodisponibilidade do ciprofloxacino, as esferas contendo as micropartículas de CH-Fe(III) foram revestidas com dois polímeros de diferentes, sendo a polietilenoimina e o Eudragit[®] RS.

2.3.2 Esferas de pectina-micropartículas adsorventes revestidas com Polietilenoimina

A polietilenoimina (PEI) é uma amina polimérica alifática que apresenta características catiônicas. O mecanismo de revestimento é baseado na interação eletrostática entre os grupos amino positivamente carregados da PEI e os grupos carboxílicos negativamente carregados da pectina (BOURGEOIS et al., 2005). Devido ao alto peso molecular da PEI (25 kDa) e a acentuada densidade das esferas de pectina contendo as micropartículas adsorventes, a PEI não difunde para o interior da rede da esfera, interagindo desta forma, apenas com os grupos carboxílicos presentes na superfície da esfera e, com isso, ocasionando o revestimento desejado.

A seguir, serão apresentados os resultados dos ensaios obtidos com as esferas revestidas com PEI referentes ao peso médio das esferas, a estabilidade frente aos meios digestivos simulados e perfil de adsorção *in vitro* do ciprofloxacino no meio intestinal.

2.3.2.1 Peso médio das esferas revestidas com PEI

Os pesos médios das esferas revestidas com diferentes concentrações PEI (0,05 a 1,20 %), contendo as micropartículas de CH-Fe(III) em diferentes proporções de micropartículas:pectina, estão apresentadas na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3: Peso médio (mg \pm SD) das esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Fe(III) em diferentes proporções, revestidas com concentrações crescentes de PEI.

Esferas de CH-Fe(III):Pec	Concentração de PEI (%)						
	0,05 %	0,10 %	0,15 %	0,30 %	0,60 %	0,90 %	1,20 %
5:3*	1,24 \pm 0,15	1,31 \pm 0,02	1,34 \pm 0,08	1,28 \pm 0,10	1,31 \pm 0,04	1,32 \pm 0,09	1,37 \pm 0,03
4:4*	1,79 \pm 0,08	1,72 \pm 0,09	1,81 \pm 0,07	1,79 \pm 0,02	1,84 \pm 0,09	1,84 \pm 0,02	1,81 \pm 0,21
5:5*	2,03 \pm 0,01	2,10 \pm 0,18	2,04 \pm 0,02	2,02 \pm 0,07	2,09 \pm 0,01	2,02 \pm 0,04	2,06 \pm 0,07
3:6*	2,04 \pm 0,07	2,06 \pm 0,06	2,12 \pm 0,16	2,01 \pm 0,09	2,05 \pm 0,03	2,04 \pm 0,02	2,02 \pm 0,03

* Proporção micropartícula:pectina.

Analisando os dados apresentados na **Tabela 2.3**, verifica-se que a variação na concentração de PEI não apresenta influência no peso médio das esferas, uma vez que com o aumento da concentração de 0,05 % para 1,20 % o peso médio, para todos os casos permaneceu praticamente constante.

Comparando os pesos médios apresentados na **Tabela 2.3** com os dados obtidos para as esferas não-revestidas (**Tabela 2.1**), observa-se que as esferas revestidas PEI apresentaram valores de pesos médios muito próximos, indicando com isso que o revestimento com a PEI não apresenta influência sob este parâmetro.

2.3.2.2 Estabilidade frente aos meios digestivos simulados

Para a determinação da estabilidade, as esferas revestidas com PEI foram incubadas nos meios digestivos simulados SGM, SIM e SCM a 37 °C e a sua desintegração foi acompanhada por observação macroscópica. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 2.4**.

Tabela 2.4: Estabilidade das esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH, revestidas com diferentes concentrações de PEI nos meios digestivos simulados: gástrico (SGM), intestinal (SIM) e colônico (SCM), incubadas a 37°C.

Meio digestivo	CH-Fe(III):Pec			
	5:3*	4:4*	5:5*	3:6*
PEI 0,05 %				
SGM	>1 h	>1 h	>1 h	>1 h
SIM**	>5 h	>5 h	>5 h	>5 h
SCM***	1 h	1 h	1 h 30 min	1 h 30 min
PEI 0,10 %				
SGM	>1 h	>1 h	>1 h	>1 h
SIM**	>5 h	>5 h	>5 h	>5 h
SCM***	1 h 30 min	2 h	2 h	2 h
PEI 0,15 %				
SGM	>1 h	>1 h	>1 h	>1 h
SIM**	>5 h	>5 h	>5 h	>5 h
SCM***	>3 h	>3 h	>3 h	>3 h
PEI 0,30 %				
SGM	>1 h	>1 h	>1 h	>1 h
SIM**	>5 h	>5 h	>5 h	>5 h
SCM***	>5 h	>5 h	>5 h	>5 h
PEI 0,60 %				
SGM	>1 h	>1 h	>1 h	>1 h
SIM**	>5 h	>5 h	>5 h	>5 h
SCM***	>8 h	>8 h	>8 h	>8 h
PEI 0,90 %				
SGM	>1 h	>1 h	>1 h	>1 h
SIM**	>5 h	>5 h	>5 h	>5 h
SCM***	>12 h	>12 h	>12 h	>12 h
PEI 1,20 %				
SGM	>1 h	>1 h	>1 h	>1 h
SIM**	>5 h	>5 h	>5 h	>5 h
SCM***	>24 h	>24 h	>24 h	>24 h

* Proporção micropartícula:pectina. ** Esferas transferidas após 1 h de incubação no SGM. *** Esferas transferidas após 1 h de incubação no SGM seguidas de 5 h no SIM.

Analisando os resultados apresentados na **Tabela 2.4**, verifica-se que todas as esferas, independente da proporção micropartícula:pectina e da concentração de PEI, apresentaram-se estáveis por 1 h no meio SGM e 5 h no SIM. Entretanto a estabilidade no SGM foi dependente da concentração utilizada do polímero de revestimento, sendo que quanto maior a concentração de PEI maior a estabilidade das esferas. Como pode ser observado a estabilidade das esferas revestidas com PEI foi crescente ordem de 1, 3, 5, 8, 12 e 24 h.

Considerando que o tempo de transito do ciprofloxacino no intestino é de 2 a 12 h (RAMON et al, 1996; RAMON et al., 2001), selecionou-se as esferas revestidas com 0,10 % de PEI para o estudo de adsorção *in vitro* do ciprofloxacino no SIM, pois as mesmas liberaram as micropartículas no SCM em aproximadamente 2 h após a incubação.

2.3.2.3 Adsorção *in vitro* do ciprofloxacino

O estudo da adsorção do ciprofloxacino pelas esferas revestidas com 0,10 % de PEI seguiu o mesmo protocolo aplicado no estudo das esferas sem revestimento descrito anteriormente, sendo incubadas por 5 h no SIM (pH 7,4; a 37°C). Os resultados da adsorção do ciprofloxacino pelas esferas de pectina contendo CH-Fe(III) em diferentes proporções micropartícula:pectina, revestidas com PEI (0,10 %) estão apresentados na **Figura 2.4**.

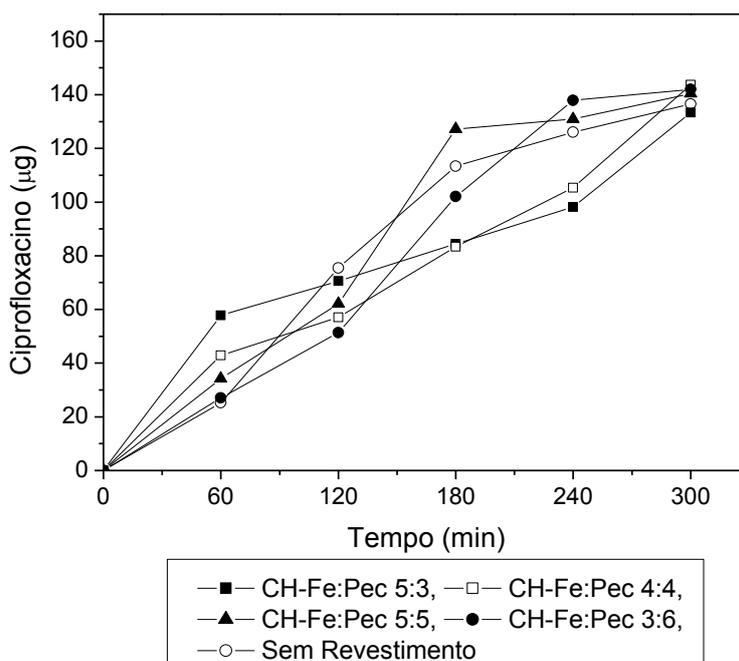


Figura 2.4: Adsorção do ciprofloxacino (μg) por esferas revestidas com PEI contendo micropartículas de CH-Fe(III) em diferentes proporções (5:3, 4:4, 5:5 e 3:6, p/p) no SIM (pH 7,4; a 37°C).

Analisando os dados apresentados na **Figura 2.4**, verifica-se que em média foram adsorvidos $140 \mu\text{g}$, correspondentes a 35 % da concentração inicial de ciprofloxacino presente no SIM. Esta porcentagem de adsorção foi praticamente a mesma para as esferas revestidas com 0,10 % de PEI e esferas não-revestidas. Com este dado evidencia-se que o revestimento com PEI (0,10 %) não preveniu a adsorção do ciprofloxacino presente no SIM, este fato pode ser resultante da formação de uma camada de revestimento porosa o suficiente para permitir a entrada do ciprofloxacino na rede da esfera e com isso ser adsorvido pelas micropartículas de CH-Fe(III). O não impedimento da adsorção do ciprofloxacino no SIM torna o sistema inviável para obtenção do objetivo proposto, como abordado anteriormente.

2.3.3 Esferas de pectina-micropartículas adsorventes revestidas com Eudragit®RS

O Eudragit® RS é um co-polímero do ácido acrílico e metacrílico com baixa concentração de grupos amônia quaternária. Este polímero foi escolhido como material de revestimento pois forma um filme de revestimento pH independente, é inerte às enzimas e secreções digestivas endógenas e proporciona uma liberação controlada (VERVOORT e KINGET, 1996). Somada a estas características, estudos anteriores (KHODER et al., 2009) demonstram que o filme de revestimento formado pelo Eudragit® RS em esferas de pectina-carvão ativo preveniram a adsorção do ciprofloxacino nas duas primeiras horas de incubação em meio intestinal simulado. Com isso, no presente estudo foi analisada a influência do revestimento com Eudragit® RS nas características físicas e na estabilidade das esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Fe(III), bem foi como determinada a eficácia do impedimento da adsorção do ciprofloxacino no meio intestinal e a adsorção do fármaco no meio colônico.

Serão apresentados a seguir os resultados da caracterização física, a estabilidade frente aos meios digestivos simulados, bem como o perfil de adsorção *in vitro* do ciprofloxacino nos meios intestinal e colônico pelas esferas de pectina contendo CH-Fe(III), revestidas com Eudragit® RS.

2.3.3.1 Caracterização física

As características físicas das esferas revestidas com Eudragit® RS, contendo as micropartículas de CH-Fe(III) e CH em diferentes proporções de micropartículas:pectina (p/p), estão apresentadas na **Tabela 2.5**.

Tabela 2.5: Características físicas das esferas revestidas com Eudragit® RS contendo diferentes proporções de pectina e micropartículas de CH-Fe(III) e CH na proporção 4:4 (p/p).

Esferas		Tamanho (mm±SD)	Peso (mg±SD)	CV(%)**
CH-Fe(III):Pec*	CH:Pec*			
5:3	-	1,28±0,07	1,78±0,20	11,0
4:4	-	1,26±0,01	2,29±0,07	3,0
5:5	-	1,36±0,03	2,47±0,17	7,0
3:6	-	1,37±0,02	2,32±0,10	4,0
-	4:4	1,75±0,11	2,26±0,14	6,0

* Proporção micropartícula:pectina. ** Coeficiente de variação do peso das esferas, calculado pela divisão do desvio padrão pelo peso médio.

Analisando os dados da **Tabela 2.5** verifica-se que as esferas revestidas com Eudragit® RS contendo CH-Fe(III) apresentam um diâmetro médio variando entre 1,28 e 1,37 mm, sendo este diâmetro de 1,75 mm para as esferas contendo CH. Comparando estes dados com os dados apresentados na **Tabela 2.1**, observa-se que as esferas revestidas apresentaram um aumento no diâmetro correspondente a 10; 9,5; 17 e 11 % (CH-Fe(III):Pec, proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6 (p/p), respectivamente).

O peso médio das esferas revestidas com Eudragit® RS foi 1,78; 2,29; 2,47 e 2,32 mg, correspondendo a um aumento de peso de 30, 20, 19 e 14 % quando comparadas com as esferas sem tal revestimento (**Tabela 2.1**), para CH-Fe(III):Pec (5:3, 4:4, 5:5 e 3:6 (p/p), respectivamente). Já para as esferas contendo CH (proporção 4:4, p/p), o peso médio foi 2,26 mg representando um ganho de 14 % no peso em relação às esferas sem revestimento. Comparando as diferentes porcentagens de aumento de peso das esferas revestidas verifica-se que o mesmo não foi regular, refletindo com isso a dificuldade encontrada no controle do processo de revestimento.

A **Figura 2.5** apresenta as imagens obtidas por MEV das superfícies externas das esferas revestidas e não-revestidas contendo as micropartículas de CH-Fe(III) e ainda um corte transversal de uma esfera revestida com Eudragit® RS.

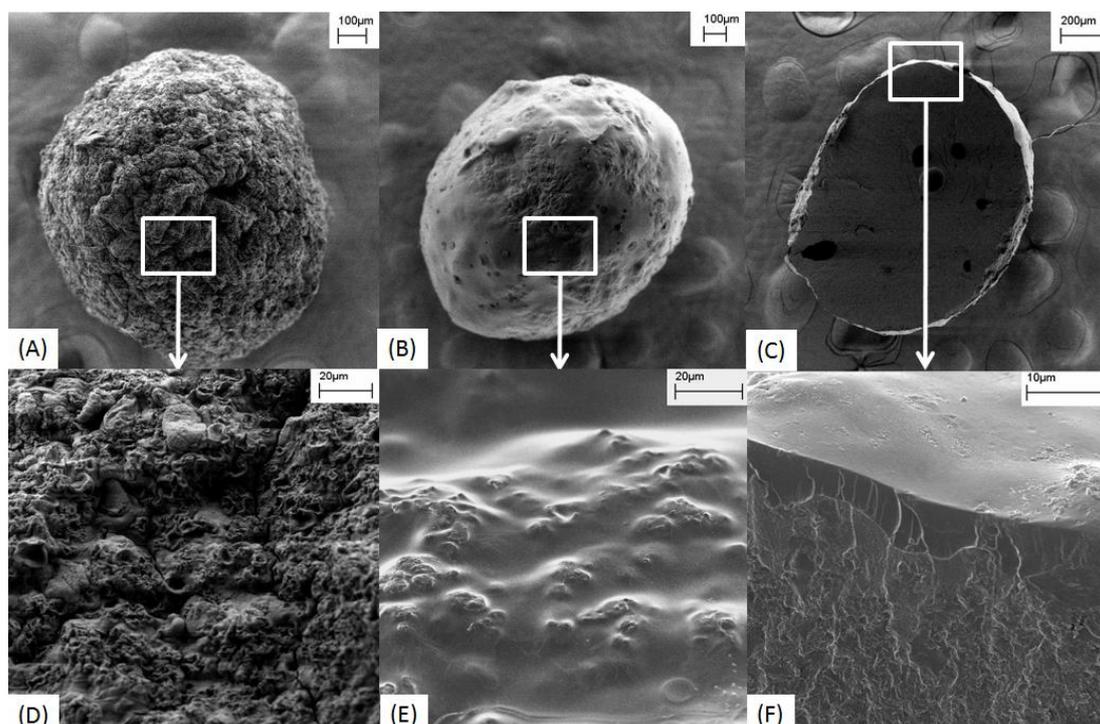


Figura 2.5: MEV das esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Fe(III), sem revestimento (A e D) e revestidas com Eudragit[®] RS: esfera inteira (B e E), e corte transversal (C e F).

Analisando as imagens verifica-se que enquanto as esferas sem revestimento apresentam uma superfície rugosa [Fig. 2.6 (A) e 2.6(D)] as esferas revestidas apresentam uma superfície lisa [Fig. 2.6 (B) e 2.6(E)] decorrente da camada de Eudragit[®] RS, a qual apresenta uma espessura da ordem de poucos micrômetros [Fig. 2.6(F)]. Através da imagem do corte transversal das esferas [Fig. 2.6(C)] pode-se dizer que as micropartículas de CH-Fe(III) estão homogeneamente distribuídas na matriz de pectina.

2.3.3.2 Intumescimento

O ensaio de intumescimento para as esferas revestidas com Eudragit[®] RS obedeceu exatamente o mesmo protocolo seguido para o estudo do intumescimento das esferas sem revestimento e revestidas com PEI, sendo determinado gravimetricamente em diferentes intervalos de tempo no SIM (pH 7,4) a 37 °C. As porcentagens de intumescimento das esferas revestidas com Eudragit[®] RS contendo

micropartículas de CH-Fe(III), nas proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6 (p/p) e CH na proporção 4:4 estão representadas na **Figura 2.7**.

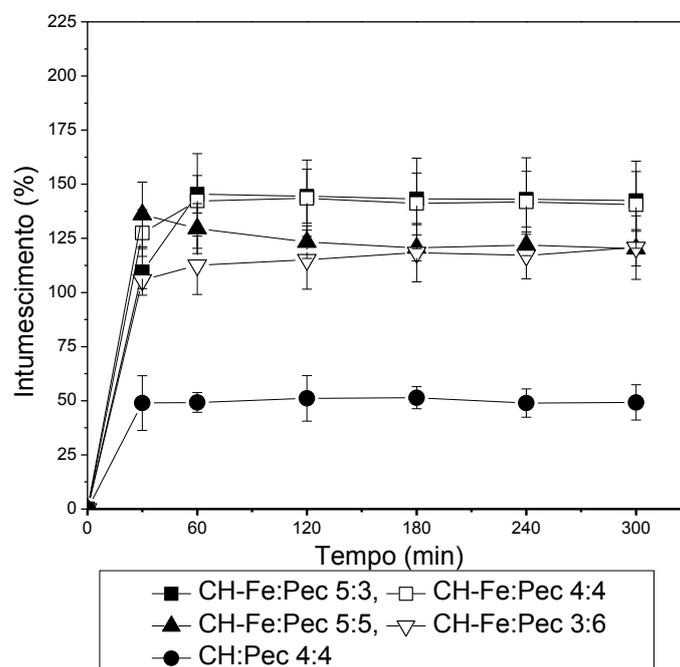


Figura 2.6: Intumescimento das esferas revestidas com Eudragit® RS contendo micropartículas de CH-Fe(III) (proporções 5:3, 4:4, 5:5 e 3:6, p/p) e CH (proporção 4:4, p/p), no SIM (pH = 7,4; a 37°C).

Analisando a **Figura 2.6** observa-se que as esferas revestidas com Eudragit® RS intumescem rapidamente até atingir um estado de equilíbrio a 60 min, o mesmo relatado para as esferas sem o revestimento. A porcentagem de intumescimento foi de 49 % para as esferas revestidas com Eudragit® RS contendo micropartículas CH (4:4, p/p), enquanto que esta porcentagem foi de 120 % para as esferas contendo CH-Fe(III). Ao comparar estes resultados com aqueles obtidos para as esferas não-revestidas (**Figura 2.2**), verifica-se que o revestimento das esferas com o Eudragit® RS proporcionou uma redução no intumescimento de 46 e 40 % (esferas contendo CH e CH-Fe(III), respectivamente). O fato de reduzir o intumescimento e não impedi-lo completamente pode ser explicada pelas propriedades do Eudragit® RS. Este é um produto de polimerização do ácido de éster acrílico contendo grupos de amônio quaternário, sendo insolúvel em água e nos meios digestivos; entretanto, ele é permeável. A permeabilidade do Eudragit® RS é independente do pH do trato

digestivo (GOTO et al., 1986), uma vez ele sendo permeável, o meio entra na rede da esfera ocasionando o seu intumescimento.

2.3.3.3 Estabilidade frente aos meios digestivos simulados

As esferas revestidas com o Eudragit® RS apresentaram exatamente a mesma estabilidade das esferas não-revestidas, demonstrada na **Tabela 2.2**, ou seja, permaneceram intactas por no mínimo 1 h no SGM, seguidas de 5 h no SIM. Por sua vez, no SCM o tempo de desintegração foi de 1h 15 min; 1h 30 min; 1h 40 min e 2 h para as esferas revestidas de CH-Fe(III):Pec nas proporções 5:3; 4:4; 5:4 e 3:6 (p/p) e de 2 h para as esferas CH:Pec 4:4 (p/p).

As **Figuras 2.7** e **2.8** apresentam as imagens obtidas com auxílio de microscópio ótico, durante a determinação da estabilidade das esferas contendo as micropartículas de CH-Fe(III) (proporção 4:4, p/p), incubadas no meio SIM e no SCM, respectivamente. As imagens foram obtidas com auxílio de microscópio ótico (Leitz Diaplan, França)

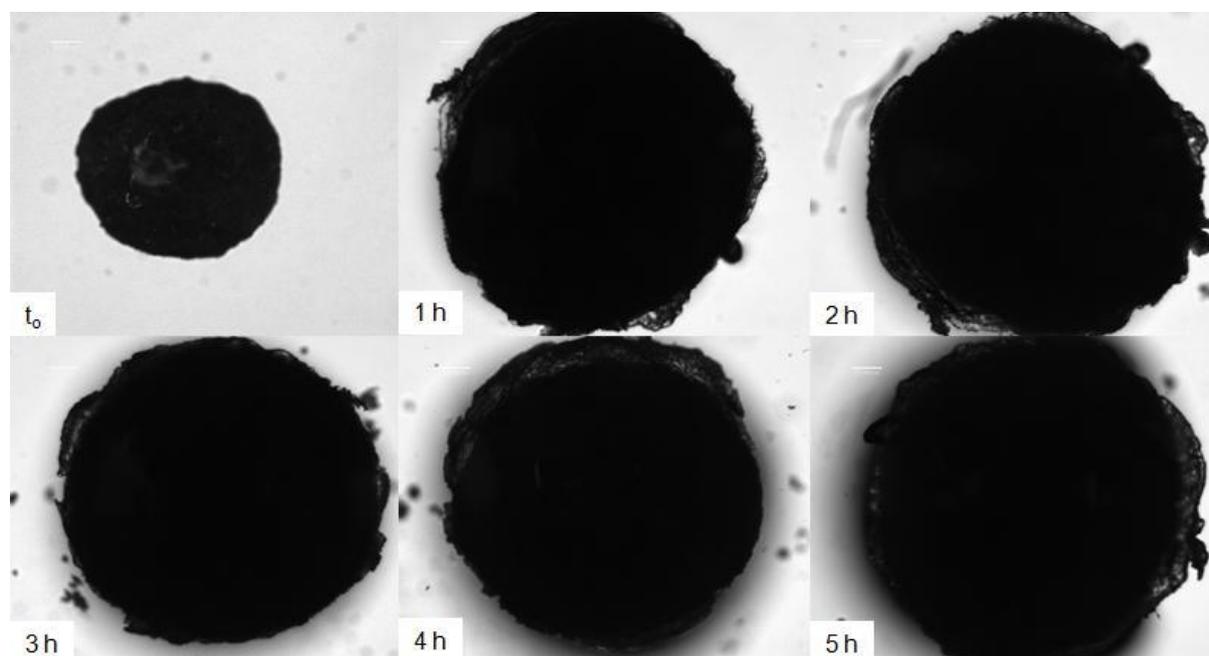


Figura 2.7: Estabilidade das esferas de pectina revestidas com o Eudragit® RS contendo CH-Fe(III) (4 :4, p/p) incubadas por 5h no SIM (pH = 7,4; a 37 °C).

Analisando as imagens apresentadas na **Figura 2.7** verifica-se que as esferas permaneceram estáveis durante as 5h incubadas no SIM (pH = 7,4; a 37 °C). Pode-se evidenciar que não ocorreu a desintegração das esferas, entretanto, devido as características de permeabilidade do Eudragit® RS, como abordado anteriormente, as esferas intumesceram.

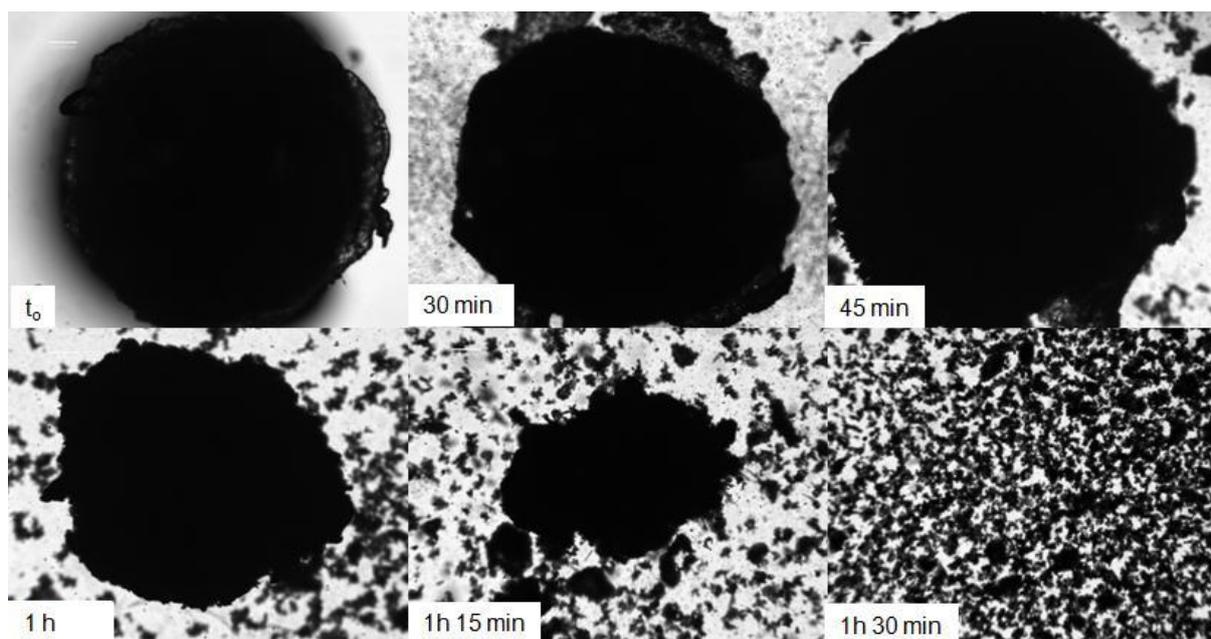


Figura 2.8: Estabilidade das esferas de pectina revestidas com o Eudragit® RS contendo CH-Fe(III) (4 :4, p/p) incubadas no SCM (pH = 6,5; a 37 °C).

Após 5h de incubação no SIM, o meio foi removido e as esferas foram incubadas no SCM (pH = 6,5; a 37 °C), onde permaneceram até completa desintegração. Analisando as imagens obtidas (**Figura 2.8**) durante a incubação no SCM verifica-se que a camada de revestimento de Eudragit® RS é removida nos 30 min iniciais de incubação. Observa-se que a desintegração das esferas começou após 45 min do início do tempo de contato, sendo esta desintegração decorrente da ação das pectinases (\cong a 5200 PG/mL), presentes no meio. A completa desintegração das esferas foi observada após 1h 30 min. de incubação.

Através dos resultados de estabilidades obtidos para as esferas revestidas com Eudragit® RS, evidencia-se que o revestimento não apresentou influência no

tempo de desintegração das esferas no meio colônico, uma vez que, como abordado acima, os tempos de desintegração foram exatamente os mesmo obtidos para as esferas sem o revestimento com o Eudragit® RS.

2.3.3.4 Adsorção *in vitro* do ciprofloxacino

O estudo da adsorção do ciprofloxacino pelas esferas revestidas com o Eudragit® RS seguiu o mesmo protocolo aplicado no estudo das esferas sem tal revestimento, descrito anteriormente. Primeiramente as esferas foram incubadas por 5h no SIM, seguidas de incubação no SCM por mais 5h. Novamente foram utilizadas as esferas contendo micropartículas de CH como sistema-controle.

Os perfis de adsorção do ciprofloxacino no meio intestinal (pH 7,4 a 37 °C) pelas esferas revestidas com Eudragit® RS contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH estão apresentados na **Figura 2.9**.

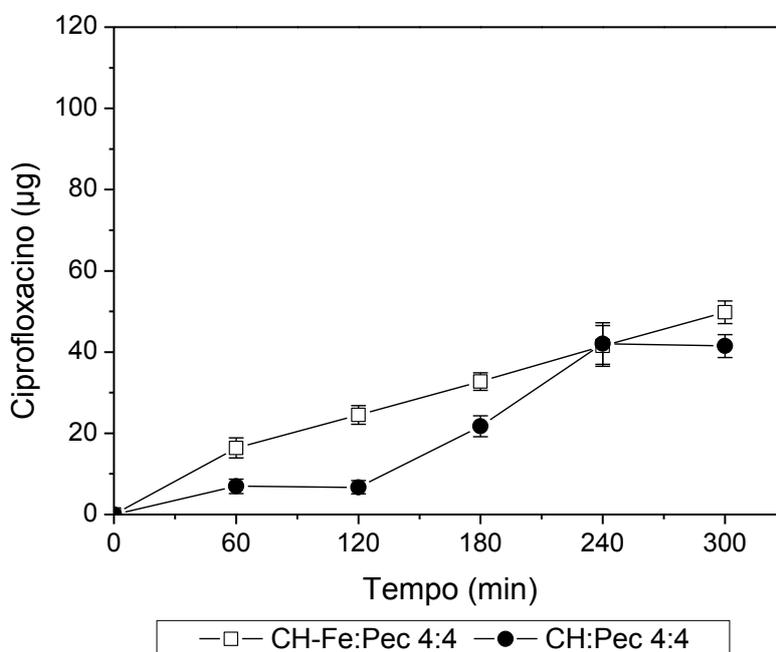


Figura 2.9: Adsorção do ciprofloxacino (µg) por esferas revestidas com Eudragit® RS contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH no SIM (pH 7,4; a 37°C).

Analisando os dados apresentados na **Figura 2.9** e comparando os mesmos com os resultados obtidos para as esferas não-revestidas (**Figura 2.3**), verifica-se que após as 5 h de incubação, o filme de Eudragit[®] RS presente nas esferas contendo CH-Fe(III), proporcionou uma redução de aproximadamente 54 % da adsorção do ciprofloxacino. A adsorção nos 120 min iniciais foi de 24 µg e 7 µg, para as esferas de CH-Fe(III) e CH, respectivamente, correspondendo a aproximadamente 6 e 2 % da concentração inicial de ciprofloxacino. Normalmente a absorção do ciprofloxacino no organismo ocorre em média 90 min após administração oral, ocorrendo principalmente no duodeno com uma considerável diminuição de absorção no jejuno (HARDER, et al., 1990; CRUMP et al., 2983). Com base nestes dados de literatura sobre a farmacocinética do ciprofloxacino, sugere-se que os 6 % de adsorção após 120 min de tempo de contato entre o ciprofloxacino no meio intestinal e as esferas, não representaria uma alteração significativa na biodisponibilidade do fármaco. Entretanto, estes dados foram obtidos com ensaios *in vitro*, com isso, para realmente confirmar a não alteração da biodisponibilidade do ciprofloxacino, necessita-se realizar ensaios *in vivo*.

Após a incubação no SIM por 300 min, as esferas não-revestidas e revestidas (correspondendo a aproximadamente 1 mg de CH-Fe(III) e CH), foram transferidas para o SCM (1 mL; pH 6,5), contendo 400 µg/mL de ciprofloxacino. O estudo da adsorção foi conduzido por mais 300 min a 37 °C. A **Figura 2.10** apresenta o perfil de adsorção do ciprofloxacino das esferas não-revestidas [**Fig. 2.10(A)**] e revestidas com Eudragit[®] RS [**Fig. 2.10(B)**] contendo as micropartículas de CH-Fe(III) e CH incubadas no SCM. O estudo foi conduzido com as esferas não-revestidas de CH-Fe(III) e CH com o intuito de verificar a influência do revestimento na adsorção do ciprofloxacino a nível colônico.

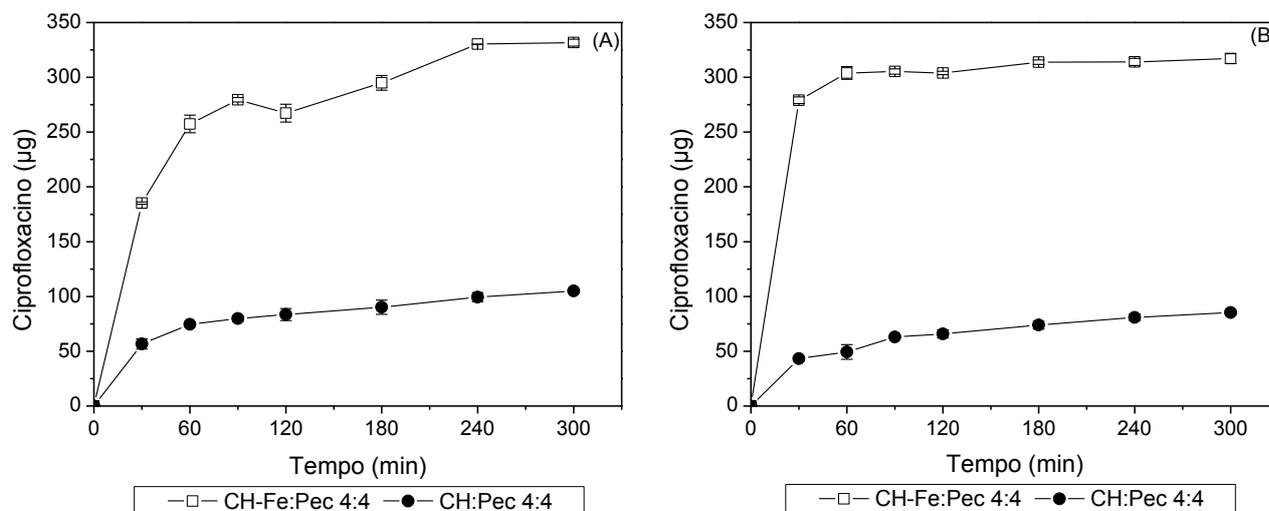


Figura 2.10: Adsorção do ciprofloxacino (μg) por esferas não-revestidas (A) e revestidas com Eudragit[®] RS (B) contendo micropartículas de CH-Fe(III) e CH no SCM (pH 6,5; a 37°C).

Através dos resultados apresentados constata-se que a adsorção do ciprofloxacino foi de aproximadamente 330 μg e de 100 μg para as esferas não-revestidas contendo CH-Fe(III) e CH, respectivamente, correspondendo a 83 e 25 % da concentração inicial de ciprofloxacino. Para as esferas revestidas com Eudragit[®] RS a adsorção foi de aproximadamente 320 μg e 80 μg para CH-Fe(III) e CH, respectivamente, o que corresponde a 80 e 20 % da concentração inicial de ciprofloxacino.

O revestimento com o Eudragit[®] RS produziu uma pequena redução na concentração total de ciprofloxacino adsorvido (aproximadamente 10 a 20 μg). De acordo com a análise da variância (ANOVA) destes dados, verifica-se que, para as esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III) a diferença na capacidade de adsorção não foi significativa ($F_{\text{tabelados}} = 5,98 > F_{\text{calculado}} 3,63$; $p < 0,05$), por outro lado para as esferas contendo micropartículas de CH a diferença na adsorção é significativa ($F_{\text{tabelados}} = 5,98 < F_{\text{calculado}} 177,18$; $p < 0,05$).

A capacidade de adsorção do ciprofloxacino pelas esferas revestidas com Eudragit[®] RS contendo CH-Fe(III) não apresentam diferenças significativas ($F_{\text{tabelados}}$

= 5,98 > $F_{\text{calculado}}$ 2,87; $p < 0,05$), quando comparada com a capacidade de adsorção das micropartículas não-encapsuladas pela matriz de pectina (dados apresentado no Capítulo I). Com isso pode-se concluir que o encapsulamento com a matriz de pectina não apresenta influência na capacidade de adsorção das micropartículas de CH-Fe(III).

Comparando as capacidades de adsorção do ciprofloxacino pelas esferas contendo CH-Fe(III) e CH (**Figura 2.10**) evidencia-se um perfil de adsorção completamente diferente, onde as micropartículas com Fe(III) apresentaram uma capacidade de adsorção 26 % superior em relação as micropartículas sem o metal. Como abordado no Capítulo I, as quinolonas são capazes de formar complexos estáveis com íons metálicos, como o Fe(III). De acordo com dados da literatura (TUREL et al., 1996) a complexação entre o ciprofloxacino e os íons metálicos é dependente, dentre outros fatores, do pH do meio, sendo que valores entre 3,0 e 7,0 são excelentes para a formação de complexo ciprofloxacino:metal. Como o pH do meio colônico simulado utilizado neste estudo foi 6,5; foi possível a formação do complexo ciprofloxacino:micropartícula de CH-Fe(III), complexo este evidenciado boa capacidade de adsorção do ciprofloxacino pelas esferas contendo micropartículas de CH-Fe(III).

Com os dados obtidos neste capítulo, pode-se concluir que o sistema de liberação colônica baseado em micropartículas de CH-Fe(III), encapsuladas por uma matriz de pectina sendo esta revestida com Eudragit[®] RS, apresenta eficácia na adsorção *in vitro* do ciprofloxacino.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho objetivou desenvolver um complexo biopolímero-íon metálico matricial microparticulado, composto de quitosana e íons metálicos, para a extração de antimicrobianos residuais presentes no cólon, a fim de eliminá-los localmente e reduzir seus efeitos secundários. Para garantir uma liberação cólon-específica, as micropartículas de quitosana-metal foram encapsuladas por uma matriz de pectina.

A etapa inicial do trabalho foi a obtenção de micropartículas de quitosana tendo os íons Fe(II), Fe(III) e Zn(II) imobilizados à sua estrutura. As micropartículas desenvolvidas, através da técnica de secagem por aspersão, com posterior reticulação com glutaraldeído. As micropartículas foram caracterizadas quanto ao grau de desacetilação, quantificação dos íons metálicos, morfologia, tamanho de partícula e distribuição granulométrica. A reticulação das micropartículas mostrou influenciar o tamanho e a distribuição granulométrica e não apresentou influência na morfologia das micropartículas. Através da determinação da capacidade de adsorção do ciprofloxacino, conduzido *in vitro*, verificou-se que as micropartículas de quitosana-Fe(III) e quitosana-Zn(II) apresentam efetividade de adsorção do fármaco em estudo, uma vez que antimicrobianos derivados da quinolona formam complexos estáveis com íons metálicos. As micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II) apresentaram seletividade de adsorção para o ciprofloxacino frente ao anti-inflamatório nimesulida.

Os dados de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas foram matematicamente ajustados para isotermas de Langmuir e Freundlich, sendo que os dados apresentaram um melhor ajuste para a isoterma de Freundlich, desta forma indicando que a adsorção ocorre em sítios de ligação heterogêneos com distribuição não uniforme, podendo ocorrer mais de uma camada.

Através da análise de modelos de cinética de adsorção de *pesudo-primeira-ordem* e *pseudo-segunda-ordem*, verificou-se que os dados melhor se ajustaram ao modelo de *pseudo-segunda-ordem*, indicando com isso que o mecanismo de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas é através de reação química, ou seja, quimissorção.

A etapa seguinte foi o desenvolvimento de uma matriz sólida para a adsorção de antimicrobianos residuais presentes no cólon. Para isso as micropartículas de quitosana-Fe(III) e quitosana-Zn(II) reticuladas foram encapsuladas em uma matriz de pectina. A formação de uma forte interação entre as micropartículas de

quitosana-Zn(II) e a pectina impossibilitou o encapsulamento de uma quantidade eficaz de micropartículas de quitosana-Zn(II), logo este sistema foi descartado.

Esferas de pectina-micropartículas contendo micropartículas de quitosana-Fe(III) foram caracterizadas quanto ao diâmetro, morfologia, intumescimento e estabilidade frente a meios digestivos simulados. O estudo de adsorção, *in vitro*, do ciprofloxacino no meio intestinal simulado, demonstrou a necessidade de revestimento das esferas. Esferas de pectina contendo micropartículas de quitosana-Fe(III) revestidas com Eudragit[®] RS, demonstraram-se promissoras como matrizes cólon-específicas para a extração do ciprofloxacino presente no meio colônico simulado.

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Micropartículas de quitosana-metal preparadas pela técnica de secagem por aspersão apresentam uma forma esférica colapsada com superfície rugosa;
- A reticulação com glutaraldeído influencia no tamanho das micropartículas, sem apresentar influências na morfologia externa;
- Micropartículas de CH-Fe(III) e CH-Zn(II) são efetivas e seletivas para a adsorção do ciprofloxacino;
- A adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas desenvolvidas apresentou um melhor ajuste para a isoterma de Freundlich, desta forma indicando que a adsorção ocorre em sítios de ligação heterogêneos com distribuição não uniforme, podendo ocorrer mais de uma camada;
- O modelo de cinética de adsorção do sistema obedece a um modelo de cinética de *pseudo-segunda-ordem*, indicando com isso que o mecanismo de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas é através quimissorção;
- A encapsulação com uma matriz de pectina não apresenta influência na capacidade de adsorção do ciprofloxacino pelas micropartículas de CH-Fe(III)
- Esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Fe(III) são apresentadas com efetividade *in vitro*, para extração presente em meio colônico simulado.

Como perspectivas para a continuação do trabalho propõem-se:

- Realização de espectroscopia de Mössbauer com o objetivo de determinar o estado de oxidação e o número de coordenação dos íons Fe nas micropartículas;
- Determinação da capacidade de adsorção e do ciprofloxacino pelas esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Fe(III) em estudos *in vivo*;
- Verificar a influência das esferas de pectina contendo micropartículas de CH-Fe(III) sob a biodisponibilidade do ciprofloxacino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHAK, M.; HAFIDI, A.; OUAZZANI, N.; SAYADI, S.; MANDI, L. Low cost biosorbent "banana peel" for the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater: kinetic and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, p. 117-125, 2009.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on Chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 100, p. 5-28, 2004.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 997-1026, 2005.
- AKSU, Z.; TUNÇ, O. Application of biosorption for penicillin G removal: comparison with activated carbon. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 831-847, 2005.
- AMERI, M e MAA, Y. F. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. *Drying Technology*, v. 24, p. 763-768, 2006.
- ANDERSON, A. D.; NELSON, J. M.; ROSSITER, S.; ANGULO, F.J. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microbial Drug Resistance*, v. 9, p. 373-379, 2003
- ANDREMONT, A. Conséquences de l'antibiothérapie sur l'écosystème intestinal. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, v. 19, p. 395-402, 2000.
- APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and futura perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16, p. 5-15, 2000.
- BABA, Y.; HIRAKAWA, H. Selective adsorption of palladium(II), platinum(IV), and mercury(II) on a new chitosan derivative possessing pyridyl group. *Chemistry Letters*, p. 1905-1908, 1992.
- BARAS, B; BENOIT, M. A.; GILLARD, J. Influence of various technological parameters on the preparation of spray-dried poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing a model antigen. *Journal of Microencapsulation*, v. 17, p. 485-498, 2000.
- BARBOSA, T. M e LEVY, S. B. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, v. 3, p. 303-311, 2000.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v.194, p. 1-13, 2000.
- BERQUÓ, L.S., BARROS, A. J. D.; LIMA, R. C.; BERTOLDI, A. D. Utilização de antimicrobianos em uma população urbana. *Revista de Saúde Pública*, v. 38, p. 239-246, 2004.
- BOURGEOIS, S., LAHAM, A., BESNARD, M., ANDREMONT, A., FATTAL, E. *In vitro* and *in vivo* evaluation of pectin beads for colon delivery of β -lactamases. *Journal of Drug Targeting*, v. 13, p. 277-284, 2005.

- BOURGEOIS, S., TSAPIS, N., HONNAS, H., ANDREMONT, A., SHAKWEH, M., BESNARD, M., FATTAL, E. Colonic delivery of β -lactamases does not affect amoxicillin pharmacokinetics in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97 p. 1853-1863, 2008.
- BOURGEOIS, S.; GERNET, M.; PRADEAU, D.; ANDREMONT, A.; FATTAL, E. Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β -lactamases entrapped in pectin beads. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 324, p.2-9, 2006.
- BROUSSIGNAC, P. Un haut polymère naturel peu connu dans l'industrie : Le chitosan. *Chimie et Industrie : Génie Chimique*, v. 99, p. 1241-1247, 1968.
- BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, v. 42, p. 3569-3580, 2001.
- BÜRGER, C.; VALCARENCHI, D.; SANDRI, S.; RODRIGUES, C.A. Cross-linking chitosan-Fe(III), oral phosphate binder: studies *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 223, p. 29-33, 2001.
- BURKE, A.; YILMAZ, E.; HASIRCI, N.; YILMAZ, O. Iron(III) ion removal from solution through adsorption on chitosan. *Journal Applied Polymer Science*, v.84, p. 1185-1192, 2002.
- CANTANHEDE, L. B.; LIMA, J. B.; LOPES, G. S.; FARIAS, R. F.; BEZERRA, C. W. B. Uso de sílica-titânica organofuncionalizadas para a remoção de Cu(II) em aguardentes. *Ciências e Tecnologias de Alimentos*, v. 25, p. 500-505, 2005.
- CEVHER, E.; ORHAN, Z.; MÜLAZIMOGLU, L.; SENSOY, D.; ALPER, M.; YILDIZ, A.; ÖZSOY, Y. Characterization of biodegradable Chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 317, p. 127-135, 2006.
- CHAMBIN, O.; DUPUIS, G.; CHAMPION, D.; VOILLEY, A.; POURCELOT, Y. Colon-specific drug delivery: influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 321, p. 86-93, 2006.
- COLLETT, J.; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, E. M. Delineamento de formas farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- CORTHIÉ, G. Intestinal flora and health: which challenges? *Nutrition Clinique et Métabolisme*, v. 21, p. 76-80, 2007.
- CRUMP, B.; WISE, R.; DENT, J. Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 24, p. 784-786, 1983.
- DENKBAS, E.B.; OTTENBRITE, R.M. Perspectives on: chitosan drug delivery systems based on their geometries. *Journal Bioactive and Compatible Polymers*, v. 21, p. 351-368, 2004.

- DESAI, M. P.; LABHASETWAR, V.; AMIDON, G. L.; LEVY, R. J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharmaceutical Research*, v. 13, n. 12, p. 1838-1845, 1996.
- DODANE, V.; VILIVALAN, V.D. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 1, p. 246-253, 1998.
- DUCLUZEAU. R.; LADIRE, M.; CALLUT, C.; RAIBAUD, P.; ABRAMS, G.D. Antagonistic effects of extremely oxygen-sensitive clostridia from the microflora of conventional mice and of *Escherichia coli* against *Shigella flexneri* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Infection and Immunity*, v. 17, p. 415-424, 1997.
- FAGUNDES, T.; BERNARDI, E. L.; RODRIGUES, C. A. Phosphate adsorption on chitosan-Fe(III)-crosslinking: batch and column studies. *Journal of Chromatography & Related. Technology*, v.24, p. 1189-1198, 2001.
- FAGUNDES, T.; COELHO, E. C.; SANTOS, K. F. S.; RODRIGUES, C. A. Chitosan-iron(III)-crosslinking (CH-Fe(III)-CL) for pré-concentration of phosphate in simulated seawater. *Journal of Chromatography & Related. Technology*, v.25, p. 1085-1092, 2002.
- FALK, P.G., HOOPER, L.V., MIDTVEDT, T., GORDON, J.I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 1157-1170, 1998.
- FREIBERG, S.; ZHU, X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 282, p. 1-18, 2004.
- FREIRE, A. C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II - Tipos de sistemas utilizados. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 337-355, 2006.
- FRETER, R., BRICKNER, H., BOTNEY, M., CLEVEN, D., ARANKI, A. Mechanisms that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infect Immun.*, v. 39, p. 676-685, 1983.
- FU, Y. J.; MI, F. L.; WONG, T. B.; SHYU, S. S. Characteristic and controlled release of anticancer drug loaded poly (*D,L*-lactide) microparticles prepared by spray drying technique. *Journal of Microencapsulation*, v. 18, p. 733-747, 2001.
- GANZA-GONZALEZ, A.; ANGUIANO-IGEA, S.; OTERO-ESPINAR, F. J.; MENDEZ, J. B. Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 48, p. 149-155, 1999.
- GENTA, I.; COSTANTINI, M.; ASTI, A.; CONTI, B.; MONTANARI, L. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v. 36, p. 81-88, 1998.

GILLESPIE, S. H.; KENNEDY, N. Les fluoroquinolones: un nouveau traitement pour la tuberculose ? *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 2, p. 265-271, 1998.

GIUNCHEDI, P.; JULIANO, C.; GAVINI, E.; COSSU, M.; SORRENTI, M. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine bucal tablets prepared using drug-loaded Chitosan microspheres. *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics*, v. 53, p. 233-239, 2002.

GONÇALVES, V. L.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C. Effect crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros*, v. 15, p.6-12, 2005.

GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 2005.

GOTO, S., KAWATA, M., NAKAMURA, M., MAEKAWA, K., AOYAMA, T. Eudragit RS and RL (acrylic resins) microcapsule as pH insensitive and sustained release preparations of ketoprofen. *Journal of Microencapsulation*, v. 3, p. 293-304, 1986.

GRATTARD, N.; PERNIN, M.; MARTY, B.; ROUDAUT, G.; CHAMPION, D.; LE MESTE, A. Study of release kinetics of small and high molecular weight substances dispersed into spray-dried ethylcellulose microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 84, p. 125-135, 2002.

GU, C.; KARTHIKEYAN, K. G. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides. *Environmental Science & Technology*, v. 39, p. 9166-9173, 2005.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology*, v. 38, p. 43-74, 2004.

GUPTA, K.C.; JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 43-54, 2006a.

GUPTA, K.C.; JABRAIL, F.H. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked Chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 744-756, 2006b.

HARDER, S.; FUHR, U.; BEERMANN, D.; STAIB, A.H. Ciprofloxacin adsorption in different regions of the human gastrointestinal tract. Investigation with the hf-capsule. *British Journal of clinical Pharmacology*, v.30, p. 35-39, 1990.

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

HO, Y. S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 451-465, 1999.

- HUANG, Y.C.; YEH, M. K. ;CHENG, S.N. ; CHIANG, C. H. ; The characteristics of betamethasone-loaded chitosan microparticles by spray-drying method. *Journal of Microencapsulation*, v. 20, p.459-472, 2003.
- INOUE, K.; HIRAKAWA, H.; ISHIKAWA, Y. Adsorption of metal ions on gallium(III)-templated oxine type of chemically modified chitosan. *Separation Science and Technology*, v.31, p. 2273-2285, 1996.
- KHODER, M.; TSAPIS, N.; HUGUET, H.; BESNARD, M.; GUEUTIN, C.; FATTAL, E. Removal of ciprofloxacin in simulated digestive media by activated charcoal entrapped within zinc-pectinate beads. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 379, p. 251-259, 2009.
- KIMURA, I. Y.; GONÇALVES, A. C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 9, p. 51-57, 1999.
- KLUG, M.; SANCHES, M. N. M.; LARANJEIRA, C. M. Análise das isotermas de adsorção de Cu(II), Co(II), Ni(II) e Zn(II) pela N- (3,4-dhb)quitosana empregando o método de regressão não linear. *Química Nova*, v. 21, p. 410-413, 1998.
- KMETEC, V.; KOZJEK, F.; VEBER, M. Chromatographic and permeation analysis of ciprofloxacin metal complexes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 176, p. 225-230, 1999.
- 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. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 249, p. 165-174, 2002.
- KOFUJI, K.; QIAN, C. J.; NISHIMURA, M.; SUGIYAMA, I.; MURATA, Y.; KAWASHIMA, S. Relationship between physicochemical characteristics and functional properties of chitosan. *European Polymer Journal*, v. 41, p. 2784-2791, 2005.
- KOYAMA, Y.; TANIGUCHI, A. Studies on chitin. X: Homogeneous cross-linking of chitosan for enhanced cupric ion adsorption. *Journal Applied Polymer Science*, v. 31, 1951-1954, 1986.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and Chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 126-139, 2004.
- KUMAR, G.; BRISTOW, J. F.; SMITH, P. J.; PAYNE, G. F. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer*, v. 41, p. 2157-2169, 2000.
- LIMA, I. S.; AIROLDI, C. A thermodynamic investigation on chitosan-divalent cation interactions. *Thermochimica Acta*, v. 421, p. 133-139, 2004.
- LORENZO-LAMOS, M. L.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Design of microencapsulated of sodium diclofenac in colon-specific delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 238, p. 51-59, 2002.

- MA, H. .H. M.; CHIU, F. C. K.; LI, R. C. Mechanistic investigation of the reduction in antimicrobial activity of ciprofloxacin by metal cations. *Pharmaceutical Research*, v. 14, p. 366-370, 1997.
- MACLEOD G. S., COLLET, J. H., FELL, J. T. The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p. 303-310, 1999.
- MALINOWSKA, I.; RÓZYLO, J.K. Separation of optical isomers of amino acids on modified chitin and chitosan layers. *Biomedical Chromatography*, v. 11, p. 272-275, 1997.
- MONTEIRO, O. A. C; AIROLDI, C. The influence of chitosan with defined degrees of acetylation on the thermodynamic data for copper coordination. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 282, p. 32-37, 2005.
- MUZZARELLI, R. A.; ROCCHETTI, R. The use of chitosan columns for the removal of mercury from waters. *Journal of Chromatography*, v. 96, p. 115-121, 1974.
- NGAH, W. S. W.; GHANI, S. A.; KAMARI, A. Adsorption behavior of Fe(II) and Fe(III) ions in aqueous solution of chitosan and cross-linked chitosan beads. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 443-450, 2005.
- OLIVEIRA, B. F.; SANTANA, M. H. A.; RÉ, M. I. Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with *D,L*-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, p. 353-360, 2005.
- PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; PENICHE, H., ACOSTA, N. Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*, v. 3, p. 511-520, 2003.
- PYENSON, H.; TRACY, P. H. A 1,10-phenantroline method for the determination of iron in powdered milk. *Journal of Dairy Science*, v. 28, p. 401-412, 1945.
- RAMON, J.; BEN-HAIM, M.; SHABTAI, M.; RUBINSTEIN, E. Transepithelial intestinal excretion of ciprofloxacin in humans. *Clinical Infectious Diseases*, v. 32, p. 822-823, 2001.
- RAMON, J.; DAUTREY, S.; FARINOTI, R.; CARBON, C.; RUBINSTEIN, E. Intestinal elimination of ciprofloxacin in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 38, p. 757-760, 1994.
- RAMON, J.; DAUTREY, S.; FARINOTI, R.; CARBON, C.; RUBINSTEIN, E. Excretion of ciprofloxacin into the large bowel of the rabbit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 40, p. 11-13, 1996.
- RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27, 2000a
- RAVI KUMAR, M. N. V.. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, v. 3, p. 234-258, 2000b

- RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, v. 57, p. 929-967, 2001.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress Polymer Science*, v. 31, p. 603-632, 2006.
- RODRIGUES, C. A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; STADLER, E. Interaction of Cu(II) on N-(2-pyridylmethyl) and N-(4-pyridylmethyl) chitosan. *Polymer*, v. 39, p. 5121-5126, 1998b.
- RODRIGUES, C. A.; OLIVEIRA, A. E.; WILLAIN, F. R. CECHINEL-FILHO, V.; GUIMARÃES, C. L.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Separation of biflavonoids from *Rheedia gardneriana* using chitin-Fe complex as stationary phase. *Pharmazie*, v. 55, p. 699-700, 2000.
- RODRIGUES, C. A.; REYNAUD, F.; STADLER, E.; DRAGO, V. Preparation, characterization, and chromatography properties of chitin modified with FeCl₃. *Journal of Chromatography & Related. Technology*, v. 22, p. 761-769, 1999.
- RODRIGUES, C. A.; SAVI, A. O. S.; REYNAUD, F.; SCHLEMPER, V.; CECHINEL-FILHO, V. An improved extraction of Marrubiim from *Marrubium vulgare*. *Chromatographia*, v. 47, p. 449-450, 1998a.
- SABNIS, S.; BLOCK, L.H. Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems. Molecular modifications. *Biological Macromolecules*, v. 27, p. 181-186, 2000.
- SADEEK, S. A. Synthesis, thermogravimetric analysis, infrared, electronic and mass spectra of Mn(II), Co(II) and Fe(III) norfloxacin complexes. *Journal of Molecular Structure*, v. 753, p. 1-12, 2005.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v.26, p. 725-737, 2003.
- SHI, X. Y; TAN, T. W. Preparation of Chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D₂. *Biomaterials*, v. 23, p. 4469-4473, 2002.
- SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p. 1-33, 2004.
- SOUSSY, C. J. Quinolones et fluoroquinolones dans l'univers bactérien. *Médecine et Maladies Infectieuses*, v. 31, p. 626-631, 2001.
- SOUZA, M. V. N. ; ALMEIDA, M. V.; SILVA, A. D.; COURI, M. R. C. Ciprofloxacina, uma importante fluorquinolona no combate ao antraz. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica*, v. 85, p. 13-18, 2004.

- SRIAMORNSAK, P.; NUNTHANID, J. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 160, p. 207-212, 1998.
- SUN, S.; WANG, A. Adsorption properties and mechanism of cross-linked carboxymethyl-chitosan resin with Zn(II) as template ion. *Reactive and Functional Polymers*, v. 66, p. 819-826, 2006.
- TAKANORI, S.; KEISUKE, K.; YOSHIO, I. Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. *Die Makromology Chemistry*, v. 177, p. 3589-3600, 1976.
- TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p.1583-1594, 2005.
- TANCRÈDE C.; AZIZI P.; RAIBAUD P.; DUCLUZEAU R. Conséquences de la destruction des barrières écologiques de la flore du tube digestif par les antibiotiques. Perturbations des relations entre l'hôte et les bactéries potentiellement pathogènes. *Méd. Mal. Infect.* v. 7, p. 145-149, 1977.
- TAO, S. L.; DESAI, T. A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, p. 315-328, 2003.
- TONG, P.; BABA, Y.; ADACHI, Y.; KAMAZU, K. Adsorption of metal ions on a new ion-exchange resin chemically derived from chitosan. *Chemestry Letters*, p. 1529-1532, 1991.
- TRÉMOLIÈRES, F. ; GARRAFFO, R. ; LORTHOLARY, O. Nécessité d'approches alternatives dans les stratégies d'évaluation des nouveaux antibiotiques antibactériens. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 35, p. S229-S235, 2005.
- TUREL, I. The interaction of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Transition Metal Chemistry*, v. 232, p. 27-47, 2002.
- TUREL, I.; BUKOVEC, N.; FARKAS, E. Complex formation between some metals and a quinolone family member (ciprofloxacin). *Polyhedron*, v. 15, p. 269-275, 1996.
- UPADHYAY, S. K.; KUMAR, P.; ARORA, V. Complexes of quinolone drugs norfloxacin and ciprofloxacin with alkaline earth metal perchlorates. *Journal of Structural Chemistry*, v. 47, p. 1078-1082, 2006.
- URBANIÁK, B.; MRESTANI, Y.; KOKOT, Z. J.; NEUBERT, R. H. H. Investigation of interaction of fluoroquinolones with aluminum, iron and magnesium ions using capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*, v. 65, p. 489-492, 2007.
- VARDE, N. K.; PACK, D. W. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biology Therapy*, v. 4, p. 1-17, 2004.
- VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 55, p. 77-93, 2004.

VEHRING, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharmaceutical Research*, v. 25, p. 999-1022, 2008.

VERVOORT, L.; KINGET, R. In vitro degradation by colonic bacteria of inulin HP incorporated in Eudragit RS films. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 129, p. 185-190, 1996.

VOLD, I. M. N.; VARUM, K. M.; GUIBAL, E.; SMIDSROD, O. Binding of ions to chitosan: selectivity studies. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, p. 471-477, 2003.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? *Uso racional de medicamentos: temas selecionados*, v. 14, p. 1-6, 2004.

WHO - World Health Organization. Interventions and strategies to improve the use of antimicrobials in developing countries: a review, WHO, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/guidance/en/index.html>. acesso em: 03 set 2009.

YANG, L.; ALEXANDRIDIS, P. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 5, p. 135-143, 2000

YAO, K. D., TU, H., FA, C., ZHANG, J. W., LIU, J. pH sensitivity of the swelling of a chitosan-pectin polyelectrolyte complex. *Die Angewandte makromolekulare Chemie*, v. 245, p. 63-72, 1997.

ZHANG, Y.; YANG, M.; HUANG, X. Arsenic(V) removal with a Ce(IV)-doped iron oxide adsorbent. *Chemosphere*, v. 51, p. 945-952, 2003.

ZHENG, Y.; YI, Y.; WANG, Y.; ZHANG, W.; DU, M. Preparation of chitosan-copper complexes and their antitumor activity. *Bioorganic & Medical Chemistry Letter*, v. 16, p. 4127-4129, 2006.

ZIMMER, A.; KREUTER, J. Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 16, p. 61-73, 1995.

ANEXO I

Validação de metodologia analítica para quantificação de nimesulida presente no meio colônico simulado.

A quantificação da nimesulida presente no meio colônico foi realizada através de CLAE em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando um detector ultravioleta visível com um comprimento de onda de 278 nm. Foi utilizada uma coluna Symmetry[®] C18 (5 µm, 150 x 4.6 mm) e pré-coluna do mesmo material (5 µm), ambas mantidas à temperatura de 40 °C. A fase móvel consistiu de uma mistura isocrática de tampão fosfato (10 mM) e acetonitrila na proporção de 80:20 (v/v), com pH aparente igual a 3,0. O fluxo foi de 0,8 mL/min e o tempo de análise foi pré-fixado em 7,0 min.

Para avaliação da linearidade, as seguintes concentrações, a partir de uma mesma solução-mãe (100 µg/mL), foram preparadas: 0,5; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL. Foram determinadas 3 curva-padrão com estas concentrações em dias consecutivos e, com auxílio do programa Excel, foram determinados o coeficiente de correlação, o coeficiente linear e angular.

Segundo a análise da variância (ANOVA), verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ($p < 0,05$), observados nos valores de $F_{\text{calculado}}$ (**Tabela 1**), comparados aos valores de F_{tabelado} .

Tabela 1: ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da nimesulida presente em meio colônico simulado.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F _{calculado}
Entre	6	$7,007.10^{13}$	$1,1679.10^{13}$	526,14
Regressão linear	1	$6,606.10^{13}$	$6,606.10^{13}$	2976,17
Desvio da linearidade	5	$4,010.10^{12}$	$8,021.10^{11}$	3,613
Dentro	7	$1,109.10^{10}$	$2,2196.10^{10}$	
Total	13	$7,008.10^{13}$		

A curva padrão da nimesulida apresentou coeficiente angular 558859,6, coeficiente linear 3810711 e coeficiente de correlação 0,9997 (Figura 1), superior a 0,99, que é valor mínimo preconizado pelos códigos oficiais (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

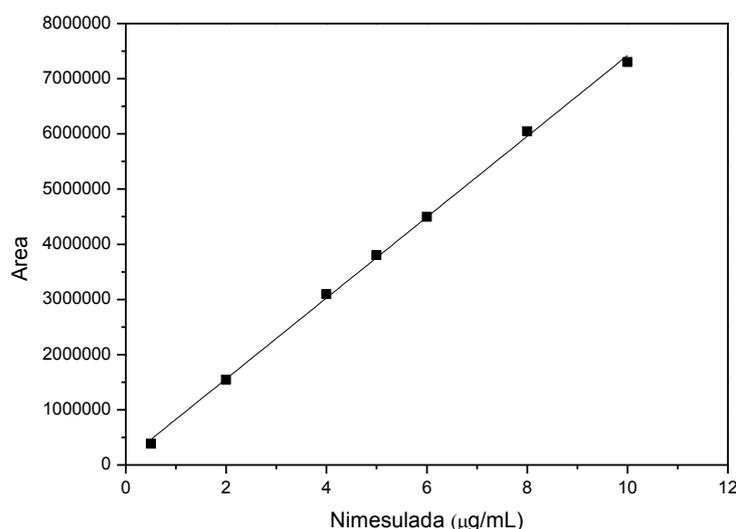


Figura 1: Curva-padrão para quantificação da nimesulida presente no meio colônico simulado.

A precisão foi determinada ao nível de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Para isso, 6 soluções diferentes de 5

$\mu\text{g/mL}$ foram obtidas a partir do meio colônico contendo nimesulida e injetadas, em triplicata, durante 3 dias. Foram determinados os desvios-padrão e os coeficientes de variação (CV %) intra-dia e inter-dia.

A avaliação do CV % intra-dia demonstra pequena variação na análise de amostras de mesma concentração num mesmo dia, assim como a determinação do CV % inter-dia, ambos apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para o doseamento da nimesulida no meio colônico (n = 6).

Solução-amostra	Precisão intra-dia – 1 (%)	Precisão intra-dia – 2(%)	Precisão intra-dia – 3 (%)	Precisão inter-dia (%)
Meio colônico contendo nimesulida (5 $\mu\text{g/mL}$)	0,94	0,89	0,62	1,2

A **Figura 2** apresenta o cromatograma da amostra contendo nimesulida e ciprofloxacino.

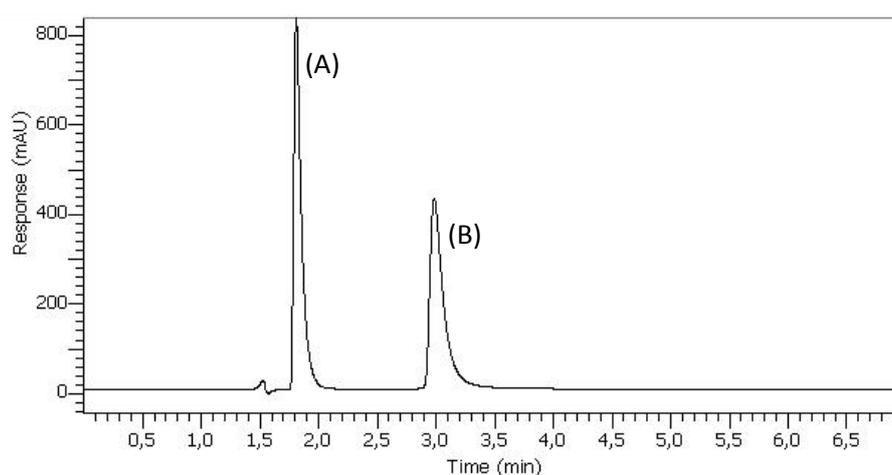


Figura 2 : Cromatograma da amostra contendo nimesulida (A) e ciprofloxacino (B).