



ESTUDO DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE GELATINA PARA
APLICAÇÃO NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DOXICICLINA

Débora Vieira Way

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Rio de Janeiro

Março de 2013

ESTUDO DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE GELATINA PARA
APLICAÇÃO NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DOXICICLINA

Débora Vieira Way

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Prof. Márcio Nele de Souza, D.Sc.

Prof^ª. Wilma de Araújo Gonzalez, D.Sc.

Dr^ª. Juliana Rocha Rodrigues Barcellos, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2013

Way, Débora Vieira

Estudo da Reação de Produção de Partículas de Gelatina para Aplicação na Liberação Controlada de Doxiciclina/ Débora Vieira Way. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XIII, 107 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 86-96.

1. Gelatina. 2. Doxiciclina. 3. Liberação Controlada. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Agradecimentos

A meus pais pelo apoio, amor e dedicação em todos os momentos e por acreditarem em mim quando nem eu mesma acredito.

A meu irmão por ser meu grande companheiro e por sempre me encher de orgulho e alegria.

Ao Zé, meu “tio” tão querido, pela orientação, mas especialmente por todo o carinho e preocupação.

Ao Márcio pela força sempre que precisei e pela descontração.

A meus grandes amigos Fred e Tina por estarem há quase 15 anos a meu lado comemorando, consolando, brigando e incentivando.

A meus colegas da turma de mestrado pelas muitas histórias, dúvidas e conhecimento compartilhados ao longo desses dois anos.

Aos novos grandes amigos conquistados ao longo dessa jornada e que moram agora no meu coração: minha querida Anitcha, por ser tão solícita e amorosa; Anderson, por todas as visitas ao lab e principalmente por toda a disposição que me passou por osmose; e Joãozinho, que me forneceu litros e litros de água Milli-Q intercaladas com muito bate-papo.

A todo o pessoal do laboratório pela colaboração e companhia. Em especial ao Caio, pela paciência com que respondeu minhas milhares de perguntas; Dirrrrceu, pelas implicâncias mútuas, conversas e muita diversão; Jorge, que além de grande amigo, nunca deixa de ajudar quando mais preciso; Luiza e Paulinha pelo carinho e eficiência; e Meninas Superpoderosas (Thamy, Lari e Rhana) por encherem o ambiente de alegria.

Ao Márcio da CEVET pela parceria e confiança.

À Juliana pelas dicas sobre gelatina e imensa boa vontade.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para essa dissertação de mestrado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ESTUDO DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE GELATINA PARA APLICAÇÃO NA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DOXICICLINA

Débora Vieira Way

Março/2013

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Programa: Engenharia Química

A doxiciclina é um antibiótico de amplo espectro muito empregado para o tratamento da erliquiose e da babesiose caninas. Como o tratamento dessas doenças é feito durante um período extenso, o desenvolvimento de um produto que permita a liberação controlada do fármaco traria inúmeros benefícios para a medicina veterinária. Por isso, foram estudadas as influências da utilização de diferentes tipos de gelatinas e agentes reticulantes nas características de um produto particulado produzido em suspensão inversa e na cinética de liberação da doxiciclina incorporada *in situ* no produto. Os resultados indicam que as diferenças observadas parecem ser fruto da interação da gelatina com a doxiciclina. Além disso, foi detectada também uma possível alteração na estrutura da proteína desencadeada por seu processo de dissolução.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

STUDY OF THE REACTION OF GELATIN PARTICLES PRODUCTION FOR
APPLICATION IN DOXYCYCLINE CONTROLLED RELEASE

Débora Vieira Way

March/2013

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Department: Chemical Engineering

Doxycycline is a broad-spectrum antibiotic widely used for treatment of canine ehrlichiosis and babesiosis. As treatment of these diseases is done over an extended period, the development of a product that would allow controlled release of the drug would bring numerous benefits to veterinary medicine. Therefore, the influence of different types of gelatins and crosslinkers on the final characteristics of a particulate product prepared through inverse suspension reaction and on the kinetics of the release of doxycycline incorporated in situ in the final product is studied. The obtained results indicate that the observed differences appear to be the result of the interaction between gelatin and doxycycline. Furthermore, a possible change in the protein structure triggered by the dissolution process was also detected.

Índice

<i>Capítulo I</i>	1
1.1. Introdução	1
1.2. Motivação.....	3
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivos específicos.....	4
1.4. Estrutura da dissertação.....	4
2.1. Polímeros.....	6
2.1.1. Classificação de Polímeros.....	7
2.2. Géis	8
2.3. Gelatina	9
2.3.1. Micro e nanopartículas de gelatina.....	14
2.4. Suspensão Inversa e Gelificação	16
2.4.1. Reticulação da gelatina.....	17
2.5. Erliquiose e Babesiose	23
2.6. Doxíciclina	25
2.7. Comentários Finais.....	28
<i>Capítulo III</i>	30
3.1. Materiais.....	30
3.2. Métodos.....	33
3.2.1. Reações.....	33
3.2.1.1. Reações sem formaldeído.....	33
3.2.1.2. Reações com formaldeído	34
3.2.2. Caracterização	35
3.2.2.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	35
3.2.2.2. Análises Termogravimétricas (TGA).....	36
3.2.2.3. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	36
3.2.2.4. Distribuição de Tamanhos de Partícula (Malvern).....	36
3.2.2.5. Eletroforese	37
3.2.2.6. Teste de Escoamento em Pipeta	37
3.2.2.7. Testes de Liberação Controlada	37
3.2.2.8. Determinação do Percentual de Doxíciclina Encapsulada	39

3.2.2.9.	Espectrofotometria no Ultravioleta (UV).....	40
<i>Capítulo IV</i>	42
4.1.	Compilação dos Resultados de MELO & PINTO (2011).....	42
4.1.1.	Análise Preliminar dos dados de MELO & PINTO (2011)	44
4.2.	Caracterização das Gelatinas Comerciais.....	47
4.2.1.	Análise Morfológica.....	48
4.2.2.	Distribuição de Tamanhos de Partícula.....	49
4.2.3.	Análise de Massa Molar.....	50
4.2.4.	Eletroforese	51
4.2.5.	Análise de Composição de Aminoácidos.....	52
4.2.6.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	54
4.2.7.	Determinação do pH das Gelatinas em Solução.....	55
4.3.	Primeiro Grupo de Reações.....	56
4.3.1.	Resultados de GPC.....	57
4.3.2.	Resultados de FTIR.....	64
4.3.3.	Resultados de Espalhamento de Luz.....	69
4.4.	Conclusões Parciais.....	70
4.5.	Segundo Grupo de Reações.....	71
4.5.1.	Teste de Escoamento em Pipeta.....	73
4.5.2.	Resultados de GPC.....	74
4.5.3.	Análises de Espalhamento de Luz.....	76
4.5.4.	Determinação da Eficiência de Encapsulamento	77
4.5.5.	Testes de Liberação Controlada.....	78
4.6.	Modelo de Interação.....	82
<i>Capítulo V</i>	84
5.1.	Conclusão.....	84
5.2.	Sugestões para Trabalhos Futuros.....	85
<i>Capítulo VI</i>	86
<i>Apêndice A</i>	97
<i>Apêndice B</i>	103

Lista de Figuras

Figura 1 – Número de publicações com as palavras chave “drug delivery” e “gelatin” na PubMed no período de 1965 até 2012.	13
Figura 2 – Resultados dos testes de liberação controlada de MELO & PINTO (2011).23	
Figura 3 – Estrutura química da doxiciclina.....	26
Figura 4 – Ilustração do sistema de liberação controlada utilizado para testes.....	38
Figura 5 – Curva de calibração do UV de solução de doxiciclina usando água como solvente.....	40
Figura 6 – Curva de calibração do UV de solução de doxiciclina usando tampão PBS como solvente.....	41
Figura 7 – Perfis de liberação da doxiciclina obtidos por MELO & PINTO (2011). ...	44
Figura 8 – Gráfico da relação entre média de tamanhos de partícula e volume de formol dos experimentos de MELO & PINTO (2011).	46
Figura 9 – (a) Morfologia das partículas de gelatina PhEur e (b) das partículas de gelatina de porco.....	48
Figura 10 – Fotografias das gelatinas na mesma escala sendo: (a) Partículas de gelatina PhEur e (b) Partículas de gelatina de porco.....	49
Figura 11 – Distribuição de tamanhos de partícula das gelatinas comerciais.	49
Figura 12 – Gel de eletroforese das gelatinas comerciais.	52
Figura 13 – Termograma de TGA da gelatina PhEur.....	54
Figura 14 – Termograma de TGA da gelatina de porco.....	55
Figura 15 – Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 1, contendo 1% de glicose.	58
Figura 16 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 2, contendo 2% de glicose.	59
Figura 17 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 3, contendo 3% de glicose.	60
Figura 18 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 4, contendo 4% de glicose.	60
Figura 19 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 5, contendo 10% de glicerol.	61
Figura 20 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 6, sem agente reticulante algum e na temperatura de 50 °C.	61
Figura 21 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 7, sem agente reticulante algum e na temperatura de 60 °C.	62
Figura 22 - Gráfico das massas molares ponderais finais para a série com diferentes concentrações de glicose.	62
Figura 23 – Espectros de FTIR das reações sem agentes reticulantes.	64
Figura 24 – Ampliação da escala dos espectros de FTIR das reações em que não foram adicionados agentes reticulantes.....	66
Figura 25 – Espectros de FTIR da reação com 10% de glicerol comparados com o da gelatina PhEur e com o da reação sem reticulante.	66

Figura 26 – Espectros de FTIR da reação com 4% de glicose comparados com o da gelatina PhEur e com a mistura física entre a gelatina e a glicose.	67
Figura 27 – Espectros de FTIR das reações com diferentes gelatinas e 4% de glicose. 68	
Figura 28 – Fotografias em sequência da alteração na coloração da mistura contendo água, gelatina e doxiciclina. (a) Solução aquosa de doxiciclina; (b) e (c) mistura de água, gelatina PhEur e doxiciclina respectivamente antes e após a alteração de cor.	73
Figura 29 – Resultados de GPC da reação 12.	75
Figura 30 – Perfil de liberação das diferentes gelatinas preparadas a partir da melhor receita de MELO & PINTO (2011).	78
Figura 31 – Perfil de liberação do fármaco quando diferentes concentrações de gelatina são utilizadas.	79
Figura 32 – Perfil de liberação do fármaco das reações conduzidas na presença e na ausência de formaldeído.	80
Figura 33 – Gráfico com todos os dados de liberação controlada de doxiciclina do segundo grupo de reações realizadas.	81
Figura 34 – Estrutura química da glicose.	82
Figura 35 – Cromatograma da gelatina comercial PhEur.	97
Figura 36 – Cromatograma da gelatina comercial de porco.	97
Figura 37 – Cromatograma da doxiciclina.	98
Figura 38 – Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 1.	98
Figura 39 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 2.	99
Figura 40 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 3.	99
Figura 41 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 4.	100
Figura 42 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 5.	100
Figura 43 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 6.	101
Figura 44 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 7.	101
Figura 45 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 12.	102
Figura 46 – Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 1.	103
Figura 47 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 2.	103
Figura 48 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 3.	104
Figura 49 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 4.	104
Figura 50 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 5.	104
Figura 51 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 6.	105
Figura 52 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 7.	105
Figura 53 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 8.	105

Figura 54 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 9.....	106
Figura 55 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 10.....	106
Figura 56 - Distribuição de Tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 11.....	106
Figura 57 - Distribuição de Tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 12.....	107
Figura 58 - Distribuição de Tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 13.....	107
Figura 59 - Distribuição de Tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 14.....	107

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição típica da gelatina comercial após tratamento para retirada de umidade e cinzas (Adaptado de EASTOE, 1955).	12
Tabela 2 – Resultados de trabalho anterior do grupo (Adaptado de MELO & PINTO, 2011).	43
Tabela 3 – Cálculo da eficiência de encapsulamento dos testes de MELO & PINTO (2011).	45
Tabela 4 – Massas molares das gelatinas comerciais obtidas através de análise de GPC.	50
Tabela 5 – Resultados da análise de composição de aminoácidos das gelatinas comerciais.	53
Tabela 6 – Medidas de pH das gelatinas comerciais em solução.	56
Tabela 7 – Condições reacionais do primeiro grupo de reações realizadas.	57
Tabela 8 – Tamanho médio das partículas do primeiro grupo de reações realizadas....	70
Tabela 9 – Condições reacionais do segundo grupo de reações realizadas.	72
Tabela 10 – Resultados dos testes de escoamento em pipeta.	74
Tabela 11 - Tamanho médio das partículas do segundo grupo de reações realizadas...	76
Tabela 12 – Eficiência de encapsulamento do segundo grupo de reações realizadas. ..	77

Índice de Siglas

Sigla	Significado
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PBS	Tampão fosfato salino
PhEur	Farmacopéia Européia
GPC	Cromatografia de permeação em gel
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
PVC	Poli(cloreto de vinila)
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
GTA	Glutaraldeído
EDC	1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida
BSA	Albumina de soro bovino
SPAN 80	Monooleato de sorbitan
TGA	Termogravimetria
UV	Ultravioleta

Capítulo I

Introdução

1.1. Introdução

O desenvolvimento de materiais para a indústria farmacêutica sempre foi alvo de muita pesquisa e de muitos investimentos. Ao longo da história, muitas descobertas importantes foram feitas na área e muitas ainda estão por vir.

Um dos principais avanços recentes foi o desenvolvimento de técnicas e materiais capazes de permitir o encapsulamento de fármacos. O encapsulamento possui, por exemplo, a habilidade de mascarar sabor ou odor ruins ou de proteger contra a fotodegradação. Contudo, a característica que mais se destaca nesses materiais é a capacidade de permitir a liberação controlada e/ou direcionada dos compostos que encapsulam (DESAI *et al.*, 1996; ESPOSITO *et al.* 1996).

Recentemente, com o advento da nanotecnologia, foi observado que nanopartículas poliméricas possuem futuro bastante promissor para a resolução de problemas na liberação controlada de fármacos. Na verdade, partículas poliméricas em geral, desde que tenham as características adequadas, têm a capacidade de liberar medicamentos de forma controlada e até mesmo direcionada (quando iniciam a liberação do fármaco apenas respondendo a estímulos, como alteração no pH ou temperatura) (VAUTHIER *et al.*, 2009).

Dentre os principais materiais utilizados para encapsulamento, os hidrogéis, descobertos na década de 60 em trabalho pioneiro de Wichterle e Lim (WICHTERLE *et al.*, 1960), vêm sendo utilizados com bastante sucesso com essa finalidade. Destaca-se, entretanto, a gelatina, que além de apresentar inúmeras vantagens, como o baixo potencial alergênico, baixo preço e biodegradabilidade, já é empregada com êxito há muitos anos pela indústria farmacêutica (SCHRIEBER & GAREIS, 2007).

A gelatina é um material hidrofílico que possui inúmeros grupamentos funcionais que podem ser reticulados, formando assim um hidrogel. Dessa forma,

gelatinas possuem enorme potencial para uso no encapsulamento de medicamentos que apresentam afinidade com a água, como por exemplo a doxiciclina.

A doxiciclina é um dos antibióticos mais empregados no tratamento da erliquiose, doença que acomete cães (VIGNARD-ROSEZ *et al.*, 2013). Esse medicamento deve ser administrado por via oral geralmente por um período de 21 dias (BARTSCH & GREENE, 2013), o que dificulta o tratamento, principalmente nos casos em que os animais apresentam comportamento imprevisível e agressivo. Dessa forma, o desenvolvimento de um produto que permita a liberação prolongada do fármaco, reduzindo o número de doses a serem administradas, traria enormes benefícios para a medicina veterinária.

A doxiciclina é um medicamento hidrossolúvel, o que, aliado à hidrofiliabilidade da gelatina, faz dos dois materiais uma combinação perfeita para a criação de um produto que permita o encapsulamento, visando posterior liberação controlada do antibiótico. Entretanto, para que a gelatina possa ser utilizada para encapsulamento da doxiciclina e sua liberação seja prolongada, é necessário realizar um procedimento para reticular as cadeias protéicas em um meio aquoso disperso num meio orgânico (suspensão inversa). Esse tratamento é indispensável, já que, como a gelatina é altamente hidrofílica, uma vez que as partículas formadas entrem em contato com a água elas são prontamente solubilizadas e o fármaco é imediatamente liberado. Para que a liberação seja lenta, portanto, a reticulação deve ser feita, dando origem aos chamados hidrogéis.

A literatura indica que a reticulação da gelatina pode se dar por meio da utilização de diversos materiais, como glutaraldeído, formaldeído, açúcares e compostos epóxi (SCHRIEBER & GAREIS, 2007; CORTESI, 1998). Entretanto, os estudos analisados são contraditórios e não procuram explicar como e se realmente ocorrem as reações de reticulação da gelatina. Dessa forma, este trabalho visa compreender como e se as reações de reticulação acontecem e como elas influenciam as taxas de liberação da doxiciclina.

1.2. Motivação

Como a gelatina é um polímero natural não tóxico, de baixo custo, biocompatível e muito empregado nas indústrias alimentícia e farmacêutica, ela se apresenta como um material com um potencial muito elevado para emprego na liberação controlada de medicamentos. Por conta disso, diversos estudos com essa finalidade já vêm sendo conduzidos com a gelatina, como será discutido com detalhes adiante. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos faz uso de agentes reticulantes altamente tóxicos, o que dificulta muito a aplicação e conseqüentemente a aprovação do produto. Além disso, os estudos que empregam materiais naturais ou atóxicos como reticulantes para a gelatina não conseguem provar de maneira inequívoca que houve reticulação das cadeias ou apresentam resultados contraditórios e/ou inconsistentes.

Dessa forma, surge a necessidade de explicar como e se as reações de reticulação da gelatina realmente ocorrem e se é possível utilizar materiais naturais, como os açúcares, por exemplo, para reticulá-la, permitindo dessa forma o encapsulamento e a liberação controlada de fármacos hidrofílicos empregando materiais não tóxicos.

Além disso, em trabalho anterior do grupo (MELO & PINTO, 2011), foram relatadas diferenças nos perfis de liberação da doxiciclina em gelatinas tratadas com glicose e frutose. Essas diferenças motivaram um estudo mais aprofundado, visando à melhor compreensão dos fenômenos observados.

1.3. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é estudar a influência de diferentes materiais usados como agentes reticulantes para a gelatina sobre a cinética de liberação da doxiciclina incorporada em partículas de gelatina produzidas em suspensões inversas.

1.3.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Possibilitar o encapsulamento doxíciclina utilizando gelatina;
- Produzir partículas estáveis de gelatina, carregadas com doxíciclina e com tamanho e forma controlados, por processos de suspensão inversa;
- Estudar a reticulação da gelatina com diferentes materiais e sua influência na cinética de liberação do fármaco;
- Estudar a influência de diferentes tipos de gelatinas na liberação controlada do antibiótico;
- Explicar as diferenças nos perfis de liberação da doxíciclina observados em trabalho anterior do grupo (MELO & PINTO, 2011).

1.4. Estrutura da dissertação

A dissertação está estruturada em seis capítulos descritos brevemente a seguir.

O Capítulo I apresentou uma pequena introdução, além dos principais objetivos e da motivação para o desenvolvimento deste estudo.

No Capítulo II é apresentada a revisão bibliográfica, destacando os principais trabalhos acerca do uso de hidrogéis de gelatina para aplicações biomédicas.

No Capítulo III são descritos os materiais e métodos empregados ao longo de toda a pesquisa. Nele são apresentados com detalhes os procedimentos empregados em todo o processo.

No Capítulo IV, todos os resultados são apresentados e discutidos detalhadamente.

O Capítulo V apresenta as conclusões e sugestões para trabalhos futuros. Finalmente, no Capítulo VI são apresentadas as referências bibliográficas.

A dissertação se encerra após a apresentação dos Apêndices A e B, onde são dispostas as figuras referentes às análises de cromatografia de permeação em gel e de distribuição de tamanhos de partícula respectivamente.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

2.1. Polímeros

Polímeros são macromoléculas formadas pela ligação covalente resultante de reações entre moléculas menores, chamadas monômeros. Cada unidade repetitiva resultante dessas ligações recebe o nome de mero (MANO, 1985; ODIAN, 2004).

Os polímeros podem ser encontrados em praticamente todos os lugares e muitas vezes constituem a estrutura básica de vários materiais naturais. São exemplos de materiais poliméricos a borracha de pneus, os tubos de poli(cloreto de vinila) (PVC), garrafas de poli(tereftalato de etileno) (PET), aparelhos dentários móveis, copinhos descartáveis, fios de nylon, entre inúmeros outros materiais utilizados no dia-a-dia.

Por serem materiais muito complexos, a simples alteração de propriedades moleculares como a massa molar, ou de propriedades morfológicas (partícula, filme, etc) faz com que um mesmo polímero, como por exemplo o poli(metacrilato de metila) (PMMA), possa ser utilizado tanto como substituto para o vidro como para a confecção de lentes de contato e resinas dentárias que exigem alto grau de biocompatibilidade e, portanto, baixa toxicidade (SANTOS, 2007).

Os polímeros recebem muitas classificações. Vale ressaltar, no entanto, que essas classificações são complementares, o que quer dizer que um mesmo polímero pode e deve ser enquadrado em mais de uma classe para que seja descrito adequadamente. A seguir são descritas as classificações mais pertinentes para esse trabalho.

2.1.1. Classificação de Polímeros

Os polímeros comumente utilizados para aplicações farmacêuticas podem ser de origem natural ou sintética. Polímeros naturais são aqueles obtidos na natureza. Alguns exemplos são a quitosana, o alginato, a albumina, a borracha natural, o amido e a celulose (e polissacarídeos em geral), e as proteínas. Já os polímeros sintéticos, são produzidos artificialmente em laboratório ou em unidades industriais (mesmo que sejam oriundos de materiais naturais). Exemplos de polímeros sintéticos, por sua vez, são os poliacrilatos, os polimetacrilatos e os poliestirênicos (VAUTHIER *et al.*, 2009).

Os polímeros naturais tendem a ser menos nocivos aos seres vivos do que os polímeros sintéticos, por serem produzidos por organismos vivos. Dessa forma, sempre que possível, há uma tendência em preferir a utilização dos materiais naturais para aplicações médicas e farmacêuticas. Isso não quer dizer, entretanto, que os materiais sintéticos não possam ser utilizados nem que todos os materiais naturais são seguros para usos médicos e farmacêuticos.

Além da classificação de polímeros naturais e sintéticos, os polímeros também podem ser classificados como lineares, ramificados ou reticulados, de acordo com a morfologia da estrutura molecular. Os polímeros lineares, como o próprio nome já diz, são aqueles cujas moléculas de monômero se ligam de forma sequencial e contínua (CANEVAROLO, 2006). Já os polímeros ramificados são aqueles que apresentam mais de dois segmentos terminais por molécula. É importante perceber que os grupos laterais dos monômeros não são considerados ramificações. Para que o polímero seja considerado ramificado, a ramificação deve ser composta por ao menos uma molécula de monômero completa. Quando duas ou mais moléculas de polímero são ligadas umas as outras sem que essa união se dê nos segmentos terminais, a molécula resultante é chamada de polímero reticulado. Essas ligações são comumente chamadas *crosslinks*, reticulações ou ainda ligações cruzadas (ODIAN, 2004).

Uma última classificação, porém não menos importante que as outras, é aquela que divide os polímeros de acordo com o tipo de reação que lhes dá origem: poliadição ou policondensação. Polímeros de condensação são aqueles formados por reações entre monômeros multifuncionais (como diácidos, diaminas e diálcoois). A principal característica desse tipo de reação é de que quase sempre eliminam uma molécula

pequena, como H₂O, CH₃OH, HCl ou NH₃ (MANO, 1985; WAY, 2011). Já na poliadicação, os monômeros são insaturados e não há eliminação de nenhuma molécula durante a reação (CANEVAROLO, 2006), sendo as unidades méricas adicionadas uma a uma à cadeia polimérica. Na policondensação o crescimento de cadeia pode ocorrer aos saltos, já que a incorporação é devida a reações entre os grupos funcionais das estruturas formadas (ODIAN, 2004).

2.2. Géis

Um gel é um polímero reticulado capaz de absorver grande quantidade de um determinado líquido (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Devido à elevada afinidade do polímero com o líquido em questão, o material incha, formando um gel. Essa absorção, também conhecida como intumescimento, pode ser de cerca de 10% até várias vezes o valor da massa do polímero seco (LOPES *et al.*, 2005; HOFFMAN, 2009). Quando o gel é formado por um polímero hidrofílico, ele é chamado de hidrogel. Isso porque, como o próprio nome sugere, hidrogéis são capazes de absorver água (CANEVAROLO, 2003).

Os hidrogéis podem ser encontrados na forma sólida (como no caso de lentes de contato), em pó (como no caso de drágeas de medicamentos), recobrimentos (como cateteres ou implantes) e também na forma de líquidos que formam géis quando aquecidos ou resfriados (HOFFMAN, 2002). Os principais usos de hidrogéis como biomateriais são na produção de dispositivos para liberação controlada de fármacos, produção de lentes de contato, substratos para a engenharia de tecidos, implantes e oftalmologia (BUENO, 2010).

Como já comentado anteriormente, nos últimos anos vêm sendo estudados os hidrogéis que possuem a capacidade de reagir a estímulos, como a variação de temperatura e pH, ou ainda variações no campo elétrico ou força iônica do meio. Esses materiais são chamados “inteligentes” e são empregados na fabricação de músculos artificiais, agentes embólicos ou na liberação controlada e direcionada de fármacos (BUENO, 2010).

Os géis podem ser classificados como géis físicos ou químicos, de acordo com o tipo de ligação que apresentam entre suas cadeias (KAMATH & PARK, 1993). Géis físicos são aqueles que podem se desintegrar, dissolver ou degradar. Isso ocorre porque as ligações entre as cadeias são secundárias e, portanto, mais fracas (ligações de hidrogênio, iônicas ou interações hidrofóbicas). Por conta disso, eles são também chamados de géis reversíveis. Um exemplo de gel físico é o alginato de sódio (HOFFMAN, 2002).

Os géis químicos também são chamados de permanentes porque as reticulações são formadas por ligações covalentes, muito mais fortes que as ligações secundárias presentes nos géis físicos. Dessa forma, quando colocados em presença do líquido com que têm afinidade, eles incham, porém não dissolvem (HENNINK *et al.*, 2002). Assim como no caso dos géis reversíveis, os géis químicos não são homogêneos. Eles apresentam regiões de maior inchamento, onde o grau (ou densidade) de reticulação é maior, e regiões de menor inchamento, onde o comportamento contrário é observado (HOFFMAN, 2002).

Para que possam ser utilizados na liberação controlada de fármacos, os hidrogéis devem ser biocompatíveis. Além disso, devem também ser biodegradáveis, bioabsorvíveis ou ao menos eliminados do organismo sem prejuízo à saúde do paciente (KAMATH & PARK, 1993). A biodegradação desses materiais pode se dar de quatro diferentes maneiras: solubilização, hidrólise química, hidrólise enzimática ou troca iônica (KAMATH & PARK, 1993). É importante ressaltar que os produtos de degradação também devem ser biocompatíveis para que os polímeros possam ser empregados na indústria farmacêutica.

2.3. Gelatina

Quando se fala em gelatina, é instintivo associar a palavra à sobremesa que é muito encontrada em todo o mundo com os mais diversos sabores. Entretanto, a gelatina possui inúmeras outras possibilidades de aplicação.

Durante os primeiros séculos d.C., o homem descobriu que a fervura de ossos e peles de animais levava à produção de uma espécie de cola, apesar de não se ter ideia

naquele tempo de que se tratava de gelatina. Foi muito mais tarde, apenas durante as Guerras Napoleônicas, que começou a se tornar comum o uso da gelatina como alimento. Isso ocorreu devido ao fato de que o bloqueio dos franceses pela marinha britânica ocasionou uma falta de proteína (advinda até então da carne) para a população. A gelatina surgiu naquele momento como uma alternativa para suprir essa carência (SCHRIEBER & GAREIS, 2007).

Com o passar do tempo, descobriu-se que a gelatina poderia ser utilizada não só como alimento, mas também para outras aplicações. Por volta de 1833, um farmacêutico chamado Mothes patenteou o uso de gelatina para fabricação de cápsulas de medicamentos (SCHRIEBER & GAREIS, 2007). De lá para cá essa proteína tem sido largamente empregada para diversas aplicações biomédicas.

A gelatina é um polímero natural produzido a partir de hidrolisados de colágeno ou da fração polissacarídica de algas marinhas (YANNAS, 1972; BUENO, 2010). O colágeno possui uma estrutura tripla-hélice reforçada e estabilizada por ligações cruzadas covalentes entre as cadeias (YANNAS, 1972). Além disso, ligados aos grupos hidroxila dos resíduos da hidroxilisina, normalmente há carboidratos cuja função ainda é desconhecida, mas que exercem influência direta no empacotamento das moléculas de colágeno (SCHRIEBER & GAREIS, 2007).

O processo que converte colágeno em gelatina é conhecido como condicionamento e pode ser de dois tipos: ácido e básico. Dependendo do tipo empregado, a gelatina produzida apresenta propriedades ligeiramente diferentes e é classificada como tipo A (tratamento ácido) e tipo B (tratamento básico) (DIGENIS *et al.*, 1994).

O conhecimento do tipo de gelatina permite determinar o pH de trabalho mais adequado. Gelatinas tipo A apresentam ponto isoelétrico (PI) na faixa de 7 a 9, enquanto gelatinas tipo B apresentam PI na faixa de 4,7 a 5,4 (GMIA, 2012). Como no ponto isoelétrico, as proteínas apresentam carga nula, não convém trabalhar na faixa de pH em que o PI possa ser atingido, uma vez que a solubilização da gelatina será comprometida devido à ausência de carga das moléculas. Dessa forma, o desconhecimento do tipo de processo de condicionamento a que foi submetida a gelatina com que se deseja trabalhar pode afetar diretamente seu processo de solubilização (BARCELLOS, 2012).

Quando o colágeno passa pela etapa de condicionamento, as ligações cruzadas que reforçam e estabilizam as cadeias são parcialmente quebradas, o que leva a uma queda na massa molar do material (YANNAS, 1972). Por isso, como esse processo de hidrólise depende fortemente do tipo de tratamento e da quantidade de energia empregada, a gelatina apresenta múltiplos fragmentos, que dão origem a uma mistura de diferentes massas molares.

Uma vez que a gelatina pode ser classificada como de tipo A ou B e que suas distribuições de massas molares podem variar muito, é bastante comum classificá-la também de acordo com a força do gel que é capaz de formar. Por isso, foi criada a medida de Bloom da gelatina, que nada mais é que o peso em gramas necessário para um pistão deformar até uma profundidade determinada um gel sob condições padrões. Esse valor pode variar entre 50 e 300. Uma gelatina 300 Bloom, portanto, forma gel mais forte que uma gelatina 50 Bloom e, por isso, requer uma concentração mais baixa de material proteico para atingir a um gel com mesma força que a 50 Bloom (SCHRIEBER & GAREIS, 2007).

Para encapsulamento de substâncias hidrofílicas, normalmente é indicado que sejam utilizadas gelatinas com ao menos 200 Bloom porque, por conta da sua viscosidade, podem ser utilizadas formulações contendo menos água (SCHRIEBER & GAREIS, 2007).

As proporções dos aminoácidos que compõe a gelatina são função do processo de fabricação e do material que lhe deu origem (como pele de boi, peixe ou porco). A Tabela 1 indica a composição típica da gelatina obtida a partir de ossos bovinos, que é a mais encontrada comercialmente. Cerca de 85 a 92% da gelatina é constituída por proteína (um polímero natural). O restante é composto de sais minerais, umidade e cinzas (EASTOE, 1955).

O processo de dissolução da gelatina é bastante delicado. Tradicionalmente a dissolução é feita em duas etapas: primeiro a gelatina é inchada em água fria, para só então ser solubilizada em água a 50- 60 °C. Esse método é normalmente chamado de método indireto. Mas outra metodologia também é comumente empregada e é conhecida como método direto, em que a gelatina é solubilizada em água a 80 °C sem a etapa prévia de inchamento (BARCELLOS, 2012).

Tabela 1 – Composição típica da gelatina comercial após tratamento para retirada de umidade e cinzas (Adaptado de EASTOE, 1955).

Aminoácido	Composição (%)
Ácido aspártico	5.70
Ácido glutâmico	9.86
Alanina	9.61
Arginina	7.65
Fenilalanina	2.13
Glicina	23.13
Hidroxilisina	0.68
Hidroxiprolina	11.31
Histidina	0.60
Isoleucina	1.28
Leucina	2.98
Lisina	3.66
Metionina	0.51
Prolina	13.18
Serina	3.15
Tirosina	0.17
Treonina	2.04
Valina	2.38

Em qualquer um dos métodos utilizados, no entanto, deve-se tomar muito cuidado para não haver aglomeração, pois uma vez que sejam formados blocos de gelatina, a solubilização completa do material é muito dificultada. Além disso, deve-se observar que a gelatina apresenta uma cinética lenta de dissolução; portanto, soluções preparadas a temperaturas abaixo de 50 °C apresentam comportamento reológico

diferente das soluções preparadas a temperaturas mais elevadas, o que sugere a formação de uma espécie de pré-estrutura a temperaturas mais baixas.

Dessa forma, o método indireto é usado principalmente nos casos em que as partículas de gelatina são muito pequenas, pois elas possuem maior tendência de aglomerar. Isso ocorre porque as partículas inchadas tendem a se incorporar às partículas secas para evitar o molhamento. Quando isso acontece, a dissolução do material é bastante dificultada. Quando, entretanto, a gelatina passa pela etapa de inchamento em água fria antes da solubilização, a superfície não fica tão grudenta, o que evita a agregação (SCHRIEBER & GAREIS, 2007).

Quando resfriada, a solução de gelatina retoma a estrutura tripla-hélice característica do colágeno, formando um hidrogel. Isso ocorre porque, as moléculas de água se posicionam nos interstícios e ocorre a formação de ligações de hidrogênio com os grupamentos CO e NH (KAMATH & PARK, 1993).

O interesse na utilização de partículas de gelatina como carreadores de fármacos para liberação controlada cresce a cada dia, como pode ser comprovado pelo grande aumento no número de publicações na área, como mostrado na Figura 1. Isso ocorre porque o encapsulamento de fármacos apresenta não só as vantagens de proteger contra fotodegradação e oxidação e de mascarar odor e sabor, mas também de reduzir os efeitos adversos causados pelos medicamentos e diminuir o número de doses a serem administradas (DESAI *et al.*, 1996; ESPOSITO *et al.* 1996).

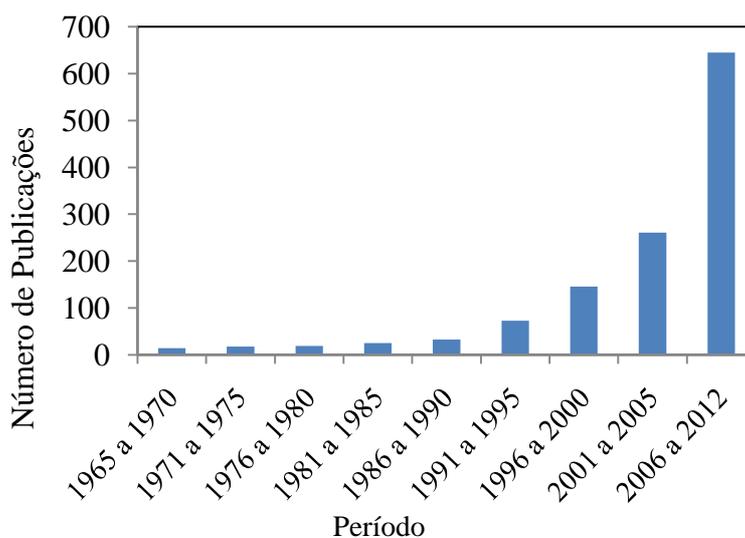


Figura 1 – Número de publicações com as palavras chave “drug delivery” e “gelatin” na PubMed no período de 1965 até 2012.

Ademais, a gelatina, além de boa formadora de partículas, não contém pirogênicos, que são produtos do metabolismo de organismos como bactérias e fungos que podem causar febre (ESPOSITO *et al.*, 1996).

O uso da gelatina vem sendo adotado nas mais diversas áreas por conta principalmente de sua biodegradabilidade, baixo preço, e baixa toxicidade. Dependendo do tipo de função que deverá exercer, a gelatina pode ser produzida na forma de cápsulas, filmes, membranas ou ainda micro e nanopartículas.

2.3.1. Micro e nanopartículas de gelatina

A partir dos anos de 1980-1990 começaram a ser estudadas soluções para a liberação controlada de fármacos empregando sistemas poliméricos nas escalas micro e nano (GRUND *et al.*, 2011).

As micro e nanopartículas poliméricas podem ser classificadas como cápsulas, quando o núcleo da partícula é composto por um óleo ou água e apenas a casca é de polímero, ou como esferas, quando toda a massa da partícula é sólida (VAUTHIER *et al.*, 2009). As cápsulas podem ainda receber outras classificações, no caso do núcleo estar ou não subdividido dentro da partícula. Nesse caso elas são denominadas cápsulas poli ou mononucleares. As cápsulas podem ainda ser classificadas conforme a substância ativa esteja suspensa ou dissolvida no núcleo. Nesse caso, são chamadas heterogêneas ou homogêneas, respectivamente (SILVA *et al.*, 2003). Tanto nas cápsulas quanto nas esferas, o fármaco pode ficar adsorvido na superfície ou ainda aprisionado dentro das partículas (KUMARI *et al.*, 2010).

Dependendo da forma de administração do medicamento, o tamanho das partículas deve ser alterado. No caso de aplicações intramusculares ou subcutâneas, por exemplo, os diâmetros de partícula ótimos devem variar entre 20 e 100 micra. Nanopartículas administradas via intravenosa devem ser significativamente menores que 5 μm , para não causarem embolias. Isso ocorre porque os menores capilares presentes no organismo possuem diâmetro em torno de 5-6 μm (HANS & LOWMAN, 2002). Partículas menores que 20- 30 nm são filtradas pelos rins e eliminadas pela urina

(GAUMET *et al.*, 2008). Partículas maiores são eliminadas nas fezes ou se acumulam no organismo. Quando há acúmulo, pode ser necessário realizar cirurgia para remover o material.

Diversas técnicas são empregadas para a produção de partículas poliméricas, visando ao encapsulamento. A escolha da técnica empregada depende do tipo de partícula que se deseja produzir (cápsulas ou esferas), do tamanho de partícula pretendido, da solubilidade dos materiais escolhidos, da interação do fármaco com esses materiais e, sobretudo, depende da sensibilidade dos polímeros e fármacos às condições de reação (SUAVE *et al.*, 2006).

O método mais empregado para a produção de nanopartículas é o de emulsificação, seguido por evaporação do solvente. Apesar de muito empregada, a técnica apresenta uma grande desvantagem, que é a necessidade usual de utilizar solventes tóxicos, como o clorofórmio e o diclorometano (SOUTO *et al.*, 2012), que devem ser evitados para aplicações médicas e farmacêuticas (HANS & LOWMAN, 2002; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

As partículas também podem ser produzidas por aspersão, também conhecida como técnica de *spray drying*. Nesse caso, o polímero é solubilizado em um solvente volátil e essa solução é então borrifada em ar quente, o que ocasiona a secagem e, conseqüentemente formação das partículas (KIM, 2011).

A coacervação, ou separação de fases, é induzida por alterações que causam a dessolvatação de uma determinada molécula. Essa alteração pode ser uma mudança de temperatura, a adição de um não solvente ou a adição de micro-íons (SILVA *et al.*, 2003). A técnica apresenta como principal vantagem a possibilidade de obtenção de altas eficiências de encapsulamento de fármacos hidrossolúveis.

Em alguns casos é comum aliar duas ou mais técnicas de microencapsulação, de forma a adequar o sistema às necessidades de cada material. No caso da gelatina, por exemplo, ao menos dois métodos costumam ser combinados. São eles a suspensão inversa e a gelificação. Eles possibilitam não só a formação de partículas, mas também o encapsulamento *in situ* do fármaco, o que dispensa a realização de uma etapa posterior para carregar as partículas com a doxiciclina.

2.4. Suspensão Inversa e Gelificação

As reações de polimerização em suspensão são reações em que um iniciador é dissolvido na fase orgânica e essa mistura é então dispersa em uma solução aquosa contendo um agente estabilizante. O agente estabilizante é responsável por diminuir a tensão interfacial entre as duas fases, estabilizando assim a gota de monômero (fase orgânica). Dessa forma, cada gota funciona como se fosse um mini-reator em massa, onde apenas iniciador e monômeros estão presentes (ODIAN, 2004).

Esse tipo de reação, em que a fase dispersa é orgânica e a fase contínua é aquosa é chamada somente de suspensão. Quando o contrário é observado (a fase contínua é orgânica e a fase dispersa é aquosa), a técnica recebe o nome de suspensão inversa. A diferença é que dessa vez o agente estabilizante deve ser solúvel na fase orgânica e o iniciador deve ser solúvel na fase aquosa. A suspensão inversa é, portanto, responsável pela produção de partículas de polímeros hidrofílicos.

Nas reações conduzidas por intermédio dessa técnica, os polímeros formados são obtidos na forma de pérolas esféricas e a distribuição final de tamanhos de partícula é resultado dos fenômenos de quebra e coalescência das gotas. Por isso, o tamanho das partículas de polímero pode ser controlado com auxílio da variação da velocidade de agitação, da concentração de agente estabilizante, da temperatura da reação ou até mesmo pela alteração do tipo de fase contínua empregado. Tipicamente, as partículas formadas possuem tamanhos na faixa de 1-5000 μm (JAHANZAD *et al.*, 2004). O tipo de óleo, a velocidade de agitação, a temperatura de reação, a concentração de polímero e o tipo e concentração do agente estabilizante exercem influência muito grande no tamanho e na distribuição de tamanhos de partícula dos polímeros (ODIAN, 2004; ESPOSITO *et al.*, 1996).

Por serem obtidos na forma de partículas esféricas de tamanho controlado, os polímeros obtidos pela técnica de polimerização em suspensão são ideais para aplicações médicas e farmacêuticas, em que o tamanho e forma dos materiais exercem influência muito grande nas propriedades do produto final (SANTOS, 2007).

Para que sejam obtidas micropartículas após a realização da reação em suspensão inversa no caso da gelatina, é necessário gelificar as gotículas formadas na

suspensão por meio da redução da temperatura (VAUTHIER & BOUCHEMAL, 2009). Uma vez gelificadas, as partículas têm maior dificuldade de aglomerar. No entanto, caso a agitação cesse, as partículas não se mantêm estáveis por muito tempo, pois a presença de água no sistema faz com que elas fiquem bastante pegajosas. Para contornar esse problema e permitir a formação definitiva das esferas, costuma ser adicionada acetona à mistura para desidratar as partículas. Quando isso é feito, toda a água é retirada das partículas de polímero e, portanto, elas se tornam sólidas e não mais suscetíveis à aglomeração.

2.4.1. Reticulação da gelatina

Como já foi explicado anteriormente, a gelatina é um material bastante hidrofílico e, portanto, muito solúvel em água. Dessa forma, ao entrar em contato com os fluidos corporais, a gelatina funcionaria apenas como uma barreira física, sendo, por isso, prontamente dissolvida e o fármaco liberado quase que instantaneamente. Isso não seria de forma alguma vantajoso, uma vez que a aplicação desejada exige a liberação controlada da droga. Assim sendo, a reticulação das cadeias de gelatina faz-se necessária para aplicação na liberação controlada de medicamentos já que uma vez reticulada, a gelatina carregada com o fármaco irá inchar, porém não dissolver, permitindo a liberação gradual de sua carga.

São inúmeras as informações na literatura a respeito da reticulação da gelatina. Além das muitas possibilidades de aplicação do hidrogel formado, foram muitos os agentes reticulantes e técnicas já empregadas até o momento.

YANNAS *et al.* (1967) sugerem que a gelatina pode ser reticulada quando seu teor de umidade é drasticamente reduzido (0,1- 0,3g de água/ 100g de proteína). Essa desidratação, entretanto, exige o tratamento do material a temperaturas bastante elevadas, o que pode ser prejudicial nos casos de aplicações médicas e farmacêuticas. Essa preocupação é importante porque, quando exposta a temperaturas acima de 50 °C, a gelatina começa a ser degradada, o que pode dar origem a compostos nocivos aos seres vivos em geral. Dessa forma, a reticulação da gelatina por desidratação não parece ser adequada para aplicação na liberação controlada de medicamentos.

Inspirados pelo trabalho de YANNAS *et al.* (1967) e por publicações mais recentes sobre a reticulação de colágeno e albumina, VANDELLI *et al.* (2004) estudaram a reticulação da gelatina por meio do tratamento com microondas. Nesse trabalho, os autores carregaram partículas previamente reticuladas com diclofenaco de sódio e observaram as taxas de liberação do medicamento e o percentual de reticulação da proteína. Os resultados parecem promissores, principalmente se consideramos que os testes de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* indicam que as partículas são bem toleradas. Entretanto, os próprios autores ressaltam que, por meio dos testes realizados, não é possível afirmar que está mesmo ocorrendo reticulação da gelatina. A possibilidade de estarem ocorrendo reações laterais com os grupamentos amino e carboxílico livres ou mesmo degradação da gelatina não foram descartados.

Apesar de alguns estudos, como os citados anteriormente, visarem à indução de reticulação sem a adição de nenhum outro composto ao meio, a grande maioria dos trabalhos da literatura emprega aldeídos para reticular a gelatina. Esse tratamento, apesar de eficiente, não considera em geral o fato de que os aldeídos são altamente tóxicos e que, portanto, seu uso carece de avaliações minuciosas e da definição de protocolos específicos para as diversas classes de fármacos. A seguir são apresentadas algumas pesquisas que utilizaram glutaraldeído, formaldeído e glioxal como agentes reticulantes.

FAN & DASH (2001) estudaram o efeito da reticulação da gelatina com diferentes concentrações de glutaraldeído (GTA) na liberação controlada do fármaco doxorrubicina, empregado para tratamento de câncer ósseo. Foi utilizado glutaraldeído nas suas duas formas comerciais: glutaraldeído-bissulfito de sódio e glutaraldeído em solução. Os autores reportam que não há evidências de reticulação quando glutaraldeído-bissulfito de sódio é empregado, mas que quando é utilizado GTA em solução há redução significativa na velocidade de liberação do medicamento, o que configura indício de reticulação. FAN & DASH (2001) observaram, no entanto, que a doxorrubicina interage com o GTA, uma vez que quando a concentração da droga é aumentada, o perfil de liberação se torna mais lento. Essa é uma indicação forte de que o fármaco pode estar sendo reticulado quando em presença de GTA, o que pode comprometer a atividade do medicamento ou mesmo torná-lo tóxico. Dessa forma, para que o glutaraldeído possa ser empregado juntamente com a doxorrubicina, maiores

estudos devem ser conduzidos de forma a melhor compreender a interação do reticulante com o medicamento.

FARRIS *et al.* (2010) propuseram um novo mecanismo para a reticulação da gelatina empregando glutaraldeído. Os autores sugerem que o mecanismo mais aceito pela literatura, que é o de que os grupamentos amino da lisina e as carbonilas do GTA reagem e formam uma base de Schiff, somente ocorre quando o pH do meio é superior ao ponto isoelétrico da gelatina. Os resultados de FARRIS *et al.* (2010) sugerem, portanto, que quando o pH do meio é ácido (inferior ao ponto isoelétrico), as ligações covalentes se formam entre os grupos hidroxila da hidroxilisina e/ou hidroxiprolina e o glutaraldeído, o que dá origem a um hemiacetal. Dessa forma, fica evidente a importância do pH na reticulação da gelatina quando aldeídos, em especial o glutaraldeído, são utilizados.

ZAMPIERI *et al.* (2005) estudaram o efeito da extensão da ligação cruzada induzida por formaldeído em cápsulas de gelatina dura contendo naproxeno, um agente anti-inflamatório. Os autores afirmam que a ligação cruzada aumenta com o aumento da concentração de formaldeído, o que confirma dados da literatura. No entanto, ZAMPIERI *et al.* (2005) relatam que o aumento da concentração de etanol diminui a eficiência de reticulação, o que não se mostrou coerente com os resultados de análise de formol residual. Ainda segundo os autores, ao aumentar a concentração de etanol no meio, observou-se menor incidência de reticulação. Dessa forma, deveria ter sido observada maior quantidade de formaldeído residual, o que não ocorreu. Por conta disso, não pode ser descartada a possibilidade de estarem ocorrendo reações laterais entre a gelatina ou o naproxeno e o etanol.

DAVIS & TABOR (1963) utilizaram formaldeído e glioxal como agentes reticulantes para diferentes tipos de gelatina e estudaram a cinética de reticulação por meio de medidas viscosimétricas. Os autores propuseram mecanismos reacionais de acordo com os resultados obtidos e expuseram dados cinéticos muito interessantes. Segundo eles, são inúmeros os fatores que exercem influência no grau de reticulação. Além de provarem que o tipo de gelatina é importante, foi proposta a seguinte expressão:

$$\text{Taxa de reticulação} = \frac{[\text{Gelatina}]^2 * [\text{Agente reticulante}]^n}{[\text{H}^+]} \quad [1]$$

Dessa forma, é interessante ressaltar, que a concentração de gelatina possui aparentemente um papel muito importante na reticulação.

Inspirados pelo sucesso do trabalho de DAVIS & TABOR (1963), CARVALHO *et al.* (2005) empregaram glioxal e formaldeído na formação de filmes de gelatina biodegradáveis. Eles observaram que ambos os aldeídos foram capazes de reduzir a solubilidade dos filmes. Além disso, verificaram que as propriedades finais dos filmes parecem ser função do arranjo espacial após a reticulação.

ULUBAYRAM *et al.* (2002) encapsularam albumina de soro bovino (BSA) utilizando gelatina e estudaram o efeito da utilização de diferentes concentrações de glutaraldeído, empregado como agente reticulante, na cinética de liberação da BSA. Os autores garantem que a liberação pode ser estendida de horas até semanas por meio do ajuste de alguns parâmetros do sistema.

LAI (2010) utilizou glutaraldeído e 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida, também conhecido como EDC, para reticular gelatina a ser usada para aplicações oftalmológicas. Assim como na grande maioria dos trabalhos listados nessa revisão bibliográfica, primeiramente foram preparados os filmes de gelatina e somente depois de prontos é que as reações de reticulação foram iniciadas. LAI preocupou-se com a questão da toxicidade de seus agentes reticulantes e realizou, por isso, estudos *in vitro* e *in vivo* com gelatinas reticuladas. Seus resultados indicam que a EDC parece ser menos tóxica que o GTA, mesmo após tratamento com glicina, que reduz a toxidez de aldeídos em geral.

LAI (2011) deu continuidade a seu trabalho e estudou mais aprofundadamente o uso do EDC como reticulante por conta de sua menor toxidez. Seus novos resultados indicam que quando o grau de reticulação é baixo, as partículas rapidamente são degradadas. Quando o grau de reticulação é aumentado, surgem problemas de biocompatibilidade, o que indica que essa carbodiimida pode não ser adequada para aplicações oftalmológicas. Um aspecto interessante do trabalho de LAI (2011) merece

ser ressaltado, no entanto, que é a utilização da técnica de GPC utilizando colunas de água para acompanhamento da degradação da gelatina pela proteinase MMP-2.

Preocupados com a questão da toxicidade dos agentes reticulantes, alguns trabalhos buscaram alternativas com outros materiais naturais, visando à reticulação das cadeias de gelatina.

SCHACHT *et al.* (1997) reportaram sucesso no preparo de hidrogéis de gelatina empregando dextrana como reticulante. Os autores, no entanto, ressaltam que no caso da dextrana em sua forma nativa, a reticulação é meramente física, uma vez que soluções aquosas de dextrana e gelatina são termodinamicamente instáveis e, portanto, a solubilidade do açúcar é bastante reduzida. Quando oxidada, entretanto, a dextrana passa a conter diferentes tipos de dialdeídos em sua estrutura e, por isso, passa a ser capaz de interagir com a gelatina e formar ligações covalentes. A reticulação química se dá entre os grupamentos ϵ -amino da lisina e/ou hidroxilisina e os aldeídos da dextrana. Os autores ressaltam muito pertinentemente também a necessidade de compreender mais claramente a complexidade da formação dos hidrogéis para a produção de materiais para aplicações biomédicas.

CORTESI *et al.* (1998) foram pioneiros na tentativa de empregar açúcares de baixa massa molar, como frutose e glicose, para reticular a gelatina. Eles utilizaram açúcares tanto em sua forma nativa, como em sua forma oxidada e indicam que há uma redução bastante significativa na solubilidade da gelatina em ambos os casos, mas especialmente quando esta é tratada com açúcar oxidado. Os autores, entretanto, não apresentam provas incontestáveis de que a reticulação realmente ocorre. As alterações observadas na solubilidade e nas outras análises apresentadas podem ser fruto de outro tipo de reação que não a reticulação.

Em uma revisão da literatura sobre mecanismos de reticulação da gelatina, DIGENIS *et al.* (1994) reafirmam, no entanto, a possibilidade de ocorrerem ligações covalentes da gelatina com açúcares do tipo aldose, como por exemplo a glicose.

Dando continuidade a trabalho anterior, CORTESI *et al.* (1999) utilizaram dextrana nas formas nativa e oxidada para reticular gelatina e testaram a liberação da droga antineoplástica TAPP-Br. Os resultados indicam que ambos os tipos de tratamento da gelatina foram capazes de reduzir sua solubilidade. Vale destacar,

entretanto, que o polissacarídeo em sua forma oxidada apresentou melhor desempenho (reduziu em cerca de 40% a solubilidade da gelatina), quando comparado ao tratamento com dextrana nativa. Os testes de liberação reforçam os dados de solubilidade, uma vez que retardam a liberação do fármaco. CORTESI et al. (1999) destacam, entretanto, que não é possível excluir a possibilidade de interação entre a dextrana oxidada e a TAPP-Br, mas afirmam que enzimas presentes *in vivo* são capazes de desfazer a ligação entre eles. É importante ressaltar, entretanto, que apesar de as formas oxidadas dos açúcares utilizados pelos autores em ambos os trabalhos parecerem ser mais eficientes, a preocupação com possíveis barreiras de biocompatibilidade deve ser constante. Para evitar o aumento da toxicidade do produto, o mais conveniente seria a utilização dos agentes reticulantes em sua forma nativa.

WU *et al.* (2006) compararam os efeitos da reticulação da gelatina com glutaraldeído e com dextrana oxidada na liberação controlada de pingiangmicina. As partículas produzidas visam à criação de um produto para quimioembolização. Seus resultados indicam que ambos os agentes reticulantes foram capazes de retardar a liberação do medicamento, mas que a dextrana apresentou melhor desempenho, quando comparada ao glutaraldeído. Os autores, no entanto, não consideraram a possibilidade de haver interação do fármaco com a gelatina. De qualquer forma, os dados são de extrema importância uma vez que mostram que não é necessário utilizar o glutaraldeído (um composto altamente tóxico) para reticular a gelatina.

Com base principalmente no trabalho de CORTESI et al. (1998), MELO & PINTO (2011) começaram a estudar a liberação controlada de doxiciclina encapsulada com gelatina após tratamento com diferentes açúcares em sua forma nativa e/ou formaldeído. Seus resultados, apresentados na Figura 2, indicam claramente que os açúcares escolhidos exercem influência bastante significativa no perfil de liberação do fármaco. Além disso, foi verificado que o encapsulamento com gelatina permite atrasar a liberação da doxiciclina.

Os resultados de MELO & PINTO (2011) serão mais bem explorados no Capítulo IV, uma vez que foram a principal motivação para o desenvolvimento desta dissertação e, portanto, estão altamente interconectados com os resultados obtidos.

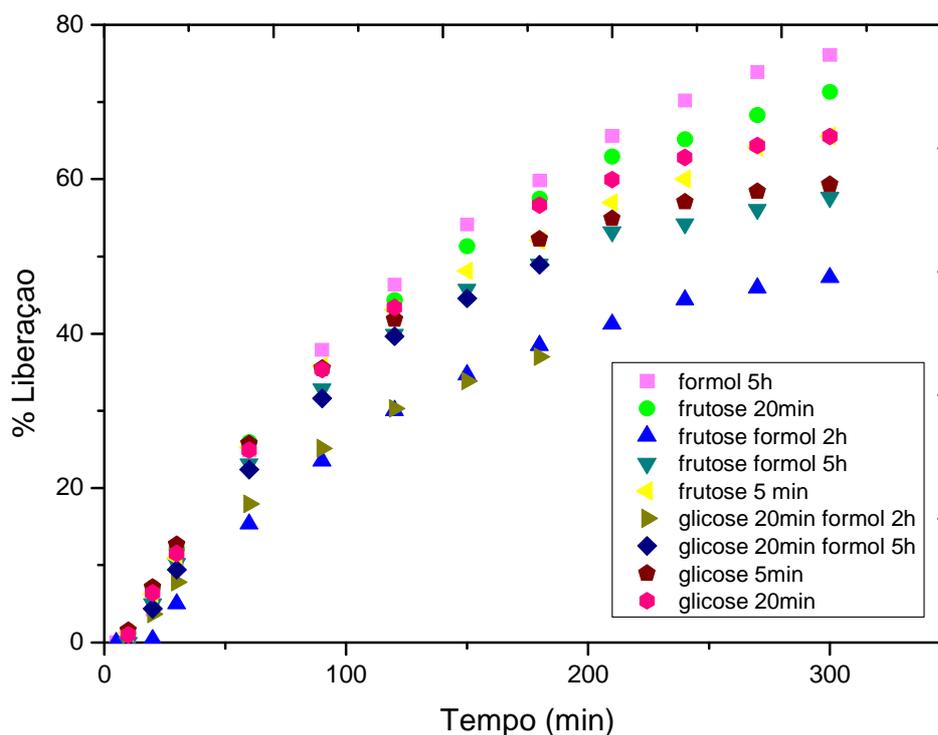


Figura 2 – Resultados dos testes de liberação controlada de MELO & PINTO (2011).

2.5. Erliquiose e Babesiose

A babesiose em cães é tipicamente causada por dois tipos de protozoários: a *babesia canis* e a *babesia gibsoni*. A transmissão da doença se dá durante o parasitismo dos carrapatos *Boophilus microplus* ou *Rhipicephalus sanguineus* e através de agulhas ou outros materiais contaminados (PACHECO *et al.*, 2009). Cães com babesiose apresentam fraqueza, vômito, anorexia, anemia, depressão, linfadenopatia, esplenomegalia e indisposição (VIAL *et al.*, 2006). Por conta desses sintomas, a doença também é conhecida como “tristeza parasitária”, além de febre do carrapato, peste de sangrar ou piroplasmose (PINTO, 2009). A babesiose também é observada em humanos e outros animais, como gatos, cavalos e bovinos, sendo inclusive a doença que causa mais prejuízos à pecuária leiteira (PACHECO *et al.*, 2009).

O primeiro registro que faz referência à babesiose está na Bíblia, que descreve uma praga que afetou o gado do Faraó Ramsés II (VIAL *et al.*, 2006). O protozoário, no entanto só foi descrito pela primeira vez em 1888 por um patologista húngaro (KRAUSE, 2002).

O tratamento é feito com babesicidas como o sulfato de quinurônio, o aceturato de diminazeno, a amicarbalida, o isetionato de fenamidina e o dipropionato de imidocarb. Dentre eles, os mais comumente utilizados são o aceturato de diminazeno e o dipropionato de imidocarb (PINTO, 2009).

O uso de imidocarb elimina completamente o agente do organismo do animal, o que impede a perpetuação do estímulo antigênico. Por conta disso, medicamentos como a doxiciclina, que apenas eliminam a infecção, podem ser benéficos, pois promovem proteção prolongada, uma vez que não extinguem completamente o agente do organismo (PINTO, 2009).

A babesiose pode se assemelhar à erliquiose aguda (GUIMARÃES, 2011), cujo tratamento preferencial costuma ser, como será apresentado a seguir, com doxiciclina. Por isso, uma vez que o diagnóstico pode ser impreciso, o uso da doxiciclina permite o tratamento de ambas as doenças simultaneamente. Dessa forma, o uso da doxiciclina para o tratamento da babesiose apresenta outra vantagem, além do estímulo antigênico.

A *Ehrlichia canis* é uma bactéria responsável por causar a erliquiose canina. Assim como a babesiose, a erliquiose é transmitida pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e, por isso, tem maior ocorrência em áreas tropicais e subtropicais. Ela já foi conhecida também como tifo canino, febre hemorrágica canina e moléstia do cão rastreador, mas hoje é denominada erliquiose monolítica canina (PEDROSO, 2006).

A doença apresenta 3 fases: a aguda, a subclínica e a crônica (WANER & HARRUS, 2000). Na fase aguda, os principais sintomas são febre, depressão, anorexia, perda de peso, mucosas pálidas, secreção oculonasal, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (VIEIRA *et al.*, 2011). Já na fase subclínica, mesmo que o tratamento não tenha sido iniciado, em geral os sintomas desaparecem e o animal parece saudável. Entrando na fase crônica, entretanto, duas situações diferentes podem ser observadas. A doença pode continuar assintomática, como observado na fase subclínica, ou os sintomas podem retornar ainda mais fortes. Nesse caso, observam-se sinais de apatia, caquexia, tendência a hemorragias, palidez de mucosas, sensibilidade abdominal,

uveíte anterior ou sinais de meningoencefalite além de alta letalidade (WANER & HARRUS, 2000; UENO *et al.*, 2009).

A erliquiose foi descrita pela primeira vez na Argélia em 1935 (VIEIRA *et al.*, 2011). No Brasil, a doença foi diagnosticada pela primeira vez em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 1973 (COSTA *et al.*, 1973). Seu tratamento é consensualmente feito com antibióticos, em sua maioria derivados das tetraciclinas, mas outros medicamentos também são utilizados, como enrofloxacina, cloranfenicol, penicilinas e sulfonamidas. O dipropionato de imidocarb também pode ser empregado, mas testes sugerem que os animais tratados com doxiciclina (uma tetraciclina) tiveram suas plaquetas normalizadas mais rapidamente que aqueles tratados com imidocarb (PEDROSO, 2006).

Dessa forma, por conta das pequenas vantagens da doxiciclina em relação aos outros medicamentos apresentados para os tratamentos da erliquiose e da babesiose, ela foi escolhida para ser utilizada neste trabalho.

2.6. Doxiciclina

A doxiciclina é um antibiótico de amplo espectro, eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Ela pertence à família das tetraciclinas e possui ação bacteriostática (ANDRADE *et al.*, 2009). Além disso, comparada às outras tetraciclinas, a doxiciclina possui custo relativamente baixo, o que torna sua comercialização bastante atrativa (VARGAS-ESTRADA *et al.*, 2007).

Segundo SCHUSTER & DENES (2011), a dose recomendada de doxiciclina para cães para o tratamento da erliquiose e da babesiose varia entre 5 e 10 mg/kg duas vezes ao dia. Apesar de existirem formulações para aplicação intramuscular ou intravenosa (SINDAN, 2013), a medicação é feita na grande maioria das vezes por via oral (VO), porque a doxiciclina ocasiona a irritação dos tecidos quando injetada.

As tetraciclinas são consensualmente utilizadas no tratamento da erliquiose e da babesiose há muitos anos. O período de tratamento, no entanto, não é consenso entre os veterinários. O tempo mínimo costuma ser de 11 dias (GUIMARÃES, 2011), mas há profissionais que sugerem que a medicação não seja interrompida antes de ao menos 21 dias.

Deve-se destacar que apesar deste trabalho focar principalmente a aplicação veterinária da doxiciclina (cães em especial), esse medicamento também é empregado em seres humanos para o tratamento de outras enfermidades, como por exemplo a periodontite (ANDRADE *et al.*, 2009) e a leptospirose (McCLAIN *et al.*, 1984). Dessa forma, a extensão da aplicação para seres humanos, a princípio, pode ser facilmente obtida por meio da manipulação das doses de fármaco na gelatina.

Com relação à estabilidade, é importante ressaltar que quando submetida a condições drásticas de umidade, pH e temperatura, a doxiciclina sofre degradação por epimerização (formação de um diastereoisômero). Os produtos de degradação formados não possuem atividade e podem ser tóxicos (INJAC *et al.*, 2007). Além disso, a estrutura da doxiciclina é altamente complexa como pode ser observado na Figura 3. Por isso, é preciso sempre atentar para possíveis interações do fármaco com o material encapsulante, de forma a não alterar a estrutura, não ocasionar a perda do princípio ativo nem mesmo gerar compostos tóxicos.

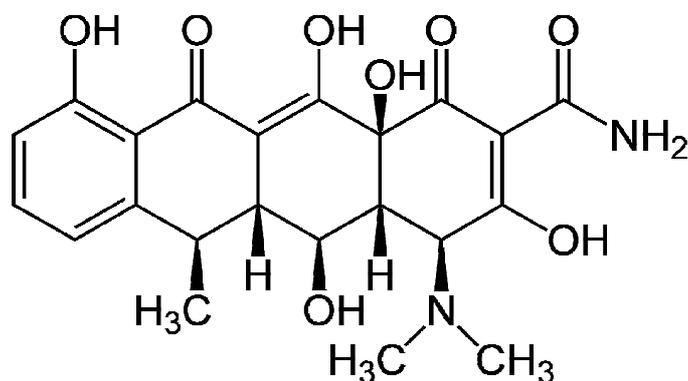


Figura 3 – Estrutura química da doxiciclina

O encapsulamento da doxiciclina permitiria não só a redução no número de doses de medicamento a serem administradas, mas também diminuiria a tendência à irritação dos tecidos nas aplicações parenterais, uma vez que o princípio ativo estaria protegido dentro da partícula de polímero. Apesar de aplicações parenterais não serem comuns por conta da irritação causada pela doxiciclina quando injetada (VARGAS-ESTRADA *et al.*, 2007), são pouquíssimos os trabalhos que visam a desenvolver um produto que possibilite a liberação controlada desse fármaco.

STOLLER *et al.* (1998) descreveram as propriedades farmacocinéticas de um sistema de liberação controlada de doxiciclina para tratamento da periodontite. O polímero estudado foi uma blenda de poli(ácido lático) e poli(D-L- lactídeo) e o fármaco era apenas misturado ao polímero imediatamente antes da aplicação. Os autores afirmam que o sistema apresenta as propriedades químicas e farmacocinéticas necessárias para o tratamento da bolsa periodontal.

A técnica de mistura dos polímeros com o fármaco empregada por STOLLER *et al.* (1998) é bastante semelhante à usada por produto comercial conhecido como ATRIDOX®, que é também utilizado para o tratamento da periodontite crônica. A formulação é composta por poli(D-L-lactídeo) dissolvido em N-metil-2-pirrolidona e doxiciclina, e quando aplicada, permite a liberação do fármaco por 7 dias (FDA, 2013).

MUNDARGI *et al.* (2007) também estudaram sistemas de liberação controlada de doxiciclina para tratamento da bolsa periodontal. Os autores escolheram a poli(ϵ -caprolactama) e o poli(D,L – lactídeo – co- glicolídeo) para a produção de microesferas carregadas com o fármaco e provaram a eficiência do sistema proposto para o tratamento. No entanto, não houve preocupação em eliminar a utilização de diclorometano, um composto altamente tóxico e cancerígeno, no preparo das micropartículas.

Outros autores propuseram sistemas de liberação controlada para o tratamento da periodontite. Dentre eles, KAU *et al.* (2013) empregaram copolímeros de poli(lactídeo) e poli(glicolídeo). OBAIDAT & HAMMAD (2009) utilizaram goma xantana, ácido hialurônico, carragenina e hidroxipropil metilcelulose. SAHOO *et al.* (2010) escolheram usar blendas de poli(caprolactama) e quitosana.

VOGT *et al.* (2004) depositaram uma patente a respeito do desenvolvimento de implantes para a liberação controlada de doxiciclina para uso humano e veterinário. A invenção consiste em prensar o fármaco com ao menos um adjuvante farmacêutico orgânico ou inorgânico, de forma a retardar a liberação do princípio ativo.

Todos os trabalhos citados têm em comum o fato de não enfocarem a modificação dos polímeros de forma a potencializar suas propriedades. Todos realizam apenas uma mistura dos materiais poliméricos já prontos com o fármaco e estudam a

farmacocinética dos sistemas. Os sistemas propostos apenas formam uma barreira física para a liberação retardada do fármaco baseada em efeitos de adsorção e de difusão.

CHUANG *et al.* (2010) estudaram o efeito da manipulação de diferentes variáveis da copolimerização via radicais livres do poli(ácido acrílico) com a quitosana na liberação da doxiciclina. As partículas foram capazes de retardar a liberação do fármaco, mas não conseguiram prolongá-la demasiadamente.

À exceção do trabalho de CHUANG *et al.*, (2010), portanto, não há ainda na literatura registros sobre tentativas de alterar as propriedades de um determinado polímero para encapsular a doxiciclina, visando a permitir a liberação controlada da mesma. Há, portanto, necessidade de desenvolver um produto que permita a liberação controlada da doxiciclina por períodos de tempo longos, para que possam ser aplicados não só no tratamento da erliquiose e da babesiose, mas também no tratamento de muitas outras enfermidades como, por exemplo, periodontite.

2.7. Comentários Finais

A gelatina é um polímero natural, biocompatível, biodegradável, de baixo custo, com baixa toxicidade e com inúmeros grupos funcionais (hidroxilas livres, carbonilas, grupamentos amino) que podem ser reticulados, dando origem uma rede altamente interconectada, capaz de encapsular fármacos hidrofílicos e permitir com isso a liberação controlada desses princípios ativos. Para que a liberação desses materiais seja gradual, no entanto, é importante que as cadeias de gelatina sejam reticuladas e essa modificação não pode dar origem a materiais tóxicos ou nocivos ao organismo.

É inquestionável o fato de que aldeídos são capazes de reticular a gelatina. Exemplos como o uso de formaldeído, glutaraldeído e glioxal são largamente encontrados na literatura. No entanto, é inquestionável também que a toxicidade destes compostos deve ser levada em consideração quando se trata de uma aplicação farmacêutica. Todos esses aldeídos, embora permitidos por lei, apresentam algum nível de toxicidade e devem, portanto, ser controlados e, sempre que possível, evitados.

Preocupados com esse fator, alguns grupos de pesquisa relatados anteriormente buscaram o desenvolvimento de materiais ou técnicas alternativos para reticular a gelatina. Em especial, aqueles que utilizaram açúcares como agentes reticulantes obtiveram resultados interessantes. De forma sucinta, todos eles propõem que é possível reticular a gelatina utilizando dextrose, glicose, sacarose ou frutose, seja em sua forma nativa ou em sua forma oxidada. No entanto, os autores, como já discutido anteriormente, não conseguem provar de maneira inequívoca que a reticulação realmente ocorre. As evidências, principalmente a redução na solubilidade das gelatinas, indicam que provavelmente há *crosslink*, mas não é possível excluir a possibilidade de que estejam ocorrendo apenas reações laterais entre a gelatina e os “agentes reticulantes” empregados ou ainda apenas interação com o fármaco (quando este está presente).

Resultados anteriores do grupo (MELO & PINTO, 2011) reforçam dados da literatura de que glicose e frutose de alguma forma interagem com a gelatina. Mas o que se observa, de uma maneira geral, é que não parece ainda haver uma boa compreensão do que ocorre quando esses materiais reagem. Dessa forma, esse trabalho visa a compreender a influência que a reação de materiais naturais (especialmente a glicose) com gelatina exercem na liberação controlada de doxiciclina, de forma a explicar em especial, as diferenças nos perfis de liberação do fármaco observadas por MELO & PINTO (2011).

Capítulo III

Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Os materiais utilizados ao longo de todo o trabalho e suas respectivas origens e purezas são listados a seguir.

3.1.1. Reagentes

Gelatinas:

- Gelatina Grau Farmacêutico – PhEur Gelatin (Sigma-Aldrich, Alemanha) – é, segundo o fabricante, uma mistura de gelatinas dos tipos A e B em proporção desconhecida. Segue as especificações da farmacopéia européia. Lote: BCBC8523;
- Gelatina de Porco – Porcine Skin Gelatin (Sigma-Aldrich, Alemanha) – Gelatina 250 Bloom, grau microbiológico. Lote: 0001259386;

Reticulantes:

- Formaldeído (VETEC, Brasil) – Teor 36,5-38%;
- D-(+)-glicose Anidra (Sigma-Aldrich, França) – Reagente ACS;
- Glicerol (VETEC, Brasil) – pureza mínima 99,5%. Máximo de 0,5% de água;

Fármaco:

- Doxiciclina hiclato (Pharma Nostra) – Data de validade: 09/2013. Origem: Hadan Juipeng Chemical Engi / Índia.

Outros materiais:

- Dodecil Sulfato de Sódio (VETEC, Brasil) – Teor mínimo 90%. Usado no preparo das soluções para GPC;
- Propileno Glicol (VETEC, Brasil) – teor mínimo 99,5%. Máximo de 0,5% de água. Utilizado como excipiente para os testes de liberação controlada;
- Acetona (VETEC, Brasil) – Reagente PA ACS, dosagem mínima 99,5%. Usada para desidratar as partículas após a reação;
- Fosfato de sódio dibásico anidro (VETEC, Brasil) – Reagente PA, teor mínimo 99%. Usado no preparo de solução tampão PBS;
- Fosfato de potássio monobásico anidro (VETEC, Brasil) – Reagente PA, teor mínimo 99%. Utilizado no preparo de solução tampão PBS;
- Cloreto de sódio (VETEC, Brasil) – teor mínimo 99%. Usado no preparo de solução tampão PBS;
- Cloreto de potássio (VETEC, Brasil) - teor mínimo 99%. Utilizado no preparo de solução tampão PBS;
- Monooleato de sorbitan, SPAN 80 (Sigma Aldrich, Estados Unidos). Usado como agente surfactante das reações;
- Óleo de Girassol (Liza, Brasil). Lote: 09C. Utilizado como fase contínua das reações.
- Padrão pré-corado para eletroforese SDS-PAGE (Bio-Rad, Estados Unidos). Proteínas: miosina – 202440 g/gmol; β -galactosidade – 116580 g/gmol; albumina de soro bovino – 98080 g/gmol; ovalbumina – 47110 g/gmol;
- Água destilada. Usada nas reações;

- Água Milli-Q. Utilizada no preparo das soluções de SDS para análises de GPC.

3.1.2. Equipamentos e acessórios

- Placa de agitação (IKA, modelo C-MAG HS7, Alemanha) com controle de temperatura por meio de termopar (IKA, modelo ETS-D5) - Utilizada para agitação e controle de temperatura das reações;
- Banho termostático (Haake, modelo C35P, EUA) com controle de temperatura e bomba de recirculação - Utilizado para controlar a temperatura do reator para as reações com formaldeído;
- Balança analítica com capacidade para pesar materiais de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A) - Utilizada na pesagem de reagentes e produtos reacionais;
- Bomba de vácuo (QUIMIS, modelo Q355D2, Brasil) e todo aparato necessário para seu funcionamento (kitassato, funil de büchner) - Utilizada para lavagem e filtração das amostras;
- Papel de filtro qualitativo (Qualy, Brasil) com 12,5 cm de diâmetro, 205 µm de espessura e maioria dos poros com 14 µm de diâmetro - Usado na filtração das amostras com a bomba de vácuo;
- Sistema de filtração Millipore completo (funil com junta, frasco coletor 1000 mL, pinça em alumínio e suporte para membrana dom 47 mm de diâmetro) – Utilizado para filtração de soluções aquosas de SDS para análises de GPC;
- Membrana para filtração (Sartorius Stedim Biotech) – Membranas de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,45 µm utilizadas para filtração de solução aquosa em sistema da Millipore;
- Bécheres com capacidades variando entre 50-500 mL, utilizados para preparo de soluções, e pesagem de reagentes;
- Estereomicroscópio binocular (NIKON SMZ 800), utilizado para visualizar a forma das partículas obtidas;

- Cromatógrafo (Phenomenex modelo TS-430 com três colunas SHODEX-OH PAK e detector refratométrico Viscotec, modelo VE3580) - Utilizado para determinação das massas molares das gelatinas. O equipamento foi calibrado com padrões de poliestireno sulfonado com massas molares na faixa de 31 até 2260×10^3 g/gmol;
- Analisador Térmico (Perkin Elmer, modelo STA-6000) – Utilizado para condução das análises termogravimétricas (TGA) dos materiais;
- Infravermelho com Transformada de Fourier (Thermo, modelo Nicolet 6700) – Utilizado para análises de FTIR das amostras. O equipamento é equipado com um acessório Smart Orbit que possui um diamante na área de leitura e permite a análise de amostras sólidas sem a necessidade de preparar pastilhas;
- Analisador de tamanho de partículas (Malvern, Mastersizer 2000) – O equipamento possui um sistema de detectores para espalhamento frontal, lateral e posterior de luz. A fonte é um laser néon de hélio, cujo comprimento de onda característico é de 632,8 nm. Seu limite de detecção varia entre 0,1 e 1000 micra. Foi empregado para determinação dos tamanhos médios e distribuição de tamanhos de partícula.

3.2. Métodos

3.2.1. Reações

O procedimento adotado para as reações é descrito detalhadamente a seguir.

3.2.1.1. Reações sem formaldeído

Foram preparadas inicialmente duas misturas. Uma delas continha óleo de girassol e SPAN 80 na temperatura de reação e a outra continha água, glicose ou glicerol (a depender da reação) e gelatina.

Visto que a gelatina inicia seu processo de degradação quando submetida a altas temperaturas por longos períodos, o procedimento de solubilização adotado visava a minimizar o tempo de exposição da gelatina a essas condições e, por isso, não seguia nenhum método particular descrito na literatura. Assim, o glicerol ou glicose eram solubilizados a 60 °C e só então a gelatina era adicionada, sem a etapa prévia de inchamento. Nos casos em que o fármaco foi empregado na reação, ele foi solubilizado junto com a glicose na temperatura de 60 °C.

A solução aquosa contendo fármaco, glicose ou glicerol e gelatina era então vertida no óleo contendo SPAN80 e essa mistura era mantida sob agitação magnética a cerca de 700 rpm, segundo manual da placa utilizada, e temperatura controlada durante 30 minutos. Não foi observada formação significativa de espuma (fenômeno comum em soluções de gelatina) nas reações realizadas com as condições reacionais descritas.

Terminada a reação, a mistura era resfriada até 10 °C com auxílio de um banho de gelo, e 50 mL de acetona eram adicionados para desidratar as partículas. Após permanecer sob agitação por ao menos 5 minutos em presença de acetona, o produto era então filtrado a vácuo e lavado com mais 100 mL de acetona, para remoção do óleo e água residuais.

O produto final era mantido em dessecador na temperatura ambiente.

3.2.1.2. Reações com formaldeído

As reações conduzidas na presença de formaldeído incluíram uma etapa adicional, descrita abaixo.

Após o término da reação com a glicose, que no caso das reações com formaldeído tinha duração de apenas 20 minutos, a mistura era resfriada como no caso anterior (sem formaldeído). Antes da adição da acetona, no entanto, 2 mL de solução de formaldeído 10% eram adicionadas e a mistura mantida sob agitação magnética intensa a 10 °C, com auxílio de um reator de 100 mL, encamisado por mais 2 horas.

Terminado o período de 2 horas de reação, o procedimento anterior era retomado e, portanto, era adicionada acetona e em seguida era feita a filtração e a lavagem do produto.

3.2.2. Caracterização

3.2.2.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A técnica de GPC foi empregada para determinação das massas molares das gelatinas. Tanto reagentes como produtos foram caracterizados, de forma a possibilitar o acompanhamento da evolução das massas molares de acordo com as reações realizadas.

O procedimento experimental envolvido no preparo das amostras, adaptado de DUPONT (2002), consistiu na solubilização de cerca de 1 mg de gelatina em 1 mL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) recém preparada. Essa mistura, após solubilização, foi filtrada com auxílio de um filtro de teflon de 0,22 μm e injetada no cromatógrafo, seguindo as seguintes condições:

- Volume de injeção: 200 μL ;
- Vazão de operação: 0,5 mL/min
- Temperatura: 40 °C
- Tempo de análise: 80 min
- Solvente: Solução de SDS 18 g/L preparada segundo procedimento descrito a seguir.

Preparo da Solução de SDS para GPC

A solução utilizada para a análise de GPC da gelatina foi preparada cuidadosamente, segundo especificações de DUPONT (2002). Primeiramente, era preparada a solução na concentração de 18 g de SDS por litro de água Milli-Q. Após a solubilização completa do dodecil sulfato de sódio, a solução era então filtrada com auxílio de um sistema de filtração da Millipore®, específico para filtração de soluções aquosas. Para isso, foi empregada uma membrana de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45 μm .

Vale ressaltar que a água Milli-Q não deve ser estocada por períodos longos. Dessa forma, apenas pequenos volumes de solução eram preparados, de forma que fosse totalmente consumida em cerca de 3 a 5 dias, para não comprometer a análise ou bom funcionamento do equipamento. Esse procedimento é definido pela ASTM (2011) e

deve ser adotado devido à possibilidade de haver crescimento microbiano e também porque o recipiente utilizado para armazenagem, que deve ser de plástico, sempre pode transferir íons para a água, comprometendo as análises.

3.2.2.2. Análises Termogravimétricas (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas na faixa de 50 a 650 °C e a temperatura foi elevada a uma taxa de 10 °C/min. As amostras foram preparadas colocando cerca de 10 – 20 mg de material em um cadinho de alumina adequada para o uso no equipamento. As análises foram conduzidas em atmosfera inerte, por conta da utilização de nitrogênio na vazão de 20 mL/min.

3.2.2.3. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas na região do infravermelho médio (4000- 400 cm^{-1}) em modo de reflexão total e com resolução de 4 cm^{-1} . Cada espectro era registrado como resultado da média de 128 scans.

Uma vez que o equipamento possui acessório Smart Orbit, que permite a utilização direta da amostra em pó, sem a necessidade de preparo de pastilhas, o único procedimento de preparo das amostras consistia em macerá-las, quando eram identificados aglomerados.

3.2.2.4. Distribuição de Tamanhos de Partícula (Malvern)

A determinação da distribuição de tamanhos de partícula dos materiais foi feita com auxílio da técnica de difratometria a laser. As amostras foram preparadas dispersando cerca de 200 mg de amostra em 5 mL de etanol.

3.2.2.5. Eletroforese

As gelatinas comerciais foram caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de forma a possibilitar a avaliação da pureza e a distribuição de massas molares das subunidades das proteínas (ANVISA, 2010). Para isso, foi preparado um gel de poliacrilamida na concentração de 7,5%, uma vez que a gelatina possui massas molares da ordem de 100- 300 x 10³ g/gmol. O preparo do gel seguiu as condições predefinidas por LAEMMLI (1970).

Um sistema da Bio-Rad foi empregado e a corrente aplicada no momento da corrida do gel foi de 35 mA.

O procedimento experimental envolvido no preparo das amostras consistiu na solubilização de cerca de 12 mg de gelatina em 1 mL de água Milli-Q. Essa solução foi empregada então como solução mãe, uma vez que optou-se por realizar a eletroforese em três concentrações diferentes para cada amostra de gelatina.

3.2.2.6. Teste de Escoamento em Pipeta

Uma das formas de determinar de maneira simples e rápida o aumento ou diminuição da viscosidade de uma mistura é realizando um teste de escoamento em pipeta. O procedimento consiste em primeiro preparar a mistura que se deseja analisar, e em seguida, com auxílio de uma pipeta de 1 mL e uma pera, sugar o líquido até o limite indicado pela pipeta. Em seguida, a pera é retirada e o tempo que o material leva para escoar completamente é medido com auxílio de um cronômetro.

É importante ressaltar que, como a viscosidade é muito dependente da temperatura, os testes devem ser realizados na mesma temperatura. Nesse caso, foi escolhido conduzir os experimentos a cerca de 30 °C.

3.2.2.7. Testes de Liberação Controlada

Testes de liberação controlada *in vitro* para aplicações farmacêuticas possuem regras específicas que devem ser seguidas, de forma a não somente padronizar os testes, permitindo assim a comparação entre dados de diferentes grupos de pesquisa, mas

também de fazer com que sejam o mais próximos de um teste *in vivo*, minimizando as discrepâncias entre os resultados. Por conta desta especificidade, essas análises costumam ser encomendadas a empresas especializadas, o que encarece e muitas vezes atrasa muito o andamento da pesquisa. Dessa forma, tornou-se uma prática bastante comum desenvolver testes de liberação semelhantes aos especificados pelas farmacopeias, de forma que apenas os materiais que apresentam melhor desempenho sejam enviados para análise profissional.

Apesar de serem inúmeros os tipos de análise descritos pelas farmacopeias, não há ainda testes específicos para aplicações parenterais (CHAIBVA & WALKER, 2007; SIEWERT et al., 2003; USP, 2009a; USP, 2009b). Dentre os testes existentes, no entanto, existe um que se aproxima mais da realidade da aplicação intramuscular, que é o teste que emprega células de difusão vertical. Esse aparato é comumente empregado para avaliação *in vitro* de medicamentos de uso tópico, mas será empregada nesse estudo para avaliação da liberação intramuscular.

Vale ressaltar que, por conta da grande diferença existente entre os muitos testes disponíveis, não é possível comparar resultados de testes diferentes entre si. Há relatos, por exemplo, de que os testes com membrana de diálise não permitem a liberação completa da droga e que, além disso, seus perfis de liberação costumam ser mais lentos (D'SOUZA & DeLUCA, 2006). Dessa forma, a realização do teste *in vitro* não é capaz de excluir a necessidade da realização do teste *in vivo*.

A descrição completa do teste padrão pode ser visualizada em USP (2009b) e HANSON (2010). Aqui será apenas descrito o sistema de liberação controlada proposto para esse trabalho, como ilustra a Figura 4.

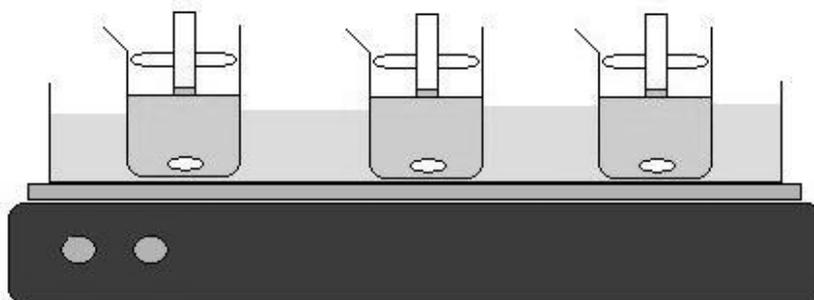


Figura 4 – Ilustração do sistema de liberação controlada utilizado para testes.

O procedimento adotado para o teste é apresentado a seguir:

- (i) Primeiramente, três pedaços de cerca de 5 cm de membrana de diálise de acetato de celulose devem ser colocados em um bécher com água destilada a aproximadamente 100 °C durante ao menos 30 minutos;
- (ii) Um banho de água a 37 °C é colocado em uma placa de aquecimento com agitação magnética com cinco pontos;
- (iii) Visando a manter a temperatura do banho o mais homogênea possível, um agitador magnético é posicionado no centro da placa;
- (iv) A doxiciclina e o excipiente escolhido são pesados, misturados e colocados dentro de um tubo, cuja ponta deve estar recoberta com a membrana de diálise já saturada;
- (v) Bécheres de 100 mL são então preenchidos com 80 mL de tampão fosfato salino (pH 7,2-7,4) e colocados na placa, para entrarem em equilíbrio térmico com o banho;
- (vi) O tubo com a membrana pode então ser posicionado de forma a apenas tangenciar a superfície do tampão, sendo mantido dessa maneira até o final do teste de liberação;
- (vii) Vale ressaltar que, para evitar a evaporação do tampão, o tubo deve ser inserido em uma espécie de rolha de isopor perfeitamente ajustada ao diâmetro do bécher utilizado no teste;
- (viii) Alíquotas de 2 mL são retiradas ao longo do tempo para posterior análise no espectrofotômetro de UV-Vis para determinação do percentual de liberação. Entretanto, para que o nível de líquido no bécher não diminua, a cada alíquota retirada, a mesma quantidade de tampão fresco deve ser adicionada.

3.2.2.8. Determinação do Percentual de Doxiciclina Encapsulada

Para determinar o percentual de doxiciclina liberada ao longo do tempo por meio dos testes de liberação descritos anteriormente, é imprescindível conhecer primeiro a eficiência de encapsulamento do fármaco. Para isso, foi elaborado um teste que consiste em adicionar 50 mg de amostra a 10 mL de água destilada e manter a 50 °C sob agitação magnética lenta durante 48 horas. Ao final deste período, as misturas são filtradas em filtro de seringa de 0,45 µm e analisadas com auxílio de um espectrofotômetro UV.

É importante ressaltar que, contrariamente aos testes de liberação, que foram realizados com tampão PBS, a determinação do percentual total de doxiciclina encapsulada deve ser realizado em água destilada. Isso ocorre porque, quando exposta a temperaturas mais elevadas na presença do tampão, a doxiciclina passa para uma coloração marrom escura, indicação de degradação do fármaco.

3.2.2.9. Espectrofotometria no Ultravioleta (UV)

A espectrofotometria UV foi empregada para acompanhar o percentual de liberação da doxiciclina com relação ao tempo. Para isso, foi necessário primeiramente construir duas curvas de calibração. Na primeira, Figura 5, preparou-se uma solução mãe de 0,4 mg/mL de doxiciclina em água destilada. A partir desta solução, foram feitas diluições para obtenção de soluções nas concentrações de 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 mg/mL. A amostra mais concentrada (0,4 mg/mL) não ficou compreendida na parte linear da curva (lei de Lambert-Beer) e foi, portanto, descartada.

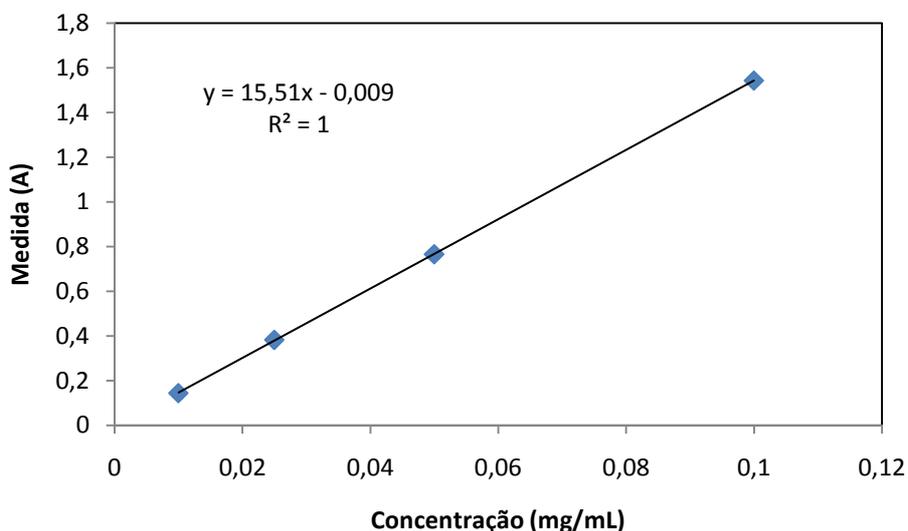


Figura 5 – Curva de calibração do UV de solução de doxiciclina usando água como solvente.

Como já discutido anteriormente, a curva de calibração em água é empregada para determinação do percentual total de doxiciclina encapsulada, enquanto a curva de calibração com tampão é usada para determinação do percentual de doxiciclina durante a realização dos testes de liberação.

O procedimento para construção da curva com tampão, Figura 6, foi o mesmo utilizado com a água. Mais uma vez, a solução de 0,4 mg/mL não ficou compreendida dentro da região linear e foi descartada.

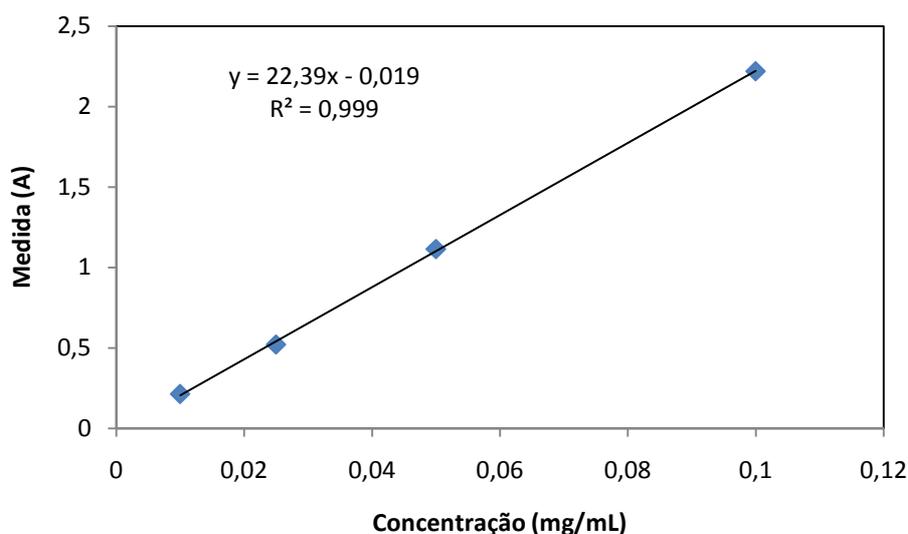


Figura 6 – Curva de calibração do UV de solução de doxiciclina usando tampão PBS como solvente.

Ambas as calibrações apresentaram coeficiente de correlação bastante elevado, o que garante confiabilidade ao ajuste. As equações exibidas nos gráficos foram então utilizadas com sucesso nos cálculos de percentual de doxiciclina.

O comprimento de onda empregado nas análises foi o de 345 nm, que foi previamente determinado por MELO & PINTO (2011) e corresponde ao pico de máximo de absorção da doxiciclina.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

4.1. Compilação dos Resultados de MELO & PINTO (2011)

Como mencionado anteriormente, o trabalho desenvolvido nesta dissertação foi fortemente motivado pela observação em trabalho anterior do grupo (MELO & PINTO, 2011) de que a interação da gelatina (gelatina comercial obtida a partir de osso bovino) com açúcares como frutose e glicose altera significativamente a cinética de liberação da doxiciclina.

MELO & PINTO (2011) apresenta evidências experimentais compatíveis com dados da literatura, que indicam que a alteração no perfil de liberação pode ser fruto da reticulação das cadeias de gelatina pelos açúcares.

O autor apresenta resultados, no entanto, contrários à literatura, que garante que a reticulação da gelatina com formaldeído é tão maior quanto maior for o tempo de reação. Para MELO & PINTO (2011) fica claro que, quanto maior o tempo de reação, mais rápida é a liberação da doxiciclina, o que não é compatível com a ideia de um maior grau de reticulação, em que seria esperado comportamento inverso.

Os principais resultados do autor são apresentados na Tabela 2 e na Figura 7.

Vale ressaltar que, para MELO & PINTO (2011), o melhor resultado do teste de liberação controlada foi obtido utilizando as condições do Teste 39, em que glicose e formaldeído foram empregados simultaneamente.

Tabela 2 – Resultados de trabalho anterior do grupo (Adaptado de MELO & PINTO, 2011).

Teste	Água (g)	Formaldeído (mL)	Glicose (g)	Frutose (g)	Doxiciclina (g)	Tamanho partícula (µm)	Tamanho aglomerado (µm)	t ₁ reação (min)	t ₂ reação (h)	% inicial fármaco	% final fármaco	% liberação	Tempo medição (min)
33	15	1	0	0	0,75	35	130	0	2	33,3	12,6	43	45
34	10	0	0,5	0	0,75	15	115	5	0	27,7	16,7	60	300
35	10	0	0,5	0	0,75	15	130	20	0	27,7	18,8	67	300
36	15	1	0	0	0,75	40	144	0	5	33,3	12,8	60	180
37	10	0	0	0,5	0,75	15	130	5	0	27,7	22,98	65	300
38	10	0	0	0,5	0,75	-	161	20	0	27,7	19,1	70	300
39	10	2	0,5	0	0,75	-	123	20	2	27,7	17,6	38	180
40	10	2	0	0,5	0,75	80	157	20	2	27,7	14,1	47	300
41	10	2	0	0,5	0,75	-	96	20	5	27,7	12,9	60	300
42	10	2	0,5	0	0,75	-	171	20	5	27,7	14,9	50	180

onde: t₁ reação – tempo de reação com glicose ou frutose antes da adição de formaldeído;

t₂ reação – tempo de reação após a adição de formaldeído;

% liberação – é o percentual de liberação no tempo correspondente ao tempo de medição (informado na coluna posterior);

Tempo de medição – tempo de duração do teste de liberação.

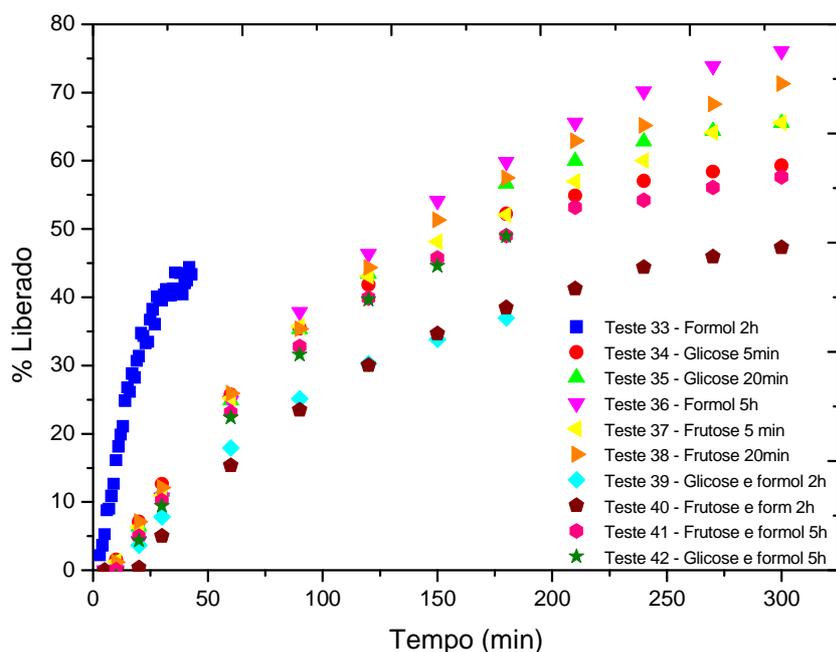


Figura 7 – Perfis de liberação da doxiciclina obtidos por MELO & PINTO (2011).

A seguir é feita uma análise preliminar com base nos dados do autor apresentados na Tabela 2 e na Figura 7.

4.1.1. Análise Preliminar dos dados de MELO & PINTO (2011)

Com base em análises feitas a partir dos dados apresentados anteriormente, foi possível extrair algumas informações importantes para nortear o trabalho a ser iniciado.

Observando os testes em que somente formaldeído foi empregado como reticulante (Testes 33 e 36) e apenas o tempo reacional foi alterado, é possível observar que aparentemente o aumento do tempo ocasiona uma diminuição na velocidade de liberação da doxiciclina. Esse resultado reafirma dados da literatura que mostram que aldeídos em geral são capazes de reticular a gelatina. Quando reticulada a gelatina, tem sua solubilidade diminuída, o que dificulta, portanto, a liberação do fármaco, como observado na Figura 7.

Observando individualmente, no entanto, os pares de testes 34 e 35, 37 e 38, 39 e 42, 40 e 41 (identificados por cores na Tabela 2), é possível notar que, quanto maior o tempo de reação, mais rápida é a liberação da doxiciclina. Esse comportamento não é compatível com uma possível reação de reticulação das cadeias proteicas, em que um período maior de exposição ao reticulante ocasionaria a redução da velocidade de liberação da droga. No entanto, deve ser observado que a elevação do tempo reacional significa também o aumento do tempo de exposição da gelatina a temperaturas altas, o que acelera o processo de degradação da gelatina. Dessa forma, a extensão do tempo de reação e o consequente aumento da degradação da gelatina parece exercer nesse caso, efeito preponderante ao de reticulação e, portanto, deve ser evitado, de forma a garantir um perfil de liberação lento do fármaco encapsulado.

Além disso, de forma a permitir uma análise mais clara do percentual de encapsulamento da doxiciclina, foi proposto um cálculo de eficiência de encapsulamento, onde:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \frac{\% \text{ final de fármaco}}{\% \text{ inicial de fármaco}} * 100 \quad [2]$$

Os resultados desse cálculo são apresentados na Tabela 3 e discutidos a seguir.

Tabela 3 – Cálculo da eficiência de encapsulamento dos testes de MELO & PINTO (2011).

Teste	Eficiência de Encapsulamento (%)
33	38
34	60
35	68
36	38
37	83
38	69
39	64
40	51
41	47
42	54

As maiores eficiências de encapsulamento foram obtidas nas reações em que glicose ou frutose foram empregadas sem adição posterior de formaldeído. Além disso, mesmo nas reações em que o formol foi adicionado, a presença dos açúcares exerceu influência positiva no percentual de fármaco final. Isso pode ser comprovado quando se observam os testes 33 e 36, em que apenas formaldeído foi utilizado, que apresentam os piores resultados em termos de eficiência de encapsulamento.

Dessa forma, combinando os resultados dos perfis de liberação da doxiciclina com os de eficiência de encapsulamento, é possível afirmar que a utilização dos açúcares glicose e/ou frutose parece exercer influência muito positiva no encapsulamento do fármaco com gelatina. Além disso, há indicações de que a glicose e a frutose são capazes de reticular a gelatina, uma vez que permitem a liberação ainda mais lenta da droga do que quando apenas formol é empregado com a mesma finalidade.

Com relação ao tamanho de partícula, que é uma variável importante para o estudo por conta da necessidade de obtenção de materiais com tamanho controlado, é possível notar que aparentemente a utilização de formol ocasiona aumento no tamanho das partículas. A Figura 8 mostra uma tendência de aumento de tamanho, à medida que a concentração de formol no meio é elevada. Vale ressaltar que quando o volume de formol é zero, a média de tamanho de partícula obtida foi a mesma para todos os experimentos (vide Tabela 2).

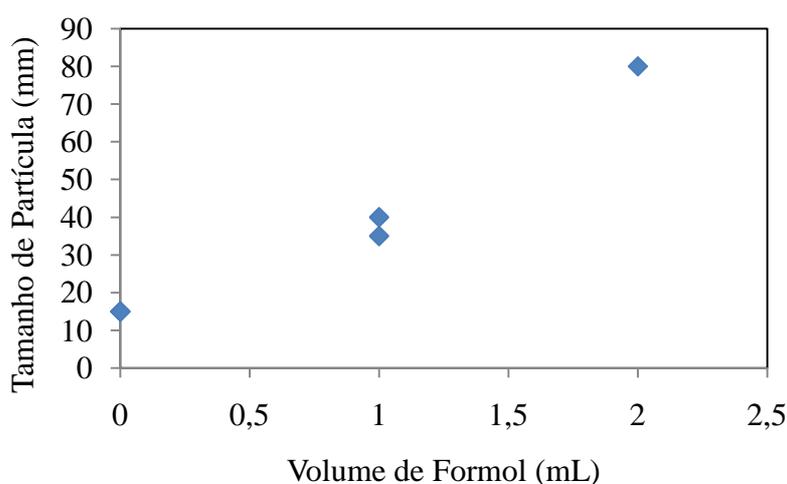


Figura 8 – Gráfico da relação entre média de tamanhos de partícula e volume de formol dos experimentos de MELO & PINTO (2011).

Os resultados de MELO & PINTO (2011), portanto, indicam que a gelatina parece ser um material adequado para o encapsulamento da doxiciclina. Além disso, os resultados mostram os testes realizados sem adição de formaldeído tiveram desempenho superior aos que empregaram aldeído. Isso mostra que é possível utilizar materiais naturais não tóxicos para o desenvolvimento de um produto de liberação controlada de fármacos utilizando gelatina como principal matéria-prima.

No entanto, são necessários testes complementares para compreender melhor como a glicose e frutose influenciam as variáveis estudadas.

4.2. Caracterização das Gelatinas Comerciais

Segundo resolução da ANVISA RDC nº 305 (2012), não é permitida a utilização de material de partida obtido de tecidos ou fluidos de animais ruminantes. Por isso, a utilização de gelatina advinda de pele bovina para aplicações médicas e farmacêuticas fica proibida no Brasil.

Assim, após a análise preliminar dos dados de MELO & PINTO (2011) e da realização de uma extensa pesquisa bibliográfica, foi determinado que seriam utilizadas duas gelatinas diferentes ao longo do estudo, sendo a primeira de origem suína e a segunda compatível com as especificações da Farmacopeia Europeia, sendo, portanto, considerada gelatina grau farmacêutico.

A partir deste ponto, as gelatinas usadas receberão as seguintes denominações:

- Gelatina de porco – para a gelatina que possui origem suína;
- Gelatina PhEur – para a que possui grau farmacêutico. PhEur é uma referência à adequação à Farmacopeia Europeia, comumente abreviada como PhEur.

Portanto, primeiramente, as gelatinas comerciais foram cuidadosamente caracterizadas. Essa caracterização é indispensável para reconhecer possíveis semelhanças e diferenças entre esses materiais, uma vez que, a depender do tipo de

tratamento a que são submetidas e da origem que tiveram, as gelatinas apresentam características bastante distintas, que podem exercer influência muito significativa nos resultados finais obtidos.

4.2.1. Análise Morfológica

Considerando a importância da utilização de partículas de gelatina no formato esférico para aplicações médicas e farmacêuticas (SANTOS, 2007), foram tiradas fotografias em microscópio óptico para observar a morfologia das partículas de gelatina adquiridas, como pode ser observado na Figura 9.

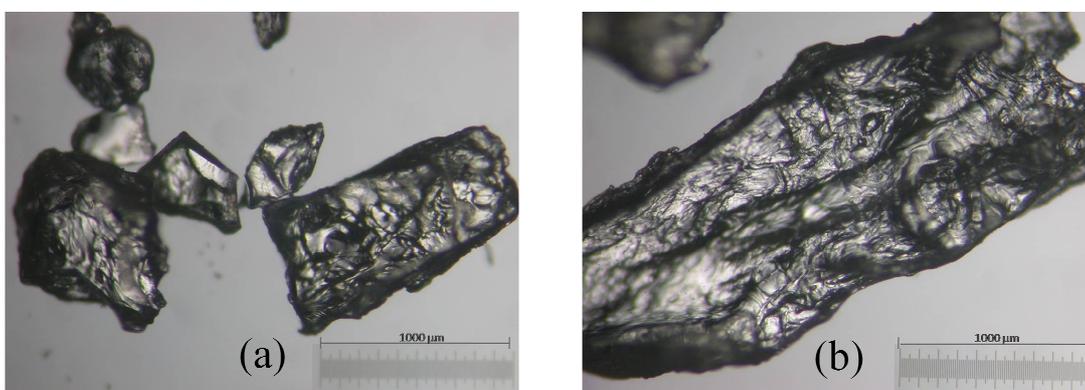


Figura 9 – (a) Morfologia das partículas de gelatina PhEur e (b) das partículas de gelatina de porco.

Ambas as gelatinas apresentam morfologia bastante irregular. Isso ocorre porque, quando fabricadas, as gelatinas são extrusadas e então cortadas em pequenos pedaços (SCHRIEBER & GAREIS, 2007). Dessa forma, para obter partículas no formato esférico, é necessário tratamento posterior desses materiais.

Além disso, observando grupos maiores de partículas, como indica a Figura 10, é possível notar que o tamanho das partículas da gelatina de porco é bastante superior ao da gelatina PhEur.

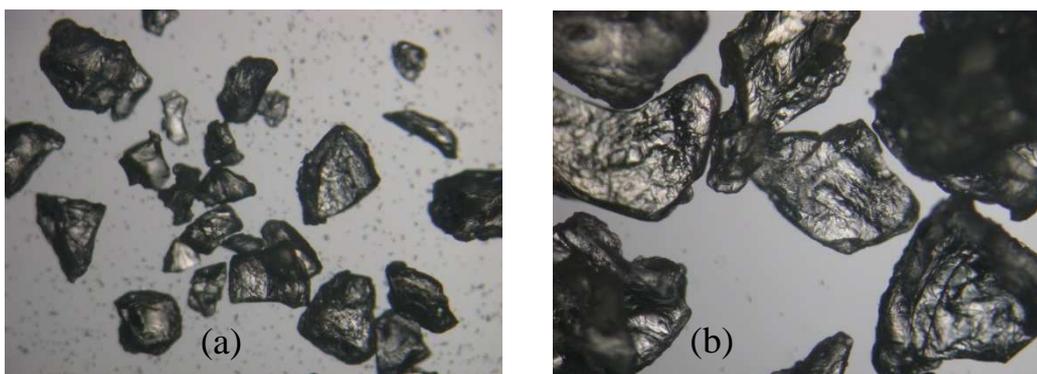


Figura 10 – Fotografias das gelatinas na mesma escala sendo: (a) Partículas de gelatina PhEur e (b) Partículas de gelatina de porco.

4.2.2. Distribuição de Tamanhos de Partícula

As diferenças observadas nos tamanhos das partículas de gelatina com auxílio do microscópio motivaram a realização de análises de Malvern, de forma a caracterizar as distribuições iniciais de tamanhos. Os resultados são apresentados na Figura 11.

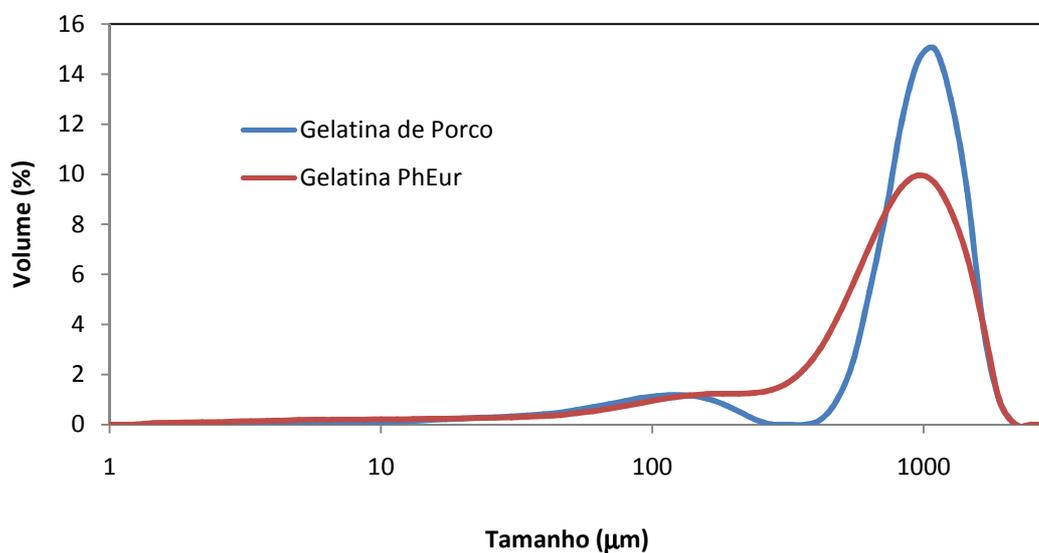


Figura 11 – Distribuição de tamanhos de partícula das gelatinas comerciais.

É importante frisar que apenas por meio de uma análise visual já é possível notar diferenças bastante significativas nos tamanhos de partícula das duas gelatinas

analisadas. No entanto, análise de Malvern não foi capaz de evidenciar de forma contundente essa diferença, pois o limite máximo de detecção do equipamento foi atingido. Mesmo assim, observa-se claramente que a distribuição de partículas da gelatina PhEur é ligeiramente mais larga e mais deslocada para tamanhos menores, enquanto a gelatina de porco apresenta tamanhos maiores e distribuição mais estreita. Deve-se ainda considerar que a morfologia das partículas é muito irregular, o que compromete a qualidade das medidas de espalhamento de luz.

4.2.3. Análise de Massa Molar

Além da distribuição de tamanhos de partícula e da morfologia, é de suma importância também caracterizar as massas molares das gelatinas, principalmente porque um dos objetivos do trabalho é o de estudar a influência da evolução das massas molares (reticulação) na cinética de liberação da doxíciclina.

Dessa forma, é importante conhecer a distribuição de massas molares das proteínas comerciais adquiridas. Os resultados são apresentados na Tabela 4 e os cromatogramas podem ser observados no Apêndice A.

Tabela 4 – Massas molares das gelatinas comerciais obtidas através de análise de GPC.

	Gelatina PhEur	Gelatina de Porco
Mn (g/gmol)	67275	51304
Mw (g/gmol)	196607	155895
Mz (g/gmol)	526420	394661
Mw/Mn	2,9	3,0

Os resultados indicam que a gelatina PhEur apresenta massa molar ligeiramente superior à da gelatina de porco.

O índice de polidispersão (Mn/Mw) retrata o processo pelo qual a gelatina é produzida, conhecido como condicionamento. Como já comentado anteriormente, ao

serem submetidas a esse tratamento, as moléculas de colágeno são quebradas em fragmentos de diversos tamanhos, o que dá origem a uma distribuição de massas molares cujo índice de polidispersão é igual ou maior que 2 (SCHRIEBER & GAREIS, 2007).

4.2.4. Eletroforese

Outra técnica empregada para determinação das massas molares e avaliação da pureza de materiais proteicos é a eletroforese.

Como em cada gel é possível correr até 10 amostras, foram escolhidas três diferentes concentrações de cada gelatina. A ordem em que foram dispostas e suas respectivas concentrações são apresentadas a seguir.

- N°1 – Padrão pré-corado SDS-PAGE
- N°2 – Gelatina PhEur – Concentração de 0,0129 mg/ μ L
- N°3 – Gelatina PhEur – Concentração de 0,0086 mg/ μ L
- N°4 – Gelatina PhEur – Concentração de 0,0043 mg/ μ L
- N°5 – Gelatina de porco – Concentração de 0,0123 mg/ μ L
- N°6 – Gelatina de porco – Concentração de 0,0082 mg/ μ L
- N°7 – Gelatina de porco – Concentração de 0,0041 mg/ μ L
- N°8 – Tampão de SDS (para detectar possíveis contaminações)

O gel de poliacrilamida de 7,5% mostrou-se acertado para a visualização das bandas dos materiais analisados. Além disso, a escolha das concentrações das gelatinas foi adequada para observar com clareza a separação dos materiais. Aquelas de maior concentração (N°2 e N°5), entretanto, apresentam bandas mais intensas e, portanto, mais visíveis.

Com o gel obtido (Figura 12) é possível notar que as gelatinas consistem em uma mistura de fragmentos com diferentes massas molares. Além disso, nota-se que aparentemente a maior parte do material possui Mw situado entre 116580 e 202440 g/gmol por conta da intensidade das bandas nessa região. No entanto, observa-se também, especialmente para a gelatina de porco, uma banda mais fraca na região próxima à albumina de soro bovino (Mw = 98080 g/gmol).

Dessa forma, a eletroforese confirma os resultados obtidos por meio da análise de GPC.

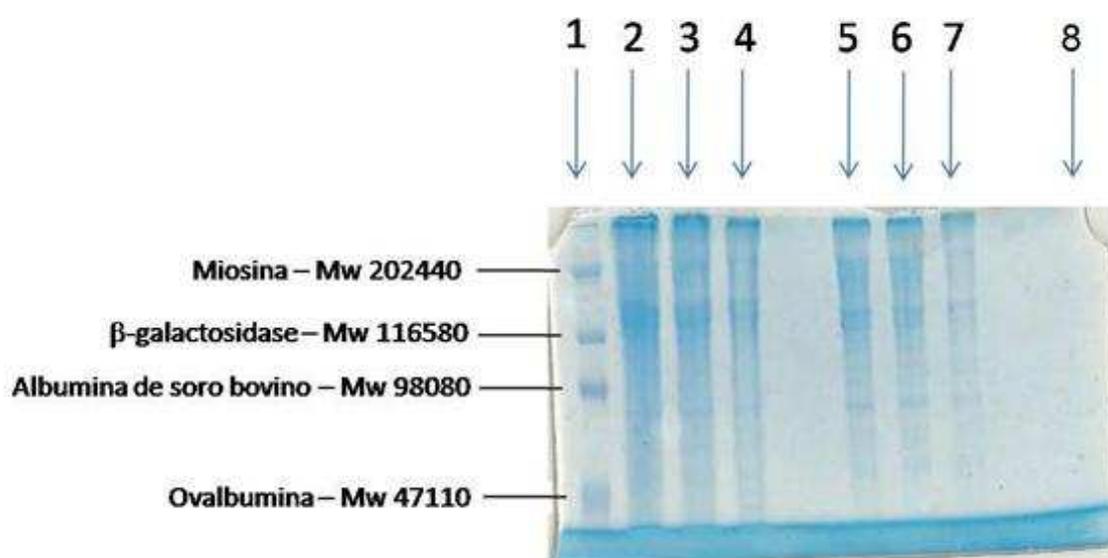


Figura 12 – Gel de eletroforese das gelatinas comerciais.

4.2.5. Análise de Composição de Aminoácidos

A análise de composição de aminoácidos foi encomendada à empresa Biosynthesis, situada no Texas, EUA. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Os resultados obtidos são coerentes com dados da literatura, que indicam que a gelatina não apresenta em sua composição os aminoácidos cisteína e triptofano (EASTOE, 1955).

Tabela 5 – Resultados da análise de composição de aminoácidos das gelatinas comerciais.

Aminoácido	Gelatina PhEur	Gelatina de porco
	Composição (%)	Composição (%)
Hidroxiprolina	13,47	12,84
Ácido aspártico e Asparagina	5,51	5,25
Serina	2,82	2,78
Ácido glutâmico e Glutamina	10,11	9,72
Glicina	21,18	21,51
Histidina	1,32	1,33
Arginina	8,67	8,84
Treonina	1,86	1,85
Alanina	8,60	8,54
Prolina	13,14	13,96
Cisteína	0,00	0,00
Tirosina	0,65	0,86
Valina	2,09	1,68
Metionina	0,71	0,91
Lisina	3,93	3,97
Isoleucina	1,23	1,13
Leucina	2,82	2,75
Fenilalanina	1,99	2,08
Triptofano	0,00	0,00

O conhecimento da composição de aminoácidos da gelatina é importante, uma vez que pequenas variações no percentual de um determinado aminoácido podem significar a presença ou ausência de um grupo funcional específico, o que pode ser crucial para a reação que se deseja realizar.

De acordo com a literatura, não há diferença significativa entre as composições de aminoácidos de gelatinas obtidas de peles de suínos e de pele de bovinos (GMIA, 2012). Essa informação é confirmada com os dados da Tabela 5. Portanto, parece lícito dizer que as gelatinas estudadas são similares e diferem principalmente em relação à distribuição de massas molares.

4.2.6. Análise Termogravimétrica (TGA)

A gelatina, por ser uma proteína, é muito sensível a elevações de temperatura. Isso ocorre porque, quando submetidas a temperaturas altas, as proteínas iniciam um processo de desnaturação. É importante, portanto, conhecer a temperatura em que esse processo se inicia, de maneira que ele possa ser evitado para não comprometer as propriedades do material. Por isso, foram feitas análises de TGA das gelatinas PhEur e de porco, que são apresentadas na Figura 13 e na Figura 14.

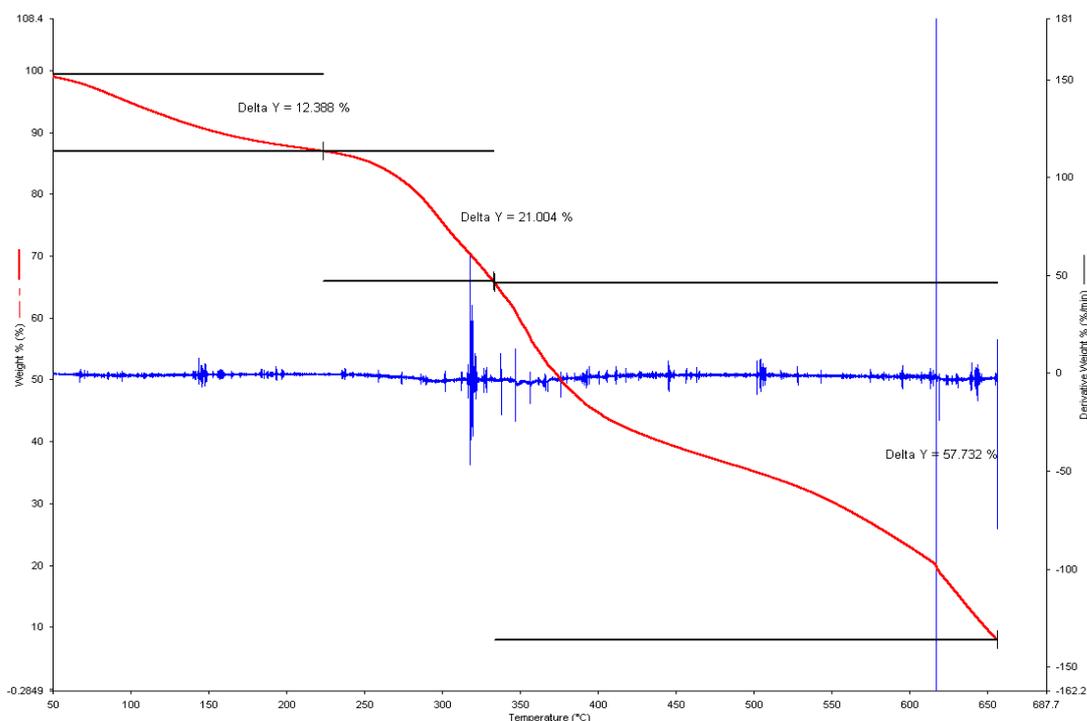


Figura 13 – Termograma de TGA da gelatina PhEur.

Apesar da perda de massa só começar a ser muito significativa a temperaturas um pouco mais elevadas, da ordem de 100-200 °C, a desnaturação do material e perda de massa já pode ser notada ainda antes da temperatura inicial da análise, que é de 50 °C. Dessa forma, sempre que possível, a utilização de temperaturas superiores a 50 °C deve ser evitada de forma a preservar a estrutura da gelatina. Como a perda de massa na região de 50 a 150 °C é praticamente linear, é pouco provável que diga respeito à perda de água livre, que tende a aumentar nas temperaturas ao redor de 100 °C.

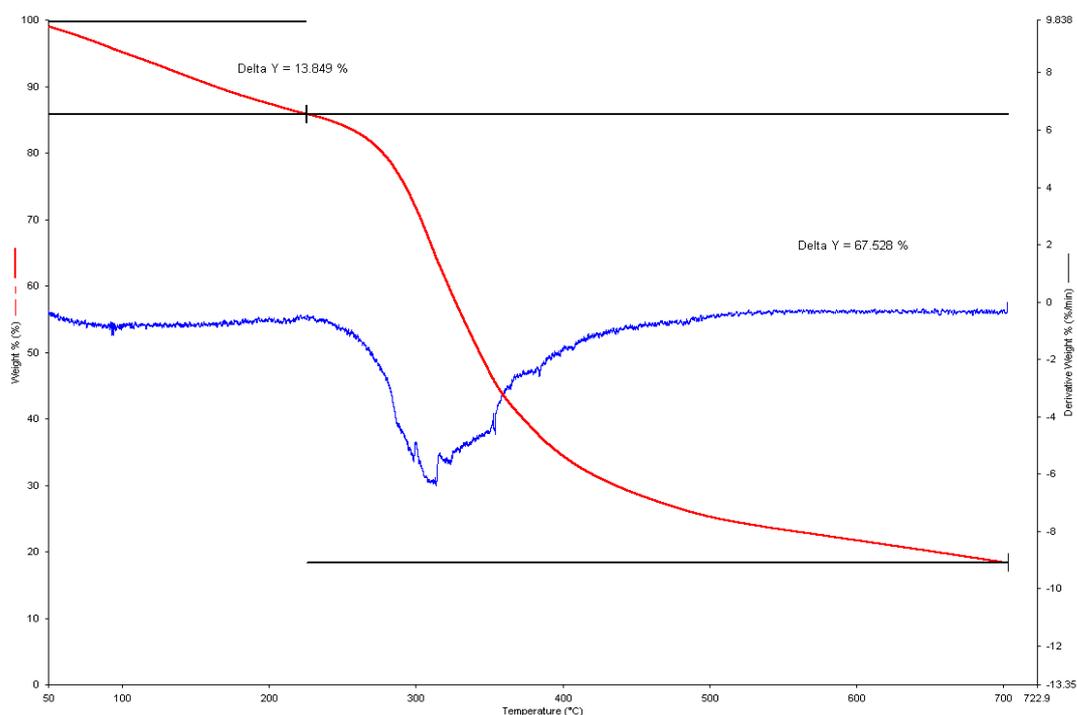


Figura 14 – Termograma de TGA da gelatina de porco.

4.2.7. Determinação do pH das Gelatinas em Solução

A determinação do pH das gelatinas comerciais em solução foi feita dissolvendo 1 g de amostra em 10 mL de água. A medida foi feita a 60 °C, temperatura em que a gelatina é normalmente solubilizada.

Os resultados obtidos foram bastante próximos, como indica a Tabela 6.

Tabela 6 – Medidas de pH das gelatinas comerciais em solução.

Tipo de Gelatina	pH
PhEur	5,76
Porco	5,51

O conhecimento do pH em solução permite a determinação do tipo de tratamento a que a gelatina foi submetida. Nesse caso, portanto, ambas as gelatinas foram produzidas provavelmente pelo processo de condicionamento em meio ácido (GMIA, 2012).

4.3. Primeiro Grupo de Reações

De forma a buscar uma melhor compreensão dos dados de MELO & PINTO (2011), foi proposto um conjunto de novas reações, nas quais foram variadas a concentração de glicose, a temperatura, o tipo de reticulante e o tipo de gelatina, como indica a Tabela 7. Para essas reações, a doxíciclina não foi adicionada à receita, pois o objetivo era estudar primeiramente a natureza das transformações ocorridas na gelatina durante o processo de formação da partícula. A formulação base, contendo 120 g de óleo, 30 g de água, 3 g de gelatina e 6 g de SPAN 80, foi desenvolvida por MELO & PINTO (2011), para garantir a estabilidade do meio disperso.

As medidas de pH expressas na Tabela 7 são importantes porque ele pode afetar a solubilidade da gelatina. Gelatinas do tipo A, como as empregadas nesse estudo, possuem ponto isoelétrico na faixa de 7 a 9 (GMIA, 2012). Dessa forma, sua solubilização será dificultada caso o pH da mistura encontre-se nessa região, pois no ponto isoelétrico, a proteína terá carga nula. Os dados indicam, portanto, que a solubilização das gelatinas comerciais adquiridas não é comprometida pelo pH do meio.

Para todas as reações consideradas, o tempo de reação foi de 30 minutos e foram retiradas alíquotas de 5 em 5 minutos ao longo de todo o período. Os materiais obtidos foram então caracterizados por meio de análises de GPC, FTIR e espalhamento de luz, como apresentado a seguir.

Tabela 7 – Condições reacionais do primeiro grupo de reações realizadas.

Reação	Água (g)	Óleo (g)	Gelatina		SPAN 80 (g)	Glicerol (%)	Glicose (%)	Temperatura (°C)	pH *
			(g)	Tipo					
1	30	120	3	PhEur	6	-	1	50	5,4
2	30	120	3	PhEur	6	-	2	50	4,4
3	30	120	3	PhEur	6	-	3	50	4,0
4	30	120	3	PhEur	6	-	4	50	4,0
5	30	120	3	PhEur	6	10	-	50	5,3
6	30	120	3	PhEur	6	-	-	50	5,8
7	30	120	3	PhEur	6	-	-	60	5,8
8	30	120	3	PhEur	6	-	4	80	4,0
9	30	120	3	Porco	6	-	4	50	5,5

* As medidas de pH foram feitas logo após a completa solubilização da gelatina e, portanto, imediatamente antes da solução ser vertida na mistura contendo óleo e SPAN 80.

4.3.1. Resultados de GPC

O conhecimento da massa molar dos polímeros é indispensável para possibilitar correta compreensão das propriedades finais. Além disso, o acompanhamento da evolução das massas molares ao longo da reação pode fornecer informações importantes acerca do tipo de reação envolvida no processo de produção de partícula na suspensão inversa.

Apesar de ser uma técnica muito simples e largamente empregada na área de polímeros, não há relatos na literatura de tentativas de acompanhar a cinética de

reticulação da gelatina por meio de análises de GPC. Portanto, esse estudo é realizado aparentemente pela primeira vez.

Uma vez reticuladas, as moléculas de gelatina têm sua massa molar bastante elevada, o que pode ser facilmente detectado com auxílio da cromatografia de permeação em gel. Dessa forma, foram feitas análises de GPC de todas as alíquotas das reações da Tabela 7 e seus resultados são apresentados a seguir.

Como pode ser observado na Figura 15, contrariamente ao que era esperado, há uma brusca redução na massa molar da gelatina já nos instantes iniciais da reação. No tempo zero são apresentados dois resultados. O primeiro, da gelatina PhEur, consiste na análise de GPC da gelatina comercial, sem qualquer tentativa de modificação química. O segundo consiste na alíquota retirada exatamente no momento em que a solução de gelatina contendo (ou não) reticulante é vertida na mistura de óleo com SPAN80. Os resultados apresentados na Figura 15 não parecem indicar a existência de qualquer aumento apreciável de massa molar ao longo do processamento.

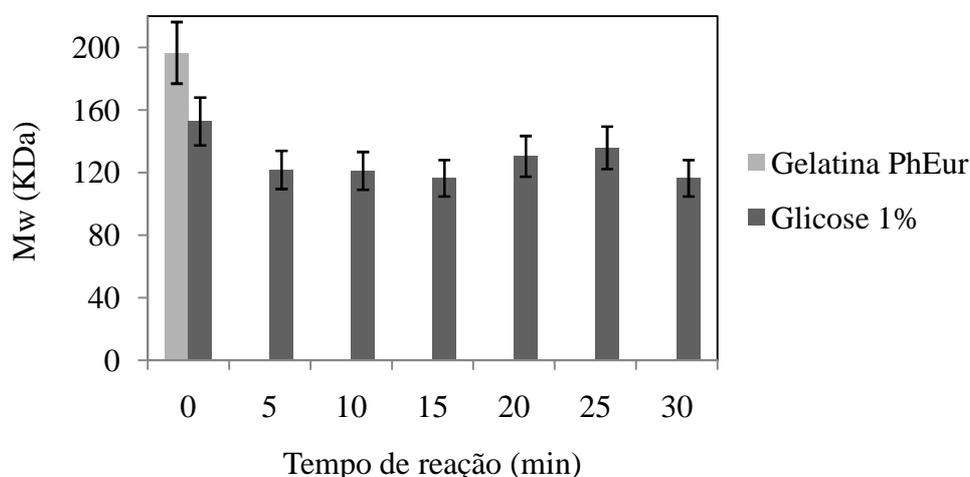


Figura 15 – Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 1, contendo 1% de glicose.

Esse resultado indica a existência de efeitos relevantes sobre a gelatina durante o processo de dissolução, que antes de ser adicionada ao óleo deve ser solubilizada a 60°C. Quando o colágeno passa pelo processo de condicionamento, sua estrutura de tripla-hélice característica é apenas parcialmente quebrada (YANNAS, 1972). A queda na massa molar observada pode ser, portanto, uma indicação da continuação desse

processo de quebra da estrutura, iniciado quando a gelatina começa a ser solubilizada. Além disso, vale ressaltar que a exposição da gelatina a temperatura de 60 °C pode dar início ao processo de degradação, o que pode explicar também, ao menos em parte, a queda na massa molar observada. No entanto, essa hipótese é pouco provável, porque o processo de redução da massa molar não é continuado ao longo do tempo.

Outro fator que merece destaque é o de que, após a queda inicial no Mw, quando se consideram que o erro da análise de GPC costuma ser de até 10%, observa-se que a massa molar do material permanece essencialmente constante até o término da reação. Dessa forma, a degradação do material não parece ser o fenômeno mais importante no caso analisado, uma vez que o processo de degradação deveria ser contínuo e a massa molar, portanto, deveria diminuir progressivamente ao longo da reação no caso de haver degradação térmica apreciável.

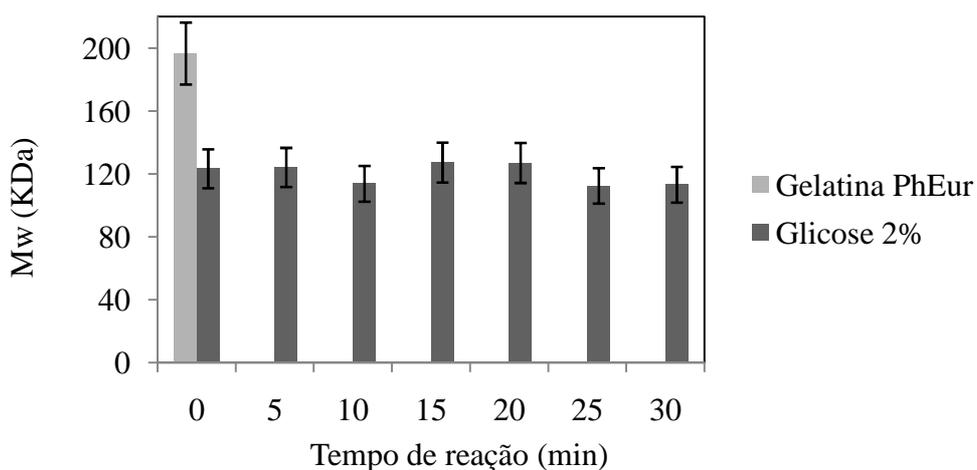


Figura 16 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 2, contendo 2% de glicose.

Esses resultados se repetem para todas as outras reações em que glicose ou glicerol foram empregados como reticulantes, como pode ser observado nas Figuras 16, 17, 18 e 19, o que pode indicar que os materiais utilizados não são eficazes para reticular a gelatina, ao contrário do que se afirma na literatura.

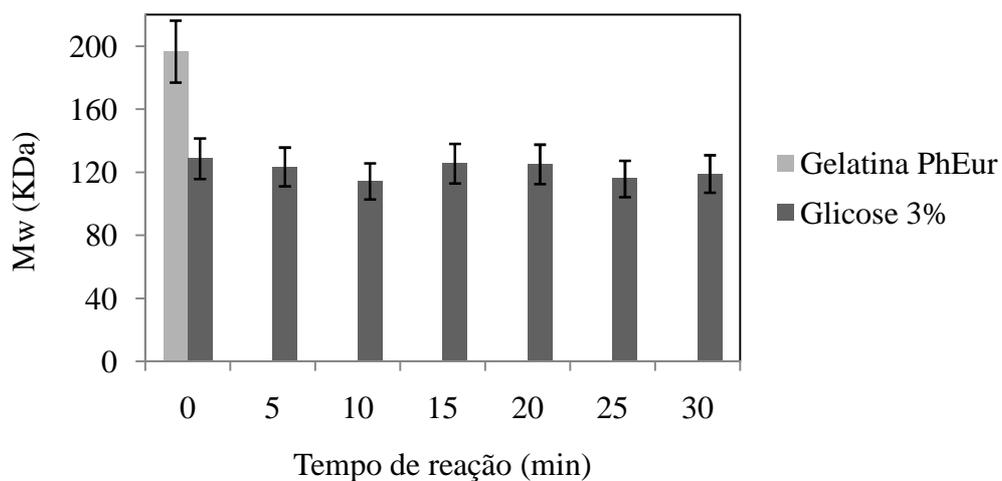


Figura 17 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 3, contendo 3% de glicose.

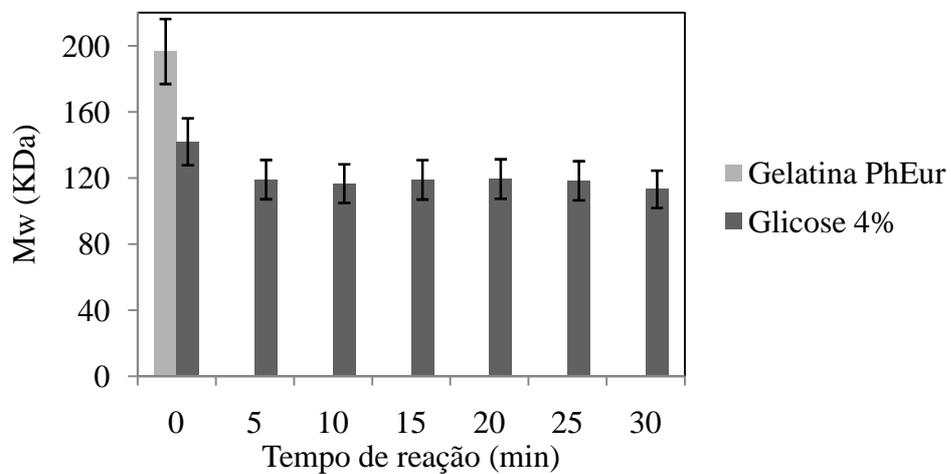


Figura 18 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 4, contendo 4% de glicose.

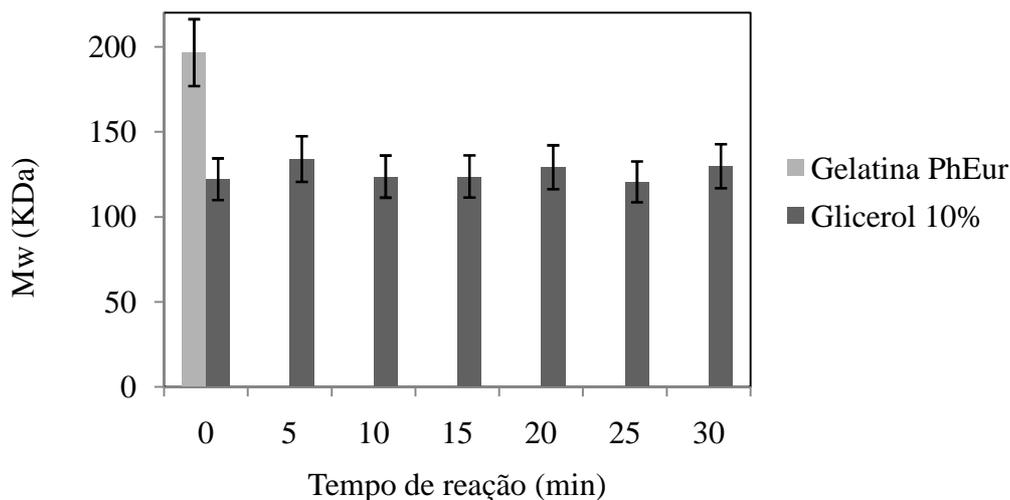


Figura 19 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 5, contendo 10% de glicerol.

O mesmo comportamento foi observado também quando nenhum reticulante era empregado e apenas a temperatura era variada. Há registros na literatura, como já apresentado, de que apenas o aumento de temperatura é capaz de ocasionar a formação de ligações cruzadas na gelatina; entretanto, isso não foi observado com as condições empregadas nas reações 6 e 7, como indicam as Figuras 20 e 21.

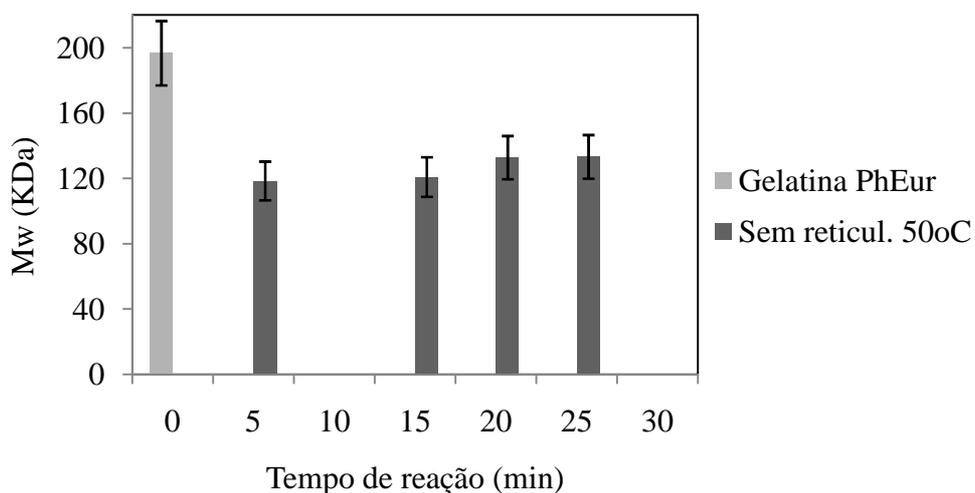


Figura 20 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 6, sem agente reticulante algum e na temperatura de 50 °C.

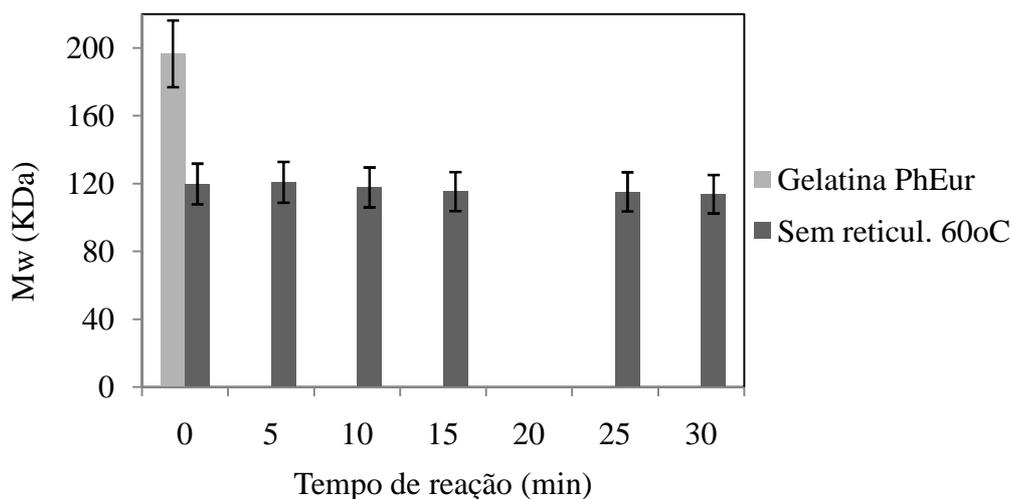


Figura 21 - Gráfico da evolução da massa molar ponderal com o tempo para a reação 7, sem agente reticulante algum e na temperatura de 60 °C.

Além disso, a Figura 22 mostra que as massas molares finais das reações com diferentes tipos e concentrações de agente reticulante são estatisticamente similares.

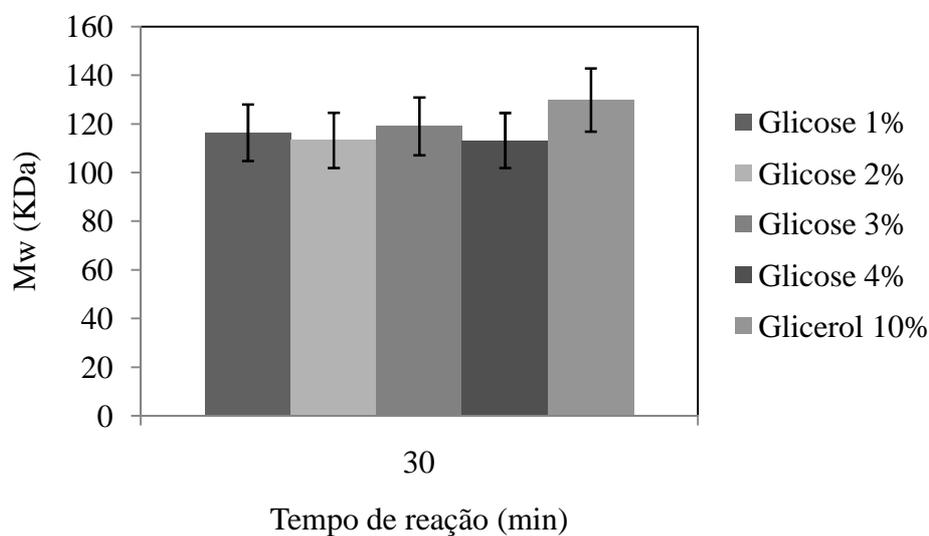


Figura 22 - Gráfico das massas molares ponderais finais para a série com diferentes concentrações de glicose.

Dessa forma, analisando os resultados obtidos, pode-se dizer que a reticulação da proteína pode não estar ocorrendo. Entretanto, o fato é que MELO & PINTO (2011)

observaram comportamentos muito distintos nos perfis de liberação de doxiciclina quando a gelatina era tratada com glicose, o que indica que algum tipo de modificação química deve ocorrer na estrutura do material. Por isso, é necessária uma análise mais aprofundada dos produtos, de maneira a tentar compreender que tipo de interação a gelatina possui com a glicose e/ou glicerol.

Vale ressaltar, no entanto, que apesar de os dados indicarem que aparentemente o *crosslink* não ocorre, no decorrer das análises houve um progressivo aumento na pressão das colunas do GPC, o que é sinal de entupimento das mesmas. A pressão aumentou até atingir o limite máximo permitido para sua operação, mesmo tendo sido tomados todos os cuidados necessários para o bom funcionamento do equipamento. Como descrito no capítulo anterior, a solução de SDS utilizada como eluente foi filtrada em sistema Millipore® com auxílio de membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm e a solução de gelatina a ser injetada também era filtrada com auxílio de filtro de seringa de 0,45 µm. Dessa forma, é possível que tenha havido a formação de microgéis e que o material tenha passado pelo filtro de seringa, interagindo com a coluna e ocasionando o entupimento.

Merece destaque também o fato de a gelatina apresentar comportamento tixotrópico (MIQUELIM, 2010) o que também pode explicar o entupimento. Isso é possível porque, antes de serem filtradas, as amostras agitadas manualmente com o objetivo de homogeneizar a solução. Ao proceder dessa forma, a mistura tem sua viscosidade diminuída por conta do cisalhamento. Após a injeção, entretanto, o cisalhamento cessa ou ao menos é muito reduzido e a viscosidade torna a se elevar, o que pode ter ocasionado o aumento de pressão observado.

Por isso, para detectar possíveis alterações na estrutura química da gelatina, visando a entender como e se ela interage com a glicose e o glicerol, foram realizadas análises de FTIR, que são apresentadas a seguir. De qualquer forma, baseado nos resultados dessa seção, é possível afirmar que o processo de dissolução causa mudanças estruturais na estrutura supra-molecular da gelatina (como destruição de tripla-hélice), mas que não parece ocorrer qualquer reticulação da gelatina na presença de glicose ou glicerol, como afirmado na literatura.

4.3.2. Resultados de FTIR

De forma a complementar as informações obtidas com auxílio das análises de GPC, os resultados de FTIR são apresentados e discutidos a seguir.

Analisando a Figura 23, é possível notar uma alteração da banda posicionada em 3274 cm^{-1} , presente em baixa intensidade na gelatina farmacêutica, e que tem sua intensidade fortemente aumentada após as reações a 50 e 60 °C. Essa região situada em $3100\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ e sinalizada com o número 1 no gráfico, é característica quando há presença de água livre. Além disso, no caso de proteínas, é também a região onde se apresentam as bandas de amida-A e amida-B (HANANI *et al.*, 2011).

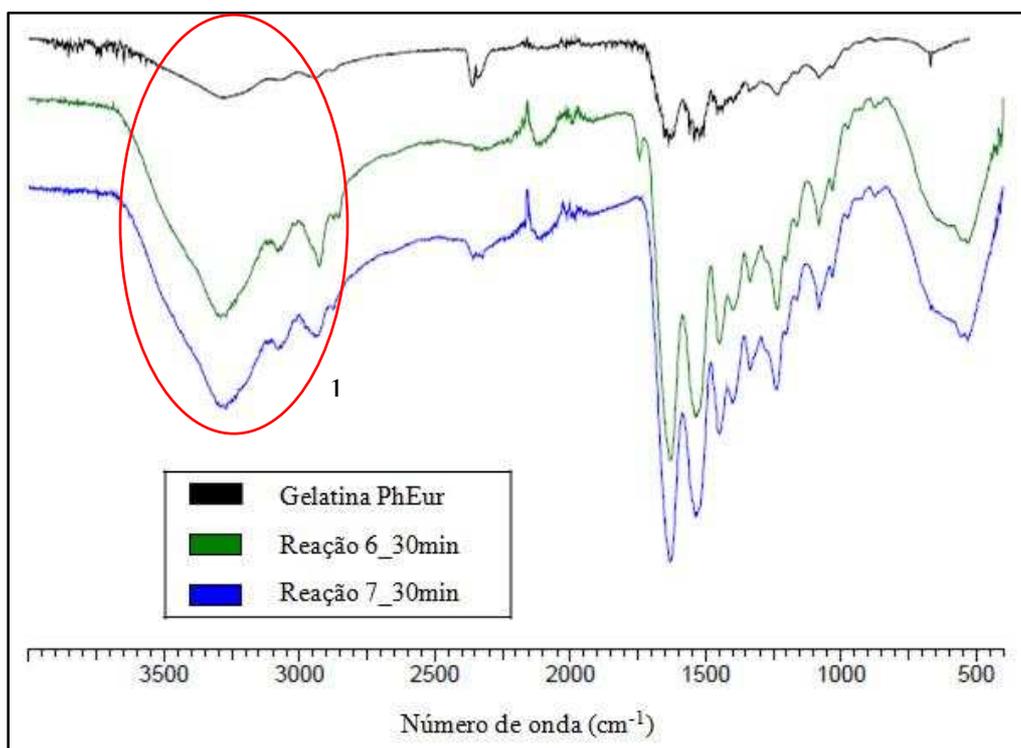


Figura 23 – Espectros de FTIR das reações sem agentes reticulantes.

Além da amida-A, as proteínas costumam apresentar outras bandas características, que são listadas a seguir (KONG & YU, 2007 *Apud* ELLIOT & AMBROSE, 1950; KRIMM & BANDEKAR, 1986; BANKER, 1992; MIYAZAWA, 1956):

- Amida-A – Localizada em 3300 cm^{-1} , ela indica o estiramento da ligação NH;
- Amida-B – Localizada em 3100 cm^{-1} , ela também indica o estiramento da ligação NH;
- Amida-I – Localizada tipicamente em $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ela indica aproximadamente 80% da vibração de estiramento da ligação C=O das ligações peptídicas;
- Amida-II – Localizada tipicamente em $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$, ela indica a deformação da ligação NH no plano e o estiramento vibracional da ligação CN;
- Amida III – Localizada tipicamente em $1229\text{-}1301\text{ cm}^{-1}$, ela também indica deformação da ligação NH e o estiramento da ligação CN;
- Amida IV – Localizada em $625\text{-}767\text{ cm}^{-1}$, indica a deformação da ligação OCN;
- Amida-V – Localizada em $640\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, indica a deformação do NH fora do plano;
- Amida-VI – Localizada em $537\text{-}606\text{ cm}^{-1}$, indica a deformação do C=O fora do plano;
- Amida-VII – Localizada em 200 cm^{-1} , indica a torção do esqueleto peptídico.

Com base, portanto, na lista apresentada anteriormente, foram identificadas também as bandas características da amida I, sinalizada na Figura 24 como número 2, a amida-II, identificada como número 3, e a amida-III, identificada como número 4.

Analisando a Figura 24, é possível observar que, assim como no caso da banda de amida-A, também houve aumento nas intensidades das bandas de número 2, 3 e 4 após o tratamento da gelatina a diferentes temperaturas.

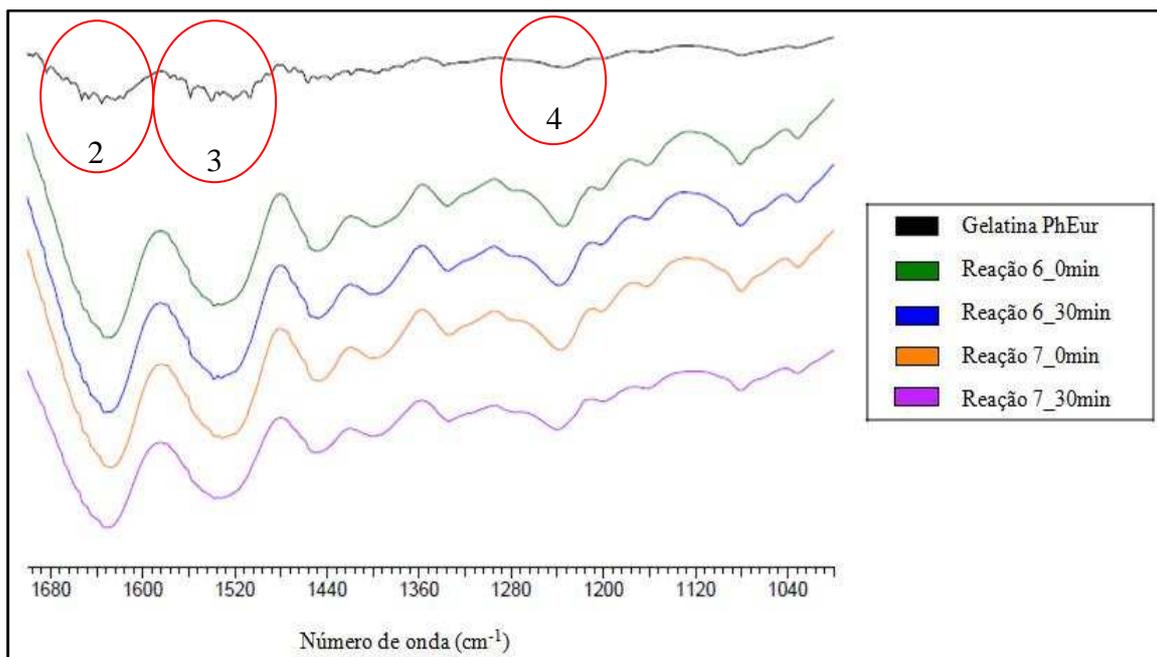


Figura 24 – Ampliação da escala dos espectros de FTIR das reações em que não foram adicionados agentes reticulantes.

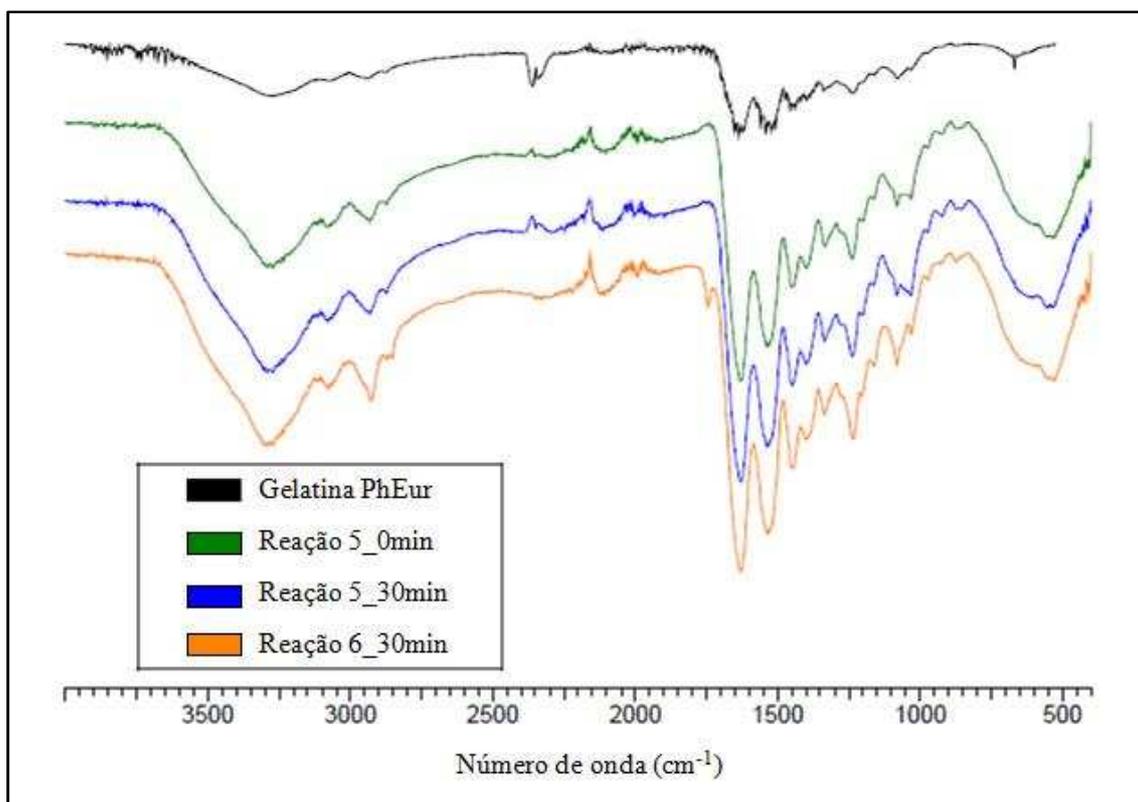


Figura 25 – Espectros de FTIR da reação com 10% de glicerol comparados com o da gelatina PhEur e com o da reação sem reticulante.

Analisando, entretanto, a Figura 25, pode-se notar que não há praticamente diferença alguma entre os espectros das reações 5 e 6. Não houve surgimento ou desaparecimento de bandas e, além disso, as intensidades das mesmas são praticamente idênticas. Dessa forma, conclui-se que o glicerol a princípio não parece mesmo agir como agente reticulante da gelatina. Além disso, ele aparentemente não apresenta nenhum outro tipo de interação com a proteína, já que o aumento na intensidade das bandas é o mesmo observado quando o glicerol não é adicionado.

Na Figura 26 são apresentados os espectros da reação 4 em conjunto com o da gelatina comercial PhEur e da mistura física entre a gelatina comercial em questão e a glicose na mesma concentração empregada na reação.

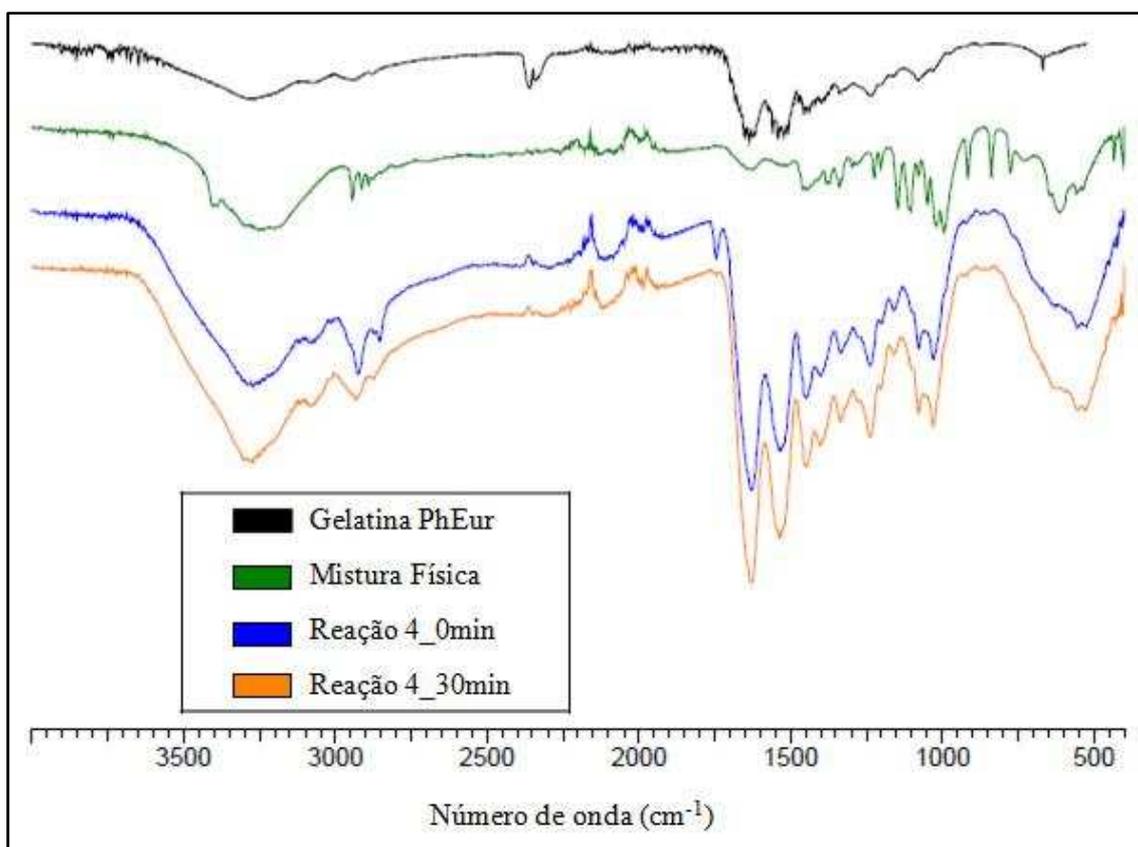


Figura 26 – Espectros de FTIR da reação com 4% de glicose comparados com o da gelatina PhEur e com a mistura física entre a gelatina e a glicose.

Com relação à diferença entre a mistura física e a gelatina PhEur, nota-se um aumento significativo na região característica da presença de água livre, provavelmente

ocasionada pela presença de glicose. Além disso, é possível perceber que as bandas características das ligações peptídicas são muito menos intensas na mistura física do que na reação 4, o que faz com que o espectro se pareça mais com o da gelatina PhEur. Isso indica que o processo reacional ou mesmo o simples processo de dissolução induz algum tipo de alteração na estrutura da proteína, uma vez que, quando o material é simplesmente misturado à glicose, as alterações não são da mesma natureza.

Estudando a Figura 27, que compara os tipos de gelatina comerciais empregadas, é possível notar que aparentemente não há grande diferença entre ambas, como já discutido, uma vez que as bandas características praticamente se sobrepõem.

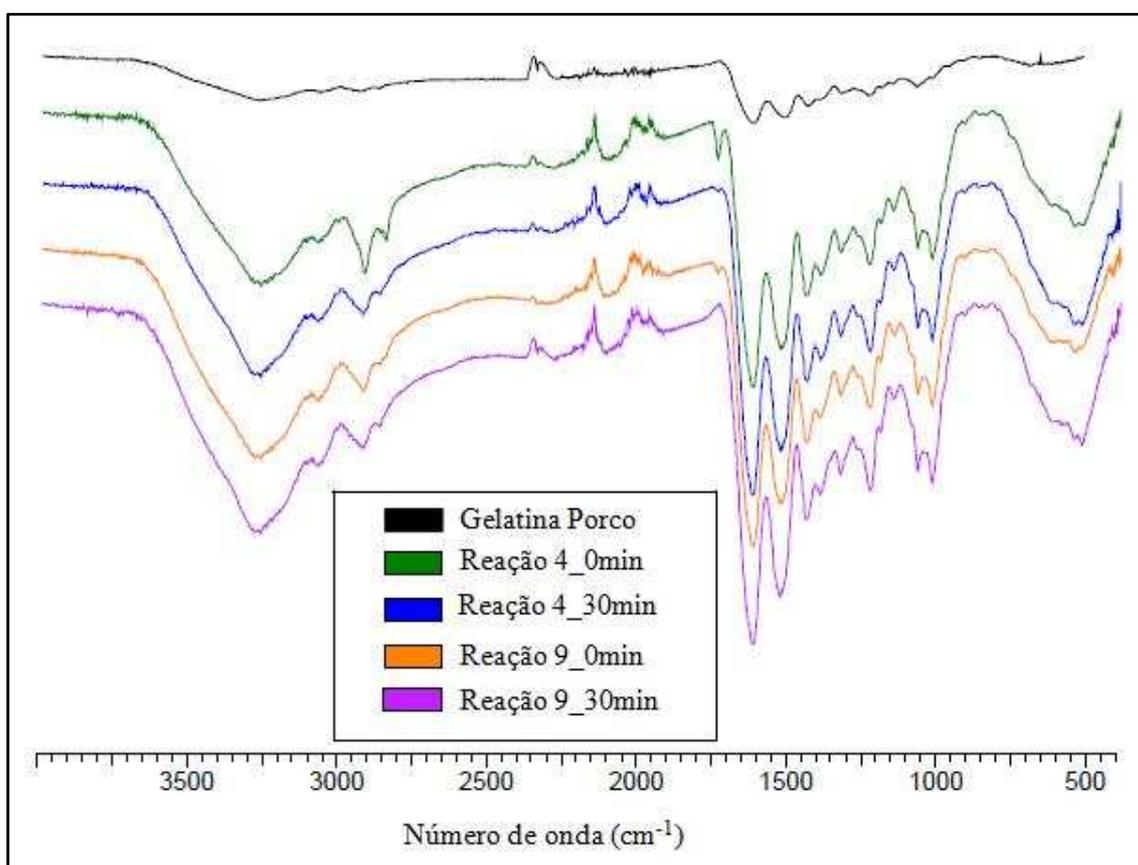


Figura 27 – Espectros de FTIR das reações com diferentes gelatinas e 4% de glicose.

Outro fator que merece destaque é o de que aparentemente as alterações observadas são fruto de algum fenômeno que acontece nos instantes iniciais de reação, já que, após a retirada de alíquota em 0 min, não são observadas grandes diferenças nos

espectros. Isso é coerente com os resultados de GPC, que indicam uma queda acentuada na massa molar das gelatinas nos primeiros momentos da reação.

Retomando, portanto, a discussão iniciada anteriormente, os dados de FTIR parecem também indicar que os efeitos observados são fruto de uma cinética de dissolução da gelatina. O processo de “desmantelamento” da estrutura tripla-hélice do material, que não foi totalmente quebrada no processo de condicionamento do colágeno, pode estar sendo continuado durante o processo de dissolução. Dessa forma, os grupamentos amino e hidroxila aprisionados dentro da estrutura seriam de certa forma libertados, o que explicaria o aumento na intensidade das bandas observado após as reações realizadas.

Além disso, a falta de alteração nos espectros nos tempos 0 e 30 min de reação indicam que possivelmente não há reticulação nem mesmo interação da glicose ou do glicerol com a gelatina, já que o grau de reticulação é proporcional ao tempo reacional.

4.3.3. Resultados de Espalhamento de Luz

Uma vez que aplicações médicas e farmacêuticas exigem controle rígido da forma e do tamanho das partículas utilizadas, foram feitas análises de espalhamento de luz para determinação do tamanho médio, como indica a Tabela 8. Além disso, a análise também permite a determinação da distribuição de tamanhos de partícula. Esses resultados podem ser visualizados no Apêndice B, juntamente com as micrografias dos materiais produzidos. Um dos objetivos perseguidos era verificar se mudanças nas distribuições de tamanho poderiam justificar os dados obtidos por MELO & PINTO (2011).

No caso da aplicação intramuscular de medicamentos, a faixa de tamanho exigida costuma variar entre 20 e 100 micra, como já apresentado anteriormente. Dessa forma, a grande maioria dos materiais produzidos encontra-se no limite permitido para esse tipo de administração.

Tabela 8 – Tamanho médio das partículas do primeiro grupo de reações realizadas.

Reação	Tamanho médio (μm)
1	50
2	20
3	24
4	16
5	29
6	28
7	27
8	28
9	38

Caso seja necessário aumentar o tamanho médio dessas partículas, algumas medidas simples podem ser tomadas, como a redução na velocidade de agitação ou mesmo diminuição da concentração de estabilizante. No entanto, vale ressaltar que, quando a droga for incluída na receita, a tendência provavelmente será de aumento de tamanho. Dessa forma, as médias de tamanho apresentadas a princípio são adequadas para a aplicação pretendida, mas serão novamente analisadas quando o fármaco for incluído na formulação.

É importante observar que os resultados da Tabela 8 não parecem indicar qualquer mudança consistente de morfologia com a mudança das condições de operação, não sendo possível encontrar nesses dados explicação para os resultados de MELO & PINTO (2011).

4.4. Conclusões Parciais

Após análise cuidadosa dos dados anteriormente apresentados, referentes ao primeiro conjunto de reações realizadas, foi possível perceber que aparentemente não há

reticulação das cadeias de gelatina quando glicerol, glicose ou mesmo apenas aumento de temperatura são empregados com essa finalidade. A única alteração detectada por meio das análises de GPC e FTIR ocorre ainda nos instantes iniciais de reação e possivelmente está ligada à cinética de dissolução da gelatina, que pode dar origem a uma nova estrutura do material. No entanto, PINTO (2011) apresenta dados que indicam diferenças claras nos perfis de liberação da doxiciclina quando são variadas as concentrações de glicose e frutose. Dessa forma, faz-se necessária a realização de outro conjunto de reações, dessa vez utilizando a doxiciclina, visando à compreensão das diferenças observadas pelo autor.

4.5. Segundo Grupo de Reações

No segundo grupo de reações foram estudadas as influências dos diferentes tipos de gelatinas comerciais escolhidas e da alteração na concentração de glicose e de gelatina sobre a cinética de liberação do medicamento. Além disso, foram repetidas, empregando gelatina PhEur e de porco, as condições do experimento 39, selecionado por MELO & PINTO (2011) como aquele que apresentou melhores resultados.

Os materiais utilizados e suas respectivas concentrações são apresentados na Tabela 9.

Vale ressaltar que durante a realização desse segundo grupo de reações, um fenômeno bastante interessante foi observado. Como descrito no procedimento experimental no capítulo anterior, antes de a mistura contendo gelatina, doxiciclina e glicose ser vertida em um recipiente contendo óleo e agente estabilizante, a gelatina, o fármaco e a glicose devem ser solubilizados. No momento em que a solubilização era realizada, logo após a mistura se tornar quase completamente translúcida (o que indicaria solubilização completa dos materiais), uma alteração brusca na coloração e na viscosidade foi observada. A mistura passou de coloração alaranjada translúcida, característica da doxiciclina em solução, para uma mistura leitosa e levemente amarelada, extremamente viscosa, como mostra a Figura 28.

Tabela 9 – Condições reacionais do segundo grupo de reações realizadas.

Reação	Água (g)	Óleo (g)	Gelatina		SPAN 80 (g)	Doxiciclina (g)	Formol (mL)	Glicose (%)
			(g)	Tipo				
10	10	40	1,5	PhEur	1	0,75	2	0,5
11	10	40	1,5	Porco	1	0,75	2	0,5
12	10	40	3	PhEur	2	1,50	-	-
13	10	40	1,5	PhEur	1	0,75	-	0,5
14	10	40	1,5	PhEur	1	0,75	-	-

Para identificar quais materiais interagiram com a doxiciclina, foram feitas combinações de misturas desses materiais, como descrito a seguir.

- Água + gelatina – A solubilização a 60 °C foi completa e o aspecto final foi de uma solução ligeiramente amarelada, característica da gelatina;
- Água + glicose – Como esperado, a solubilização a 60 °C também foi completa e o aspecto final foi de uma solução completamente transparente;
- Água + doxiciclina – A solubilização a 60 °C foi completa e o aspecto final foi de uma solução alaranjada;
- Água + doxiciclina + glicose – A solubilização a 60 °C foi completa e o aspecto final foi de uma solução alaranjada;
- Água + doxiciclina + gelatina – A solubilização a 60 °C foi quase completa, mas em determinado momento a mistura passou pela transição de coloração e textura indicada anteriormente.

Dessa forma, fica claro que ocorre uma forte interação do fármaco com a gelatina.

pH (a 60°C) – 1,39

pH (a 60°C) – 3,33

pH (a 60°C) – 2,09

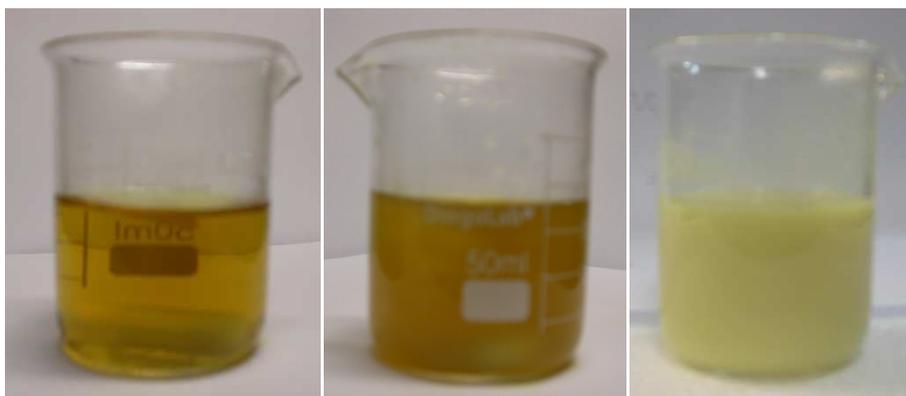


Figura 28 – Fotografias em sequência da alteração na coloração da mistura contendo água, gelatina e doxiciclina. (a) Solução aquosa de doxiciclina; (b) e (c) mistura de água, gelatina PhEur e doxiciclina respectivamente antes e após a alteração de cor.

Vale ressaltar que, assim como foi constatado para o primeiro grupo de reações, o pH do meio após a adição da doxiciclina encontra-se bastante afastado do ponto isoelétrico da gelatina (entre 7 e 9). Dessa forma, não é necessário ajuste de pH para permitir a solubilização da proteína.

Para caracterizar melhor o aumento de viscosidade foi feito um teste de escoamento em pipeta, como descrito a seguir.

4.5.1. Teste de Escoamento em Pipeta

A Tabela 10 mostra os resultados dos testes para avaliação das diferenças na viscosidade de algumas soluções aquosas empregadas nas reações. Em especial, destacam-se os experimentos 3A e 3B. Neles, a mistura utilizada foi a mesma, mas a medida de tempo de escoamento foi realizada em dois momentos. A primeira (3A) foi feita antes da mudança de coloração da mistura, enquanto a segunda (3B) foi feita após essa transição.

Tabela 10 – Resultados dos testes de escoamento em pipeta.

Experimento	Material usado	Massa de material (g)	Tempo de escoamento (s)
1	Água	10	25
	Gelatina PhEur	1,5	
2	Água	10	4
	Doxiciclina	0,75	
3A	Água	10	29
	Doxiciclina	0,75	
	Gelatina PhEur	1,5	
3B	Água	10	42
	Doxiciclina	0,75	
	Gelatina PhEur	1,5	

É possível observar que, antes da transição, os tempos de escoamento da mistura 3A e da mistura 1 são muito similares. Quando há a mudança de cor, entretanto, o tempo aumenta 44%, o que prova claramente que há alteração bastante significativa da viscosidade já percebida apenas visualmente.

O aumento de viscosidade geralmente é indício de aumento de massa molar. Dessa forma, os resultados parecem sugerir que a doxiciclina pode estar reticulando a gelatina. Por isso, as análises de GPC das amostras em que doxiciclina foi adicionada à receita são importantes para compreender melhor esses dados.

4.5.2. Resultados de GPC

Há apenas um resultado de GPC referente ao segundo grupo de reações. Isso ocorre porque não foi possível solubilizar as amostras das reações 10 e 11, já que em suas receitas de preparo foi incluído formaldeído, que sabidamente é capaz de reticular as cadeias de gelatina.

Os GPCs das reações 13 e 14 não foram realizados por falta de tempo hábil (e serão realizados posteriormente). No entanto, os resultados dos testes de liberação apresentados mais adiante compensam a falta desses resultados.

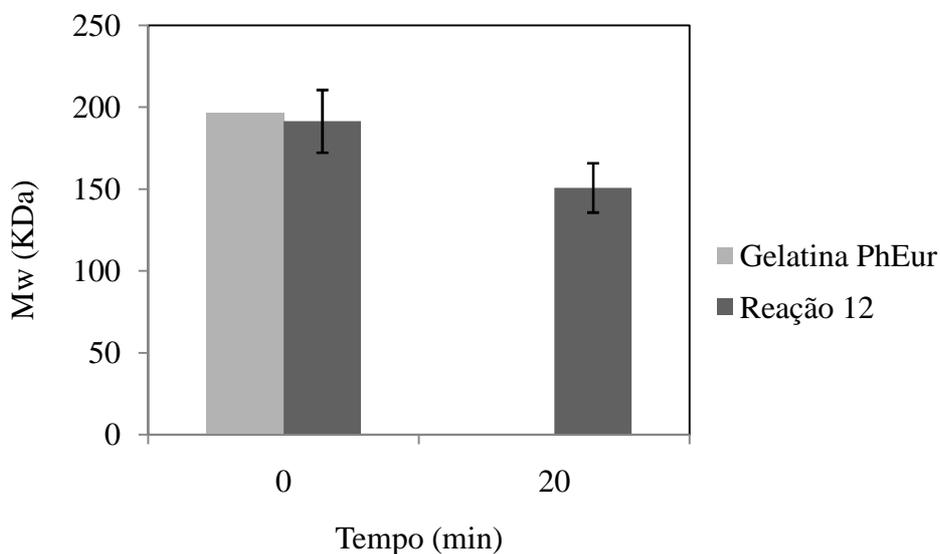


Figura 29 – Resultados de GPC da reação 12.

Ao contrário do que ocorre nos resultados de GPC do primeiro grupo de reações, a massa molar do produto da reação 12 quase não se altera. A queda brusca observada nos experimentos anteriores é muito inferior quando a doxiciclina é adicionada à receita, o que indica que ela pode interagir de alguma forma com a gelatina. Esse resultado é compatível com os dados de escoamento em pipeta que indicam que há possivelmente um aumento da massa molar da gelatina causada pela interação com o fármaco.

Dessa forma parecem ocorrer dois fenômenos concorrentes simultaneamente quando a doxiciclina é incorporada à receita. O primeiro ocasiona a queda da massa molar, devido possivelmente à alteração da estrutura da gelatina, como já discutido anteriormente. O segundo ocasiona a elevação da massa molar e tem origem provavelmente na interação do fármaco com a gelatina.

4.5.3. Análises de Espalhamento de Luz

O tamanho médio e a distribuição de tamanhos de partícula dos materiais produzidos no segundo grupo de reações foram determinados com auxílio de análises de espalhamento de luz, assim como foi apresentado para o primeiro grupo de reações. Os novos resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Tamanho médio das partículas do segundo grupo de reações realizadas.

Reação	Tamanho médio (μm)
10	240
11	122
12	474
13	195
14	210

O aumento da média de tamanhos em relação ao primeiro grupo de reações é uma indicação clara de que a doxiciclina está sendo encapsulada e promovendo mudanças no sistema de reação. O aumento de viscosidade do meio de reação pode explicar o aumento dos tamanhos médios de partícula, por redução da frequência de quebra e aumento das taxas de coalescência (ODIAN, 2004).

Além disso, é importante notar que, apesar de os tamanhos de partícula obtidos serem superiores ao limite máximo permitido para aplicações intramusculares, a diferença de tamanho e de morfologia (vide apêndice B) entre as gelatinas comerciais adquiridas e os materiais produzidos é bastante significativa e muito positiva, uma vez que mostra que a técnica de suspensão inversa é capaz de permitir o controle dessas variáveis.

Ademais, para diminuir o tamanho das partículas, podem ser adotadas medidas simples como o aumento da concentração de agente estabilizante ou aumento da velocidade de agitação. Caso seja necessária uma redução ainda maior, a reação pode

ainda ser conduzida em mini-emulsão, ao invés de em suspensão inversa (ODIAN, 2004; CANEVAROLO, 2006).

Dessa forma, o fato de os tamanhos serem superiores aos desejados não é de forma alguma um problema grave. O importante é que é possível produzir partículas de gelatina estáveis e que permitem o encapsulamento do fármaco, além de identificar que a presença da doxiciclina afeta o curso de reação.

4.5.4. Determinação da Eficiência de Encapsulamento

A determinação da eficiência de encapsulamento é fundamental para conhecer o percentual de perda do medicamento e possibilitar o cálculo do percentual de liberação com o tempo nos testes de liberação controlada. Os resultados para o segundo grupo de reações são apresentados na Tabela 12.

As reações 10 e 11 apresentaram os piores desempenhos com relação à eficiência de encapsulamento. Esses resultados são compatíveis com os obtidos por PINTO (2011), cujos testes que empregaram formaldeído também apresentaram grande percentual de perda do fármaco. Já a perda quando o formaldeído não é incluído na reação é muito inferior e as eficiências chegam a valores superiores a 80%, que podem ser considerados bastante satisfatórios.

Tabela 12 – Eficiência de encapsulamento do segundo grupo de reações realizadas.

Reação	Eficiência de encapsulamento (%)
10	67
11	49
12	83
13	88
14	83

Esse resultado é muito positivo, pois indica que o formaldeído parece exercer efeito negativo ao encapsulamento do fármaco e que, portanto, a não utilização desse composto traria outros efeitos benéficos, além da diminuição da toxicidade da formulação.

4.5.5. Testes de Liberação Controlada

O acompanhamento da cinética de liberação da doxiciclina, aliado aos resultados previamente apresentados, visa a complementar as informações obtidas, de forma que seja possível propor possíveis explicações para as diferenças e semelhanças observadas.

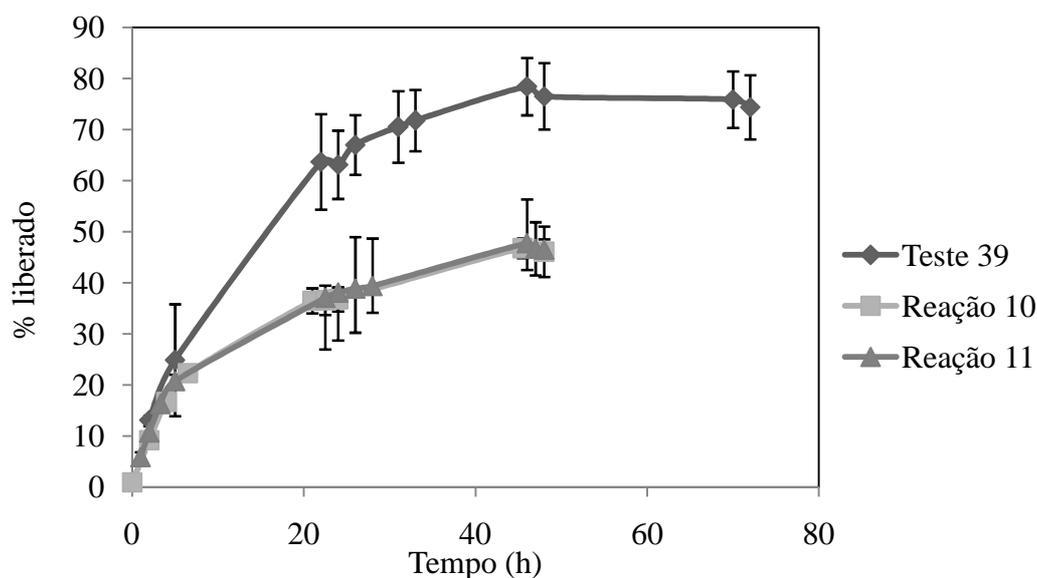


Figura 30 – Perfil de liberação das diferentes gelatinas preparadas a partir da melhor receita de MELO & PINTO (2011).

A Figura 30 analisa o efeito da utilização de diferentes tipos de gelatinas para encapsulamento na cinética de liberação da doxiciclina. O gráfico mistura informações de MELO & PINTO (2011), cuja gelatina empregada, da marca Dr.Oetker, pode ser adquirida em supermercado, com dados novos obtidos com a utilização de gelatinas especiais escolhidas para essa dissertação. As curvas indicam que para os produtos das reações 10 e 11, a liberação da doxiciclina se dá de forma muito mais lenta e que, portanto, eles apresentam desempenho muito superior quando comparadas ao do teste

39. Esse efeito provavelmente é observado porque as gelatinas PhEur e de porco são mais puras que a gelatina de mercado.

A semelhança observada nos perfis de liberação das reações 10 e 11 é coerente com os resultados da caracterização das gelatinas empregadas em cada um dos experimentos. Como as características físicas e químicas das proteínas são muito similares, era de se esperar que a curva liberação do fármaco não apresentasse diferenças significativas. Dessa forma, a utilização da gelatina grau farmacêutico (PhEur) é a mais adequada para a aplicação, pois, além de desempenhar melhor a função de encapsulante, prolongando a liberação do fármaco, ela já possui as especificações necessárias para que possa ser empregada em aplicações farmacêuticas.

Além do tipo de gelatina, a influência da concentração desse material também foi estudada. Analisando a Figura 31, é possível perceber que a concentração de gelatina não parece exercer influência significativa no perfil de liberação do fármaco, uma vez que quando são considerados os erros, os valores obtidos para as reações 12 e 14 são estatisticamente idênticos. Dessa forma, concentrações maiores de gelatina podem ser utilizadas de forma a aumentar a produtividade, sem comprometer a qualidade do produto.

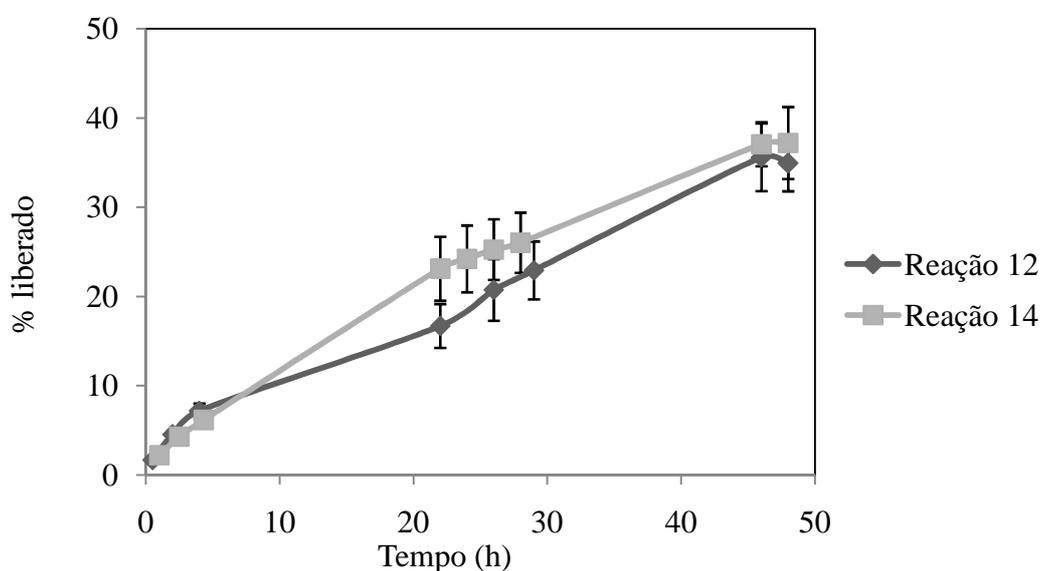


Figura 31 – Perfil de liberação do fármaco quando diferentes concentrações de gelatina são utilizadas.

Outra variável estudada foi o efeito da utilização de formaldeído nas reações, como indica a Figura 32. A liberação da doxiciclina encapsulada durante a reação 13, em que formol não foi utilizado, se dá de maneira mais lenta que a liberação do fármaco da reação 14, em que o formol está presente. Essa informação, aliada ao fato de que a eficiência de encapsulamento da reação 13 é muito superior à da reação 10, só confirma o fato de que a não utilização do formaldeído permite a liberação mais lenta da doxiciclina, uma vez que a concentração de fármaco na partícula é maior no produto da reação 13, o que a princípio ocasionaria a liberação mais rápida da fármaco.

O desempenho dos produtos em que apenas materiais naturais são utilizados é, portanto, superior nas condições analisadas, quando comparados com os resultados em que formaldeído é empregado. A reticulação da gelatina pelo formaldeído não favorece a cinética de liberação da doxiciclina. Dessa forma, a utilização do formol não é de forma alguma vantajosa para a aplicação desejada, principalmente porque, além de não apresentar desempenho positivo, o composto é altamente tóxico.

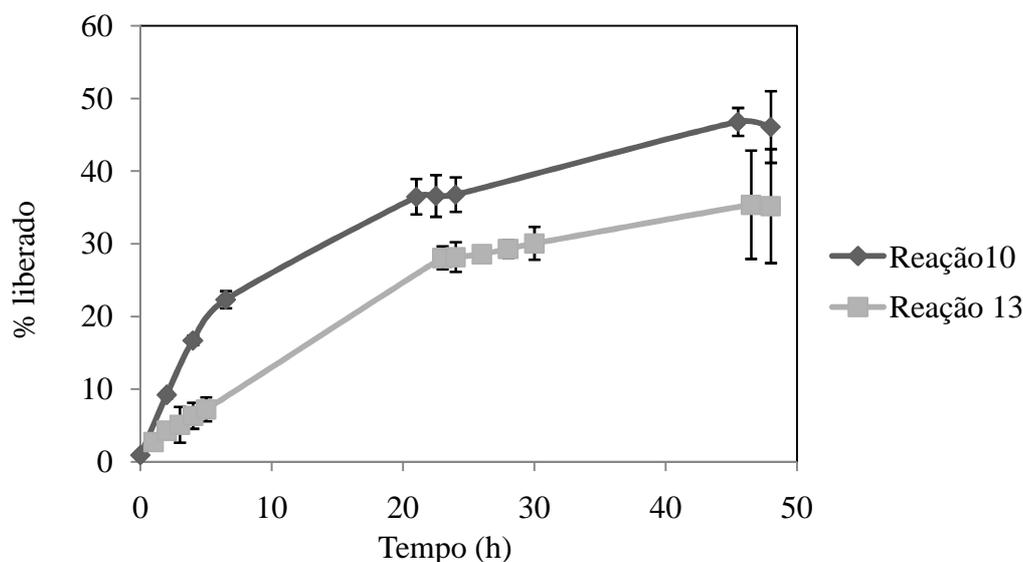


Figura 32 – Perfil de liberação do fármaco das reações conduzidas na presença e na ausência de formaldeído.

A Figura 33 apresenta então todas as curvas de liberação do segundo grupo de reações para efeito de comparação.

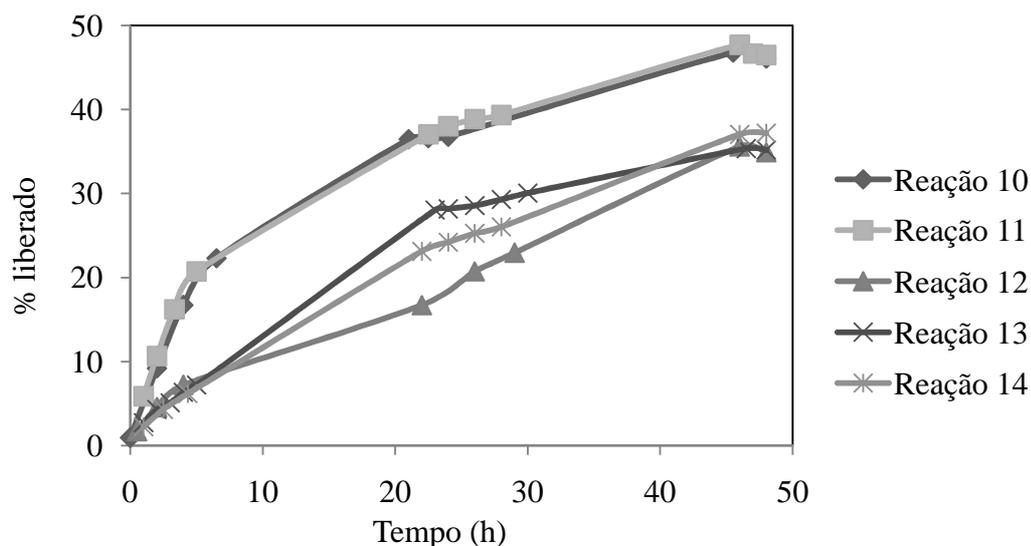


Figura 33 – Gráfico com todos os dados de liberação controlada de doxiciclina do segundo grupo de reações realizadas.

Com exceção das reação 10 e 11, todos os outros experimentos apresentam resultados bastante similares. Isso indica que o emprego de formaldeído não tem nenhum efeito positivo nos produtos estudados, como já discutido anteriormente. Os resultados em que apenas gelatina ou glicose e gelatina foram utilizadas na formulação tiveram desempenho superior aos em que foi utilizado formol. A reticulação com formol, portanto, não teve o efeito esperado, que era o da liberação mais lenta do fármaco.

Dessa forma, é possível concluir que apenas o encapsulamento da doxiciclina com gelatina não reticulada já é capaz de permitir a liberação controlada do fármaco. Além disso, a adição de formol e/ou glicose parece exercer influência negativa na performance do material nos testes de liberação.

Além disso, confrontando esses resultados com os de MELO & PINTO (2011) percebe-se que, na verdade os açúcares usados apresentam influência muito pequena na liberação do fármaco. O tempo que a gelatina permanece exposta à doxiciclina em solução parece exercer maior influência muito maior no perfil de liberação, o que mais uma vez mostra que as diferenças observadas quando formaldeído não é adicionado à reação são fruto principalmente da interação da gelatina com a doxiciclina.

4.6. Modelo de Interação

Os resultados do segundo grupo de reações deixam claro que:

- O desempenho dos materiais produzidos é prejudicado quando se adiciona glicose ao meio reacional;
- A doxiciclina interage com a gelatina, o que ocasiona alteração de cor e aumento de viscosidade da mistura;
- A glicose não é capaz de reticular a gelatina nas condições testadas.

Além disso, sabe-se também, como já explicado anteriormente, que normalmente há carboidratos ligados aos grupos hidroxila dos resíduos da hidroxilisina. Um exemplo, portanto, de carboidrato que pode estar ligado à gelatina é a glicose, cuja estrutura é apresentada na **Figura 34**.

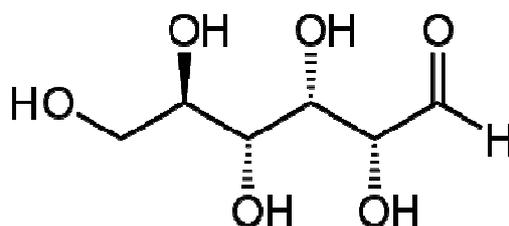


Figura 34 – Estrutura química da glicose.

A partir das informações reunidas acima, foi proposto um modelo de interação entre gelatina, doxiciclina e glicose, que é descrito a seguir.

Alterações de coloração ocorrem quando um ou mais grupos cromóforos de um determinado material são modificados. Dessa forma, considerando que a doxiciclina possui dois grupos cromóforos (McMURRY, 2005), fica claro que a transformação observada ocorre quando a gelatina interage química ou fisicamente com um desses grupamentos.

A glicose interage com a gelatina possivelmente por meio de ligações glicosídicas, em que a hidroxila do carboidrato reage com um álcool formando um éter. Há, no entanto, também a possibilidade dessa interação entre os compostos ocorrer via ligações de hidrogênio.

Os grupos cromóforos da doxiciclina são os grupamentos enol e fenol, e ambos apresentam hidroxilas em sua estrutura (McMURRY, 2005). Dessa forma, para que a coloração seja alterada, deve estar ocorrendo algum tipo de reação envolvendo as hidroxilas do fármaco e as hidroxilas da gelatina, assim como no caso da interação da gelatina com a glicose. Combinando essa informação ao fato de que o desempenho na liberação da doxiciclina dos materiais produzidos na presença de glicose serem inferiores aos materiais produzidos sem o açúcar, parece correto considerar que, pode estar ocorrendo uma competição pelas hidroxilas livres da hidroxilisina da gelatina. Isso sugere que a interação entre a doxiciclina e a gelatina seja muito similar à interação entre a glicose e a gelatina descrita na literatura por SCHRIEBER & GAREIS (2007) e, portanto, explica o fato de a liberação do fármaco ocorrer mais lentamente quando o açúcar não é adicionado ao meio reacional.

Vale ressaltar também que, além da alteração na coloração, há também uma mudança bastante pronunciada na viscosidade da mistura, o que sugere uma possível reticulação da gelatina provocada pela adição do fármaco. Considerando que tanto a gelatina como a doxiciclina são moléculas bastante complexas, torna-se difícil determinar que tipo de reação está ocorrendo sem a realização de análises complementares, mas há, por exemplo, a possibilidade de os grupamentos amino terminais ou livres das cadeias proteicas reagirem com um ou mais grupos funcionais da doxiciclina gerando estruturas reticuladas.

Capítulo V

Conclusão e Sugestões

5.1. Conclusão

Com base nos resultados apresentados e cuidadosamente discutidos anteriormente, é possível concluir que, ao contrário do que era esperado inicialmente, glicose e glicerol não são capazes de reticular a gelatina nas condições testadas. Além disso, o formaldeído, apesar de possibilitar o *crosslink* das cadeias, exerce influência negativa no encapsulamento e na liberação controlada do fármaco.

As eficiências de encapsulamento das reações em que apenas glicose ou nenhum agente reticulante foi empregado, no entanto, são altíssimas e a cinética de liberação da doxiciclina é bem mais lenta quando comparada às reações em que formol foi empregado.

MELO & PINTO (2011) observaram diminuição da velocidade de liberação do fármaco quando frutose ou glicose eram utilizados, mas combinando seus resultados com os obtidos nesse trabalho fica claro que as diferenças apresentadas são fruto apenas da interação da gelatina com a doxiciclina.

Por conta do aumento na viscosidade da mistura de gelatina com o fármaco em questão, é possível que esteja ocorrendo a reticulação da proteína pela doxiciclina. Mas é importante ressaltar que, seja qual for o tipo de interação existente entre esses materiais, estudos devem ser feitos de forma a determinar se há perda de atividade do antibiótico ou mesmo se há formação de substâncias tóxicas provenientes dessa interação.

Há, no entanto, a ocorrência de um fenômeno bastante interessante nos momentos iniciais de reação, que consiste em uma diminuição súbita da massa molar da gelatina e um aumento nas intensidades das bandas características dos grupamentos amino e carbonila das ligações peptídicas. Esse fenômeno possivelmente está atrelado a

uma mudança de estrutura da gelatina, que pode ser causado pela quebra do que restou da estrutura tripla-hélice característica do colágeno.

Dessa forma, apesar da grande preocupação com a degradação da gelatina, ela é um material bastante estável, mas que possui estrutura muito complexa e ainda pouco compreendida.

De uma forma geral, portanto, o estudo mostra que é possível encapsular doxiciclina utilizando gelatina com perdas pequenas de fármaco durante o processo. Além disso, os resultados indicam que não é preciso empregar nenhum tipo de substância tóxica, como por exemplo o formaldeído, para obter uma boa cinética de liberação. Dessa forma, a gelatina por si só já garante um perfil de liberação prolongado da doxiciclina.

5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Como sugestões para trabalhos futuros podem ser feitos:

- Estudos para avaliar o tipo de interação da gelatina com a doxiciclina de forma a determinar se há perda de atividade ou geração de compostos tóxicos;
- Um novo agente reticulante de origem natural pode ser escolhido para promover as ligações cruzadas da gelatina, sem afetar sua toxicidade e permitindo a liberação ainda mais lenta da doxiciclina. Em especial poderia ser testado o uso do ácido succínico, que é amplamente utilizado na medicina. Ele possui ação anti-inflamatória e é recomendada sua utilização associada ao uso de antibióticos.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

ANDRADE, D.P., PALLOS, D., FORTE, L.F.B.P., RICARDO, L.H., 2009, “A Doxiciclina Como Adjuvante no Tratamento da Periodontite”, *International Journal of Dentistry*, v.8 (4), pp. 202-209.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010, Farmacopéia Brasileira, v. 2, 5ª edição, Brasília, Brasil.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002, Resolução RDC nº305, de 14 de novembro de 2002.

ASTM, American Society for Testing and Materials, 2011, Standard Specification for Reagent Water, D1193-06.

BARCELLOS, J.R.R., 2012, *Otimização do Processo de Purificação da Glicerina da Cadeia Produtiva de Biodiesel para Produção de Biofilmes*, Tese de D.Sc., Instituto Militar de Engenharia, IME, Rio de Janeiro, Brasil.

BARTSCH, R.C; GREENE R.T., 1996, “Post-Therapy antibody titers in dogs with Ehrlichiosis: Follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or Doxycycline”. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.10, nº.4, pp. 271-274.

BUENO, V.A.B., 2010, *Produção de Hidrogéis Micro e Nano Estruturados*, Tese de D.Sc., USP, São Paulo, Brasil.

CANEVAROLO, S.V., 2006, *Ciência dos Polímeros*, 2ªed., São Paulo, Artliber.

CHAIBVA, F.A., WALKER, R.B., 2007, “The Comparison of in vitro Release Methods for the Evaluation of Oxytocin Release from Pluronic® F127 Parenteral Formulations”, *Dissolution Technologies*, November, pp.15-25.

CHUANG, C., CHIU, W., DON, T., 2010, “Synthesis of Chitosan-Poly(acrylic acid) Complex Particles by Dispersion Polymerization and Their Applications in pH Buffering and Drug Release”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 120, pp.1659-1670.

CORTESI, R., ESPOSITO, E., OSTI, M., SQUARZONI, G., MENEGATTI, E., DAVIS, S.S., NASTRUZZI, C., 1999, “Dextran Cross-linked Gelatin Microspheres as a Drug Delivery System”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.47, pp. 153-160.

CORTESI, R., NASTRUZZI, C., DAVIS, S.S., 1998, “Sugar Cross-linked Gelatin for Controlled Release: Microspheres and Disks”, *Biomaterials*, v. 19, pp. 1641-1649.

D’SOUZA, S.S., DeLUCA, P.P., 2006, “Methods to Assess in vitro Drug Release from Injectable Polymeric Particulate Systems”, *Pharmaceutical Research*, v. 23, nº3, 460-474.

DAVIS, P., TABOR, B.E., 1963, “Kinetic Study of the Crosslinking of Gelatin by Formaldehyde and Glyoxal”, *Journal of Polymer Science: Part A*, v.1, pp.799-815.

DESAI, M.P., LABEHASETWAR, V., AMIDON, G.L., LEVY, R.J., 1996, “Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size”, *Pharmaceutical Research*, v. 13, nº 12, pp. 1838-1845.

DIGENIS, A., GOLD, T.B., SHAH, V.P., 1994, “Crosslinking of Gelatin Capsules and its Relevance to their In Vitro/In Vivo Performance”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.83, nº 7, pp. 915-921.

ESPOSITO E., CORTESI, R., NASTRUZZI, C., 1996, “Gelatin Microspheres: Influence of Preparation Parameters and Thermal Treatment on Chemico-physical and Biopharmaceutical Properties”, *Biomaterials*, v. 17, nº20, pp. 2009-2020.

FAN, H., DASH, A.K., 2001, “Effect of Cross-linking on the In Vitro Release Kinetics of Doxorubicin from Gelatin Implants”, *International Journal of Pharmaceutics*, v.213, pp. 103-116.

FARRIS, S., SONG, J., HUANG, Q., 2010, “Alternative Reaction Mechanism for the Cross-linking of Gelatin with Glutaraldehyde”, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v.58, pp.998-1003.

GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R., DELIE, F., 2008, “Nanoparticles for Drug Delivery: The Need for Precision in Reporting Particles Size Diameters”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, pp. 1-9.

GMIA (Gelatin Manufacturers Institute of America), 2012, *Gelatin Handbook*, America, pp. 1-25.

GRUND, S., BAUER, M., FISCHER, D., 2011, “Polymers in Drug Delivery – State of the Art and Future Trends”, *Advanced Engineering Materials*, v.13, n° 3, pp. 61-87.

HANANI, Z.A.N., ROOS, Y.H., KERRY, J.P., 2011, “Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Analysis of Biodegradable Gelatin Films Immersed in Water”, *11th International Congress of Engineering and Food*, Athens, Greece.

HANS, M.L., LOWMAN, A.M., 2002, “Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting”, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 6, pp. 319-327.

HANSON, R., 2010, “A Primer on Release-Rate Testing of Semisolids”, *Dissolution Technologies*, November, pp. 33-35.

HENNINK, W.E., VAN NOSTRUM, C.F., 2002, “Novel Crosslinking Methods to Design Hydrogels”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.54, pp.13-36.

HOFFMAN, A.S., 2002, “Hydrogel for Biomedical Applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.43, pp.3-12.

INJAC, R., MILIC-DJORDJEVIC, V., SRDJENOVIC, B., 2007, “Testing and Degradation Profiles of Doxycycline in Bulk, Tablets, and Capsules by HPLC”, *Journal of Chromatographic Science*, v. 45.

JAHANZAD, F., Sajjadi, S., Brooks, B.W., 2004, “On the Evolution of Particle Size Average and Size Distribution in Suspension Polymerization Processes”, *Industrial & Engineering Chemical Research*, v.206, pp. 255-262.

KAMATH, K.R., PARK, K., 1993, “Biodegradable Hydrogels in Drug Delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 11, pp. 59-84.

KAU, Y.C., CHEN, D.W.C., HSIEH, Y.T., LEE, F.Y., LIU, S.J., 2013, “Compression Molding of Biodegradable Drug-eluting Implants for Sustained Release of Metronidazole and Doxycycline”, *Journal of Applied Polymer Science*, v.127, pp. 554-560.

KIM, C., 2011, “Preparation Method for Biodegradable Micro-Particles Containing Drugs”, *Patent n° 8034382*, United States Patent, Little Rock, AR, USA.

KONG, J., YU, S., 2007, “Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures”, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 39, n° 8, pp. 549-559.

KRAUSE, P.J., 2002, “Babesiosis”, *Medical Clinics of North America*, v. 86, issue 2, pp. 361-373.

KUMARI, A., YADAV, S.K., YADAV, S.C., 2010, “Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, pp. 1-18.

LAEMMLI, U.K., 1970, “Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4”, *Nature*, v. 227, pp. 680-685.

LAI, J., 2010, “Biocompatibility of Chemically Cross-linked Gelatin Hydrogels for Ophthalmic Use”, *Journal of Material Science: Mater Med*, v.21, pp. 1899-1911.

LOPES, C.M., LOBO, J.M.S., COSTA, P., 2005, “Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: Polímeros Hidrofílicos”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, nº2.

MANO, E.B., 1985, *Introdução A Polímeros*, 1 ed., São Paulo, Edgard Blücher LTDA.

McCLAIN, J.B., BALLOU, W.R., HARRISON, S.M., STEINWEG, D.L., 1984, “Doxycycline Therapy for Leptospirosis”, *Annals of Internal Medicine*, v. 100, nº 5, pp. 696-698.

McMURRY, J, 2005, *Química Orgânica*, 6ª ed., São Paulo, Pioneira Thomson Learning.

MIQUELIM, J.N., 2010, *Avaliação Reológica e Microscópica de Espumas Tipo Marshmallow*, Tese de D.Sc., USP, São Paulo, SP, Brasil.

MUNDARGI, R.C., SRIRANGARAJAN, S., AGNIHOTRI, S.A., PATIL, S.A., RAVINDRA, S., SETTY, S.B., AMINABHAVI, T.M., 2007, “Development and Evaluation of Novel Biodegradable Microspheres Based on Poly(D, L-Lactide-co-glicolide) and poly (ε-caprolactone) for Controlled Delivery of Doxycycline in the

Treatment of Human Periodontal Pocket: In vitro and In vivo Studies”, *Journal of Controlled Release*, v. 119, pp. 59-68.

OBAIDAT, A.A., HAMMAD, M.M., 2009, “Sustained Release of Tetracycline from Polymeric Periodontal Inserts Prepared by Extrusion”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 116, pp. 333-336.

ODIAN, G., 2004, *Principles of Polymerization*, 4 ed., New Jersey, John Wiley & Sons.

PEDROSO, T.C, 2006, *Eficácia da Doxiciclina e da Combinação com o Dipropionato de Imidocarb no Tratamento de Ehrlichia canis em Cães*, Dissertação de M.Sc., Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

MELO, C.K., PINTO, J.C., 2011, “Testes de Liberação com Nanopartículas Poliméricas Carregadas com Doxiciclina”, Relatório Técnico 04, PEQ-13400, Programa de Engenharia Química da COPPE, Rio de Janeiro, Brasil.

SAHOO, S., SASMAL, A., SAHOO, D., NAYAK, P., 2010, “Synthesis e Characterization of Chitosan-Polycaprolactone Blended with Organoclay for Control Release of Doxycycline”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 118, pp. 3167-3175.

SANTOS, J.G.F., 2007, *Otimização do Processo de Obtenção do Cimento Ósseo à base de PMMA*, Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SCHACHT, E., BOGDANOV, B., BULCKE, A.V.D., De ROOZE, N., 1997, “Hydrogels Prepared by Crosslinking of Gelatin With Dextran Dialdehyde”, *Reactive & Functional Polymers*, v.33, pp. 109-116.

SCHRIEBER, R., GAREIS, H., 2007, *Gelatin Handbook*, Weinheim, Germany, Wiley VCH.

SCHUSTER, S.M., DENES, T.J.S., 2011, *Guia de Princípios Ativos, DrogaVet Manipulação Veterinária*, 5ª ed., Curitiba, PR, Brasil.

SIEWERT, M., DRESSMAN, J., BROWN, C., SHAH, V., 2003, “FIP/AAPS Guidelines for Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms”, *Dissolution Technologies*, February, pp.6-15.

SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D., VEIGA, F., 2003, “Administração Oral de Peptídeos e Proteínas: II. Aplicação de Métodos de Microencapsulação”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, nº 1, pp. 1-20.

SINDAN, Compêndio de Produtos Veterinários. Disponível em: <<http://www.cpvs.com.br/cpvs/index.html>>. Acesso em: 11 de Janeiro de 2013.

SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R., RUDZINSKI, W.E., 2001, “Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices”, *Journal of Controlled Release*, v.70, pp. 1-20.

SOUTO, E.B., SEVERINO, P., SANTANA, M.H.A., 2012, “Preparação de Nanopartículas Poliméricas a Partir de Polímeros Pré-formados – Parte II”, *Polímeros*, v. 22, pp. 101-106.

STOLLER, N.H., JOHNSON, L.R., TRAPNELL, S., HARROLD, C.Q., GARRETT, S., 1998, “Pharmacokinetic Release of Topical Doxycycline”, *Journal Periodontol* , v. 69, pp. 1085- 1091.

SUAVE, J., DALL’AGNOL, E.C., PEZZIN, A.P.T., SILVA, D.A.K., MEIER, M.M., SOLDI, V., 2006, “Microencapsulação: Inovação em Diferentes Áreas”, *Revista Saúde e Ambiente*, v.7, n°2, pp. 12-20.

U.S.. Food and Drug Administration (FDA), 2013. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/050751s0151bl.pdf>. Acesso em 15 de janeiro de 2013.

UENO, T.E.H., Aguiar, D.M., Pacheco, R.C., Richtzenhain, L.J., Ribeiro, M.G., Paes, A.C., Megid, A., Labruna, M.B., 2009, “*Ehrlichia canis* em Cães Atendidos em Hospital Veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 3, p. 57-61.

ULUBAYRAM, K., EROGLU, I., HASIRCI, N., 2002, “Gelatin Microspheres and Sponges for Delivery of Macromolecules”, *Journal of Biomaterials Applications*, v. 16, pp. 227-241.

USP (United States Pharmacopeial Convention), 2009a, “Topical and Transdermal Drug Products”, *Pharmacopeial Forum*, v. 35, pp. 750-764.

USP (United States Pharmacopeial Convention), 2009b, “Topical and Transdermal Drug Products – Product Performance Tests”, *Pharmacopeial Forum*, v. 35, pp. 1-28.

VANDELLI, M.A., ROMAGNOLI, M., MONTI, A., GOZZI, M., GUERRA, P., RIVASI F., FORNI, F., 2004, “Microwave-treated Gelatin Microspheres as Drug Delivery System”, *Journal of Controlled Release*, v. 96, pp. 67-84.

VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K., 2009, “Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles”, *Pharmaceutical Research*, v.26, nº5.

VIEIRA, R.F.C., Biondo, A.W., Guimarães, A.M.S. et al, 2011, “Ehrlichiosis in Brazil”, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 1-12.

VIGNARD-ROSEZ, K.S.F.V; ALVES, F.A.R. BLEICH, I.M., 2013, Disponível em: <http://www.cepav.com.br/br/paginas_internas/textos_tecnicos/erliquiose.html>.

Acesso em: 05 de Março de 2013.

VOGT, S.J., SCHNABELRAUCH, J., KUHN, K.M., 2004, “Pharmaceutical Preparation, Method for Its Production as Well as Its Use”, *Patent nº 0067253*, United States Patent, New York, USA.

WANER, T., Harrus, S., 2000, “Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME)”, *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, International Veterinary Information Service.

WAY, D.V., 2011, *Otimização da Produção de Resinas à base de Poli(metacrilato de metila) para Aplicações Odontológicas*, Projeto Final de Curso, Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

WICHTERLE, O., LIM, D., 1960, “Hydrophilic Gels in Biologic Use”, *Chemical Gel Nature*, v.185, p.117.

WU, H., ZHANG, Z., WU, D., ZHAO, H., YU, K., HOU, Z., 2006, “Preparation and Drug Release Characteristics of Pingyanmycin- loaded Dextran Cross-linked Gelatin Microspheres for Embolization Therapy”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Polymers*, v.78, pp. 56-62.

YANNAS, I.V., 1972, “Collagen and Gelatin in the Solid State”, *Journal of Macromolecular Science*, v.7, pp. 49-104.

YANNAS, I.V., TOBOLSKY, A.V., 1967, “Cross-linking of Gelatin by Dehydration”, *Nature*, v. 215, nº 5100, pp. 509-510.

ZAMPIERI, A.L.T.C., LIMA, E.M., DINIZ, D.G.A., 2005, “Estudo da Ligação Cruzada Induzida pelo Formaldeído em Cápsulas de Gelatina Dura”, *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.2 (2), pp. 73-19.

Apêndice A

Resultados de GPC

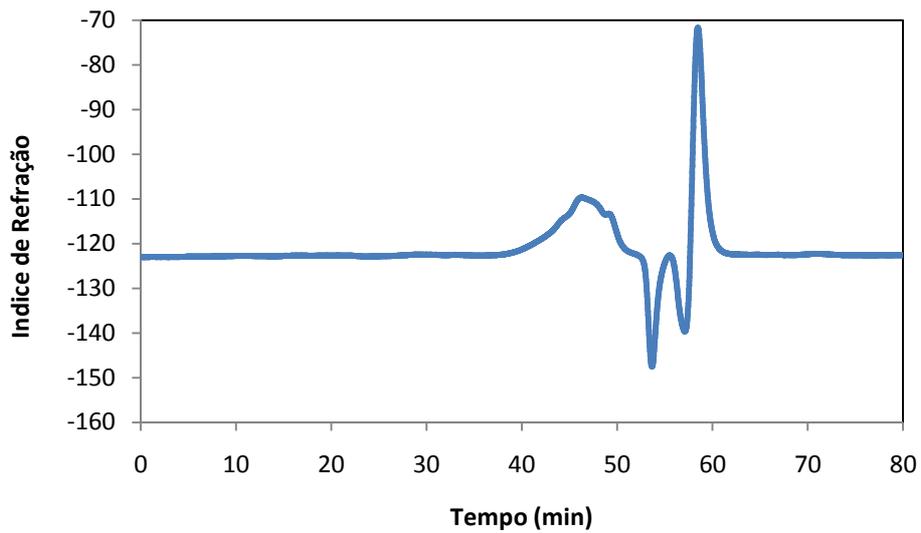


Figura 35 – Cromatograma da gelatina comercial PhEur.

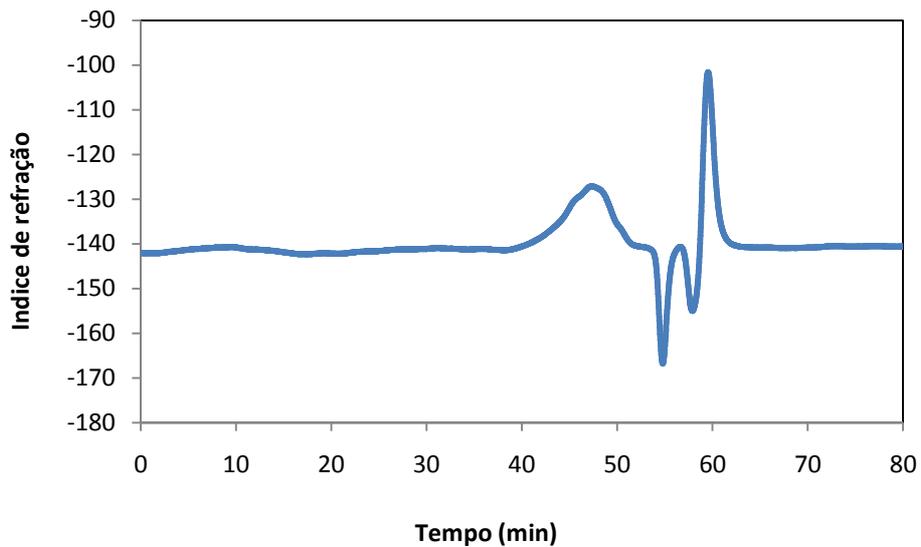


Figura 36 – Cromatograma da gelatina comercial de porco.

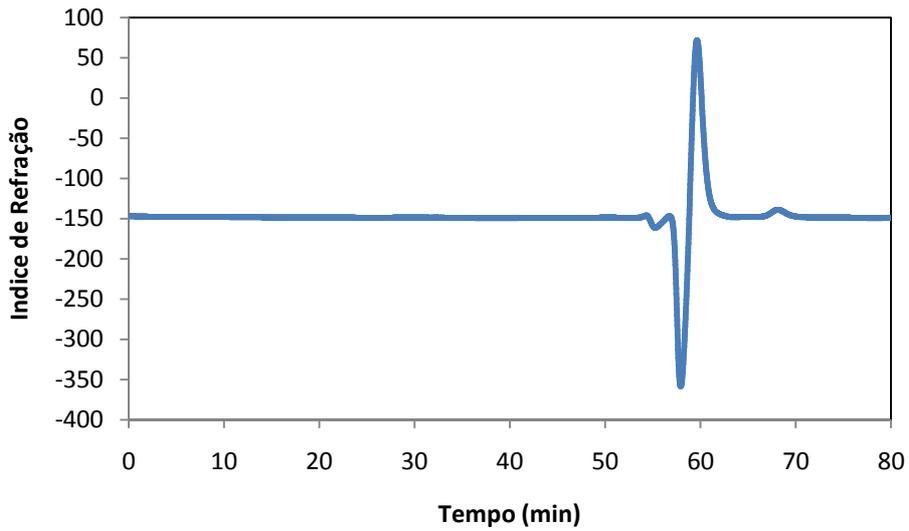


Figura 37 – Cromatograma da doxiciclina.

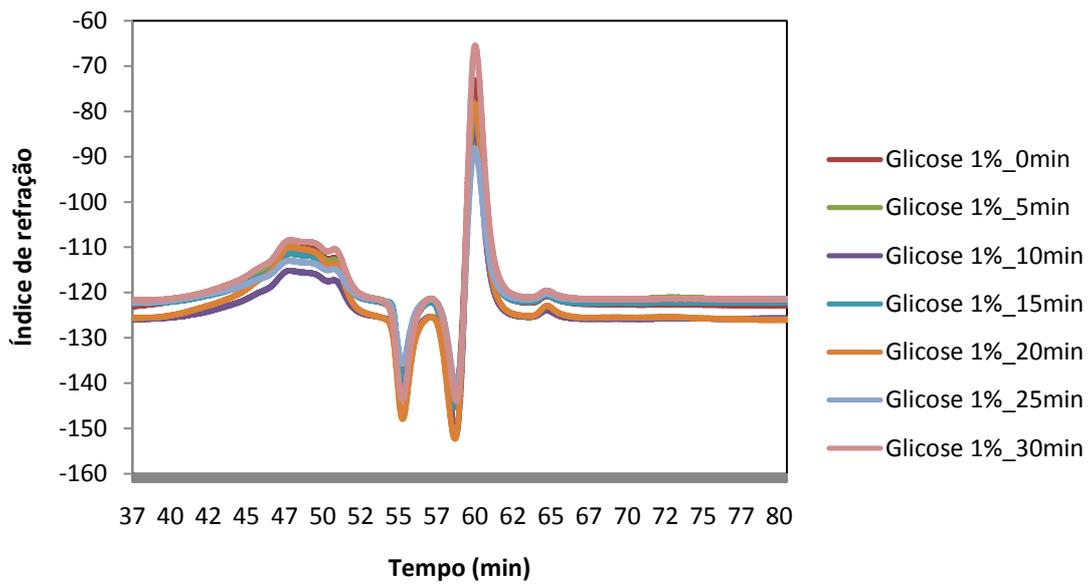


Figura 38 – Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 1.

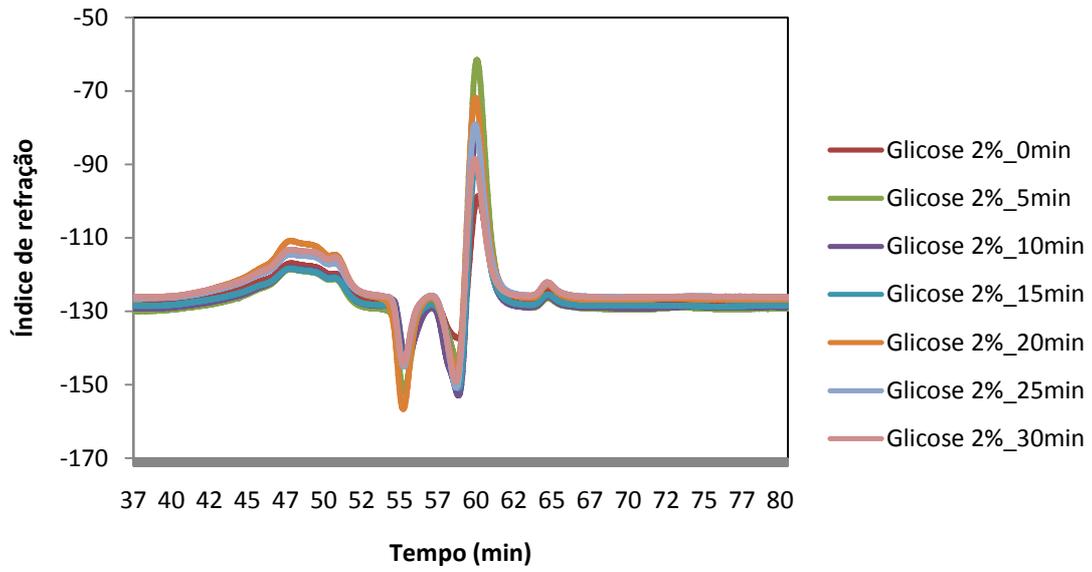


Figura 39 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 2.

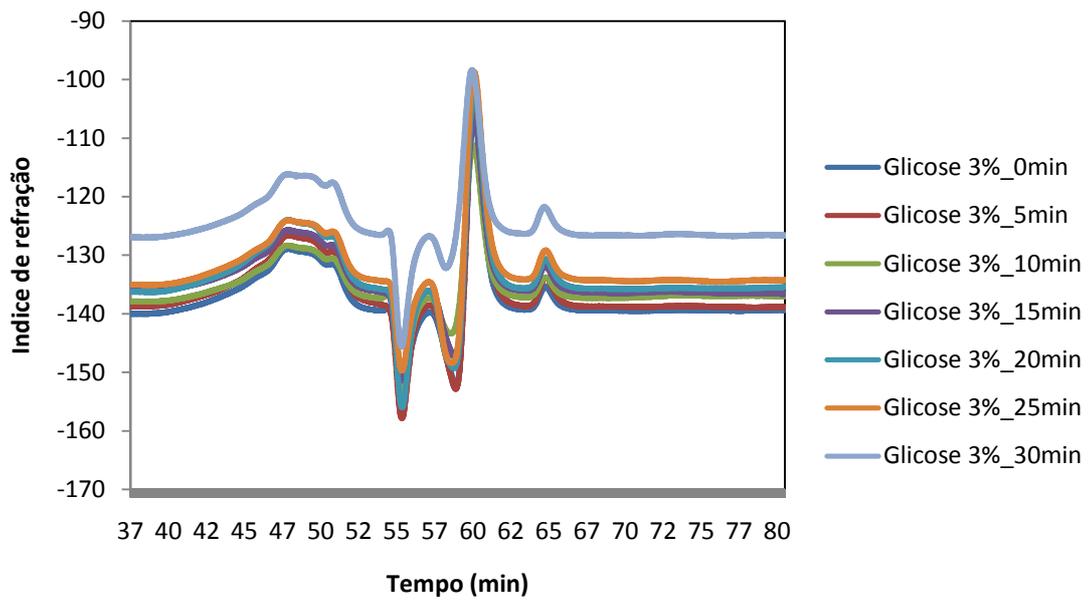


Figura 40 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 3.

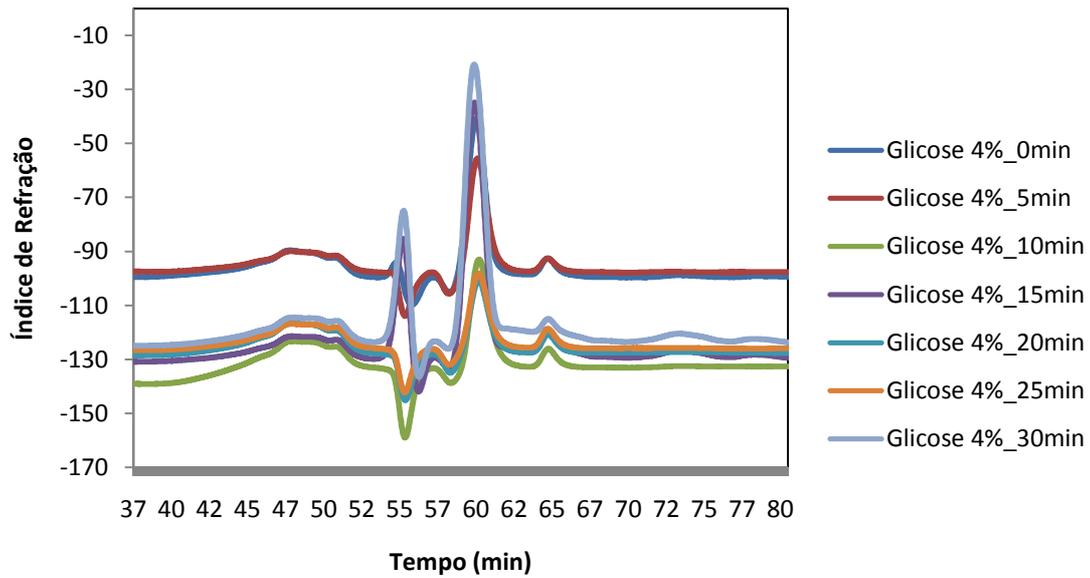


Figura 41 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 4.

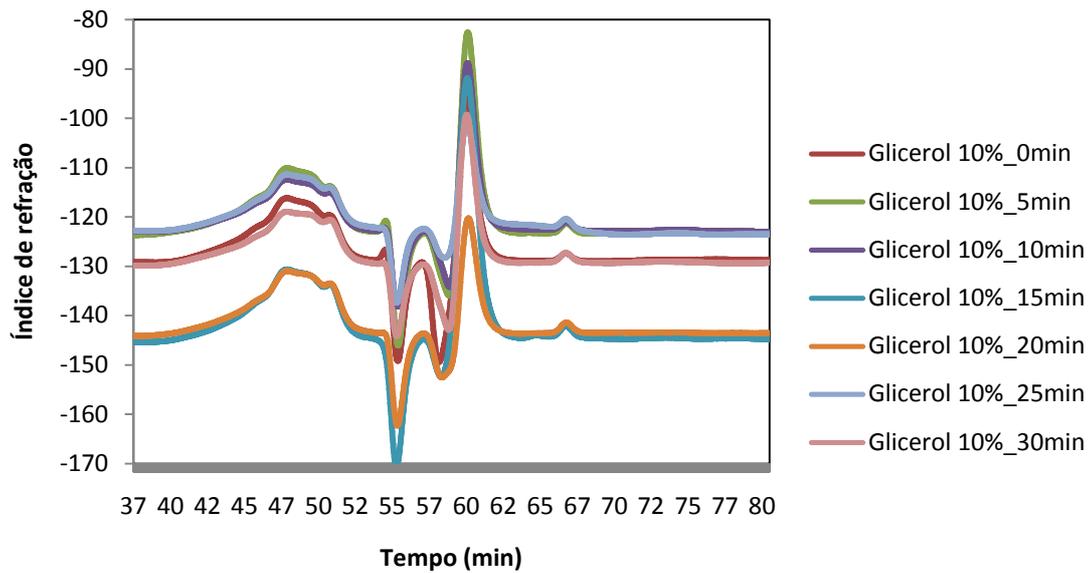


Figura 42 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 5.

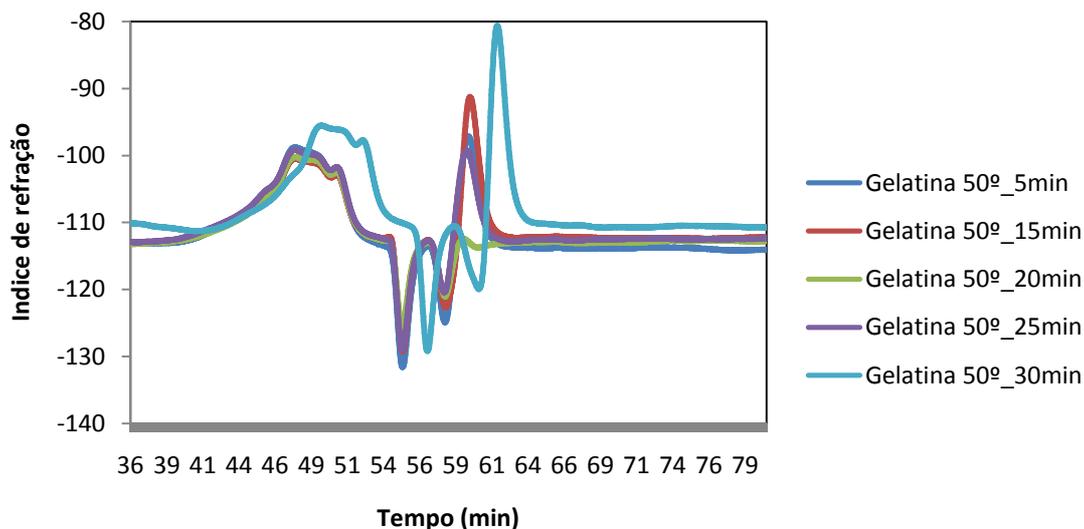


Figura 43 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 6.

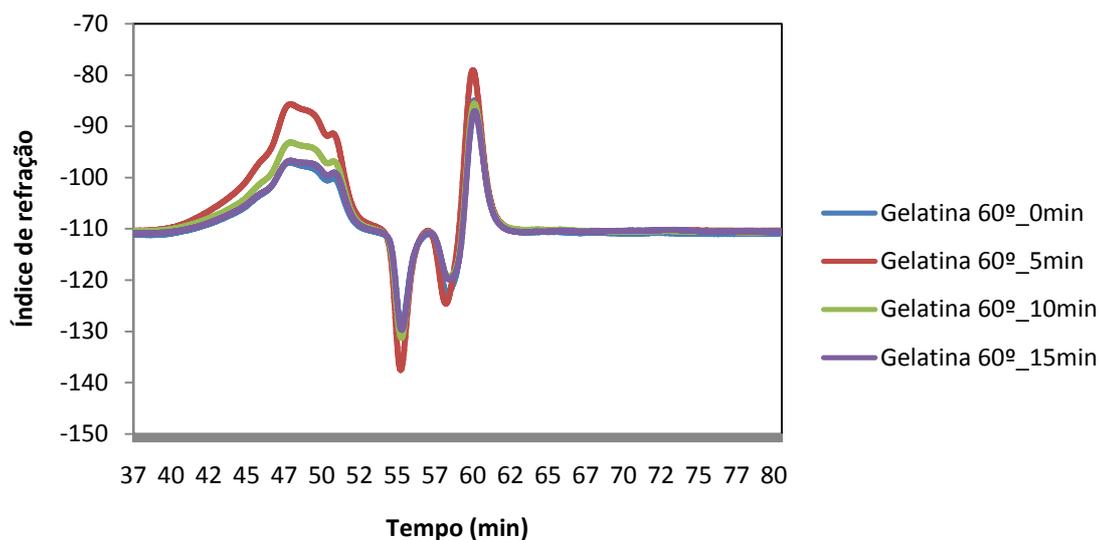


Figura 44 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 7.

As análises de GPC das reações 8 e 9 não foram realizadas, uma vez que os resultados das análises das reações anteriores se mostraram repetitivos.

A análise das reações 10 e 11 não foi possível devido ao fato de as amostras não serem solúveis em água. Isso ocorre por conta da adição de formaldeído, que sabidamente é capaz de reticular as cadeias de gelatina.

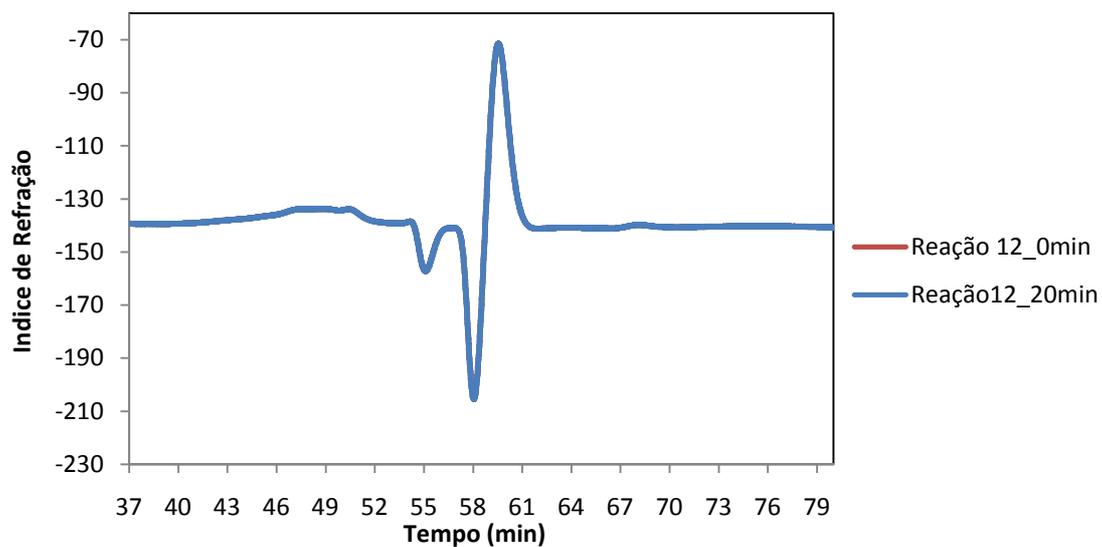


Figura 45 - Cromatogramas das diferentes alíquotas referentes à reação 12.

Como não houve alteração alguma no cromatograma das alíquotas 0 min e 20 min da reação 12, as análises das alíquotas de 5, 10, 15, 25 e 30 min não foram realizadas.

Apêndice B

Análises de Espalhamento de Luz e Fotografias

A seguir são apresentadas as distribuições de tamanho de partícula obtidas por meio de análise de espalhamento de luz junto à fotografia do material retirada com auxílio de microscópio óptico.

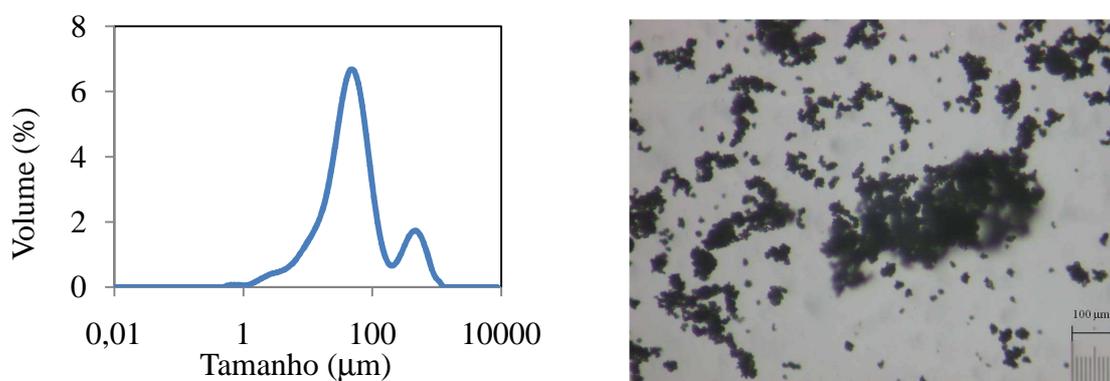


Figura 46 – Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 1.

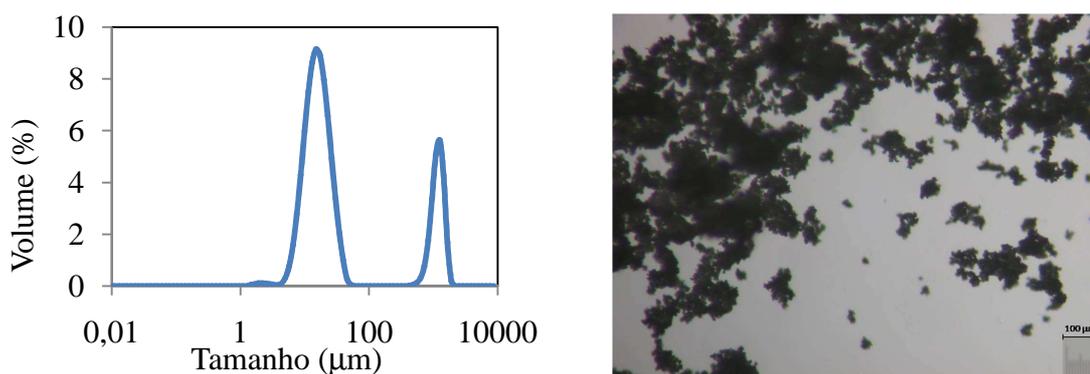


Figura 47 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 2.

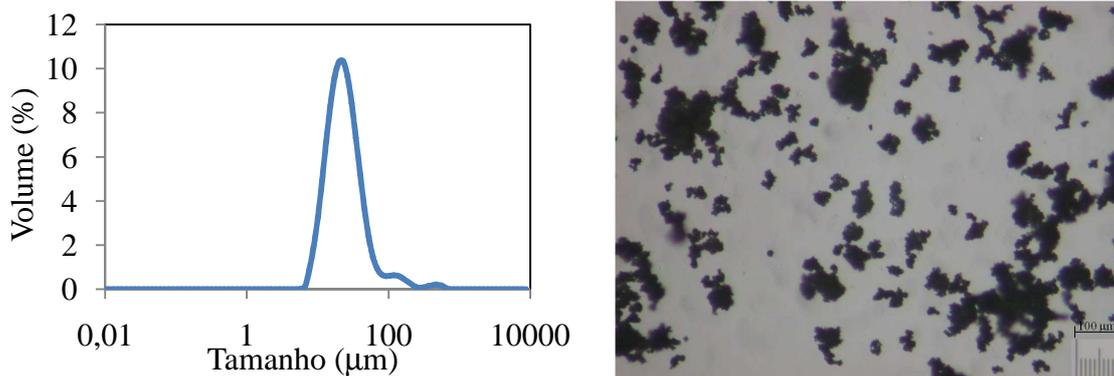


Figura 48 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 3.

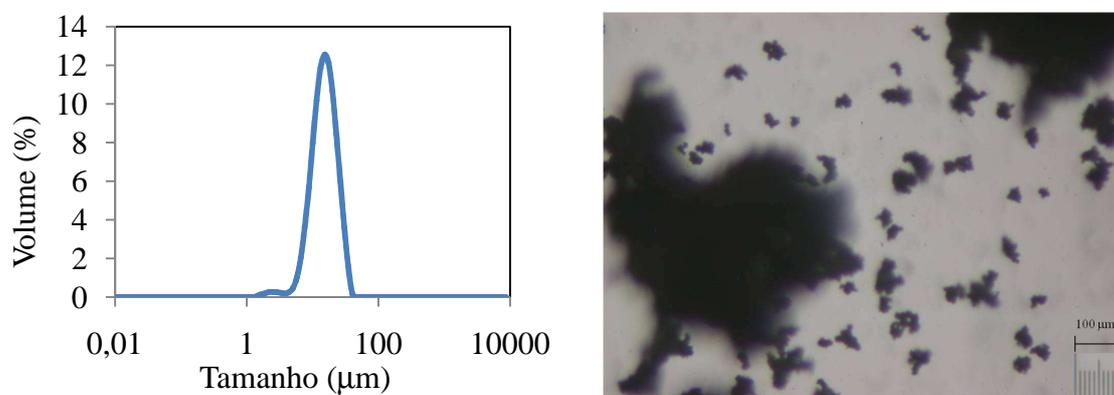


Figura 49 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 4.

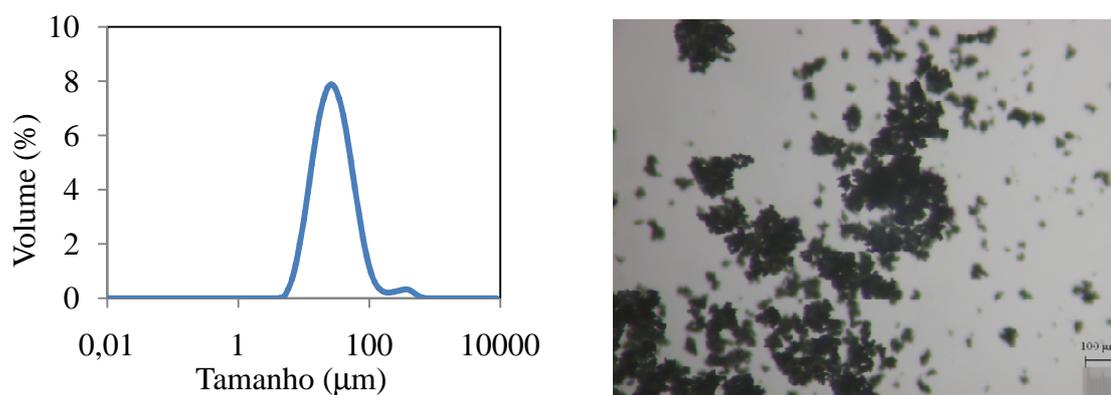


Figura 50 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 5.

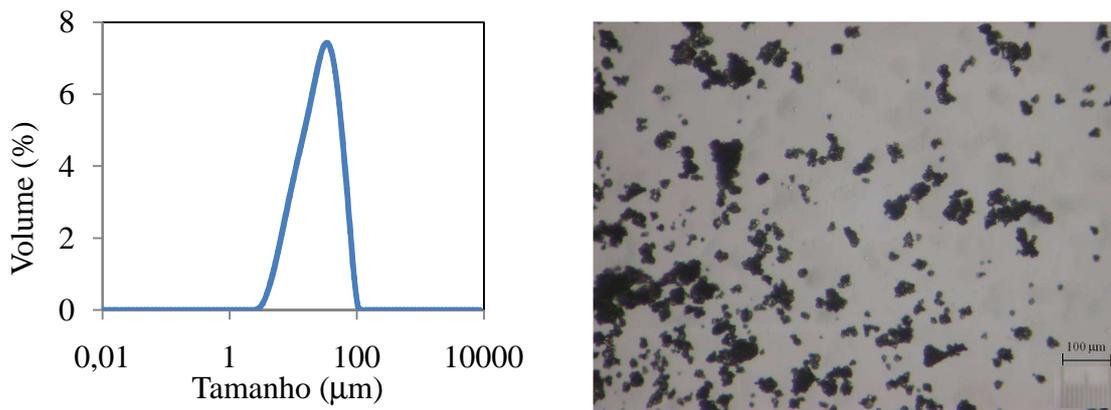


Figura 51 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 6.

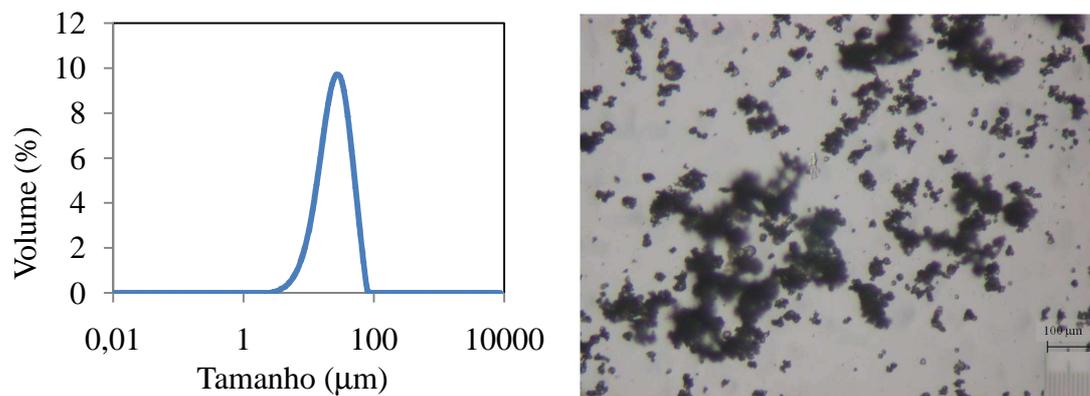


Figura 52 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 7.

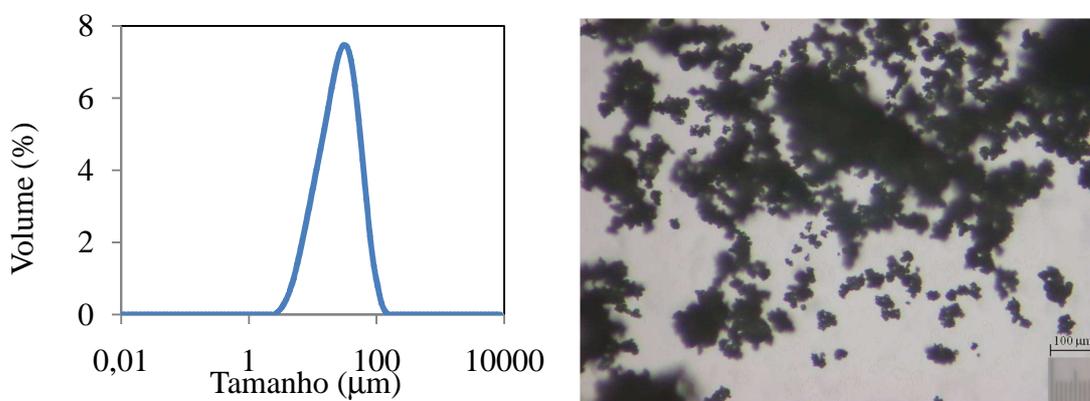


Figura 53 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 8.

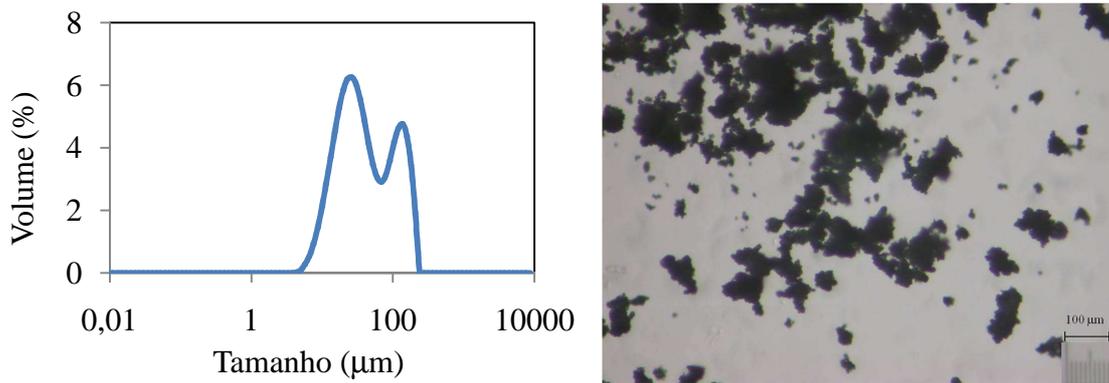


Figura 54 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 9.

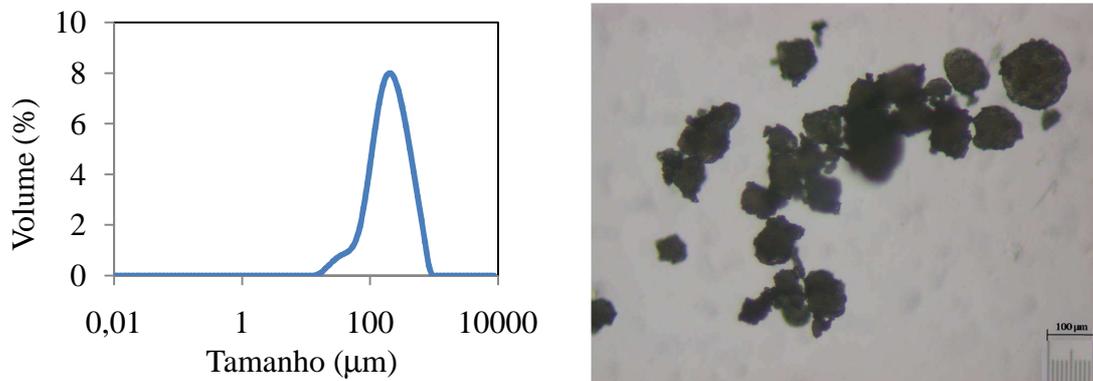


Figura 55 - Distribuição de tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 10.

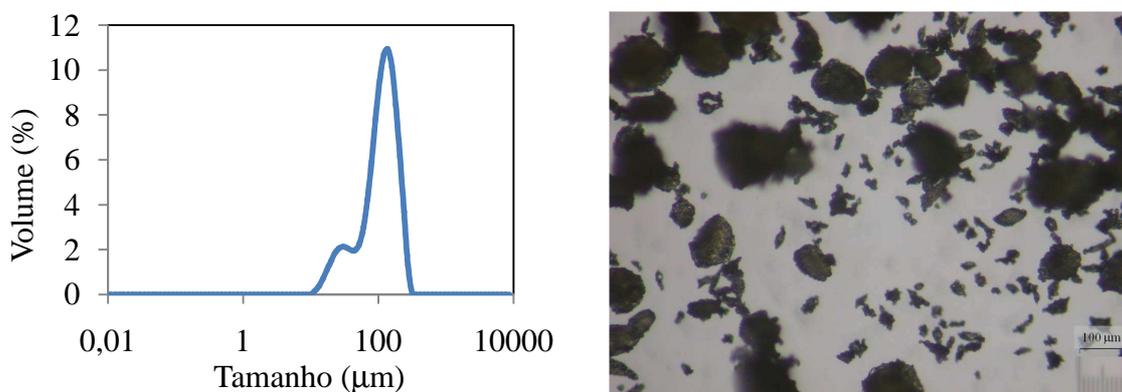


Figura 56 - Distribuição de Tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 11.

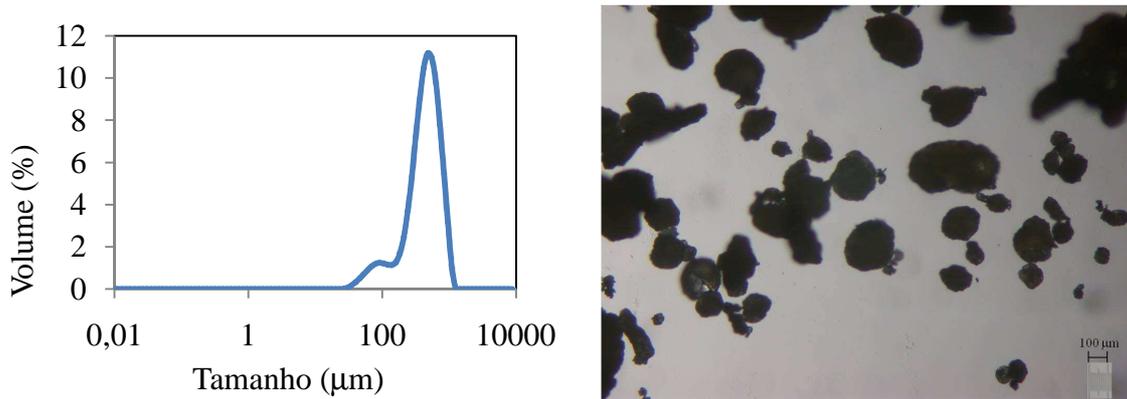


Figura 57 - Distribuição de Tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 12.

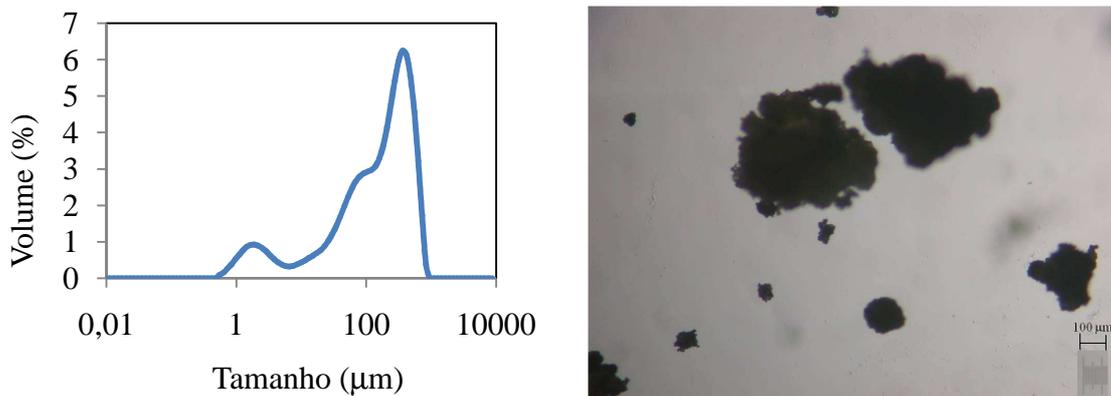


Figura 58 - Distribuição de Tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 13.

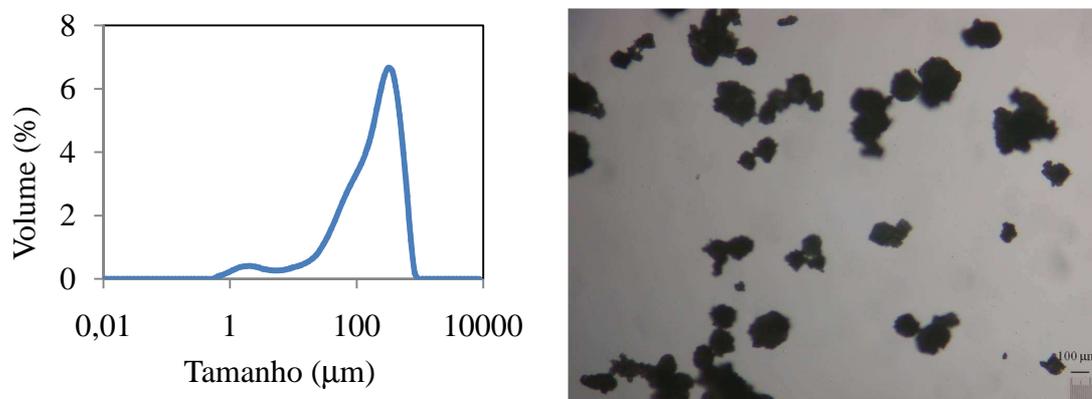


Figura 59 - Distribuição de Tamanhos de partícula e fotografia retirada com auxílio de microscópio óptico da gelatina produzida na reação 14.