

**Edelmar Chagas da Silva**

**Micro Partículas: preparação e caracterização do  
encapsulamento de rifampicina**

Dissertação apresentada a  
Universidade de Mogi das  
Cruzes para obter o título de  
Mestre pelo programa de pós-  
graduação em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Nelson Duran**

**Mogi das Cruzes  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Edelmar Chagas da Silva

Micro Partículas: preparação e caracterização do  
encapsulamento de rifampicina

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Silva, Edelmar Chagas da

Micropartículas : preparação e caracterização do  
encapsulamento da rifampicina / Edelmar Chagas da  
Silva. - 2008.

58 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -  
Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero

1. Micropartículas 2. Rifampicina 3. PHBV 4.  
Farmacologia I. Título II. Caballero, Nelson Eduardo  
Duran

CDD 615.43

Mogi das Cruzes

2008

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às dez horas do dia doze de junho de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Micro Partículas: preparação e caracterização do encapsulamento de rifampicina" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Edelmar Chagas da Silva**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Nelson Eduardo Duran Caballero e Elisa Esposito da Universidade de Mogi das Cruzes e Roseli Maria de Conti Lourenço da Universidade de Santo Antonio do Pinhal, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO por UNANIMIDADE  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 12 de junho de 2008.

Comissão Examinadora

Julgamento

Nelson Duran  
Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero

APROVADO  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Elisa Esposito  
Prof.ª Dr.ª Elisa Esposito

APROVADO  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Roseli Lourenço  
Prof.ª Dr.ª Roseli Maria C Lourenço

APROVADO  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## DEDICATÓRIA

A minha filha **Marina Chagas da Silva** e minha ex-mulher **Neusa Lúcia da Silva**, que me motivaram a ir à busca e a conquistar novos desafios e que sempre se colocaram disponíveis a me acolher quando a tarefa se tornava muito pesada.

Ao meu amigo **Júlio César Figueiredo**, por me incentivar sempre e a todos os outros amigos que sempre estiveram ao meu lado.

Ao **Prof. Nelson Duran** pela orientação e pelo apoio em todos os momentos, compartilhando sua experiência e amizade, tornando minha jornada mais fácil e sendo decisivo na realização desta pesquisa.

A **Priscyla Daniely Marcato Gaspari** pelo apoio marcante durante a elaboração deste trabalho, sendo um exemplo de competência, dedicação e companheirismo durante a elaboração deste trabalho.

Daniel Razzo, Instituto de Química Unicamp, pelo apoio durante a elaboração deste trabalho.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo a preparação e caracterização de sistemas de liberação sustentada veiculando a Rifampicina, um agente antibacteriano. A Rifampicina foi encapsulada em micropartículas poliméricas preparadas a partir do polímero biodegradável nacional **poli(hidroxi-butilato-co-valerato) (PHBV)** produzido por bactérias.

A Rifampicina encapsulada pelas micropartículas de PHBV foi preparada pela técnica de emulsão seguida de evaporação do solvente, utilizando clorofórmio, água Milli-Q e polivinil álcool (PVA), como solvente, meio de dispersão e emulsificante, respectivamente.

As micropartículas foram obtidas com tamanhos de 17-34 $\mu$ m de diâmetro que variam em função da concentração de PHBV, RIF inicial e PVA. Foi possível obter uma eficiência de encapsulação de 15%. O rendimento total do PHBV-Rifampicina chegou a 52% com variações relacionadas à otimização do processo. A liberação da Rifampicina foi dependente das proporções de PHBV/PVA utilizadas. Os valores encontrados em função destes parâmetros foram de 20-75%.

**Palavras chaves:** Microencapsulação; micropartículas; rifampicina; PHBV poli(hidroxi-butilato-co-valerato); antibacteriana; citotoxicidade.

## ABSTRACT

The aim of this work was the preparation and characterization of a sustained systems using poly(hydroxybutyrato-co-valerate) (PHBV) as carrier encapsulating Rifampicin (RIF) with antibiotic activity.

Encapsulated Rifampicin as microparticles of PHBV were prepared by the emulsion/evaporation technique, using chloroform, water and polyvinyl alcohol (PVA) as solvent, dispersion media and emulsifier, respectively.

The size obtained with this technique was sartound 17-34 $\mu$ m diameter that depends on the concentration of PHBV, RIF and PVA. It was possible to get an encapsulation efficiency value of 15%. The total yield of the PHBV-RIF of 52% was reached with the optimization of the process. The Rifampicin release was dependent of PHBV/PVA relationship. The values obtained in function of these parameter were around 20-75% after 60 minutes.

It was observed that the size, the encapsulation efficiency, and the rifampicina release of the microparticles vary in function of the initial concentrations of PHBV, PVA and Rifampicin.

The results they show that the rifampicina free it is shown more active that encapsulated her in the case of the *S. aureus* ATCC 05923 and similar with *S. aureus* Rid 1 e *S. epidemidis* IE. However in the case of the *S. aureus* ATCC 29213 it was shown more efficient encapsulated her that the free.

**Key words:** Microencapsulation; microparticles; rifampicina; PHBV  
poly(hydroxybutyrate-co-valerate); antibacterial; cytotoxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estrutura da fampicina.....	14
<b>Figura 2.</b> : A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas: a) Convencional e b) Liberação controlada. (Duran e de Azevedo, 2002).....	16
<b>Figura 3.</b> A diferença morfológica entre a forma farmacêutica de micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas.....	18
<b>Figura 4.</b> Estruturas de poliésteres: PHBV e PHB.....	24
<b>Figura 5.</b> Micropartículas de RIF e PHBV obtidas por a microscopia eletrônica de varredura MEV).....	39
<b>Figura 6</b> (. Micrografia de Microscopia eletrônica de varredura (SEM)) de micropartícula de Rifampicina e PHBV (50 mg de PBHV, 10 mg de Rifampicina, 1,2% PVA e 5 mL de clorofórmio), sendo que a metodologia de gotejamento da fase orgânica na fase aquosa foi realizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.....	39
<b>Figura 7. Figura nº. MEV</b> de micropartícula de RIF e PHBV (50mg de PBHV, 10mg de RIF e 5mL de clorofórmio), sendo que a metodologia de gotejamento da fase orgânica na fase aquosa foi realizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur .....	40

<b>Figura 8.</b> Curva de calibração da Rifampicina em 1 mL de diclorometano e 9 ml de metanol.....	41
<b>Figura 9.</b> Dissolução da RIF (10 mg/mL) em 13% de etanol e solução tampão fosfato 0,05M pH 7,4.....	41
<b>Figura 10.</b> Liberação da Rifampicina (10 mg/mL) encapsulada em PVA/PHBV(1%/50 mg) em 13% de etanol, sem controle de evaporação do solvente.....	42
<b>Figura 11.</b> Liberação da Rifampicina (10 mg/mL) encapsulada em PVA/PHBV(1%/50 mg) em 13% em etanol com controle de evaporação do solvente.....	42
<b>Figura 12.</b> Efeitos das concentrações Rifampicina, PHBV e PVA na liberação da Rifampicina nas micropartículas (valor médio de três medidas) com controle da evaporação do etanol.....	43
<b>Figura 13.</b> Análise de Citotoxicidade pelo ensaio de Vermelho Neutro (VN) e de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) da RIF encapsulada (PHBV), em células V-79.....	45
<b>Figura 14.</b> Citotoxicidade da Rifampicina livre em células V-79, em vermelho neutro (VN) e (MTT).....	45
<b>Figura 15.</b> Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostra após 5 dias.....	46
<b>Figura 16.</b> Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com 10 dias.....	47
<b>Figura 17.</b> Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com 15 dias.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>TSA</b>	Agar tripticase soja
<b>VN</b>	2-amino-3-metil-7-amino-cloreto de fenazina
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
<b>IC50</b>	Concentração que inibe 50% da viabilidade celular
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoxido
<b>MM</b>	Massa Molar
<b>DEMEM</b>	Meio Eagle modificado por Dulbecco
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>PHB</b>	Poli(hidroxibutiratos)
<b>HV</b>	Poli (hidroxivalerato)
<b>PHB-V</b>	Poli(hidroxibutirato-co-valerato)
<b>PLA</b>	Polilactídeo
<b>PVA</b>	Poli vinil álcool
<b>Rif</b>	Rifampicina
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>PBS-Ca<sup>2</sup></b>	Tampão salina fosfato de cálcio
<b>CFU</b>	Unidade formadoras de Células

# 1 INTRODUÇÃO

1.1	Tuberculose.....	11
1.2	Rifampicina.....	13
1.3	Sistema de liberação sustentada.....	15
1.4	Sistemas transportadores de fármacos.....	17
1.4.1	Microencapsulamento.....	17
1.4.2	Identificação e Terminologia.....	17
1.4.3	Aplicações.....	19
1.4.4	Preparação de micronanopartículas.....	20
1.4.5	Polímeros utilizados em drogas de liberação controlada e Rifampicina.....	20
1.4.6	PHB e PHB-V em sistemas de liberação controlada de Rifampicina.....	21
1.4.7	Biodegradabilidade do PHBV.....	23
1.4.8	Citotoxicidade.....	24
1.4.8.1	.....MTT.....	25
1.4.8.2	Vermelho neutro.....	25
1.4.8.3	Síntese de DNA.....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>27</b>
2.1	Geral.....	27
2.2	Específico.....	27
<b>3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>28</b>
3.1	Material.....	28
3.1.1	Reagentes.....	28
3.2	Preparação da micropartículas de PHBV e Rifampicina.....	29
3.3	Determinação da eficiência de encapsulamento e do conteúdo de Rifampicina Dentro das Micropartículas de PHBV.....	30
3.4	Determinação do tamanho e caracterização da micropartículas.....	31
3.5	Análise de liberação da Rifampicina microencapsulada.....	32

<b>3.6</b>	Atividade antimicrobiana das micropartículas de Rifampicina-PHBV.....	32
<b>3.7</b>	Avaliação da citotoxicidade das micropartículas de PHBV-rifampicina.....	33
<b>3.7.1</b>	Preparo de células.....	33
<b>3.7.2</b>	Avaliação da citotoxicidade pelo método do VN.....	34
<b>3.7.3</b>	Avaliação da citotoxicidade pelo método do MTT.....	35
<b>3.7.4</b>	Avaliação da citotoxicidade pelo método do DNA.....	35
<b>3.7.5</b>	Determinação da biodegradabilidade do polímero PHBV.....	35
<b>4</b>	Resultados e discussão.....	36
<b>4.1</b>	Preparação do microencapsulamento RIF/PHBV e eficiência de encapsulamento da rifampicina.....	36
<b>4.2</b>	Liberação da RIF microencapsulada.....	40
<b>4.3</b>	Atividade antimicrobiana das micropartículas RIF-PHBV.....	43
<b>4.4</b>	Ensaio com vermelho Neutro (Análise da integridade da membrana lisossomal.....	44
<b>4.5</b>	Ensaio de Biodegradabilidade das micropartículas de RIF/PHBV.....	46
<b>4.6</b>	Conclusões.....	48
	Referências .....	50

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais antigas, sendo conhecida pela humanidade desde o Egito antigo. A tuberculose (TB) é uma doença crônica, infecto-contagiosa, produzida pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, que se caracteriza pela presença de granulomas e foi isolada pelo cientista alemão Robert Koch. Em sua homenagem o bacilo da tuberculose ficou conhecido como bacilo de Koch.

Através da história a tuberculose tem sido uma das doenças que causa epidemias mais graves. Porém, somente em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que a tuberculose é uma emergência global, lançando um esforço conjunto para mobilizar recursos na luta contra a epidemia (Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2001).

A tuberculose pode atingir todos os grupos etários, embora cerca de 85% dos casos ocorram em adultos. Desses, 90% ocorrem na forma pulmonar da doença que pode atingir também a pele, ossos, rins, meninges e nódulos linfáticos. A tuberculose também pode assumir a forma de uma septicemia envolvendo um ou mais órgãos, ou ainda, pode aparecer como uma simples bronquite. A principal via de transmissão da tuberculose é a via aérea sendo que medidas que ajudam a reduzir a transmissão são: aumentar a ventilação do ambiente e cobrir a boca e o nariz ao tossir ou espirrar.

O *M. tuberculosis* é um bacilo encurvado fino, de cerca de 4µm de comprimento e 1 µm de diâmetro. Os bacilos da tuberculose são organismos aeróbios estritos que se multiplicam melhor quando a pressão do oxigênio do meio é de pelo menos 100 mm de Hg, fato que justifica a localização preferencial nos nódulos dos pulmões, onde, apesar de baixa pressão de oxigênio, a circulação é lenta permitindo a troca de gases entre os bacilos e o órgão (Robbins e Cotran, 1983).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), dois bilhões de pessoas correspondendo a um terço da população mundial, está infectada pelo *M. tuberculosis*. Destes, 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrem a cada ano (Ministério da Saúde – secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2001).

O Brasil ocupa o 13º lugar no ranking dos 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo (Souza e Vasconcelos, 2005). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS), são notificados anualmente 85 mil casos novos de tuberculose, correspondendo a um coeficiente de incidência de 47/100.000 habitantes no Brasil (Ministério da Saúde – secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2001). Especificamente no estado de São Paulo ocorrem 18000-20000 novos casos, totalizando 1500 mortes por ano.

Quando associada com doenças como a AIDS e/ou diabetes, o problema se agrava levando à 5000 óbitos por ano (Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo, 2002).

A cura natural é diminuta. Não há, atualmente, vacina curativa ou preventiva de uso geral e eficiente para a tuberculose exceto a BCG que é utilizada para a prevenção de formas graves em crianças, principalmente a meningite tuberculosa e a tuberculose miliar.

O tratamento é realizado mediante a quimioterapia na qual, diversos medicamentos podem ser utilizados como, por exemplo, isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomina e etambutol. Estes podem ser utilizados sozinhos ou combinados (Coll, 2003). Os problemas do tratamento da tuberculose é o longo período de tratamento (cerca de 6 meses) que faz com que muitos pacientes abandonem o tratamento antes do término e a multidrogarresistência em que o *M. tuberculosis*, não é mais suscetível à ação de um ou vários fármacos anti-tuberculose (Blanchard, 1996).

As estatísticas mostram que o abandono de tratamento atinge grandes proporções no país. Atualmente, o Brasil apresenta 71% de índice de cura dos casos tratados e cerca de 12% de abandono do tratamento (Ministério da Saúde, 2005). O aparecimento de cepas resistentes complicou extraordinariamente o

combate à doença, elevando em até 200 vezes o custo da terapia, com aumento da mortalidade (Centers of Diseases Control, 1999).

O lento crescimento dos organismos, o desenvolvimento crônico da doença, a baixa adesão do paciente ao regime terapêutico, a toxicidade dos fármacos e o desenvolvimento de resistência do bacilo frente ao regime terapêutico são os principais problemas da terapêutica (Mendel e Petri-Jr, 1996).

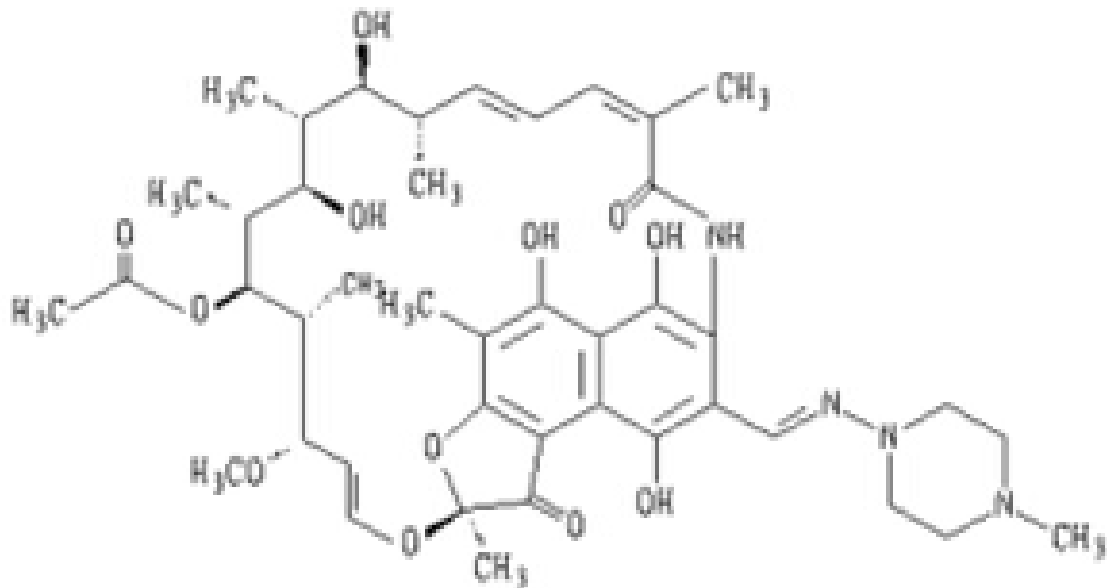
Uma estratégia para solucionar este problema, seria reduzir o abandono através do desenvolvimento de novos medicamentos ou associações terapêuticas que reduzissem o tempo de tratamento, o número de doses necessárias e fundamentalmente, apresentassem menor toxicidade, o que poderia ser obtido através da tecnologia de liberação sustentada de fármaco.

## 1.2 Rifampicina

A RIF juntamente com a isoniazida, são os fármacos de escolha no tratamento no combate da tuberculose (Mendel e Petri-Jr, 1996).

A RIF, 3(4-metil-1-piperazil-iminometil), (figura 1), é um pó cristalino vermelho, com ponto de fusão entre 183-188°C. É muito solúvel em clorofórmio e dimetilsulfóxido; solúvel em acetato de etila, metanol e tetrahidrofurano; levemente solúvel em acetona e tetracloreto de carbono. A solubilidade em água varia em função do pH. Assim, a 25°C, 10 g de RIF são solúveis em 100 mL de água em pH 2,0.

O caráter ácido da RIF é associado aos grupos hidroxilas nos carbonos C1, C4 e C5 ( $pK_a=1,7$ ). A função básica é associada ao grupamento amina da piperazina ( $pK_a=7,9$ ) (Connors e col., 1986).



PM: 822,96

**Figura 1.** Estrutura da Rifampicina. (RIF), ([www.scielo.br/scielo.php?script=\\_arttext...](http://www.scielo.br/scielo.php?script=_arttext...))

Os efeitos adversos encontrados com o uso da RIF podem ser icterícia assintomática; mal-estar abdominal, dor muscular e articular; alteração da função hepática em pacientes que já tenham comprometimento desse órgão; prurido e erupção cutânea; coloração vermelho-alaranjada da urina, fezes, saliva, escarros, suor e lágrimas; reação do tipo imunológica em pacientes com tratamento

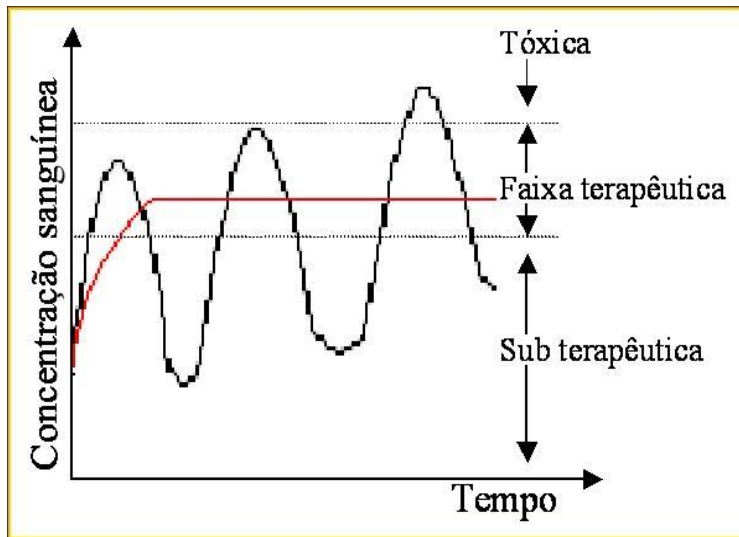
intermitente, com doses elevadas, de até 1200 mg. podendo ocorrer dispinéia, chiado, púrpura e leucopenia (Korolkovas e França, 2002).

### **1.3 Sistema de liberação sustentada**

Significativos esforços têm sido dedicados recentemente no desenvolvimento de tecnologia para sistema de liberação sustentada. Espécies coloidais como lipossomas, micro e nanopartículas têm sido extensivamente estudados para este sistema que, em geral, pode ser utilizado para melhorar a biodisponibilidade oral, manter o efeito da droga no tecido alvo, solubilizar drogas, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (Youan e col., 2003).

No sistema de liberação sustentada, o princípio ativo é encapsulado em uma matriz que deve apresentar as seguintes características: permitir a modelagem para a forma desejada e liberação da substância ativa por mecanismos adequados, ter estabilidade adequada e possuir baixa toxicidade incluindo qualquer produto de degradação (Panyam e Labhasetwar, 2003; Miyazaki e col. 2003). Através deste sistema é possível manter a concentração do fármaco no plasma na faixa terapêutica por um tempo prolongado, utilizando-se de um menor número de doses.

Isto é uma vantagem em relação às formas convencionais de administrações (spray, injeção, pílulas) nas quais, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta, atinge um pico máximo e então declina. Uma vez que cada droga possui uma faixa terapêutica acima da qual é tóxica e abaixo da qual é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas, fato que pode ser problemático se a dose efetiva da droga estiver próxima da dose tóxica (Figura 2).



**Figura 2:** A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas: a) Convencional (\_\_\_\_) e b) Liberação controlada (\_\_\_\_), (Duran e de Azevedo, 2002).

Dois tipos de controle de liberação de drogas podem ser realizados, o temporal e o controle de distribuição.

No controle temporal, a liberação visa prolongar a liberação da droga ou liberar a mesma no tempo específico de duração do tratamento. O controle de liberação de duração prolongado é atualmente benéfico para drogas que são rapidamente metabolizadas e eliminadas pelo organismo após sua administração.

Com a administração da droga convencional em injeções, a concentração da droga esta sujeita a uma ampla variação durante um período de 24 horas, e em um único período do tratamento a concentração da droga vai estar na sua faixa terapêutica. Com o sistema de liberação controlada a porcentagem da droga liberada compete com a porcentagem da droga eliminada, e, portanto, a concentração da droga na janela terapêutica é mais ampla no período de 24 horas.

No controle de distribuição, a liberação visa o direcionamento da liberação da droga ao local preciso de atividade dentro do corpo, o controle temporal pode produzir um significativo aperfeiçoamento no tratamento, garantindo os efeitos máximos possíveis provocados pela droga (Uhrich e col., 1999).

## **1.4 Sistemas transportadores de fármacos**

### **1.4.1 Microencapsulamento**

A ciência e a tecnologia da microencapsulação é um bom exemplo de como a aplicação de uma técnica em determinado campo pode ser extrapolada para vários outros, incluindo o das ciências farmacêuticas (Luzzi e Palmieri, 1985).

O processo de microencapsulação foi inicialmente utilizado pela “National Cash Register Company” na produção de papel de cópia sem carbono. O sucesso do processo de microencapsulação levou cientistas de outras áreas a aplicarem esta tecnologia utilizando-a nas áreas farmacêutica, gráfica, agricultura, indústrias de alimento, produtos domésticos entre outras (Donbrow, 1991; Luzzi e Palmieri, 1985, Brown e col., 2004)

Atualmente a microencapsulação constitui um importante campo para o desenvolvimento de novas formulações, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, aumentar a eficiência terapêutica de substâncias utilizadas no tratamento de uma grande variedade de doenças (Saks e Gardner, 1997). Além disso, torna possível a utilização de fármacos potencialmente tóxicos, como é o caso de muitos antineoplásicos (Wasan e Morton, 1996).

Existe também o sistema de nanoencapsulação que possibilita o isolamento e a manutenção de substâncias ativas no interior das nanopartículas, com dimensões variando de alguns nanômetros. Os fármacos, quando encapsulados no interior das matrizes poliméricas, não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico como quando em solução. Assim, o polímero tem que degradar para que o fármaco possa ser liberado, ou então o fármaco tem que se difundir para o exterior da matriz (Dunn, 1991; Arshaddy, 1991).

### **1.4.2 Identificação e Terminologia**

O termo nanopartículas é usado de acordo com o tamanho da partícula a que está se referindo. Partículas com tamanho menor que 1  $\mu\text{m}$  são consideradas

nanopartículas, enquanto que as partículas maiores são consideradas micropartículas (De Oliveira e André Filho, 1999). Além disto, micro e nanopartículas podem se apresentar em duas estruturas diferentes: a micro/nanoesfera e a micro/nanocapsula. Denominam-se micro/nanoesferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homoganeamente disperso no interior da matriz polimérica. Desta forma, obtém-se um sistema monolítico onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Micro/nanocapsula, ao contrário, constituem sistemas do tipo reservatório onde é possível identificar um núcleo diferenciado que, pode ser líquido ou sólido. Nesse caso, a substância ativa encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo, em estudos do tipo caroço-casaca (Durán e De Azevedo, 2002; Desai e col., 1996).

A diferença morfológica entre a forma farmacêutica de micro/nanoesferas e micro/nanocápsulas está ilustrada na Figura 3.

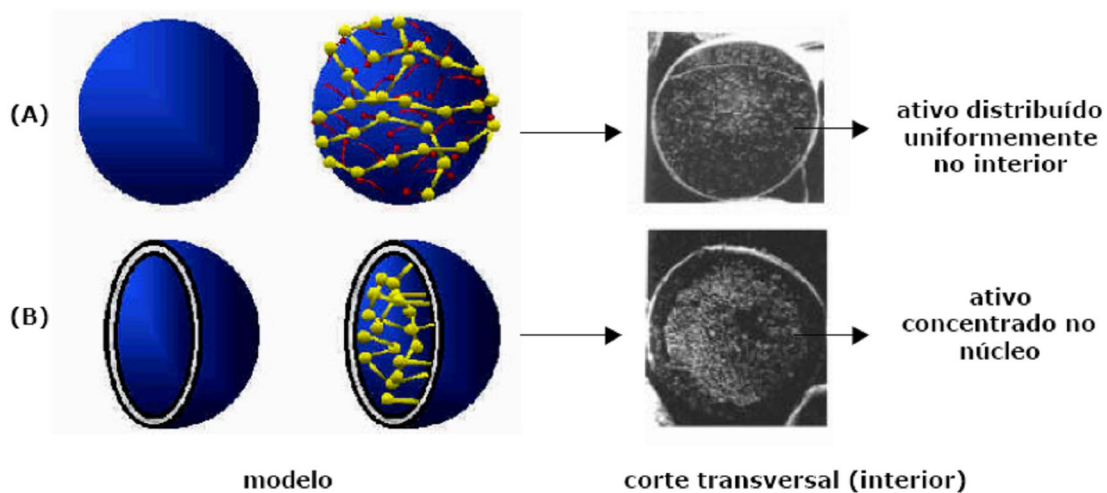


Figura 3. Exemplos das diferentes formas farmacêuticas: (A) nano/microesferas e (B) micro/nanocápsulas.

### **1.4.3. Aplicações**

As micropartículas podem modificar a cor, forma, volume, densidade, reatividade, durabilidade, sensibilidade à pressão, sensibilidade ao calor e fotosensibilidade da substância encapsulada. Pode preservar uma substância em um estado finamente dividido e libera-lo como requerido (Finch, 1990; Thies, 1996), bem como aumentar o tempo de armazenamento de compostos voláteis. Micropartículas podem proteger uma substância dos efeitos dos raios UV, umidade, oxigênio e reações químicas entre duas substâncias podem ser evitadas pela separação física por microencapsulamento.

Pós finamente divididos podem ser microencapsulados afim de se reduzir aglomerações (Brandau, 2002).

Micropartículas tem sido empregada em muitos campos da tecnologia, frequentemente ligados a aplicações nas quais o conteúdo é liberado em condições controladas.

Uma grande variedade de produtos é microencapsulada para diferentes tipos de aplicações como: na indústria alimentícia onde os produtos tem sido encapsulados em gelatinas e gomas, e aditivos alimentares encapsulados para aumentar o tempo de armazenamento através da redução da volatilização e degradação oxidativa; nos pigmentos que tem sido encapsulado em copolímeros acrílicos como agentes formadores de filme; no controle de pragas e ervas daninhas na agricultura, aumentando a liberação do principio ativo no alvo requerido; nas indústrias de cosméticos para a produção de perfumes com a essência encapsulada, removedores de maquiagem (Finch, 1990; Nelson, 2002).

### **1.4.4. Preparação de micropartículas**

A preparação de microesferas e microcápsulas envolve diferentes tecnologias e requer a presença simultânea do material suporte e da molécula ativa no meio reacional (Lin, 1985). Os materiais a serem utilizados devem apresentar as

seguintes características: permitir a modelagem para a forma desejada, liberação da substância ativa por mecanismos adequados, ter estabilidade adequada, possuir baixa toxicidade incluindo qualquer produto de degradação e ter esterilidade (Guiot e Couver, 1983).

Os polímeros utilizados podem ser divididos em três classes: polímeros solúveis em água, polímeros biodegradáveis e polímeros não biodegradáveis. As propriedades físico-químicas do polímero são de grande importância quando se pretende a liberação controlada, prolongada e/ ou vetorização de fármacos, uma vez que a farmacocinético do fármaco encapsulado passa a ser dependente do sistema no qual ele esta (Dunn, 1991). Polímeros hidrossolúveis não necessitam sofrer degradação para se dissolverem no meio biológico, polímeros biodegradáveis são aqueles assimilados pelo sistema biológico (Há e col., 2000; Dunn, 1991). Quanto maior a presença de domínios amorfos no polímero, maior a sua capacidade de degradação como a massa molar e a presença de grupos hidrofílicos.

Devido à biocompatibilidade, fácil reabsorção e propriedades não-tóxicas o polímero PHBV (polihidroxibutirato-co-valerato), tem sido amplamente utilizado na preparação de micropartículas em sistemas de liberação controlada (Chen e col, 2000; Hass e col, 2003).

#### **1.4.5. Polímeros utilizados em drogas de liberação controlada e Rifampicina (Oliveira e Lima, 2006).**

A classificação dos polímeros na aplicação de liberação controlada pode ser difícil devido a diversidade dos polímeros e a suas estruturas. Pois os polímeros devem ser classificados como sitio biodegradável ou não biodegradável.

Os sistemas biodegradáveis têm ocupado as atenções para o uso e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, em decorrência dos não biodegradáveis precisarem ser recuperados ou promover manipulação após a sua introdução no corpo.

Logo as propriedades físico-químicas do princípio ativo, principalmente solubilidade e permeabilidade, e como ele pode ser absorvido pelo organismo também tem bastante importância para a escolha do polímero da formulação.

Além da função, ou objetivos da formulação e das características do princípio ativo, as propriedades físico-químicas do polímero são fatores de suma importância que determinam a sua utilização.

#### **1.4.6. PHB e PHB-V em sistemas de liberação controlada de Rifampicina**

Polihidroxibutiratos (PHB) (Figura 4) e os polihidroxibutiratos-co-valeratos (PHBV) são poliésteres produzidos biologicamente por vários microorganismos na natureza que transformam o excedente de seu metabolismo em polímero biodegradável, na forma de grânulos intracelulares.

A descoberta destes polímeros data do início do século XX e emergiram como possíveis polímeros de cobertura em sistemas de liberação controlada devido às seguintes vantagens: serem facilmente sintetizados quimicamente e, portanto, apresentarem menos problemas toxicológicos nos produtos farmacêuticos; propriedades físicas reproduzíveis devido à especificidade das enzimas microbianas e serem compatíveis com o tecido animal (Kim e col., 2000). OBS:Esta frase não esta boa tentar mudar

PHBVS são polímeros isostáticos e altamente cristalinos (50-80%) o que diminui a velocidade de degradação frente aos poli-lactatos e poli-glicolatos (Sudesh e col., 2000). De acordo com Conway e col. (1997), as partículas de PHB e PHBV têm maior hidrofobicidade do que as partículas de PLA e devido a esta propriedade, as mucosas teriam maior afinidade por estas e seriam facilmente fagocitada por macrófagos. PHB com 9% de hidroxivalerato (HV) produz um ótimo efeito plastificante por aumentar o volume livre do polímero, reduzindo a cristalinidade do PHB. A vantagem de plastificação do polímero é o aumento da velocidade de liberação do fármaco, devido a uma menor resistência de difusão no interior das microesferas (Baran et al., 2002).

O primeiro estudo de produção de nanoesferas de PHB foi feito em 1986 por (Koosha e Muller, 1989) que empregou a técnica de emulsificação/evaporação de solvente.

A emulsificação/evaporação de solvente é um método amplamente empregado, podendo ser utilizado na encapsulação de fármacos a partir de emulsões simples ou múltiplas. No processo de emulsificação/evaporação de solvente, a partir de emulsões simples o/a, o polímero é dissolvido em um solvente orgânico e nesta fase orgânica o fármaco é dissolvido ou disperso. Esta solução ou dispersão é emulsificada numa fase aquosa, contendo um agente emulsificante. Para formação das microesferas, o solvente orgânico sofre difusão pela fase aquosa e evaporação na interface água/ar. Em seguida, as micropartículas podem ser filtradas ou separadas por centrifugação (O'Donnell e McGinity, 1997).

As características das micropartículas carreadoras de fármacos obtidas por emulsificação/evaporação de solvente são influenciadas por diversas condições envolvidas no processo. Dentre essas, observam-se as propriedades físico-químicas do solvente orgânico, a velocidade de agitação, a temperatura, a velocidade de evaporação do solvente orgânico e a concentração do agente emulsificante.

No que se refere à escolha do solvente que constitui a fase orgânica, é necessário considerar sua imiscibilidade com a água, a capacidade de solubilizar tanto o polímero, quanto o fármaco, além de avaliar sua toxicidade (O'Donnell e McGinity, 1997; Birnbaun et al. 2000).

As características físico-químicas do fármaco a ser incorporado nas micropartículas devem ser consideradas uma vez que podem influenciar na sua distribuição no interior da micropartícula (Freiberg e Zhu, 2004). Dessa forma, o fármaco pode encontrar-se completamente dissolvido no polímero ou disperso como discretas partículas sólidas distribuídas na matriz (Kim e col., 2000). Além disso, durante a etapa de emulsificação, a solubilidade do fármaco nas fases deve ser considerada, pois podem ocorrer difusão e perda, reduzindo a eficiência de encapsulação (Watts e col., 1990).

Durante a escolha do polímero empregado na obtenção das micropartículas deve-se dar importância à massa molar, à biodisponibilidade e às propriedades térmicas (Genta et al., 1998 Ueda e Tabata, 2003; Ginés, 1996).

A concentração do polímero na fase orgânica desempenha um papel importante nas características de liberação de fármacos associados à micropartículas. Uma concentração elevada confere maior viscosidade à solução, retardando a precipitação do polímero, resultando em micropartículas menos porosas e, dessa forma, reduzindo a liberação de fármacos encapsulados. O aumento de concentração de fármaco, por sua vez, resulta em maior liberação inicial atribuída à perda de fármaco durante a solidificação da matriz polimérica (Luan e Bodmeier, 2006).

A velocidade de agitação influencia no tamanho das micropartículas obtidas sendo que, quanto maior a velocidade de agitação, menor o diâmetro e a dispersão de tamanho das micropartículas obtidas (Sansdrap e Moes, 1993).

#### **1.4.7. Biodegradabilidade do PHBV**

A degradação dos polímeros biodegradáveis utilizados na preparação de micro/nanopartículas como PHBV (Figura 4) depende de alguns fatores como a massa molar do polímero e o seu grau de cristalinidade. Neste último caso quanto maior a presença de domínios amorfos nos polímeros, maior a capacidade de degradação (Chen e col., 2000). Devido à biocompatibilidade, fácil reabsorção e propriedades não tóxicas o polímero poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxicaprolato) (PHBV) têm sido utilizado na preparação de micro e nanopartículas em sistemas de liberação sustentada (Rossi e col., 2004; Chen e col., 2000).

As partículas de PHB e PHBV de acordo com Conway e col. (1997) tem maior hidrofobicidade do que as partículas de PLA, em decorrência disto teriam maior afinidade com as mucosas e seriam mais facilmente fagocitadas por macrófagos. Também concluíram que PHB com 9% de d hidroxicaprolato (HV) produz um ótimo efeito plastificante por aumentar o volume livre do polímero, reduzindo a cristalinidade do mesmo. Este efeito plastificante no polímero aumenta a velocidade

de liberação do fármaco devido à diminuição da resistência de difusão dentro da micropartícula.

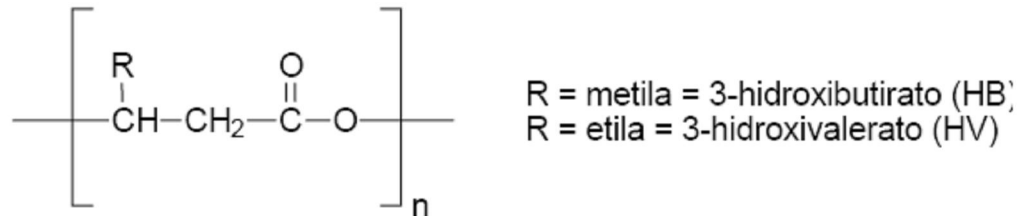


Figura 4. Estruturas de poliésteres: PHBV e PHB. (C.A. Perusse e S.S.Guterres 2006).

#### 1.4.8. Citotoxicidade

A citotoxicidade pode ser definida como sendo a propriedade de ativação dos mecanismos relacionados à morte celular por um composto químico ou biológico, ou através de uma célula mediadora como, por exemplo, os macrófagos e as células T citotóxicas (Krähenbühl e Tschopp, 1991). Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis na determinação da citotoxicidade basal, e também no estabelecimento da faixa de concentração na qual o composto apresenta atividade, que podem indicar a concentração inicial dos testes *in vivo* diminuindo desta forma a quantidade de animais experimentais (Halle e Spielman 1998). Neste tipo de teste detalhes importantes como parâmetros de citotoxicidade, genotoxicidade, indução de mutações ou morte celular programada também podem ser determinados.

Os alvos celulares dos testes de citotoxicidade são baseados principalmente, na perda seletiva da permeabilidade celular, na redução da função mitocondrial e nas mudanças na morfologia e replicação celular. Cada tipo de célula responde por meio de diversos mecanismos bioquímicos à presença de diferentes compostos,

mas algumas dessas respostas são comuns e podem ser utilizadas como marcadores de citotoxicidade (Eisenbrand e col., 2002).

#### **a) Redução do MTT**

O ensaio de redução do MTT se baseia na redução do (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) MTT, um composto amarelo escuro solúvel em água, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase mitocondrial de células viáveis, originando como produto o formazan, um composto azul escuro solúvel em solventes orgânicos<sup>127</sup>.? A enzima succinato desidrogenase atua como uma doadora de elétrons na redução do MTT, através da succinato desidrogenase mitocondrial. De fato, este ensaio avalia predominantemente o balanço redox NAD<sup>+</sup>/NADH. Este processo ocorre apenas quando a mitocôndria está viável, ou seja, com o sistema enzimático funcionando corretamente, mantendo a atividade de desidrogenases. O MTT (composto tetrazólico) é bioreduzido pelas células em um produto colorido, formazan (sal tiazólico). Esta conversão provavelmente ocorre à custa de NADPH ou NADH produzidos por desidrogenases em células metabolicamente ativas. Uma vez que esta conversão ocorre apenas em células vivas, a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis na cultura. Os valores de absorvância medidos a 570nm sendo menores que o controle indicam uma redução na taxa de proliferação celular. (Corrêa e col, 2005).

#### **b) Ensaio com vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina).**

A avaliação por este método baseia-se na habilidade de células viáveis incorporarem o corante o vermelho neutro, em seus lisossomas. Esse fraco corante catiônico penetra a membrana celular por difusão passiva não iônica e concentra-se nos lisossomas onde por ligações hidrofóbicas eletrostáticas, liga-se aos grupos fosfato da matriz lisossomal. Dessa maneira, esse ensaio depende de dois fatores principais: 1) número de células viáveis na cultura: existe uma correlação linear entre o vermelho

neutro extraído de uma cultura e o número de células viáveis nessa cultura. o que implica na possibilidade de alterações tóxicas da proliferação celular modificarem os resultados 2) os resultados são dependentes da viabilidade lisossomal que é uma função celular. O termo “viabilidade de uma cultura” representa a porcentagem de células que expressam certas características reservadas às células vivas, por exemplo, a exclusão de um corante como o azul de tripan que avalia a integridade da membrana celular. A retenção do vermelho neutro pelas células viáveis pode ser modificada por alterações na superfície celular ou nas membranas lisossomais (Repetto e Sanz, 1993).

### **c) Ensaio da síntese de DNA ou conteúdo total de proteínas.**

A razão para a seleção desse ensaio foi a consideração do fato da existência de uma velocidade ótima conhecida de proliferação celular na cultura contínua. Essa velocidade seria reduzida na presença de agentes químicos que por sua vez, afetariam uma ou mais funções citológicas essenciais como por exemplo, atividade mitocondrial, síntese de DNA, síntese protéica, etc. O objetivo da determinação de conteúdo de DNA (medida da absorvância a 270nm) é avaliar o material celular total o que é uma indicação do número total de células (Renzi e col., 1993).

## OBJETIVOS

### 2. Objetivos

#### 2.1 Geral

- Preparação e caracterização do microencapsulamento de RIF e de sua atividade antimicrobiana e da liberação controlada.

#### 2.2 Específicos

1- Preparar micropartículas poliméricas, pelo método de emulsificação seguida de evaporação do solvente, utilizando-se o polímero biodegradável PHBV (poli-hidroxibutirato-co-valerato), polímero biodegradável de origem nacional.

2- Encapsular o composto RIF em micropartículas de PHBV.

3- Caracterizar as micropartículas quanto ao diâmetro, morfologia e eficiência de encapsulamento do fármaco.

4- Avaliar a liberação da RIF encapsulada nas micropartículas.

5- Avaliação antibacteriano da RIF livre e encapsulada.

6- Avaliar a citotoxicidade da RIF livre e encapsulada.

7- Avaliar a biodegradabilidade do polímero na liberação do fármaco.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Reagentes

- Cloreto de metileno – Labsynth;
- Clorofórmio – Merck;
- Fosfato de potássio monobásico - Merck;
- Hidróxido de sódio - Merck;
- Meio de cultura Agar Tripticase soja (TSA) – Microbiologie;
- Meio Eagle modificado por Dulbecco - Siogma;
- Metanol – Merck;
- PHBV (MM 130.000 Da) - Biocycle;
- PVA (MM 30 – 70.000 Da) – Aldrich;
- RIF– sochimia SRI - Grupo Lepetit Comercial Business;
- Agitador Mecânico – Marconi;
- Agulha 40x12mm – BD Plastipak Ltda; Balança Analítica – Metler Toledo;
- Balança semi- analítica – Geaka;
- Balões volumétricos, 5mL, 10mL, 50mL, 100mL – Schot;
- Pipeta de Pasteur ( Vidro);
- Banho de ultra-som – Ultra Sonic Cleaner;
- Béqueres 250mL, 150mL, 100mL e 10mL;
- Centrífuga – Sorvall;
- Espectrofotômetro UV – Agilent 8453;
- Liofilizador – Edwards Mod. Modulyio;
- Medidor de pH – Digimed;
- Microscópio eletrônico de varredura – Jeol JSM – T300;

- Purificador de água Milli- Q Plus – Millipore Ltda;
- Placas de cultura de 24 cavidades – Corning;
- Seringa 5 mL – BD Plastipak Ltda;
- Tubos para centrífuga, 50 mL
- Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC05923;
- Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC29213;
- Cepa *Staphylococcus epidemidis* ATCC12228;
- Cepa *Staphylococcus epidemidis* 1E;

### 3.2. Preparação das Micropartículas de Rifampicina /PHBV

As micropartículas de RIF foram preparadas a partir da técnica de emulsão seguida de evaporação do solvente. Foram feitos vários ensaios para se determinar o melhor procedimento a ser utilizado.

#### **Procedimento 1:**

Após vários intentos de preparação com PHBV de diferentes massas molares, se chegou a que o PHBV de massa molar 130.000 Da era o polímero mais adequado para a formação de micropartículas de interesse. Como disse a Elisa descrever um pouco sobre isso

No primeiro procedimento utilizado dissolveu-se 50 mg de PHHBV (MM 130.000 Da – 9,8% de valerato) e 10 mg de RIF em 5 mL de clorofórmio, misturando com a ajuda de uma espátula até se obter uma solução homogênea. Paralelamente preparou-se uma solução de PVA (MM 30 – 70.000 Da), onde 1,0% de PVA foram adicionados em 100 mL de água Milli-Q dissolvendo-o aos poucos sob agitação mecânica de 2400 rpm por cerca de 20 minutos. A solução contendo RIF-PHBV foi gotejada em 100 mL da solução PVA 1,0% com agitação mecânica de 2700 rpm por 12 horas a 25°C. Após este processo as micropartículas foram centrifugadas a 15000 rpm por um período de 2 horas, sendo que a cada 30 minutos o sobrenadante das mesmas era retirado. A seguir os índices de RIF nas micropartículas foram determinados conforme descritos posteriormente.

**Procedimento 2:**

Em decorrência dos resultados obtidos pelo procedimento 1 o PVA foi dissolvido em 100 mL de água Milli-Q com agitação magnética e a solução RIF- PHBV e clorofórmio, foi dissolvida com agitação magnética e posteriormente gotejada na solução PVA Água Milli-Q, com a ajuda de uma pipeta Pasteur. Sendo os resultados não adequados tentou-se outro procedimento.

**Procedimento 3:**

Solução (1): Em um béquer de 250 mL foi adicionado 100mL de água Milli-Q e 1,0 g de PVA, onde o mesmo foi dissolvido com agitação magnética.

Solução (2): Em um béquer de 10 mL, foram pesadas 10 mg de RIF, 50 mg de PHBV e 5 mL de clorofórmio, esta solução foi dissolvida com agitação magnética e posteriormente gotejada com a ajuda de uma pipeta de Pasteur na solução água PVA (1), sob agitação mecânica por 12 h a 25°C e a 1260 rpm. Pelas características das partículas e rendimento de encapsulamento (citar o rendimento) foi utilizado como o método padronizado. Logo, as partículas obtidas por este procedimento foram analisadas pela metodologia que serão descrita posteriormente.

**3.3. Determinação da eficiência de encapsulamento e do conteúdo de RIF dentro das micropartículas de PHBV**

Para determinar os parâmetros de encapsulamento de RIF nas micropartículas de PHBV, primeiramente foi extraído o RIF de uma quantidade conhecida de micropartículas e quantificada por espectrofotometria UV-Vis.

Para determinação do encapsulamento da RIF foram feitos vários ensaios. Num estudo preliminar para obter as condições ótimas de extração da RIF das micropartículas obtidas foram utilizadas 1-3 mL de diclorometano e 7-9 mL de metanol (purificado). As condição mais eficiente nesta extração foi de 1 mL de diclorometano e 9 mL de metanol. Logo, a metodologia final foi: 10 mg de micropartículas contendo a Rifampicina, em 1 mL de diclorometano e 9 mL de metanol utilizado para dissolver o PHBV, esta solução foi mantida sob agitação magnética por 20 minutos. Em seguida a

suspensão formada foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante límpido foi utilizado para leitura da absorção da RIF no espectrofotômetro de UV-VIs a 473 nm (Kassab e col, 1997).

Uma série de soluções de RIF de concentrações conhecidas em solução de 1 mL de diclorometano e 9 mL de metanol foram preparadas e suas absorbâncias foram medidas e utilizadas para obtenção da curva de calibração da RIF nas condições estudadas. As concentrações de RIF nas amostras com micropartículas e RIF não encapsulada (controle) foram obtidas por regressão linear.

A eficiência do encapsulamento das micropartículas, o conteúdo de RIF e o rendimento das micropartículas recuperadas foram determinados pelas equações (1), (2) e (3) respectivamente (Govender e col., 1999).

(1) Efic. encapsulamento (%) = [massa RIF na micropartícula/massa RIF inicial] x100

(2) Conteúdo do RIF(%)=[massa RIF na micropartícula/massa RIF recuperada] x100

(3) Rend. processo (%)= massa de RIF recuperada/massa da RIF e PHBV inicial] x 100

### **3.4. Determinação do tamanho e caracterização das micropartículas**

As micropartículas foram caracterizadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma pequena quantidade de micropartículas foi adicionada a uma fita de carbono fixada num porta-amostra de latão. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au/Pb pelo processo de Sputtering (evaporação do metal e deposição de uma fina camada sobre a amostra), utilizando-se um metalizador BAL-TEC. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-T300 utilizando-se as tensões de aceleração de 20 e 25 KV, e detectores de elétrons secundários e elétrons retroespalhados.

### **3.5. Análise de liberação da RIF microencapsulada**

Com o objetivo de avaliar a cinética de liberação do fármaco, foram primeiramente feitos 5 experimentos para se obter a melhor condição para a liberação de RIF da partícula em etanol.

Após varias concentrações de etanol (10%, 13% e 15%) no meio de liberação da RIF encapsulada no processo, a solução de tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 na concentração de etanol de 13% foi a ótima para esta liberação. Em função disto a curva de calibração da RIF foi construída nas condições descritas acima (vide Figura 6). Colocar logo em seguida

Em seguida em uma barriquinha de vidro foi pesado 3,5 mg de partícula encapsulada e adicionada a um artefato apropriado, imerso num banho sob temperatura constante de 36,5°C (fluxo aberto) onde corria com a ajuda de uma bomba peristáltica na solução tampão acima citada com o controle da evaporação do etanol.

Uma amostra decorrente deste fluxo foi coletada em uma proveta volumétrica anotando seu volume e tempo. Em seguida a absorbância foi medida a 473 nm em espectrofotômetro UV-Vis. Foi realizada uma curva de calibração com quantidade conhecida de RIF livre e as concentrações de RIF nas amostras encapsuladas foram determinadas por regressão linear.

### **3.6. Atividade antimicrobiana das micropartículas de Rifampicina - PHBV**

A atividade antimicrobiana das micropartículas de RIF- PHBV foi observada segundo o método de difusão, comparando a inibição do crescimento do microorganismo provocada pelo antibiótico livre e o microencapsulado. Para ser realizado este experimento, utilizamos um meio de cultura TSA inoculado com uma concentração conhecida de microorganismo e adicionamos a RIF livre e RIF encapsulada em poços preparados no ágar.

Foram pesados 8 g de meio TSA, e dissolvidos em 200mL de água, onde deixamos aquecer até a ebulição, com constante agitação, até a fusão do ágar e em seguida esterilizamos em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Após a preparação do meio, inoculamos a placa com *Staphylococcus aureus* ATCC05923, ATCC29213, *Staphylococcus epidemidis* ATCC12228 e 1E a uma concentração de  $10^5$  CFU/mL e vertemos o meio na placa e homogenizamos.

Após o meio se solidificar foram feitos poços uniformes onde adicionamos 100  $\mu$ L de solução de RIF livre e 100  $\mu$ L da amostra de RIF-PHBV contendo as mesmas concentrações de RIF 4 $\mu$ g/mL. As amostras de RIF livre e microencapsulada foram dissolvidas em tampão de fosfato de potássio 0,05M e pH 7,4 (Adaptado da metodologia da USP, 2004).

As placas contendo os microorganismos e a RIF foram incubadas a 37°C e as leituras de suas absorbâncias foram medidas a 590 nm. Comparando a absorbância de cada poço controle contendo o TSA com os poços controle (cultura bacteriana), o qual foi denominado como crescimento absoluto (100%) pode-se medir a inibição do TSA sobre as culturas as culturas bacterianas expostas a Rif livre e a RIF encapsulada estes ensaios se deram num tempo de 20 h e 24h após a sua preparação.

A concentração de RIF utilizada foi baseada na concentração mínima inibitória (MIC) de aproximadamente 2  $\mu$ g/mL de RIF para uma concentração de  $10^5$  CFC/mL microorganismo (Farias e col, 1997).

### **3.7.0 Análise de citotoxicidade das micropartículas de Riafampicina – PHBV**

#### **3.7.1. Preparo das Culturas de células (Corrêa e col. 2005).**

Os fibroblastos V79 foram mantidos em cultura contínua através repiques periódicos, até atingirem a densidade de confluência. Este cultivo foi realizado em meio DMEM (meio Eagle modificado por Dulbecco) contendo 100 U/mL de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de sulfato de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram descoladas usando solução de ATV (tripsina versene-tripsina a 0,1% e versene a 0,016%). O número de células viáveis para o cultivo e plaqueamento foi determinado pelo método do azul tripan homogenizando-se uma alíquota da suspensão celular com quantidade equivalente de solução de azul de tripan a 0,1%, contando as células viáveis em câmara de Neubauer e excluindo as células que incorporaram o corante. O

cultivo foi realizado em meio DEMEM suplementado com 10% de SFB. A incubação foi realizada em estufa de cultura a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sup>2</sup>.

Nos três diferentes ensaios de citotoxicidade, descrito posteriormente, o plaqueamento foi realizado incubando-se 3x10<sup>4</sup> células/mL em cada cavidade da placa de cultura (com 96 cavidades) e incubando-se a 37°C por 48 h. Após a incubação as células foram expostas por 24 h a diferentes concentrações de RIF (Corrêa e col, 2005).

As soluções contendo RIF foram diluídas em meio DEMEM com 0,2% de DMSO. Os experimentos foram realizados em quadruplicada em várias concentrações de RIF livre (sem ser encapsulada) e, posteriormente, em amostras de RIF livre e microencapsulada (RIF- PHBV).

### **3.7.2. Ensaio com Vermelho Neutro (Avaliação da integridade da membrana lisossomal)**

Após a incubação com as soluções de RIF, o meio foi removido e trocado por uma solução de corante Vermelho Neutro (VN), hidrocloreto de [3-AMINO7-DIMETILAMINO-2METILFENAZINA] letra minúscula, 50 µM, preparado em meio DEMEM soro fetal bovino (SFB), pré-incubado por 12 h a 37°C e filtrado em membrana Millipore (0,22 µg), imediatamente antes do uso. Após 3 h de incubação em estufa de cultura a 37°C, as células foram lavadas com tampão salina fosfato de cálcio (PBS-Ca<sup>2</sup>) para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomas. A cada cavidade foi adicionado 0,1 mL de solução aquosa contendo 1% de ácido acético glacial e 50% de etanol, para fixar as células e extrair o VN incorporado nos lisossomas. As placas foram agitadas por 20 minutos e as absorbâncias foram determinadas a 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) (Corrêa e col, 2005).

### **3.7.3. Ensaio com MTT (Quantificação de células viáveis)**

O meio de cultura contendo as soluções de RIF foi removido e as células incubadas com 0,1 mL de uma solução de corante brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-

2,5-difenilterazólio] (MTT – 1mg/mL), preparada em meio DEMEM se SFB imediatamente antes do uso. As células então foram incubadas por 5 h em estufa de cultura de células a 37°C. O meio foi retirado cuidadosamente e os cristais produzidos foram solubilizados adicionando-se 0,1 mL de etanol por cavidade. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância determinada a 570 nm. A viabilidade das células V79 foi estimada comparando-se os valores de absorbância das células tratadas com a absorbância das células controle. Os valores foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) (Corrêa e col, 2005).

#### **3.7.4. Ensaio de conteúdo de DNA (Análise de crescimento celular)**

Após a incubação e a remoção dos meios contendo as soluções de RIF, as células foram lavadas com PSB-Ca<sup>2+</sup>, fixadas com solução aquosa de ácido tricloroacético 5%, lavadas novamente com etanol (todas as soluções de lavagem em baixas temperaturas) e secas ao ar. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL/cavidade de uma solução de NaOH 0,5 mol/L e incubou-se a placas por 1 h a 37°C para promover a lise celular. Os efeitos da proliferação celular foram emitidos comparando a absorbância, a 260 nm, das células tratadas com as células controles. Este parâmetro indica a população celular, visto que a relação entre valores de A260 e o número de células no lisado descrevem uma regressão linear.

Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) (Corrêa e col, 2005).

#### **3.7.5 Determinação da Biodegradabilidade do PHBV das micropartículas de Rifampicina.**

Com o objetivo de avaliar a biodegradabilidade do PHBV, foi realizado o seguinte ensaio:

Preparou-se uma solução tampão de fosfato de sódio 0,05M e pH 7, 4, em seguida esta solução foi distribuída em três (3) tubos Falcon de 14 mL, e em cada tubo foram adicionados 13 mL da solução.

Paralelamente pesou-se 15mg de micropartículas de RIF/PHBV, (10mg de RIF, 50mg de PHBV, 5mL de clorofórmio e 1% de PVA), onde a mesma foi adicionada aos respectivos tubos falcon, em seguida foi levada a um banho Maria, onde a temperatura era de 36C° aproximadamente e sob constante agitação a uma velocidade de 120 rpm.

Micrografia de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas nas respectivas amostras em 5 dias, 10 dias e 15 dias.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Preparação da micropartículas de RIF/PHBV e eficiência de encapsulamento da Rifampicina.**

As microesferas de RIF foram preparadas pela técnica de emulsão seguida de evaporação do solvente, como já descrito anteriormente. O método de emulsão seguido de evaporação de solvente é conceitualmente simples, porém muitas variáveis podem influenciar o produto final desse processo, tanto nas propriedades físico-químicos como no comportamento da liberação do princípio ativo, sendo estas algumas das variações citadas: velocidade de agitação da emulsão; tipo e concentração do tensoativo; condições em que o solvente é evaporado; concentração do princípio ativo; tipo de solvente utilizado; relação entre princípio ativo-polímero; polímero utilizado e modo de adição da fase orgânica na fase aquosa (Fong, 1988).

Como todas as variáveis influenciam o preparo das partículas, busca-se que estas partículas não mostrem formação de espumas, de precipitados e de coágulos. Espera-se a obtenção de formas arredondadas (esféricas), de superfície lisa, com baixa polidispersidade, alto rendimento e uma alta eficiência de encapsulamento.

A tabela abaixo mostra a otimização do processo a 25°C e o que melhor se adapta aos nossos interesses (Tabela 1).

TABELA 1. Determinação das condições de agitação para a obtenção do encapsulamento da Rifampicina.

Rotação Mecânica	Eficiência de encapsulamento
2700 rpm 12 h	4,0%
1500 rpm 12 h	5,0%
1400 rpm 12 h	8,0%
1320 rpm 12 h	8,0%
1260 rpm 12 h	15,0%
1200 rpm 12 h	6,0%

O fator de agitação mostrou-se importante na eficiência de encapsulamento, que será a seguir discutido. A agitação mecânica entre 1260-1400 rpm por 12 horas mostrou-se adequado (Tabela 1), sendo escolhido a velocidade de 1260 rpm para as experiências de otimização para os outros parâmetros.

Logo, em função desta experiência e de outros preliminares com vários tipos de PHBV (diferentes massas molares) chegamos a conclusão que o polímero de interesse era o PHBV (MM130000 Da.) e testes com diferentes concentrações de RIF e de PHBV e PVA foram necessários para otimizar a preparação (Tabela 2)..

A eficiência de encapsulamento e o conteúdo de RIF encontrado variaram em relação a metodologia utilizada.

**Tabela 2.** Efeitos da concentração de RIF, PHBV e PVA na eficiência de encapsulamento, conteúdo de RIF, rendimento e tamanho aproximado nas Micropartículas (em duplicatas, desvio  $\pm$  5%).

No experimento 01 a dissolução do PVA em água Milli-Q e do RIF-PHBV foram realizadas com agitação magnética até total dissolução dos mesmos, e o gotejamento da solução RIF-PHBV na solução PVA foi realizada com uma pipeta Pausteur, sob agitação mecânica a 1260 rpm por 12 h. Neste ensaio a 50 mg/mL de PHBV a variação de 1,0 a 1,2 % de PVA a eficiência de encapsulamento caiu de 15% a 0,2%. Isto possivelmente foi devido a não estabilização da emulsão e perdas do RIF na lavagem. Ao mesmo tempo o conteúdo de RIF diminuiu significativamente. O rendimento do polímero diminuiu também possivelmente por precipitação em grumos que não foram possíveis re-suspendê-los. Quando mantido o PVA em 1,2% e se modificou a quantidade de RIF de 30 mg/mL para 50 mg/mL foi observado somente um aumento no rendimento das partículas.

No experimento 02 a dissolução do PVA em água Milli-Q foi realizada em agitador mecânico a 1200 rpm, por 30 min, e a dissolução da RIF- PHBV, foi realizada com a ajuda de uma espátula, e o gotejamento da solução RIF-PHBV

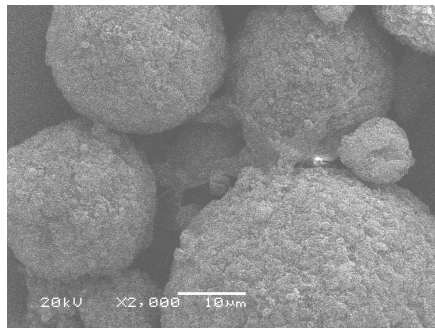
Experimento	PHBV/Sol (mg/mL)	Conc PVA (%)	Eficiência Encapsulaç ão (%)	Conteúdo RIF (%)	Rendimento (%)	Tamanho $\mu\text{m}$ Aproximado
01						
1260 rpm	50,0	1,0	15	31	53	17-34
1260 rpm	50,0	1,2	0,2	0,1	42	
1260 rpm	30,0	1,2	1,4	0,6	76	16-40
02						
1200 rpm	50,0	1,0	11	20	13	16-30

na solução PVA foi realizada com a ajuda de uma seringa de vidro de 5 mL sob agitação mecânica de 1700 rpm por 12 h. Durante a solubilização do PHBV, foi observado que a solução apresentava turbidez e o polímero não se dissolvia totalmente quando utilizávamos espátula para a solubilização do mesmo. Quando utilizamos a agitação magnética para a solubilização do PHBV este continuou apresentando um pouco de turbidez, porém sua dissolução foi completa. Devido a este fato optamos pelo

método descrito no experimento de número 01 (50 mg/mL de PHBV, 1% de PVA, 10 mg de RIF e 1260 rpm).

O rendimento encontrado conforme Tabela 1 demonstra que com o aprimoramento da técnica pode-se apresentar um rendimento melhor, já que o resultado varia conforme o domínio da técnica.

As partículas apresentam tamanhos aproximados, uma vez que o método não permite a utilização de uma quantidade de amostras que possibilite uma análise mais detalhada em relação ao tamanho das Micropartículas (Fig5 e Fig.6).



(Figura 5 Micrografia de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de micropartícula de RIF e PHBV (50 mg de PBHV, 10 mg de RIF, 1,0% PVA e 5 mL de clorofórmio), sendo que a metodologia de gotejamento da fase orgânica na fase aquosa foi realizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

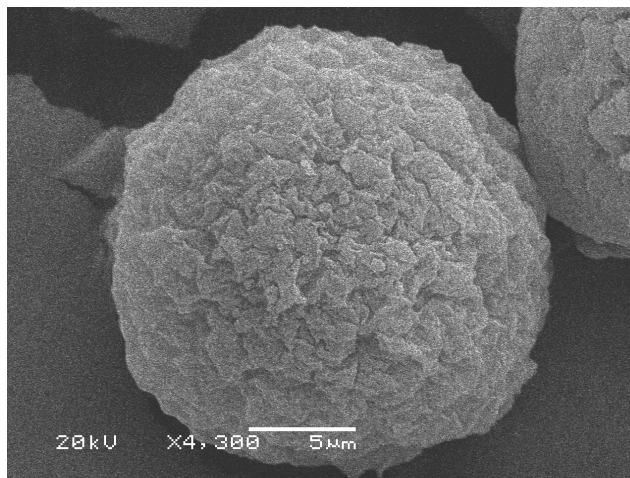


Figura 6. Micrografia de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de micropartícula de RIF e PHBV (50 mg de PBHV, 10 mg de RIF, 1,2% PVA e 5 mL de

clorofórmio), sendo que a metodologia de gotejamento da fase orgânica na fase aquosa foi realizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur

A Fig.7 mostra as micropartículas obtidas por a microscopia eletrônica de varredura (MEV), observando-se partículas esféricas com distribuição levemente heterogênea de aproximadamente de 17-34  $\mu\text{m}$ .

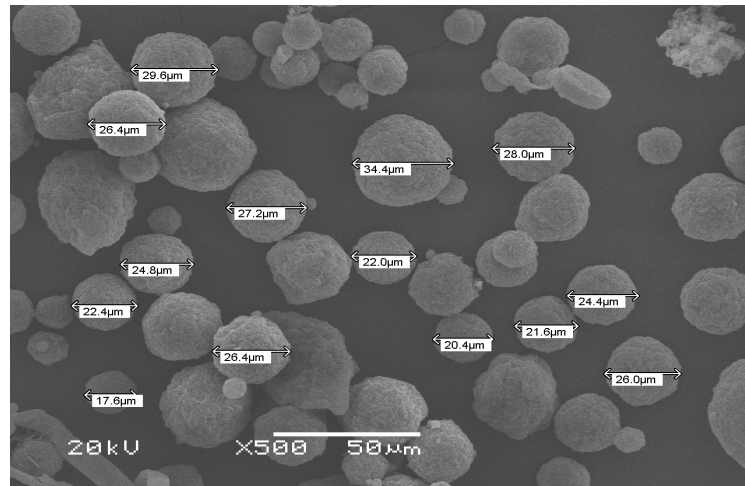


Fig. 7. Micrografia de Microscopia eletrônica de varredura (SEM) de micropartícula de RIF e PHBV/PVA (50 mg de PHBV, 1% de PVA, 10 mg de RIF e 5 mL de clorofórmio), sendo que a metodologia de gotejamento da fase orgânica na fase aquosa foi realizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

#### 4.2. Liberação de RIF microencapsulada

Nesta parte do estudo, foi investigada a liberação da RIF microencapsulada conforme descrito anteriormente com o objetivo de avaliar a cinética de liberação do fármaco, foram primeiramente feitos 5 experimentos para avaliar da facilidade ou não de liberar RIF da partícula em etanol.

Após várias experiências com variações da concentração de etanol (5-18%) no meio de liberação da RIF encapsulada, em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,4 observou-se uma concentração de etanol ótima, de 13%. Em função disto a curva de calibração da RIF foi construída nas condições descritas acima (Figura 8), como também a dissolução

da RIF no mesmo meio, afim de saber o tempo e velocidade de dissolução versus a encapsulada (Fig.9).

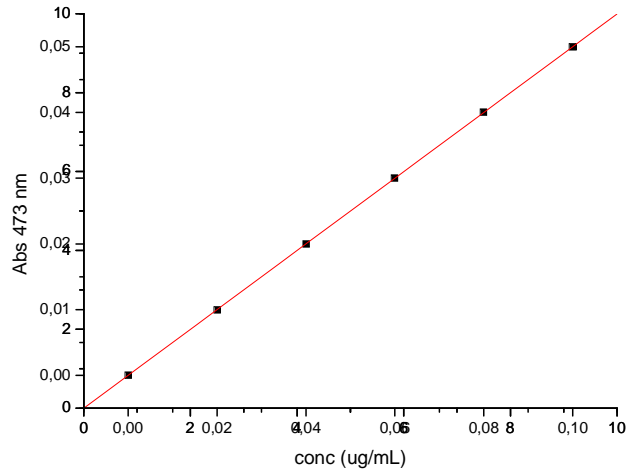


Figura 8. Curva de calibração da RIF em 1 mL de diclorometano e 9 ml de metanol

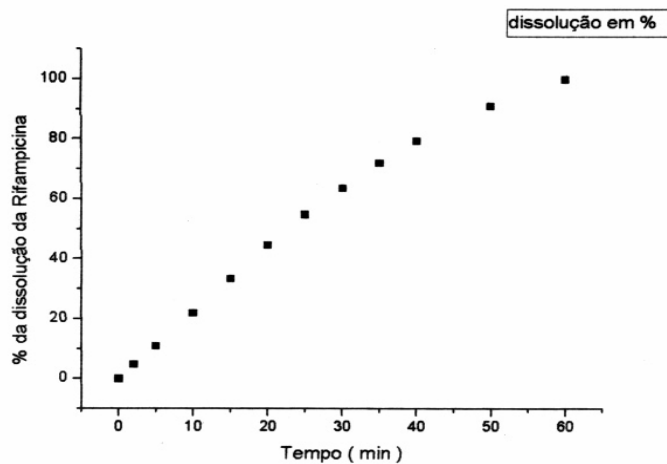


Fig.9. Dissolução da RIF (10 mg/mL) em 13% de etanol e solução tampão fosfato 0,05 M pH 7,4.

O experimento de liberação de RIF em 13% de etanol e tampão fosfato 0,05 M é mostrada na Figura 10. Esta curva foi calculada em função de mg de RIF liberada em função do tempo.

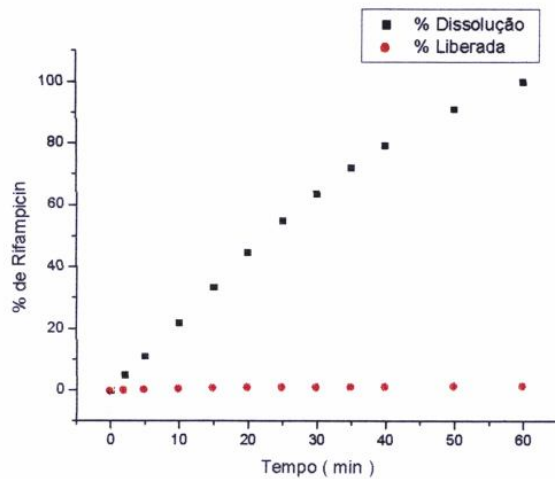


Figura 10. Liberação da RIF (10 mg/mL) encapsulada em PVA/PHBV(1%/50 mg) em 13% de etanol, sem controle de evaporação do solvente.

Esta Figura 10 demonstra a baixa liberação da RIF no experimento realizado sem o controle da evaporação do solvente. Este fenômeno de evaporação prejudica significativamente a liberação da rifampicina. Isto indicou a necessidade de manter o sistema fechado evitando a evaporação do solvente.

Logo a Figura 11 mostra agora a liberação da RIF experimento realizado com o controle da evaporação do etanol. Ficou evidente que este controle de evaporação permitiu uma liberação sustentada maior e significativa.

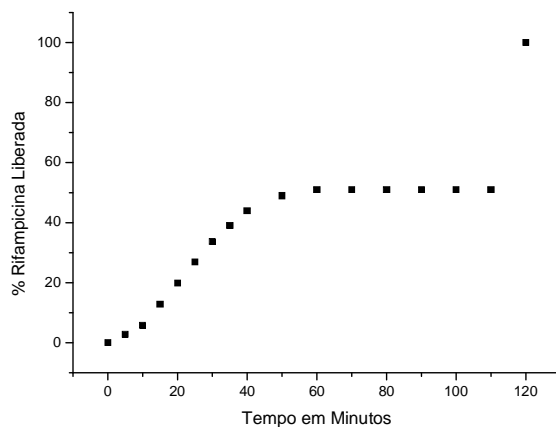


Figura 11. Liberação da RIF (10 mg/mL) encapsulada em PVA/PHBV(1%/50 mg) em 13% em etanol com controle de evaporação do solvente.

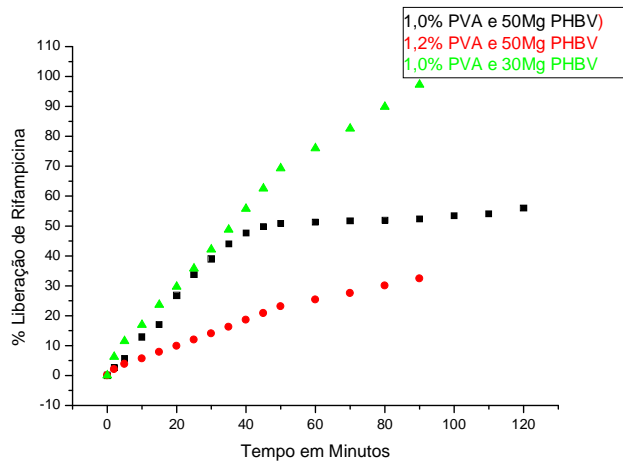


Figura 12. Efeitos das concentrações rifampicina, PHBV e PVA na liberação da RIF nas micropartículas (valor médio de três medidas) com controle da evaporação do etanol.

No estudo de variação da concentração do PVA e de PHBV em função da liberação da RIF, a Figura 12 mostra que mantendo a concentração do PHBV (50 mg/mL) e variando a concentração do PVA de 1% a 1,2% a liberação diminuiu significativamente nos primeiros 60 minutos. Na concentração 1% de PVA deu ao redor 53% de liberação. Entretanto, na concentração de 1,2% um valor de 20% foi observado.

Quando foi mantida a concentração de PVA em 1% e foi variada a concentração de PHBV em 30 mg/mL a liberação foi maior nesta concentração atingindo um valor de 75% em 60 minutos ao contraio do valor de 53% quando era 1% PVA e 50 mg/mL de PHBV.

Vale lembrar que a dissolução total (100%) da RIF é atingida em 60 minutos(Fig.9). Segundo este ensaio a liberação sustentada se atinge melhor a 50 mg/mL de PHBV, 1% de PVA e 10 mg de RIF. Nota-se que também este foi o melhor método de obtenção das micropartículas encapsulando a RIF.

#### 4.3. Atividade antimicrobiana das micropartículas RIF-PHBV

Na atividade antimicrobiana das micropartículas de RIF-PHBV foi observada segundo o método de difusão (Tabela 3) que a atividade da RIF livre era mais ativa que

a encapsulada. Isto é quando comparando a inibição do crescimento do microorganismo com o antibiótico livre com o microencapsulado.

A concentração do crescimento bacteriano foi baseado na turvação destas amostras e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. Este método indica a quantidade necessária do fármaco para inibir o crescimento da bactéria.

**Tabela 3.** Inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* por RIF livre e microencapsulada (amostras referentes a Tabela 1) em função dos ensaios realizados durante o tempo de 16h.

MIC µg/mL.	RIF Livre	RIF Encapsulada
S. aureus ATCC 05923	< 0,4 µg/mL .	2 µg/mL.
S. aureus ATCC 29213	<0,4 µg/mL .	0,25 µg/mL.
S. aureus Rid. 1	<0,4 µg/mL .	0,5 µg/mL.
S. epidemidis 1E	<0,4 µg/mL.	0,55 µg/mL.

Os resultados mostram que a RIF livre se mostra mais ativa que a encapsulada no caso da *S. aureus* ATCC 05923 e similares com *S. aureus* Rid 1 e *S. epidemidis* IE.

Entretanto, no caso da *S. aureus* ATCC 29213 mostrou-se mais eficiente a encapsulada que a livre. Estes resultados serão a seguir discutidos em função da sua toxicidade.

#### 4.4. Ensaio com Vermelho Neutro (Análise da integridade da membrana lisossomal)

O ensaio de VN que mostra a integridade lipossomal da célula, na experiência com RIF a Figura 13 mostra um valor IC<sub>50</sub> de 75 mM. Entretanto, não mostrou toxicidade para MTT, provavelmente induz o sistema enzimático celular que reduz o MTT indicando leve aumento em vez de inibição.

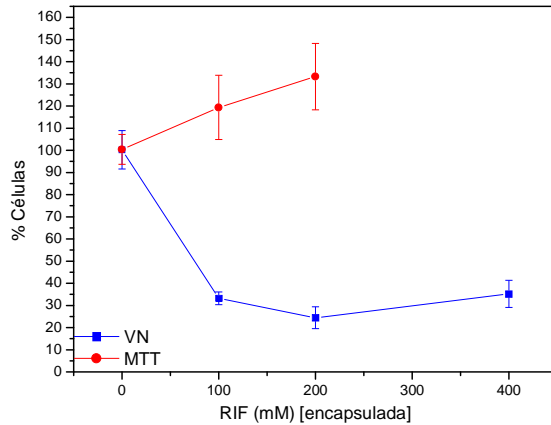


Figura 13. Análise de Citotoxicidade pelo ensaio de Vermelho Neutro (VN) e de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) da RIF encapsulada (PHBV), em células V-79.

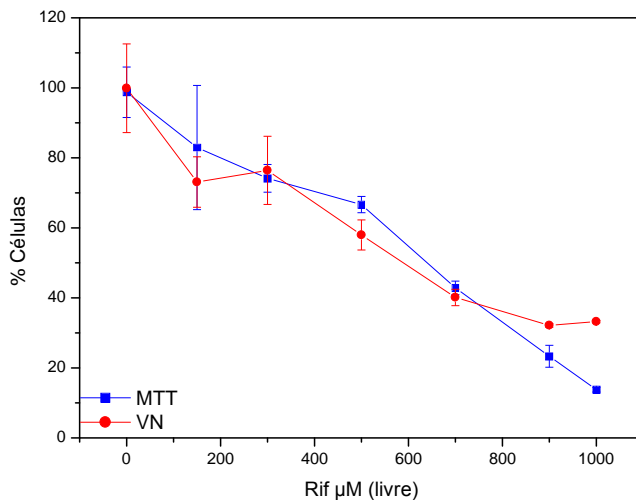


Figura 14. Citotoxicidade da RIF livre em células V-79, em vermelho neutro (VN) e (MTT) (mesmas condições da Fig. 14).

A figura 14 mostra que a RIF livre apresenta tanto para o ensaio de VN como MTT um valor aproximado de  $IC_{50}$  de 0,600 mM (600  $\mu$ M). Isto mostra que embora a atividade antimicrobiana de RIF encapsulada se mostra um pouco menor ou igual para

algumas cepas de *S. Aurious* sua toxicidade tanto no ensaio de VN ou do MTT mostra-se 125 vezes menos tóxico.

Infelizmente devido a problemas técnicos com contaminação celular em várias oportunidades os ensaios de toxicidade pelo método de DNA não foram possíveis ser apresentados no momento nesta tese. Os resultados estão sendo repetidos cuidadosamente para poder ter uma comparação com os ensaios de VN e MTT.

#### 4.5. Ensaio de Biodegradabilidade das micropartículas de RIF/PBV

A figura 15 mostra a micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da amostra após 5 dias solução em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4 em banho maria sob agitação de 120 rpm, onde ainda não se nota com clareza a degradação do polímero em questão

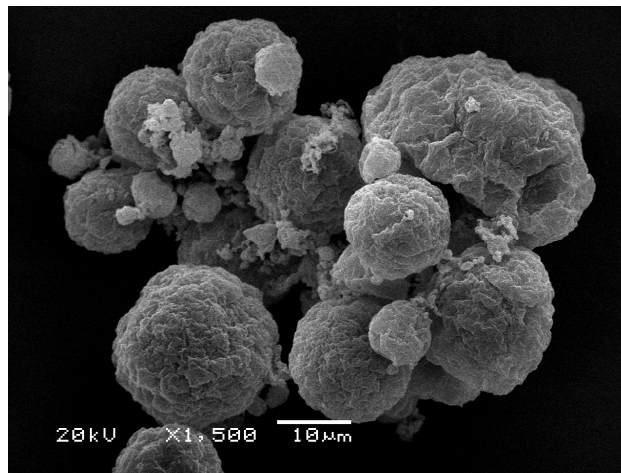


Figura 15. Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostra após 5 dias de degradação em tampão fosfato 0,05M pH 7,4 (10mg de RIF/50mg PHBV e 1% PVA)

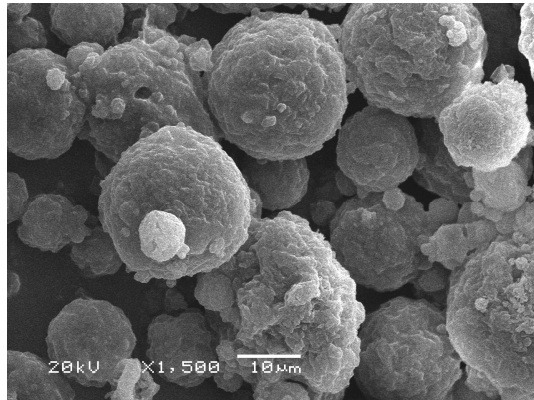


Figura 16. Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com 10 dias de degradação em tampão fosfato 0,05M pH 7,4 (10mg de RIF/50mg PHBV e 1% PVA

Entretanto a fig 16 que mostra o comportamento das partículas após 10 dias indica uma leve degradação da superfície do polímero.

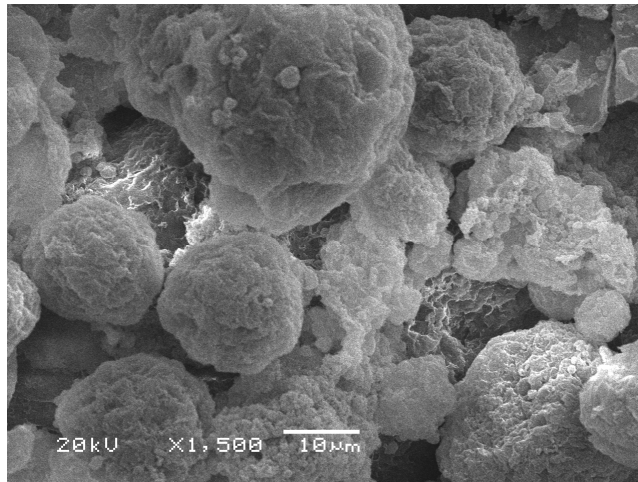


Figura 17 Micrografia de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com 15 dias de degradação em tampão fosfato 0,05M pH 7,4 (10mg de RIF/50mg PHBV e 1% PVA

A fig 17 mostra que após 15 dias a degradação da superfície do polímero é notória. Quando foi monitorada a liberação da RIF sem a adição de etanol no meio no tempo de 1 hora (60 minutos) a RIF não foi liberada. Logo, concluí-se que somente nestas condições poderia ter liberação da RIF quando ocorre-se a degradação da partícula. Em virtude disto, somente poderia ser percebida a liberação da RIF após 15 dias porque neste tempo de monitoramento é que teríamos uma degradação notória da superfície do polímero,

## CONCLUSÕES

A preparação e caracterização do microencapsulamento de RIF e de sua atividade antimicrobiana e da liberação controlada foram atingidos.

Nos aspectos específicos a preparação de micropartículas poliméricas, pelo método de emulsificação seguida de evaporação do solvente, utilizando-se o polímero biodegradável PHBV (poli-hidroxibutirato-co-valerato) foram obtidos com um rendimento de 53%. O qual pode ser variado em função da técnica a ser seguida. O rendimento de encapsulamento da RIF em micropartículas de PHBV foi de 15% e com um conteúdo de RIF de 31% nas condições otimizadas. As partículas obtidas foram esféricas de tamanho ao redor de 17-34  $\mu$ m.

No estudo de variação da concentração do PVA e de PHBV em função da liberação da Rifampicina, foi encontrado que mantendo a concentração do PHBV e variando a concentração do PVA a liberação poderia ser modulada. Na concentração 1% de PVA deu ao redor 53% de liberação. Entretanto, na concentração de 1,2% um valor de 20% foi observado. Quando foi mantida a concentração de PVA em 1% e foi variada a concentração de PHBV em 30 mg/mL a liberação foi maior nesta concentração atingindo um valor de 75% em 60 minutos ao contrario do valor de 53% quando era 1% PVA e 50 mg/mL de PHBV. Segundo este ensaio a liberação sustentada se atinge melhor a 50 mg/mL de PHBV, 1% de PVA e 10 mg de RIF já que nesse período a dissolução da RIF é atingida em 100%. Isto mostra que a RIF na micropartículas de PHBV está integrada na partícula e não somente adsorvida na superfície da partícula. Nota-se que também este foi o melhor método de obtenção das micropartículas encapsulando a RIF.

As propriedades antibacterianas de RIF/PHBV se mantiveram, quando comparado com RIF livre e alguns casos foram maiores que a RIF livre. Este fato precisa ser melhor analisado e não está dentro do escopo desta tese.

A avaliação da citotoxicidade da RIF livre e encapsulada mostrou uma significativa diminuição da citotoxicidade da RIF/PHBV comparada com a RIF livre. Uma diminuição de ao redor de 125 vezes de diminuição da citotoxicidade pelos ensaios de VN e MTT

foram encontrados. Isto facilitaria o efeito terapêutico do antibiótico e diminuiria os efeitos secundários da RIF como uso especialmente em cateteres na medicina.

Em termos de biodegradação foi notado que a possível liberação do RIF somente poderia ser após 10-15 dias

## BIBLIOGRÁFIAS

- ARSHADDY, R. (1991). Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: Polylactides and related polyesters. *J. Control. Release* 17, 1-22.
- BLANCHARD, J.S. (1996). Molecular Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann. Rev. Biochem.* 65, 215-221.
- BARAN, E.T.; OZER, N.; HASIRCI, V. (2002). Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an *in vitro* study. *J. Microencapsul.* 19, 363-376.
- BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. (2004). Nanoparticle-coated microparticles: Preparation and characterization. *J. Microencapsul.* 21, 499-512.
- BIRNBAUN, D.T.; KOSMALA, J.D.; HENTHORN, D.B.; BRANNON-PEPPAS, L. (2000). Controlled release of the b-estradiol from PLAGA microparticles: The effect of organic solvent on encapsulation and release. *J. Control. Release* 65, 375-380
- BRANDAU, T. (2002). Preparation of microdisperse controlled release microcapsules, *Int. J. Pharm.* 242, 179-184.
- BROWN, E. N.; WHITE, S. R.; SOTTOS, N. R. (2004). Microcapsule induced toughening in a self-healing polymer composite, *J. Mater. Sci.* 39, 1703-1710.
- C.A. Perusse e S.S.Guterres (2006). Congresso brasileiro de engenharia e ciência dos materiais
- CENTERS OF DISEASES CONTROL (1999). Primary multi-drug-resistant tuberculosis-Ivanovo Oblast, Russia. *Morb. Mortal Weekly Rep.* 48, 661-663.
- CENTRO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICO DO ESTADO DE SÃO PAULO (1998).
- PROF<sup>a</sup> ALEXANDRA URANJAC

- CHEN, D.R; BEI, J.Z.;WANG, S.G. (2000). Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* 67, 455-459.
- CHEN, D. R.; BEI, J. Z WANG, S. G., (2000). Polycaprolactone microparticle and their biodegradation, *Polym. Degrad. Stab.*, 67, 455-459.
- COLL, P. (2003). Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infermedades infecc. Microbiol. Clin.* 21, 299-308. *Chem. Abstr.* (2003) 16, 1676.
- CONNORS, K.A.; AMIDON, G.L.; STELLA, V. J (1986). Chemical stability of pharmaceuticals: A handbook for pharmacists. 2 ed. New York, Interscience, 728-32.
- CONWAY, B.R.; EYLES, J. E.; ALPAR, H.O. (1997). A comparative study on the immune responses to antigens in PLA and PHB microspheres. *J. Control. Release* 49, 1-9.
- CORREA, D.H.A.; MELO, P.S.; DE CARVALHO, C.A.A.; DE ZEVEDO, M.B.M.; DURÁN, N.; HAUN, M. (2005). Dehydrocrotonin and its beta-cyclodextrin complex: Cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 510, 17-24.
- DE OLIVEIRA, A. G.; ANDRE FILHO, N. (1999). Sistemas de Micro/Nanoencapsulação de Fármacos. *Infarma.* 9, 18-19.
- DESAI, M.P.; LABHASEWAR, V.; AMIDON, G.L.; LEVI,R.J. (1996), Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm. Res.* 131838–1845.
- DLUND, U.; ALBERTSSON, A.C. (2002). Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. *Adv. Polym. Sci.* 157, 67-112. *Chem. Abstr.* (2003) 42, 249.

- DONBROW, M. (1991). *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*. Boca raton, CRC, 1-13
- DURÁN, N.; DE AZEVEDO, M.M.M. (2002). Rede de pesquisa em nanobiotecnologia. Disponível em [www.comciencia.br](http://www.comciencia.br), 1-7. Acesso em: 18 de agosto 2006.
- DUNN, R. L. (1991). *Polymeric Matrices.* In Dunn, R, L.; Ottembrite, R.M.; *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, Washhignton, DC, *Amer Chem. Soc.* 10-23
- EISENBRAND, G.; POOLI-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R., KLEINER, J. (2002). *Methods of in vitro toxicology. Food Chem. Toxicol.* 40, 193-236.
- FARIAS, W.V.L.; SADER, H.S.; LEME, I.L.; PIGNATARI, A.C. (1997). Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais, *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, 43, 199-204..
- FINCH, C. A. (1990). Microencapsulation, in: Elvers, B.; Hawkins, S.; Schulz, G.; *Olmann's Enciclopédia Industrial Chemistry*, 5<sup>th</sup>. Ed Weinhein: Verlagsgssellschft, v A 16, 575-588.
- FRIBERG, S.; ZHU, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled release. *Intern. J. Pharm.* 282, 1-18.
- GENTA, I.; PERUGINI, P.; PAVANETO, F. (1998). Different molecular weigth chitosan microspheres: Influence on drug loading and drug release. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 24, 779-784.
- GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M.C.; ILLUM, S.; DAVIS, S.S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studiesof a water soluble drug. *J. Control. Release*, 57, 171-185.

- GUINÉS, J. M.(1996). Thermal investigation of cristalization of polyethylene glycols in solid dispersions containing oxazepan. *Intern. J. Pharm.* 143, 247-253.
- GUIOT, P.; COUVREUR, P (1983). Qunatitative study of the interaction between polybutyrycyanoacrylate nanoparticles and mouse peritoneal macrophages in culture. *J. Pharm. Belg.* 38, 130-134
- HA, J.C.; LEE, Y.M.; KIM, SY.J.; (2000). Poly(ethylene oxide)-ply(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) ( plurovic)/poly(epsilon-caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanoespheres – I. Preparation and characterization.; *J. Control Release.* 62, 381-392
- HASS, J.; KUMAR, M.N.V.R.; BAKOWSKY, L.C.M., (2003). Preparation of cationic PCLnanoparticles for drug and gene delivery. In 30<sup>th</sup> & Exposition of the Controlled Release Society. Abstract 260.
- KASSAB, A.C.; XU, K.; DENKBAS, E.B.; DOU, Y.; ZHAO, S.,; PISKIN, E. (1997). Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolizant agent. *J. Biomater. Sci. Polym.* 8, 947-961.
- KIM, G.J.; BANG, K.H.; KIM, Y.B.M.; RHEE, Y.H. (2000). Preparation and characterization of native poly(3-hidroxybutyrate) microspheres from *Ralstonia eutropha.*, *Biotechnol. Lett.* 22, 1487-1492.
- KOOSHA, F.; MULLER, RH.; DAVIS, S.S. (1989). Polyhydroxybutyrate as a drug carrier. *Crit. Rev. Ther Drug Carrier Syst.* 6, 117-130
- KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. (2002). Dicionário Terapêutico Guanabara. Edição 2002/2003, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan. p.18-89.
- KRAHENBUHL, O.; TSCHOPP, J. (1991). Debate: The mechanism of lymphocyte-mediated Killing. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today.* 12, 399-402.

- LUAN, X.; BODMEIER, R. (2006). In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: influence of the formulation and processing parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 27, 143-149.
- LUZZI, L.; PALMIERE, A (1985). An Overview of pharmaceutical Applications. In: Lim, F. Biomedical Applications of Microencapsulation. Boca Raton, CRC, 2-14
- MINISTÉRIO DA SAÚDE –Secretária de Vigilância em Saúde- SVS. (2001)
- MENDEL, G. L.; PETRI-JR, W. A.; (1996). Antimicrobial agents: drugs used in the chemotherapy of tuberculosis, *Micobactérium avium* Complex Disease, and Leprosy. In: Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9 ed. Estados Unidos, McGraw-Hill, 1155-1167.
- MIYAZAKI, S.; TAKAHASHI, A.; KUBO, W. (2003). Poly n-butylcyanoacrylate (PNBCA) nanocapsules as carrier for NSAIDs: *in vitro* release *in vivo* skin penetration. *J. Pharm. Sci.* 6, 240-245.
- NELSON, G. (2002). Application of microencapsulation in textiles. *Int. J. Pharm.* 242, 55-62.
- O'DENNELL, P.B.; MCGINITY, J. W. (1997). Preparation of microspheres by solvent evaporation technique. *Advan. Drug Delivery Rev.* 28, 25-42
- OLIVEIRA R.B. ; LIMA E.M. (2006). Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. *Rev. Eletrônica Farm.* 3, 29-35.
- PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. (2003). Biodegradabilidable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.* 55, 329-347
- RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. (1993). The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA-ALterm. Lab. Anim.* 21, 89-96.

- REPETTO, G.; SANZ, P. (1993). Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function - in-vitro effects of 24 metals. *Atla-Altern. Lab. Animals* 21, 501-507.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R.S. (1983). Patologia estrutural e funcional. 2 ed., Rio de Janeiro, interamericana, 329-334.
- ROSSI, S.; AZGHANI, A.O.; OMRI, A. (2004). Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid). Controlled release system. *J. Antimicrob. Chemoter.* 54, 1013-1018.
- SANSDRAP, P.; MOES, A. J.(1993) Influence of manufacturing parameters on the size characteristics an the release profiles of nifedipine from poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *I ntern. J. Pharm.* 98, 157-164.
- SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. (2005). Fármacos no combate a tuberculose: passado, presente e futuro. *Quim. Nova* 28, 678-682.
- SUDESSH K.; ABE, K.; DOI, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanotes: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 25, 1503-1555.
- THIES, C. (1996). A survery of microencapsulation processes. In: Benita, S.; Microencapsulations: methods and industrial applications, 1 ed New York: Marcel Dekker, cap 1, 1-20.
- UHRICH, K.E.; CANNIZZARO, S. M.; LANGER, R.S.; SHAKESHEFF, K.M. (1999). Polymeric systems of controlled drug release. *Chem. Rev.* 99, 3181-3198.
- UEDA, H.; TABATA, Y. (2003). Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials. *Advan. Drug Delivery Rev.* 55, 501-518.
- USP – THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2004). v 27, NF 22, Twinbrook Parkway, Rockville, 2148-2168

- WASAN, K.M.; MORTON, R.E. (1996). Differences in lipoprotein concentration and composition modify the plasma distribution of free and liposomal amphotericin. *Pharm. Res.* 1, 462-468
- WATTS, P.J.; DAVIES, M.C.; MELIA, C.D. (1990). Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. *Crit. Rev. Ther Drug Carrier Sys.* 7, 235-259.
- YOUAN, B.B.C.; HUSSAIN, A.; Nguyen, N. (2003). Evaluation of sucrose as alternative surfactants in microencapsulation of proteins by the solvent evaporation method. *AAPS Pharm. Sci* 5, 1-9.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)