

Universidade de Coimbra

Faculdade de Farmácia

Microencapsulação de fármacos peptídicos em pectina  
pelo método de emulsificação/gelificação interna  
A albumina como fármaco modelo



Alice Paula Alves Urbano

Coimbra

2004

---

Universidade de Coimbra

Faculdade de Farmácia

Microencapsulação de fármacos peptídicos em pectina  
pelo método de emulsificação/gelificação interna  
A albumina como fármaco modelo

Alice Paula Alves Urbano

Dissertação apresentada para obtenção  
do Grau de Mestre em Farmácia,  
Área de Farmacotecnia e Biogalénica

Coimbra

2004

“A vida humana é demasiado curta  
para que nos dediquemos ao estudo de problemas sem sentido;  
a memória é limitada,  
e quanto mais entulho científico tivermos na nossa cabeça,  
tanto menor será o espaço para as grandes ideias.”

*Lev D. Landau*

Para os pais,  
Alice e Joaquim António,  
os melhores do mundo,  
que sempre acreditaram  
que era possível.

Para o avô Quim,  
o nosso anjo da guarda.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Francisco José de Baptista Veiga e ao Professor Doutor António José Ribeiro, orientadores deste trabalho, pela colaboração e ensinamentos transmitidos, pela paciência e compreensão e, especialmente, por não terem desistido deste projecto.

Ao Professor Doutor João José Sousa pelas sempre simpáticas palavras de ânimo.

À Catarina Silva e à Catarina Reis, pelo acompanhamento diário, o apoio e estímulo constante nas dificuldades e nos sucessos. Sem as longas discussões que tivemos, de onde surgiram ideias e soluções, esta tese não teria sido possível.

À Laura pela ajuda, conselhos, pelo ombro amigo e sorriso diário.

À Rita, à Ana Raquel, ao Rui, ao Manuel e a todos os outros elementos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pela simpatia com que nos receberam e pelo bom ambiente de trabalho que nos proporcionaram.

À Dra. Margarida Figueiredo pelas facilidades concedidas na utilização dos equipamentos do LabGran no Instituto Pedro Nunes e ao Eng. Vítor pela disponibilidade constante.

Ao Adamo pela ajuda preciosa nas questões do Latex, pela atenção e paciência infinita de que só um bom amigo é capaz.

À Raquel, ao César, à Helena, à Cláudia, mais uma vez, pela amizade incondicional própria dos amigos que são para sempre.

Ao André, por ter estado presente em todas as horas e pelo apoio incansável que nos permitiram mais esta realização pessoal.

Aos pais, sem quem nada faria sentido.

**BEM HAJAM.**

## Resumo

Com os rápidos avanços na área da biotecnologia, as proteínas e fármacos peptídicos têm vindo a afirmar-se como uma classe de agentes terapêuticos cada vez mais importante. Contudo, apesar de serem extremamente activos e específicos nas suas funções, a maior parte deles não são activos quando administrados por via oral. De facto, a via oral constitui um sério obstáculo devido às barreiras físicas e enzimáticas do tracto gastrointestinal superior.

Como a administração convencional não providencia uma libertação controlada ou direccionada, a biodisponibilidade oral pode ser melhorada recorrendo-se a outras formas de administração. As microesferas de polímeros degradáveis têm sido alvo de muitos estudos e constituem um sistema vantajoso uma vez que podem ser injectadas ou ingeridas, formuladas para produzirem um determinado perfil de libertação ou atingirem um alvo específico.

Em combinação com os métodos de microencapsulação, a libertação específica no cólon tem sido extensivamente investigada. Embora a mucosa do cólon não seja o local mais apropriado para a absorção, esta região apresenta vantagens para a absorção de peptídeos devido ao trânsito intestinal lento e ao baixo nível de peptidases. Esta abordagem permitiria uma redução da quantidade de fármaco administrada, de efeitos adversos e um aumento da biodisponibilidade oral. A maioria dos sistemas utilizados baseiam-se nas variações de pH, do trânsito intestinal relativamente constante ou na degradação enzimática pelas bactérias do cólon, mas os últimos parecem ser os mais promissores.

A pectina, um polissacarídeo natural, é resistente às proteases mas degradada pela flora bacteriana do cólon. Sob a forma de pectinato de cálcio, tem sido utilizada em películas, comprimidos e microesferas. Neste trabalho, propomos a preparação de microesferas de pectinato de cálcio por um método de emulsificação/gelificação interna como estratégia para aumentar a biodisponibilidade oral de proteínas ou fármacos peptídicos.

## Abstract

With the rapid advances in the field of biotechnology, proteins and peptide drugs are increasingly becoming a very important class of therapeutic agents. However, even though these drugs are highly potent and specific in their physiological functions, most of them are generally not therapeutically active by oral administration. In fact, the oral route presents a severe obstacle for peptide drugs due to the physical and enzymatic barriers of the superior gastrointestinal tract.

As conventional oral drug administration does not usually provide rate-controlled release or target specificity, an important strategy to improve oral bioavailability is the resort to other dosage forms or formulations. Microspheres prepared from degradable polymers have been thoroughly studied and constitute an advantageous system because they can be injected or ingested, tailored for desired release profiles and provide organ-targeted release.

In combination with the microencapsulation methods, the colon specific delivery has been extensively studied. Although the surface area of the colon is not ideal for absorption, it appears to have some advantages for peptide absorption owing to slow transit and a lower level of peptidases than ileum. Therefore, the specific colonic delivery of drugs would allow either the reduction of the total administered dose to the patient, decreasing the possible side effects or the improvement of the oral bioavailability of the drug. Most systems used rely on the variation of the pH value through the gastrointestinal tract, the relatively constant small intestine transit time and enzymatic degradation by colonic bacteria, although the latter approach appears to be more promising.

Pectin, a natural polysaccharide, is resistant to proteases whereas it is digested by the bacterial flora of the colon. In the form of calcium pectinate, it has been formulated into films, compressed tablets and microspheres. In this work, we propose calcium pectinate microspheres prepared by an emulsification/internal gelation method as a strategy to increase the oral bioavailability of protein or peptide drugs.

# ÍNDICE

<b>Lista de Figuras</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>ix</b>
<b>Capítulo 1: Introdução</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 2: Administração oral de peptídeos e libertação específica no cólon</b>	<b>3</b>
2.1 O tracto gastrointestinal . . . . .	4
2.1.1 Aspectos anatómicos e fisiológicos . . . . .	4
2.2 A administração oral de peptídeos . . . . .	8
2.2.1 Obstáculos à absorção . . . . .	9
2.2.2 Estratégias gerais para optimização da absorção . . . . .	12
2.3 Libertação específica no cólon . . . . .	15
2.3.1 Sistemas dependentes do tempo e sistemas osmóticos . . . . .	17
2.3.2 Sistemas dependentes da pressão . . . . .	18
2.3.3 Pró-fármacos . . . . .	19
2.3.4 Sistemas poliméricos . . . . .	19
2.4 A albumina como fármaco modelo: características físico-químicas . . . . .	21
<b>Capítulo 3: Pectina: propriedades e aplicações</b>	<b>25</b>
3.1 Grau de esterificação e tipos de pectina . . . . .	26
3.2 Fontes e produção . . . . .	28
3.3 Aplicações . . . . .	29

3.4	Estrutura e propriedades físico-químicas . . . . .	31
3.5	Mecanismos de gelificação . . . . .	34
3.5.1	Pectinas HM . . . . .	35
3.5.2	Pectinas LM . . . . .	37
3.6	As enzimas pectinolíticas . . . . .	39
3.7	A pectina como veículo de fármacos absorvidos no cólon: estudos conhecidos	40
3.7.1	Macroesferas de pectinato de cálcio . . . . .	40
3.7.2	Microesferas e microcápsulas de pectinato de cálcio . . . . .	45
3.7.3	Macroesferas de pectinato de cálcio revestidas com quitosano . . . . .	49
3.7.4	Comprimidos de pectina ou pectinato de cálcio . . . . .	50
3.7.5	Revestimento por película . . . . .	55
3.7.6	<i>Pellets</i> de pectina . . . . .	57
<b>Capítulo 4: Microencapsulação por gelificação iónica</b>		<b>59</b>
4.1	Noções gerais . . . . .	59
4.2	Emulsificação <i>versus</i> extrusão . . . . .	63
4.2.1	Isolamento das microesferas . . . . .	65
4.3	Gelificação iónica . . . . .	65
4.3.1	Gelificação externa . . . . .	67
4.3.2	Gelificação interna . . . . .	73
<b>Capítulo 5: Materiais e Métodos</b>		<b>75</b>
5.1	Matérias primas . . . . .	75
5.2	Preparação das microesferas . . . . .	76
5.2.1	Configuração do reactor . . . . .	76
5.2.2	Preparação da solução de pectina/BSA . . . . .	77
5.2.3	Emulsificação/gelificação interna . . . . .	77

5.2.4	Revestimento . . . . .	78
5.2.5	Lavagem e isolamento . . . . .	80
5.2.6	Secagem . . . . .	80
5.3	Caracterização das microesferas . . . . .	83
5.3.1	Avaliação morfológica . . . . .	83
5.3.2	Granulometria . . . . .	83
5.4	Determinação da eficiência de encapsulação . . . . .	83
5.5	Estudos de liberação . . . . .	83
5.5.1	Quantificação da BSA . . . . .	84
<b>Capítulo 6: Resultados e Discussão</b>		<b>85</b>
6.1	Parâmetros de processo . . . . .	85
6.1.1	pH da solução de pectina/BSA . . . . .	85
6.1.2	Dispersão do carbonato de cálcio . . . . .	87
6.1.3	Concentração do agente emulsivo . . . . .	89
6.1.4	Relação de fases . . . . .	89
6.1.5	Velocidade de agitação . . . . .	90
6.1.6	Isolamento das microesferas . . . . .	91
6.2	Parâmetros de formulação . . . . .	92
6.2.1	Tipo de pectina . . . . .	92
6.2.2	Concentração de pectina . . . . .	92
6.2.3	Proporção polímero/proteína . . . . .	94
6.2.4	Revestimento com quitosano . . . . .	94
6.2.5	Presença de adjuvantes sem e com revestimento . . . . .	98
6.3	Discussão geral . . . . .	99
6.3.1	Escolha dos parâmetros fixos de processo e formulação . . . . .	99
6.3.2	O fenômeno de pré-gelificação . . . . .	104

6.3.3	Análise da granulometria . . . . .	104
6.3.4	Análise das eficiências de encapsulação e liberação a pH 1,2 . . .	110
<b>Capítulo 7:</b>	<b>Conclusões</b>	<b>119</b>

## LISTA DE FIGURAS

2.1	Estrutura $\alpha$ -helicoidal da molécula de BSA (Friedli, 1996). . . . .	22
2.2	Modelo “space filling” da molécula de BSA mostrando a distribuição superficial de cargas (Friedli, 1996). . . . .	22
2.3	Conformação “expanded” (Friedli, 1996). . . . .	23
2.4	Conformação “fast” (Friedli, 1996). . . . .	23
2.5	Conformação “normal” (Friedli, 1996). . . . .	23
2.6	Relação entre as formas isoméricas da BSA e o pH (Friedli, 1996). . . . .	24
3.1	Diferentes tipos de pectina. a) pectina HM, b) pectina LM, c) pectina LM amidada. . . . .	27
3.2	Esquema tridimensional da disposição da pectina na parede celular de uma planta. . . . .	28
3.3	Representação de uma unidade dissacárida da cadeia galacturónica da pectina (adaptado de (Braccini et al., 1999)). . . . .	32
4.1	Esquema proposto para a estrutura interna de macroesferas de alginato de cálcio preparadas por um método de extrusão/gelificação externa, onde se podem ver as diferentes microtexturas (adaptado de (Bienaimé et al., 2003)).	68
4.2	Esquema do corte de macroesferas de alginato de cálcio, após exposição ao calcicromo, que mostra a espessura da crosta superficial e a profundidade da zona de gelificação intermédia (adaptado de (Bienaimé et al., 2003)). . .	70

4.3	Constituição da barreira polimérica durante a gelificação e formação de cavidades (adaptado de (Bienaimé et al., 2003)). $M^{2+}$ e $M^{3+}$ representam, genericamente, os catiões bi- e trivalentes. . . . .	71
4.4	Esquema que representa a formação de uma cavidade em forma de haste (adaptado de (Bienaimé et al., 2003)). Note-se a troca iónica entre iões $Na^+$ e $Ca^{2+}$ e a perda de moléculas de água que conduz à redução de volume da macroesfera. . . . .	72
4.5	Granulometria típica obtida para microesferas de alginato de cálcio preparadas por emulsificação/gelificação interna (adaptado de (Poncelet, 2001)) .	74
5.1	Reactor cilíndrico de fundo redondo e hélice marinha de três lâminas. . . .	77
5.2	Esquema da preparação das microesferas de pectina contendo BSA. . . . .	79
6.1	Microesferas liofilizadas com congelamento a $-40^{\circ}C$ em banho de etanol a 96% (à esquerda) e com congelamento a $-20^{\circ}C$ em frigorífico (à direita). . . . .	86
6.2	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes concentrações de agente emulsivo. . . . .	89
6.3	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes relações de fases. . . . .	90
6.4	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes velocidades de agitação. . . . .	91
6.5	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas isoladas por deposição e centrifugação. . . . .	91
6.6	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com dois tipos diferentes de pectina. . . . .	92
6.7	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes concentrações de pectina. . . . .	94

6.8	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes razões entre pectina e BSA. . . . .	95
6.9	Influência do revestimento de quitosano na eficiência de encapsulação e na libertação a pH 1,2. . . . .	96
6.10	Influência da adição de Span®80 à solução de revestimento na eficiência de encapsulação e na libertação a pH 1,2. . . . .	97
6.11	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes concentrações de quitosano. . . . .	98
6.12	Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas constituídas por pectinato de cálcio (CaP), pectinato de cálcio e tripolifosfato de sódio (TPP) e por pectinato de cálcio e tripolifosfato de sódio revestidas com quitosano (TPP/Quitosano). . . . .	99
6.13	Concentração de cálcio livre em função do pH para diferentes sais de cálcio (adaptado de (Poncelet et al., 1995; Poncelet, 2001)). . . . .	100
6.14	Esquema da interacção entre pectina e proteína (adaptado de Thakur e colaboradores (Thakur et al., 1997)). . . . .	103
6.15	Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e sem revestimento. A ampliação foi de 500x. . . . .	105
6.16	Microesferas de pectinato de cálcio preparadas por emulsificação/gelificação externa (Wong et al., 2002b)). . . . .	105
6.17	Microesferas de pectinato de cálcio preparadas por emulsificação/gelificação por arrefecimento (Esposito et al., 2001)). . . . .	105
6.18	Aspecto dos fragmentos obtidos quando foi utilizada a solução de pectina a 3% (m/v). . . . .	108
6.19	Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e tripolifosfato de sódio. A ampliação foi de 500x. . . . .	109

6.20	Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e tripolifosfato de sódio e revestidas com quitosano. As setas indicam o local das microesferas. A ampliação foi de 500x. . . . .	109
6.21	Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com uma pectina HM. As setas indicam malformações das microesferas. A ampliação foi de 500x. . . . .	113
6.22	Esquema representativo da interacção entre pectina e quitosano (adaptado de (Lee et al., 1997)). . . . .	115
6.23	Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e revestidas com quitosano. A ampliação foi de 200x. . .	116
6.24	Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e revestidas com quitosano contendo Span®80. A ampliação foi de 500x. . . . .	116

## LISTA DE TABELAS

3.1	Fármacos encapsulados em macroesferas de pectinato de cálcio com ou sem revestimento. . . . .	44
3.2	Fármacos encapsulados em microesferas ou microcápsulas de pectinato de cálcio. . . . .	48
3.3	Fármacos incorporados em matrizes de pectina, pectinato de cálcio ou combinação com outros polímeros. . . . .	52
3.4	Utilização da pectina ou derivados nos revestimentos por película. . . . .	56
3.5	Utilização da pectina sob a forma de <i>pellets</i> . . . . .	58
4.1	Classificação dos métodos de encapsulação segundo Thies (Thies, 1996). . . . .	61
5.1	Parâmetros de processo estudados. . . . .	81
5.2	Parâmetros de formulação estudados. . . . .	82
6.1	Fenómeno de pré-gelificação . . . . .	86
6.2	Resultados da granulometria das microesferas preparadas a partir de soluções de pectina/BSA com diferentes valores de pH. . . . .	87
6.3	Efeito dos parâmetros de processo na granulometria e na eficiência de encapsulação das microesferas. . . . .	88
6.4	Efeito dos parâmetros de formulação na granulometria e na eficiência de encapsulação das microesferas. . . . .	93
6.5	Influência do revestimento de quitosano na distribuição de tamanhos. . . . .	96

6.6	Influência da adição de Span®80 à solução de revestimento na distribuição de tamanhos. . . . .	97
-----	--	----

## Capítulo 1

### **INTRODUÇÃO**

Os progressos na área da biotecnologia, nomeadamente o desenvolvimento de proteínas recombinantes, proporcionaram um aumento da utilização de proteínas purificadas para propósitos farmacêuticos. Os peptídeos e proteínas são moléculas de elevado peso molecular relativamente aos fármacos convencionais, geralmente instáveis, difíceis de analisar nos fluidos corporais e a sua passagem através das membranas biológicas é relativamente complexa. Assim sendo, os fármacos deste tipo que estão comercialmente disponíveis são normalmente administrados parenteralmente ou sob a forma de implantes poliméricos.

A via oral é, sem dúvida, a mais popular forma de administração de fármacos, pelo que têm vindo a ser desenvolvidas estratégias que permitam promover e otimizar a sua utilização. Esta via de administração apresenta diversos e complexos obstáculos à absorção de proteínas e fármacos peptídicos devido à existência de barreiras fisiológicas e enzimáticas no tracto gastrointestinal, pelo que a biodisponibilidade oral destes agentes é muito reduzida.

O acesso à circulação sistémica através da absorção no cólon representa, portanto, uma forma de administrar peptídeos, fármacos proteicos e fármacos pouco absorvidos no tracto gastrointestinal superior. Além disso, para o tratamento de doenças características do tracto gastrointestinal inferior, como a doença de Crohn, as colites ulcerosas ou cancro do cólon, a vectorização do fármaco não só permite diminuir a dose administrada como também pode reduzir a incidência de efeitos adversos associados. O fluido colónico não é ácido e contém níveis baixos de enzimas proteolíticas responsáveis pela destruição dos fármacos

peptídicos. Além disso, contém um elevado número de enzimas que degradam especificamente um grande número de polissacarídeos.

A combinação de diferentes estratégias que permitam transpor simultaneamente as barreiras física e enzimática do tracto gastrointestinal, possibilita o aumento da biodisponibilidade de proteínas e fármacos peptídicos administrados por via oral. O trabalho que aqui apresentamos associa a encapsulação em microesferas com um polissacarídeo cuja propensão de vectorização para o cólon tem sido extensivamente estudada.

Quando começámos a desenvolver este projecto, pretendíamos preparar microesferas de pectina pelo método de emulsificação/gelificação interna partindo do trabalho que tem vindo a ser realizado no nosso Laboratório de Investigação com um outro polímero natural, o alginato. No entanto, a mudança de polímero determinou que fosse alterado um conjunto de condições fundamentais (pH das soluções, concentração do polímero, quantidade do agente reticulante, etc.) para a obtenção de microesferas. Para o desenvolvimento deste trabalho, optámos pela albumina sérica bovina como fármaco modelo.

Esta dissertação está organizada da seguinte forma: no segundo capítulo, consideramos questões relacionadas com a administração oral de proteínas e fármacos peptídicos e a libertação específica no cólon como estratégia para aumentar a biodisponibilidade daqueles tipos de fármacos. No terceiro capítulo, introduzimos o polissacarídeo em estudo e fazemos uma revisão do trabalho que tem sido publicado no que diz respeito às suas aplicações na administração especificamente direccionada ao cólon. No quarto capítulo, recordamos alguns conceitos e técnicas em microencapsulação dando especial atenção ao fenómeno de gelificação. No quinto capítulo descrevemos os métodos experimentais utilizados. No sexto capítulo apresentamos e discutimos os resultados obtidos. No sétimo capítulo referimo-nos às conclusões gerais deste trabalho.

## Capítulo 2

# **ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PEPTÍDEOS E LIBERTAÇÃO ESPECÍFICA NO CÓLON**

Até à década de 60 pensava-se que os peptídeos e proteínas eram completamente digeridos no tracto gastrointestinal antes que pudesse ocorrer alguma absorção. Entretanto, após estudos de detecção de anticorpos, da determinação sérica directa de proteínas administradas oralmente ou experiências com tecidos isolados, sabe-se actualmente que pequenas quantidades intactas de peptídeos ou proteínas podem entrar na circulação (Langguth et al., 1997). Numerosos estudos com um conjunto de fármacos peptídicos, alguns efectuados em humanos mas a maior parte em animais de laboratório, também revelaram que somente pequenas quantidades destes fármacos são absorvidos no tracto gastrointestinal após administração oral, devido ao metabolismo luminal, das microvilosidades e do citosol e à presença de barreiras à difusão (Fix, 1996b; Rubinstein et al., 1997).

Entretanto, as proteínas e peptídeos afirmaram-se como uma classe importante de fármacos terapêuticos (Lai e Topp, 1999). A sua susceptibilidade à degradação química continua, todavia, a representar um desafio ao desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis.

Neste capítulo pretendemos rever algumas noções anatómicas e fisiológicas sobre o tracto gastrointestinal, expor algumas questões relativas à administração oral de proteínas e fármacos peptídicos e descrever aspectos associados à sua libertação específica no cólon.

## 2.1 O tracto gastrointestinal

### 2.1.1 Aspectos anatómicos e fisiológicos

#### Descrição

O estômago está situado na parte superior da cavidade abdominal, entre a parte terminal do esófago e o início do duodeno, por cima do cólon transverso e do mesocólon<sup>1</sup>. A função do estômago é em parte mecânica, executada pela musculatura externa, e em parte química, regulada pela presença de glândulas na mucosa.

O intestino delgado compreende a porção do tubo digestivo que se estende do estômago ao intestino grosso, com um comprimento total de aproximadamente 6m. Está delimitado, em cima, pelo piloro e, em baixo, pela válvula íleocecal e divide-se em três porções: o duodeno, o jejuno e o íleo. Sendo um órgão de digestão e absorção, o intestino delgado possui uma microestrutura complexa composta por vilosidades e microvilosidades que proporcionam uma elevada área de superfície.

O intestino grosso estende-se desde a válvula íleocecal ao ânus e é constituído pelo cego, apêndice íleocecal, cólon ascendente, transverso, descendente e sigmóide e recto. Tem cerca de 1,5m de comprimento, uma área de superfície de cerca de 1300cm<sup>2</sup> e o seu diâmetro varia de aproximadamente 9,0cm no região do cego a 2,0cm no cólon sigmóide (Hastewell et al., 1991).

Do ponto de vista da sua composição anatómica, o tracto gastrointestinal é constituído por quatro camadas sobrepostas: a *serosa*, uma camada muito vascularizada; a *muscular*, composta por dois planos de músculo liso; a *submucosa*, constituída essencialmente por dois feixes de tecido conjuntivo; e a *mucosa*, uma camada contínua ao longo de todo o tracto gastrointestinal (Testut e Latarjet, 1949). Esta última camada possui uma face externa, aderente à submucosa, e uma face interna de constituição diferente de acordo com as diversas regiões do tracto gastrointestinal.

---

<sup>1</sup>Entende-se por mesocólon a parte do peritoneu pela qual o cólon está ligado à parede abdominal.

Em toda a sua extensão, a mucosa gástrica apresenta pregas longas e onduladas cuja direcção é a do eixo do estômago e outras mais pequenas orientadas em direcções cruzadas. Podem ainda encontrar-se sulcos circulares que dividem a superfície em pequenos departamentos, mais ou menos irregulares, que são as únicas saliências existentes na mucosa (Testut e Latarjet, 1949).

No intestino delgado, a mucosa apresenta uma consistência menos espessa e uma estrutura bastante complexa. É na face externa que se encontram as válvulas coniventes, vilosidades, formações linfóides e orifícios glandulares (Testut e Latarjet, 1949).

A anatomia do intestino grosso reflecte as suas funções primárias: a reabsorção de água e sais e a acumulação e excreção das substâncias que não foram absorvidas. A eliminação destas substâncias sob a forma de fezes é facilitada pela secreção de muco pelas células caliciformes localizadas na mucosa. O muco actua como lubrificante e protege a mucosa da agressão dos conteúdos semi-sólidos. A mucosa do cólon é mais espessa e resistente e forma pregas irregulares que desaparecem quando a parede intestinal se distende. Como não contém vilosidades, a sua superfície lisa absorptiva é apenas cerca de 3% da superfície do intestino delgado (Wynsberghe et al., 1995).

### *Variação do pH*

Em condição de jejum, o pH no estômago varia de 0,85 a 2,0. O tamponamento e diluição do ácido é produzido pela ingestão de alimentos e o pH aumenta até 4 – 5. Esta subida de pH provoca um aumento da secreção gástrica, que repõe a acidez num período de 30 a 45 minutos. O suco gástrico é seguidamente neutralizado no duodeno, onde o pH aumenta rapidamente até atingir um valor de 5,5 na porção jejunal. Na região proximal do cólon o pH encontra-se entre 5 e 6,5, aumentando ligeiramente ao longo do intestino até 6 – 7. O ambiente no cego e cólon ascendente é geralmente mais ácido que no intestino delgado, mas na zona mais distal o pH volta a subir até 6 – 8 (Healey, 1989). A variabilidade de valores de pH ao longo do tracto gastrointestinal é um factor importante para a natureza da flora bacteriana, como veremos na secção seguinte.

### *Motilidade*

No tracto gastrointestinal ocorrem dois tipos de movimentos básicos: os propulsivos, que obrigam os alimentos a mover-se ao longo do aparelho digestivo, e os de mistura, que mantêm o conteúdo intestinal constantemente misturado. O movimento propulsivo básico do tracto gastrointestinal designa-se por *peristaltismo*. Quando uma quantidade de alimentos se acumula em qualquer parte do intestino, o estiramento da parede intestinal estimula o sistema nervoso entérico e surge um anel contráctil que inicia o movimento peristáltico. Os movimentos de mistura variam nas diversas partes do tubo digestivo. Em algumas regiões são as próprias contracções peristálticas que conduzem à mistura, e noutras são as *contracções constrictivas locais ou contracções de segmentação* que misturam e segmentam o conteúdo intestinal (Guyton e Hall, 1998).

À medida que o esófago vai conduzindo os alimentos para o estômago, através do que se designa por uma *onda peristáltica esofágica*, é transmitida uma *onda de relaxamento*, responsável por preparar o estômago para a recepção dos alimentos, e que precede a onda peristáltica (Guyton e Hall, 1998). Uma vez no intestino, o quimo distende a parede intestinal e segue-se uma série de contracções de segmentação localizadas. São estas contracções espaçadas que promovem a mistura dos alimentos com as secreções intestinais. Simultaneamente, o quimo é impelido ao longo de todo o intestino delgado pelas, já mencionadas, ondas peristálticas. Ao contrário do esvaziamento gástrico, cujo tempo varia com a quantidade de alimentos ingeridos e com o tamanho da forma sólida, o trânsito no intestino delgado é relativamente constante. Em condições normais, o quimo demora entre 3 a 5 horas a deslocar-se do piloro à porção final do intestino. A passagem de uma forma sólida do intestino delgado para o cólon é controlada por um esfíncter localizado na junção ileocecal, que também tem a função de prevenir o refluxo dos conteúdos colónicos. Como não são necessários movimentos intensos para a execução das funções do cólon, os movimentos nesta região são normalmente lentos mas com características semelhantes às do intestino delgado (Guyton e Hall, 1998). O movimento ao longo do cólon é também intermitente e

provocado por contracções dos anéis, que segmentam o conteúdo colónico e o empurram em direcção ao recto. Este processo de transporte entre o cego e o ânus pode demorar de 24 a 48 horas (Fell, 1992).

#### *Actividade enzimática*

A actividade enzimática inicia-se no estômago por acção da pepsina, que resulta da activação do pepsinogénio pelo HCl e converte as proteínas em polipeptídeos.

No intestino delgado, as enzimas proteolíticas pancreáticas quebram diferentes ligações peptídicas, produzindo aminoácidos e pequenos peptídeos. O tripsinogénio é activado e convertido em tripsina e enteroquinase. Por seu lado, a pepsina activa e transforma o quimotripsinogénio e a pro-carboxipeptidase em quimotripsina e carboxipeptidase. As aminopeptidases convertem os peptídeos em aminoácidos; as lipases são responsáveis pela degradação de gorduras em glicerol e ácidos gordos e as amilases transformam os hidratos de carbono em açúcares simples (Wynsberghe et al., 1995).

As secreções no cólon são sobretudo mucos cuja principal função é dar a consistência necessária ao bolo fecal, lubrificar e proteger a mucosa colónica.

#### *População bacteriana*

A população bacteriana no tracto gastrointestinal superior é diminuta e é composta por espécies resistentes a ambientes ácidos, como as *Aerobic lactobacilli* e *Streptococci*. A escassez de bactérias no tracto gastrointestinal superior parece dever-se à composição do meio luminal, que elimina a grande parte de microrganismos ingeridos, e aos movimentos propulsivos na direcção do íleo, que impede uma colonização constante (Guarner e Malagelada, 2003; Sinha e Kumria, 2003).

Já no cólon existe um ecossistema microbiano complexo e dinâmico com uma densidade de bactérias muito elevada, cuja concentração pode atingir  $10^{11}$  a  $10^{12}$  células/g de conteúdo luminal. Existem mais de 400 espécies de bactérias diferentes e resultados de

estudos de análise bacteriológica mostram que a população anaeróbia é de 100 a 1000 vezes superior à aeróbia. Entre elas podemos citar os géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium* e *Ruminococcus* que são predominantes enquanto *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Fusobacterium* e *Lactobacillus* pertencem ao género subdominante (Guarner e Malagelada, 2003). Esta microflora produz os seus próprios recursos energéticos através da fermentação de diversas substâncias (oligo- ou polissacáridos) endógenas ou exógenas que não foram completamente digeridas no intestino delgado. A actividade enzimática típica processa-se no espaço extracelular e, em princípio, num meio com pH neutro a alcalino. Como o pH é ácido no cólon ascendente e aumenta de forma gradual no cólon transversal e descendente, a actividade proteolítica aumenta distalmente (Rubinstein et al., 1997).

## **2.2 A administração oral de peptídeos**

Os peptídeos ou fármacos peptídicos são conjuntos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Consideram-se peptídeos pequenos aqueles que contêm menos de 8 aminoácidos. Os fármacos peptídicos que pertencem a este grupo incluem o enalapril, lisinopril e análogos das hormonas libertadas pela tiróide. O termo fármaco polipeptídico refere-se a fármacos peptídicos com 8 ou mais aminoácidos e inclui a ciclosporina, leuprolina e luliberina. As proteínas são peptídeos grandes. Os fármacos polipeptídicos que contenham entre 50 a 2500 aminoácidos designam-se por fármacos proteicos e incluem a insulina, hormonas de crescimento e interferons. De acordo com a sua actividade, os peptídeos ou fármacos peptídicos podem ser classificados em enzimas, hormonas, inibidores enzimáticos, agentes microbianos, agentes imunomoduladores e vacinas (Zhou e Po, 1991a).

As vias não-parenterais possíveis para a administração de peptídeos ou fármacos proteicos incluem as vias ocular, bucal, nasal, vaginal, rectal, transdérmica e oral. Na ausência de substâncias que promovam a sua absorção, estas vias, apesar de mais cómodas para os doentes, são geralmente menos eficazes do que as parenterais. Sabia-se que alguns peptí-

deos de baixo peso molecular poderiam ser administrados através da via nasal, mas foi a publicação de um trabalho que anunciava a administração oral de insulina em humanos que reconduziu a atenção para a administração de peptídeos terapêuticos por aquela via (Davis, 1990).

A via oral é, por diversos motivos, a mais popular forma de administração de fármacos. A adesão do doente ao tratamento é uma das vantagens mais importantes, principalmente em terapias de longa duração como acontece para os fármacos peptídicos. Por outro lado, a maximização da biodisponibilidade tem como consequência uma redução dos custos, especialmente se a produção dos fármacos for dispendiosa.

Todavia, a biodisponibilidade oral dos peptídeos é reduzida devido à actividade enzimática que gera uma degradação pré-sistémica intensa, pelo que novas estratégias tem sido desenvolvidas para proteger aqueles agentes até ao local onde devem ser libertados. A ciclosporina, por exemplo, só é activa por via oral se for administrada numa formulação azeite/glicéridos mas os motivos do aumento da biodisponibilidade (apesar de muito variável) desta molécula nesta formulação em particular não estão esclarecidos. Para outros peptídeos ou proteínas ainda não estão comercialmente disponíveis sistemas orais especialmente formulados para superar as barreiras físicas, fisiológicas e metabólicas do tracto gastrointestinal ou para satisfazerem as necessidades farmacológicas de moléculas específicas (Smith et al., 1992).

### *2.2.1 Obstáculos à absorção*

#### *Estabilidade física e química*

Independentemente da forma farmacêutica, a decomposição dos fármacos peptídicos e proteínas constitui um problema. As alterações não-enzimáticas podem ser do tipo físico ou químico. Nas primeiras estão compreendidas a desnaturação, agregação e precipitação, geralmente induzidas por elevadas concentrações de co-solventes usados em algumas formulações. A perda de conformação não só conduz a uma fraca absorção como tam-

bém contribui para a perda de actividade. As alterações químicas incluem a  $\beta$ -eliminação, desamidação, troca dissulfeto, racemização e oxidação (Zhou e Po, 1991a).

#### *Degradação enzimática*

O pH ácido do estômago começa por provocar a ruptura de algumas ligações internas que determinam a estrutura tridimensional das proteínas e peptídeos. O ataque enzimático é iniciado pela pepsina, seguindo-se reacções de hidrólise nas quais participam, principalmente, as peptidases das microvilosidades. Os pequenos peptídeos resultantes destas reacções são posteriormente hidrolisados por acção das enzimas intestinais existentes nas microvilosidades e no citosol. As peptidases mais relevantes que se encontram na mucosa intestinal são a leucinoaminopeptidase, aminotripeptidase, angiotensinase, glicilglicinodipeptidase, deaminopeptidase, serinocarboxipeptidase e aminopeptidases. No cólon, a proteólise é muito menos intensa e as enzimas da flora microbiana são as principais responsáveis pela actividade enzimática.

#### *Permeabilidade da mucosa*

Um dos motivos da baixa biodisponibilidade dos fármacos peptídicos após administração oral é o fraco transporte através da mucosa intestinal. Por comparação com a mucosa intestinal dos ratos, pode considerar-se que o raio dos poros da mucosa intestinal é cerca de 4Å (Zhou e Po, 1991b) e, portanto, a capacidade dos fármacos proteicos de elevado peso molecular ou muito hidrofílicos atravessarem o epitélio intestinal é limitada.

O mecanismo pelo qual a maior parte dos pequenos peptídeos atravessam as células do epitélio intestinal é do tipo transcelular, resultante de um transporte activo, passivo, por endocitose ou por via intercelular. Porém, para peptídeos maiores e proteínas, o transporte para o interior das células da mucosa intestinal inclui a passagem através das junções paracelulares, de forma não específica e com menor número de barreiras físicas e metabólicas. A passagem pelas junções apertadas e pelo espaço intersticial tem uma natureza hidrofílica,

sendo o transporte principalmente limitado pelo tamanho e/ou carga destas junções (Sarciaux et al., 1995).

Outro mecanismo de absorção é a endocitose mediada por receptores. Neste caso, a sua captação poderá ser inibida pela competição de outros peptídeos, especialmente os que resultam da digestão dos alimentos. Além disso, a hidrólise intracelular que se segue à captação geralmente diminui a quantidade de peptídeos intactos que atravessam a membrana basolateral das células (Smith et al., 1992).

A via de transporte mais provável para as proteínas grandes é a transcitose, que consiste na internalização de vesículas endocíticas impedindo a fusão com organelos lisossomais.

A maioria dos estudos *in vivo* não identificaram quais os tipos de células do epitélio intestinal envolvidos no transporte específico de peptídeos e proteínas. Parece, contudo, que as células M que revestem as placas de Peyer estarão envolvidas no transporte transepitelial de quantidades limitadas de algum conteúdo luminal às células do sistema imunitário. Infelizmente, embora as placas de Peyer compreendam até 25% do total da mucosa em algumas regiões do tracto gastrointestinal, a informação disponível relativamente à quantidade de macromoléculas que entram na circulação sistémica por esta via é ainda escassa (Smith et al., 1992).

No cólon, os mecanismos de transporte para os iões são do tipo activo bi-direccional rápido e específico através da camada epitelial. Ao contrário do intestino delgado, parece não existir documentação sobre transportadores activos para nutrientes orgânicos e, portanto, a probabilidade de moléculas grandes ou farmacologicamente activas serem ali absorvidas é baixa (Mackay et al., 1997). Por exemplo, a BSA foi utilizada para estudar as diferenças de absorção ao longo do tracto gastrointestinal e verificou-se que o cólon absorveu 0,13% da BSA intacta enquanto que no intestino delgado a absorção foi 1,7% (Friend, 1991).

Várias revisões sobre a absorção oral de peptídeos e proteínas foram já publicadas (Smith et al., 1992). Os mecanismos de absorção, em particular, também foram documentados em termos do transporte intestinal paracelular (Nellans, 1990), transporte transcelular (Burton et al., 1991) e vias endocíticas (Shen et al., 1990).

### *Tempo de contacto*

A fraca absorção também pode ser parcialmente atribuída a um tempo de contacto curto entre a superfície absorvente e a molécula.

### *2.2.2 Estratégias gerais para optimização da absorção*

Vimos até agora que além do metabolismo de primeira passagem e de uma *clearance* rápida, a administração de peptídeos e proteínas acarreta problemas específicos de estabilidade, susceptibilidade à proteólise e, de modo geral, incapacidade para atravessar as membranas ou outras barreiras biológicas cuja função é, precisamente, impedir selectivamente a passagem deste tipo de moléculas. A solução para uma administração oral eficiente está em encontrar uma maneira de estas moléculas atravessarem o epitélio intestinal de forma segura e reprodutível e, seguidamente, transpor esse conhecimento para formular uma composição estável, reprodutível e transponível à escala industrial a um custo aceitável (Smith et al., 1992). Nas secções seguintes apresentamos algumas das estratégias que têm sido utilizadas para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos, incluindo os peptídeos e proteínas.

### *Modificação química*

Uma das estratégias para aumentar a estabilidade e lipofilicidade é a modificação química. A forma conformacional dos peptídeos é modificada, aumentando-se a sua estabilidade e permeabilidade através da membrana celular (Zhou, 1994). Esta é uma alternativa especialmente importante na protecção de peptídeos de pequenas dimensões (com cerca de 10 aminoácidos) (Zhou e Po, 1991a), sem perda significativa de actividade biológica. No entanto, para moléculas maiores, o resultado é menos estimulante provavelmente devido à complexidade das suas estruturas (Fix, 1996a).

### *Inibição enzimática*

Uma forma de evitar a degradação pré-sistémica pelas enzimas é a administração conjunta de inibidores enzimáticos. Consoante o tipo de protease e a sua localização a nível subcelular, assim será escolhido o inibidor.

De acordo com a sua estrutura química, os inibidores enzimáticos podem ser classificados em aminoácidos e aminoácidos modificados, pouco tóxicos mas extensivamente diluídos nos fluidos intestinais sendo necessária a utilização de quantidades elevadas; peptídeos e peptídeos modificados; polipeptídeos, com baixa toxicidade e forte actividade inibitória; e inibidores não-aminoácidos, muito potentes mas altamente tóxicos (Silva et al., 2002). Além das categorias mencionadas, existem ainda agentes complexantes, cuja actividade inibitória resulta da capacidade para captarem iões bivalentes que são cofactores de muitas proteases (Silva et al., 2002).

Ao uso prolongado destes agentes inibidores estão associados efeitos tóxicos e danos directos na mucosa intestinal. Além disso, a própria acção inibidora pode provocar distúrbios, estimulando a secreção de proteases via um mecanismo de *feedback* negativo. Consequentemente, o risco de diversos efeitos tóxicos é muito grande (Bernkop-Schnürch, 1998).

### *Promoção da absorção*

A solução mais simples para superar a fraca permeabilidade é a administração conjunta de promotores de absorção (Zhou e Po, 1991a), como por exemplo o EDTA, salicilatos, surfactantes, sais biliares, ácidos gordos e ureias cíclicas insaturadas. O efeito desejado na acção do promotor, que deve apresentar compatibilidade e especificidade para o peptídeo, é uma reacção rápida e reversível de aumento do tamanho dos poros da membrana da mucosa, seguida da breve recuperação das funções normais de barreira (Zhou e Po, 1991b). As proteínas e peptídeos são substâncias muito reactivas e, por isso, é importante que as suas actividades química, biológica e conformacional não sejam comprometidas pela presença do promotor de absorção. A maior parte dos peptídeos também possuem um tempo de

semi-vida reduzido em ambientes como o do tracto gastrointestinal e, portanto, uma rápida absorção é essencial para que a concentração plasmática seja significativa. A reversibilidade do efeito é uma questão importante no que diz respeito aos aspectos toxicológicos. A perturbação das funções de barreira das células pode facilitar a absorção não-específica de toxinas ou outras substâncias que conduzam a efeitos adversos. Contudo, mesmo que incorporados em formulações contendo um agente promotor com actividade demonstrada para moléculas mais pequenas e orgânicas, a absorção de proteínas ou fármacos peptídicos ainda é muito baixa (Fix, 1996b).

#### *Formas farmacêuticas*

Outra opção é recorrer a sistemas de administração como as emulsões (Singh et al., 1997; Shively, 1997), microemulsões (Sarciaux et al., 1995; Yang e Benita, 2000), lipossomas (Weiner, 1994; Meyer et al., 1994; Walde e Ichikawa, 2001; Colletier et al., 2002), nanopartículas (Florence et al., 1995; Florence, 1997; Allémann et al., 1998; Jung et al., 2000; Sakuma et al., 2001) ou micropartículas (Florence, 1997; Putney, 1998; Delie, 1998; Chen e Langer, 1998; Allémann et al., 1998; Freiberg e Zhu, 2004).

Grande parte do trabalho realizado na área da administração de proteínas focalizou-se no fabrico de formulações *depot* injectáveis, nas quais a proteína está inserida numa matriz polimérica biodegradável. Após administração subcutânea ou intramuscular a proteína é libertada por difusão através da rede e/ou por degradação do polímero. Os polímeros mais utilizados para constituir esta matriz têm sido os homo e copolímeros dos ácidos láctico e glicólico. Todavia, pelo facto de estes polímeros serem insolúveis, os processos de constituição da matriz expõem as proteínas ou fármacos peptídicos a solventes orgânicos (Putney, 1998), podendo comprometer a sua estabilidade.

Num trabalho de revisão realizado por Delie (Delie, 1998), cujo objectivo era discutir as vantagens e limitações das metodologias e modelos utilizados para avaliar a captação de nano e micropartículas pelo tracto gastrointestinal, refere-se que são numerosas as evidências de que aquele tipo de partículas é, de facto, captado. Mais, o recurso à microencapsu-

lação tem sido considerado como uma estratégia tão importante que várias outras revisões se debruçaram sobre a natureza e extensão da absorção de sistemas microparticulados (Lavelle et al., 1995; Florence, 1997; Ermak e Giannasca, 1998; O'Hagan, 1998). Embora os mecanismos e locais de captação e a cinética da captação ainda sejam uma matéria controversa (Delie, 1998), a encapsulação de fármacos, proteínas ou antígenos em micropartículas biodegradáveis confere protecção ao ataque enzimático, aumenta a sua captação e favorece o direccionamento a alvos específicos.

#### *Aumento do tempo de contacto*

A intensificação do contacto com a mucosa epitelial é conseguida através da utilização de sistemas bioadesivos. Deste modo, o tempo de permanência da molécula no local da absorção aumenta, gerando-se um gradiente de concentração e a absorção é promovida, minimizando-se a degradação enzimática. Os polímeros bioadesivos designam-se por mucoadesivos, quando aderem à camada de muco que reveste o epitélio intestinal, e por citoadesivos, quando aderem especificamente à membrana celular (Silva et al., 2002).

### **2.3 Libertação específica no cólon**

Cada estratégia tem as suas vantagens e desvantagens. A manipulação química, por exemplo, pode resultar para moléculas pequenas mas para moléculas maiores, cuja estrutura terciária é importante para a actividade biológica, esta poderá não ser a abordagem mais adequada (Davis, 1990). Mesmo a utilização de promotores de absorção e/ou inibidores enzimáticos tem um sucesso moderado (Fix, 1996b; Rubinstein et al., 1997).

A identificação da região do intestino que favorece a absorção de peptídeos e proteínas é um passo crucial na escolha e desenvolvimento de sistemas de administração oral. As variações ao longo do tracto gastrointestinal relacionadas com a sua composição, espessura da camada de muco, pH, área de superfície e actividade enzimática, em diferentes locais, conduzem a diferenças na absorção (Kompella e Lee, 2001).

O interesse no direccionamento de fármacos ao cólon surgiu da necessidade de tratar doenças específicas desta região do tracto gastrointestinal. Mas ultimamente a libertação específica no cólon tem ganho uma atenção e interesse crescentes (Friend, 1991; Mrsny, 1992; Rubinstein et al., 1997; Watts e Illum, 1997; Rodríguez et al., 1998; Yang et al., 2002; Chourasia e Jain, 2003) principalmente devido à necessidade de se diminuírem os efeitos adversos associados aos tratamentos de doenças inflamatórias e desordens de motilidade do cólon através da libertação local de fármacos; à descoberta de novos anti-inflamatórios; à demonstração de mecanismos de acção de alguns anti-inflamatórios não-esteróides que mostraram actividade contra pólipos do cólon; à confirmação de que, em alguns casos, a absorção de fármacos através do cólon é eficaz; às evidências de que é possível o aumento da biodisponibilidade dos fármacos; às indicações de que fármacos proteicos são melhor absorvidos por alguns compartimentos sistémicos do cólon do que pelo intestino delgado e à actividade metabólica característica do cólon (Rubinstein, 2000).

Quando o fármaco é libertado do sistema, os principais factores que determinam o sucesso da especificidade do cólon são a estabilidade da molécula no lúmen colónico, a velocidade de absorção na mucosa e a estabilidade da molécula aquando da sua passagem através da mucosa do cólon (Friend, 1991).

A estrutura e função do cólon tem sido bastante estudada mas não existem muitos dados que correlacionem estrutura e função com o transporte de fármacos através do epitélio colónico. Intuitivamente dizemos que a absorção de muitos fármacos no cólon é nula ou quase inexistente. A ausência aparente de transportadores de moléculas orgânicas, como já referimos, limita esta estratégia no que diz respeito ao transporte mediado através da barreira epitelial. Contudo, foram descritos estudos indicando que a absorção de alguns fármacos em diferentes regiões do tracto gastrointestinal é semelhante (Mackay et al., 1997).

Por outro lado, embora ainda relativamente pouco se conheça sobre a proteólise específica no cólon, estudos de conteúdos cecais evidenciaram que os peptídeos e aminoácidos estão expostos a uma grande variedade de processos metabólicos mas que essa actividade proteolítica é inferior e distinta da actividade no intestino delgado. No entanto, devido ao

elevado tempo de permanência no cólon, mesmo que a actividade enzimática seja baixa e menos agressiva, o fármaco estará durante mais tempo exposto a enzimas proteolíticas. Mas se o fármaco for convenientemente protegido, então este tempo de permanência prolongado pode favorecer a sua absorção.

Com base no tempo de trânsito, na variação do pH e nos tipos de bactérias e enzimas ao longo do tracto gastrointestinal, foram desenvolvidas algumas estratégias para direccionar, especificamente ao cólon, fármacos administrados pela via oral. As abordagens actualmente disponíveis são, essencialmente, os sistemas dependentes do tempo e sistemas osmóticos, os sistemas dependentes da pressão, os pró-fármacos, o revestimento com polímeros sensíveis ao pH e os que são degradáveis pela microflora colónica.

### *2.3.1 Sistemas dependentes do tempo e sistemas osmóticos*

Os sistemas dependentes do tempo são formulados para libertar o seu conteúdo após um intervalo de tempo pré-determinado. Este intervalo não é fácil de prever, mas presumindo-se que o trânsito intestinal é relativamente constante e parece ser independente da forma farmacêutica e da fase digestiva em que se encontra o indivíduo (Fell, 1992), considera-se que um intervalo de 3 horas é suficiente. Um dos primeiros sistemas a utilizar este princípio foi o dispositivo *Pulsincap*<sup>TM</sup> (Binns et al., 1996; Stevens et al., 2002), que consiste numa cápsula impermeável contendo o fármaco coberta por uma tampa de hidrogel. Em contacto com os fluidos gastrointestinais, a tampa de hidrogel intumescer e separa-se do corpo capsular permitindo a libertação do fármaco. O tempo de libertação é regulado pelas características dos componentes.

Um outro sistema é o *Time-Clock*, para o qual o intervalo de tempo até à libertação do fármaco é determinado pela espessura do revestimento hidrofóbico ou de uma camada de um polímero hidrofílico que envolve um núcleo de fármaco. Uma vantagem deste dispositivo é o que a sua preparação emprega técnicas de revestimento convencionais e excipientes normalmente presentes em diversas formulações.

Ainda um outro exemplo é o sistema *Geomatrix*® (Wilding et al., 1995; Conte e Maggi,

1996). Trata-se de um comprimido de múltiplas camadas composto por um material hidrofílico, que contém o princípio activo, revestido por uma ou duas camadas de um polímero permeável ou semi-permeável. Estas camadas, sob a forma de películas ou de revestimento por compressão, são aplicadas nas faces do núcleo. É a presença do revestimento que modifica a velocidade de hidratação/intumescimento e reduz a área de superfície exposta.

Uma limitação destes dispositivos é que a libertação do fármaco é programada com base nas estatísticas de condições consideradas normais, ignorando-se a variabilidade do tempo do esvaziamento gástrico e do trânsito intestinal entre indivíduos.

Os sistemas osmóticos são essencialmente do tipo tempo-dependente. Teoricamente, este tipo de sistemas liberta de forma sincronizada todos os componentes da formulação. Especialmente se tiverem sido incluídos promotores de absorção e/ou inibidores enzimáticos uma libertação sincronizada será óptima para promover a absorção do fármaco.

### *2.3.2 Sistemas dependentes da pressão*

A pressão, que é gerada pelas contracções musculares da parede do intestino para a propulsão dos conteúdos intestinais, vai variando em intensidade e duração. O cólon é a região do tracto gastrointestinal que exhibe uma pressão luminal maior devido aos processos que ocorrem durante a formação do bolo fecal, nomeadamente o aumento da sua viscosidade. Um exemplo de sistemas dependentes da pressão é o PCDC (*“Pressure-controlled colon delivery capsule”*) (Hu et al., 1998; Muraoka et al., 1998) que consistia, originalmente, no revestimento da superfície interior de cápsulas de gelatina com etilcelulose. Neste sistema, o fármaco é dissolvido num suporte, como o polietilenoglicol, e a mistura é introduzida na cápsula. Uma vez administrado, a gelatina dissolve-se e a temperatura do organismo provoca o derretimento e aumento de volume do polietilenoglicol. O sistema adquire um aspecto semelhante a um pequeno balão de etilcelulose, resistente à pressão luminal do intestino delgado. No entanto, quando a pressão se intensifica no cólon o pequeno balão desintegra-se e o fármaco é libertado. Como a gelatina se dissolve imediatamente após a administração, é a espessura da membrana de etilcelulose que determina as características

de desintegração da cápsula. Apesar dos resultados promissores de alguns estudos *in vivo*, não foi inequivocamente provado que a ruptura da cápsula ocorre na região colónica. Além disso, falta ainda avaliar a influência da presença de alimentos uma vez que as contracções pós-prandiais podem ser suficientemente intensas para ocorrer desintegração da cápsula no estômago (Ibekwe et al., 2004). Assim, é necessário ponderar sobre se esta estratégia representa um meio viável de direccionamento específico ao cólon.

### *2.3.3 Pró-fármacos*

Os pró-fármacos são derivados farmacologicamente inactivos da molécula parente, que requerem transformações espontâneas ou enzimáticas para libertar o fármaco activo. Uma vez no cólon e sob um estímulo específico, os pró-fármacos dão origem à regeneração do fármaco. Um exemplo é a sulfasalazina, que consiste no ácido 5-aminosalicílico ligado à sulfapiridina por uma ligação azo. Após administração oral este pró-fármaco é minimamente absorvido no estômago e intestino delgado e, quando atinge o cólon, as azoreductases quebram a ligação azo e o ácido 5-aminosalicílico é libertado (Sinha e Kumria, 2001b). Além da conjugação com compostos azo, os pró-fármacos também podem ser obtidos através da conjugação com aminoácidos, ciclodextrinas, dextranos, polímeros ou com grupos glicosídeos, glucoronídeos e sulfatos (Sinha e Kumria, 2001a).

O inconveniente deste tipo de sistema é a necessidade de uma síntese independente para cada fármaco. Além disso, são raros os estudos que evidenciam o potencial desta estratégia na administração de proteínas ou peptídeos terapêuticos (Mackay et al., 1997).

### *2.3.4 Sistemas poliméricos*

A maneira mais simples de obter uma libertação específica no cólon é por meio da utilização de polímeros de revestimento entérico, assumindo-se que o pH do tracto gastrointestinal aumenta gradualmente do intestino delgado ao cólon. As formas farmacêuticas sólidas são envolvidas com um revestimento suficientemente espesso para impedir a

difusão do fármaco no tracto gastrointestinal superior. Dos vários polímeros usados em revestimentos entéricos, todos são insolúveis e quase todos impermeáveis a baixos valores de pH e dissolvem-se quando o pH atingir um valor igual ou superior a 6. Os copolímeros metilmetacrilados dos ácidos metacrílicos, distribuídos comercialmente como produtos Eudragit®<sup>®</sup>, são os mais comuns. Espera-se, portanto, que este tipo de sistemas dependentes do pH protejam o fármaco durante a sua passagem pelo tracto gastrointestinal superior e que possibilite a sua libertação uma vez atingido o meio intestinal. Contudo, tal como foi referido, o pH na região proximal do cólon é inferior ao pH na zona distal do intestino delgado e, por isso, este tipo de sistemas tendem a libertar o fármaco antes de este atingir a região colónica. Uma maneira de contornar a libertação prematura do fármaco seria o uso de polímeros Eudragit®<sup>®</sup> modificados com uma velocidade de dissolução inferior e a um valor de pH mais elevado. Por outro lado, o pH do tracto gastrointestinal está sujeito a uma grande variabilidade entre indivíduos dependendo da idade, sexo, tipo de dieta, estado de jejum/pós-prandial e situação patológica.

A razão fundamental para o aperfeiçoamento de sistemas baseados em polissacarídeos (Rubinstein, 2000; Sinha e Kumria, 2001b; Vandamme et al., 2002) é, como já foi referido, a existência de uma quantidade significativa de polissacaridasas no cólon. Existem, *grosso modo*, duas formas de preparar hidrogéis polissacarídicos descritas na literatura. Na primeira, fazem-se reagir quimicamente ou misturar fisicamente mono-, di-, oligo- ou polissacarídeos com polímeros sintéticos para criar um hidrogel biodegradável, geralmente sob a forma de película. Esta película pode sofrer um aumento de porosidade por hidrólise enzimática ou mesmo sofrer erosão completa. O segundo modo de preparação refere-se aos polissacarídeos naturais, que são modificados por forma a diminuir a solubilidade em água ou a modificar as propriedades de intumescimento mas mantendo a susceptibilidade de degradação pelas enzimas colónicas. Candidatos para este efeito são a pectina, o alginato, a goma de guar, o dextrano, o quitosano, a amilose e sulfato de condroitina.

Das abordagens referidas, os sistemas activados pelas enzimas existentes no cólon parecem ser os mais promissores. No entanto, também estes materiais têm as suas limitações.

A sua natureza hidrofílica favorece a solubilidade e intumescimento em ambientes aquosos e, por isso, é necessário modificar de alguma forma a estrutura ou explorar a formulação.

#### **2.4 A albumina como fármaco modelo: características físico-químicas**

A albumina sérica é uma das proteínas mais extensivamente estudadas (He e Carter, 1992; Friedli, 1996). É constituída por uma única cadeia peptídica composta por 580 a 585 aminoácidos consoante a espécie e tem uma massa molecular entre 66000 a 69000 Da. É ainda caracterizada por um baixo conteúdo de triptofano e metionina e um elevado conteúdo de cisteína, ácido aspártico e glutâmico, lisina e arginina.

A molécula de BSA é constituída por três domínios homólogos (I, II e III) divididos em nove laços (L1-L9) por 17 ligações dissulfeto. Esses laços, em cada domínio, são constituídos por uma sequência de laços grande-pequeno-grande que formam um triplete. Por sua vez, cada domínio é o produto de dois subdomínios (por exemplo, IA, IB). A estrutura primária da BSA é invulgar relativamente a outras proteínas extracelulares já que possui um único grupo sulfidril (Cys-34).

Dados de cristalografia de raios-x referem que a estrutura da BSA é predominantemente  $\alpha$ -helicoidal (ver figura 2.1) e os restantes polipeptídeos estão distribuídos por regiões extendidas ou flexíveis entre os subdomínios. Cada um dos domínios ainda pode ser dividido em 10 segmentos helicoidais, de 1 a 6 para o subdomínio A e de 7 a 10 para o subdomínio B. Os domínios I e II e os domínios II e III estão ligados através de extensões helicoidais, que dão origem às duas maiores hélices da molécula. A distribuição de grupos carregados na estrutura primária da molécula é assimétrica enquanto que na forma terciária as cargas estão uniformemente distribuídas (ver figura 2.2).

A molécula de BSA adquire diferentes conformações consoante o pH do meio em que se encontra. Num trabalho de Friedli (Friedli, 1996) refere-se que esta molécula pode existir em cinco formas isoméricas diferentes: “expanded”, “fast”, “normal”, “basic” e “aged” (ver figuras 2.3 a 2.5).

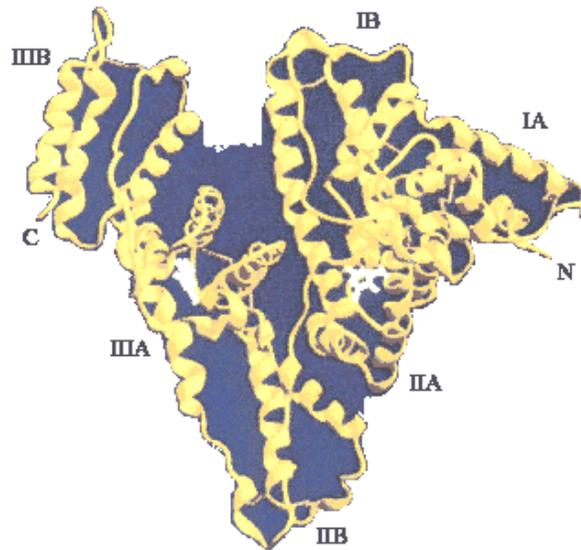


Figura 2.1: Estrutura  $\alpha$ -helicoidal da molécula de BSA (Friedli, 1996).

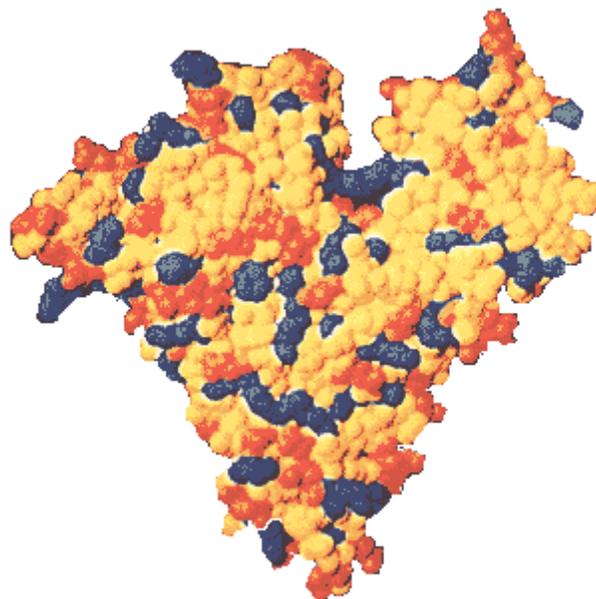


Figura 2.2: Modelo "space filling" da molécula de BSA mostrando a distribuição superficial de cargas (Friedli, 1996).

Resumidamente, a transição para a forma “fast” envolve um desdobramento do domínio III da molécula e caracteriza-se por um aumento dramático da viscosidade e diminuição da solubilidade. A valores de pH inferiores a 4 a molécula sofre uma outra expansão, com aumento da viscosidade intrínseca, sendo esta forma designada por “expanded”. A pH 9 é conhecida uma outra forma isomérica, “basic”, que se pode transformar na conformação “aged” mantendo-se o mesmo pH e uma força iónica baixa durante cerca de 4 dias.

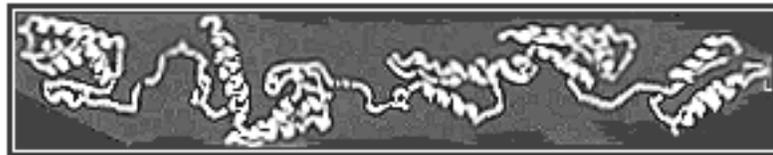


Figura 2.3: Conformação “expanded” (Friedli, 1996).



Figura 2.4: Conformação “fast” (Friedli, 1996).



Figura 2.5: Conformação “normal” (Friedli, 1996).

O comportamento da BSA em diferentes valores de pH (ver figura 2.6) é muito importante para a escolha do meio de dissolução na preparação das microesferas, como se poderá ver discutido no capítulo 6.

Como a albumina tende a ligar-se a muitos ligandos, não é fácil atribuir um valor exacto ao ponto isoeléctrico. No entanto, ele estará entre 4,8 e 5,28 (Rothschild et al., 1988).

<i>Expanded</i>	↔	<i>Fast</i>	↔	<i>Normal</i>	↔	<i>Basic</i>	↔	<i>Aged</i>
<i>pH</i>		2,7		4,3		8		10

Figura 2.6: Relação entre as formas isoméricas da BSA e o pH (Friedli, 1996).

## Capítulo 3

### **PECTINA: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES**

A pectina, do grego “*pectos*” que significa sólido ou gelificado, foi descoberta em 1790 quando Vauquelin estudava sumos de fruta. O seu trabalho foi prosseguido por Braconnot que, em 1824, a baptizou com o termo “*ácido péctico*”. Mais tarde, em 1924, foi Smolenski quem identificou um polímero constituído por unidades de ácido galacturónico e, seis anos depois, Meyer e Mark, baseados em resultados de raios-X de outros polímeros naturais, sugerem uma cadeia longa para a molécula. Em 1937, Schneider e Bock estabelecem a fórmula de estrutura da pectina: uma cadeia de moléculas de ácido galacturónico com os grupos carboxílicos parcialmente esterificados por grupos metílicos (Goldblith, 1978).

A nomenclatura das substâncias pécticas foi objecto de muita discussão, devido, por um lado, à composição heterogénea que as moléculas apresentam e, por outro, à frequência de grupos metilo ( $-CH_3$ ) e à variabilidade no comprimento das cadeias. Desta característica surgiu ainda a questão de que o comprimento deve ter uma cadeia de ácido galacturónico para poder ser classificada como substância péctica. Além disso, na fase inicial do estudo destas substâncias, cada investigador usava o seu próprio sistema de classificação, o que conduziu frequentemente, ao uso de diversos termos para a mesma substância. Em 1944 foi adoptado um sistema de nomenclatura oficial e revisto com as seguintes definições (McWilliams, 1974):

- *Substâncias pécticas* são derivados complexos de carboidratos que contenham uma elevada proporção de unidades de ácido galacturónico e apresentem um tamanho coloidal. Este termo inclui a protopectina, pectina, ácidos pectínicos e ácidos pécticos.

- *Protopectina* é um composto parente da pectina que não mostra propriedades gelificantes.
- *Pectina* é um termo utilizado para definir toda e qualquer substância pectíca capaz de formar um gel.
- *Ácidos pectínicos* são cadeias de ácido galacturónico de tamanho coloidal com grupos metilo esterificados. Formam-se a partir da protopectina que, durante o amadurecimento dos frutos, se vai transformando em moléculas mais pequenas.
- *Pectinatos* são os sais dos ácidos pectínicos.
- *Ácidos pectícos* são substâncias de tamanho coloidal com fraca capacidade de formar geles, provavelmente devido a um menor número de grupos metilo.

Neste capítulo recordamos algumas das propriedades da pectina que consideramos mais relevantes para o nosso tema e revemos o trabalho que tem sido desenvolvido especificamente quanto à utilização deste polissacarídeo para a libertação específica no cólon.

### **3.1 Grau de esterificação e tipos de pectina**

A percentagem de grupos ácidos, na forma de ésteres metílicos, presentes na cadeia de pectina designa-se por *grau de esterificação* (DE)<sup>1</sup> e, consoante este parâmetro, as pectinas são classificadas em pectinas HM<sup>2</sup> (elevado teor de grupos metoxilo) e pectinas LM<sup>3</sup> (baixo teor de grupos metoxilo).

Por definição da *Food Chemicals Codex*, existem numa pectina HM mais de 50% de grupos metoxilo enquanto que uma pectina LM tem um número de grupos metoxilo infe-

---

<sup>1</sup>Do inglês “degree of esterification”. Também é comum encontrarmos o termo grau de metilação ou metoxilação, que tem o mesmo significado.

<sup>2</sup>Do inglês “high methoxyl pectin”.

<sup>3</sup>Do inglês “low methoxyl pectin”.

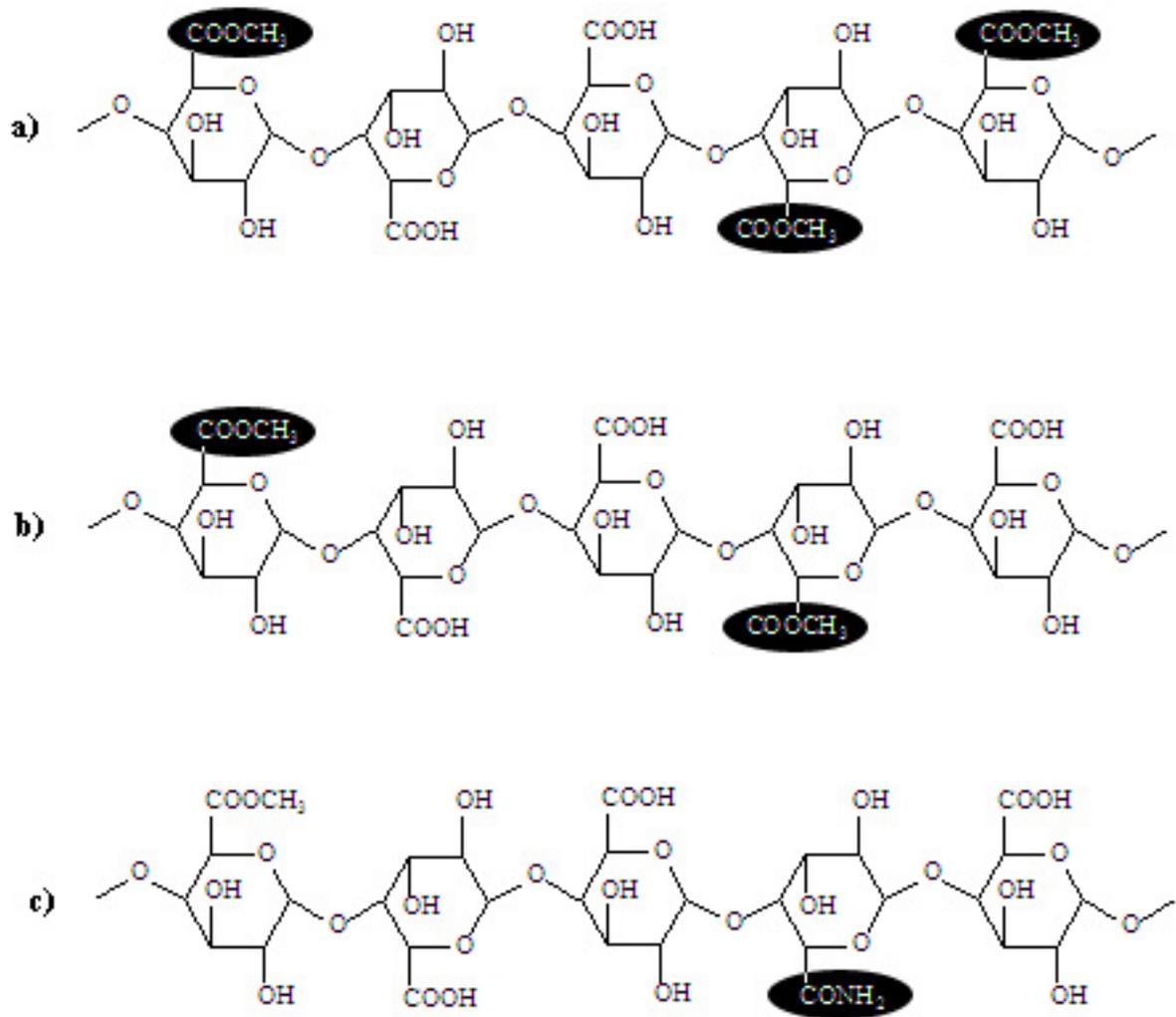


Figura 3.1: Diferentes tipos de pectina. a) pectina HM, b) pectina LM, c) pectina LM amidada.

rior a 50%. Quando se utiliza amônia no processo de desesterificação obtém-se a pectina amidada. O grau de esterificação e o grau de amidação (DA)<sup>4</sup> determinam o conteúdo de grupos carboxílicos ou metoxilos nas cadeias da pectina (ver figura 3.1).

### 3.2 Fontes e produção

Pectina é um termo que engloba um conjunto de polissacarídeos complexos que estão presentes nas paredes celulares das plantas de grande porte, vegetais e frutos e lhes conferem resistência mecânica e flexibilidade, devido às interações que estabelecem com outros componentes. Na maioria das plantas a pectina encontra-se disposta na camada intercelular entre as paredes celulares primárias de células adjacentes (ver figura 3.2). A resistência destas estruturas celulares depende da orientação, propriedades mecânicas e ligações entre as substâncias pécnicas e as fibras celulósicas (Thakur et al., 1997).

Embora exista na maior parte dos tecidos vegetais, o número de fontes que podem ser utilizadas para a comercialização da pectina é muito limitado. Além disso, como a gelificação (propriedade que exploraremos mais adiante) depende do peso molecular e do grau de esterificação, pectinas de proveniências diferentes têm inevitavelmente capacidades diferentes de formar geles devido a variações naqueles parâmetros. Portanto, a simples detec-

ção de pectina num fruto não é suficiente para transformá-lo numa fonte comercial. Atualmente, as principais fontes de pectina são a casca de citrinos, como o limão, a laranja e a lima, e a polpa de maçã. É ainda possível obtê-la a partir da beterraba e resíduos de sementes de girassol. A pectina da polpa de maçã difere das pectinas cítricas devido à presença

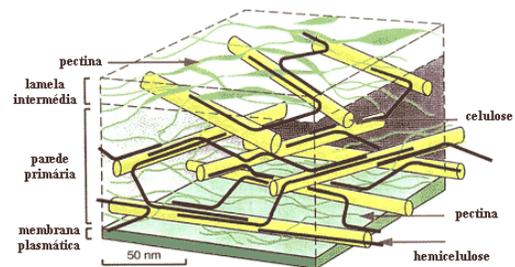


Figura 3.2: Esquema tridimensional da disposição da pectina na parede celular de uma planta.

<sup>4</sup>Do inglês “degree of amidation”.

de maior quantidade de grupos éster metílicos e, inicialmente, era sobretudo utilizada na produção de pectinas de baixo grau de esterificação. A pectina de beterraba não é habitualmente utilizada como matéria-prima devido à fraca capacidade de gelificar e à quantidade excessiva de açúcares neutros que reduzem o número de unidades de ácido galacturónico a níveis abaixo dos limites legalmente permitidos (May, 1990).

O fabrico de pectina é um processo relativamente simples que consiste nas seguintes etapas: *extracção, purificação do extracto e precipitação*. A primeira fase da produção, além dos passos necessários para preparar a matéria-prima, consiste em extrair a pectina ligada aos tecidos celulares. Esta matéria, fresca ou desidratada, é adicionada a determinada quantidade de água e adiciona-se também um ácido mineral, nítrico ou clorídrico, para baixar o pH e hidrolisar a protopectina de maneira a facilitar a dissolução. A temperatura a que ocorre este processo ajuda a baixar a viscosidade da solução. Se se pretender a obtenção de uma pectina com um elevado grau de esterificação, o controlo do tempo, temperatura e acidez é essencial para que não ocorra uma hidrólise ou desesterificação excessivas. Prolongando o período de desesterificação obtêm-se pectinas com baixos conteúdos em grupos metoxilos. Depois de ser isolado, o extracto é separado por centrifugação e/ou filtração. Alguns extractos, especialmente os provenientes da polpa de maçã, contêm pequenas quantidades de amido, que pode ser hidrolisado por acção de um preparado de amilases. Tratamentos posteriores ao extracto dependem dos tipos de pectina pretendidos. O mais simples consiste em concentrar o extracto por evaporação, obtendo-se um fluido mais viscoso. A pectina sob a forma de pó é obtida através da secagem do extracto por pulverização; precipitação como sal insolúvel seguida de lavagem com uma solução alcoólica acidificada e secagem; ou através da precipitação por insolubilidade em álcool e secagem.

### **3.3 Aplicações**

Para aplicações industriais, a propriedade mais atractiva é a capacidade de formar geles, o que conduziu a aplicações na indústria alimentar como agente gelificante e espessante em

gelatinas, geleias e compotas ou como estabilizante em bebidas, produtos lácteos e sobremesas congeladas. Devido à exploração das propriedades naturais da pectina, o seu uso é cada vez mais variado. Na indústria de cosmética, tem sido utilizada na preparação de pastas, pomadas, óleos e cremes; em desodorizantes e pastas de dentes é empregue para encapsular/revestir substâncias aromáticas especiais e tem ainda aplicações como espessante e estabilizante em tónicos capilares, loções e champôs. Na indústria tabaqueira usa-se a pectina de beterraba como adesivo natural nos invólucros de charutos e cigarrilhas. A pectina também está presente na produção de filtros de cerâmica de estrutura porosa homogénea e de membranas para ultracentrifugação e electrodiálise. Até no fabrico de plásticos biodegradáveis, como matéria prima renovável, a pectina se tem tornado cada vez mais importante.

Apesar do imenso potencial que a pectina tem demonstrado para aplicações farmacêuticas, a sua utilização nesta área não tem sido muito explorada provavelmente devido à existência de outros polissacarídeos naturais mais competitivos a nível económico. A pectina foi reconhecida na maioria dos países, pelas autoridades competentes, como um aditivo alimentar importante e inofensivo. Uma vez que pode ser encontrada na maior parte das plantas terrestres e em diversos frutos, o organismo do Homem está bem habituado a este polissacarídeo, sendo improvável a manifestação de episódios de intolerância gástrica mesmo em doses muito elevadas. Depois da avaliação da JEFCEFA (*The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) concluiu-se que, do ponto de vista toxicológico, não há limitações à utilização dos diversos tipos de pectinas e seus derivados amidados. E, de facto, estudos que têm vindo a ser realizados mostram que a pectina (na sua forma pura ou modificada), enquanto substância biologicamente activa, parece manifestar benefícios directos na saúde, nomeadamente na diminuição do colesterol (Galibois et al., 1994; Garcia-Diez et al., 1996; Ismail et al., 1999; Nishimura et al., 2000; Terpstra et al., 1998; 2002; Fernandez, 1995; Shen et al., 1998), na redução das concentrações plasmáticas de glicose (Kumar et al., 1993), na remoção de cationes tóxicos dos órgãos dos tractos gastrointestinal e respiratório (Kohn, 1982), no controlo de hemorragias ou sangramentos locais (Joseph, 1956),

como anticoagulante na forma de sal sulfato (Brake e Fennema, 1993; Geigy, 1957), no tratamento da anemia por deficiência em ferro (Eichel, 1967; Kim e Atallah, 1992; 1993; Kim et al., 1996), como adjuvante na administração de bismuto (Company, 1970), no tratamento de úlceras duodenais (Nie et al., 1999; Riunite, 1970), no prolongamento do esvaziamento gástrico (Holt et al., 1979; Schwartz et al., 1982; 1988; Lorenzo et al., 1988), no tratamento de desordens relacionadas com excessos alimentares (Rabbani et al., 2001; Riunite, 1970), como anti-inflamatório (Andoh et al., 1999) e imunoregulador (Lim et al., 1997), na inibição do crescimento de células tumorais (Tapper e Roberfroid, 1999; Hayashi et al., 2000; Anonymous, 2000), prevenção de metástases hepáticas (Tazawa et al., 1999) e actividade antimutagénica contra compostos nitro-aromáticos (Hensel e Meier, 1999). Além disso, a pectina tem merecido muita atenção no sentido do aproveitamento das suas propriedades para aplicação como veículo de fármacos. Dada a importância e o nosso especial interesse nestes estudos, reservámos uma secção mais adiante para a revisão dos trabalhos até hoje publicados nesta matéria.

### **3.4 Estrutura e propriedades físico-químicas**

À semelhança de outros polissacarídeos, as pectinas são polimoleculares e polidispersas, ou seja, heterogéneas no que respeita à estrutura química e peso molecular (que pode variar entre 50000 a 150000 Da) e a sua composição varia com a fonte da qual foi extraída bem como com as condições usadas durante a extracção e purificação (Thakur et al., 1997). Considera-se, contudo, quimicamente homogénea uma pectina que se elua através de uma coluna cromatográfica mostrando um pico de composição constante, embora possa ser heterogéneo no que diz respeito à massa molecular (O'Neill et al., 2001).

A estrutura dominante da pectina é uma cadeia linear de ácido *D*-galacturónico com ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1-4) com diversos graus de esterificação dos resíduos de ácido carboxílico. Esta estrutura é ocasionalmente interrompida por cadeias laterais ricas em açúcares neutros, nomeadamente arabinose, galactose e ramnose. Na figura 3.3 mostra-se

uma representação de uma unidade dissacárida da cadeia linear da pectina com a designação dos átomos e ângulos de torção de interesse. A conformação junto à ligação glicosídica é descrita pelos ângulos de torção  $\psi$  e  $\phi$  e a orientação dos grupos ácidos é descrita pelos ângulos de diédricos  $\gamma$  e  $\gamma'$ .

Estudos computacionais realizados por Braccini e colaboradores (Braccini et al., 1999) indicam que o comportamento conformacional dos dissacarídeos é controlado principalmente pelo tipo de ligação glicosídica (1-4)-di-axial ou (1-4)-di-equatorial.

O ácido galacturónico (unidade principal da cadeia dominante, como foi já referido) possui uma ligação axial-axial e, por isso, o seu espaço conformacional é mais restrito. Estas considerações são importantes para compreender e interpretar o comportamento macroscópico das soluções de pectina.

Para se estabelecer a estrutura primária de um polissacárideo péctico é necessário que tenham sido determinadas as seguintes características: as composições dos resíduos glicosilo e ligações glicosídicas; as configurações absolutas (D ou L), as formas cíclicas (piranose ou furanose) e configurações anoméricas dos grupos glicosilo; a sequência dos grupos glicosilo e a localização de substituintes que não sejam carboidratos (por exemplo, grupos *O*-metilo ou *O*-acetilo). Até agora, apenas três polissacárideos pécticos foram isolados da parede celular primária de plantas e caracterizados estruturalmente: homogalacturonano, ramnogalacturonano e galacturonanos substituídos. O grupo homogalacturonano é o principal responsável pela complexidade química e estrutural das substâncias pécticas: como as inserções de unidades ramnosilo não são compatíveis com a cadeia galacturónica regular, vão actuar como pregas delimitadoras das zonas de junção durante a gelificação da pectina.

Foi sugerido, após alguns estudos com pectinas originárias de diferentes fontes, que o

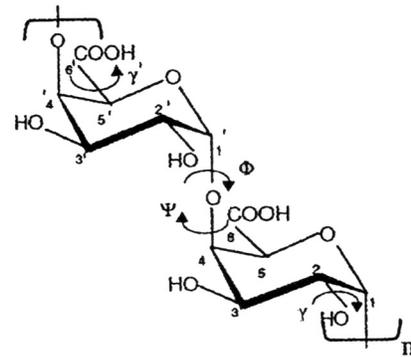


Figura 3.3: Representação de uma unidade dissacárida da cadeia galacturónica da pectina (adaptado de (Braccini et al., 1999)).

grupo galacturonano não constituía um homopolímero<sup>5</sup> devido à ocorrência de segmentos, mais ou menos extensos, de grupos ramnose na cadeia dominante. Contudo, para efeitos práticos, a pectina comercial pode ser considerada como um homopolímero de unidades galacturónicas. A pectina tem pKa 3,5 e a valores neutros de pH encontra-se negativamente carregada.

As pectinas são, de forma geral, solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos, embora apresentem um intumescimento relativamente grande e uma dissolução moderada na presença de solventes orgânicos polares (Towle e Christensen, 1973). A solubilidade em soluções aquosas depende do grau de polimerização e do número e distribuição dos grupos metoxilo. De forma geral, a solubilidade aumenta com a diminuição do peso molecular e aumento dos grupos carboxílicos esterificados. Também a temperatura, o pH da solução e a natureza e concentração de co-solutos presentes são factores que influenciam a solubilidade (Thakur et al., 1997). Por exemplo, como o grupo éster é mais hidrofóbico que o grupo carboxílico, uma pectina com um grau de esterificação elevado gelifica a temperaturas mais altas do que outra com um grau de esterificação menor (Gilbert, 0000). Os sais bivalentes dos ácidos péctico e pectínico são ligeiramente solúveis em água, a não ser que sejam convertidos nas formas sódica e potássica (Towle e Christensen, 1973).

As soluções de pectina, embora viscosas, apresentam viscosidades relativamente baixas quando comparadas com outras gomas ou espessantes naturais. A adição de sais de catiões monovalentes provoca uma redução da viscosidade, que se verifica mais pronunciada se o conteúdo de grupos metoxilo for baixo, aparentemente devido a uma redução do número de grupos negativamente carregados e, conseqüentemente, ao decréscimo das repulsões entre cadeias adjacentes que assim permite o estabelecimento de associações (Towle e Christensen, 1973). Já a adição de catiões polivalentes, bem como o pH, exibem um efeito oposto. Em soluções que não contenham iões, a viscosidade diminui quando o pH (se for inferior ao pKa) aumentar para valores acima do pKa. Em particular, o efeito do aumento da

---

<sup>5</sup>Designa-se por *homopolímero* o resultado da polimerização de um único tipo de unidade monomérica.

viscosidade após adição de sais de cálcio é ainda maior à medida que diminui o grau de esterificação, já que existe um número maior de grupos carboxílicos livres para poderem ligar-se aos iões  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **3.5 Mecanismos de gelificação**

A nível molecular, um gel aquoso consiste em três elementos: (a) zonas de junção onde as moléculas de polímero se associam, (b) segmentos interjuncionais de polímeros relativamente móveis e (c) água retida na rede polimérica. As zonas de junção podem envolver uma única ligação covalente entre duas cadeias poliméricas ou uma combinação de ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas ao longo de e entre duas cadeias poliméricas. Embora a formação de uma junção intermolecular estável seja uma condição crítica para a gelificação, são também necessárias algumas limitações à associação entre cadeias para se poder obter uma rede hidratada em vez de um precipitado insolúvel (Axelos e Thibault, 1991). Um polímero que não forme zonas de junção mantém-se simplesmente em solução, enquanto outro que as forme ao longo de toda a cadeia será insolúvel, a não ser que factores entrópicos mantenham as cadeias afastadas (Rees e Wignt, 1971). É ainda possível avaliar a proporção da cadeia envolvida em zonas de junção e zonas interjuncionais por  $^1\text{H}$  RMN (Mackay et al., 1982). A resistência do gel e, por vezes, as propriedades gerais podem ser alteradas por variação do grau de polimerização e da funcionalidade química da cadeia de pectina. Essas variações também provocam alterações na textura do gel. O grau de esterificação, as ramificações de cadeias de açúcares neutros, a acetilação e a reticulação de moléculas de pectina também influenciam a textura dos geles (Baier et al., 1994). As cadeias de pectina possuem carga negativa, e a densidade de carga é maior a um pH elevado e a um baixo DE (Gross et al., 1980). Dependendo da densidade de carga, as moléculas de pectina repelem-se mutuamente o que interfere com a associação entre as cadeias em solução. A conformação da pectina não é influenciada pela existência de ramificações mas, em soluções concentradas, a ramificação lateral pode contribuir para um emaranhado

significativo (Hawang e Kokini, 1992).

O processo de gelificação é influenciado por parâmetros intrínsecos e extrínsecos, que incluem o grau de esterificação, a distribuição de cargas ao longo da estrutura principal, o peso molecular médio da amostra, a força iónica, o pH, a temperatura e a presença de co-solutos (Thakur et al., 1997). A existência de substituintes também influencia a gelificação. Mesmo um grupo pequeno como o *O*-acetilo, distribuído regularmente na cadeia é suficiente para impedir a formação do gel. É por este motivo que a pectina extraída da beterraba, que contém quantidades especialmente elevadas de grupos *O*-acetilo, não são aceitáveis para usos comerciais (Towle e Christensen, 1973).

As pectinas podem gelificar-se, essencialmente, segundo quatro mecanismos: induzidas por um ambiente ácido, através da reticulação com catiões bivalentes, por oxidação dos substituintes éster do ácido ferrúlico na pectina de beterraba ou por meio de uma reacção sinérgica com o alginato. As pectinas extraídas da beterraba contêm resíduos de ácido ferrúlico nas cadeias laterais que podem estabelecer ligações via oxidação. A reacção pode ser iniciada por um peróxido ou peroxidase ou usando persulfatos (Liu et al., 2003).

A função do co-soluto na preparação de geles de pectinas HM é estabilizar as zonas de junção promovendo interações hidrofóbicas entre os grupos éster metálicos. Esse efeito depende, portanto, especificamente da geometria molecular do co-soluto e das interações com moléculas de água vizinhas (Oakenfull e Scott, 1984).

Nas pectinas LM o gel forma-se na presença de catiões bivalentes (geralmente iões cálcio), que actuam como pontes entre pares de grupos carboxílicos (Axelos e Thibault, 1991).

### *3.5.1 Pectinas HM*

Em termos de estrutura, as zonas de junção nas pectinas HM são diferentes (Plaschina et al., 1978; Morris et al., 1980; Ravanat e Rinaudo, 1980; Rinaudo et al., 1980). As ligações das cadeias poliméricas envolvem segmentos extensos de duas ou mais moléculas de pectina para formar as zonas de junção. Estas são estabilizadas através de uma combinação

de ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as moléculas de pectina (Oakenfull, 1991; Walkinshaw e Arnott, 1981). Os efeitos hidrofóbicos surgem das interações desfavoráveis entre moléculas de água e grupos metoxilo apolares. Os grupos metoxilo induzem alterações na estrutura da água diminuindo a sua entropia. Para minimizar este fenómeno, os grupos metoxilo são obrigados a coalescer e, deste modo, a diminuir a área de superfície em contacto com a água. Esta remoção dos grupos carboxilo constitui a maior contribuição para a energia livre de estabilização conformacional (Nakai e Li-Chan, 1988). O comprimento do segmento necessário para proporcionar estabilidade suficiente a estas zonas de junção é maior à medida que aumenta o grau de esterificação: para um grau de esterificação elevado, praticamente toda a cadeia polimérica parece ser necessária enquanto que para um teor menor em grupos metoxilo (é referido um grau de esterificação de 64,9%) estariam envolvidas 34 unidades monoméricas (17 de cada cadeia) (Oakenfull e Scott, 1986). O tamanho e a estabilidade termodinâmica das zonas de junção depende da proximidade dos dois grupos éster. Plaschina e colaboradores (Plaschina et al., 1978) mostraram que as forças atractivas que existem entre moléculas de pectina se devem aos grupos metoxilo. Walkinshaw e Arnott (Walkinshaw e Arnott, 1981) também sugeriram a contribuição das ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas na estabilidade dos geles de pectinas HM. Uma vez que a intensidade das interações hidrofóbicas depende do co-soluto utilizado e da temperatura, também a resistência do gel e a velocidade de desenvolvimento da estrutura são influenciados por estes parâmetros (Oakenfull e Scott, 1984; Rao e Cooley, 1994). As ligações de hidrogénio nas pectinas HM, favorecidas pela conformação dos resíduos de ácido urónico adjacentes (Demarty et al., 1984), ocorrem entre os átomos de oxigénio funcionais. Individualmente, estas ligações são relativamente fracas e fáceis de quebrar, no entanto, em grande número conferem ao gel uma estabilidade termodinâmica significativa (Joesten e Schaad, 1974). A firmeza do gel e desenvolvimento da estrutura depende da temperatura de armazenamento, pH, concentração da pectina e do co-soluto utilizado. Geles de pectina HM/glucose são mais firmes do que geles com frutose (Oakenfull e Scott, 1986). Esta diferença na resistência pode ser explicada pelos

diferentes efeitos que os açúcares têm na interação hidrofóbica com o gel. A contribuição das interações hidrofóbicas para a energia livre de formação das zonas de junção é metade da das ligações de hidrogénio, mas essencial já que estas últimas, por si só, são insuficientes para ultrapassar a barreira entrópica da gelificação (Oakenfull e Scott, 1984).

### 3.5.2 *Pectinas LM*

Como foi anteriormente referido, neste tipo de pectinas a gelificação resulta de ligações iónicas via pontes de iões cálcio entre dois grupos carboxílicos pertencentes a duas cadeias em contacto mas distintas. As interações entre aqueles catiões e os grupos carboxílicos são descritas através do modelo “caixa-de-ovos”<sup>6</sup> envolvendo um processo de duas fases de dimerização inicial e subsequente agregação das “caixas-de-ovos” pré-formadas (Grant et al., 1973; Powell et al., 1982). O mecanismo envolve a formação de zonas de junção que consistem em dímeros de simetrias helicoidais  $2_1$  semelhantes ao modelo proposto para os alginatos (Kohn, 1987). O tamanho das zonas de junção “caixa-de-ovos” é limitado pela presença de sequências contendo resíduos de manuronatos<sup>7</sup>, que interrompem a cadeia de blocos gulurónicos (Walkinshaw e Arnott, 1981). O pH deve ser elevado uma vez que só os grupos carboxílicos dissociados participam nas ligações com os iões cálcio (Glickman, 1969). As junções formam-se entre blocos galacturónicos lineares e não esterificados de forma não covalente através de ligações de coordenação que usam as orbitais não preenchidas daqueles iões (Walkinshaw e Arnott, 1981). Os átomos de oxigénio dos grupos hidroxilo, o átomo de oxigénio do ciclohexano e os restantes átomos de oxigénio de outros monómeros participam no processo de ligação por meio dos seus electrões livres (Kohn, 1987). O cálcio é particularmente eficaz na complexação com os hidrocarbonetos principalmente porque o seu raio iónico (0,1 nm) é suficientemente grande para se coordenar com os átomos de oxigénio, cuja localização é regular, e devido à flexibilidade relativa-

---

<sup>6</sup>Do inglês “egg-box”.

<sup>7</sup>O alginato é, estruturalmente, um polímero não ramificado dos ácidos *D*-manurónico e *L*-gulurónico com ligações glicosídicas (1-4).

mente às direcções em que se estabelecem as ligações de coordenação (Angyal, 1989). A presença de grupos metilo impede a formação de zonas de junção nos segmentos interjuncionais das moléculas, tornando-as mais flexíveis. A existência de cadeias laterais na molécula impede a sua agregação (Smidsrod e Haug, 1971). Quanto maior for o número de grupos carboxílicos reactivos, mais provável é a formação da ponte (Glickman, 1969). Por outro lado, as moléculas com maior número de grupos negativamente carregados e menor grau de esterificação são mais lineares e, por isso, possuem uma maior tendência para formar uma ponte com os iões cálcio (Glickman, 1969; Speiser et al., 1947). A dimensão do agregado que forma a zona de junção depende da quantidade de cálcio disponível (Kohn, 1987; Morris et al., 1982). Com níveis baixos de cálcio, os resíduos de poligalacturonato formam unidades primárias de duas cadeias numa configuração antiparalela, com cerca de 50% dos grupos carboxílicos neutralizados com o cálcio. O efeito combinado do pH e co-soluto promove a gelificação a concentrações baixas de cálcio apesar da diminuição do número de sequências de grupos carboxílicos disponíveis para ligações com aquele catião. Este fenómeno complexo acontece devido ao efeito do co-soluto na actividade da água e aos efeitos hidrofóbicos e depende do tipo de co-soluto utilizado (May e Stainsby, 1986). Na presença de um excesso de cálcio, formam-se várias unidades primárias em forma de agregados em camadas e esse excesso de catiões, que constituem agregados secundários, ficam fracamente ligados contribuindo pouco para a resistência do gel (Axelos e Thibault, 1991). A valores de pH entre 3 e 5, uma elevada concentração de iões  $\text{Ca}^{2+}$  promove uma reticulação de tal forma extensa que a pectina precipita e o gel é destruído (Glickman, 1969). A durabilidade de uma zona de junção num gel preparado a partir de pectinas LM depende da intensidade das ligações electrostáticas que, por seu lado, dependem do comprimento dos segmentos contínuos de pectina que podem estabelecer interacções (Powell et al., 1982). O aumento da força iónica bem como um pH neutro e diminuição da temperatura de sedimentação diminuí a quantidade de cálcio necessária para obter uma transição solução-gel (Garnier et al., 1993) e para um grau de esterificação superior a 45% a ligação cooperativa ao cálcio é desprezável (Thibault e Rinaudo, 1985). Os sais de catiões mono-

valentes de pectina são altamente ionizáveis em solução e a distribuição de cargas iônicas ao longo da molécula mantêm-na numa conformação desdobrada (Kokini e Chou, 1993). A ionização também previne a agregação entre as cadeias de polímero, resultando em soluções de viscosidade estável uma vez que cada cadeia se encontra hidratada, estendida e independente (Bemiller e Whistler, 1958). No entanto, Thibault e Rinaudo (Thibault e Rinaudo, 1986) referem que os catiões monovalentes são responsáveis por uma diminuição da viscosidade cujo grau é maior com a diminuição do grau de esterificação. A adição de catiões bi ou trivalentes produz um efeito oposto. Também é referido que, para as pectinas LM, a resistência do gel aumenta com a diminuição do grau de esterificação (Kim et al., 1978a). A amidação das pectinas LM aumenta a capacidade de formar geles (Kim et al., 1978b). Black e Smith (Black e Smit, 1972) compararam as características dos geles de pectinas desesterificadas pelo processo convencional (por meio de um ácido) e das desesterificadas com amónia, com o mesmo peso molecular e quantidade de ácidos carboxílicos livres, e verificaram que a resistência dos geles aumentava para a pectina amidada. Este aumento na resistência do gel foi explicado pelas ligações de hidrogénio entre os grupos amida. Para além disso, verificou-se que este tipo de pectina proporcionava uma melhor textura e menor tendência para sinérese relativamente às pectinas comerciais (Gross et al., 1980).

### **3.6 As enzimas pectinolíticas**

Consoante o tipo de actividade que catalisam, as enzimas pectinolíticas dividem-se em dois grandes grupos: as desesterificantes (pectinoesterases) e as despolimerizantes (liases e poligalacturonases) (Towle e Christensen, 1973).

As pectinoesterases (também designadas por pectases, pectinometoxilases ou pectinometil-esterases) podem ser encontradas na generalidade das plantas e são sintetizadas por numerosos microrganismos. Estas enzimas hidrolisam os grupos ésteres metílicos com formação de metanol e unidades de ácido galacturónico.

As liases degradam, via eliminação- $\beta$ , as ligações glicosídicas próximas dos grupos carboxílicos livres.

As poligalacturonases (também designadas por pectinases, pectolases ou poligalacturonidas) atacam a cadeia galacturónica entre dois grupos carboxílicos. Esta enzima não tem actividade sobre o polímero totalmente metoxilado mas, na presença de pectinoesterases, quebra todas as ligações da cadeia dando origem a resíduos de ácido galacturónico livres.

Consoante o tipo de ataque da enzima usam-se os prefixos *endo* ou *exo* e os termos polimetilgalacturonase e poligalacturonase indicam se a enzima prefere como substrato a pectina ou o ácido péctico. Segundo Phaff e Demain existem duas enzimas bem conhecidas que atacam o ácido poligalacturónico: a endo-poligalacturonase, que hidrolisa ao acaso o ácido péctico dando origem a uma mistura de ácido galacturónico e digalacturónico, e a exo-poligalacturonase, que quebra unidades de ácido galacturónico do extremo do polímero de ácido péctico.

### **3.7 A pectina como veículo de fármacos absorvidos no cólon: estudos conhecidos**

#### *3.7.1 Macroesferas de pectinato de cálcio*

As macroesferas de pectina são geralmente preparadas por extrusão de uma solução de pectina para uma solução de cloreto de cálcio. As macroesferas são depois recolhidas do meio de suspensão por filtração, lavadas com água destilada e secas.

A tabela 3.1 resume os diversos fármacos encapsulados em macroesferas de pectinato de cálcio.

Tanto quanto conhecemos, a preparação de macroesferas de pectina contendo um fármaco foi iniciada por Aydin e colaboradores (Aydin e Akbuga, 1996). Os autores utilizaram o atenolol e o piroxicam como fármacos modelos e obtiveram eficiências de encapsulação entre 26,5 e 58,7% e entre 64,3 e 97,2%, respectivamente, confirmando com estudos de espectrofotometria de infravermelho ligações de hidrogénio entre a pectina e ambos os fármacos. Os parâmetros estudados foram a concentração de fármaco (de 2 a 18% (m/v))

e da solução de cloreto de cálcio (2 e 10% (m/v)) e o método de secagem (liofilização e secagem em forno a 50°C). Verificou-se que o tamanho das macroesferas com atenolol depende da concentração de fármaco e do tipo de secagem. Quanto às eficiências de encapsulação, os resultados mostraram que eram principalmente dependentes da concentração da solução de cloreto de cálcio e da quantidade de fármaco. Os estudos de libertação realizados mostraram que existe uma diminuição acentuada na libertação de atenolol e piroxicam incorporados nas macroesferas relativamente às formas em pó. Além disso, o perfil de libertação não foi afectado pela concentração de fármaco nem de cálcio, mas o processo de liofilização fez aumentar a libertação de piroxicam.

Mais tarde, foi utilizada uma pectina amidada para encapsular cloroquina (Munjeri et al., 1998b), com diferentes razões entre polissacarídeo e fármaco, e foram obtidas elevadas eficiências de encapsulação (entre 94 e 98%). Nos ensaios de libertação em fluido gástrico simulado, e após 9 horas de incubação, foi libertado um máximo de 80% de cloroquina enquanto que em fluido intestinal todo o fármaco foi libertado ao fim de 4 horas. O aumento da proporção de pectina relativamente à cloroquina, diminuiu a libertação do fármaco nos dois meios.

Para comprovar a libertação de fármaco das macroesferas de pectinato de cálcio no cólon, já que Ashford e Fell (Ashford e Fell, 1994) tinham sugerido que sistemas multiparticulados constituíam estratégias muito mais reprodutíveis no que respeita à libertação colónica, Munjeri e colaboradores (Munjeri et al., 1998a) descrevem um estudo *in vivo* com voluntários humanos usando a técnica de cintigrafia- $\gamma$ . Foi escolhida uma formulação de pectina, amberlite rádiomarcada e amilose administrada através de uma cápsula de gelatina dura. Os resultados mostraram que as macroesferas passaram pelo estômago separadamente em cerca de 22 minutos. A passagem através do intestino também se processou individualmente, tendo-se constituído um aglomerado na junção ileocecal e, nesta altura, as macroesferas mantinham-se intactas. Uma vez no cólon, as macroesferas voltaram a dispersar-se e os dados da contagem  $\gamma$  indicaram que a pectina é lentamente degradada pelas enzimas da flora bacteriana.

Na sequência de um trabalho publicado em 1997 (Sriamornsak et al., 1997b), Sriamornsak (Sriamornsak, 1998a;b; 1999) com a colaboração de Nunthanid (Sriamornsak e Nunthanid, 1998; 1999), realizou uma série de estudos sobre a aplicabilidade das macroesferas de pectinato de cálcio na administração oral de fármacos para libertação específica no cólon. A influência de vários parâmetros de formulação e de processo (tipo de pectina, quantidade de fármaco utilizada, concentração da solução de cloreto de cálcio, tempo de reticulação entre pectina e íons cálcio, concentração de um agente endurecedor, tempo de endurecimento e método de secagem) nas propriedades das macroesferas de pectinato de cálcio e nas características de libertação do fármaco foram investigados.

De forma geral, verificou-se que o tipo de pectina influencia a forma das macroesferas e a eficiência de encapsulação, tendo-se obtido melhores resultados para as pectinas com baixo grau de esterificação.

Particularmente para a indometacina (Sriamornsak e Nunthanid, 1998), o diâmetro médio das macroesferas aumentou com a quantidade de fármaco utilizada enquanto a eficiência de encapsulação, embora elevada, diminuiu. A libertação de fármaco foi mais rápida quanto maior foi a proporção de indometacina. No caso da BSA (Sriamornsak, 1998a), o tamanho médio das macroesferas também aumentou mas a eficiência de encapsulação não foi proporcional à quantidade de proteína utilizada. O perfil de libertação foi semelhante para todos os valores estudados, tendo a libertação da BSA sido um pouco maior para a menor proporção desta proteína.

Quanto à concentração da solução de cloreto de cálcio, registou-se uma redução do tamanho das macroesferas e uma diminuição da eficiência de encapsulação com o aumento da concentração. Estes resultados foram atribuídos a um encolhimento mais extenso da macroesfera devido a um fenómeno de sinérese. A libertação do fármaco foi mais lenta para a maior concentração da solução de cloreto de cálcio.

O tempo de reticulação entre os íons cálcio e a pectina também foi estudado (Sriamornsak, 1998a). Quanto maior foi o período de reticulação menor o diâmetro das macroesferas. Já a eficiência de encapsulação não foi proporcional. A diminuição da libertação da pro-

teína com o aumento do tempo de reticulação foi justificada pelo facto das ligações entre as cadeias das moléculas de pectina poderem ter sido promovidas por uma exposição mais prolongada aos iões cálcio.

Verificou-se ainda que, na presença do endurecedor (glutaraldeído), o diâmetro médio das macroesferas diminuiu, a eficiência de encapsulação aumentou e a libertação do fármaco ocorreu mais lentamente. Observou-se o mesmo comportamento para um aumento do tempo de endurecimento. Provavelmente, este agente promove a formação de mais ligações entre as moléculas de pectina, formando-se uma superfície mais densa que impede a difusão do fármaco durante o processo de preparação.

Finalmente, para a secagem a 25 e a 37°C verificou-se que o tamanho das macroesferas diminuiu com o aumento da temperatura, mas a eficiência de encapsulação aumentou. O perfil de libertação do fármaco não é alterado por este factor, excepto quando a temperatura foi de 50°C (Sriamornsak, 1999). No caso da liofilização como método de secagem (Sriamornsak, 1999), o tamanho das macroesferas permaneceu constante, a eficiência de encapsulação foi menor que a 37°C e a libertação do fármaco ocorreu muito mais rapidamente.

Do estudo com células *Saccharomyces cerevisiae* (Sriamornsak, 1998b) concluiu-se que para se formarem macroesferas regulares, o grau de esterificação máximo da pectina é de 30%. A viabilidade das células encapsuladas foi testada indirectamente, através da monitorização do consumo de glicose. O armazenamento em solução de cloreto de cálcio a 4 e a -40°C não alterou a actividade metabólica relativamente às células não encapsuladas. No entanto, a actividade das células imobilizadas nas macroesferas liofilizadas registou um decréscimo significativo. O método de secagem parece, pois, ser determinante nas características das macroesferas, particularmente no caso da encapsulação de células.

A combinação da pectina com outros polímeros também foi experimentada como estratégia para obter uma formulação de libertação controlada. Liu e Krishnan (Liu e Krishnan, 1999) estudaram macroesferas de pectina/alginato preparadas por extrusão/gelificação externa com um tratamento de polilisina. Foram utilizados três fármacos com diferentes solubilidades e verificou-se que a eficiência de encapsulação depende da solubilidade e do

Tabela 3.1: Fármacos encapsulados em macroesferas de pectinato de cálcio com ou sem revestimento.

<b>Fármaco modelo</b>	<b>Referência</b>
Atenolol	(Aydin e Akbuga, 1996)
BSA	(Kim et al., 2003; Chang e Lin, 2000; Sriamornsak, 1999; 1998a)
Cetoprofeno	(El-Gibaly, 2002)
Cloridrato de hidroxilamina	(Murata et al., 2004)
Cloroquina	(Munjeri et al., 1998b)
Clorotiazida	(Liu e Krishnan, 1999)
Diclofenac de sódio	(Murata et al., 2004)
Indometacina	(Sriamornsak e Nunthanid, 1999; Liu e Krishnan, 1999; Munjeri et al., 1998a; Sriamornsak e Nunthanid, 1998; Munjeri et al., 1997)
Insulina	(Musabayane et al., 2000)
Óleo de fígado de tubarão	(Diáz-Rojas et al., 2004)
Piroxicam	(Aydin e Akbuga, 1996)
Sulfametoxazole	(Munjeri et al., 1998a; 1997)
Tanase	(Boadi e Neufeld, 2001)
Teofilina	(Chan et al., 2001; Liu e Krishnan, 1999)

tempo de gelificação e que a pectina controla a libertação nos meios ácidos e alcalinos. Embora todas as formulações testadas (alginato, alginato/polilisina, pectina/alginato/polilisina)

tenham mostrado 100% de aderência a tecidos gástricos e intestinais, os ensaios não foram suficientes para diferenciar a intensidade da adesão. Além disso, nos estudos de transporte com monocamadas de células Caco-2, observou-se um aumento da permeabilidade da solução de pectina/alginato após 30 minutos de contacto. No final do trabalho, concluiu-se que a combinação dos três polímeros tem a vantagem do aumento de permeabilidade e aumento da concentração de fármaco no local da absorção, da bioadesividade e libertação controlada.

Um outro estudo com macroesferas de pectinato de cálcio, descrito por Musabayane e colaboradores (Musabayane et al., 2000), teve como objectivo a encapsulação de insulina e avaliação do seu efeito nos níveis plasmáticos de glicose em ratos diabéticos. As eficiências de encapsulação foram elevadas (entre 74 a 85%) e o aumento da concentração de insulina e diminuição da glicémia nos ratos, 2 a 4 horas após administração, sugerem que a libertação da insulina terá ocorrido no íleo ou cólon.

### *3.7.2 Microesferas e microcápsulas de pectinato de cálcio*

Na tabela 3.2 encontram-se sumariados os diferentes fármacos encapsulados em microesferas ou microcápsulas de pectinato de cálcio.

Uma estratégia para encapsular anti-inflamatórios não-esteróides foi apresentada por Meshali e colaboradores (Meshali et al., 1992). Os autores aplicaram uma mistura de pectina e rutina para encapsular azapropazona usando a técnica do leiteo fluidizado, obtendo partículas com tamanhos entre os 100 e 400  $\mu\text{m}$ . A encapsulação do fármaco resultou num aumento da sua velocidade de dissolução quer em meio ácido quer em meio alcalino, e os ensaios de biodisponibilidade em ratos mostraram que a concentração plasmática do fármaco duplicou. Além disso, enquanto que a administração de azapropazona aos ratos conduziu ao aparecimento de úlceras profundas e hemorragias da mucosa gástrica, estas manifestações desapareceram quando o fármaco foi encapsulado.

McMullen e colaboradores (McMullen et al., 1982; 1984) também utilizaram a pectina para preparar microcápsulas, ou microglóbulos como designaram na altura, e estudar os

factores determinantes para o controlo do seu tamanho, morfologia e isolamento. A encapsulação de sulfamerazina foi realizada por coacervação de uma solução de pectina/gelatina em contacto com partículas suspensas e gotículas emulsificadas. Após arrefecimento e desnaturação com formaldeído, as gotículas líquidas de coacervato gelificam e formam-se os microglóbulos, após reacção de floculação em 2-propanol, são recuperados sob a forma de pó disperso em água. Esta técnica exige que a solubilidade do fármaco no líquido de equilíbrio e no coacervato seja suficientemente baixa, que o fármaco apresente uma estabilidade adequada em meios ácidos e alcalinos e que os tamanhos dos pós de fármaco sejam inferiores ao tamanho pretendido para o microglóbulo para garantir a esfericidade da forma.

Além da aplicação na libertação específica no cólon, a pectina também foi estudada como sistema microparticulado, contendo piroxicam, para administração oftálmica (Giunchedi et al., 1999). Neste trabalho as microesferas de pectina foram preparadas por secagem por pulverização (“spray-drying”) e testadas quanto à retenção pré-corneal. As microesferas, com tamanho inferior a  $10\mu\text{m}$ , aumentaram a velocidade de dissolução do fármaco *in vitro*. Nos estudos *in vivo* com coelhos verificou-se um aumento da biodisponibilidade relativamente à formulação líquida comercial.

Recorrendo a um novo método designado por microencapsulação por emulsificação em microcanal<sup>8</sup>, Kawakatsu e colaboradores (Kawakatsu et al., 2001) prepararam microcápsulas sólido-em-óleo-em-água. Essencialmente, é forçada a passagem de uma emulsão água-em-óleo por uma fase hidrofílica (solução de pectina) através de uma placa de sílica multicanal, formando-se uma emulsão água-em-óleo-em-água monodispersa. As microcápsulas sólido-em-óleo-em-água são posteriormente obtidas por gelificação da fase interna com uma solução de cálcio (fase aquosa externa) contendo um agente emulsivo. Embora tenham sido preparadas apenas microesferas vazias, os resultados indicaram que é possível a encapsulação de um material hidrossolúvel.

---

<sup>8</sup>Do inglês “microchannel emulsification”.

A emulsificação também encontrou aplicação na encapsulação com pectina (Esposito et al., 2001; Wong et al., 2002a;b). No estudo de Esposito e colaboradores (Esposito et al., 2001) as gotículas de pectina são obtidas por emulsificação e a gelificação é conseguida através de um arrefecimento rápido da emulsão, seguido de um tratamento com acetona (que actua como agente desidratante). Os autores ainda investigaram o efeito de um endurecimento iónico (com iões cálcio) para o qual a reticulação com os iões é realizado *in situ* ou numa segunda etapa. No primeiro caso, uma solução de cloreto de cálcio é adicionada à emulsão água-em-óleo. O segundo, consiste em expor as microesferas isoladas e secas a uma solução de cloreto de cálcio. Vários parâmetros de processo de formulação foram investigados. Os resultados por eles obtidos mostraram que a pectina de maçã e o isosteato de isostearilo como fase oleosa produziram microesferas esféricas e de superfície regular com uma granulometria unimodal. O aumento da concentração da pectina resultou num aumento do tamanho médio e da polidispersão, enquanto que o aumento da razão fase aquosa/fase oleosa resultou em microesferas esféricas, porosas e de maior tamanho. Dos agentes emulsivos estudados (todos da gama Span®) foi com o Span®20 que obtiveram o menor diâmetro. O tamanho das microesferas foi principalmente controlado variando a concentração do agente emulsivo e a velocidade de agitação.

Wong e colaboradores (Wong et al., 2002a;b) prepararam microesferas de pectinato de cálcio por gelificação externa usando uma técnica modificada de emulsificação. A solução de pectina/fármaco foi dispersa em isooctano contendo um agente emulsivo por acção de um agitador mecânico a 1000rpm e após 10 minutos de agitação foi adicionada uma solução aquosa com um outro agente emulsivo. A agitação continuou por mais 5 minutos e a gelificação das microesferas ocorreu por adição de uma solução de cloreto de cálcio. As microesferas foram depois recolhidas por filtração sob vácuo e lavadas com água destilada. Foram testados três fármacos diferentes e verificou-se que os de menor solubilidade produziram microesferas maiores e com maior eficiência de encapsulação. De maneira geral todos os lotes preparados apresentaram, nos meios de dissolução utilizados, uma libertação rápida do fármaco. A libertação mais rápida ocorreu em tampão HCl/KCl (pH 1,2), seguido

Tabela 3.2: Fármacos encapsulados em microesferas ou microcápsulas de pectinato de cálcio.

<b>Fármaco modelo</b>	<b>Referência</b>
Azapropazona	(Meshali et al., 1992)
BSA	(Aral e Akbuga, 1998)
Metronidazol	(Esposito et al., 2001)
Piroxicam	(Giunchedi et al., 1999)
Sulfanilamida	(Wong et al., 2002b;a)
Sulfaguanidina	(Wong et al., 2002b;a)
Sulfamerazina	(McMullen et al., 1984)
Sulfatiazole	(Wong et al., 2002b;a)
Tetraciclina	(Esposito et al., 2001)

do tampão NaOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4) e água destilada (pH 5,5). Verificou-se que a solubilidade dos diferentes fármacos no meio exterior é determinante para justificar a perda de fármaco durante o processo de preparação e nos estudos de libertação. No caso da quantidade de fármaco libertado ser comparável, como aconteceu para o tampão NaOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4), o efeito do pH na interacção da pectina e fármaco parece ser o que melhor explica o perfil de libertação.

A pectina forma geles por reacção não só com os iões cálcio mas com todos os catiões bivalentes, à excepção do ião magnésio. Tendo este facto em consideração, El-Gibaly (El-Gibaly, 2002) escolheu o ião zinco para preparar macroesferas de pectinato de zinco contendo cetoprofeno e matrizes das macroesferas com uma mistura de pectina/dextrano, pectina/carboximetilcelulose de sódio ou pectina/dextrano/carboximetilcelulose de sódio. Os perfis de libertação do fármaco foram estudados e comparados com as macroesferas convencionais de pectinato de cálcio. A percentagem de fármaco libertado das macroesferas de pectinato de zinco em meio intestinal simulado diminuiu com o aumento da concentração

de pectina, da concentração de zinco e do tempo de reticulação e com a diminuição da quantidade de fármaco adicionada. Provavelmente devido a diferenças no grau de reticulação entre os tipos de gel, o sistema pectina-zinco teve um maior efeito retardante na libertação de cetoprofeno. Das formulações matriciais estudadas, a mistura pectina/dextrano (numa razão de 1,5 : 1) foi a que apresentou melhores resultados, permanecendo intacta e re- tendo mais de 98% de fármaco durante a exposição de 2 horas ao meio gástrico simulado. Apesar destes resultados prometedores, não foram dadas indicações quanto à estrutura das microesferas após compressão para produzir as matrizes.

### *3.7.3 Macroesferas de pectinato de cálcio revestidas com quitosano*

Referimos já que a reticulação da pectina com os íons cálcio inibe a libertação do fármaco incorporado na matriz polimérica, uma vez que diminui a solubilidade e intumescimento das moléculas de pectina. No entanto, após hidratação as moléculas de fármaco que se encontram à superfície da matriz passam, por difusão, para o meio circundante, particularmente se se tratar de um fármaco hidrofílico. As moléculas de água migram para o interior da rede de polímero e substituem o fármaco dissolvido, criando poros e canais. A entrada de fluido na matriz promove um intumescimento mais rápido e extenso, aumentando a área de superfície e, conseqüentemente, acelerando a libertação do fármaco incorporado (Liu et al., 2003).

Munjeri e colaboradores (Munjeri et al., 1997) investigaram a aplicabilidade na produção de macroesferas de uma pectina amidada contendo fármacos com diferentes solubilidades. As eficiências de encapsulação obtidas foram elevadas sendo maiores para o fármaco mais solúvel. Em meios com diferentes valores de pH verificou-se que as percentagens de fármaco libertado aumentaram para valores de pH mais elevados e o tratamento com quitosano diminuiu a quantidade de fármaco libertado.

Muito recentemente, foi publicado um trabalho cujo objectivo foi estudar o comportamento *in vitro* de macroesferas de pectina contendo BSA revestidas com quitosano (Kim et al., 2003). Parâmetros como a concentração da solução de cloreto de cálcio, massa

molecular do quitosano, pH da solução de quitosano e pH do meio de libertação foram investigados e discutidos. A eficiência de encapsulação foi máxima para uma concentração de cloreto de cálcio de 2% (w/v) e uma razão pectina/BSA de 2 : 1. O aumento da concentração de cálcio conduziu a uma diminuição da libertação de BSA nas macroesferas não revestidas mas o efeito deste factor em macroesferas revestidas não é relevante. A protecção do revestimento foi maior quando se utilizou um quitosano de elevada massa molecular e uma solução de pH 5.

#### *3.7.4 Comprimidos de pectina ou pectinato de cálcio*

A libertação de indometacina incorporada em comprimidos de pectinato de cálcio foi avaliada na presença e ausência de conteúdos cecais de ratos (Rubinstein et al., 1993). Os resultados indicaram que, na presença do conteúdo cecal, a libertação foi muito maior, demonstrando que o pectinato de cálcio pode ser degradado pelas enzimas do cólon.

O tipo de pectina, a presença de cálcio e a solubilidade do sal de cálcio são parâmetros que influenciam a libertação de um fármaco (Ashford et al., 1994). Quanto maior o grau de esterificação da pectina menor é a sua solubilidade e, portanto, o efeito protector foi melhor. Os estudos de reologia indicaram que existe um valor óptimo da quantidade de cálcio que maximiza a resistência do gel. Acima desse valor, o gel enfraquece devido ao número excessivo de ligações entre o cálcio e a pectina que dá origem a uma matriz heterogénea.

O potencial para libertação específica no cólon de pectinas amidadas também foi avaliado (Wakerly et al., 1997a). A adição de cálcio à pectina com  $DA = 24\%$  atrasou a libertação de paracetamol mas teve o efeito oposto para a pectina com  $DA = 13\%$ . Na ausência de cálcio, o fármaco é libertado mais rapidamente das matrizes de pectina com maior grau de amidação. Por outro lado, Ahrabi e colaboradores (Ahrabi et al., 2000) mostraram que entre uma pectina amidada e o sal de cálcio de uma pectina HM, a primeira é mais susceptível à acção enzimática e, por isso, constitui uma melhor alternativa à libertação no cólon.

Sungthongjeen e colaboradores (Sungthongjeen et al., 1999) estudaram a influência da fonte de pectina, da razão fármaco/pectina e da força de compressão aplicada. Apesar de

a dureza dos comprimidos ter variado com a força de compressão, a libertação do fármaco (indometacina) não foi influenciada. O aumento da quantidade de pectina na matriz retardou a libertação, provavelmente devido à existência de uma camada mais resistente ao meio de dissolução. O tipo de pectina também afectou a libertação da indometacina, embora o grau de esterificação fosse semelhante. No entanto, como uma das pectinas apresentava um teor elevado de sucrose, o aumento da libertação de indometacina foi, portanto, atribuído à formação de poros durante a dissolução da sucrose que facilitaram a penetração do solvente.

Na tabela 3.3 indicam-se os fármacos incorporados em matrizes de pectina, pectinato de cálcio ou combinação com outros polímeros.

#### *Revestimento por compressão*

Uma outra forma de utilização da pectina (ou de pectinato de cálcio) é na obtenção de comprimidos gastro-resistentes. Os adjuvantes e fármacos são comprimidos formando um núcleo. Por sua vez, este é colocado no centro de uma camada de pectina, que é comprimida para formar uma camada exterior espessa e resistente. Este processo é conhecido por *revestimento por compressão*. A penetração de água é retardada pelo revestimento e o contacto entre fármacos e fluidos é inibido até o comprimido atingir o cólon, onde a camada exterior é degradada pelas enzimas ali existentes.

Rubinstein e Radai (Rubinstein e Radai, 1995) prepararam comprimidos de pectinato de cálcio utilizando este método e também matrizes convencionais e avaliaram o perfil de libertação de indometacina e o comportamento *in vivo* de comprimidos contendo insulina. Praticamente logo após a administração, as matrizes de pectinato de cálcio começaram a libertar a insulina pelo que foi concluído que esta formulação é mais adequada para fármacos pouco solúveis em meios aquosos. Para o caso de fármacos muito hidrossolúveis, é necessária uma protecção adicional. De facto, quando a razão mássica núcleo/revestimento foi ajustada a 50/50, a libertação de insulina sofreu um atraso de 5 a 8 horas.

Num outro estudo, a libertação do fármaco foi analisada *in vitro* em condições simu-

Tabela 3.3: Fármacos incorporados em matrizes de pectina, pectinato de cálcio ou combinação com outros polímeros.

<b>Fármaco modelo</b>	<b>Referência</b>
Ácido 5-aminosalicílico	(Turkoglu e T.Ugurlu, 2002)
Cloreto de metoclopramida	(Naggar et al., 1992)
Cloridrato de clorpromazina	(Meshali e Gabr, 1993)
Diclofenac de sódio	(Naggar et al., 1992)
Diltiazem	(Miyazaki et al., 2000)
Fluoresceína de sódio	(Ashford et al., 1994; 1993)
Indometacina	(Semdé et al., 2002; Sungthongjeen et al., 1999; Fernández-Hervás e Fell, 1998; Rubinstein e Radai, 1995; Rubinstein et al., 1993)
Insulina	(Rubinstein e Radai, 1995)
Maleato de clorfeniramina	(Naggar et al., 1992)
Paracetamol	(Fernández-Hervás e Fell, 1998; Wakerly et al., 1997a)
Ropivacaína	(Ahrabi et al., 2000)
Sulfato de quinidina	(Naggar et al., 1992)
Teofilina	(Semdé et al., 2002)
Verde de naftol B	(Wakerly et al., 1996b)

lando todo o tracto gastrointestinal e *in vivo* por cintigrafia- $\gamma$  em voluntários humanos (Ashford et al., 1993). Foram testados três pectinas com graus de esterificação diferentes e só usando a pectina com  $DE = 70\%$  foi possível proteger o núcleo de fármaco uma vez que as pectinas LM são mais hidrofílicas e acabam por se dissolver. A adição de cálcio às

formulações com pectinas LM reduziu a solubilidade mas a quantidade utilizada também diminuiu a resistência dos comprimidos. Os autores também verificaram que a integridade da camada de revestimento exterior diminuía com a espessura. Mesmo para a pectina de maior grau de esterificação (70%) é necessária uma espessura de 0,9-2,0 mm para prevenir satisfatoriamente uma libertação precoce. O mesmo foi concluído por Fernández-Hervás e Fell (Fernández-Hervás e Fell, 1998) quando investigaram o comportamento de comprimidos de dimensão reduzida (5 mm) de pectina contendo indometacina e paracetamol. Para evitarem um revestimento com espessura elevada, a pectina foi combinada com quitosano. A mistura de polímeros ofereceu uma protecção mais elevada em meios simulando o tracto gastrointestinal superior, apesar de ainda ter ocorrido uma pequena libertação de paracetamol antes da adição de enzimas, justificada por ser mais solúvel que a indometacina.

Após exposição de comprimidos com verde de naftol B a conteúdos cecais humanos, de ratos e a enzimas específicas puras, Wakerly e colaboradores (Wakerly et al., 1996b) observaram uma libertação rápida do fármaco modelo. A semelhança nos tempos e perfis de libertação nos diferentes meios indicam que o ataque das enzimas segue mecanismos semelhantes.

A desvantagem do método de revestimento por compressão surge da dificuldade técnica de centrar o núcleo de fármaco no seio dos pós de polímero e comprimi-lo de maneira a que seja igual a espessura e densidade em todas as direcções. É fácil ver que zonas com um revestimento fino intumescem mais facilmente, conduzindo ao colapso do comprimido. Por outro lado, a camada de revestimento é necessariamente volumosa e, portanto, inadequada para algumas formas farmacêuticas.

Outros métodos de incorporação de fármacos na matriz polimérica foram utilizados e estudada a sua influência nos perfis de libertação (Naggar et al., 1992).

#### *Combinação com outros polímeros*

A combinação da pectina com outros polímeros naturais ou sintéticos é uma estratégia possível com vista à diminuição da sua hidrossolubilidade. Por exemplo, a mistura

de pectina e etilcelulose combina o facto de a primeira ser enzimaticamente degradável e as propriedades protectoras da etilcelulose. A combinação com quitosano e derivados polimetilmetacrilatos produz compósitos mais resistentes à solubilização, mantendo a susceptibilidade enzimática.

Meshali e Gabr (Meshali e Gabr, 1993) estudaram a combinação de pectina e quitosano sob a forma de mistura física, de complexo e cada polímero em separado. O aumento da percentagem dos polímeros nos comprimidos conduziram a uma diminuição da velocidade de libertação do cloridrato de clorpromazina e o melhor perfil foi obtido para a mistura física da pectina e quitosano. Fernández-Hervás e Fell (Fernández-Hervás e Fell, 1998) também conseguiram uma protecção eficaz a pH gástrico.

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foi também utilizada em formulações para administração sublingual de diltiazem, recorrendo-se ainda ao uso da etilcelulose na preparação de comprimidos bicamada (Miyazaki et al., 2000). Os resultados indicaram um aumento significativo da biodisponibilidade do fármaco administrado a coelhos por via sublingual relativamente à via oral. Os estudos *in vitro* mostraram que os comprimidos bicamada com pectina e HPMC numa razão (1:1) proporcionam uma libertação mais sustentada. O revestimento por compressão de uma mistura de pectina e HPMC também foi proposto por Turkoglu e Ugurlu (Turkoglu e T.Ugurlu, 2002). A concentração ideal de HPMC encontrada foi de 20%, a qual proporcionou uma protecção de até 6 horas ao núcleo de fármaco. Na presença das enzimas pectinolíticas a velocidade de libertação foi maior, o que significa que esta combinação de polímeros é adequada à vectorização de fármacos para o cólon.

Semdé e colaboradores (Semdé et al., 2002) estudaram a libertação de indometacina e teofilina de comprimidos preparados por compressão directa de vários complexos de epí-clorohidrina/pectina. Como era de esperar, a solubilidade do fármaco influencia a sua libertação da matriz e, neste caso, a teofilina é libertada mais rapidamente que a indometacina. Verificou-se que, na presença de enzimas, todas as formulações testadas foram rapidamente degradadas com perfis de libertação semelhantes enquanto que, na ausência de enzimas, a libertação de indometacina depende do grau de reticulação do complexo. O aumento da

razão epiclorohidrina/pectina (até 26,1% (m/m)) prolonga a libertação de indometacina, já que a solubilidade da pectina diminui com o aumento do grau de reticulação e, consequentemente, o complexo reduz a penetração do meio de dissolução prevenindo a difusão do fármaco. Quando a razão entre os dois polímeros aumentou para além do valor óptimo verificou-se que as propriedades de hidratação e gelificação da matriz diminuíram, explicando uma libertação mais rápida. Por outro lado, a compressão directa parece não ser o melhor método de preparação dos comprimidos, já que a fraca compressibilidade da pectina pode ter sido o motivo da variabilidade nos tempos de desintegração e de velocidade de erosão. A adição de etilcelulose pode ser utilizada para melhorar a compactibilidade das pectinas (Ahrabi et al., 2000). A granulação a húmido ou a adição de um revestimento entérico (Ahrabi et al., 2000) podem ser úteis, especialmente no caso de fármacos muito hidrossolúveis.

De modo geral, os perfis de libertação de fármacos de sistemas matriciais contendo pectina apresentam uma forma bimodal uma vez que a libertação é controlada por dois fenómenos distintos: a difusão através da rede matricial hidratada e a erosão da matriz. A contribuição do último mecanismo é predominante quando existem ligações de reticulação fracas ou a intumescência é elevada.

### *3.7.5 Revestimento por película*

Uma outra forma de aplicação da pectina é como revestimento hidrofílico insolúvel (tabela 3.4). O revestimento por compressão pode não ser o processo mais adequado para determinadas formas sólidas e, portanto, o revestimento por película surge como alternativa para a preparação de formas de libertação controlada. Devido à sua elevada hidrossolubilidade, em comparação com os polímeros convencionais, a pectina por si só parece não ser apropriada para a obtenção de películas com características de libertação controlada. A combinação com polímeros insolúveis tem sido utilizada para transpor o problema da dissolução da pectina.

Sriamornsak e colaboradores (Sriamornsak et al., 1997b;a) revestiram *pellets* contendo

Tabela 3.4: Utilização da pectina ou derivados nos revestimentos por película.

<b>Fármaco modelo</b>	<b>Referência</b>
Ácido 5-aminosalicílico	(Sriamornsak et al., 2003)
Diclofenac de sódio	(Mitrevej et al., 2001)
Eritrocina	(Hiorth et al., 2003)
Paracetamol	(Ofori-Kwakye et al., 2004; Ofori-Kwakye e Fell, 2003; Hiorth et al., 2003; Ofori- Kwakye e Fell, 2001; Ma- cleod et al., 1999a;b; Wakerly et al., 1997b)
Rádio-marcação	(Macleod et al., 1999c)
Teofilina	(Semdé et al., 2000b;a; Sria- mornsak et al., 1997a;b)

teofilina com um filme de pectinato de cálcio. A eficiência de encapsulação do fármaco diminuiu com a aplicação do filme e com o tempo de revestimento mas a libertação em fluido gástrico foi mais lenta (Sriamornsak et al., 1997b). Além disso, os *pellets* revestidos com pectinato de cálcio apresentam, para uma simulação do tracto gastrointestinal, perfis de libertação que parecem não ser significativamente afectados pelo pH (Sriamornsak et al., 1997a).

Também nos revestimentos por filme as misturas de pectina e quitosano (Mitrevej et al., 2001; Hiorth et al., 2003), polimetacrilatos (Semdé et al., 1998; 2000b;a; Sriamornsak et al., 2003), derivados celulósicos (Wakerly et al., 1996a; 1997b; Macleod et al., 1997; Semdé et al., 1998; 2000b) ou uma combinação de 3 componentes como a pectina/quitosano/HPMC (Macleod et al., 1999b;c;a; Ofori-Kwakye e Fell, 2001; 2003; Ofori-Kwakye et al., 2004) foram utilizadas para melhorar o comportamento de matrizes ou *pel-*

*lets*.

Um filme de pectina/quitosano a 3% foi suficiente para uma libertação controlada de diclofenac de sódio (Mitrevej et al., 2001). A diminuição do grau de acetilação do quitosano, bem como a utilização de pectinas LM não amidadas, facilitam a interação entre os dois polímeros produzindo-se um filme mais resistente às variações de pH (Hiorth et al., 2003).

A adição de polimetacrilatos a pectinas desesterificadas inibiu a libertação nos meios gástrico e intestinal, e só na presença de enzimas o fármaco foi libertado (Sriamornsak et al., 2003). Em simulação das condições colónicas, uma maior concentração de pectina acelerou a libertação do fármaco (Sriamornsak et al., 2003; Semdé et al., 2000a; 1998).

O tipo de derivados da celulose influencia o perfil de libertação (Semdé et al., 2000b) e a quantidade de pectina na mistura deve ser controlada (Macleod et al., 1997; Wakerly et al., 1996a), mantendo-se a susceptibilidade enzimática (Wakerly et al., 1996a; 1997b).

Quando combinada com quitosano e HPMC, formam-se filmes mais estáveis num intervalo de pH maior (Ofori-Kwakye e Fell, 2001). A libertação, do tipo bimodal (Macleod et al., 1999a;b;c; Ofori-Kwakye e Fell, 2001) pode ser controlada por alteração da espessura do filme (Ofori-Kwakye e Fell, 2003) e foi confirmada a degradação deste tipo de revestimento no cólon com ensaios em humanos (Ofori-Kwakye et al., 2004).

### 3.7.6 *Pellets de pectina*

O recurso às formas farmacêuticas multipartícula para administração oral oferece algumas vantagens, nomeadamente, a especificidade de acção e redução dos efeitos adversos locais (Pillay e Fassihi, 1999a). Na tabela 3.5 encontram-se os fármacos já utilizados na preparação de *pellets* de pectina.

Tho e colaboradores (Tho et al., 2001a;b) investigaram a possibilidade de preparar *pellets* de pectina. Foram utilizados três tipos de pectina e diferentes líquidos de granulação na presença e ausência de celulose microcristalina. Do primeiro estudo (Tho et al., 2001a), concluiu-se que um grau de esterificação elevado não é adequado enquanto que a amidação

da pectina apresenta um impacto positivo. A adição de um líquido de granulação contendo etanol produz *pellets* praticamente esféricos, mas mecanicamente menos estáveis. No segundo trabalho (Tho et al., 2001b), foi investigado o efeito da concentração de aditivos (cloreto de cálcio, ácido cítrico, ácido lático, metanol e etanol) no líquido de granulação na forma e, tamanho e estabilidade mecânica dos *pellets*. Posteriormente, foi aperfeiçoada a qualidade da *pelletização*, relativamente à forma e tamanho dos *pellets* (Tho et al., 2002a). Os mesmos autores propuseram ainda a utilização do ácido pectínico como alternativa à celulose microcristalina, já que uma pequena quantidade de ácido pectínico (20%) foi suficiente para a preparação dos *pellets* (Tho et al., 2002b). Além disso, a pH intestinal, ocorre intumescência e desintegração parcial libertando-se cerca de 70% do fármaco modelo, ao contrário do que acontece com a celulose microcristalina.

*Pellets* de alginato de cálcio, pectinato de cálcio e pectinato/alginato de cálcio foram preparados por Pillay e Fassihi (Pillay e Fassihi, 1999a;b) e realizado um estudo comparativo das suas características físico-químicas. Para todas as formulações estudadas, a libertação do fármaco modelo a pH gástrico foi inferior a 5% (Pillay e Fassihi, 1999a). A combinação de uma pectina LM com alginato parece influenciar o grau de reticulação e, conseqüentemente, o comportamento físico e mecânico (Pillay e Fassihi, 1999b).

Joseph e Venkataram (Joseph e Venkataram, 1995) combinaram pectina com gelatina para preparar *pellets* por um método de coacervação. A libertação a pH gástrico foi também negligenciável em todas as formulações apresentadas.

Tabela 3.5: Utilização da pectina sob a forma de *pellets*.

<b>Fármaco modelo</b>	<b>Referência</b>
Ácido acetilsalicílico	(Tho et al., 2002a; 2001a;b)
Diclofenac de sódio	(Pillay e Fassihi, 1999a)
Indometacina	(Joseph e Venkataram, 1995)
Riboflavina	(Tho et al., 2002b)

## Capítulo 4

### MICROENCAPSULAÇÃO POR GELIFICAÇÃO IÓNICA

Tal como foi mencionado no segundo capítulo, uma estratégia importante para aumentar a biodisponibilidade de proteínas e fármacos peptídicos é a utilização de microesferas. De facto, os sistemas micropartícula aumentam a biodisponibilidade de fármacos com características de baixa absorção, proporcionam uma libertação controlada, asseguram a sua estabilidade e reduzem a irritação da mucosa gastrointestinal.

Neste capítulo vamos começar por rever alguns conceitos em microencapsulação e métodos de preparação de micropartículas mais comuns e, seguidamente, descrever mais pormenorizadamente o fenómeno da gelificação iónica<sup>1</sup>.

#### **4.1 Noções gerais**

As micropartículas são definidas na literatura especializada como partículas esféricas e sólidas de origem polimérica que contêm um agente activo. Quanto às suas dimensões, parece não existir ainda um intervalo de tamanhos universalmente aceite. Há autores que as definem como variando entre 50 nm e 2 mm (Kumar, 2000), outros situam-nas entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$  (Arshady, 1990; 1991; Burgess e Hickey, 1994; Murillo et al., 2001) ou ainda de alguns micrómetro a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  (Luzzi, 1970). Por outro lado, a dimensão típica das micropartículas comercialmente disponíveis está entre os 3 e 800  $\mu\text{m}$  (Thies, 1996). Uma vez que o termo micropartícula se refere à ordem do micrómetro, parece-nos que designar por micropartículas as partículas cujo diâmetro se encontra entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$  e por macropartículas as que possuam um tamanho superior a 1000  $\mu\text{m}$  é a definição mais

---

<sup>1</sup>Por vezes aparece também o termo gelificação ionotrópica.

correcta e será essa a utilizada ao longo deste trabalho.

De acordo com as técnicas de fabrico utilizadas e em função da sua morfologia, é possível distinguir duas categorias de micropartículas: *microcápsulas*<sup>2</sup>, partículas esféricas constituídas por um revestimento sólido que contém no seu interior a substância encapsulada, e *microesferas*, partículas esféricas constituídas por uma rede contínua de material suporte, na qual se encontra disperso o princípio activo (Giunchedi e Conte, 1995). As microcápsulas podem ainda ser *polinucleares* ou *mononucleares* se o núcleo se encontrar ou não dividido, e as microesferas consideradas *homogéneas* ou *heterogéneas* se a substância activa estiver dissolvida ou dispersa sob a forma de partículas (Aftabrouhad e Doelker, 1992).

No início da década de 70, a maior parte dos dados disponíveis relativamente à microencapsulação encontrava-se nas patentes. No entanto, neste tipo de literatura não estavam descritos detalhes essenciais para a reprodutibilidade dos métodos utilizados ou os pormenores eram referenciados de forma ambígua. Ainda assim, a informação existente, sob a forma de artigos científicos, patentes e folhetos de apresentação, foi recolhida e exposta por Luzzi (Luzzi, 1970). Até esta altura, as micropartículas eram preparadas por coacervação, separação de fases, polimerização interfacial, métodos electrostáticos, métodos mecânicos e metalização sob vácuo.

Embora seja vastíssimo o número de variações e combinações de métodos, os processos de obtenção de sistemas microencapsulados são classificados por muitos investigadores em mecânicos e químicos ou em mecânicos, físico-químicos e químicos (Murillo et al., 2001). Uma organização diferente, já que os processos ditos mecânicos podem envolver uma reacção química e os processos químicos assentam, por vezes, exclusivamente em fenómenos físicos, foi sugerida por Thies (Thies, 1996). Este autor classifica os métodos de encapsulação em tipo A e tipo B (tabela 4.1). As cápsulas produzidas pelo tipo A, formam-se

---

<sup>2</sup>O conceito de microcápsula surgiu da idealização do modelo celular, no qual a membrana que envolve o citoplasma, organelos e outros componentes exerce simultaneamente outras funções como o controlo de entrada e saída de substâncias da célula.

Tabela 4.1: Classificação dos métodos de encapsulação segundo Thies (Thies, 1996).

<b>Processos de tipo A</b>	<b>Processos de tipo B</b>
Coacervação complexa	Secagem por pulverização (“Spray-drying”)
Incompatibilidade polímero-polímero	“Spray-chilling”
Polimerização interfacial em meio líquido	Leito fluidizado
Polimerização <i>in situ</i>	Extrusão centrífuga
“In-liquid drying”	Separação por rotação em disco (“Spinning disk”) ou suspensão rotacional
Gelificação térmica ou iónica em meio líquido	Polimerização líquido-gás ou em interface líquida-gasosa
Desolvatação em meio líquido	Extrusão por pressão ou pulverização para um banho de extracção com solvente

inteiramente num banho líquido sob agitação ou num reactor tubular. As que são fabricadas pelo tipo B usam uma fase gasosa em determinada etapa da encapsulação: através da pulverização de um material de revestimento sobre a substância a encapsular, solidificação de gotículas líquidas pulverizadas para uma fase gasosa, gelificação de gotículas pulverizadas para um banho líquido ou reacções de polimerização numa interface sólida-gasosa.

Nos últimos anos as técnicas mais desenvolvidas foram a extrusão (ver secção seguinte), encapsulação em lipossomas, a separação por rotação em disco, o leito fluidizado e a secagem por pulverização (Gouin, 2004).

A encapsulação em lipossomas tem sido especialmente utilizada para aplicações farmacêuticas. Por exemplo, na administração de agentes de contraste para a detecção de tumores ou na estabilização de nutrientes da pele em produtos cosméticos e, ultimamente, na indústria alimentar. Entretanto, no processo de formação dos lipossomas já não é necessário recorrer à sonicação e a solventes orgânicos, e é possível uma produção de microcápsulas

em larga escala. A principal vantagem, relativamente a outros métodos de microencapsulação, é a estabilidade e protecção da substância encapsulada quando as partículas são re-hidratadas. Uma outra propriedade importante dos lipossomas é a sua capacidade de se ligarem a um alvo específico.

A separação por rotação em disco consiste na preparação de uma suspensão de partículas núcleo na solução de revestimento que passará por um disco em rotação, em condições que permitam a formação de uma película de revestimento muito fina. A atomização da suspensão à saída dos orifícios do disco possibilita a constituição de micropartículas revestidas. Esta técnica proporciona melhores rendimentos de produção a um custo semelhante relativamente aos métodos tradicionais, e o equipamento utilizado é simples e pode ser instalado em qualquer dispositivo de pulverização.

A microencapsulação realizada através do leito fluidizado é uma forma eficiente de aplicar uma camada uniforme de revestimento (polissacarídeos, proteínas, agentes emulsivos, gorduras, materiais entéricos) a partículas sólidas. A vantagem deste método é o facto de não se adicionarem solventes ao revestimento, o que diminui o tempo de processamento. Os recursos energéticos são também reduzidos já que se elimina o processo de evaporação.

A tecnologia de secagem por pulverização está bem definida e é relativamente pouco dispendiosa. Uma das limitações desta técnica é o número restrito de materiais que podem ser utilizados. Por exemplo, na indústria alimentar, os processos são realizados em meios aquosos e, por isso, o material encapsulante tem de ser solúvel em água.

Uma vez que estamos particularmente interessados na microencapsulação por gelificação iónica, sugerimos ao leitor que pretenda informação adicional sobre métodos de microencapsulação a consulta de revisões mais completas sobre esta matéria (ver, por exemplo, as referências (Burgess e Hickey, 1994; Thies, 1996; Lachman et al., 2001; Silva et al., 2003; Gouin, 2004)).

O método de microencapsulação que apresentamos neste trabalho designa-se por *emulsificação/gelificação interna*. Isto é, a emulsificação é a técnica através da qual se formam as gotículas e a gelificação (iónica, no nosso caso) refere-se ao tipo de solidificação da mi-

cropartícula entretanto constituída. Conforme a fonte do agente gelificante, ou seja, se vem de fora da gotícula ou se já se encontra disperso na solução polimérica juntamente com o princípio activo, a gelificação diz-se *externa* ou *interna* respectivamente.

#### **4.2 Emulsificação versus extrusão**

O método convencional, e até hoje o mais explorado, para a preparação de macropartículas de pectina designa-se por *extrusão*. Nesta técnica, a mistura do material encapsulante e substância activa é forçada a passar por um orifício de dimensão pré-determinada, formando-se gotas. Estas gotas caem dentro de uma solução de cloreto de cálcio e gelificam através da interacção entre o polissacarídeo e os iões cálcio.

Macropartículas de alginato preparadas pelo método de extrusão/gelificação têm sido extensivamente estudadas devido à facilidade de preparação, às condições suaves em que todo o processo decorre e ao facto de, em princípio, se poder encapsular qualquer tipo de substância. A principal vantagem da extrusão/gelificação, especialmente na encapsulação de óleos aromáticos, é o elevado período de armazenamento que pode atingir - até 5 anos, uma vez que a matriz hidrofílica constitui uma barreira praticamente impermeável e, portanto, os gases da atmosfera difundem-se muito lentamente através dela.

Consoante o polímero utilizado, a solidificação das gotas também pode ocorrer por reticulação química (através da formação de uma membrana polimérica interfacial entre polielectrólitos de cargas opostas) ou por meio de uma gelificação térmica.

Apesar de o método de extrusão/gelificação proporcionar o fabrico de macrocápsulas uniformes e de boa qualidade, a diminuição do tamanho facilita a troca de substâncias entre o interior das macrocápsulas e o meio circundante, aumenta as actividades de fermentação (no caso da encapsulação de células) e minimiza a sua ruptura. No entanto, o diâmetro da agulha usada nesses dispositivos limita a dimensão das macrocápsulas a cerca de 1 mm (Poncelet et al., 1992). Tentativas de redução de tamanho incluíram a aplicação de jactos de ar nas agulhas (Miyawaki et al., 1980), agulhas vibratórias (Hulst et al., 1985) ou

impulsos electrostáticos (Hommel et al., 1988) ao fluxo da solução mas, apesar das vantagens relativamente às velocidades de processamento e reproductibilidade, nenhuma destas opções teve grande adesão.

Por outro lado, a maior limitação da extrusão é que parece não ser adequada para a produção à escala industrial (Poncelet et al., 1992). O número necessário de agulhas para manter um fluxo constante é inversamente proporcional ao volume da macroesfera, o que significa que para uma redução de, por exemplo, 5 vezes no tamanho das macroesferas seriam necessárias milhares de agulhas para que a produção fosse equivalente (Dabora, 1967). Além disso, o risco de entupimento das agulhas é elevado.

É neste contexto que surgem as primeiras utilizações de técnicas de emulsificação com polissacarídeos. Inicialmente, também estas alternativas eram relativamente agressivas. Uma adaptação consistia em adicionar uma emulsão de uma solução quente de carragenano em óleo a água fria (Lacroix et al., 1990). Uma outra envolvia a adição de uma emulsão óleo-em-água (a fase aquosa constituída por uma solução de ácido algínico) a uma solução de cloreto de cálcio (Lim e Sun, 1980) para encapsulação das gotículas de óleo. Esta última, apesar de não envolver temperaturas elevadas, tinha a desvantagem de tanto a solução de polissacarídeo como a solução de cálcio serem insolúveis na fase oleosa.

Um trabalho realizado por Fundueanu e colaboradores (Fundueanu et al., 1999), com estudos de estabilidade, porosidade, re-hidratação e intumescimento, mostrou que as microesferas de alginato de cálcio preparadas por emulsificação seguida da gelificação do polímero têm poros com dimensões inferiores comparativamente às preparadas por extrusão. Esta conclusão foi atribuída à elevada concentração de polímero em solução e ao processo de secagem que proporcionavam a formação uma estrutura compacta.

A estabilidade dos fármacos, especialmente para os fármacos peptídicos ou proteínas, continua porém a ser uma questão extremamente importante. A maior parte das técnicas de emulsificação continuam a envolver exposição a solventes orgânicos, à sonicação ou a forças mecânicas durante a preparação das microesferas. Todo este tipo de perturbações pode ser prejudicial à estrutura proteica bem como à actividade biológica da substância

activa.

Neste trabalho, para a fase de emulsificação, escolhemos um óleo mineral como fase oleosa e um agente emulsivo lipofílico empregue na indústria cosmética e em produtos alimentares, cuja segurança foi já confirmada. Para a dispersão da fase interna foi utilizado um agitador mecânico e aplicada uma velocidade moderada. Deste modo, pudemos eliminar a presença de solventes orgânicos e garantir o mínimo de perturbações exteriores.

#### *4.2.1 Isolamento das microesferas*

Quando o método de encapsulação utiliza a técnica de extrusão, o isolamento é geralmente realizado por filtração e lavagem com água destilada.

No que diz respeito à emulsificação, o isolamento das microesferas da fase oleosa é uma etapa muito importante. Neste caso, as microesferas são separadas através da adição de uma solução aquosa que perturba o equilíbrio do sistema emulsivo dando origem a um sistema óleo-em-água. Este fenómeno de inversão de fases é favorável à migração das microesferas produzidas da fase oleosa para a fase aquosa. Factores como o volume da solução aquosa adicionada e o tempo de separação (isto é, o tempo de contacto entre a emulsão e a fase aquosa adicionada) podem limitar o desenvolvimento do processo. Se o volume da fase aquosa e o tempo de separação forem excessivos pode formar-se uma nova emulsão óleo-em-água estável, da qual a extracção das microesferas é praticamente impossível (Poncelet et al., 1999).

### **4.3 Gelificação iónica**

Os primeiros métodos de encapsulação envolviam a utilização de solventes orgânicos ou reagentes incompatíveis com potenciais encapsulados biológicos e/ou aquecimento durante o processo. Quando começaram a usar-se proteínas e polissacarídeos que possuíam propriedades de formar geles, desenvolveram-se técnicas de imobilização que se pretendiam biocompatíveis. De qualquer forma, os procedimentos mais comuns consistiam no

aquecimento a temperaturas entre 40 e 60°C do gel até se atingir a sua liquefacção, adição do agente imobilizante e, seguidamente, solidificação por arrefecimento. Naturalmente que o recurso a temperaturas relativamente elevadas era incompatível com substâncias termicamente lábeis e foi necessário o desenvolvimento de métodos de imobilização mais simples e suaves (Poncelet et al., 1992).

No início dos anos 80, Lim e Moss (Lim e Moss, 1981) descreveram a preparação de microcápsulas semipermeáveis em meios inteiramente aquosos contendo células hepáticas e ilhotas pancreáticas. As gotículas foram produzidas por extrusão de uma solução de alginato de sódio, na qual foram previamente dispersas as células, através de uma ponta de capilar para o interior de uma solução de cloreto de cálcio. Ao entrarem em contacto com esta solução, as gotículas gelificam imediatamente formando microcápsulas consistentes. Posteriormente, as microcápsulas foram endurecidas numa solução de polilisina, constituindo-se uma membrana permanente e semi-permeável. O alginato no interior foi depois dissolvido com uma solução isotónica de citrato de sódio, de forma a simular-se o ambiente celular, e as microcápsulas foram transferidas para um meio de cultura. Os autores verificaram que as células encapsuladas cresceram e multiplicaram-se e que, durante dois meses, as células pancreáticas libertaram insulina e permaneceram sensíveis à estimulação com glicose e teofilina, respondendo com um padrão típico de libertação de insulina. Este novo método de encapsulação veio, pois, contribuir para o progresso na área da microencapsulação.

Como foi já discutido no capítulo 3, e de forma semelhante ao alginato, também a pectina pode estabelecer ligações com catiões bivalentes formando geles resistentes e, por isso, o método de microencapsulação por gelificação interessou-nos particularmente. A gelificação iónica consiste, portanto, na formação de um hidrogel através da reacção de um electrólito com um outro polielectrólito que contenha grupos de carga oposta.

Embora o processo de gelificação e a sua natureza aparentemente estocástica sejam fenómenos complexos, as macro e microesferas são construções macromoleculares bem estruturadas. Por um lado, o arranjo das moléculas durante a fase de gelificação induz a

construção de barreiras e passagens preferenciais que orientam e facilitam, ou dificultam, a difusão do material encapsulado. Por outro, no caso da encapsulação de células, as restrições mecânicas e químicas impostas pelas células encapsuladas induzem toda a estrutura a procurar um equilíbrio dinâmico das interações físico-químicas entre as células e a matriz polimérica. Mesmo que os biopolímeros usados para a encapsulação possuam unidades monoméricas repetitivas, cada uma delas pode adoptar diferentes configurações tridimensionais durante a gelificação, sendo este um dos factores responsáveis pelas propriedades do gel (Bienaimé et al., 2003).

#### *4.3.1 Gelificação externa*

Se o agente gelificante for um sal de cálcio (como geralmente acontece no caso da pectina), a fonte de iões cálcio é externa quando se utiliza para a gelificação um banho de cloreto de cálcio ou interna quando se usa um sal insolúvel de cálcio que é adicionado à solução de polímero/fármaco.

Em 2000, Hills e colaboradores (Hills et al., 2000) usaram técnicas de RMN, difusão e microimagem para explorar, de forma não-invasiva, a estrutura interna de macroesferas de alginato de cálcio. Apesar das fortes evidências da existência de microestruturas em geles de alginato de cálcio, os factores que as determinam ainda não estão completamente esclarecidos.

Mais recentemente, Bienaimé e colaboradores (Bienaimé et al., 2003) investigaram o tipo de estrutura matricial de macroesferas de alginato de cálcio preparadas por extrusão/gelificação externa. Para o efeito foram utilizados corantes (como o calcicromo, o ácido calconcarboxílico, a murexida e o azul de metileno) com afinidade específica para os diferentes constituintes da matriz, mostrando as características específicas da estrutura interna. A figura 4.1 representa uma ilustração do que os autores pensam ser a estrutura do interior de uma macroesfera de alginato de cálcio. O estudo permitiu visualizar, através do padrão de colorações obtido, a variedade de interações químicas que ocorrem durante e após a gelificação. A disposição do polissacarídeo é diferente na camada periférica e no

núcleo da macroesfera e a distribuição dos íons cálcio no interior da macroesfera está longe de ser homogénea.

Embora o estudo se refira a macropartículas de alginato de cálcio, as semelhanças deste polímero com a pectina, relativamente ao processo de gelificação, justificam a introdução das secções seguintes.

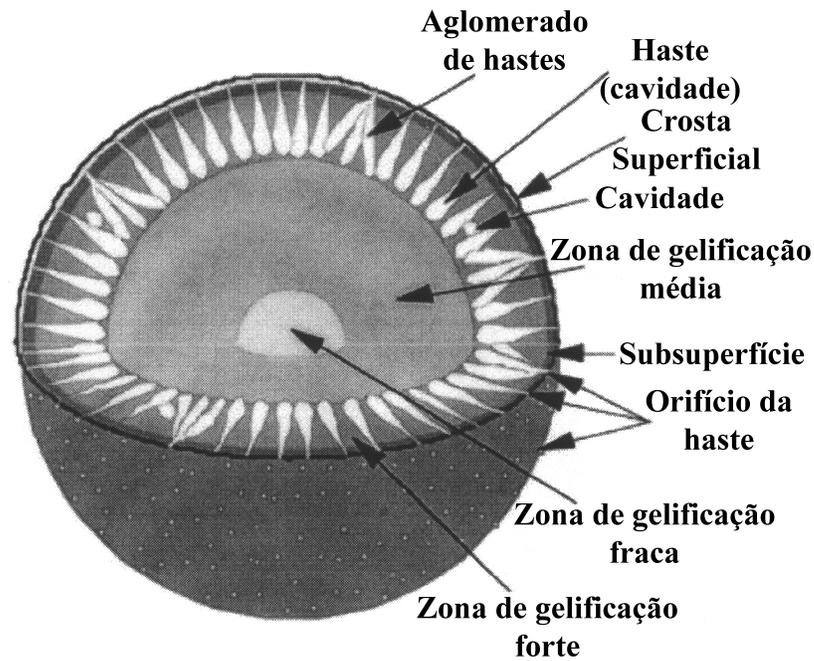


Figura 4.1: Esquema proposto para a estrutura interna de macroesferas de alginato de cálcio preparadas por um método de extrusão/gelificação externa, onde se podem ver as diferentes microtexturas (adaptado de (Bienaimé et al., 2003)).

#### *Distribuição e variação da densidade do polímero na macroesfera*

O azul de metileno, que tem carga positiva, interage com os grupos carboxílicos do alginato e forma um complexo corado. Portanto, a intensidade da coloração permite a visualização das regiões onde o polímero está mais concentrado. Os resultados obtidos com este corante mostraram que o alginato se encontra mais localizado à superfície das

macroesferas.

A variação da densidade do alginato foi determinada misturando-se este polímero com partículas esféricas SEPHADEX®G10 E G25 e partículas amorfas (fibras celulósicas). Observações sob radiação ultravioleta e a existência de fragmentos das esferas junto à superfície indicam que durante a gelificação as partículas migram (devido ao movimento do alginato) para a periferia e que, nessa zona, as restrições mecânicas podem ser significativamente fortes.

#### *Distribuição dos iões de cálcio na macroesfera*

A utilização do calcicromo mostra a heterogeneidade das macroesferas de alginato de cálcio. Quando uma macroesfera inteira ou uma fracção é introduzida numa solução de corante, este interage com os iões cálcio da matriz revelando a sua estrutura. Como a intensidade da coloração depende da concentração daqueles catiões, variando este parâmetro podem detectar-se diferentes intensidades (ver figura 4.2). Facilmente se observam a crosta superficial, uma subsuperfície e zonas de gelificação forte, média e fraca. Além disso, existe uma linha de separação evidente entre a zona de gelificação média e a zona de gelificação fraca para baixas concentrações de polímero, mas quando esta concentração aumenta a separação entre as duas zonas torna-se difusa.

A complexação entre iões cálcio e o ácido calconcarboxílico produz uma coloração azul avermelhada, cuja intensidade é também proporcional à quantidade de cálcio presente. Os autores observaram uma cor intensa localizada exclusivamente na periferia da macroesfera (principalmente na crosta superficial) e verificaram que microestruturas como as cavidades e as hastes, em aglomerados ou individualmente, eram desprovidas de cor. Este corante permitiu ainda apurar que a concentração de iões cálcio diminui progressivamente da superfície para o centro da macroesfera. Quanto maior as concentrações de alginato e de cálcio, mais intensa é a coloração nas macroesferas e maiores as diferenças entre a superfície e o núcleo. Além disso, a heterogeneidade aumenta para uma maior concentração de cálcio e para uma menor concentração de polímero.

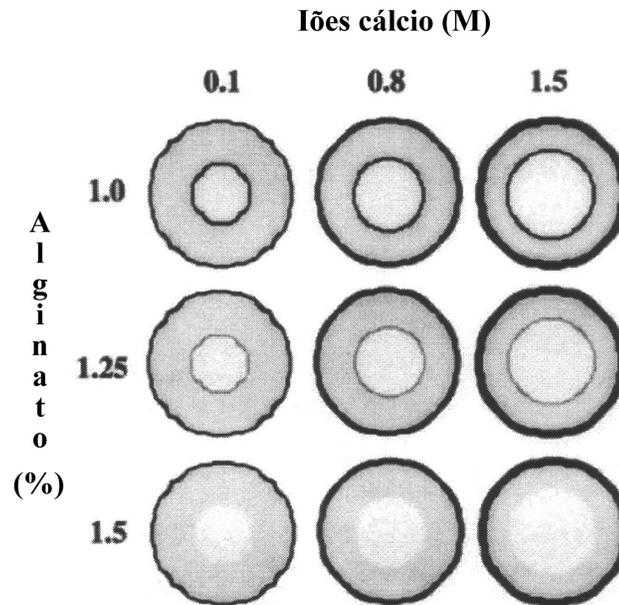


Figura 4.2: Esquema do corte de macroeferas de alginato de cálcio, após exposição ao calcicromo, que mostra a espessura da crosta superficial e a profundidade da zona de gelificação intermédia (adaptado de (Bienaimé et al., 2003)).

#### *Velocidade de difusão do cálcio*

Para distinguir a difusão dos íons cálcio no sentido do núcleo durante a formação da rede polimérica os autores usaram a murexida (esta molécula forma um complexo de cor laranja com o cálcio). Os resultados mostraram que a maior velocidade de difusão se verifica quando a concentração de alginato é menor e a concentração de cálcio é maior. De facto, a gelificação do alginato ocorre através de uma reacção por difusão, na qual os dois reagentes se difundem um em direcção ao outro formando uma estrutura estável. Portanto, estes resultados podem ser explicados pelo facto de uma menor concentração de alginato permitir a difusão rápida de uma grande quantidade de íons cálcio. Opostamente, uma elevada concentração de alginato atrasa a difusão de uma pequena quantidade de íons cálcio. Na figura 4.3 encontra-se uma representação esquemática da organização do polímero durante a gelificação. Se a camada de polímero  $d_1$  for pouco espessa a velocidade de difusão

é rápida, mas diminui prontamente com o aumento da barreira polimérica (representada por  $d_1$ ,  $d_2$  e  $d_3$ ). As cavidades vão-se formando quando ocorrem contracções e enfraquecimentos da crosta superficial.

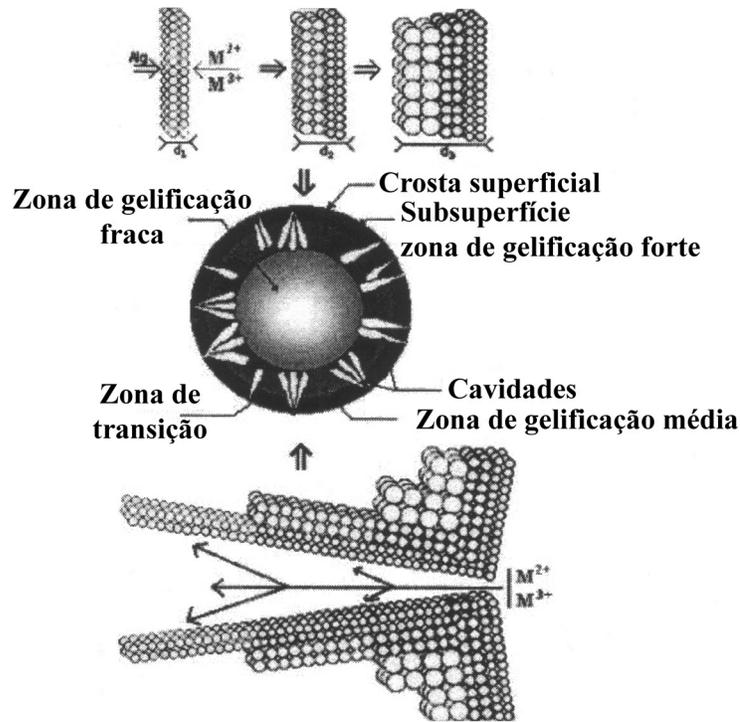


Figura 4.3: Constituição da barreira polimérica durante a gelificação e formação de cavidades (adaptado de (Bienaimé et al., 2003)).  $M^{2+}$  e  $M^{3+}$  representam, genericamente, os cátions bi- e trivalentes.

#### *Mecanismo da gelificação externa*

Os fenómenos acima referidos sugerem, pois, que ocorrem de forma gradual e em simultâneo diversos processos durante a gelificação. Primeiramente, a formação de uma crosta superficial que actua como uma protecção periférica que vai comprimindo progressivamente a macroesfera e constitui um obstáculo à difusão dos íons cálcio no interior das macroesferas. Verifica-se também uma redução de volume da macroesfera com perda de

moléculas de água, que resulta da reticulação do alginato com o cálcio. Por outro lado, as moléculas de alginato que não reajam imediatamente com o cálcio movem-se progressivamente do núcleo para a superfície, atraídas pela acumulação de íons cálcio naquela interface, e por isso a densidade de matéria nessa região é maior. Finalmente, todos esses fenômenos produzem uma sucessão de processos ocasionando a formação de diferentes microestruturas (microfracturas, hastes simples e aglomerados, cavidades) que caracterizam a estrutura heterogênea. A figura 4.4 mostra a formação de uma cavidade em forma de haste, em que  $P_g$  representa a força envolvida na formação da rede de alginato de cálcio e que limita a entrada dos íons cálcio e  $P_0$  representa a força envolvida na penetração destes íons na gota de alginato. Naturalmente que este tipo de microestrutura só se forma quando  $P_0 > P_g$ .

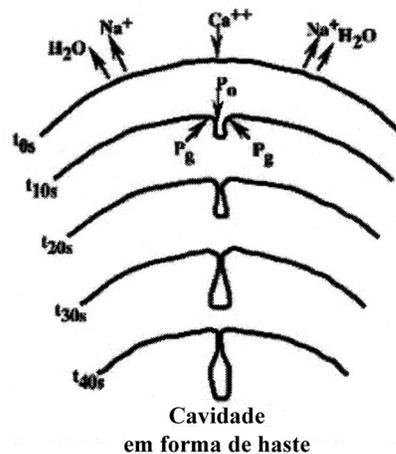


Figura 4.4: Esquema que representa a formação de uma cavidade em forma de haste (adaptado de (Bienaimé et al., 2003)). Note-se a troca iônica entre íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e a perda de moléculas de água que conduz à redução de volume da macroesfera.

A heterogeneidade da estrutura interna é acentuada se as concentrações das soluções de cálcio e alginato variarem mas, apesar da variedade de microestruturas internas, as macroesferas são altamente reproduzíveis.

O método de gelificação externa também pode ser combinado com uma técnica de emulsificação. Neste caso a solução de cloreto de cálcio é adicionada na fase final da encapsulação, o que de alguma forma provoca uma perturbação do equilíbrio do sistema (Chan et al., 2002). Ao contrário da extrusão, nesta variante da técnica o contacto entre as gotículas da solução de polímero/fármaco e a solução de cloreto de cálcio não é imediato: o início da reticulação entre o polímero e os iões cálcio depende da probabilidade de colisão entre os dois tipos de gotículas (Heng et al., 2003). As microcápsulas tendem a agregar-se antes de endurecerem completamente e o tamanho é difícil de controlar (Poncelet et al., 1992). É necessário ainda controlar o volume da solução de cloreto de cálcio para prevenir uma desestabilização da emulsão e a formação de agregados poliméricos irregulares. Além disso, para que as microcápsulas resultem suficientemente sólidas require-se um excesso de sal de cálcio (Chan et al., 2002) em relação à quantidade de polímero utilizada. Um outro aspecto a ter em consideração é a concentração da solução de cálcio: a adição de uma mesma quantidade de cálcio na forma de solução diluída dá origem à formação de microesferas irregulares (Fundueanu et al., 1998).

#### *4.3.2 Gelificação interna*

Pelaez e Karel (Pelaez e Karel, 1981) propuseram uma alternativa à gelificação externa, que consistia na dispersão de um sal de cálcio na solução polimérica (de alginato de sódio) e libertação lenta dos iões de cálcio via quebra espontânea de gluconolactona. À medida que esta se vai degradando, o meio torna-se mais ácido e provoca a libertação dos iões cálcio que ficam assim disponíveis para reagirem com o alginato.

Lencki e colaboradores (Lencki et al., 1989) sugerem a utilização de citrato de cálcio/citrato de sódio como fonte interna dos catiões reticulantes. Neste caso, a acidificação do meio seria conseguida por adição de um ácido miscível (ácido acético) com a fase oleosa. Baseando-se nesta proposta, Poncelet e colaboradores (Poncelet et al., 1992) prepararam microesferas de alginato por emulsificação/gelificação interna e estudaram o efeito das características do alginato e da configuração do dispositivo.

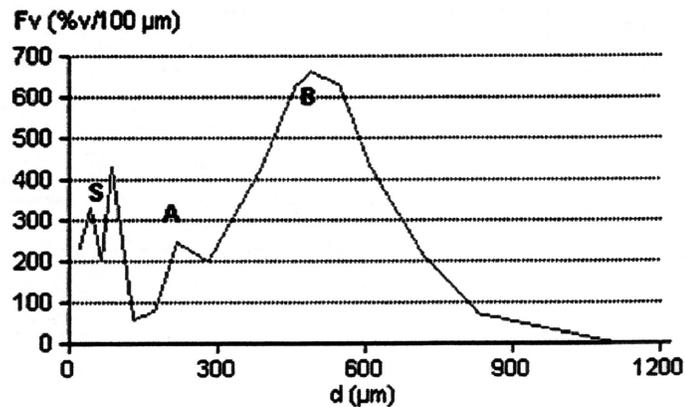


Figura 4.5: Granulometria típica obtida para microesferas de alginato de cálcio preparadas por emulsificação/gelificação interna (adaptado de (Poncelet, 2001))

A granulometria típica consistia em dois picos principais, um pico A com representação de 25% e um pico B representando cerca de 65 a 95% do volume total (ver figura 4.5). Verificou-se ainda a existência de vários picos satélite (S) com um baixo índice de representatividade.

A selecção de um vector de cálcio adequado para o método de gelificação interna depende do intervalo de pH que se pretende. Por exemplo, os valores de pH neutros são apropriados para a imobilização de células, mas se o trabalho for realizado com culturas que tolerem bem ambientes mais ácidos o pH pode ser inicialmente mais baixo. Por outro lado, para o intervalo de pH desejado, a libertação dos iões cálcio deve ocorrer lentamente no início da acidificação e depois, à medida que o meio vai ficando mais ácido, a libertação dos catiões deve ser mais rápida (Poncelet et al., 1999).

## Capítulo 5

# MATERIAIS E MÉTODOS

### ***5.1 Matérias primas***

- Polímero encapsulante

Pectina LM (GRINDSTED pectin LA 410) - Danisco (Grindsted, Dinamarca)

A informação da percentagem de grupos metoxilo e amida não foi disponibilizada pelo fornecedor mas esta referência tem, tipicamente, um DE de 33% e DA de 14%.

Pectina HM (GRINDSTED pectin MRS 351) - Danisco (Grindsted, Dinamarca)

A informação da percentagem de grupos metoxilo não foi disponibilizada pelo fornecedor mas o DE de uma pectina HM com esta referência varia tipicamente entre 58 e 75%.

- Fármaco modelo

Albumina sérica bovina liofilizada (fracção V) - Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA)

- Fase oleosa

Parafina líquida (viscosidade  $_{20^{\circ}\text{C}} = 222,1 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ ) - Vaz Pereira (Lisboa, Portugal)

- Agente emulsivo

Monooleato de sorbitano (Span®80) - Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suíça)

- Agente reticulante

Carbonato de cálcio - Omya (Orgon, França)

- Polímero de revestimento

Quitosano de baixo peso molecular (150KDa) - Fluka Biochemika (Steinheim, Alemanha)

- Adjuvantes

Tripolifosfato de sódio - Riedel-deHAËN (Seelze, Alemanha)

Os outros reagentes utilizados são de grau analítico e as soluções aquosas foram preparadas com água desmineralizada.

## **5.2 Preparação das microesferas**

Para a preparação das microesferas utilizámos o método descrito por Poncelet e colaboradores (Poncelet et al., 1992; 1995) adaptado ao polímero que escolhemos. As diferentes variáveis estudadas estão organizadas nas tabelas 5.1 e 5.2 e a selecção dos parâmetros de processo fixos será justificada no capítulo seguinte.

### **5.2.1 Configuração do reactor**

Num trabalho de Poncelet e colaboradores (Poncelet et al., 1992) onde se pretendia estudar a influência do tipo de hélices (turbina de seis lâminas, lâmina dupla achatada de rede e hélice marinha) e da configuração do reactor na distribuição de tamanhos das microesferas, os autores concluíram que a dispersão dos picos não era significativamente afectada. Todavia, o diâmetro médio e os rendimentos sofriam alterações significativas. Isto foi justificado pelo facto de terem verificado que durante o desenvolvimento da dispersão a solução de polissacarídeo tendia a acumular-se em determinadas zonas do reactor. A solução encontrada foi adoptar uma configuração que evite a existência de cantos no reactor.

Quanto às hélices utilizadas naquele estudo, a lâmina de rede produziu uma emulsão mais homogênea e, conseqüentemente, microesferas com menor tamanho. No entanto, os rendimentos foram baixos devido à adesão do polímero à lâmina.

Tendo em conta estes resultados, a etapa de emulsificação do método que aqui apresentamos foi conduzida num reactor cilíndrico de fundo redondo usando uma hélice marinha de três lâminas (ver figura 5.2.1).

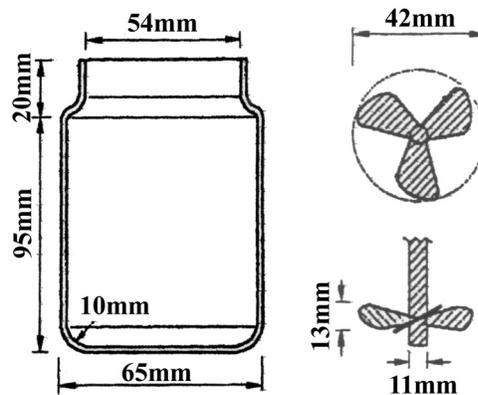


Figura 5.1: Reactor cilíndrico de fundo redondo e hélice marinha de três lâminas.

### 5.2.2 Preparação da solução de pectina/BSA

A uma solução de BSA em tampão NaOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (USP XXV, pH 8,0) adicionou-se a pectina recorrendo à agitação magnética até dissolução completa. Após esta dissolução, mediu-se o pH (MultiCal®, Weilheim, Alemanha) e deixou-se em repouso para eliminação de bolhas de ar.

### 5.2.3 Emulsificação/gelificação interna

A 50mL de parafina foi adicionado Span®80 a 1% (v/v) e agitou-se a 200rpm recorrendo a um agitador Ika-Eurostar (Staufen, Alemanha) provido de uma hélice marinha durante 15 minutos (fase *a* da figura 5.2). Preparou-se uma suspensão de carbonato de

cálcio a 5% (m/v) e adicionou-se à solução de pectina/BSA o volume necessário para uma relação de 6,64% (m/m) ( $\text{Ca}^{2+}$ /pectina). Esta mistura foi homogeneizada e adicionada à fase oleosa (fase *b* da figura 5.2). Após 15 minutos de emulsificação adicionaram-se lentamente, durante 60 minutos, 20 mL de parafina contendo ácido acético glacial (fase *c* da figura 5.2). A relação molar entre este e o  $\text{Ca}^{2+}$  foi de 7,4. Nesta etapa a velocidade de agitação foi ajustada a 400 rpm. Após o período de gelificação, a velocidade de agitação foi reduzida para 200 rpm e as microesferas foram separadas através da adição de uma solução tampão acetato (USP XXV, pH 4,5) à emulsão (fase *d* da figura 5.2).

#### 5.2.4 Revestimento

As soluções de quitosano foram preparadas através da dissolução do quitosano numa solução de ácido acético a 1% (v/v) de modo a se obterem as concentrações pretendidas (tabela 5.2). O pH da solução foi ajustado a 6,2 com uma solução de NaOH a 4M e filtrou-se, para eliminar os resíduos não solubilizados, com filtros de papel (Whatman GD1). Juntaram-se 30 mL da solução de quitosano a um volume igual de parafina e deixou-se com agitação magnética a 1100 rpm durante 1h30. Esta mistura foi adicionada à emulsão no final da gelificação (fase *c* da figura 5.2) e reagiu com as microesferas durante 30 minutos sob uma velocidade de agitação de 400 rpm. As fases foram finalmente separadas com uma solução tampão acetato (USP XXV, pH 4,5).

Quando se utilizou o tripolifosfato de sódio como adjuvante, dissolveu-se primeiramente a BSA em solução tampão NaOH/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (USP XXV, pH 8,0), adicionou-se a quantidade de adjuvante necessária para se obter uma concentração de 2% (m/v) e, depois de estar completamente dissolvido, juntou-se a pectina. O lote foi seguidamente preparado segundo os procedimentos descritos.

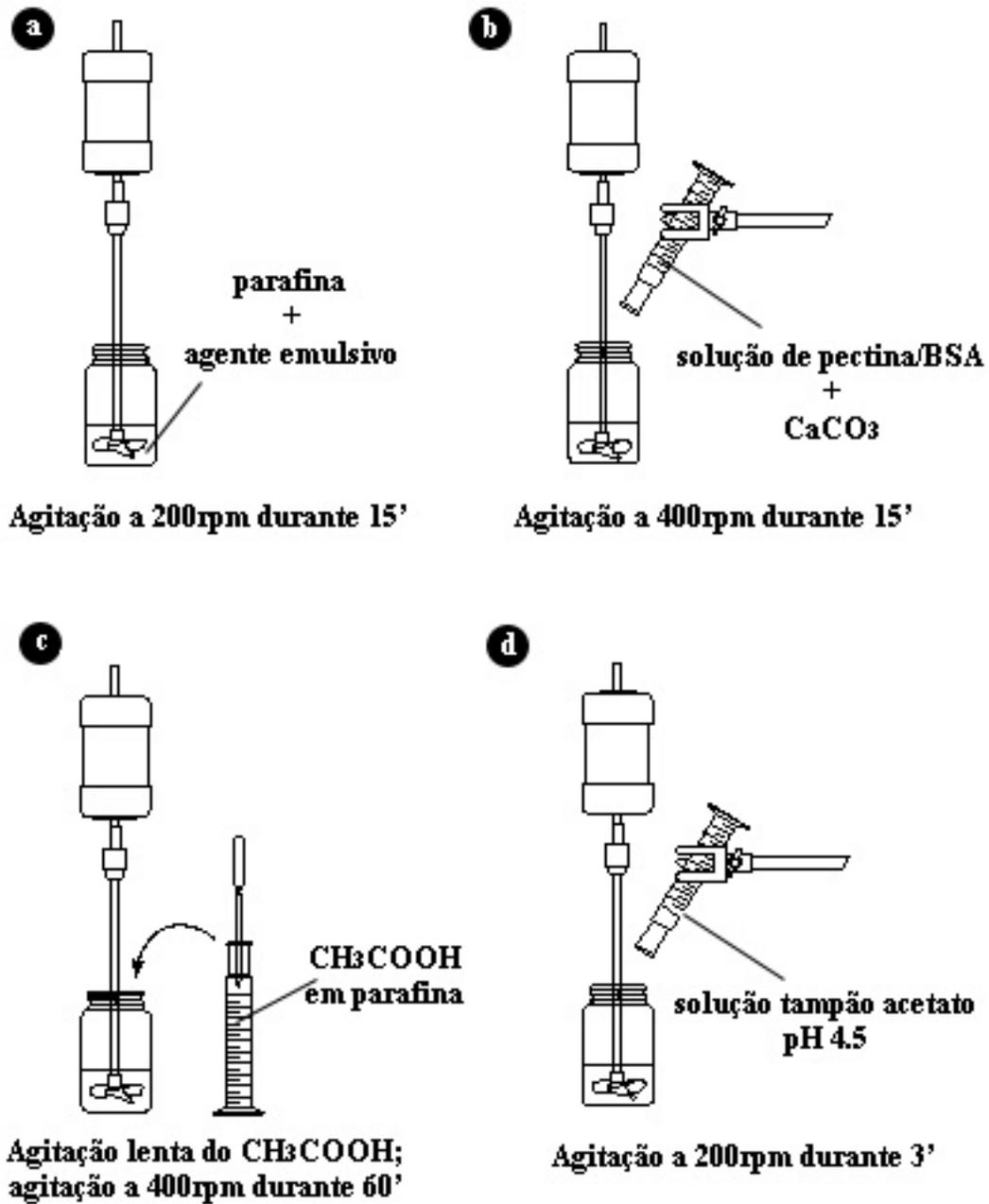


Figura 5.2: Esquema da preparação das microesferas de pectina contendo BSA.

### 5.2.5 Lavagem e isolamento

Para se proceder ao isolamento, centrifugou-se a emulsão obtida a 3000rpm durante 10 minutos. Obtiveram-se três fases, a aquosa que contém as microesferas depositadas, a oleosa límpida que é rejeitada e uma fase emulsificada que se recolhe por aspiração. A esta última adicionaram-se 25 mL de solução tampão acetato, centrifugou-se novamente à mesma velocidade durante 10 minutos, aspirou-se o óleo e separou-se a fase aquosa. Este passo foi repetido até não se detectar a deposição de microesferas na fase aquosa. Juntaram-se todas as fases aquosas no mesmo copo e deixou-se em repouso. Após deposição das microesferas, a solução sobrenadante foi aspirada e substituída por solução nova. O processo de lavagem repetiu-se até não ser detectado óleo na observação microscópica. As microesferas hidratadas foram suspensas na solução de lavagem a uma temperatura entre 0 e 6°C.

Nas tabelas 5.1 e 5.2 encontram-se os parâmetros de processo e formulação estudados neste trabalho.

### 5.2.6 Secagem

A liofilização é um método de secagem muito utilizado para aumentar a estabilidade de fármacos lábeis durante a produção ou armazenamento a longo prazo. Além da vantagem de uma melhor estabilidade, as formulações liofilizadas também são mais fáceis de manusear (Tang e Pikal, 2004). As microesferas hidratadas foram, pois, distribuídas por recipientes de forma a que o congelamento a  $-40^{\circ}\text{C}$ , em banho de etanol (Benchtop shell freezer, Freezone® model 79490, Labconco, EUA) a 96%, se processasse rápida e uniformemente. A liofilização (Lyoh-loch 6, Labconco, EUA) foi realizada a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

Tabela 5.1: Parâmetros de processo estudados.

Variável	Valores estudados
pH da solução de pectina/BSA	7,4
	7,8
	8,0
Dispersão do CaCO <sub>3</sub>	agitação manual
	sonicação
Concentração do agente emulsivo [% (v/v)]	0,0
	0,5
	1,0
Relação de fases [(v/v)]	30/70
	40/60
	50/50
Velocidade de agitação [rpm]	400
	600
	800
Tipo de isolamento	deposição
	centrifugação

Tabela 5.2: Parâmetros de formulação estudados.

<b>Variável</b>	<b>Valores estudados</b>
Tipo de pectina	pectina LM pectina HM
Concentração de pectina [% (m/v)]	3 4 5
Proporção pectina/BSA [(m/m)]	2 : 1 3 : 1 4 : 1
Concentração da solução de revestimento [% (m/v)]	0,0 0,3 0,5 1,0
Presença de emulsificante na solução de revestimento [mL]	0,0 1,0
Presença de adjuvante [% (m/v)]	0,0 2 2 + revestimento [0,3% (m/v)]

### 5.3 Caracterização das microesferas

#### 5.3.1 Avaliação morfológica

A morfologia das microesferas foi avaliada por microscopia óptica (Olympus BH2-UMA, Tokio, Japan). As imagens foram projectadas num monitor ligado a uma câmara de vídeo (Cue-2, Olympus, Tokio, Japan). Registos digitais das microesferas isoladas foram realizados com uma máquina fotográfica digital Sony (MVC-CD 400, Japão).

#### 5.3.2 Granulometria

O tamanho das microesferas e distribuições de volume foram determinados através da técnica de difractometria laser (modelo Fraunhofer) usando um Coulter LS130, num intervalo de tamanhos de 0,1 a 1000  $\mu\text{m}$ . O meio de suspensão utilizado para a análise granulométrica foi a solução de lavagem das microesferas.

### 5.4 Determinação da eficiência de encapsulação

Para a determinação da eficiência de encapsulação da BSA utilizou-se um método indirecto que consistiu no doseamento da albumina nas fases de lavagem.

A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a seguinte relação:

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantidade de BSA total} - \text{Quantidade de BSA livre}}{\text{Quantidade de BSA total}} \times 100 \quad (5.1)$$

e cada determinação foi feita em triplicado.

### 5.5 Estudos de libertação

Amostras de 20mg de microesferas liofilizadas foram suspensas em 20mL de tampão HCl/KCl (USP XXV, pH 1,2) e colocadas numa placa magnética (Variomag, Telesystem, Alemanha) sob uma agitação de 100rpm. Ao fim de 2 horas, transferiram-se as amostras para tubos de centrífuga e centrifugaram-se a 3000rpm durante 10 minutos. Após recolha

de 9,3 mL do sobrenadante, as microesferas depositadas foram repostas no recipiente correspondente e adicionou-se um volume igual de tampão NaOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (USP XXV, pH 7,4). Ao fim de 2 horas, transferiram-se novamente as amostras para tubos de centrífuga e centrifugaram-se a 3000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante (2 mL) foi recolhido e quantificado. Os ensaios foram realizados em triplicado.

### 5.5.1 *Quantificação da BSA*

O doseamento a pH 1,2 foi realizado directamente por espectrofotometria UV (Shimadzu UV 1603, Kyoto, Japão) a  $\lambda = 280\text{nm}$ . Foram também realizados ensaios com microesferas sem BSA, uma vez que a pectina poderia interferir nos doseamentos, e o valor da absorvância foi descontado.

Para a quantificação da BSA a pH 4,5 procedeu-se da seguinte forma. A 2 mL de amostra das fases de lavagem adicionaram-se 380  $\mu\text{L}$  de NaOH a 0,2 M, de maneira a aumentar o pH acima do ponto isoeléctrico da BSA e garantir a repulsão entre esta e a pectina, e homogeneizou-se. Em seguida adicionaram-se 2 mL de etanol e agitou-se (Vortex Genie-2, Scientific Industries, New York, EUA) durante 1 minuto, por forma a provocar a precipitação de microesferas de granulometria muito pequena que não se teriam depositado. As quantidades mencionadas foram escolhidas após estudos de pH, observação macroscópica dos precipitados obtidos e análise das absorvâncias com diferentes volumes de etanol. As soluções foram depois centrifugadas a 3000rpm durante 10 minutos e lidos os valores das absorvâncias num espectrofotómetro UV a  $\lambda = 280\text{nm}$ .

A pH 7,4 o doseamento da BSA foi realizado do seguinte modo: a 2 mL de amostra foi adicionado o mesmo volume de etanol com agitação em vortex durante 1 minuto. Seguiu-se uma centrifugação a 3000rpm durante 10 minutos e os valores das absorvâncias foram lidos num espectrofotómetro UV a  $\lambda = 280\text{nm}$ .

## Capítulo 6

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em toda a pesquisa efectuada, até à conclusão deste trabalho, não foram encontrados estudos que se debruçassem sobre a preparação de microesferas de pectinato de cálcio pelo método de emulsificação/gelificação interna. Assim, apesar de apresentarmos sugestões para justificar os resultados obtidos, não podemos estabelecer comparações com outros trabalhos que validem, ou refutem, as nossas observações.

Nos estudos de libertação não foi detectada a existência de proteína a pH 7,4 e, portanto, apenas os resultados referentes ao meio que simulou o pH gástrico são aqui apresentados.

#### **6.1 Parâmetros de processo**

##### *6.1.1 pH da solução de pectina/BSA*

Uma vez que tínhamos observado diferenças no aspecto exterior do produto liofilizado nos primeiros lotes preparados (figura 6.1), averiguámos se o modo de congelamento, que antecede a liofilização das amostras, poderia influenciar significativamente a libertação de BSA. Preparámos um lote (n°12) com as mesmas condições que um outro anteriormente produzido (n°8) mas pretendendo realizar o congelamento a  $-40^{\circ}\text{C}$  num banho de etanol a 96%. Logo após adição da solução de carbonato de cálcio verificámos que tinha ocorrido uma gelificação prematura. Voltámos a repetir a experiência (lote n°14) e obtivemos novamente uma gelificação antecipada, apesar de menos extensa, que se reflectiu nos resultados de granulometria (ver tabela 6.1).

De facto, quando se adiciona a solução de carbonato de cálcio à solução de pectina/BSA observa-se um aumento rápido da viscosidade.

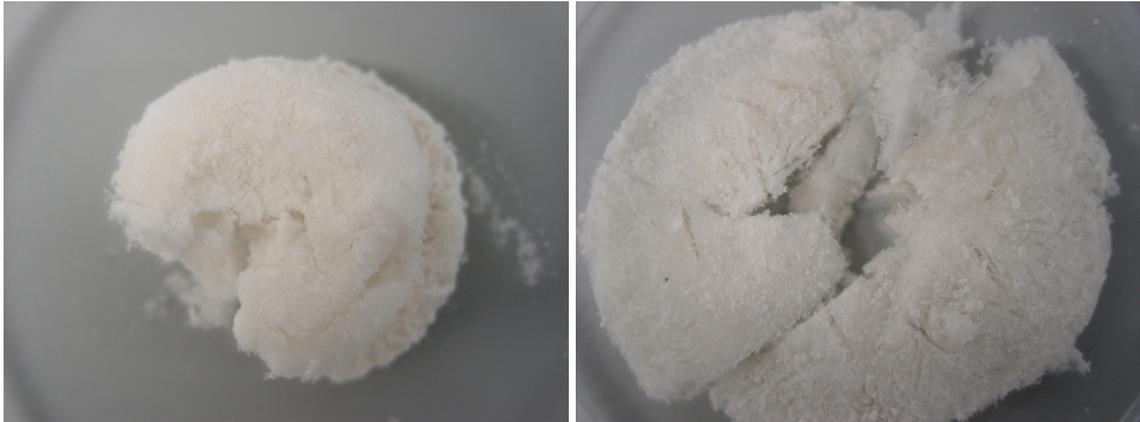


Figura 6.1: Microesferas liofilizadas com congelamento a  $-40^{\circ}\text{C}$  em banho de etanol a 96% (à esquerda) e com congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  em frigorífico (à direita).

Tabela 6.1: Fenómeno de pré-gelificação.

Lote	pH da solução tampão	pH da solução pectina/BSA	Diâmetro médio $\pm$ DP [ $\mu\text{m}$ ]	Moda [ $\mu\text{m}$ ]
8	7,4	6,77	$59,59 \pm 23,93$	56
12	7,4	6,87	$183 \pm 143,2$	127,1
14	7,4	6,86	$102,2 \pm 43,6$	105,9

Quando ocorre pré-gelificação, o tamanho das microesferas vai aumentar mas não de uma forma uniforme. Durante a emulsificação, algumas gotículas podem englobar mais ou menos grãos de sal de cálcio (Poncelet et al., 1992) resultando depois numa granulometria heterogénea.

Para aumentar o pH da solução de pectina/BSA, dissolvemos os dois reagentes numa solução de tampão fosfato a dois pH diferentes, 7,8 e 8,0. Dos resultados obtidos verificamos que a subida do pH oferece uma melhor distribuição de tamanhos (tabela 6.2).

Tabela 6.2: Resultados da granulometria das microesferas preparadas a partir de soluções de pectina/BSA com diferentes valores de pH.

<b>pH da solução tampão</b>	<b>pH da solução pectina/BSA</b>	<b>Diâmetro médio <math>\pm</math> DP [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Moda [<math>\mu\text{m}</math>]</b>
7,4	6,77	59,59 $\pm$ 23,93	56
7,8	7,04	49,15 $\pm$ 16,91	46,68
8,0	7,08	36,23 $\pm$ 10,62	38,91

### 6.1.2 Dispersão do carbonato de cálcio

O tipo de dispersão da solução de carbonato de cálcio foi também estudado. Nos primeiros lotes que preparámos procedemos a uma agitação manual da solução de carbonato de cálcio. Entretanto passámos a utilizar a sonicação para melhor promover a dispersão do sal de cálcio.

Através da análise granulométrica verificou-se que este parâmetro influencia o tamanho das microesferas (tabela 6.3). Esperar-se-ia que o recurso à sonicação proporcionasse uma granulometria mais homogénea. No entanto, pode observar-se que o desvio padrão é superior, o que reflecte uma distribuição com um elevado índice de polidispersão. Esta largura do pico resulta certamente da ocorrência de uma pré-gelificação, já que o pH da solução de pectina/BSA (pH 6,77), como vimos, permite uma libertação antecipada dos iões de cálcio.

Tabela 6.3: Efeito dos parâmetros de processo na granulometria e na eficiência de encapsulação das microesferas.

<b>Parâmetro</b>	<b>Diâmetro médio <math>\pm</math> DP [<math>\mu</math>m]</b>	<b>Moda [<math>\mu</math>m]</b>	<b>Eficiência de encapsulação <math>\pm</math> DP [%]</b>
<b>Dispersão do CaCO<sub>3</sub></b>			
agitação manual	61,84 $\pm$ 28,23	61,34	-
sonicação	157,70 $\pm$ 97,23	127,1	-
<b>Concentração do emulsivo [% (v/v)]</b>			
0	155,2 $\pm$ 88,48	200,30	94,78 $\pm$ 0,036
0,5	49,31 $\pm$ 15,61	51,13	97,96 $\pm$ 0,402
1,0	36,23 $\pm$ 10,62	38,91	97,74 $\pm$ 0,236
<b>Relação de fases [(v/v)]</b>			
30/70	55,56 $\pm$ 16,72	61,34	93,74 $\pm$ 0,312
40/60	82,99 $\pm$ 40,30	80,61	93,54 $\pm$ 0,304
50/50	36,23 $\pm$ 10,62	38,91	97,74 $\pm$ 0,236
<b>Velocidade de agitação [rpm]</b>			
400	36,23 $\pm$ 10,62	38,91	97,74 $\pm$ 0,236
600	17,80 $\pm$ 5,12	18,78	97,22 $\pm$ 0,060
800	11,61 $\pm$ 3,86	11,91	96,87 $\pm$ 0,126
<b>Tipo de isolamento</b>			
deposição	36,23 $\pm$ 10,62	38,91	97,74 $\pm$ 0,236
centrifugação	35,33 $\pm$ 10,85	35,52	97,96 $\pm$ 0,032

### 6.1.3 Concentração do agente emulsivo

O tamanho de microesferas preparadas por um método de emulsificação pode ser controlado através da adição de um agente emulsivo. De facto, a presença e aumento da concentração de Span®80 conduziu a uma diminuição do tamanho médio das microesferas e do índice de polidispersão (tabela 6.3).

Quanto à eficiência de encapsulação, observámos um aumento de cerca de 3% quando foram adicionados 0,5% (v/v) deste agente emulsivo à fase oleosa, mas para uma maior concentração não verificámos uma diferença significativa (figura 6.2). Quando expostas ao meio ácido, as microesferas preparadas com diferentes concentrações de Span®80 libertaram a maior parte do seu conteúdo em BSA. A libertação foi total para a ausência de agente emulsivo, uma ligeira diminuição foi observada para a concentração intermédia e 81,01% de BSA foi libertada para uma concentração de 1% (v/v).

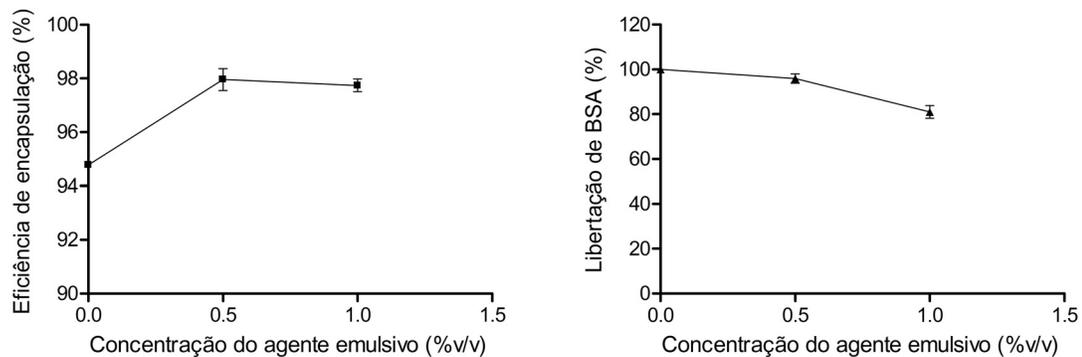


Figura 6.2: Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes concentrações de agente emulsivo.

### 6.1.4 Relação de fases

A alteração da relação, em volume, das fases aquosa e oleosa não varia de forma linear relativamente ao tamanho das microesferas (tabela 6.3). O aumento da fase aquosa de 30

para 40% (v/v) aumentou muito significativamente o diâmetro médio. No entanto, o tamanho das microesferas diminuiu para menos de metade quando se empregou uma relação de fases de 50/50 (v/v). A variação da menor para a maior proporção de fase aquosa conduziu a um aumento da eficiência de encapsulação e a uma retenção de BSA de cerca de 20% (figura 6.3).

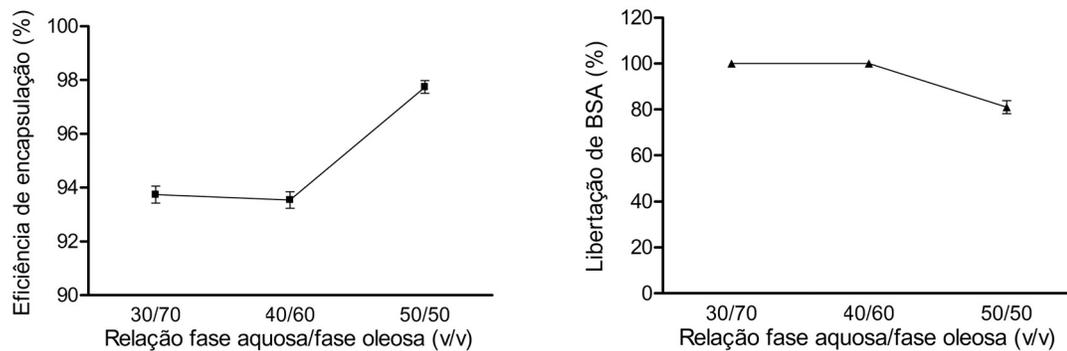


Figura 6.3: Comparação das eficiências de encapsulação e liberação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes relações de fases.

#### 6.1.5 Velocidade de agitação

Os tamanhos médios e modas das microesferas preparadas com diferentes velocidades de agitação encontram-se na tabela (tabela 6.3). Pode, pois, ver-se que para 400, 600 e 800rpm, o tamanho médio diminuiu com o aumento da velocidade. Relativamente às eficiências de encapsulação, verificámos que diminuem ligeiramente à medida que a velocidade é mais elevada. Para os ensaios de liberação a pH 1,2 verificamos que aumentando a velocidade de agitação aumenta também a liberação de BSA, sendo que as diferenças observadas entre 600 e 800rpm não são significativas (ver figura 6.4).

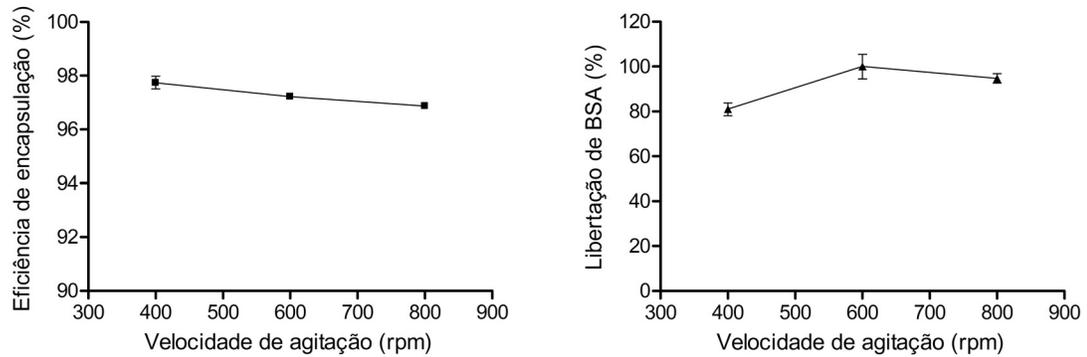


Figura 6.4: Comparação das eficiências de encapsulação e liberação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes velocidades de agitação.

#### 6.1.6 Isolamento das microesferas

As microesferas isoladas por centrifugação apresentaram um tamanho médio ligeiramente mais pequeno do que as obtidas por deposição (tabela 6.3). As eficiências de encapsulação para os dois tipos de isolamento são idênticas e, apesar de a liberação de proteína a pH 1,2 ser maior para o isolamento por centrifugação, a diferença entre os dois parâmetros não é significativa (figura 6.5).

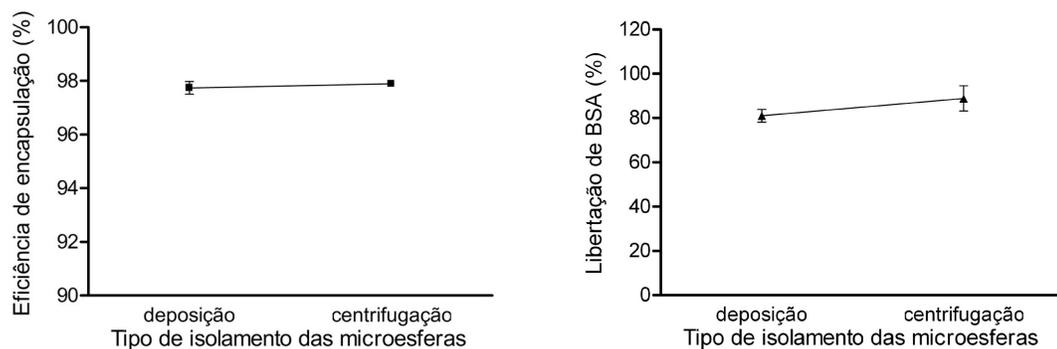


Figura 6.5: Comparação das eficiências de encapsulação e liberação a pH 1,2 de microesferas isoladas por deposição e centrifugação.

## 6.2 Parâmetros de formulação

### 6.2.1 Tipo de pectina

Quando utilizámos uma pectina com elevado grau de esterificação diminuiu o tamanho médio das microesferas (tabela 6.4). A eficiência de encapsulação foi reduzida em cerca de 6% e a libertação de BSA a pH 1,2 foi total (figura 6.6).

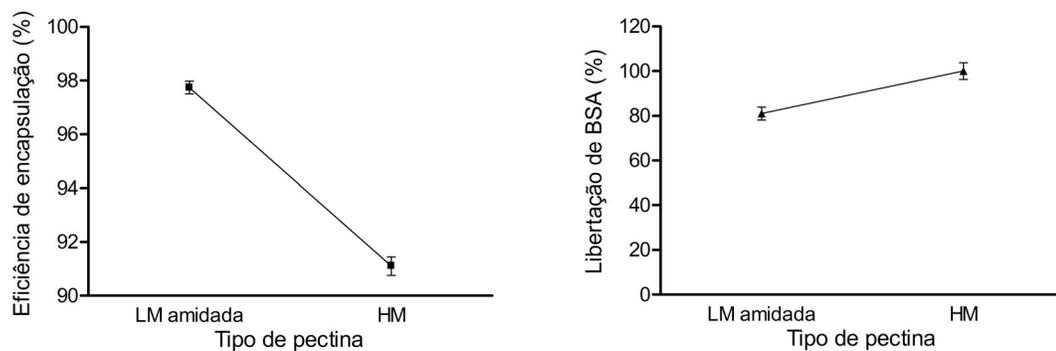


Figura 6.6: Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com dois tipos diferentes de pectina.

### 6.2.2 Concentração de pectina

Os resultados obtidos mostram que aumentando a concentração de pectina de 3 para 5% (m/v) o diâmetro médio das microesferas não varia proporcionalmente (tabela 6.4). Uma concentração de pectina de 3% (m/v) produz microesferas com um tamanho médio muito grande ( $73,78\mu\text{m}$ ) e um índice de polidispersão elevado. A figura 6.7 mostra o efeito da concentração do polissacarídeo na eficiência de encapsulação e na libertação a pH 1,2. Para as microesferas preparadas com a pectina a 3 e 4% (m/v), a eficiência de encapsulação foi semelhante e aumentou ligeiramente para 5% (m/v). Relativamente à libertação em meio ácido, só com a maior concentração foi possível uma retenção de cerca de 20% de BSA no interior das microesferas.

Tabela 6.4: Efeito dos parâmetros de formulação na granulometria e na eficiência de encapsulação das microesferas.

<b>Parâmetro</b>	<b>Diâmetro médio <math>\pm</math> DP [<math>\mu</math>m]</b>	<b>Moda [<math>\mu</math>m]</b>	<b>Eficiência de encapsulação <math>\pm</math> DP [%]</b>
<b>Tipo de pectina</b>			
LM amidada	36,23 $\pm$ 10,62	38,91	97,74 $\pm$ 0,236
HM	28,40 $\pm$ 7,45	29,61	91,11 $\pm$ 0,346
<b>Concentração de pectina [% (m/v)]</b>			
3	73,78 $\pm$ 59,61	38,91	96,63 $\pm$ 0,563
4	22,56 $\pm$ 8,45	18,78	95,90 $\pm$ 0,447
5	36,23 $\pm$ 10,62	38,91	97,74 $\pm$ 0,236
<b>Razão pectina/BSA [(m/m)]</b>			
2:1	36,23 $\pm$ 10,62	38,91	97,74 $\pm$ 0,236
3:1	47,49 $\pm$ 15,47	46,68	97,54 $\pm$ 0,085
4:1	33,50 $\pm$ 9,05	35,52	96,46 $\pm$ 0,125
<b>Concentração de quitosano [% (m/v)]</b>			
0	36,23 $\pm$ 10,62	38,91	97,74 $\pm$ 0,236
0,3	39,88 $\pm$ 12,99	42,62	98,31 $\pm$ 0,053
0,5	57,10 $\pm$ 26,21	46,68	98,45 $\pm$ 0,119
1,0	115,70 $\pm$ 81,73	105,9	96,40 $\pm$ 0,108
<b>Presença de adjuvante e revestimento</b>			
Tripolifosfato de sódio	48,28 $\pm$ 23,21	42,62	96,22 $\pm$ 0,633
Tripolifosfato de sódio/quitosano	22,06 $\pm$ 10,09	27,03	96,29 $\pm$ 0,098

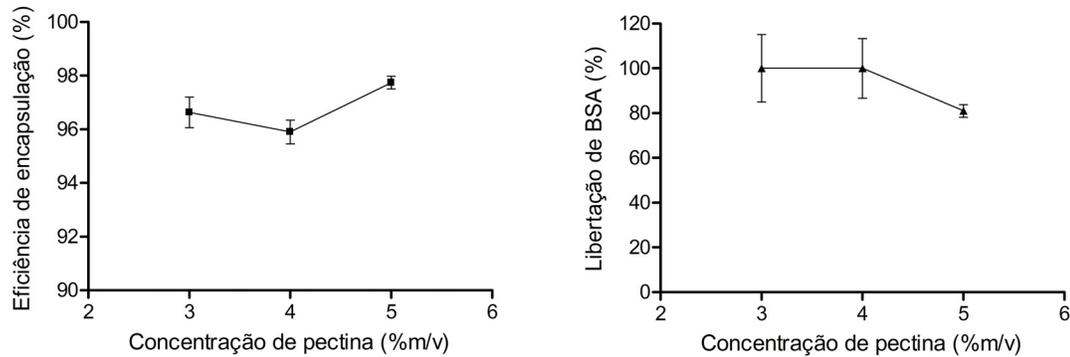


Figura 6.7: Comparação das eficiências de encapsulação e liberação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes concentrações de pectina.

### 6.2.3 Proporção polímero/proteína

O tamanho médio das microesferas com diferentes razões entre a pectina e BSA variou entre 33,5 e 47,5  $\mu\text{m}$ , não tendo sido obtida uma relação linear (tabela 6.4). O tamanho aumentou quando se aumentou a concentração da BSA até uma razão de 3 : 1 mas aumentando até 2 : 1 o tamanho diminuiu. A figura 6.8 mostra o efeito da quantidade de BSA adicionada na eficiência de encapsulação e na liberação a pH 1,2. Para ambas, podemos ver que a menor razão pectina/BSA proporciona os melhores resultados.

### 6.2.4 Revestimento com quitosano

A reticulação da pectina com os íons  $\text{Ca}^{2+}$  diminui a hidrossolubilidade e intumescência do polissacarídeo o que, teoricamente, conduz à inibição da liberação do fármaco encapsulado. Todavia, a difusão para o meio circundante das moléculas de fármaco que se encontram à superfície das microesferas não é completamente suprimida. De facto, verificámos que mesmo a alteração de alguns parâmetros de processo e de formulação não foi suficiente para reduzir a liberação de BSA.

O quitosano é um polissacarídeo constituído por copolímeros de *D*-glucosamina e *N*-acetilglucosamina que pode ser extraído da quitina dos crustáceos via desacetilação alcalina

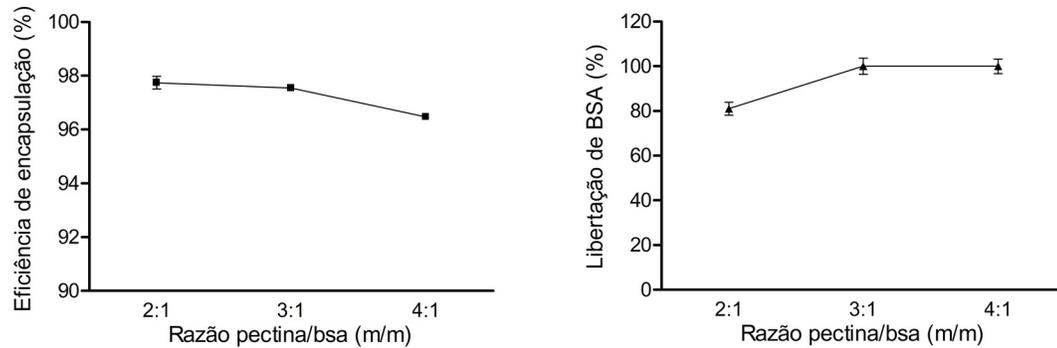


Figura 6.8: Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes razões entre pectina e BSA.

parcial. O termo quitosano refere-se a um vasto número de polímeros que diferem entre si quanto ao grau de *N*-acetilação (40 a 98%) e ao peso molecular (entre 50 e 2000 kDa), características que influenciam as propriedades físico-químicas deste polímero. O quitosano é uma base fraca cujo pKa do grupo *D*-glucosamina está entre 6,2 e 7,0 e, portanto, é insolúvel a valores neutros e alcalinos de pH. Em meios ácidos, os grupos amina são protonados e o polímero adquire uma elevada densidade de carga positiva, dissolvendo-se prontamente (Hejazi e Amiji, 2003). O quitosano pode formar complexos com polímeros aniônicos, o que resulta num reforço da matriz e conseqüentemente numa redução da erosão desta em meios aquosos (Murata et al., 1993).

As microesferas de pectinato de cálcio revestidas com uma solução de quitosano, aplicada como foi indicado no capítulo anterior, apresentaram um diâmetro médio e um índice de polidispersão muito elevados relativamente às microesferas não revestidas (tabela 6.5), o que representa um elevado grau de aglomeração.

Analisando a figura 6.9 podemos ainda verificar que há uma pequena diminuição da eficiência de encapsulação quando o revestimento é aplicado e que a libertação de BSA a pH 1,2 é de apenas 20%.

Tabela 6.5: Influência do revestimento de quitosano na distribuição de tamanhos.

	<b>Diâmetro médio <math>\pm</math> DP [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Moda [<math>\mu\text{m}</math>]</b>
Não revestidas	36,23 $\pm$ 10,62	38,91
Revestidas	170,00 $\pm$ 73,09	219,40

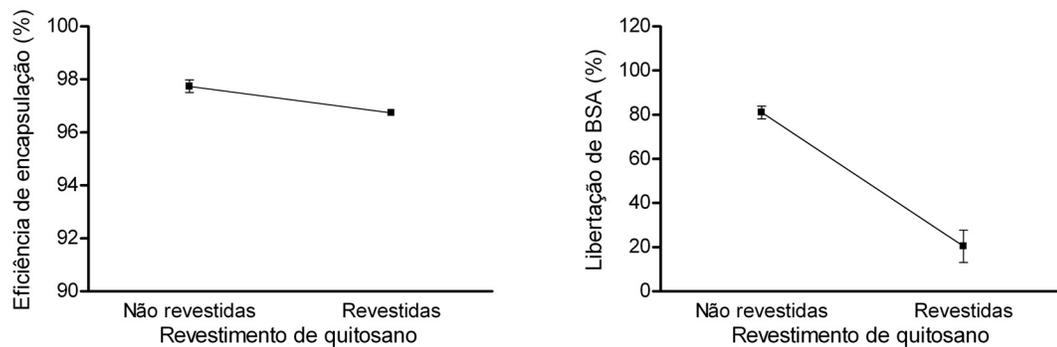


Figura 6.9: Influência do revestimento de quitosano na eficiência de encapsulação e na liberação a pH 1,2.

#### *Melhoramento da granulometria*

Uma vez que as microesferas revestidas apresentaram um tamanho médio tão elevado, além da enorme polidispersão, seguimos um procedimento testado no nosso Laboratório de Investigação que tinha produzido bons resultados com o alginato, e que consistia em adicionar o agente emulsivo (no nosso caso Span®80) à solução de revestimento.

Da tabela 6.6 vemos que a adição de 1 mL de agente emulsivo diminui drasticamente o tamanho das microesferas revestidas para um valor aproximado do obtido para as microesferas não revestidas. A figura 6.10 mostra que a eficiência de encapsulação aumentou ligeiramente mas a liberação de BSA a pH 1,2 foi significativamente influenciada.

Tabela 6.6: Influência da adição de Span®80 à solução de revestimento na distribuição de tamanhos.

Volume de Span®80 [mL]	Diâmetro médio $\pm$ DP [ $\mu\text{m}$ ]	Moda [ $\mu\text{m}$ ]
0	170,00 $\pm$ 73,09	219,40
1	39,88 $\pm$ 12,99	42,62

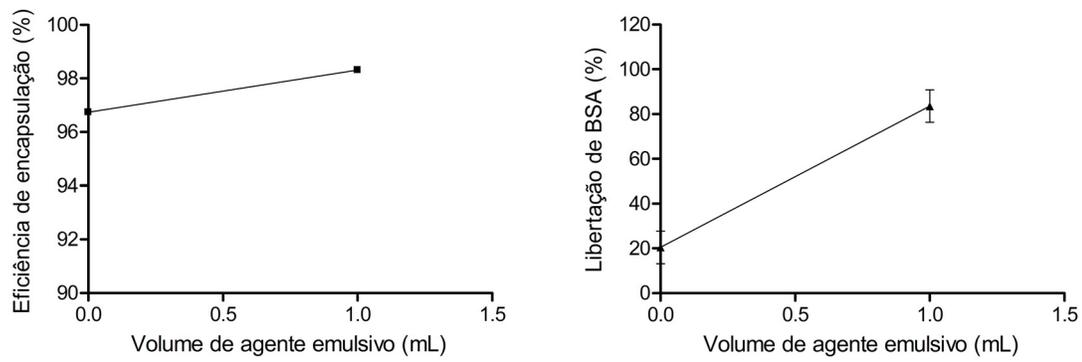


Figura 6.10: Influência da adição de Span®80 à solução de revestimento na eficiência de encapsulação e na liberação a pH 1,2.

#### *Concentração da solução de revestimento*

O aumento da concentração de quitosano resultou também num aumento do tamanho médio das microesferas (tabela 6.4), que variou entre 36,23 e 115,7 $\mu\text{m}$ . A adição de quitosano aumentou a eficiência de encapsulação até uma concentração de 0,5% (m/v) mas não houve diferença significativa na retenção durante a suspensão em pH 1,2, a não ser para a concentração mais elevada, para a qual se observou uma retenção de cerca de 28% (figura 6.11).

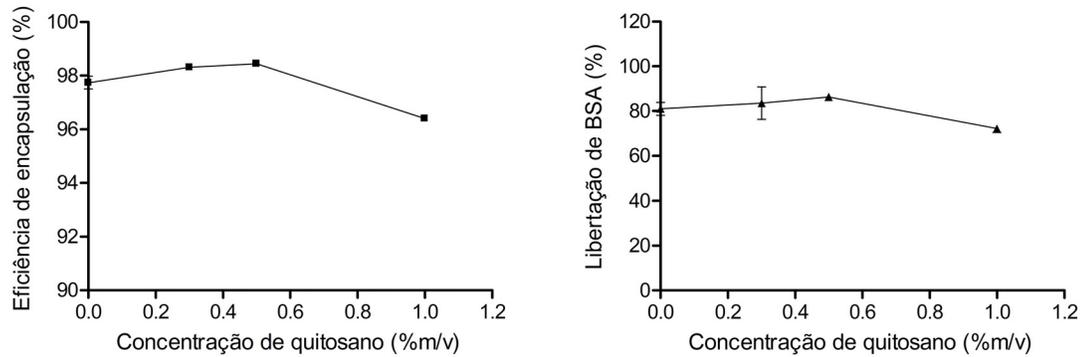


Figura 6.11: Comparação das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2 de microesferas preparadas com diferentes concentrações de quitosano.

#### 6.2.5 Presença de adjuvantes sem e com revestimento

Uma outra estratégia possível para controlar a libertação de fármacos é a incorporação de outros polianiões na solução de pectina. Para este trabalho seleccionámos o tripolifosfato de sódio, que interage com o quitosano por meio de forças electrostáticas.

Os resultados de granulometria indicaram-nos que a adição deste adjuvante fez aumentar o tamanho médio das microesferas (tabela 6.4). Quanto à eficiência de encapsulação, verificámos que esta diminuiu ligeiramente em relação às microesferas de pectina (figura 6.12). A libertação de BSA a pH 1,2 diminuiu significativamente, tendo sido conseguida uma retenção de cerca de 72%.

A análise granulométrica das microesferas preparadas com tripolifosfato de sódio e revestidas com uma solução de quitosano mostrou uma diminuição significativa do tamanho médio relativamente às microesferas não revestidas e também às microesferas preparadas apenas com pectina (tabela 6.4). A eficiência de encapsulação foi análoga à das microesferas não revestidas mas a libertação de BSA a pH 1,2 aumentou (figura 6.12).

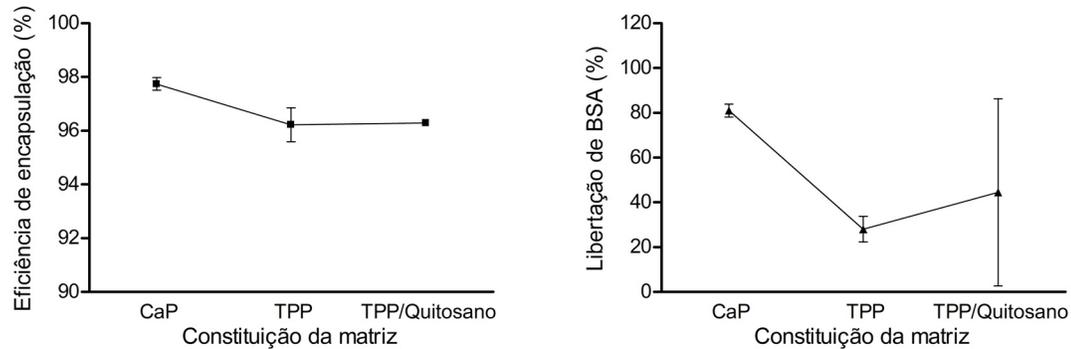


Figura 6.12: Comparação das eficiências de encapsulação e liberação a pH 1,2 de microesferas constituídas por pectinato de cálcio (CaP), pectinato de cálcio e tripolifosfato de sódio (TPP) e por pectinato de cálcio e tripolifosfato de sódio revestidas com quitosano (TPP/Quitosano).

### 6.3 Discussão geral

#### 6.3.1 Escolha dos parâmetros fixos de processo e formulação

##### *Fase oleosa*

Num trabalho de Esquisabel e colaboradores (Esquisabel et al., 1997) foi estudada a influência do tipo de óleo em microcápsulas de alginato revestidas com polilisina preparadas pelo método de emulsificação/gelificação interna. Para o efeito foram utilizados os óleos de sésamo, amêndoas doces, esqualeno, camomila e jojoba e a viscosidade de cada um foi determinada através de estudos reológicos. Os autores verificaram que o tamanho das microcápsulas diminuía linearmente com o aumento do valor da viscosidade dos óleos utilizados. Uma vez que a viscosidade da parafina é superior à de qualquer um daqueles óleos vegetais mencionados, seria de esperar uma diminuição e otimização da granulometria das microesferas. Por este motivo escolhemos como fase oleosa para a etapa de emulsificação o óleo de parafina.

*Fonte dos íons cálcio*

Poncelet e colaboradores (Poncelet et al., 1995) experimentaram cinco sais como fonte interna de íons cálcio para a preparação de microesferas de alginato. Os sais utilizados foram o oxalato, tartarato, fosfato, carbonato e citrato de cálcio. As microesferas obtidas com citrato de cálcio apresentaram uma granulometria complexa, caracterizada por dois picos principais. Mesmo a um pH de 8,0 a gelificação ficou completa em 4 minutos, muito antes de a emulsão ter atingido o equilíbrio. Com os sais oxalato e tartarato não foi possível a consolidação das microesferas porque os cátions não são libertados num intervalo de pH adequado (ver figura 6.13). O fosfato de cálcio formou agregados no centro das microesferas e a gelificação incompleta induziu a sua aglomeração. Já as microesferas preparadas com carbonato de cálcio apresentaram-se mais esféricas e com uma distribuição de tamanhos unimodal. A mistura do sal carbonato com uma solução de alginato manteve-se estável a pH 7,5 durante 48 horas e quando o pH foi reduzido para 6 – 6,5 provocou uma gelificação instantânea.

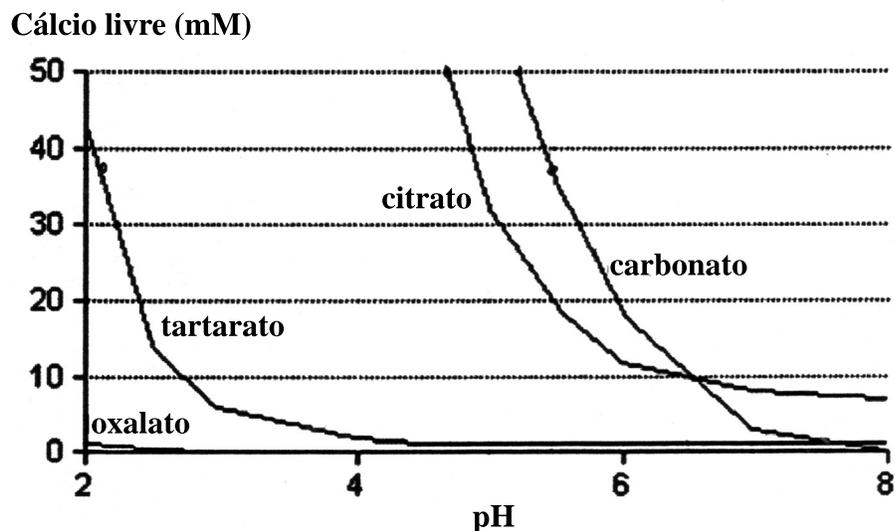


Figura 6.13: Concentração de cálcio livre em função do pH para diferentes sais de cálcio (adaptado de (Poncelet et al., 1995; Poncelet, 2001)).

Como o carbonato de cálcio foi, dos sais de cálcio analisados com a finalidade de serem empregues na gelificação interna, o que proporcionou a preparação de microesferas com as melhores características, optámos por utilizá-lo no nosso trabalho.

#### *Relação $Ca^{2+}$ /pectina*

Também na escolha da relação  $Ca^{2+}$ /pectina baseámo-nos nos trabalhos publicados com o alginato. A quantidade de cálcio, segundo Poncelet (Poncelet, 2001), que é suficiente adicionar a uma solução de alginato para assegurar uma gelificação completa é 25 mM, que corresponde a uma relação em massa de 5%. Como uma pectina LM tem, em princípio, mais grupos carboxílicos disponíveis para interagir com os iões  $Ca^{2+}$  e, no caso de uma pectina amidada, que parece reforçar essa interacção, optámos por empregar uma relação mássica entre a pectina e os iões  $Ca^{2+}$  de 6,64%.

#### *Relação ácido acético/ $Ca^{2+}$*

Quando se inicia a fase de acidificação o carbonato de cálcio vai reagindo lentamente (porque o ritmo da adição de ácido é lento) com o ácido acético segundo o esquema:



Obviamente que a relação entre ácido acético e iões cálcio determina o grau da gelificação (Silva et al., Submitted) e, conseqüentemente, a qualidade do gel. Se a quantidade de ácido for insuficiente para dissociar todos os iões cálcio do sal carbonato, as microesferas que se formarem apresentarão uma elevada fragilidade já que a quantidade de cálcio presente é dos factores que mais influencia a resistência do gel (Liu et al., 2003). Por outro lado, quando Poncelet e colaboradores (Poncelet et al., 1992) iniciaram o estudo da micro-encapsulação por emulsificação/gelificação interna começaram por variar a relação molar ácido acético/ $Ca^{2+}$  de 1,66 a 16,65. No entanto, a influência deste parâmetro nas características das microesferas não foi discutida pelo que desconhecemos qual a proporção mais

apropriada.

Tendo em consideração a estequiometria da reacção anterior (traduzida pela equação 6.1), os factores relacionados com a gelificação da pectina e o estudo de Poncelet e colaboradores, optámos por uma relação molar ácido acético/ $\text{Ca}^{2+}$  de 7,4. Este valor representa um excesso de ácido relativamente aos iões cálcio, necessário para garantir uma gelificação completa, e é um valor intermédio no intervalo referido.

#### *Meio de lavagem das microesferas*

Huguet e Dellacherie (Huguet e Dellacherie, 1996) fizeram um estudo da influência do meio de armazenamento de microesferas de alginato de cálcio na libertação de BSA. As microesferas foram suspensas em água destilada (pH 6) e numa solução  $\text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$  (pH 4) e após 15 dias de armazenamento observou-se que em solução acídica a libertação de BSA foi significativamente inferior (4,3%) em relação à água destilada (13,1%).

A escolha do pH da solução de lavagem e de armazenamento é muito importante para evitar a difusão da proteína encapsulada para o meio de suspensão. Pensa-se que há formação de um complexo reversível do tipo electrostático entre a pectina e a BSA que depende do pH do meio circundante. A figura 6.14 mostra um esquema da interacção pectina-proteína. Se o pH do meio for superior ao ponto isoeléctrico da proteína, ambas as moléculas estão desprotonadas e há repulsão entre grupos carboxílicos. Quando o pH do meio é igual ao ponto isoeléctrico, o número de cargas positivas é igual ao número de cargas negativas e começam a estabelecer-se algumas ligações entre os grupos amina da proteína e os grupos carboxílicos desprotonados da cadeia galacturónica. Se o valor do pH do meio se encontrar entre o pKa da pectina e o ponto isoeléctrico da proteína, os grupos carboxílicos livres da pectina continuam negativamente carregados e podem interagir com os grupos amina protonados da proteína. No caso de o pH ser ainda inferior ao pKa da pectina, os grupos carboxílicos adquirem um protão e repelem os grupos amina que estão também protonados.

O valor do pH deve situar-se, portanto, abaixo do ponto isoeléctrico da proteína de

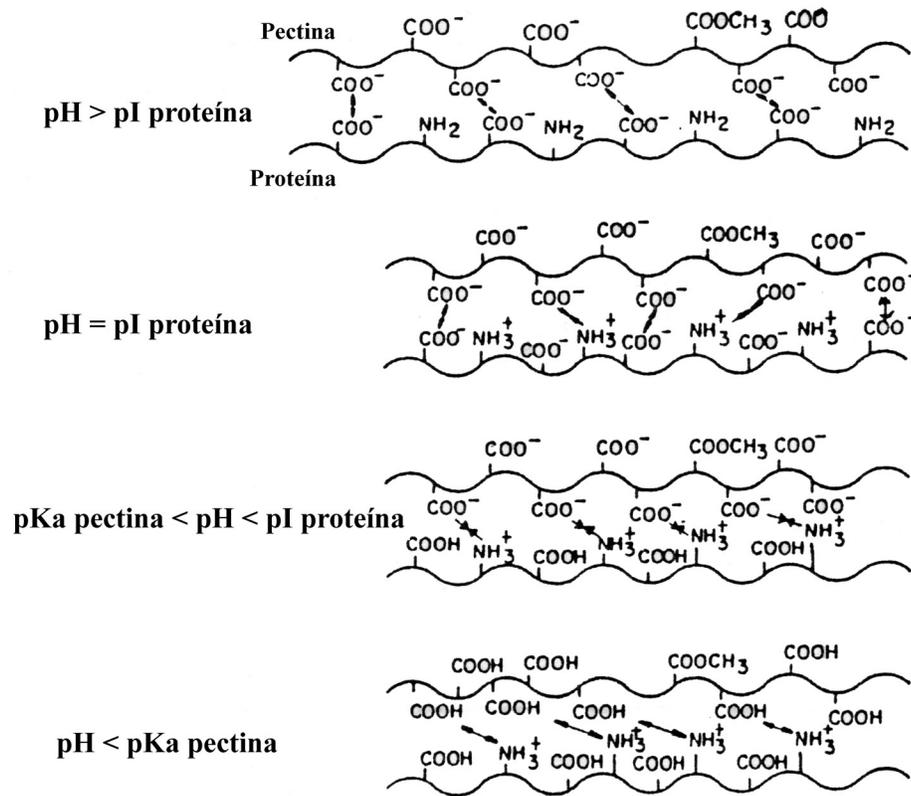


Figura 6.14: Esquema da interação entre pectina e proteína (adaptado de Thakur e colaboradores (Thakur et al., 1997)).

modo a promover-se a interação entre proteína e polímero e, assim, inibir a difusão da BSA para o meio de lavagem e armazenamento. O estudo da variação do pH em condições de simulação da fase de gelificação mostrou que, para a relação de ácido/Ca<sup>2+</sup> utilizada (7,4), o valor final do pH não é inferior a 4,2. Por outro lado, um valor de pH situado entre o pKa da pectina e o ponto isoelétrico da BSA é assegurado pela lavagem das microesferas com uma solução tampão de pH 4,5.

### 6.3.2 O fenómeno de pré-gelificação

O controlo do pH é, como pudemos apreciar na secção anterior, essencial para prevenir o fenómeno da pré-gelificação.

Lembremo-nos agora do que foi referido no capítulo 4 quanto ao comportamento da molécula de BSA em diferentes valores de pH. Uma vez que as isomerizações são reversíveis, que a forma “normal” se mantém no intervalo de pH 4 – 9 e o tamanho médio das microesferas preparadas a partir de uma solução com pH 8,0 foi o de menor valor, além de se ter obtido uma granulometria mais homogénea, o meio de dissolução escolhido para a preparação das soluções pectina/BSA foi o tampão fosfato a pH 8,0.

Mesmo assim, é necessário ter em conta que para um pH final de 7,0 (uma solução de pectina/BSA em tampão fosfato pH 8,0 produz um pH final entre 7,0 e 7,1) há alguma libertação de iões cálcio para o meio (Ponzelet et al., 1995; 1999; Ponzelet, 2001) e, se a homogeneização não for suficientemente rápida a mistura pode gelificar.

### 6.3.3 Análise da granulometria

As microesferas preparadas pelo método de emulsificação/gelificação interna que descrevemos neste trabalho apresentaram, de modo geral, um tamanho médio inferior a  $50\mu\text{m}$  e um baixo índice de polidispersão, uma forma esférica regular e um baixo grau de aglomeração (figura 6.15). Outros métodos de preparação de microesferas de pectinato de cálcio, nomeadamente emulsificação/gelificação externa (Wong et al., 2002b; Heng et al., 2003) ou combinação da emulsificação com uma gelificação por arrefecimento Esposito et al. (2001), foram já apresentados. No entanto, as microesferas obtidas através destas técnicas apresentam uma forma geralmente irregular, diâmetros médios maiores, um grau de aglomeração elevado e uma fraca capacidade de eliminação da fase oleosa (figuras 6.16 e 6.17).

O tamanho médio das gotículas formadas numa suspensão constituída por duas fases, depende de vários parâmetros como o design do esquema de trabalho, a viscosidade das

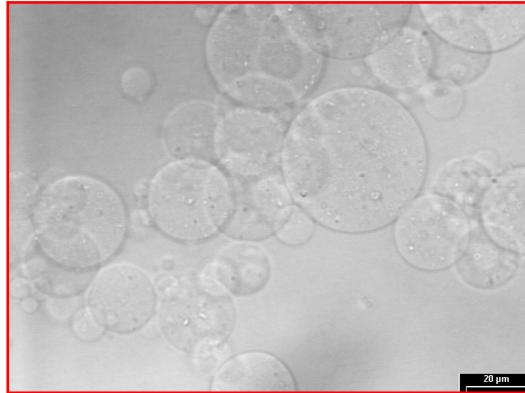


Figura 6.15: Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e sem revestimento. A ampliação foi de 500x.

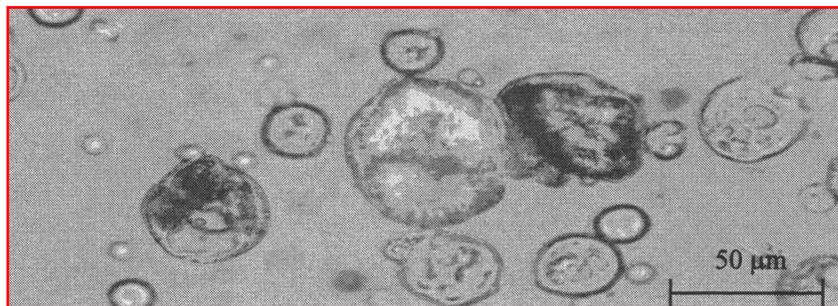


Figura 6.16: Microesferas de pectinato de cálcio preparadas por emulsificação/gelificação externa (Wong et al., 2002b)).

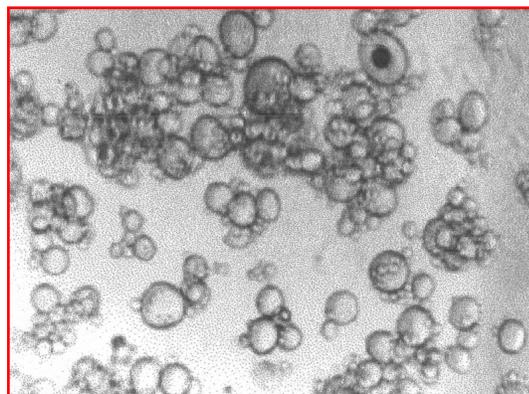


Figura 6.17: Microesferas de pectinato de cálcio preparadas por emulsificação/gelificação por arrefecimento (Esposito et al., 2001)).

duas fases imiscíveis ou a velocidade de agitação da mistura. Podemos encontrar descritas na literatura científica diversas (e semelhantes) relações empíricas entre o tamanho médio das partículas e aqueles parâmetros (Kafarov e Babanov, 1959; Scully, 1976; Arshady e Ledwith, 1983). A equação

$$d = K \frac{D_v R v_d \gamma}{D_s N v_m C_s} \quad (6.2)$$

onde  $d$  representa o tamanho médio das partículas,  $K$  expressa uma variável dependente do esquema de trabalho,  $D_v$  e  $D_s$  são respectivamente os diâmetros do reactor e da hélice do agitador,  $R$  traduz a razão (em volume) entre a fase das partículas e o meio de suspensão,  $N$  é a velocidade de agitação,  $v_d$  e  $v_m$  representam respectivamente as viscosidades da fase das partículas e do meio de suspensão,  $\gamma$  é a tensão superficial entre as duas fases imiscíveis e  $C_s$  é a concentração do emulsivo, foi adaptada por Arshady (Arshady, 1990). Esta relação pressupõe que as partículas atinjam, ou pelo menos se aproximem, de uma distribuição de equilíbrio antes do processo de reticulação, isto é, que a distribuição de tamanhos permanece estacionária sob uma agitação constante. O período necessário para atingir um tal estado estacionário poderá ser extenso mas é conseguido geralmente entre 10 a 30 minutos.

Na secção anterior verificámos que aumentando a quantidade de Span®80 adicionada à parafina diminuía o diâmetro das microesferas. O aumento da concentração do agente emulsivo diminui a tensão interfacial e impede a coalescência das gotículas, permitindo uma redução significativa do tamanho médio das microesferas, o que está de acordo com a equação 6.2.

Com respeito à relação de fases, seria de esperar que o aumento da razão fase aquosa/fase oleosa aumentasse proporcionalmente o tamanho das microesferas. No entanto, podemos observar que há uma diminuição do tamanho médio quando aumentámos o volume de fase aquosa de 40 para 50 mL. Aumentando o volume da fase interna (aquosa) aumenta também o número de gotas, a área interfacial e a tensão superficial. Sendo o número de gotas maior, a distância de separação entre elas diminui o que promove as colisões e favorece o aumento do tamanho das microesferas. Esta explicação parece justificar o aumento do diâmetro mé-

dio entre as razões 30/70 e 40/60 (v/v), tal como foi obtido por Tin e colaboradores (Tin et al., 1997) para microesferas de alginato. Contudo, num trabalho recente (Silva et al., Submitted) é referido que o aumento da fase aquosa na emulsão resulta numa redução ligeira do tamanho das microesferas.

Quanto à velocidade de agitação, verificámos que o tamanho médio diminuiu com o aumento da velocidade, tal como se previa por aplicação da equação 6.2. O aumento da força de agitação conduz a uma maior dispersão da fase interna, promovendo uma emulsão mais fina e prevenindo a aglomeração, e as microesferas que se formam são mais pequenas.

O tamanho médio e eficiência de encapsulação para as microesferas isoladas por deposição e centrifugação são semelhantes. A vantagem de utilizar a centrifugação é a maior facilidade em eliminar a fase oleosa. Todavia, quando é aplicado o revestimento de quitosano, as microesferas em vez de se depositarem depois de centrifugadas ficam suspensas pelo que, nestas condições, este não é o modo mais apropriado de as isolar.

Quando usámos a pectina HM obtivemos microesferas com menor diâmetro médio. Este resultado era esperado uma vez que verificámos que a solução aquosa desta pectina se apresentava mais fluida que a pectina LM amidada. Relembrando a equação 6.2, vemos que quanto maior a viscosidade da fase das microesferas (no nosso caso a solução de pectina/BSA que constitui a fase aquosa) maior será o tamanho das microesferas.

A diminuição da concentração de pectina (de 5 para 3% (m/v)) produz soluções menos viscosas e, por isso, esperávamos um aumento proporcional do tamanho das microesferas. O que verificámos foi que o tamanho médio diminuiu para uma concentração de 4% (m/v) e voltou a aumentar para uma concentração de 3% (m/v). O aumento da concentração de pectina implica um aumento da viscosidade da solução.

Voltando mais uma vez à equação 6.2, temos que quanto maior for a viscosidade da fase das gotículas maior é o tamanho das gotículas formadas, o que justifica o aumento do tamanho médio das microesferas para a variação de 4 para 5% (m/v) de pectina. Quando utilizámos uma concentração de 3% (m/v), o rendimento em volume obtido foi muito baixo e observou-se o aparecimento de fragmentos gelificados na fase de separação das micro-

esferas (figura 6.18). Esta concentração parece ser demasiado baixa para a preparação de microesferas pelo método de emulsificação/gelificação interna e, talvez por isso, não se verifique uma relação linear no estudo da distribuição de tamanhos.

Tin e colaboradores (Tin et al., 1997) também observaram que as microesferas de alginato de cálcio preparadas com baixas concentrações de polímero não passavam para a fase aquosa, mesmo após um contacto muito prolongado. Os autores verificaram que, como resultado da fraca recuperação, uma elevada proporção de microesferas se perdeu durante a rejeição da fase oleosa. Aquelas que foram isoladas apresentavam um aspecto pegajoso, formando agregados provenientes de uma gelificação incompleta.

A presença (antes do melhoramento da granulometria) e aumento da concentração da solução de quitosano aplicada como revestimento das microesferas, bem como a presença do tripolifosfato de sódio, conduziram a um aumento do tamanho médio e da polidispersão. Este resultado era também esperado uma vez que aumentando a concentração em termos de conteúdo polimérico aumenta a viscosidade da solução e, conseqüentemente, o tamanho das microesferas.

Quando o revestimento de quitosano é aplicado às microesferas contendo tripolifosfato verifica-se uma diminuição para cerca de metade (de 48,28 para 22,06  $\mu\text{m}$ ) do diâmetro médio. Recorrendo à microscopia óptica (ver figuras 6.19 e 6.20) podemos observar que a amostra de microesferas revestidas é composta predominantemente por fragmentos muito pequenos e não por microesferas. Pensamos que o quitosano reagiu com o tripolifosfato de sódio produzindo partículas, provavelmente gelificadas, muito pequenas e cuja presença foi detectada pelo difractómetro.



Figura 6.18: Aspecto dos fragmentos obtidos quando foi utilizada a solução de pectina a 3% (m/v).

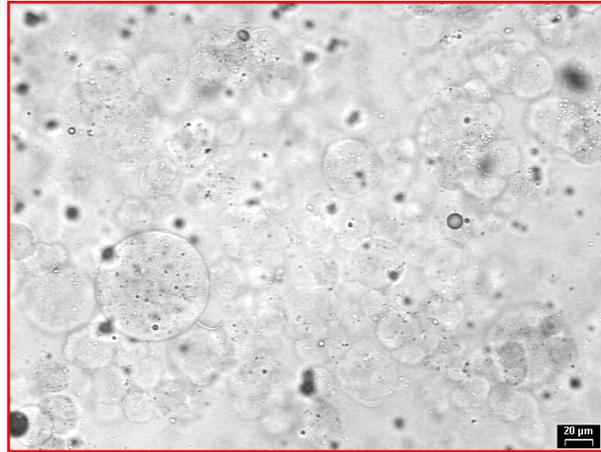


Figura 6.19: Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e tripolifosfato de sódio. A ampliação foi de 500x.

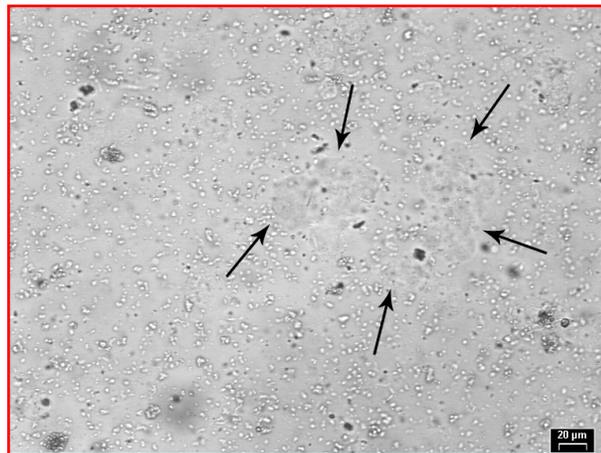


Figura 6.20: Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e tripolifosfato de sódio e revestidas com quitosano. As setas indicam o local das microesferas. A ampliação foi de 500x.

#### 6.3.4 Análise das eficiências de encapsulação e libertação a pH 1,2

Para todos os parâmetros estudados obtivemos eficiências de encapsulação acima dos 90%. Esta elevada eficiência pode ser atribuída à dimensão e natureza hidrofílica da BSA, que dificultam a sua difusão para a fase externa oleosa durante o processo de emulsificação e gelificação.

A libertação da BSA a pH 1,2 foi, de modo geral, muito elevada (superior a 70%), apesar de a pectina ser insolúvel neste meio. De facto, se o material encapsulado for hidrossolúvel a sua libertação ocorre tal como para um sistema matricial hidrofílico, aumentada pela elevada área de superfície da forma farmacêutica multipartícula (Munjeri et al., 1997). Como as microesferas têm dimensões reduzidas, a quantidade de polímero que forma a matriz pode também não ser suficiente para formar uma barreira que retarde de modo eficaz a libertação da BSA. A BSA, em pH ácido, adquire uma conformação estendida (ver capítulo 2), o que pode explicar a facilidade de difusão desta proteína (Huguet e Dellacherie, 1996).

Por outro lado, a pH baixo os protões competem com os iões cálcio pelos grupos carboxílicos das moléculas de pectina. Como o coeficiente de difusão de um protão ( $9,1 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) é cerca de 10 vezes superior ao de um ião  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0,79 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) (Heng et al., 2003), presume-se que a ligação aos iões  $\text{H}^+$  prevalece sobre a ligação aos iões  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta substituição iónica perturba a rede matricial, apesar de as microesferas manterem a sua estrutura macroscópica com propriedades mecânicas semelhantes devido à formação de ligações de hidrogénio que lhe conferem estabilidade (Fundueanu et al., 1999), deixando-a mais permeável à hidratação e à difusão da proteína para o meio exterior.

Também a um valor de pH baixo e inferior ao pKa da pectina a interacção desta com a proteína é praticamente nula, contribuindo para a difusão da BSA através da rede polimérica.

Além disso, vimos que quando o carbonato de cálcio reage com o ácido acético durante a fase de gelificação, a reacção processa-se com libertação de dióxido de carbono. Há autores que consideram que estando a solução do sal de cálcio dispersa na solução de

pectina/BSA, o dióxido de carbono libertado no interior da matriz poderá ser responsável por um aumento da porosidade das microesferas (Chan et al., 2002) e, conseqüentemente, facilitar a libertação da BSA.

A liofilização também pode ter contribuído para uma libertação elevada, já que este tipo de secagem poderá induzir alterações na estrutura das microesferas, promovendo uma difusão mais rápida da proteína. Num trabalho publicado por Schaffazick e Guterres (Schaffazick e Guterres, 2003) é referido que após re-hidratação de nanocápsulas de PLA<sup>1</sup> e benzoato de benzilo liofilizadas mais de 50% de fármaco (foi utilizada a indometacina como fármaco modelo) foi libertado. Chasteigner e colaboradores (Chasteigner et al., 1995) sugeriram que as tensões na estrutura provocadas pelo congelamento da água poderiam quebrar as nanocápsulas com conseqüente perda do conteúdo para a fase aquosa, enquanto que Gürsoy e colaboradores (Gürsoy et al., 1989) atribuíram a elevada libertação a possíveis alterações na estrutura das nanocápsulas. No entanto, num trabalho realizado por Guterres e colaboradores (Guterres et al., 2000) mostrou-se que filmes poliméricos de PLA eram rapidamente dissolvidos pelo benzoato de benzilo e, portanto, não haveria constituição de nanocápsulas mas formar-se-iam micelas. As alterações na estrutura polimérica propostas ocorreriam então antes da fase de congelamento devido à dissolução do polímero pelo benzoato de benzilo (Schaffazick e Guterres, 2003).

Por outro lado, também importa saber se as propriedades da BSA são alteradas face ao processo da liofilização. O problema da estabilidade é particularmente importante no caso das proteínas ou fármacos peptídicos já que pode ocorrer desnaturação pelo frio ou desnaturação nas interfaces. Embora exista desestabilização termodinâmica provocada pela baixa temperatura ou outro tipo de perturbação durante a liofilização, não significa necessariamente que ocorra desdobraimento da proteína se a velocidade de desdobraimento for suficientemente lenta para que a fase de secagem termine sem que se verifique um desdobraimento completo. Se assim for, a proteína pode ser liofilizada com segurança (Tang e

---

<sup>1</sup>PLA = poli(ácido láctico).

Pikal, 2004).

Embora o agente emulsivo seja mais influente no controlo do tamanho de partículas, os resultados obtidos para as microesferas preparadas na presença de Span®80 mostraram que este parâmetro favorece a encapsulação da BSA. Sendo o Span®80 um emulsificante lipossolúvel, a distribuição das suas moléculas em redor das gotículas da fase interna (aquosa) poderá constituir um obstáculo à difusão da BSA, durante o processo de preparação das microesferas. Quanto à libertação em meio ácido ter diminuído proporcionalmente com o aumento da concentração, pensamos que se deve ao facto de o agente emulsivo proporcionar a formação de microesferas com melhores características.

O efeito da relação de fases mostrou que para as relações estudadas com uma fracção oleosa maior a eficiência de encapsulação e a retenção da BSA em meio ácido são semelhantes, e são significativamente melhores para uma relação 50/50 (v/v). Sendo a BSA uma molécula hidrossolúvel, ela tem obviamente mais afinidade para a fase aquosa. Se a fracção aquosa for maior então esta afinidade poderá ser reforçada, resultando num aumento da eficiência de encapsulação e da retenção da proteína.

O aumento da velocidade de agitação fez diminuir ligeiramente a eficiência de encapsulação da BSA. Já vimos que o aumento da velocidade de agitação resulta numa diminuição do tamanho das microesferas. Consequentemente, aumenta o número de gotículas e a área interfacial. Assim sendo, a difusão de BSA para o meio exterior estará mais facilitada. Por outro lado, também a força mais intensa da agitação poderá contribuir para um aumento da difusão da BSA. O mesmo tipo de comportamento foi observado para a libertação em meio ácido. Neste caso, como as microesferas preparadas com a menor velocidade de agitação (400rpm) apresentaram um tamanho superior, a área de exposição ao meio exterior é menor e, portanto, a libertação é também menor.

As microesferas preparadas com a pectina HM não ofereceram qualquer protecção à proteína encapsulada e, de todos os parâmetros estudados, este foi aquele com o qual obtivemos uma eficiência de encapsulação mais baixa. De facto, o grau de esterificação e amidação têm uma grande influência na formação dos geles de pectina induzida pelos iões

de cálcio (Liu et al., 2003), uma vez que a extensão da ligação daqueles íons diminui drasticamente com o aumento do conteúdo de resíduos esterificados aleatoriamente distribuídos ao longo da cadeia polimérica (Morris et al., 1982). A formação de zonas de junção estáveis entre cadeias requer a participação de uma sequência mínima não-interrompida de unidades galacturónicas desesterificadas. Para pectinas com um DE ou DA elevado, a sequência consecutiva de grupos carboxílicos livres pode ser demasiado curta para que um íon  $\text{Ca}^{2+}$  possa ser fixado por dois grupos carboxílicos. Assim, a rede de pectinato de cálcio formada nestas condições é mais frágil (figura 6.21), não permitindo a formação de uma matriz suficientemente eficaz para reter a BSA.

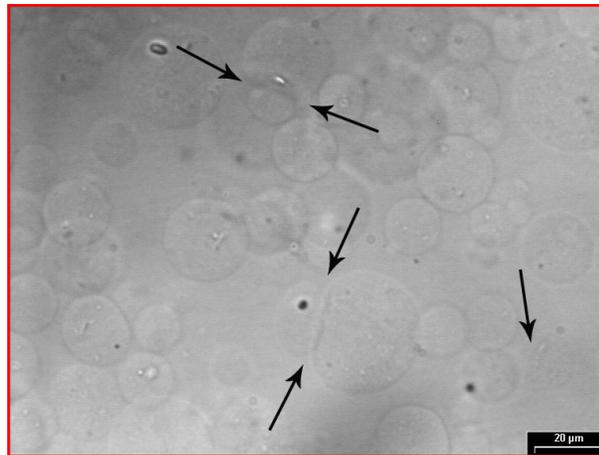


Figura 6.21: Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com uma pectina HM. As setas indicam malformações das microesferas. A ampliação foi de 500x.

Com o aumento da concentração de pectina para 5% (m/v) foi possível melhorar a eficiência de encapsulação e reduzir a libertação a pH 1,2. Uma quantidade de pectina mais elevada produz provavelmente microesferas mais compactas e, conseqüentemente, diminui a permeabilidade da matriz.

Uma maior proporção de pectina relativamente à BSA deveria favorecer a solidez das microesferas de maneira a reduzir a sua libertação. No entanto verificamos que diminuindo a quantidade de BSA nas microesferas, a retenção durante a preparação e após exposição

a meio ácido também diminui. Isto acontece provavelmente porque a difusão de algumas moléculas de BSA poderá permitir a abertura de poros na rede possibilitando a fuga de outras moléculas para o meio de dissolução. O aumento da quantidade de BSA pode conduzir também a uma redução do grau de intumescimento da rede polimérica e, assim, diminuir a libertação. Outros autores (Ostberg et al., 1993) também verificaram um melhoramento da eficiência de encapsulação, quando prepararam macroesferas de alginato de cálcio contendo teofilina a partir de uma suspensão mais concentrada do fármaco. Observaram ainda, em fotografias de microscopia electrónica de varrimento, a presença de um maior número de cristais de fármaco à superfície das macroesferas preparadas com uma menor quantidade de fármaco. Estes resultados também podem contribuir para justificar uma maior retenção da BSA nas microesferas obtidas para uma menor razão pectina/proteína.

O estudo da interacção entre pectina e quitosano por espectroscopia de infravermelho (Kim et al., 2003) sugere que os grupos amina positivos do quitosano formam uma membrana através de interacções do tipo iónico com os grupos carboxílicos da pectina. A figura 6.22, que adaptámos para o nosso polissacarídeo, mostra uma representação esquemática da formação da membrana do complexo pectina/quitosano. Uma vez que, para ambos os polielectrólitos, cerca de 70 a 80% do grau de dissociação dos grupos carboxílico e amina se aproxima de pH 5,0, cada um pode conservar uma conformação rígida e linear que resulta na formação de uma membrana densa (Lee et al., 1997). Como já foi anteriormente referido, o pH da emulsão ao fim de 60 minutos de gelificação não é inferior a 4,2 e, portanto, podemos admitir que os dois polímeros interagem daquela maneira.

Pretendia-se, pois, com a adição do quitosano o aumento da estabilidade das microesferas, uma redução do grau de intumescimento e a diminuição da permeabilidade da rede polimérica.

A ligeira diminuição da eficiência de encapsulação observada para as microesferas revestidas pode ser explicada por uma exposição mais longa à agitação. Quando se aumenta o tempo da fase de gelificação pode ocorrer a formação de um maior número de ligações entre a pectina e os iões cálcio, o que resulta num aumento da eficiência de encapsulação. No

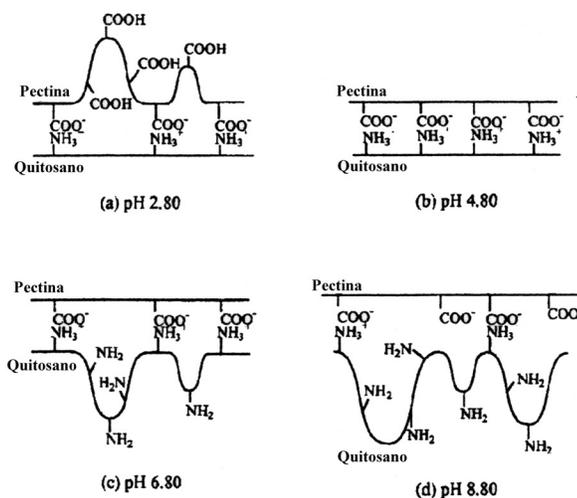


Figura 6.22: Esquema representativo da interacção entre pectina e quitosano (adaptado de (Lee et al., 1997)).

entanto, um período de gelificação mais prolongado pode conduzir à difusão de fármacos mais hidrossolúveis para o meio circundante, reduzindo a eficiência de encapsulação (Liu e Krishnan, 1999). Dos ensaios de libertação verificámos que as microesferas revestidas retiveram 80% de proteína. Isto aconteceu provavelmente devido à agregação que ocorre entre as microesferas durante o processo de revestimento (ver figura 6.23). Estes aglomerados de microesferas exibem uma área de superfície menor e, portanto, estão menos expostas ao meio ácido.

Quando usámos o agente emulsivo na solução de revestimento obtivemos, de facto, um melhoramento da granulometria das microesferas (figura 6.24) mas a libertação de BSA a pH 1,2 aumentou muito significativamente. Este resultado reforça a explicação anterior de que a protecção oferecida se devia ao grau de aglomeração elevado e não ao efeito do revestimento.

Quanto ao revestimento de quitosano em diferentes concentrações, pudémos observar um ligeiro aumento para a retenção da proteína durante o processo de preparação, até um

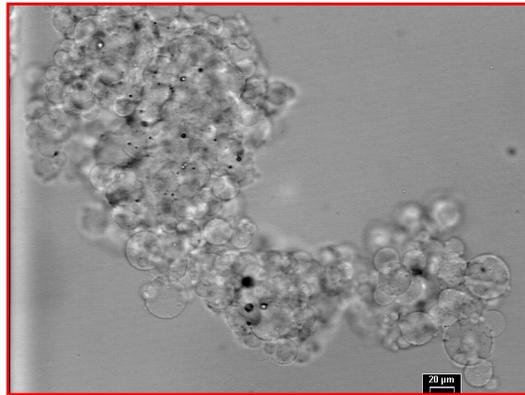


Figura 6.23: Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e revestidas com quitosano. A ampliação foi de 200x.

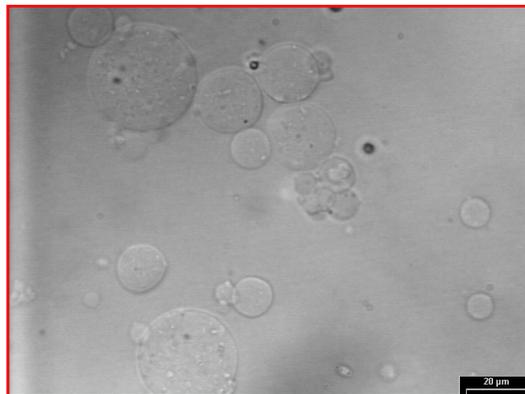


Figura 6.24: Fotografia de microscopia óptica das microesferas preparadas com a pectina LM amidada e revestidas com quitosano contendo Span®80. A ampliação foi de 500x.

máximo a 0,5% (m/v). Aumentando a concentração da solução de revestimento para além deste valor verificou-se uma diminuição da eficiência de encapsulação. Uma concentração de 1,0% (m/v) torna o revestimento mais difícil de conseguir devido à natureza viscosa da solução de quitosano, induzindo uma agregação provavelmente excessiva das microesferas (como se pode observar no aumento dramático do seu tamanho médio). A influência deste factor durante a libertação a pH 1,2 revela um padrão de resposta diferente. Para as concentrações mais baixas de quitosano a libertação é elevada e diminui cerca de 10% para a concentração máxima estudada. Das observações ao microscópio óptico pudémos verificar que as microesferas estão relativamente bem individualizadas e, portanto, este aumento na retenção parece dever-se a alguma protecção do revestimento de quitosano. Na verdade, o método de revestimento determina o limite de interacção do quitosano com as microesferas formadas. Se a solução de revestimento for aplicada numa só etapa (como foi o nosso caso), a quantidade de quitosano que estabelece ligações é baixa, provavelmente porque o quitosano começa por se ligar à superfície das microesferas e forma uma membrana que impede a difusão de outras moléculas de quitosano para o seu interior (Gaserod et al., 1999). Talvez por isso obtivémos alguma protecção apenas para uma solução muito concentrada do polícatião.

A incorporação de tripolifosfato de sódio na solução de pectina/BSA resultou numa ligeira diminuição da eficiência de encapsulação e numa grande diminuição da libertação de BSA a pH 1,2. Pensamos que o tripolifosfato de sódio contribui para um fortalecimento e diminuição da porosidade da matriz, impedindo a difusão da proteína para o meio envolvente. As microesferas revestidas com quitosano apresentam uma eficiência de encapsulação semelhante às não revestidas mas a libertação a pH 1,2 aumenta. Provavelmente o que acontece é que o quitosano compete com a pectina pelo polifosfato e a matriz fica menos resistente, resultando num aumento da libertação relativamente às microesferas não revestidas. Num trabalho de Kawashima e colaboradores (Kawashima et al., 1985) foram preparados grânulos de teofilina revestidos com um complexo quitosano/tripolifosfato de sódio. No procedimento utilizado, o tripolifosfato de sódio foi simultaneamente dis-

perso com a teofilina numa solução de acetato de etilo e os grânulos depois obtidos foram expostos a uma solução de quitosano. Os autores indicam que, durante o processo de revestimento, o tripolifosfato de sódio no grânulo dissolve-se e move-se para a superfície, onde pode reagir com o quitosano. A formação de um complexo que constitui a membrana exterior é revelada pelos registos de microscopia das secções dos grânulos. Estes resultados e as diferenças na microscopia óptica entre as microesferas revestidas e não revestidas (ver figuras 6.19 e 6.20), onde as primeiras praticamente não se distinguem do meio exterior, reforçam a indicação de o tripolifosfato se ligar preferencialmente ao quitosano ocorrendo uma perturbação da rede polimérica e, conseqüentemente, a destruição das microesferas. Por outro lado, ainda existe uma libertação de BSA de apenas cerca de 45% que pensamos suceder devido à retenção da proteína no produto liofilizado e não através da protecção das microesferas.

## Capítulo 7

### CONCLUSÕES

Apesar dos obstáculos até hoje encontrados, o interesse em desenvolver formulações para administrar oralmente proteínas ou fármacos peptídicos é elevado. De facto, muitos fármacos que actualmente só estão disponíveis em formas de administração parenteral estão sujeitas a um enorme esforço para disponibilizar uma forma oral.

As vantagens da administração oral incluem a aceitação e adesão dos doentes, a facilidade de administração, a redução de custos para a indústria farmacêutica resultante da dispensa de esterilização e do envolvimento directo de um técnico de saúde.

As estratégias farmacêuticas para aumentar a absorção no tracto gastrointestinal têm vantagens e inconvenientes. A modificação química pode funcionar para moléculas pequenas mas para moléculas maiores, para as quais estruturas terciárias se tornam muito importantes para a actividade biológica, esta alternativa pode não ter o efeito desejado. A alteração das propriedades da mucosa, através da utilização de promotores de absorção, providencia um aumento da captação das moléculas de fármacos. No entanto, alguns promotores actuam provocando danos irreversíveis à mucosa que, consequentemente, permitem a passagem de enzimas e toxinas. A encapsulação de proteínas ou fármacos peptídicos em partículas poliméricas surge como uma alternativa que providencia a sua protecção.

Devido ao ambiente menos agressivo do tracto gastrointestinal inferior, a libertação específica no cólon aparece também como uma estratégia válida, permitindo uma redução da dose total de fármaco administrada ao doente, dos possíveis efeitos adversos e um aumento da biodisponibilidade oral do fármaco. Nos últimos anos têm sido propostas diversas estratégias para que o fármaco seja libertado especificamente no cólon. A maior parte dos sistemas utilizados baseiam-se na variação do pH ao longo do tracto gastrointestinal, no

tempo de trânsito intestinal e na degradação enzimática pela flora bacteriana existente no cólon. No entanto, devido à variabilidade dos tempos de trânsito intestinal, as estratégias baseadas nas características do local de absorção parecem ser mais adequadas do que as dependentes do tempo. São diversos os polissacarídeos que podem ser degradados pelas enzimas do cólon e a pectina, pela sua abundância, características físico-químicas e por ser natural, biodegradável e não-tóxica, constitui uma alternativa muito promissora.

São inúmeras as técnicas que permitem microencapsular um princípio activo, dependendo do tipo de substância e do mecanismo de libertação. A maior dificuldade dos sistemas micropartícula está relacionada com a necessidade de as proteínas ou fármacos peptídicos permanecerem estáveis durante o processo de encapsulação, armazenamento e libertação *in vivo*. As microesferas de pectina são geralmente preparadas por extrusão/gelificação externa, mas esta técnica apresenta limitações no que diz respeito à redução do tamanho e transposição de escala.

O nosso principal objectivo foi a preparação de microesferas por um método de emulsificação/gelificação interna. Em condições moderadas de temperatura e agitação, e com os materiais seleccionados, conseguimos obter microesferas de pectinato de cálcio contendo BSA. A granulometria apresentou-se unimodal e, de forma geral, mostrou um baixo índice de polidispersão. Para todos os parâmetros estudados obtivemos eficiências de encapsulação acima dos 90%.

Podemos concluir que os parâmetros de processo relacionados com a fase de emulsificação não influenciam significativamente a libertação da proteína durante a preparação das microesferas ou após incubação em meio ácido a pH 1,2, sendo mais influentes no controlo do tamanho das microesferas. A eficiência de encapsulação e a libertação da proteína a pH 1,2 dependem sobretudo dos parâmetros de formulação.

Uma vez que não são utilizados reagentes tóxicos ou solventes orgânicos no método descrito, podem ser consideradas aplicações biológicas e alimentares. Além disso, como a fase de emulsificação é determinante no controlo do tamanho das microesferas e no rendimento de produção e as dispersões podem ser facilmente reproduzidas, são imensas as

potencialidades do método relativamente à conversão à escala industrial.

## BIBLIOGRAFIA

- AFTABROUCHAD, C. e DOELKER, E. (1992), *Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs*. S. T. P. Pharma Sciences, 2: 365.
- AHRABI, S. F., MADSEN, G., DYRSTAD, K., SANDE, S. A. e GRAFFNER, C. (2000), *Development of pectin matrix tablets for colonic delivery of model drug ropivacaine*. Eur. J. Pharm. Sci, 10: 43.
- ALLÉMANN, E., LEROUX, J.-C. e GURNY, R. (1998), *Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics*. Adv. Drug Deliv. Rev., 34: 171.
- ANDOH, A., BAMBA, T. e SASAKI, M. (1999), *Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber and butyrate in intestinal functions*. J. Parent. Ent. Nutr., 23: 70.
- ANGYAL, S. J. (1989), *Complex of metal cations with carbohydrates in solution*. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 47: 1.
- ANONYMOUS (2000), *Modified citrus pectin-monograph*. Altern. Med. Rev., 5: 573.
- ARAL, C. e AKBUGA, J. (1998), *Alternative approach to the preparation of chitosan beads*. Int. J. Pharm., 168: 9.
- ARSHADY, R. (1990), *Albumin microspheres and microcapsules: methodology of manufacturing*. J. Control. Release, 14: 111.
- ARSHADY, R. (1991), *Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules. Part 2. Polyactides and related polyesters*. J. Control. Release, 17: 1.

- ARSHADY, R. e LEDWITH, A. (1983), *Suspension polymerization and its application to the preparation of polymer supports*. *Reactive Polym.*, 1: 159.
- ASHFORD, M. e FELL, J. T. (1994), *Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration*. *J. Drug Target.*, 2: 241.
- ASHFORD, M., FELL, J. T., ATTWOOD, D., SHARMA, H. e WOODHEAD, P. (1993), *An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon*. *J. Control. Release*, 26: 213.
- ASHFORD, M., FELL, J. T., ATTWOOD, D., SHARMA, H. e WOODHEAD, P. (1994), *Studies on pectin formulations for colonic drug delivery*. *J. Control. Release*, 30: 225.
- AXELOS, M. A. V. e THIBAUT, J. F. (1991), *The chemistry of low methoxyl pectin*. In R. H. Walter, ed., *The Chemistry and technology of pectin*, 109, Academic Press, New York.
- AYDİN, Z. e AKBUGA, J. (1996), *Preparation and evaluation of pectin beads*. *Int. J. Pharm.*, 137: 133.
- BAIER, M., GOLDBERG, R., CATESSON, A. M., LIBERMAN, M., BOUCHEMAL, N., MICHON, V. e HERVE-PENHOAT, C. (1994), *Pectin changes in samples containing poplar cambium and inner bark in relation to the seasonal cycle*. *Planta*, 193: 446.
- BEMILLER, J. N. e WHISTLER, R. L. (1958), *Alkaline degradation of polysaccharides*. *Adv. Carb. Chem.*, 13: 289.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A. (1998), *The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins*. *J. Control. Release*, 52: 1.
- BIENAIMÉ, C., BARBOTIN, J.-N. e NAVA-SAUCEDO, J.-E. (2003), *How to build an adapted and bioactive cell microenvironment? A chemical interaction study of the structure*

- of Ca-alginate matrices and their repercussion on confined cells.* J. Biomed. Mater. Res., 67: 376.
- BINNS, J., STEVENS, H. N. E., MCEWEN, J., PRITCHARD, G., BREWER, F. M., CLARKE, A., JOHNSON, E. S. e MCMILLAN, I. (1996), *The tolerability of multiple oral doses of Pulsincap<sup>TM</sup> capsules in healthy volunteers.* J. Control. Release, 38: 151.
- BLACK, S. A. e SMIT, C. J. B. (1972), *The effect of demethylation procedures on the quality of low ester pectins used in dessert gels.* J. Food Sci., 37: 730.
- BOADI, D. K. e NEUFELD, R. J. (2001), *Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins.* Enzyme Microb. Techn., 28: 590.
- BRACCINI, I., GRASSO, R. P. e PÉREZ, S. (1999), *Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation.* Carbohydr. Res., 317: 119.
- BRAKE, N. C. e FENNEMA, O. R. (1993), *Edible coatings to inhibit lipid migration in a confectionary product.* J. Food Sci., 58: 1422.
- BURGESS, D. J. e HICKEY, A. J. (1994), *Microsphere technology and applications.* In *Encyclopedia of Pharmaceutical technology*, Marcel Dekker, New York.
- BURTON, P. S., CONRADI, R. A. e HILGERS, A. R. (1991), *Transcellular mechanism of peptide and protein absorption: passive aspects.* Adv. Drug Deliv. Rev., 7: 365.
- CHAN, L. W., LEE, H. Y. e HENG, P. W. S. (2002), *Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method.* Int. J. Pharm., 242: 259.
- CHAN, W. A., BOSWELL, C. D. e ZHANG, Z. (2001), *Comparison of the release profiles of a water soluble drug carried by Eudragit-coated capsules in different in vitro dissolution liquids.* Powder Technology, 119: 26.

- 
- CHANG, K. L. B. e LIN, J. (2000), *Swelling behaviour and the release of protein from chitosan-pectin composite particles*. Carbohydr. Polym., 43: 163.
- CHASTEIGNER, S., FESSI, H., CAVÉ, G., DEVISSAGUET, J.-P. e PUISIEUX, F. (1995), *Gastrointestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules*. S. T. P. Pharma Sciences, 5: 242.
- CHEN, H. e LANGER, R. (1998), *Oral particulate delivery: status and future trends*. Adv. Drug Deliv. Rev., 34: 339.
- CHOURASIA, M. K. e JAIN, S. K. (2003), *Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems*. J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 6: 33.
- COLLETIER, J.-P., CHAIZE, B., WINTERHALTER, M. e FOURNIER, D. (2002), *Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer*. BMC Biotechnology, 2: 9.
- COMPANY, A. (1970). British Patent. P.158.
- CONTE, U. e MAGGI, L. (1996), *Modulation of the dissolution profiles from Geomatrix® multi-layer matrix tablets containing drugs of different solubility*. Biomaterials, 17: 889.
- DABORA, E. K. (1967), *Production of monodisperse sprays*. Rev. Sci. Instrum., 38: 502.
- DAVIS, S. S. (1990), *Overcoming barriers to the oral administration of peptide drugs*. Trends Pharm. Sci., 11: 353.
- DELIE, F. (1998), *Evaluation of nano- and microparticle uptake by the gastrointestinal tract*. Adv. Drug Deliv. Rev., 34: 221.
- DEMARTY, M., MORVAN, C. e THELLIER, M. (1984), *Calcium and the cell wall*. Plant Cell Environ., 7: 441.

- DIÁZ-ROJAS, E. I., PACHECO-AGUILAR, R., LIZARDI, J., ARGÜELLES-MONAL, W., VALDEZ, M. A., RINAUDO, M. e GOYCOOLEA, F. M. (2004), *Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil*. Food Hydrocolloids, 18: 293.
- EICHEL, H. J. (1967). US Patent. P.109.
- EL-GIBALY, I. (2002), *Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery*. Int. J. Pharm., 232: 199.
- ERMAK, T. H. e GIANNASCA, P. J. (1998), *Microparticle targeting to M cells*. Adv. Drug Deliv. Rev., 34: 261.
- ESPOSITO, E., CORTESI, R., LUCA, G. e NASTRUZZI, C. (2001), *Pectin-based microspheres: a preformulatory study*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 944: 160.
- ESQUISABEL, A., HERNÁNDEZ, R. M., IGARTUA, M., GASCÓN, A. R., CALVO, M. B. e PEDRAZ, J. L. (1997), *Production of BCG alginate-PLL microcapsules by emulsification/internal gelation*. J. Microencapsul., 14: 627.
- FELL, J. T. (1992), *Gastrointestinal transit of microcapsules*. In M. Donbrow, ed., *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*, 159, CRC Press, London.
- FERNANDEZ, M. L. (1995), *Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fiber in the guinea pig: specific effects of pectin, guar gum, and psyllium*. Lipid Res., 36: 2394.
- FERNÁNDEZ-HERVÁS, M. J. e FELL, J. T. (1998), *Pectin/chitosan mixtures as coatings for colon-specific drug delivery: an in vitro evaluation*. Int. J. Pharm., 169: 115.
- FIX, J. A. (1996a), *Oral controlled release technology for peptides: status and future prospects*. Pharm. Res., 13: 1760.

- FIX, J. A. (1996b), *Strategies for delivery of peptides utilizing absorption-enhancing agents*. J. Pharm. Sci., 85: 1282.
- FLORENCE, A. T. (1997), *The oral absorption of micro- and nanoparticles: neither exceptional nor unusual*. Pharm. Res., 14: 259.
- FLORENCE, A. T., HILLERY, A. M., HUSSAIN, N. e JANI, P. U. (1995), *Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: studies on particle uptake and fate*. J. Control. Release, 36: 39.
- FREIBERG, S. e ZHU, X. X. (2004), *Polymer microspheres for controlled drug release*. Int. J. Pharm., 282: 1.
- FRIEDLI, G.-L. (1996), *Interaction of deamidated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals*. Tese de Doutorado, University of Surrey, England.
- FRIEND, D. R. (1991), *Colon-specific drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 7: 149.
- FUNDUEANU, G., ESPOSITO, E., MIHAI, D., CARPOV, A., DESBRIERES, J., RINAUDO, M. e NASTRUZZI, C. (1998), *Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method*. Int. J. Pharm., 170: 11.
- FUNDUEANU, G., NASTRUZZI, C., CARPOV, A., DESBRIERES, J. e RINAUDO, M. (1999), *Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods*. Biomaterials, 20: 1427.
- GALIBOIS, I., DESROSIERS, T., GUEVIN, N., LAVIGNE, C. e JACQUES, H. (1994), *Effects of dietary fibre mixtures on glucose and lipid metabolism and on mineral absorption in the rat*. Ann. Nutr. Metab., 38: 203.
- GARCIA-DIEZ, F., GARCIA-MEDIAVILLA, V., BAYON, J. E. e GONZALEZ-GALLEGO (1996), *Pectin feeding influences fecal bile acid excretion, hepatic bile acid and cholesterol synthesis and serum cholesterol in rats*. J. Nutr., 126: 1766.

- GARNIER, C., AXELOS, A. V. M. e THIBAUT, J. F. (1993), *Phase diagrams of pectin-calcium systems: influence of temperature on the gelation of pectins with different degrees of methylation*. Carb. Res., 240: 219.
- GASEROD, O., SANNES, A. e SKJAK-BRAEK, G. (1999), *Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability*. Biomaterials, 20: 773.
- GEIGY, R. J. (1957). Swiss Patent. P.888.
- GILABERT, J. P. (0000), *Degradaciòn enzimàtica y característics físics y químics de la pectina del bagazo de melocotón*. Tese de Doutoramento, Universitat de Lleida, Salamanca.
- GIUNCHEDI, P. e CONTE, U. (1995), *Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: overview*. S. T. P. Pharma Sciences, 5: 276.
- GIUNCHEDI, P., CONTE, U., CHETONI, P. e SAETTONE, M. F. (1999), *Pectin microspheres as ophthalmic carriers for piroxicam: evaluation in vitro and in vivo in albino rabbits*. Eur. J. Pharm. Sci, 9: 1.
- GLICKMAN, M. (1969), *Gum technology in the food industry*. Academic Press, New York.
- GOLDBLITH, S. A. (1978), *Introducciòn a la bioquímica de los alimentos*. Ediciones Omega, Barcelona.
- GOUIN, S. (2004), *Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends*. Trends Food Sci. Technol., 15: 330.
- GRANT, G. T., MORRIS, E. R., REES, D. A., SMITH, P. J. C. e THOM, D. (1973), *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg box model*. FEBS Lett., 32: 195.
- GROSS, M., RAO, V. N. M. e SMIT, C. J. B. (1980), *Rheological characterization of low methoxyl pectin gel by normal creep and relaxation*. J. Text. Stud., 11: 271.

- GUARNER, F. e MALAGELADA, J.-R. (2003), *Gut flora in health and disease*. The Lancet, 361: 512.
- GUTERRES, S. S., WEISS, V., FREITAS, L. L. e POHLMANN, A. R. (2000), *Influence of benzylbenzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin*. Drug Delivery, 7: 195.
- GUYTON, A. C. e HALL, J. E. (1998), *Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
- GÜRSOY, A., EROGLU, L., ULUTIN, S., TASYUREK, M., FESSI, H. e PUISIEUX, F. (1989), *Evaluation of indomethacin nanocapsules for their physical stability and inhibitory activity on inflammation and platelet-aggregation*. Int. J. Pharm., 52: 101.
- HASTEWELL, J., WILLIAMSON, I. e MACKAY, M. (1991), *Cell biology and active transport processes in the colon*. Adv. Drug Deliv. Rev., 7: 119.
- HAWANG, J. e KOKINI, J. L. (1992), *Contribution of the side chains to rheological properties of pectins*. Carbohydr. Polym., 19: 41.
- HAYASHI, A., GILLEN, A. C. e LOTT, J. R. (2000), *Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin*. Altern. Med. Rev., 5: 546.
- HE, X. M. e CARTER, D. C. (1992), *Atomic structure and chemistry of human serum albumin*. Nature, 358: 209.
- HEALEY, J. N. C. (1989), *Drug delivery to the gastrointestinal tract*. In M. H. Rubinstein, ed., *Pharmaceutical Technology*, Ellis Horwood Limited, West Sussex.
- HEJAZI, R. e AMIJI, M. (2003), *Chitosan-based gastrointestinal delivery systems*. J. Control. Release, 89: 151.
- HENG, P. W. S., CHAN, L. W. e WONG, T. W. (2003), *Formation of alginate microspheres produced using emulsification technique*. J. Microencapsul., 20: 401.

- HENSEL, A. e MEIER, K. (1999), *Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds*. *Planta Med.*, 65: 395.
- HILLS, B. P., GODWARD, J., DEBATTY, M., BARRAS, L., SATURIO, C. P. e OUWERX, C. (2000), *NMR studies of calcium induced alginate gelation. PartII. The internal bead structure*. *Magn. Reson. Chem.*, 38: 719.
- HIORTH, M., THO, I. e SANDE, S. A. (2003), *The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 56: 175.
- HOLT, S., HEADING, R. C., CARTER, D. C., PRESCOTT, L. F. e TOTHILL, P. (1979), *Effect of gel fibre on gastric emptying and absorption of glucose and paracetamol*. *The Lancet*, 1: 636.
- HOMMEL, M., SUN, A. M. e GOOSEN, M. F. A. (1988), *Droplets generation*. Canadian Patent. 1241598.
- HU, Z., KIMURA, G., MAWATARI, S., SHIMOKAWA, T., YOSHIKAWA, Y. e TAKADA, K. (1998), *New preparation method of intestinal pressure-controlled colon delivery capsules by coating machine and evaluation in beagle dogs*. *J. Control. Release*, 56: 293.
- HUGUET, M. L. e DELLACHERIE, E. (1996), *Calcium alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release*. *Process Biochem.*, 31: 745.
- HULST, A. C., TRAMPER, J., BRODELIUS, P., EIJKENBOOM, L. J. C. e LUYBEN, C. A. M. (1985), *Immobilised plant cells: respiration and oxygen transfer*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 35: 198.
- IBEKWE, V. C., KENDALL, R. A. e BASIT, A. W. (2004), *Drug delivery to the colon*. *Technology/Industry Overviews*, 27.

- ISMAIL, M. F., GAD, M. Z. e HAMDY, M. A. (1999), *Study of the hypolipidemic properties of pectin, garlic and ginseng in hypercholesterolemic*. Pharmacol. Res., 39: 157.
- JOESTEN, M. D. e SCHAAD, L. J. (1974), *Hydrogen bonding*. Marcel Dekker, New York.
- JOSEPH, G. H. (1956), *Pectin bibliography of pharmaceutical literature*. Sunskist Growers, Ontario CA.
- JOSEPH, I. e VENKATARAM, S. (1995), *Indomethacin sustained release from alginate-gelatin or pectin-gelatin coacervates*. Int. J. Pharm., 126: 161.
- JUNG, T., KAMM, W., BREITENBACH, A., KAISERLING, E., XIAO, J. X. e KISSEL, T. (2000), *Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?* Eur. J. Pharm. Biopharm., 50: 147.
- KAFAROV, V. V. e BABANOV, B. M. (1959), *Phase contact area of immiscible liquids during agitation by mechanical stirrers*. J. Appl. Chem USSR, 32: 810.
- KAWAKATSU, T., TRÄGARDH, G. e TRÄGARDH, C. (2001), *Production of W/O/W emulsions and S/O/W pectin microcapsules by microchannel emulsification*. Colloids and Surfaces A, 189: 257.
- KAWASHIMA, Y., HANDA, T., KASAI, A., TAKENAKA, H., LIN, S. Y. e ANDO, Y. (1985), *Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan*. J. Pharm. Sci., 74: 264.
- KIM, M. e ATALLAH, M. T. (1992), *Structure of dietary pectin, iron bioavailability and hemoglobin repletion in anemic rats*. J. Nutr., 122: 2298.
- KIM, M. e ATALLAH, M. T. (1993), *Intestinal solubility and absorption of ferrous iron in growing rats are affected by different dietary pectins*. J. Nutr., 123: 117.

- KIM, M., ATALLAH, M. T., AMARASIRIWARDENA, C. e BARNES, R. (1996), *Pectin with low molecular weight and high degree of esterification increases absorption of  $^{58}\text{Fe}$  in growing rats*. J. Nutr., 126: 1883.
- KIM, T. H., PARK, Y. H., KIM, K. J. e CHO, C. S. (2003), *Release of albumin from chitosan-coated pectin beads in vitro*. Int. J. Pharm., 250: 371.
- KIM, W. J., RAO, V. N. M. e SMIT, C. J. B. (1978a), *Effect of chemical composition on compressive mechanical properties of low ester pectin gels*. J. Food Sci., 43: 572.
- KIM, W. J., SUSULSKIU, F. e REES, S. C. K. (1978b), *Chemical and gelation characteristics of ammonia-demethylated sunflower pectins*. J. Food Sci., 43: 1436.
- KOHN, R. (1982), *Binding of toxic cations to pectin, its oligomeric fragments and plant tissues*. Carbohydr. Polym., 2: 273.
- KOHN, R. (1987), *Binding of divalent cations to oligomeric fragments of pectin*. Carbohydr. Res., 160: 343.
- KOKINI, J. L. e CHOU, T. C. (1993), *Comparison of the conformation of tomato pectins with apple and citrus pectins*. J. Text. Stud., 24: 117.
- KOMPELLA, U. B. e LEE, V. H. L. (2001), *Delivery systems for for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations*. Adv. Drug Deliv. Rev., 46: 211.
- KUMAR, G. P., SUDHEESH, S. e VIJAYALAKSHMI, N. R. (1993), *Hypoglycaemic effect of coccinia indica: mechanism of action*. Planta Med., 59: 330.
- KUMAR, M. N. V. R. (2000), *Nano and microparticles as controlled drug delivery devices*. J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 3: 234.
- LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A. e KANING, J. L. (2001), *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

- LACROIX, C., PAQUIN, C. e ARNAUD, J.-P. (1990), *Batch fermentation with entrapped growing cells of Lactobacillus casei; optimization of the entrapment gel matrix*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 32: 403.
- LAI, M. C. e TOPP, E. M. (1999), *Solid-state chemical stability of proteins and peptides*. J. Pharm. Sci., 88: 489.
- LANGGUTH, P., BOHNER, V., HEIZMANN, J., MERKLE, H. P., WOLFFRAM, S., AMIDON, G. L. e YAMASHITA, S. (1997), *The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery*. J. Control. Release, 46: 59.
- LAVELLE, E. C., SHARIF, S., THOMAS, N. W., HOLLAND, J. e DAVIS, S. (1995), *The importance of gastrointestinal uptake of particles in the design of oral delivery systems*. Adv. Drug Deliv. Rev., 18: 5.
- LEE, K. Y., PARK, W. H. e HA, W. S. (1997), *Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules*. J. Appl. Polym. Sci., 63: 425.
- LENCKI, R. W. J., NEUFELD, R. J. e SPINNEY, T. (1989), *Microspheres and method of producing same*. US Patent. 4822534.
- LIM, B. O., YAMADA, K., NONAKA, M., KURAMOTO, Y., HUNG, P. e SUGANO, M. (1997), *Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats*. J. Nutr., 127: 663.
- LIM, F. e MOSS, R. D. (1981), *Microencapsulation of living cells and tissues*. J. Pharm. Sci., 70: 351.
- LIM, F. e SUN, A. M. (1980), *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. Science, 210: 908.
- LIU, L., FISHMAN, M. L., KOST, J. e HICKS, K. B. (2003), *Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route*. Biomaterials, 24: 3333.

- 
- LIU, P. e KRISHNAN, T. R. (1999), *Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation*. J. Pharm. Pharmacol., 51: 141.
- LORENZO, C. D., WILLIAMS, C. M., HAJNAL, F. e VALENZUELA, J. E. (1988), *Pectin delays gastric emptying and increases satiety in obese subjects*. Gastroenterology, 95: 1211.
- LUZZI, L. A. (1970), *Microencapsulation*. J. Pharm. Sci., 59: 1367.
- MACKAY, A. L., BLOOM, M., TEPFER, M. e TAYLOR, I. E. P. (1982), *Broadline proton magnetic resonance study of cellulose, pectin and bean cell walls*. Biopolymers, 21: 1521.
- MACKAY, M., PHILLIPS, J. e HASTEWELL, J. (1997), *Peptide drug delivery: colonic and rectal absorption*. Adv. Drug Deliv. Rev., 253: 28.
- MACLEOD, G., FELL, J. T. e COLLETT, J. H. (1999a), *An in vitro investigation into the potential for bimodal drug release from pectin/chitosan/HPMC-coated tablets*. Int. J. Pharm., 188: 11.
- MACLEOD, G. S., COLLETT, J. H. e FELL, J. T. (1999b), *The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release*. J. Control. Release, 58: 303.
- MACLEOD, G. S., FELL, J. T. e COLLETT, J. H. (1997), *Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery*. Int. J. Pharm., 157: 53.
- MACLEOD, G. S., FELL, J. T., COLLETT, J. H. e SMITH, A.-M. (1999c), *Selective drug delivery to the colon using pectin:chitosan: hydroxylpropylmethylcellulose film coated tablets*. Int. J. Pharm., 187: 251.
- MAY, C. D. (1990), *Industrial pectins: sources, production and applications*. Carbohydr. Polym., 12: 79.

- MAY, C. D. e STAINSBY, G. (1986), *Factors affecting pectin gelation*. In G. O. Philip, D. J. Wedlock e P. A. Williams, eds., *Gum and stabilizers for the food industry*, Elsevier, London.
- MCMULLEN, J. N., NEWTON, D. W. e BECKER, C. H. (1982), *Pectin-gelatin complex coacervates. I: Determinants of microglobule size morphology and recovery as water-dispersible powders*. J. Pharm. Sci., 71: 628.
- MCMULLEN, J. N., NEWTON, D. W. e BECKER, C. H. (1984), *Pectin-gelatin complex coacervates. II: Effect of microencapsulated sulfamerazine on size morphology, recovery and extraction of water-dispersible microglobules*. J. Pharm. Sci., 73: 1799.
- MCWILLIAMS, M. (1974), *Food fundamentals*. John Wiley & Sons, New York.
- MESHALI, M. M., EL-DIEN, E. Z., OMAR, S. A. e LUZZI, L. A. (1992), *A new approach to encapsulating non-steroidal anti-inflammatory drugs. V. Biopharmaceutical study of microcapsules of azapropazone coated with pectin and rutin*. J. Microencapsul., 9: 67.
- MESHALI, M. M. e GABR, K. E. (1993), *Effect of interpolymer complex formation of chitosan with pectin or acacia on the release behaviour of chlorpromazine HCl*. Int. J. Pharm., 89: 177.
- MEYER, J., WHITCOMB, L. e COLLINS, D. (1994), *Efficient encapsulation of proteins within liposomes for slow release in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 199: 433.
- MITREVEJ, A., SINCHAIPANID, N., RUNGVEJHAVUTTIVITTAYA, Y. e KOSIT-CHAIYONG, V. (2001), *Multiunit controlled-release diclofenac sodium capsules using complex of chitosan with sodium alginate or pectin*. Pharm. Dev. Technol., 6: 385.
- MIYAWAKI, O., NAKAMURA, K. e YANO, T. (1980), *Permeability and molecular sieving characteristics of nylon microcapsule membrane*. Agric. Biol. Chem., 44: 2865.

- MIYAZAKI, S., KAWASAKI, N., NAKAMURA, T., IWATSU, M., HAYASHI, T., HOU, W.-M. e ATTWOOD, D. (2000), *Oral mucosal bioadhesive tablets of pectin and HPMC: in vitro and in vivo evaluation*. Int. J. Pharm., 204: 127.
- MORRIS, E. R., GIDLEY, M. J., MURRAY, E. J., POWELL, D. A. e REES, D. A. (1980), *Characterization of pectin gelation under conditions of low water activity by circular dichroism, comparative inhibition and mechanical properties*. Int. J. Biol. Macromol., 2: 327.
- MORRIS, E. R., POWELL, D. A., GIDLEY, M. J. e REES, D. A. (1982), *Conformations and interactions of pectins. I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate*. J. Mol. Biol., 155: 507.
- MRSNY, R. J. (1992), *The colon as a site for drug delivery*. J. Control. Release, 22: 15.
- MUNJERI, O., COLLECT, J. H. e FELL, J. T. (1997), *Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release*. J. Control. Release, 46: 273.
- MUNJERI, O., COLLETT, J. H., FELL, J. T., SHARMA, H. L. e SMITH, A.-M. (1998a), *In vivo behavior of hydrogel beads based on amidated pectins*. Drug Delivery, 5: 239.
- MUNJERI, O., HODZA, P., OSIM, E. E. e MUSABAYANE, C. T. (1998b), *An investigation into the suitability of amidated pectin hydrogel beads as a delivery matrix for chloroquine*. J. Pharm. Sci., 87: 905.
- MURAOKA, M., HU, Z., SHIMOKAWA, T., SEKINO, S., KUROGOSHI, R., KUBOI, Y., YOSHIKAWA, Y. e TAKADA, K. (1998), *Evaluation of intestinal pressure-controlled colon delivery capsule containing caffeine as a model drug in human volunteers*. J. Control. Release, 52: 119.

- MURATA, Y., MAEDA, T., MIYAMOTO, E. e KAWASHIMA, S. (1993), *Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads - effects of chitosan on gel matrix erosion*. Int. J. Pharm., 96: 139.
- MURATA, Y., MIYASHITA, M., KOFUJI, K., MIYAMOTO, E. e KAWASHIMA, S. (2004), *Drug release properties of a gel bead prepared with pectin and hydrolysate*. J. Control. Release, 95: 61.
- MURILLO, M., ESPUELAS, S., PRIOR, S., VITAS, A. I., RENEDO, M. J., GOÑI, M. M., IRACHE, J. M. e GAMAZO, C. (2001), *Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas*. Rev. Med. Univ. Navarra, 45: 19.
- MUSABAYANE, C. T., MUNJERI, O., BWITITI, P. e OSIM, E. E. (2000), *Orally administered, insulin-loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats*. J. Endocrinol., 164: 1.
- NAGGAR, V. F., EL-KHAWAS, M., ISMAIL, F. A. e BORAIE, N. A. (1992), *Pectin, a possible matrix for oral sustained-release preparations of water-soluble drugs*. S. T. P. Pharma Sciences, 2: 227.
- NAKAI, S. e LI-CHAN, E. (1988), *Hydrophobic interactions in food systems*. CRC Press, FL.
- NELLANS, H. N. (1990), *Paracellular and intestinal transport: modulation of absorption*. Adv. Drug Deliv. Rev., 7: 339.
- NIE, Y., LI, Y., WU, H., SHA, W., DU, H., DAI, S., WANG, H. e LI, Q. (1999), *Colloidal bismuth pectin: an alternative to bismuth subcitrate for the treatment of Helicobacter pylori-positive duodenal ulcer*. Helicobacter, 4: 128.
- NISHIMURA, N., TANIGUCHI, Y. e KIRIYAMA, S. (2000), *Plasma cholesterol-lowering effect on rats of dietary fiber extracted from immature plants*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 64: 2543.

- OAKENFULL, D. e SCOTT, A. (1984), *Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins*. J. Food Sci., 49: 1093.
- OAKENFULL, D. e SCOTT, A. (1986), *New approaches to the investigation of food gels*. In G. O. Philip, D. J. Wedlock e P. A. Williams, eds., *Gum and stabilizers for the food industry*, Elsevier, London.
- OFORI-KWAKYE, K. e FELL, J. T. (2001), *Biphasic drug release: the permeability of films containing pectin, chitosan and HPMC*. Int. J. Pharm., 226: 139.
- OFORI-KWAKYE, K. e FELL, J. T. (2003), *Biphasic drug release from film-coated tablets*. Int. J. Pharm., 250: 431.
- OFORI-KWAKYE, K., FELL, J. T., SHARMA, H. L. e SMITH, A.-M. (2004), *Gamma scintigraphic evaluation of film-coated tablets intended for colonic or biphasic release*. Int. J. Pharm., 270: 307.
- O'HAGAN, D. T. (1998), *Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines*. Adv. Drug Deliv. Rev., 34: 305.
- OAKENFULL, D. G. (1991), *The chemistry of high methoxyl pectins*. In R. H. Walter, ed., *The Chemistry and technology of pectin*, 87, Academic Press, New York.
- O'NEILL, M. A., DARVILL, A. G. e ALBERSHEIN, P. (2001), *Pectic substances*. Encyclopedia of Life Sciences, 0: 1.
- OSTBERG, T., VESTERHUS, L. e GRAFFNER, C. (1993), *Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: II. Effect of process and formulation factors on matrix properties*. Int. J. Pharm., 97: 183.
- PELAEZ, C. e KAREL, M. (1981), *Improved method for preparation of fruit-simulating alginate gels*. J. Food Process Preserv., 5: 63.

- PILLAY, V. e FASSIHI, R. (1999a), *In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics*. J. Control. Release, 59: 229.
- PILLAY, V. e FASSIHI, R. (1999b), *In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets*. J. Control. Release, 59: 243.
- PLASCHINA, I. G., BRAUDO, E. E. e TOLSTAGUZOV, V. B. (1978), *Circular-dichroism studies of pectin solutions*. Carbohydr. Res., 60: 1.
- PONCELET, D. (2001), *Production of alginate beads by emulsification/internal gelation*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 944: 74.
- PONCELET, D., BABAK, V., DULIEU, C. e PICOT, A. (1999), *A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation*. Colloids and Surfaces A, 155: 171.
- PONCELET, D., LENCKI, R., BEAULIEU, C., HALLE, J. P. e FOURNIER, A. (1992), *Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38: 39.
- PONCELET, D., SMET, B. P. D., BEAULIEU, C., HUGUET, M. L., FOURNIER, A. e NEUFELD, R. J. (1995), *Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. II. Physicochemistry*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 43: 644.
- POWELL, D. A., MORRIS, E. R., GIDLEY, M. J. e REES, D. A. (1982), *Conformation and interactions of pectins. II. Influence of residue sequence on their chain dissociation in calcium pectate gels*. J. Mol. Biol., 155: 517.
- PUTNEY, S. D. (1998), *Encapsulation of proteins for improved delivery*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 548.

- RABBANI, G. H., TEKA, T., ZAMAN, B., MAJID, M., KHATUN, M. e FUCHS, G. J. (2001), *Clinical studies in persistent diarrhea: dietary management with green banana in bangladeshi children*. *Gastroenterology*, 121: 554.
- RAO, M. A. e COOLEY, H. J. (1994), *Influence of glucose and fructose on high methoxyl pectin gel strength and structure development*. *J. Food Qual.*, 17: 21.
- RAVANAT, G. e RINAUDO, M. (1980), *Investigation on oligo and polygalacturonic acids by potentiometry and circular dichroism*. *Biopolymers*, 9: 2209.
- REES, D. A. e WIGNT, A. W. (1971), *Polysaccharide conformation. VII. Model building computations for  $\alpha$ , 1-4-galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances*. *J. Chem. Soc. B*, 1366.
- RINAUDO, M., RAVANAT, G. e VINCEDON, M. (1980), *NMR investigation on oligo and poly(galacturonic acid)s gel formation in the presence of  $Ca^{2+}$  counterions*. *Macromolekule*, 181: 1059.
- RIUNITE, S.-T. I. P. (1970). British Patent. P.870.
- RODRÍGUEZ, M., VILLA-JATO, J. L. e TORRES, D. (1998), *Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region*. *J. Control. Release*, 55: 67.
- ROTHSCHILD, M. A., ORATZ, M. e SCHREIBER, S. S. (1988), *Serum albumin*. *Hepatology*, 8: 385.
- RUBINSTEIN, A. (2000), *Natural polysaccharides as targeting tools of drugs to the human colon*. *Drug Dev. Res.*, 50: 435.
- RUBINSTEIN, A., R., EZRA, M., PATHAK, S. e ROKEM, J. S. (1993), *In vitro evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier*. *Pharm. Res.*, 10: 258.

- RUBINSTEIN, A. e RADAI, R. (1995), *In vitro and in vivo analysis of colon specificity of calcium pectinate formulations*. Eur. J. Pharm. Sci, 41: 291.
- RUBINSTEIN, A., TIROSH, B., BALUOM, M., NASSAR, T., DAVID, A., RADAI, R., GLIKO-KABIR, I. e FRIEDMAN, M. (1997), *The rationale for peptide drug delivery to the colon and the potential for polymeric carriers as effective tools*. J. Control. Release, 46: 59.
- SAKUMA, S., HAYASHI, M. e AKASHI, M. (2001), *Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 47: 21.
- SARCIAUX, J. M., ACAR, L. e SADO, P. A. (1995), *Using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides*. Int. J. Pharm., 120: 127.
- SCHAFFAZICK, S. R. e GUTERRES, S. S. (2003), *Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos*. Quím. Nova, 26: 726.
- SCHWARTZ, S. E., LEVINE, R. A., WEINSTOCK, R. S., PETOKAS, R. S., MILLS, C. A. e THOMAS, F. D. (1982), *Sustained pectin ingestion delays gastric emptying*. Gastroenterology, 83: 812.
- SCHWARTZ, S. E., LEVINE, R. A., WEINSTOCK, R. S., PETOKAS, R. S., MILLS, C. A. e THOMAS, F. D. (1988), *Sustained pectin ingestion: effect on gastric emptying and glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetic patients*. Am. J. Clin. Nutr., 48: 1413.
- SCULLY, D. B. (1976), *Scale up in suspension polymerization*. J. Appl. Polym. Sci., 20: 2299.
- SEMDÉ, R., AMIGHI, K., DEVLEESCHOUWER, M. J. e MOËS, A. (2000a), *Studies of pectin HM/Eudragit RL/Eudragit NE film-coating formulations intended for colonic drug delivery*. Int. J. Pharm., 197: 181.

- SEMDÉ, R., AMIGHI, K., DEVLEESCHOUWER, M. J. e MOËS, A. J. (2000b), *Effect of pectinolytic enzymes on the theophylline release from pellets coated with water insoluble polymers containing pectin HM or calcium pectinate*. Int. J. Pharm., 197: 169.
- SEMDÉ, R., AMIGHI, K., PIERRE, D., DEVLEESCHOUWER, M. J. e MOËS, A. J. (1998), *Leaching of pectin from mixed pectin/insoluble polymer films intended for colonic drug delivery*. Int. J. Pharm., 174: 233.
- SEMDÉ, R., MOËS, A. J., DEVLEESCHOUWER, M. J. e AMIGHI, K. (2002), *In vitro evaluation of epichlorohydrin cross-linked pectins as colon-specific drug delivery carriers*. S. T. P. Pharma Sciences, 12: 293.
- SHEN, H., HE, L., PRICE, R. L. e FERNANDEZ, M. L. (1998), *Dietary soluble fiber lowers plasma LDL cholesterol concentrations by altering lipoprotein metabolism in female guinea pigs*. J. Nutr., 128: 1434.
- SHEN, W.-C., WAN, J. e EKRAMI, H. (1990), *Enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytosis and transcytosis*. Adv. Drug Deliv. Rev., 8: 93.
- SHIVELY, M. L. (1997), *Multiple emulsions for the delivery of proteins*. Pharm. Biotechnol., 10: 199.
- SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2002), *Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral*. Rev. Bras. Ciênc. Farm., 38: 125.
- SILVA, C., RIBEIRO, A., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (2003), *Administração oral de peptídios e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação*. Rev. Bras. Ciênc. Farm., 39: 1.

- SILVA, C. M., RIBEIRO, A. J., FIGUEIREDO, M., FERREIRA, D. e VEIGA, F. (Submitted), *Microencapsulation of Hb in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation*. AAPS Pharm. Sci. Techn.
- SINGH, M., HIOE, C., QIU, H., LI, X. M., WANG, C. Y., KOFF, W., ZAMB, T. e NIXON, D. F. (1997), *CTL induction using synthetic peptides delivered in emulsions - critical role of the formulation procedure*. Vaccine, 15: 1773.
- SINHA, V. R. e KUMRIA, R. (2001a), *Colonic drug delivery: prodrug approach*. Pharm. Res., 18: 557.
- SINHA, V. R. e KUMRIA, R. (2001b), *Polysaccharides in colon-specific drug delivery*. Int. J. Pharm., 224: 19.
- SINHA, V. R. e KUMRIA, R. (2003), *Microbially triggered drug delivery to the colon*. Eur. J. Pharm. Sci, 18: 3.
- SMIDSRD, O. e HAUG, A. (1971), *Estimation of relative stiffness of the molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strengths*. Biopolymers, 10: 1213.
- SMITH, P. L., WALL, D. A., GOCHOCO, C. H. e WILSON, G. (1992), *Oral absorption of peptides and proteins*. Adv. Drug Deliv. Rev., 8: 253.
- SPEISER, R., COPLEY, M. J. e NUTTING, G. C. (1947), *Effect of molecular dissolution and charge distribution on the gelation of pectin*. J. Phys. Colloid. Chem., 51: 117.
- SRIAMORNSAK, P. (1998a), *Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads*. Int. J. Pharm., 169: 213.
- SRIAMORNSAK, P. (1998b), *Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 46: 233.

- SRIAMORNSAK, P. (1999), *Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads.* Eur. J. Pharm. Sci, 8: 221.
- SRIAMORNSAK, P. e NUNTHANID, J. (1998), *Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies.* Int. J. Pharm., 160: 207.
- SRIAMORNSAK, P. e NUNTHANID, J. (1999), *Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: II. Effect of formulation and processing variables on drug release.* J. Microencapsul., 16: 303.
- SRIAMORNSAK, P., NUNTHANID, J., WANCHANA, S. e LUANGTANA-ANAN, M. (2003), *Composite film-coated tablets intended for colon-specific delivery of 5-aminosalicylic acid: using deesterified pectin.* Pharm. Dev. Technol., 8: 311.
- SRIAMORNSAK, P., PRAKONGPAN, S., PUTTIPIATKHACHORN, S. e KENNEDY, R. A. (1997a), *Development of sustained released theophylline pellets coated with calcium pectinate.* J. Control. Release, 47: 221.
- SRIAMORNSAK, P., PUTTIPIATKHACHORN, S. e PRAKONGPAN, S. (1997b), *Calcium pectinate gel coated pellets as an alternative carrier to calcium pectinate beads.* Int. J. Pharm., 156: 189.
- STEVENS, H. N. E., WILSON, C. G., WELLING, P. G., BAKHSHAEI, M., BINNS, J. S., PERKINS, A. C., FRIER, M., BLACKSHAW, E. P., FRAME, M. W., NICHOLS, D. J., HUMPHREY, M. J. e WICKS, S. R. (2002), *Evaluation of Pulsincap<sup>TM</sup> to provide regional delivery of dofetilide to the human GI tract.* Int. J. Pharm., 236: 27.
- SUNGTHONGJEEN, S., PITAKSUTEEPPONG, T., SOMSIRI, A. e SRIAMORNSAK, P. (1999), *Studies on pectins as potential hydrogel matrices for controlled-release drug delivery.* Drug Dev. Ind. Pharm., 25: 1271.

- TANG, X. C. e PIKAL, M. J. (2004), *Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice*. Pharm. Res., 21: 191.
- TAPPER, H. S. e ROBERFROID, M. (1999), *Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth*. J. Nutr., 129: 1488.
- TAZAWA, K., YATUZUKA, K., YATUZUKA, M., KOIKE, J., OHKAMI, H., SAITO, T., OHNISHI, Y. e SAITO, M. (1999), *Dietary fiber inhibits the incidence of hepatic metastasis with the anti-oxidant activity and portal scavenging functions*. Hum. Cell, 12: 189.
- TERPSTRA, A. H., LAPRE, J. A., VRIES, H. T. e BEYNEN, A. C. (1998), *Dietary pectin with high viscosity lowers plasma and liver cholesterol concentration and plasma cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters*. J. Nutr., 128: 1944.
- TERPSTRA, A. H., LAPRE, J. A., VRIES, H. T. e BEYNEN, A. C. (2002), *Intact pectin and its polygalacturonic acid regions have similar hypocholesterolemic properties in hybrid F1B hamsters*. Nahrung, 46: 83.
- TESTUT, L. e LATARJET, A. (1949), *Traité d'Anatomie Humaine*. Gaston Doin & CIE, Paris.
- THAKUR, B. R., SINGH, R. K. e HANDA, A. K. (1997), *Chemistry and uses of pectin - a review*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 37: 47.
- THIBAUT, J. F. e RINAUDO, M. (1985), *Interactions of mono and divalent counter ions with alkali and enzyme-deesterified pectins*. Bioply., 24: 2131.
- THIBAUT, J. F. e RINAUDO, M. (1986), *Interactions of counter ions with pectins studied by potentiometry and circular dichroism*. In M. L. Fishman, ed., *Chemistry and functions of pectin*, 61, American Chemical Society, Washington D. C.
- THIES, C. (1996), *A survey of microencapsulation processes*. In S. Benita, ed., *Microencapsulation. Methods and Industrial Applications*, 1, Marcel Dekker Inc., New York.

- THO, I., ANDERSSSEN, E., DYRSTAD, K., KLEINEBUDDE, P. e SANDE, S. A. (2002a), *Quantum chemical descriptors in the formulation of pectin pellets produced by extrusion/spheronisation*. Eur. J. Pharm. Sci, 16: 143.
- THO, I., KLEINEBUDDE, P. e SANDE, S. A. (2001a), *Extrusion/Spheronization of pectin-based formulations. I. Screening of important factors*. AAPS Pharm. Sci. Techn., 2: 26.
- THO, I., KLEINEBUDDE, P. e SANDE, S. A. (2001b), *Extrusion/Spheronization of pectin-based formulations. II. Effect of additive concentration in the granulation liquid*. AAPS Pharm. Sci. Techn., 2: 27.
- THO, I., SANDE, S. A. e KLEINEBUDDE, P. (2002b), *Pectinic acid, a novel excipient for production of pellets by extrusion/spheronisation: preliminary studies*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 54: 95.
- TIN, S. S. H., BOADI, D. K. e NEUFELD, R. J. (1997), *DNA encapsulation by an air-agitated, liquid-liquid mixer*. Biotechnol. Bioeng., 56: 464.
- TOWLE, G. A. e CHRISTENSEN, O. (1973), *Industrial Gums. Polysaccharides and their derivatives*. Academic Press Inc., New York.
- TURKOGLU, M. e T.UGURLU (2002), *In vitro evaluation of pectin-HPMC compression coated 5-aminosalicylic acid tablets for colonic delivery*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 53: 65.
- VANDAMME, T. F., LENOURRY, A., CHARRUEAU, C. e CHAUMEIL, J.-C. (2002), *The use of polysaccharides to target drugs to the colon*. Carbohydr. Polym., 48: 219.
- WAKERLY, Z., FELL, J., ATTWOOD, D. e PARKINS, D. (1996a), *Pectin/ethylcellulose film coating formulations for colonic drug delivery*. Pharm. Res., 13: 1210.
- WAKERLY, Z., FELL, J., ATTWOOD, D. e PARKINS, D. (1997a), *Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery*. J. Pharm. Pharmacol., 49: 622.

- WAKERLY, Z., FELL, J. T., ATTWOOD, D. e PARKINS, D. (1997b), *Studies on drug release from pectin/ethylcellulose film coated tablets: a potential colonic delivery system*. Int. J. Pharm., 153: 219.
- WAKERLY, Z., FELL, J. T., ATTWOOD, D. e PARKINS, D. A. (1996b), *In vitro evaluation of pectin-based colonic drug delivery systems*. Int. J. Pharm., 129: 73.
- WALDE, P. e ICHIKAWA, S. (2001), *Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications*. Biomol. Eng., 18: 143.
- WALKINSHAW, M. D. e ARNOTT, S. (1981), *Conformations and interactions of pectin. II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels*. J. Mol. Biol., 53: 1075.
- WATTS, P. J. e ILLUM, L. (1997), *Colonic drug delivery*. Drug Dev. Ind. Pharm., 23: 893.
- WEINER, A. L. (1994), *Liposomes for protein delivery: selecting manufacture and development processes*. Immunomethods, 4: 201.
- WILDING, I. R., DAVIS, S. S., SPARROW, R. A., ZIEMNIAK, J. A. e HEALD, D. L. (1995), *Pharmacoscintigraphic evaluation of a modified release (Geomatrix®) diltiazem formulation*. J. Control. Release, 33: 89.
- WONG, T. W., CHAN, L. W., LEE, H. Y. e HENG, P. W. S. (2002a), *Release characteristics of pectin microspheres prepared by an emulsification technique*. J. Microencapsul., 19: 511.
- WONG, T. W., LEE, H. Y., CHAN, L. W. e HENG, P. W. S. (2002b), *Drug release properties of pectinate microspheres prepared by emulsification method*. Int. J. Pharm., 242: 233.
- WYNSBERGHE, D. V., NOBACK, C. R. e CAROLA, R. (1995), *Human Anatomy and Physiology*. McGraw-Hill, New York.

- 
- YANG, L., CHU, J. S. e FIX, J. A. (2002), *Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/em in vivo evaluation*. Int. J. Pharm., 235: 1.
- YANG, S. C. e BENITA, S. (2000), *Enhanced absorption and drug targeting by positively charged submicron emulsions*. Drug Dev. Res., 50: 476.
- ZHOU, X. H. (1994), *Overcoming enzymatic and absorption barriers to non-parenterally administered protein and peptide drugs*. J. Control. Release, 29: 239.
- ZHOU, X. H. e PO, A. L. W. (1991a), *Peptide and protein drugs: I. Therapeutic applications, absorption and parenteral administration*. Int. J. Pharm., 75: 97.
- ZHOU, X. H. e PO, A. L. W. (1991b), *Peptide and protein drugs: II. Non-parenteral routes of delivery*. Int. J. Pharm., 75: 117.