



**Universidade Federal do Rio Grande do Norte**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em**  
**Medicamentos**



**FÁTIMA DUARTE FREIRE**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS PARTICULADOS DE  
QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO GÁSTRICA DE AMOXICILINA**

Natal  
2015

FÁTIMA DUARTE FREIRE

**Obtenção e Caracterização de Sistemas Particulados de Quitosana para  
Liberação Gástrica de Amoxicilina**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PGDITM/UFRN), como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientador Profa. Dra. Fernanda Nervo Raffin

Natal  
2015

Catálogo da Publicação na Fonte  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Freire, Fatima Duarte.

Obtenção e caracterização de sistemas particulados de quitosana para liberação gástrica de amoxicilina / Fatima Duarte Freire. - Natal, 2016.

109f: il.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Nervo Raffin.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - PGDITM/UFRN.

1. Amoxicilina - Tese. 2. Gastrorretenção - Tese. 3. H. pylori - Tese. 4. Quitosana - Tese. I. Raffin, Fernanda Nervo. II. Título.

FÁTIMA DUARTE FREIRE

**Obtenção e Caracterização de Sistemas Particulados de Quitosana para Liberação Gástrica de Amoxicilina**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PGDITM/UFRN), como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Aprovado em 30/03/2015

**Dr. IRINALDO DINIZ BASILIO JUNIOR, UFAL**

Examinador Externo à Instituição

**Dr. ROGÉRIA NUNES DE SOUZA, UFS**

Examinador Externo à Instituição

**Dr. JOSE LUIS CARDOZO FONSECA, UFRN**

Examinador Externo ao Programa

**Dr. RAQUEL DE MELO BARBOSA, UFRN**

Examinador Externo ao Programa

**Dr. FERNANDA NERVO RAFFIN, UFRN**

Presidente

*À minha filha*

**Talita Freire Aragão**

*Por ser a razão da minha existência*

**Não há céu sem tempestades. Risos e lágrimas, sucessos e fracassos, aplausos e vaias fazem parte do currículo de cada ser humano, em especial por aqueles que são apaixonados por produzir novas ideias (*Augusto Cury*).**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, pois sem ELE nada seria possível. É quem me encoraja em todos os aspectos da vida.

A toda minha família que me apoia e incentiva, sempre compreendendo minhas ausências.

A Profa. Fernanda Nervo Raffin, minha orientadora, pela oportunidade de crescimento não só profissional, mas também pessoal, pela amizade, apoio, paciência e por ter-me permitido a conclusão deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Medicamentos, em especial a Allane Gouveia, Fernanda Grace, Graziene Lopes e Klécia Morais pela amizade, aprendizado, auxílio e momentos inesquecíveis que proporcionaram, sendo parte fundamental ao longo desses anos.

Aos alunos de Iniciação Científica que fizeram parte deste trabalho, João Ricardo, Edson Luiz, Allane Gouveia e Fernanda Grace, pela dedicação prestada na parte experimental.

A todos que integram o Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (Família LCQMed) por proporcionar momentos de aprendizado, alegrias e tornarem a vida acadêmica mais agradável.

À Elizângela Souza e Janaína Goes, amigas de todas as horas e incentivadoras do meu trabalho.

À Dra. Regina Esposito que no momento que eu mais precisei, chegou e me ajudou.

Ao secretário do PPgDITM, Guilherme por sempre ser disponível e prestativo.

A todos os que fazem o TecBioFar, LASID E LEFI por sempre que precisei estiveram de portas abertas.

À secretária do Departamento de Farmácia, Célia Miranda, que sempre esteve pronta para ajudar.

Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.

Mais uma etapa foi vencida! Sei que ainda é só o começo ...



## RESUMO

A infecção causada pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) está associada a inflamações gastroduodenais podendo levar ao desenvolvimento de gastrite, úlcera gástrica ou duodenal e câncer gástrico (carcinógeno do tipo 1 para câncer de estômago). A amoxicilina é utilizada como terapia de primeira linha no tratamento do *H. pylori* associada ao metronidazol ou claritromicina e um inibidor da bomba de prótons. Porém, o esquema não é totalmente efetivo devido ao inadequado acúmulo dos antibióticos no tecido gástrico, a inadequada eficácia no nicho ecológico do *H. pylori*, entre outros fatores. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização de sistemas particulados gastrorretentivos de quitosana – amoxicilina visando sua utilização para tratamento de infecções por *H. pylori*. As partículas foram obtidas pelo método de coacervação/precipitação utilizando o sulfato de sódio como agente precipitante e reticulante e duas técnicas: adição da amoxicilina durante a preparação em etapa única e sorção da amoxicilina às partículas previamente preparadas por coacervação/precipitação e *spray drying*. A caracterização físico-química das partículas foi realizada através de MEV, FTIR, DSC, TG e DRX. O perfil de liberação *in vitro* da amoxicilina livre e incorporada nas partículas foi obtido em HCl 0,1N (pH = 1,2). As partículas apresentaram eficiência de encapsulação superior a 80%, formato esférico, com partículas interligadas ou aderidas entre si, de diâmetro nanométrico para os sistemas obtidos por coacervação/precipitação e micrométrico para as partículas obtidas por *spray drying*. A caracterização por FTIR, DSC e DRX demonstrou que o fármaco foi incorporado às nanopartículas de forma dispersa na matriz polimérica. A análise térmica (TG e DSC) indicou que a encapsulação confere maior estabilidade térmica ao fármaco. Amoxicilina encapsulada nas nanopartículas teve liberação mais lenta em comparação ao fármaco livre. As partículas apresentaram perfil de liberação com etapa inicial mais rápida (efeito *burst*) atingindo um máximo em 30 minutos de 35% de amoxicilina para o sistema na proporção 1:1 em relação ao polímero e de 80% para o sistema na razão 2:1. Apesar de simples e de proporcionar elevada eficiência de encapsulação da amoxicilina, o processo de coacervação-precipitação em etapa única utilizando o sulfato de sódio como precipitante/reticulante deve ser otimizado com vistas ao ajuste da cinética de liberação de acordo com a aplicação pretendida.

**PALAVRAS CHAVE:** Quitosana – gastrorretenção – amoxicilina – *H. pylori* – nanopartículas – coacervação/precipitação

## ABSTRACT

The infection caused by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is associated with gastroduodenal inflammation can lead to the development of gastritis, gastric or duodenal ulcer and gastric cancer (type 1 carcinogen for stomach cancer). Amoxicillin is used as first-line therapy in the treatment of *H. pylori* associated to metronidazole or clarithromycin, and a proton pump inhibitor. However, the scheme is not fully effective due to inadequate accumulation of antibiotics in gastric tissue, inadequate efficacy of ecological niche of *H. pylori*, and other factors. In this context, this study aimed to obtaining and characterization of particulate systems gastrorretentivos chitosan - amoxicillin aiming its use for treatment of *H. pylori* infections. The particles were obtained by the coacervation method / precipitation using sodium sulfate as precipitating agent and crosslinking and two techniques: addition of amoxicillin during preparation in a single step and the sorption particles prior to amoxycillin prepared by coacervation / precipitation and spray drying. The physicochemical characterization of the particles was performed by SEM, FTIR, DSC, TG and XRD. The in vitro release profile of amoxycillin free and incorporated in the particles was obtained in 0.1 N HCl (pH = 1.2). The particles have higher encapsulation efficiency to 80% spherical shape with interconnected particles or adhered to each other, the nanometric diameter to the systems obtained by coacervation / precipitation and fine for the particles obtained by spray drying. The characterization by FTIR, DSC and XRD showed that the drug was incorporated into the nanoparticles dispersed in the polymeric matrix. Thermal analysis (TG and DSC) indicated that encapsulation provides greater heat stability to the drug. Amoxicillin encapsulated in nanoparticles had slower release compared to free drug. The particles showed release profile with a faster initial stage (*burst* effect) reaching a maximum at 30 minutes 35% of amoxicillin for the system in 1: 1 ratio relative to the polymer and 80% for the system in the ratio 2: 1. Although simple and provide high encapsulation efficiency of amoxicillin, the process of coacervation, precipitation in one step using sodium sulfate as precipitant / cross-linker must be optimized in order to adjust the release kinetics according to the intended application.

**KEYWORDS:** Chitosan - gastro retention - amoxicillin - *H. pylori* - nanoparticles - coacervation / precipitation

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Esquema ilustrativo do <i>Helicobacter pylori</i> invadindo células epiteliais	6
<b>Figura 2 –</b>	Reação de formação da amoxicilina, partindo do 6-APA e do éster metilhidroxifenilglicina.	10
<b>Figura 3 –</b>	Estruturas da (a) quitina e (b) quitosana	22
<b>Figura 4 –</b>	Fluxograma com a descrição da metodologia utilizada	31
<b>Figura 5 –</b>	Curva de titulação da quitosana obtida por titulação potenciométrica	37
<b>Figura 6 –</b>	Espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) da amoxicilina em solução de ácido acético 2% (1) e do branco (2)	39
<b>Figura 7 –</b>	Curva analítica da amoxicilina em ácido acético 2%, em 272 nm	40
<b>Figura 8 –</b>	Curva analítica da amoxicilina em tampão fosfato pH 7,4, em 272 nm	40
<b>Figura 9 –</b>	Cromatogramas das soluções de amoxicilina em ácido acético 2% (v/v) nos tempos 0 e 120 min	44
<b>Figura 10 –</b>	Incorporação da amoxicilina em partículas previamente preparadas por coacervação / precipitação e <i>spray drying</i> nos tempos de 1 e 3 horas.	49
<b>Figura 11 –</b>	Fotomicrografias das partículas sem o fármaco obtidas por coacervação/precipitação obtidas por MEV (aumento 18.000 X)	52
<b>Figura 12 –</b>	Fotomicrografias das partículas sem o fármaco obtidas por <i>spray drying</i> obtidas por MEV (aumento 2400 X)	53
<b>Figura 13 –</b>	Fotomicrografias das partículas com o fármaco obtida em etapa única (coacervação/precipitação) na razão 1:1 amoxicilina : polímero obtidas por MEV (aumento 20.000 X)	54
<b>Figura 14 –</b>	Fotomicrografias das partículas com o fármaco obtida por sorção durante 1 hora obtidas por MEV (aumento 10.000 X)	55

<b>Figura 15 –</b>	Distribuição granulométrica para partículas sem o fármaco (obtida por coacervação/precipitação)	56
<b>Figura 16 –</b>	Distribuição granulométrica para partículas sem o fármaco (obtida por <i>spray-drying</i> )	57
<b>Figura 17 –</b>	Distribuição granulométrica para partículas com o fármaco obtidas em etapa única (coacervação / precipitação) na razão 1:1 amoxicilina : quitosana	57
<b>Figura 18 –</b>	Distribuição granulométrica para partículas com o fármaco obtidas por sorção durante 1 hora	59
<b>Figura 19 –</b>	Difratogramas das nanopartículas sem o fármaco (NP sem AMX), nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 1:1 (NP 1:1) e 2:1 (NP 2:1) e amoxicilina matéria-prima (AMX).	61
<b>Figura 20 –</b>	Espectros de infravermelho da amoxicilina (1), quitosana (2), sulfato de sódio (3), nanopartículas sem o fármaco (4), nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 1:1 (5) nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 2:1 (6).	62
<b>Figura 21</b>	Curvas TG da amoxicilina (1), quitosana (2), nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 2:1 (3) e nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 1:1 (4).	64
<b>Figura 22</b>	Curvas de DSC da amoxicilina (1), quitosana (2), nanopartículas sem o fármaco (3), nanopartículas com o fármaco na proporção 1:1 (4), e 2:1 (5) em relação ao polímero	66
<b>Figura 23</b>	Perfil de liberação <i>in vitro</i> da amoxicilina em pH 1,2 a partir das	69

nanopartículas obtidas com razão 2:1 e 1:1 fármaco: polímero e da amoxicilina matéria-prima

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>		44
	Avaliação da estabilidade química das soluções de amoxicilina em ácido acético 2% (v/v)	
<b>Tabela 2 –</b>	Eficiência de encapsulação e concentração de amoxicilina incorporada (teor) para diferentes concentrações de quitosana:fármaco	46

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro1 –</b>	Vantagens e desvantagens dos métodos de obtenção de nano e micropartículas	17
------------------	--	----

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1 –</b>	Percentual de grupos aminos protonáveis (GD)	28
<b>Equação 2 –</b>	Determinação da massa molar viscosimétrica	29
<b>Equação 3 –</b>	Capacidades de sorção máxima ( <i>qm</i> )	34
<b>Equação 4 –</b>	Incorporação do fármaco (%)	35
<b>Equação 5 –</b>	Eficiência de encapsulacao (%)	35
<b>Equação 6 –</b>	Determinação do potencial zeta	36



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 6-APA** - Ácido 6-amino-penicilâmico
- AMX** - amoxicilina
- CLUE** - cromatografia líquida de ultra eficiência
- DRX** – difração de raios-X
- DSC** – calorimetria exploratória diferencial
- DTA** – análise térmica diferencial
- DTG** – termogravimetria derivada
- FTIR** – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
- g** – grama
- GD** - grau de desacetilação
- HCl** - ácido clorídrico
- HPMC K4** Hidroxipropilmetilcelulose K4
- IBP** - Inibidor de bomba de próton
- IV** – Infravermelho
- J** – Joules
- KBr** – brometo de potássio
- KOH** - hidróxido de potássio
- kV** – kilovolt
- m/m** – massa/massa
- mA** – miliampere
- MEV** – microscopia eletrônica de varredura
- mg** - miligrama
- N<sub>2</sub>** – nitrogênio
- NaOH** - hidróxido de sódio
- nm** nanômetro
- PAA** ácido poliacrílico
- PVP** - polivinilpirrolidona
- qm** - capacidade de sorção
- QS** - quitosana
- T** – temperatura
- TG** – termogravimetria

**T<sub>onset</sub>** – temperatura *onset*  
**T<sub>pico</sub>** – temperatura de pico  
**TPP** - tripolifosfato  
**UV / VIS** - ultravioleta visível  
**ζ** potencial zeta  
**η** viscosidade molal  
**λ<sub>max</sub>** lâmbida máximo  
**μm** - micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>4</b>
2.1	<i>Helicobacter pylori</i>	4
2.2	Amoxicilina	10
2.3	Sistemas de Liberação Gastrorretentivos	12
2.3.1	Sistemas Micro e Nanoparticulados	15
2.3.2	Sistemas de Liberação Gastrorretentivos aplicados à infecção do <i>H. pylori</i>	18
2.4	Quitosana	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
3.1	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
4.1	Reagentes e solventes	26
4.2	Equipamentos e acessórios	26
<b>4.3</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.3.1	Purificação da Quitosana	27
4.3.2	Caracterização da Quitosana	28
4.3.2.1	Grau de desacetilação	28
4.3.2.2	Massa molar viscosimétrica média	28
4.3.3	Análise da amoxicilina por espectroscopia de absorção na região do UV	29
4.3.3.1	Obtenção do espectro de absorção da amoxicilina	29
4.3.3.2	Curvas analíticas para quantificação da amoxicilina por espectroscopia de absorção na região do UV	30
4.3.4	Obtenção das Partículas	31
4.3.4.1	Partículas obtidas sem o fármaco pelo método de coacervação/precipitação	32
4.3.4.2	Partículas obtidas sem o fármaco pelo método de secagem por aspersão ( <i>spray drying</i> )	32
4.3.4.3	Partículas obtidas com o fármaco	33
4.3.4.3.1	Avaliação da estabilidade das soluções de amoxicilina em ácido	33

acético 2% (v/v)		
4.3.4.3.2	Adição do fármaco às partículas	33
4.3.4.3.3	Adição do fármaco durante a formação das partículas (etapa única)	34
4.3.4.3.4	Adição da amoxicilina por sorção às partículas previamente preparadas	34
4.3.5	Determinação da eficiência de encapsulação	35
4.3.6	Caracterização físico-química das partículas	35
4.3.6.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
4.3.6.2	Determinação do potencial zeta	36
4.3.6.3	Difração de raios-X (DRX)	36
4.3.6.4	Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	37
4.3.6.5	Análise termogravimétrica	37
4.3.6.6	Análise calorimétrica exploratória diferencial	37
4.3.7	Estudos de liberação <i>in vitro</i>	38
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
5.1	Purificação da Quitosana	39
5.2	Caracterização da Quitosana	39
5.2.1	Determinação do Grau de desacetilação	39
5.2.2	Massa molar viscosimétrica média	41
5.3	Análise da amoxicilina por espectroscopia de absorção na região do UV	41
5.3.1	Obtenção do espectro de absorção da amoxicilina	41
5.3.2	Curvas analíticas para quantificação da amoxicilina por espectroscopia de absorção na região do UV	42
5.4	Obtenção das Partículas	44
5.4.1	Partículas obtidas sem o fármaco pelo método de coacervação/precipitação	44
5.4.2	Partículas obtidas sem o fármaco pelo método de secagem por	45

aspersão ( <i>spray drying</i> )	
5.4.3 Partículas obtidas com o fármaco	46
5.4.3.1 Avaliação da estabilidade das soluções de amoxicilina em ácido acético 2% (v/v)	46
5.4.3.2 Adição da amoxicilina durante a formação das partículas	48
5.4.3.3 Adição da amoxicilina por sorção às partículas previamente preparadas	51
5.5 Caracterização físico-química das partículas	54
5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	54
5.5.2 Determinação do potencial zeta	62
5.5.3 Difração de raios-X (DRX)	62
5.5.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	64
5.5.5 Análise termogravimétrica	66
5.5.6 Análise calorimétrica exploratória diferencial	68
5.6 Estudos de liberação <i>in vitro</i>	71
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>74</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>76</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Helicobacter pylori* é uma bactéria gram negativa, que coloniza principalmente a mucosa gástrica e tem sido associada com diferentes patologias gástricas (BUCKLEY; O'MORAIN, 1998; COVER; BLASER, 2009, DUNN; COHEN; BLASER, 1997). A infecção pela bactéria é considerada a principal causa de gastrite crônica ativa e desempenha importante papel no desenvolvimento da úlcera péptica, bem como na gênese do adenocarcinoma gástrico.

O câncer gástrico é a segunda causa de morte no mundo e em 1994, a bactéria foi classificada como carcinógeno do tipo 1 para câncer de estômago pelo Agência Internacional de Pesquisa de Câncer, órgão subordinado à Organização Mundial de Saúde (STEWART; KLEIHUES, 2003; TAN, WONG, 2011).

A aquisição da infecção pelo *H. pylori* ocorre principalmente na infância, e geralmente a colonização é assintomática, resultando apenas em sinais histológicos de gastrite crônica. É considerada a causa de infecção crônica mais freqüente em humanos. Estima-se que cerca de 50% da população mundial estejam acometidos por esse microorganismo (KIM, et al, 2011).

Os tratamentos para a erradicação do *H.pylori* têm-se revelado um verdadeiro desafio. Tem sido recomendado o uso de um esquema triplo utilizando um inibidor de bomba de prótons (IBP) em dose padrão, claritromicina 500 mg e amoxicilina 1 g ou metronidazol 400 ou 500 mg, duas vezes ao dia. Contudo os esquemas de tratamento do *H. pylori* recomendados atualmente não são totalmente efetivos, possuindo uma taxa de erradicação de 80% (GRAHAM; 2009, MALFERTHEINER et al., 2012; O'CONNOR; GISBERT; O'MORAIN, 2009; ZULLO et al., 2012). Diversos fatores influenciam a falha no tratamento, tais como, resistência aos antibióticos, difícil acesso ao habitat da bactéria (por baixo da camada de muco aderente à mucosa gástrica), baixa adesão do paciente à terapêutica, instabilidade dos antibióticos em meio ácido e o curto tempo de residência dos mesmos (GRAHAM; 1998; GISBERT; PAJARES, 2005).

Para se conseguir uma melhor erradicação do *H. pylori*, diferentes propostas têm sido feitas, entre elas, o uso de um esquema terapêutico quádruplo contendo

bismuto (KATELARIS; 2002), terapia sequencial (TONG et al., 2009, VAKIL; VAIRA, 2008) e a utilização de outros antibióticos, tais como a levofloxacina. (GISBERT et al., 2006). No entanto, estas opções apresentam algumas limitações. O bismuto não está disponível em muitos países e também a necessidade de um maior número de comprimidos, o que torna esse esquema mais complexo em comparação com o regime triplo padrão. A maioria dos estudos sobre a terapia sequencial foi realizada na Itália e, apesar dos resultados promissores, SHEHADA, SRUGO e SHAOUL (2007) demonstraram que essa terapia não teve êxito em crianças e adultos jovens quando foi observada falha do regime anterior de tratamento. A levofloxacina, tem uma ampla utilização para outras infecções, e assim, o seu fator de resistência já é relativamente elevado, cerca de 15% (CAROTHERS et al., 2007).

A fim de se aumentar a eficácia dos antibióticos, sistemas de liberação gastrorretentivos têm sido delineados utilizando partículas obtidas a partir de polímeros mucoadesivos para que estes sistemas permitam a liberação do fármaco na área afetada, protegendo-o de fluidos gástricos e aumentando o seu tempo de residência (DHAWAN; SINGLA; SINHA et al., 2004; JAIN; JANGDEY, 2009).

Entre os polímeros mucoadesivos atualmente explorados, a quitosana está ganhando cada vez mais importância devido às suas características biológicas de biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e mucoadesividade (CHOWDAR; RAO, 2004; HEJAZI; AMIJI, 2003). Em condições ácidas, os resíduos amino protonados da quitosana podem interagir eletrostaticamente com as glicoproteínas da mucosa gástrica carregada negativamente, uma vez que os grupamentos ácido siálico e éster sulfatados são totalmente ionizados em pH acima de 2,6 (SOGIAS et al., 2008).

Dentre os antibióticos indicados no tratamento do *H. pylori*, a amoxicilina é amplamente utilizada na forma de cápsulas e comprimidos por via oral. Estas formas farmacêuticas convencionais têm um curto tempo de residência no estômago e, também pode haver degradação em meio ácido gástrico (pH 1,2) pela abertura do anel  $\beta$ -lactâmico. Assim, estas formas farmacêuticas convencionais não permitem a obtenção de concentrações eficazes do antibiótico no local da infecção. Consequentemente, para superar estes problemas, a amoxicilina é administrada em

altas doses (1 mg) duas vezes ao dia, aumentando o risco de ocorrência de toxicidade sistêmica e efeitos adversos (TAVARES, 2009).

Na literatura há diversos sistemas propostos para melhorar a eficácia terapêutica da amoxicilina no tratamento do *H. pylori* pelo encapsulamento em sistemas particulados de quitosana, porém nenhum estudo abordou o método de coacervação / precipitação na obtenção desses sistemas, o qual se caracteriza por ser um método simples, que não necessita de aparatos complexos e nem o uso de solventes orgânicos.

Assim sendo, a proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de sistemas particulados de amoxicilina gastrorretentivos de forma que a incorporação da amoxicilina neste sistema tenha a proteção contra as ações do suco gástrico e um maior tempo de contato com a mucosa gástrica.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* é uma bactéria gram negativa, responsável por uma das mais frequentes infecções em seres humanos (BUCKLEY; O'MORAIN, 1998; COVER; BLASER, 2009; DUNN; COHEN; BLASER, 1997). Coloniza a mucosa gástrica (especificamente as microvilosidades gástricas, localizadas acima da camada de células epiteliais do estômago) de mais de 50% da população mundial, causando diversas patologias, como úlceras gástricas e câncer gástrico; no entanto, a maioria dos indivíduos infectados é assintomática. Este grande reservatório de portadores assintomáticos torna difícil a erradicação do *H. pylori* (AZEVEDO, HUNTINGTON, GOODMAN, 2009; COVER; BLASER, 2009; KIM, et al, 2011; ROTHENBACHER, BRENNER, 2003).

A descoberta do *H. pylori* aconteceu de forma lenta e gradual. O primeiro relato sobre úlcera gástrica foi feito em 1586 pelo italiano Marcello Donati. (BUCKLEY, O'MORAIN, 1998; KIDD, MODLIN, 1998). Durante vários anos, postulou-se que a patogênese da úlcera gástrica estivesse associada exclusivamente ao estilo de vida, tabagismo e estresse, sendo tratada com repouso e uma dieta especial, pois se acreditava que nenhuma bactéria poderia viver no estômago humano, devido à extensa quantidade de ácido produzida neste órgão (GUSTAFSON; WELLING, 2010; KONTUREK, 2003; TAN, WONG, 2011).

Em 1875, Bottcher e Letulle noticiaram a existência de bactérias em regiões próximas a úlceras sugerindo a sua relação com a doença gástrica (GUSTAFSON; WELLING, 2010). Em 1892, o pesquisador Giulio Bizzozzero observou a presença de organismos em forma de espiral em estômago de cães (AXON; QUINA, 1994). Posteriormente, esses organismos foram encontrados no estômago de indivíduos com carcinoma gástrico por W. Krienitz (KIDD, MODLIN, 1998). Em 1919, Kasai e Kobayashi relataram a presença de bactérias espiraladas em vários mamíferos, que

causavam erosões hemorrágicas podendo ser curadas recorrendo-se a agentes antimicrobianos.

Diante desses achados, diversos pesquisadores de diferentes países começaram a se interessar por estes microorganismos espiralados, os quais foram identificados na mucosa gástrica humana bem como pelo tratamento de doenças gástricas usando a terapia antibiótica. No entanto, entre 1960 e 1970, os médicos e microbiologistas acreditavam que o estômago fosse estéril, visto que foram obtidas culturas bacterianas negativas e, portanto, as evidências da presença de microorganismos espiralados no estômago caíram em declínio (MARSHALL, 2002).

Robin Warren, patologista, observou por vários anos em pessoas com gastrite, bactérias na camada de muco do tecido gástrico muito semelhantes às descritas em trabalhos do final do século XIX. Embora ele estivesse convencido de que, de alguma forma essas bactérias desempenhavam um papel na doença gástrica, o ceticismo de seus colegas fez com que ele relutasse em discutir mais amplamente estes achados na comunidade de gastroenterologia (MARSHALL; WARREN, 1994). Em 1982, Barry Marshall, gastroenterologista, sentiu-se atraído pela hipótese de Warren, e o convenceu a lhe permitir investigar ainda mais seu contexto clínico. Assim, no mesmo ano, Marshall apresentou um resumo detalhando suas investigações iniciais à Associação Australiana de Gastroenterologia, o qual foi rejeitado. Este mesmo resumo foi aceito pelo Workshop Internacional de Infecções por Campilobactérias, ganhando assim credibilidade científica (BUCKLEY, O'MORAIN, 1998; KONTUREK, 2003).

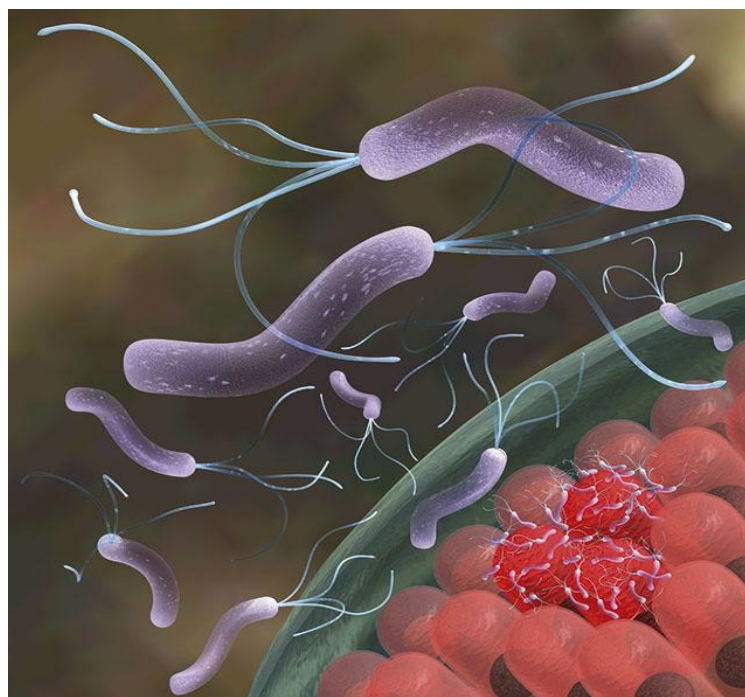
Em 1983, Warren e Marshall, isolaram e cultivaram bactérias de tecido gástrico humano, sugerindo que os casos de gastrites e úlceras estomacais eram decorrentes da colonização da mucosa gástrica por bactérias. A fim de comprovar que o microrganismo era o agente causador da doença, Marshall ingeriu uma cultura de *H. pylori*, demonstrando que esta poderia colonizar uma mucosa normal e induzir gastrite (MARSHALL; WARREN, 1994; MARSHALL et al, 1988; MORRIS; NICHOLSON, 1987).

Essa descoberta revelou-se essencial para a compreensão da etiologia das patologias gástricas. Em reconhecimento ao trabalho de Marshall e Warren, foi

atribuído a eles no ano de 2005, o prêmio Nobel de Medicina (WEYDEN; ARMSTRONG; GREGORY, 2005).

Em 1994, o Instituto Nacional de Saúde dos EUA reconheceu *H. pylori* como a principal causa de úlceras pépticas e, no mesmo ano, o microorganismo foi categorizado pela Organização Mundial de Saúde como uma substância cancerígena do grupo 1 (STEWART; KLEIHUES, 2003; TAN, WONG, 2011). Em 2012, o IV Consenso de Maastricht reforçou a constatação de que a infecção por *H. pylori* é o fator de risco mais comum para câncer gástrico em humanos (MALFERTHEINE et al., 2012).

Observado à microscopia ótica e eletrônica, o *H. pylori* pode ser encontrado com dois tipos de morfologia: bacilar, encontrada predominantemente em culturas novas ou cocóide, provenientes de cultura velha (BUCKLEY; O'MORAI, 1998; KONTUREK, 2003). Mede aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,5 a 0,1  $\mu\text{m}$  de diâmetro e possui de 4 a 6 flagelos, os quais ajudam na penetração através da camada de muco até chegarem à superfície das células epiteliais gástricas (Figura 1), (KONTUREK, 2003; OWEN, 1998).



**Figura 1** - Esquema ilustrativo do *Helicobacter pylori* invadindo células epiteliais (Fonte: [www.bio.davidson.edu](http://www.bio.davidson.edu))

Diversas estratégias permitem a sobrevivência do *H. pylori* no ambiente ácido do estômago aumentando a sua capacidade de causar infecção. Na fase precoce de colonização, a bactéria necessita atravessar a camada de muco que protege o epitélio gástrico, minimizando desta forma sua exposição ao meio ácido. Para tanto, são sintetizadas proteases e fosfolipases pelo *H. pylori*, as quais degradam os componentes do muco, facilitando então a invasão da bactéria (AMIEVA; EI-OMAR, 2008; SUERBAUM; LADEIRA et al., 2003; MICHETTI, 2002).

Outra enzima relevante na patogenicidade do *H. pylori* é a urease. Esta atua como receptor de  $H^+$ , gerando pH neutro no interior e exterior da bactéria tornando assim o meio gástrico favorável à sobrevivência do *H. pylori* (AMIEVA; EI-OMAR, 2008; BUCKLEY; O'MORAI, 1998; CONWAY, 2005). Outras variedades de enzimas como superóxido dismutase, catalase e arginase são sintetizadas, conferindo proteção contra a atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (AMIEVA; EI-OMAR, 2008).

Além disso, a habilidade do *H. pylori* em se movimentar e controlar sua orientação espacial através de respostas quimiotáticas é essencial para a sua colonização. Já no interior da mucosa gástrica, aproximadamente 20% destas bactérias são encontradas aderidas às superfícies das células epiteliais, sendo ainda encontradas nos espaços intercelulares e no interior das células (ALGOOD; COVER, 2006; AMIEVA; EL-OMAR, 2008).

A aquisição da infecção pelo *H. pylori* ocorre principalmente durante a infância. Mesmo nos primeiros meses de vida, entre as populações com condições de vida precárias, geralmente nos países subdesenvolvidos (AMIEVA, EI-OMAR, 2008). Além das condições socioeconômicas e as condições de vida na primeira infância, um fator importante é o modo de transmissão: entre membros da mesma família nos países industrializados (QUEIROZ; LUZZA, 2006). A transmissão pessoa-a-pessoa ocorre através de diversas vias: fecal-oral, oral-oral, bem como a transmissão ambiental através do abastecimento de água contaminada. Um exemplo de transmissão oral-oral é o estilo de vida familiar em países asiáticos como Japão e Coreia do Sul em que ocorre compartilhamento de refeições e talheres, e onde o abastecimento de água é seguro; no entanto a prevalência da infecção por *H. pylori* é de 39% e 60% respectivamente (SIAO; SOMSOUK, 2014).

Para a detecção da infecção pelo *H. pylori* existem diferentes testes diagnósticos, classificados em invasivos e não invasivos. O teste invasivo mais comum é a biópsia, a qual é realizada por endoscopia digestiva. Como testes não invasivos, há o teste respiratório com uréia marcada, testes sorológicos e a reação em cadeia da polimerase (PCR) em antígeno fecal, (CUSTODIO et al., 2005; OGATA et al., 2001).

Embora a maioria das infecções por *H. pylori* sejam assintomáticas, suas manifestações clínicas podem ser confundidas com outros processos patológicos, como dispepsia funcional e doença do refluxo. No entanto, uma determinada população infectada com *H. pylori* pode desenvolver doenças malignas e não-malignas. (WATARI et al, 2014). Atualmente, o tratamento é recomendado apenas em situações especiais. Assim, todos os pacientes portadores de úlcera no estômago e duodeno e infectados pela bactéria deverão ser tratados. Da mesma forma, familiares de primeiro grau de portadores de câncer de estômago deverão ser investigados quanto à presença da bactéria e, em caso positivo, submeter-se ao tratamento. Em outras situações clínicas, à critério médico, o tratamento pode também ser recomendado (MALFERTHEINER et al., 2007).

A monoterapia não é eficaz na erradicação do *H. pylori* e pode levar ao aparecimento de resistência aos antibióticos, assim diferentes associações de antibióticos, administrados juntamente com um inibidor de bomba de prótons (IBP), são o tratamento de eleição (CHEY; WONG, 2007; MALFERTHEINER et al., 2007).

De acordo com Guias Internacionais, o tratamento de primeira linha é constituído de um IBP em dose padrão (omeprazol 20 mg, lansoprazol 30 mg, pantoprazol 40 mg, exomeprazol 40 mg ou rabeprazol 20 mg), claritromicina 500 mg e amoxicilina 1 g ao dia antes das refeições. Para pacientes alérgicos à amoxicilina, faz-se o uso do metronidazol ou tinidazol. Não há consenso sobre a duração ideal da terapia tripla, assim recomenda-se um período de 7-14 dias. As taxas de erradicação com este regime são de 80% (MALFERTHEINER et al., 2012; ZULLO et al., 2012).

Diversos fatores influenciam o insucesso do tratamento, tais como: resistência aos antibióticos, difícil acesso ao habitat da bactéria (por baixo da camada de muco aderente à mucosa gástrica), baixa adesão do paciente à terapêutica, instabilidade

dos antibióticos em meio ácido e o curto tempo de residência dos mesmos no local da infecção (GRAHAM; 1998; GISBERT; PAJARES, 2005). A taxa de resistência à claritromicina vem aumentando, provavelmente devido a uma maior utilização desta em infecções do trato respiratório (BOYANOVA, 2009; CHISHOLM et al., 2009; De FRANCESCO et al., 2007; LINS et al., 2010; ROMANO et al., 2008). O metronidazol, utilizado no tratamento de diversas parasitoses atinge cerca de 40% de resistência nos países desenvolvidos e excede 90% nos países em desenvolvimento (CALVET et al., 2000; OSATO, REDDY, REDDY S.G, 2001; ZHOU et al., 2008). Além do tempo de residência dos antibióticos no estômago, muitas vezes ser insuficiente para atingir concentrações significativas capazes de atravessar a mucosa gástrica e atingir a superfície das células epiteliais, onde reside o *H. pylori*, os fármacos podem sofrer degradação ácida. Desta forma, é necessária a utilização de doses mais elevadas, que se refletem no aumento dos efeitos secundários gastrointestinais, notadamente diarreia, náuseas, vômitos, inchaço e dor abdominal, e, conseqüentemente, a descontinuidade da terapia (TAVARES, 2009).

Com o propósito de aumentar a taxa de erradicação do *H.pylori*, têm sido adotadas diferentes propostas, a saber, uma terapia quádrupla contendo bismuto, terapia sequencial, tratamento concomitante e a utilização de outros antibióticos, tais como a rifabutina, levofloxacina e furazolidona (MALFERTHEINER et al., 2007).

Mesmo após erradicação bem-sucedida, pode ocorrer a reinfecção, pois a resposta imunológica gerada durante a infecção por *H. pylori*, apesar de intensa, não protege contra infecções subseqüentes (COVER; BLASER, 2009).

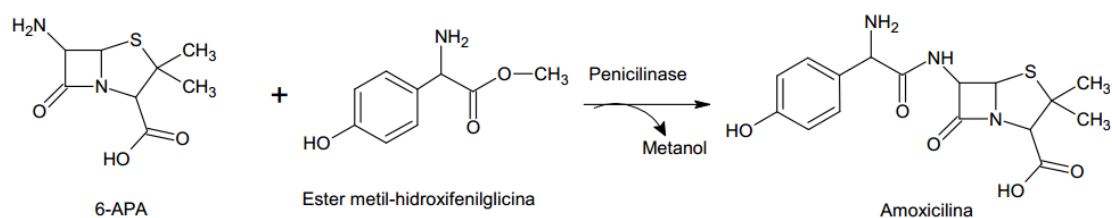
Para superar essas limitações, novas terapias têm sido propostas, tais como o uso de probióticos, sistemas de retenção gástrica e, em uma abordagem preventiva, a tentativa de desenvolver uma vacina eficaz (LOPES et al., 2014; MALFERTHEINER, SCHULTZE, ROSENKRANZ et al., 2008; SCACCIANOCE et al., 2008; SEPPALA et al., 2008)

## 2.2. Amoxicilina

A utilização dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos a partir do final da 2<sup>a</sup> Guerra Mundial representou uma enorme contribuição para as ciências médicas. Esses medicamentos continuam muito utilizados devido à alta eficiência, baixo custo e poucos efeitos colaterais (TAVARES, 2009; WILKE et al., 2005).

A amoxicilina ( $\alpha$ -amino-hidrobenzilpenicilina) é uma penicilina semissintética derivada da ampicilina. A composição de todas as penicilinas apresenta um núcleo comum: o 6-APA (ácido 6-amino-penicilâmico), que é o responsável pela atividade destes compostos. Este núcleo é constituído por um anel tiazolidínico e outro  $\beta$ -lactâmico, ao qual está ligado um grupo amina que inicia a cadeia lateral nas penicilinas. A presença do grupo carboxila confere a todas as penicilinas natureza ácida (ROLINSON, GEDDES, 2007). A figura 2 mostra a reação de condensação do 6-APA com a amina ou éster 4-hidroxifenilglicina e fenilglicina para a obtenção da amoxicilina (GEDDES, KLUGMAN, ROLINSON, 2007, GONÇALVES, GIORDANO, GIORDANO, R. C, 2005).

A par com outras penicilinas semi sintéticas, a amoxicilina foi desenvolvida com o intuito de aumentar o espectro de ação antimicrobiano, tendo em conta os compostos que existiam. Eficaz contra bactérias gram positivas e gram negativas, revela-se mais resistente ao trato gástrico, demonstrando, portanto, uma maior absorção quando administrado por via oral, comparativamente com as penicilinas naturais (GEDDES, KLUGMAN, ROLINSON, 2007).



**Figura 2** – Reação de formação da amoxicilina, partindo do 6-APA e do éster metilhidroxifenilglicina (Fonte: GONÇALVES, GIORDANO, GIORDANO, R. C, 2005)

Para que a atividade destes antibióticos penicilâmicos seja efetiva é necessário que o seu núcleo central se mantenha intacto. A transformação metabólica ou a ocorrência de qualquer alteração química nessa porção da molécula resulta na perda de toda a atividade antibacteriana. Algumas penicilinas hidrolizam-se muito facilmente na presença de metais pesados, ácidos e bases e são desativadas na presença das enzimas  $\beta$ -lactamases, presentes como substâncias naturais em muitos microrganismos. A acidez gástrica pode hidrolisar a amida da cadeia lateral e, tal como no caso da presença de  $\beta$ -lactamases, provocar a abertura do anel de quatro membros (HSU; SHU, 1992).

Embora a ampicilina tenha sido a primeira aminopenicilina a ser introduzida em terapêutica, a amoxicilina é considerada o composto padrão deste grupo, dado que apresenta um espectro de ação idêntico. Porém com maior biodisponibilidade via oral (ERAH, et al, 1997).

O pico de concentração plasmática máxima de amoxicilina é atingido ao fim de cerca de duas horas e, apesar de ter uma boa absorção, grande parte do fármaco é excretada na forma ativa pela urina. O tempo de meia vida plasmática deste composto é cerca de 0,7 a 1,4 horas e, num período de 6 a 8 horas após a administração, recupera-se na urina, sob forma intacta, até 80% da dose absorvida. Distribuem-se facilmente pelos tecidos e líquidos orgânicos e apenas 19 a 33% da fração absorvida é metabolizada, essencialmente pela hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico com formação do ácido amoxicilóico, que é o correspondente ácido penicilóico nas demais penicilinas (TAVARES, 2009).

A amoxicilina é utilizada como terapia de primeira linha no tratamento do *H. pylori* associado ao metronidazol ou claritromicina e um IBP na forma de cápsulas e comprimidos convencionais por via oral (TAVARES, 2009).

Porém, estas formas farmacêuticas convencionais, mesmo administradas em altas doses, não permitem a obtenção de concentrações eficazes do antibiótico no local da infecção (TAVARES, 2009) visto que, além de terem um curto tempo de residência no estômago, são facilmente degradadas em meio gástrico, resultando numa concentração inferior nas microvilosidades. Desta forma, essas cápsulas convencionais podem não erradicar completamente infecções pelo *H. pylori*,



permitindo assim uma recolonização (KAWABAMI; OGATA; PORTORREAL, 2001; LIN; HSU; LAI, 2002).

A fim de prolongar o tempo de residência e proteger a amoxicilina de degradação a nível gástrico, uma série de sistemas gastrorretentivos tem sido desenvolvida, na forma de comprimidos flutuantes (HILTON; DEASY, 1992), comprimidos mucoadesivos (CLAUSEN; BERNKOP-SCHNURCH, 2001), micropartículas mucoadesivas, entre outros (WANG et al., 2000; LIU et al, 2005).

### **2.3 Sistemas de liberação gastrorretentivos**

A biodisponibilidade oral de muitos fármacos é limitada pelo tempo de residência das formas farmacêuticas ao longo do trato gastrointestinal. Desta forma, os sistemas de liberação gastrorretentivos (particularmente micro e nanopartículas mucoadesivas) são delineados com o intuito de obter um aumento do tempo de permanência gástrica do fármaco superior ao dos sistemas convencionais, bem como, melhorar a sua absorção e vetorizá-lo em sítios específicos de ação (BARDONNET et al., 2006; COLLNOT; HUSSAIN; LEH, 2012; COWLES; BERNER, 2003; DESHPANDE et al., 1996; MEISSNER; LAMPRECHT, 2008; MOES, 1993). O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos vem recebendo atenção considerável de pesquisadores (COWLE; BERNER, 2003; HESLINGA, MASTRIA, ENIOLA-ADEFESO, 2009; HOU; MAINARDES, 2007; HWANG; PARK, 1998; RESTANI et al., 2010) uma vez que a obtenção desses sistemas requer menor tempo e custo que o desenvolvimento de novos medicamentos baseados em uma nova molécula ativa (HWANG, PARK, 1998; HOU, COWLE; BENNER, 2003; MAINARDES, 2007).

No caso do tratamento do *H. pylori*, as vantagens deste tipo de sistemas tornam-se evidentes visto que permitem criar um contato mais próximo entre a forma farmacêutica e a membrana absorvente, reduzindo a barreira de difusão e protegendo o fármaco da degradação no lúmen do trato gastrointestinal permitindo assim, um regime de administração única diária, aumentando a adesão à terapêutica

e reduzindo os efeitos adversos (BARDONNET et al., 2006; DESHPANDE et al., 1996; HWANG; PARK, 1998; HOU, COWLES, BERNER, 2003; HUSSAIN; LEH, 2012; MOES, 1993).

Os sistemas gastrorretentivos podem ser classificados em flutuantes, intumescíveis, magnéticos, de alta-densidade, mucoadesivos, todos com diferentes formas de atuação, vantagens e desvantagens: (HOU et al., 2003).

- **Sistemas Flutuantes** possuem baixa densidade resultando na flutuação do dispositivo nos conteúdos gástricos, o que permite a permanência no estômago durante um período prolongado. Podem ser sistemas efervescentes ou não efervescentes. Uma das principais desvantagens dos sistemas flutuantes é a necessidade de níveis elevados de fluidos no estômago para o sistema flutuar e funcionar eficientemente. Além disso, fármacos com baixa solubilidade ou estabilidade no ambiente ácido são limitações para a aplicabilidade desses sistemas (DESHPANDE, 1997; KAWASHIMA et al, 1992; FELL; WHITEHEAD; COLLETT, 2000).

- **Sistemas Intumescíveis** possuem polímeros que, em contato com o fluido gástrico, intumescem, aumentando de tamanho, de modo que não consigam passar através do piloro. Assim, o sistema fica retido no estômago por um longo período mesmo em estado alimentado. Contudo, a integridade desses sistemas pode ser perdida em função da força mecânica causada pelos movimentos peristálticos ou erosão na presença de sucos gástricos, de modo que, após um tempo predeterminado, o dispositivo já não mantém a configuração expandida (DESHPANDE et al., 1997; DESHPANDE et al., 1999; DEVEREUX; NEWTON; SHORT, 1990; CLARKE; NEWTON; SHORT, 1995).

- **Sistemas Magnéticos** contêm no seu interior partículas magnéticas, sendo outro ímã colocado no abdômen na posição do estômago no intuito de manter as partículas por mais tempo no local. Apresentam, no entanto, o grande inconveniente de necessitar de uma elevada precisão na colocação do ímã exterior e o desconforto causado ao paciente, que poderá conduzir a uma diminuição da adesão à terapêutica (ALEXIOU et al., 2002).

- **Sistemas de Alta-Densidade** possuem uma densidade superior ou igual a 1,3 g/mL, a qual é superior à densidade do fluido gástrico. Desta forma, o sistema

aloja-se ao ambiente do estômago e resiste aos movimentos peristálticos. A desvantagem deste sistema é a dificuldade em fabricá-lo com uma grande quantidade de fármaco (> 50%) de forma a obter uma densidade necessária de 2,4-2,8 g/mL (DEVEREUX; NEWTON; SHORT, 1990).

- **Sistemas Bio/Mucoadesivos** aumentam o tempo de retenção gástrica, pois aderem à membrana da mucosa gástrica ou à mucina, glicoproteína componente do muco. A adesão dos polímeros à membrana mucosa pode ser mediada por processos de hidratação, ligação química, mecânica, ou por receptor. Contudo, um muco espesso pode impedir os sítios de ligação na interface muco-polímero os quais, podem ser agravados pela alta taxa de renovação do muco (DAVIS; O'HAGAN, 1994; WILDING; PARK; ROBINSON, 1984; SENG et al., 1995).

Os sistemas de liberação gastrorretentivos não só prolongam o tempo de ação do fármaco, como controlam a liberação deste, em regiões específicas de absorção (CHAWLA et al., 2003).

A absorção de um dado fármaco veiculado através de formas farmacêuticas sólidas é condicionada pelo tempo de residência das formas farmacêuticas no trato gastrointestinal, sendo este tempo de residência distinto entre formas farmacêuticas unitárias e multiunitárias, especialmente em nível do esvaziamento gástrico e trânsito através do cólon (LAMPRECHT; SCHAFER; LEHR, 2001). Desta forma, os sistemas multiunitários são mais vantajosos do que os sistemas unitários, pois podem atenuar as consequências de um esvaziamento gástrico precoce (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; PRASANTHI; PRASANTHI; MANIKIRAN, 2011).

Dentre uma série de sistemas multiunitários propostos (micelas, lipossomas, nanopartículas e micropartículas), os sistemas microparticulados e nanoparticulados recebem grande destaque neste âmbito (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; HE, DAVIS; ILLUM, 1999; LIM et al, 2000; MERTINS et al., 2005; PRASANTHI; PRASANTHI; MANIKIRAN, 2011).

### 2.3.1 Sistemas micro e nanoparticulados poliméricos

Nas últimas décadas, um grande número de estudos tem focado no desenvolvimento de novos sistemas eficientes de liberação de fármacos a fim de atender diferentes necessidades clínicas (DISCHER; EISENBERG, 2002; LANGER; TIRRELL, 2004; QIU; PARK, 2001; XIONG et al., 2014). Sistemas micro e nanoparticulados a base de polímeros naturais ou sintéticos apresentam várias vantagens como transportadores de fármacos, tais como alta estabilidade tanto *in vitro* e *in vivo*, biocompatibilidade e multifuncionalidade (ALONSO, 2004; BRIONES; COLINO; LANA O , 2008; ENSIGN, CONE, HANES, 2012).

A maioria dos autores utiliza os termos "micropartícula" e "nanopartícula" para se referir a partículas com um diâmetro entre 1-999  $\mu\text{m}$  e 1-999 nm, respectivamente (BARDONNET et al., 2006; K. BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; PRASANTHI; PRASANTHI; MANIKIRAN, 2011).

Os sistemas particulados podem ser obtidos por meio de diferentes técnicas, sendo as principais: (a) gelificação ionotrópica; (b) coacervação simples ou complexa; (c) emulsificação com evaporação de solvente; e (d) secagem por atomização (AGNIHOTRI; MALLIKARJUMA; AMINABHARI, 2004; GRENHA, 2012; HEJAZI, AMIJI, 2003).

**Gelificação ionotrópica** – Este método é baseado numa interação iônica entre a carga do polímero e as cargas opostas de um políon (geralmente tripolifosfato de sódio (TPP)) formando um hidrogel (PATIL; CHAVANKE; WAGH, 2012).

**Coacervação** - Envolve uma agregação macromolecular provocada pela dessolvatação do polímero em resposta a trocas químicas ou físicas no meio, podendo ser simples (necessita de um único soluto como, por exemplo, sulfato de sódio) ou complexa (as micropartículas são formadas pela interação interiônica entre polímeros de cargas opostas como quitosana e alginato de sódio (DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, 2009; KISSEL et al., 2006; TOMARO–DUCHESNEAU et al., 2013).

**Emulsificação com evaporação de solvente** - envolve a formação de uma emulsão entre a solução polimérica e uma fase contínua imiscível. A emulsão formada é submetida à agitação até a maior parte do solvente orgânico evaporar, levando à solidificação das microesferas. As microesferas são então, lavadas, centrifugadas e liofilizadas (PATEL et al, 2007).

**Secagem por aspersão** – neste processo, o fármaco pode ser dissolvido ou disperso na solução polimérica, a qual é depois atomizada. O tamanho das partículas pode ser controlado pela taxa de alimentação da solução fármaco/polímero, tamanho do bico atomizador e temperatura de secagem (BOWEY;NEUFELD, 2010; GIUNCHEDI; CONTE, 1995)

A escolha do método mais adequado para se obter um sistema particulado depende da natureza do polímero e do fármaco, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação, tamanho de partícula desejado, estabilidade térmica e química da substância ativa. Para tanto, o método escolhido deve proporcionar um produto final com alta eficiência de encapsulação e baixa polidispersão de tamanho, reprodutibilidade dos perfis cinéticos de liberação, manutenção e melhoramento da estabilidade e atividade do fármaco (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2005; SUAVE et al., 2006).

O quadro 1 apresenta as vantagens e desvantagens destes métodos.

Quadro 1: Vantagens e desvantagens dos métodos de obtenção de nano e micropartículas

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Referências</b>
<b>Gelificação ionotrópica</b>	Nenhuma exigência de solventes orgânicos ou elevadas temperaturas; Método simples, rápido e de baixo custo	Liberação relativamente rápida do fármaco, devido à baixa resistência mecânica das partículas	PATIL; CHAVANKE; WAGH (2012) NARKAR, SHER PAWAR (2010)
<b>Coacervação</b>	Método simples e de baixo custo; Alta eficiência de encapsulação do fármaco; Alto controle do tamanho das partículas com baixo grau de polidispersão	Agregação das partículas; Difícil escalonamento	DUBEY; SHAMI; BHASKER-RAO, (2009) CHUN et al, (2005)
<b>Emulsificação com evaporação de solvente</b>	Método útil para a liberação de moléculas pequenas	Baixa eficiência de encapsulação; Presença de efeitos secundários após liberação do fármaco devido à presença de resíduos de solventes	MAZZARINO et al., (2012) CHAVDA et al., (2009) PATEL et al, (2007)
<b>Secagem por aspersão</b>	Baixo custo de operação, fácil escalonamento e maior rendimento; Alta eficiência de encapsulação; Pouca dependência da solubilidade do ativo e do polímero; Controle definido do tamanho de partícula	Aglomerção das partículas produzidas; Ocorrência de polimorfismo pela temperatura elevada	GIUNCHEDI; CONTE, 1995; BOWEY; NEUFELD, 2010 RAVAL et al 2010

Assim, diferentes partículas (micro e nanopartículas) têm sido avaliadas para o aumento da erradicação da infecção causada pelo *H. pylori* (BARDONNET et al.,

2006; LOPES et al., 2014) porém nenhum estudo abordou o método de coacervação / precipitação na obtenção desses sistemas, o qual se caracteriza por ser um método simples, que não necessita de aparatos complexos e nem o uso de solventes orgânicos.

### **2.3.2 Sistemas de liberação gastrorretentivos poliméricos contendo amoxicilina aplicados à infecção do *H. pylori***

Com base na fisiopatologia relacionada ao *H. pylori* e nos problemas da prática clínica, os sistemas de liberação gastrorretentivos podem melhorar potencialmente a estabilidade de antibióticos em ambiente gástrico, empregando diferentes estratégias de formulações e permitindo que o antibiótico chegue ao sítio alvo do estômago, aumentando o tempo de residência e eficácia (BARDONET et al., 2006<sup>a</sup>; BARDONET et al., 2008<sup>b</sup>; BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; CONWAY, 2005; COOREMAN; KRAUSGRILL; HENGELS, 1993; LOPES et al., 2014; SELGRAD; MALFERTHEINER, 2012).

Patel e Amij (1996) obtiveram hidrogéis liofilizados de amoxicilina e metronidazol compostos por quitosana e óxido de polietileno para liberação dos fármacos no estômago. O hidrogel apresentou um intumescimento de 16% após 1h em fluido gástrico simulado (pH = 1,2). Após 2 h, 65% da amoxicilina e 59% do metronidazol foram liberados do hidrogel em fluido gástrico simulado.

Nagahara et al., 1998, formularam microesferas mucoadesivas contendo amoxicilina e carboxivinil como polímero bioadesivo. Esse trabalho foi o primeiro a demonstrar evidências *in vivo* de um sistema mucoadesivo em ratos. Os autores observaram que as microesferas apresentaram uma atividade 10 vezes superior à suspensão de amoxicilina para a erradicação do *H. pylori*.

Microesferas mucoadesivas contendo amoxicilina e claritromicina foram preparadas através da complexação de ácido poliacrílico com polivinilpirrolidona (PVP) pelo método de evaporação do solvente. Os resultados deste estudo indicam a viabilidade da utilização desse sistema de liberação gastrorretentivo para a

erradicação do *H. pylori* visto que a velocidade de liberação dos agentes antimicrobianos foi significativamente menor do que a liberação obtida a partir das microesferas de PVP (CHUN, SAH, CHOI, 2005).

Liu et al., (2005) obtiveram micropartículas mucoadesivas contendo amoxicilina, etilcelulose (como matriz) e carbopol 934P como polímero mucoadesivo pelo método de evaporação de solvente. O teste de liberação *in vitro* mostrou que cerca de 90% da amoxicilina foi liberada em pH 1,0 no período de 4 horas, e a avaliação de mucoadesividade *in vivo*, demonstrou que 63% das microesferas ainda permaneceu em estômago dos ratos durante esse tempo.

Patel e Chavda, (2009) formularam e avaliaram a performance *in vitro* e *in vivo* de microesferas de quitosana e amoxicilina preparadas por emulsão usando glutaraldeído como agente reticulante. Os resultados mostraram que a proporção fármaco:polímero e velocidade de agitação durante a preparação afetaram diretamente o percentual de mucoadesividade, eficiência de encapsulação, tamanho de partícula e o índice de intumescimento. O melhor resultado encontrado foi de 79% de mucoadesividade após 1 hora, eficiência de encapsulação de 70% e índice de intumescimento 1,42. A liberação do fármaco ocorreu por um período maior que 12 horas, apontando o seu potencial para o tratamento da infecção por *H. pylori*.

Microesferas de amoxicilina foram preparadas com Eudragit RS 100, (o qual constituiu o núcleo) e HPMC K4, usado como polímero mucoadesivo, pelo método de evaporação de solvente para o potencial uso no tratamento de úlceras gástricas e duodenais, associadas ao *H.pylori*. A melhor formulação apresentou 96,15% de liberação do fármaco em 12 horas (SINGH et al., 2010).

Em um sistema de liberação mucoadesivo de pérolas de gelatina e amoxicilina obtidas por gelatinização ionotrópica, foi verificado para pérolas reticuladas em meio alcalino (60 a 90%) uma maior eficiência de encapsulação do que em pérolas reticuladas em meio ácido (32 a 46%). Todos os lotes produzidos mostraram liberação em meio ácido em 2 horas e foram posteriormente revestidos com quitosana. A liberação *in vitro* foi superior a 7 horas. As pérolas mostraram uma boa mucoadesividade *in vitro* e *in vivo* e mais do que 85% das pérolas permaneceram aderidas na mucosa de ratos albinos após 7 horas (NARKAR, SHER, PAWAR, 2010).



Microesferas de quitosana contendo amoxicilina e metronidazol foram produzidas e reticuladas com tripolifosfato de sódio (TPP). A influência da formulação no tamanho das partículas, intumescimento e mucoadesividade foi avaliada. Os resultados mostraram que o tamanho das partículas aumentou com a concentração do polímero. Nas microesferas com maior percentual de agente reticulante, o intumescimento diminuiu, devido à diminuição do tamanho dos poros, ocasionando uma menor penetração de água. O estudo de mucoadesão mostrou que, ao final de 8 h, 10% de microsferas ainda estavam aderidas à mucosa (HEMANT, SINGH, SHIVAKUMAR, 2010).

Em 2010, Raval et al. caracterizaram micropartículas de amoxicilina obtidas por *spray drying* e os estudos físico-químicos e morfológicos revelaram que o aumento na concentração do glutaraldeído e o tempo de reticulação diminuíram o intumescimento. O percentual de intumescimento está correlacionado com a liberação *in vitro* do fármaco e, desta forma, é possível o controle da liberação ao soluto pelo ajuste dos parâmetros acima mencionados.

Arora et al. (2011) desenvolveram sistema nanoparticulado a fim de melhorar a penetração da amoxicilina na mucosa gástrica e sua mucoadesividade através da modificação da carga superficial. Estudos *in vivo* de mucopenetração em ratos revelaram a permanência das nanopartículas durante 6 h nas camadas mais profundas da mucosa gástrica, próximo às células epiteliais.

A fim de melhorar o encapsulamento da amoxicilina, utilizou-se nanopartículas de quitosana e heparina pelo método de emulsificação. O sistema desenvolvido apresentou uma liberação prolongada em pH 1,2, colapsando em pH 7,0. Ainda, os resultados mostraram uma interação específica entre as nanopartículas e as células infectadas com *H. pylori*. Embora as nanopartículas tenham apresentado uma incompleta erradicação das bactérias, mostraram-se mais eficazes do que a amoxicilina (LIN et al., 2012).

Angadi et al (2012) desenvolveram microesferas de amoxicilina, alginato de sódio, carboximetilcelulose sódica e silicato de alumínio de magnésio como núcleo e revestiram com quitosana, como polímero mucoadesivo. Para uma maior quantidade de carboximetilcelulose sódica e silicato de alumínio magnésio obteve-se uma maior

eficiência de encapsulação (52 a 92%) apresentando também uma liberação controlada de amoxicilina por 8 horas.

A produção de micropartículas mucoadesivas de amoxicilina usando fluido supercrítico CO<sub>2</sub> como alternativa aos métodos de processos convencionais mostrou-se promissor, visto que foi obtida uma alta mucoadesividade e uma liberação controlada tanto em pH 1,2 como em pH 7,8 (PATEL, PATIL 2012).

Harsha (2013) formulou uma suspensão contendo nanopartículas de amoxicilina e gelatina adicionadas a goma xantana e sorbitol. As nanopartículas foram obtidas pelo processo de secagem por aspersão e tiveram o tamanho médio de 571 nm e eficiência de encapsulação de 93%. A amoxicilina teve uma liberação controlada por 12 horas e a suspensão foi estável por 24 meses (25°C e 60% de umidade). Porém, estudos suplementares são necessários para confirmar a efetividade na erradicação do *H. pylori*.

#### 2.4. Quitosana

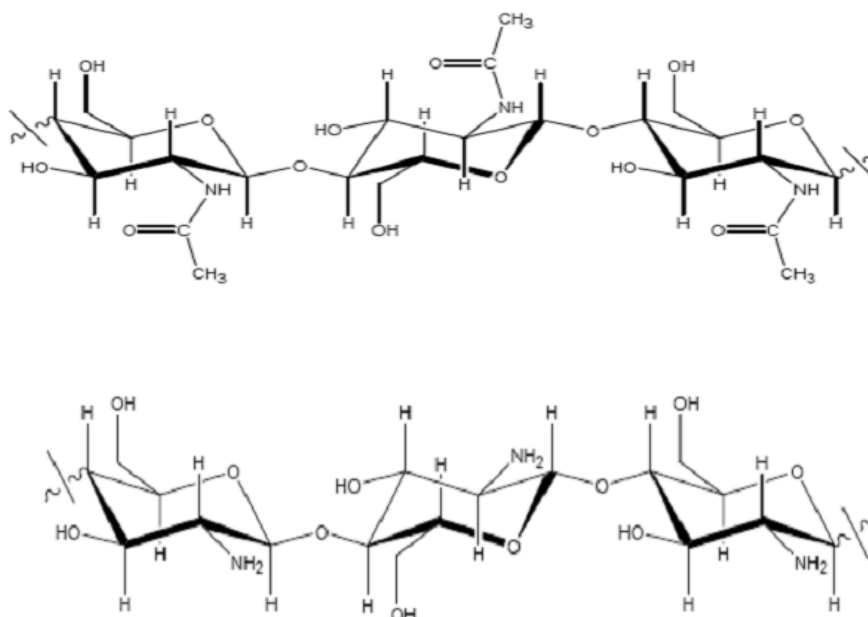
Vários sistemas gastrorretentivos propostos apresentam a quitosana na sua composição. As propriedades desse polímero, em especial o intumescimento e a mucoadesividade, além da capacidade de prolongar a liberação de fármacos, justificam o emprego em sistemas gastrorretentivos (BARDONNET et al., 2006; LOPES et al., 2014).

A quitosana é um polissacarídeo linear obtido através da desacetilação alcalina da quitina. A quitina é um importante componente do exoesqueleto de animais, especialmente de crustáceos, moluscos e insetos (KUMAR, 2000). Comercialmente é obtida de carapaças de caranguejos e lagostas, representando de 20 a 50% em massa (seca) dos subprodutos do processamento desses animais (DASH et al., 2011).

Milhões de toneladas de quitina são comercializadas anualmente no mundo e, portanto, esse biopolímero representa uma fonte de biomassa de baixo custo e amplamente disponível (DASH et al., 2011). O Japão, os EUA e a China são os

maiores produtores mundiais de quitina, mas o polímero também é produzido, ainda que em menor escala, na Índia, Noruega, Canadá, Itália, Polônia, Chile e Brasil. Por volta de 1993, o Brasil também passou a comercializar quitina e quitosana em escala industrial. Assim, duas empresas brasileiras tem se destacado na produção e comercialização destes biopolímeros: Polymar Indústria Comércio Exportação e Importação, situada em Fortaleza-CE e Kito Química Fina, localizada em Palhoça-SC (SANTOS, 2003).

Durante a reação de desacetilação, os grupamentos acetamido (-NHCOCH<sub>3</sub>) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amina (-NH<sub>2</sub>), dando origem à quitosana. Sua fórmula estrutural consiste de um copolímero de N-acetil glicosamina ( $\beta$ -(1-4)2-acetamido-2-desoxi-D-glicose) e D-glicosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose), sendo esta última predominante (KUMAR, 2000; YEN; YANG; MAU; 2009). As estruturas da quitina e da quitosana são mostradas na Figura 3.



**Figura 3** - Estruturas da (a) quitina e (b) quitosana (FONTE: KUMAR, 2009)

A desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, porém esses últimos não são empregados em escala industrial, devido aos custos elevados de extração das desacetilases, bem como, sua baixa produtividade. Os processos químicos da desacetilação de quitina podem ser realizados pela via homogênea, a qual se realiza com álcali-quitina, ou heterogênea, sendo esta a mais extensivamente usada e estudada. Geralmente a quitina é

suspensa em soluções aquosas concentradas de NaOH ou KOH (40 - 60%) por tempos variáveis (0,5 - 24 h) e a temperaturas relativamente elevadas (50 - 130 °C).

As características da quitosana obtida são determinadas pela concentração da solução alcalina e razão quitina/solução alcalina, tamanho das partículas de quitina, temperatura, tempo e atmosfera de reação (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; SANTOS et al., 2003). Dessa forma, a reprodutibilidade de características e de propriedades nem sempre se verifica, mesmo quando condições reacionais semelhantes são empregadas na desacetilação de quitina (CHATELET, DAMOUR, DOMARD, 2001; YEN; YANG; MAU; 2009).

A quitosana possui fórmula molecular  $C_6H_{11}O_4N$ , é insolúvel em valores de pH neutro e alcalinos. Na presença de soluções diluídas comporta-se como um polieletrólito catiônico moderadamente básico ( $pK_a = 6,3$ ), e forma sais com ácidos orgânicos, tais como ácido glutâmico, ácido láctico, ácido acético além do ácido clorídrico (SANTOS et al., 2003). A quitosana apresenta grau de desacetilação (GD) maior que 50%, geralmente entre 60 a 95%, com massa molar de  $10^4$  a  $10^6$  g.mol<sup>-1</sup> (CHATELET, DAMOUR, DOMARD, 2001; SANTOS et al., 2003).

Possui três tipos de grupos funcionais reativos, um grupo amino, um hidroxil primário e um hidroxil secundário nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente. O caráter catiônico da quitosana somado aos seus grupos reativos proporciona propriedades únicas para sua utilização em tecnologias de liberação controlada (SHAHIDI et al., 1999).

A solubilidade da quitosana está intimamente relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a sua solvatação em meio aquoso. Deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos  $-NH_2$  ou GD é um fator de muita importância e que poderá condicionar a utilização da quitosana nas suas diferentes aplicações (SINHA et al., 2004).

A quitosana é insolúvel em água, mas dissolve-se em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico diluído resultando em soluções viscosas (SANTOS et al., 2003). A dissolução da quitosana pode dá origem a hidrogéis, que podem ser utilizados

diretamente ou processados em outras formas na tentativa de utilização como biomateriais. Fatores como pH do solvente utilizado, concentração e peso molecular da quitosana estão diretamente relacionados à viscosidade do hidrogel obtido, bem como às propriedades do biomaterial final (JANES et al., 2001).

A habilidade da quitosana de formar hidrogéis, mesmo em baixa concentração, constitui uma de suas mais importantes propriedades funcionais, assim como a permeabilidade a solutos e o adequado desempenho *in vivo*. Em vista desta característica, a quitosana tem sido usada para a preparação de hidrogéis com aplicação nas áreas de farmácia, medicina e biotecnologia, particularmente para o tratamento de feridas e como membranas, matrizes ou outros dispositivos para a liberação controlada de fármacos (KHURMA et al., 2006).

No que se refere às aplicações biomédicas, a quitosana conjuga as propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade, mucoadesividade e adsorvidade (AZEVEDO et al.; 2007; LEE et al, 2001).

A mucoadesividade da quitosana pode ser explicada pelas forças de atração molecular formada pelas interações eletrostáticas entre a quitosana carregada positivamente e as superfícies mucosas carregadas negativamente. Tal fator é de grande vantagem em um sistema de liberação gástrica, pois a mucoadesão favorece o direcionamento do ativo ao seu sítio de ação, propicia o tempo necessário para efetivar sua ação farmacológica, diminuindo a probabilidade de efeitos adversos gastrintestinais (CHOWDARY; RAO, 2004; LEHR et al., 1992; PEPPAS; SAHLIN, 1996; WANG et al., 2000).

Assim, diferentes sistemas a base de quitosana têm sido avaliados para o aumento da erradicação da infecção causada pelo *H. pylori* através de suas propriedades acima mencionadas (BARDONNET et al., 2006; LOPES et al., 2014), conforme já descrito no item 2.3.2.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho consistiu na obtenção e caracterização de sistemas particulados de quitosana – amoxicilina com vistas à utilização como sistemas gastrorretentivos para tratamento de infecções por *H. pylori*

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter sistemas particulados pelo método de coacervação/precipitação;
- ✓ Avaliar a incorporação da amoxicilina durante o processo de obtenção das partículas em comparação a adição às partículas previamente preparadas por coacervação/precipitação e *spray drying*
- ✓ Realizar a caracterização físico-química das partículas obtidas empregando as técnicas de MEV, FTIR, DSC, TG e DR-X;
- ✓ Comparar o perfil de liberação *in vitro* da amoxicilina livre e incorporada nas partículas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes e solventes

- Ácido acético glacial (Vetec, Brasil)
- Ácido fosfórico (Labsynt, Brasil)
- Água ultrapura (Mili-Q)
- Amoxicilina (Farma Face, Brasil)
- Fosfato de sódio monobásico (Vetec, Brasil)
- Fosfato dibásico (Vetec, Brasil)
- Metanol (J. T. Barker, EUA, grau HPLC)
- Polissorbato 80 (Vetec, Brasil)
- Quitosana (Polymar, Brasil)
- Sulfato de sódio (Vetec, Brasil)

### 4.2. Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético (DiagTech DT31108)
- Agitador rotacional (Phoenix AP22)
- Agitador mecânico (IKA RW 20 digital)
- Balança analítica (Radwag AS 220/C/2)
- Banho de ultrassom (Quimis Q3350)
- Bomba à vácuo (Primatec 131B)
- Célula calorimétrica (Shimadzu DSC-60)
- Centrífuga (Fanem Excelsa® II 206 BL)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência equipado com degaseificador DGU-20A3, sistema de bombas binário LC-20AD XR, auto amostrador SIL-20AC XR, forno da coluna CTO-20AC, sistema de detecção DAD SPD-M20A e módulo de comunicação com o computador CBM-20A. Foi utilizada a coluna Shim-pack de sílica porosa ligada a grupos C18, modelo XR-ODS no comprimento de 75 mm x 4.6 mm e diâmetro de partícula 2,2 µm
- Difratorômetro (Rikugu® modelo Dmax 2500PC)

- Dissolutor (Sotax AT7)
- Espectrofotômetro de Absorção na região de infravermelho (Shimadzu Prestige-21ATR-FTIR 8300)
- Espectrofotômetro de Absorção na região UV-VIS (ThermoScientificEvolution 300)
- Estufa de secagem (QuimisQ317M-53)
- Freezer - 80°C (Nuair -85°C Ultralow Freezer)
- Liofilizador (Christ Alpha 1-2 LD)
- Microscópio eletrônico de varredura (MEV SSX 550 Shimadzu)
- Mini Spray Dryer (Büchi MD 191 B)
- pHmetro (Hanna Instruments HI 221)
- Termobalança (Shimadzu, modelo TGA-60)
- Ultrassom (QUIMIS-Q3350)
- Zeta-Meter System 3.0+ (Zeta-meter Inc., EUA)

### **4.3. Métodos**

#### **4.3.1 Purificação da quitosana**

A quitosana foi purificada de acordo com o procedimento descrito por Caroni, (2009). Amostra de quitosana foi dissolvida em ácido acético 2% sob agitação constante por 24 horas de modo a se obter uma solução a 1% (m/v) do polímero. A solução foi então filtrada primeiramente em filtros com tela de nylon e, posteriormente, foi feita uma filtração à vácuo com filtro qualitativo. À solução filtrada, adicionou-se aos poucos hidróxido de sódio a 5% (m/v), com agitação simultânea até a precipitação. Para cada 250 mL da solução polimérica, foram adicionados 100 mL da solução de NaOH. O precipitado foi lavado exaustivamente com água destilada até atingir pH neutro. Em seguida, o material foi submetido à secagem em estufa a uma temperatura em torno de 40°C. Por fim, o material foi pulverizado e tamisado.



### 4.3.2 Caracterização da quitosana

#### 4.3.2.1 Grau de desacetilação

O grau de desacetilação foi determinado por titulação potenciométrica baseado na reação de neutralização de ácido clorídrico com hidróxido de sódio. Uma massa de 0,20 g de quitosana foi dissolvida em 25 mL de solução de HCl 0,02 mol.L<sup>-1</sup> e submetida à agitação magnética por 24 h a 25°C. A titulação potenciométrica por excesso foi conduzida utilizando NaOH 0,10 mol.L<sup>-1</sup> como titulante (BEPPU, 1999).

As variações de pH durante a titulação foram medidas e através da curva de titulação e dos pontos de inflexão foi possível determinar o percentual de unidades desacetiladas correspondentes aos grupos amino protonáveis (GD) conforme a equação 1:

$$GD = \frac{M_{\text{NaOH}} \times (V_{\text{NaOH inicial}} - V_{\text{NaOH reagiu}}) \times 161}{m} \quad \text{Eq. 1}$$

onde  $M_{\text{NaOH}}$  é a molaridade da solução de NaOH (mol.L<sup>-1</sup>),  $V_1$  e  $V_2$  são respectivamente os volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de quitosana protonada (L), 161 é a massa molar da unidade monomérica da quitosana e  $m$ , a massa da amostra no estado seco tomado para titulação (g).

#### 4.3.2.2 Massa molar viscosimétrica média

A determinação de viscosidade intrínseca,  $[\eta]$ , foi determinada por viscosimetria capilar, de acordo com o procedimento descrito por kasaai, 2007. Uma solução de quitosana 0,25% (m/v) foi obtida em solução tampão (ácido acético 0,5

mol.L<sup>-1</sup>/acetato de sódio 0,2 mol.L<sup>-1</sup>, pH ≈ 4,5), sob agitação constante por 24 horas. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de celulose (Millipore) de porosidade 0,45 μm para diluição seriada. A cada volume de 10 mL foram adicionados volumes crescentes de solução tampão (0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL). Os tempos de escoamento de viscosidade intrínseca [η] das soluções foram determinados em viscosímetro, sendo a determinação da massa molar viscosimétrica obtida de acordo com a equação 2, a qual relaciona a viscosidade intrínseca à massa molar do polímero.

$$[\eta] = KM_v^a \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:  $M_v$  é a massa molar viscosimétrica média (g.mol<sup>-1</sup>), [η] é a viscosidade intrínseca (dL.g<sup>-1</sup>), K e a são constantes para um determinado polímero-solvente a 25°C

### 4.3.3 Análise da amoxicilina por espectroscopia de absorção na região do UV

#### 4.3.3.1 Obtenção do espectro de absorção da amoxicilina

Solução de amoxicilina (500 μg.mL<sup>-1</sup>) em ácido acético 2% (v/v), pH = 4,0, foi submetida à análise de varredura numa faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm para determinação do pico de absorção máxima do fármaco. Uma solução composta de quitosana 0,25% e Tween 80 1% em ácido acético 2% (v/v) (branco) foi também analisada nas mesmas condições para avaliar a interferência dos componentes da solução para obtenção das partículas na quantificação da amoxicilina.

#### **4.3.3.2 Curvas analíticas para quantificação da amoxicilina por espectroscopia de absorção na região do UV**

As curvas analíticas da amoxicilina foram obtidas em ácido acético 2% (v/v) e tampão fosfato pH 7,4. Para a realização da curva em ácido acético 2%, partiu-se de uma solução estoque ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sendo tomadas alíquotas para o preparo de diluições na faixa de concentração entre 100 e  $350 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para a curva em tampão fosfato pH 7,4, a faixa de concentração utilizada foi a mesma.

Todas as leituras foram realizadas em 272 nm e os valores médios das leituras de cada concentração foram utilizados para construção do gráfico correspondente com a determinação da faixa de linearidade, da equação da reta e do coeficiente de correlação.

#### 4.3.4. Obtenção das partículas

A Figura 4 apresenta o fluxograma com a descrição da metodologia utilizada.

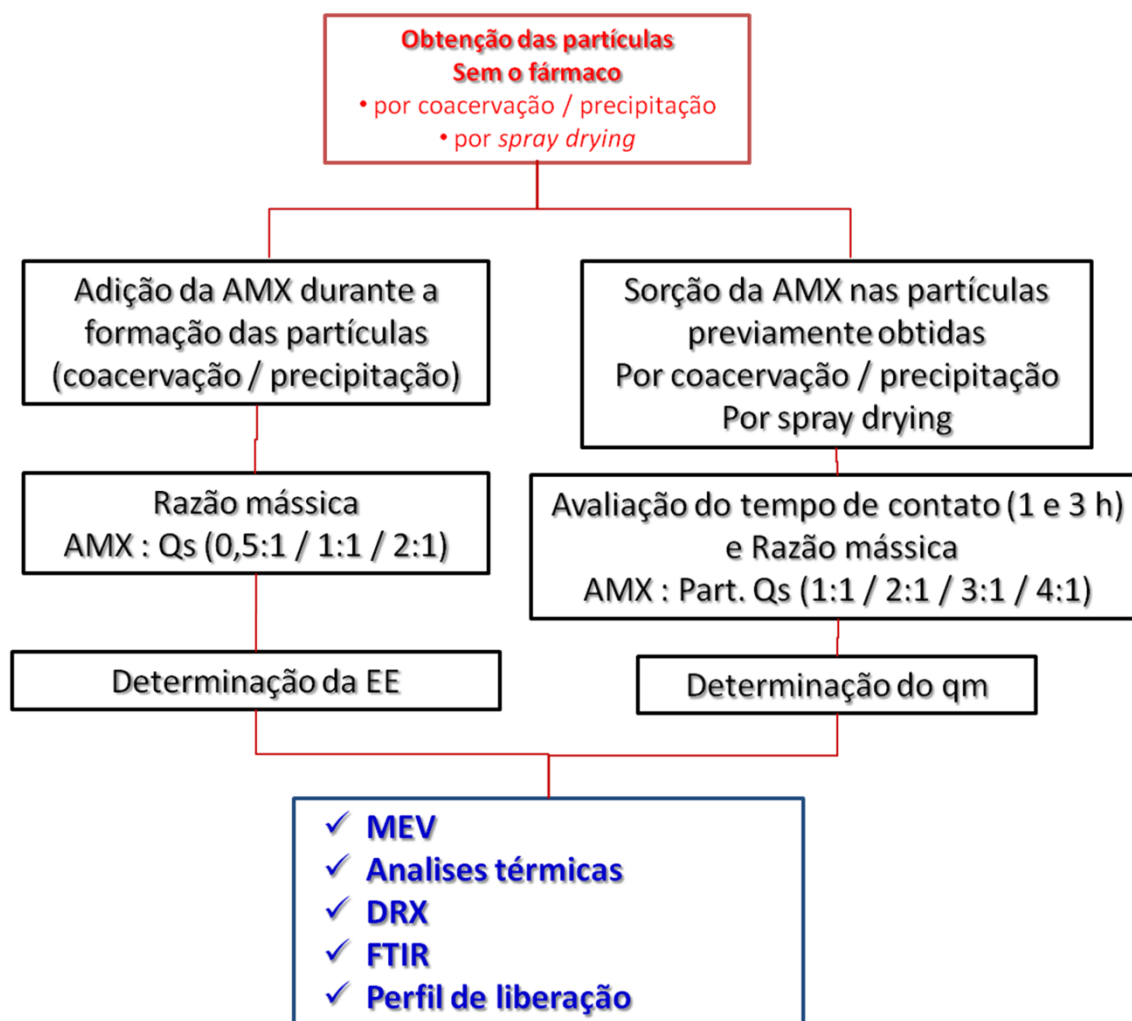


Figura 4 - Fluxograma com a descrição da metodologia utilizada

#### **4.3.4.1 Partículas obtidas sem o fármaco pelo método de coacervação/precipitação**

As partículas foram obtidas pelo método proposto por Berthold et al (1996). Uma solução de quitosana a 0,25% (m/v) foi obtida em ácido acético 2% (v/v) e Tween 80 a 1% (m/v), com agitação mecânica até completa solubilização da quitosana. Sobre a solução de quitosana, foi gotejada uma solução de sulfato de sódio 20% (fluxo de 5 mL/min) com agitação mecânica de 400 rpm e banho de ultrassom simultaneamente. Após a adição do sulfato de sódio (2 mL), a agitação mecânica e o banho de ultrassom foram mantidos por mais 1 hora.

Em seguida, a suspensão obtida foi centrifugada por 15 minutos a 3.000 rpm e as partículas foram congeladas a -80°C em freezer durante 24 h e liofilizadas durante 48 h. Ao final do processo de secagem as partículas foram coletadas e armazenadas em dessecador.

#### **4.3.4.2 Partículas obtidas sem o fármaco pelo método de secagem por aspersão (*spray drying*)**

As partículas foram obtidas a partir de uma solução de quitosana a 0,5% (m/v) em ácido acético 2% (v/v), e nebulizada em mini *spray dryer* sob as seguintes condições: temperatura de entrada de ar 140°C, fluxo do ar de 6 mL.min<sup>-1</sup>, aspersão 90% e pressão 600 N.L<sup>-1</sup> de acordo com Santos, Moura, Raffin, (2003). Ao final do processo, as partículas foram coletadas e armazenadas em dessecador.

#### **4.3.4.3 Partículas obtidas com o fármaco**

##### **4.3.4.3.1 Avaliação da estabilidade das soluções de amoxicilina em ácido acético 2% (v/v)**

Inicialmente, para avaliar a estabilidade da amoxicilina no meio ácido de produção das partículas, uma solução de quitosana e amoxicilina em ácido acético foi avaliada nos tempos 0, 30', 60', 90' e 120' minutos para verificar a degradação do fármaco através de análises em Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE).

Foram preparadas soluções de quitosana a 0,25% (m/v) e amoxicilina 0,25% em ácido acético 2% (v/v). As amostras foram levadas ao banho de ultrassom até a completa solubilização, filtradas em um filtro de seringa (0,22 µm) e acondicionadas individualmente no vial para injeção cromatográfica para posterior avaliação de sua degradação nos diferentes tempos do estudo.

Foi utilizada uma coluna com fase estacionária C18 com fase móvel tampão fosfato dibásico 10 mM ajustado com ácido fosfórico ao pH 5 e metanol, numa proporção 90:10. A temperatura utilizada foi 30°C, volume de injeção 1 µL, fluxo 0,4 mL/min com o tempo total de análise de 7 min.

##### **4.3.4.3.2 Adição do fármaco às partículas**

Para a incorporação da amoxicilina nas partículas, duas técnicas foram utilizadas: adição da amoxicilina durante a formação das partículas (etapa única) pelo método de coacervação/precipitação e sorção da amoxicilina às partículas previamente preparadas pelos métodos de coacervação/precipitação e *spray drying*.

#### 4.3.4.3.3 Adição do fármaco durante a formação das partículas (etapa única)

Para obtenção das partículas com a amoxicilina em etapa única, foi seguido o mesmo método descrito em 4.3.4.1, porém, incluindo a solubilização do fármaco na solução de quitosana. Razões mássicas de amoxicilina : quitosana (0,5:1; 1:1; 2:1) foram adotadas objetivando a avaliação da eficiência de encapsulação.

#### 4.3.4.3.4 Adição da amoxicilina por sorção às partículas previamente preparadas.

Para incorporação da amoxicilina por sorção às partículas previamente preparadas conforme 4.3.4.1 e 4.3.4.2, a amoxicilina foi solubilizada em 10 mL de tampão fosfato 0,02 M pH 7,4 e as micropartículas de quitosana (10 mg) foram adicionadas à solução de amoxicilina e acondicionadas em tubos falcon, em diferentes proporções de amoxicilina : partículas (m:m) (1:1; 2:1; 3:1; 4:1), mantendo-se agitação rotacional. Em tempos pré-determinados (1 e 3 h), os tubos foram retirados do agitador, a solução foi centrifugada a 3.000 rpm durante 15 minutos e filtrada em membrana de 45 µm. O sobrenadante coletado foi utilizado para determinação da concentração final de amoxicilina em espectrofotômetro de absorção na região do UV/Vis a 272 nm a partir de uma curva analítica.

Assim, calculou-se as capacidades de sorção máxima ( $q_m$ ) da amoxicilina nas partículas através da equação 3:

$$\text{Quantidade de sorção } (q_m) = \frac{(C_0 - C_f) \times V}{m_{\text{quitosana}}} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde,  $C_0$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) corresponde à concentração inicial de amoxicilina,  $C_e$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) à concentração final ou equilíbrio de concentração,  $V$  (L) ao volume da solução de amoxicilina e  $m$  (g), à massa das partículas de quitosana.

#### 4.3.5 Determinação da eficiência de encapsulação

A quantificação da amoxicilina na obtenção das partículas em etapa única, foi determinada após a centrifugação da suspensão por 15 minutos a 3.000 rpm na qual o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro de absorção na região do UV no comprimento de onda de 272 nm e determinado o teor e a eficiência de encapsulação (%) a partir das equações 4 e 5, respectivamente:

$$\% \text{ Incorporação do fármaco} = \left( \frac{\text{Massa do fármaco nas partículas}}{\text{Massa das partículas}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

$$\% \text{ Eficiência de encapsulação} = \left( \frac{\text{Quantidade real do fármaco}}{\text{Quantidade teórica do fármaco}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

#### 4.3.6 Caracterização físico-química das partículas

##### 4.3.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação da morfologia e distribuição granulométrica das partículas foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura. As amostras foram fixadas em um suporte metálico, recobertas com uma fina camada de ouro e observadas no



microscópio eletrônico. A partir das imagens do MEV, foi obtida a medida do diâmetro de 200 partículas segundo método de Ferret e, com o auxílio do programa computacional *Image J* foi construída a curva de frequência com a distribuição granulométrica de cada amostra.

#### 4.3.6.2 Determinação do potencial zeta

A carga superficial das partículas foi medida através da determinação da sua mobilidade eletroforética,  $\mu_E$ , a uma temperatura de 25°C. As partículas foram primeiramente dispersas em água destilada a uma concentração de 0,05% (m/v), em seguida colocadas em uma célula eletroforética, na qual foi estabelecido um potencial elétrico. O potencial zeta,  $\xi$ , foi calculado a partir do emprego da equação de Smoluchowski:

$$\xi = \frac{\mu_E \eta}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde  $\epsilon_0$  é a permissividade do vácuo,  $\epsilon_r$  é a permissividade dielétrica relativa do meio (constante dielétrica) e  $\eta$  é a viscosidade da fase contínua

#### 4.3.6.3 Difração de raios-X (DRX)

Os ensaios para a amoxicilina, partículas sem, e com o fármaco foram realizados usando o difratômetro nas seguintes condições: radiação CrK $\alpha$ , ângulo de varredura variando de 2° a 60° a uma velocidade de 2° por minuto, tensão de varredura 40 kV, corrente de varredura 20 mA e rotação da amostra 40 rpm.

#### **4.3.6.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Aproximadamente 2 mg de amoxicilina, partículas sem, e com o fármaco foram adicionadas a 200 mg de KBr e as misturas homogeneizadas em almofariz. As pastilhas foram obtidas em prensa hidráulica. Os espectros de IV foram obtidos em um espectrofotômetro entre 4000 e 700  $\text{cm}^{-1}$ , em uma resolução óptica de 1,0  $\text{cm}^{-1}$  e uma média de mais de 20 scans.

#### **4.3.6.5 Análise termogravimétrica**

As curvas de TG foram obtidas na faixa de 25 - 300°C, sob atmosfera de  $\text{N}_2$  (50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), com a razão de aquecimento de 10°C/ $\text{min}^{-1}$ . Durante os ensaios, foi utilizado o cadinho de platina contendo cerca de 5 mg de amostra.

#### **4.3.6.6 Análise calorimétrica exploratória diferencial**

Aproximadamente 2 mg de amoxicilina, quitosana, partículas com, e sem o fármaco foram colocadas em cadinhos de alumínio e submetidas a aquecimento em uma faixa de temperatura de 25 – 300°C com razão de aquecimento de 10°C  $\text{min}^{-1}$  em atmosfera de nitrogênio em vazão de 50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As células de DSC foram calibradas com índio ( $T_{\text{fusão}} = 156^\circ\text{C}$ ) e zinco ( $T_{\text{fusão}} = 419,4^\circ\text{C}$ ).

#### 4.3.7 Estudos de liberação *in vitro*

A liberação da amoxicilina a partir das partículas e do fármaco livre foi realizada em um dissolutor, usando o aparato 2 USP, rotação de 100 rpm e meio de dissolução, 450 mL, HCl 0,1N a 37°C. Partículas com o fármaco (equivalentes a 32,5 (1:1) e 61,3 mg (2:1) de amoxicilina foram colocadas em cápsula de gelatina e, em intervalos pré-estabelecidos (15, 30, 60, 90 e 120 min) alíquotas de 5 mL foram retiradas, filtradas em papel de filtro Whatman nº 41 e analisadas por espectrofotometria UV a 272 nm. O mesmo volume de HCl 0,1N foi repostado a cada coleta.

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Purificação da quitosana

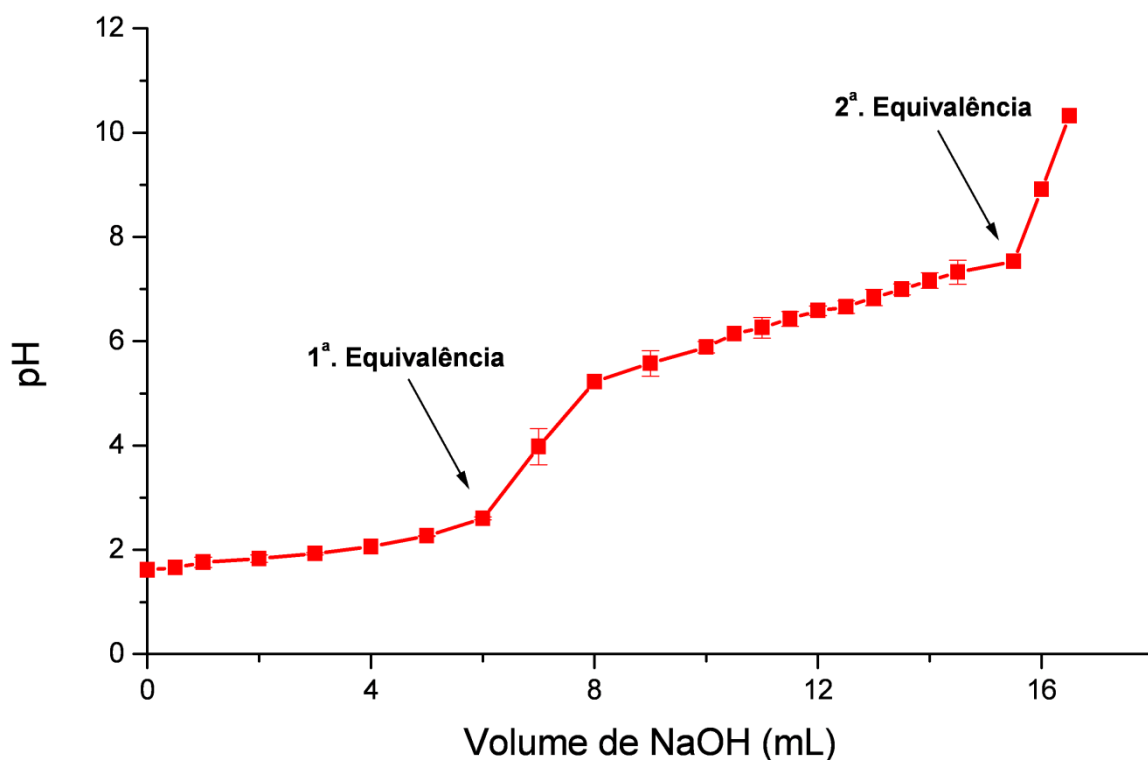
A quitosana, ao contrário da quitina, pode ser facilmente dispersa em soluções ácidas diluídas com pH inferior a 6. Isso possibilita a sua purificação através da dissolução em ácidos diluídos, e, após filtração, precipitação com a adição de uma solução alcalina forte. Dessa forma, impurezas insolúveis ou que não apresentem o mesmo comportamento de solubilidade em ácidos diluídos, ficam retidas na filtração.

### 5.2 Caracterização da quitosana

#### 5.2.1 Determinação do grau de desacetilação

O grau de desacetilação é uma das características mais importantes da quitosana, visto que esse parâmetro determina o conteúdo de grupos amino livres no polissacarídeo, diferenciando a quitosana da quitina e influenciando principalmente a sua solubilidade e a sua reatividade com outros polieletrólitos (SANTOS et al., 2003). Diversas técnicas são propostas para determinação do grau de desacetilação, incluindo potenciometria, condutivimetria, cromatografia, espectroscopia de absorção no infravermelho e ultravioleta, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massas (RAYMOND *et al.*, 1993).

Neste trabalho, a quitosana foi dissolvida em um excesso conhecido de ácido clorídrico e a solução foi então titulada potenciométricamente com hidróxido de sódio. A Figura 5 apresenta a curva de titulação potenciométrica da quitosana.



**Figura 5** - Curva de titulação da quitosana obtida por titulação potenciométrica

Nota-se nesta curva dois pontos de equivalência de titulação. A primeira equivalência refere-se à neutralização do excesso de ácido presente, enquanto que a segunda equivalência refere-se à neutralização da quitosana protonada. A diferença entre o volume final e o volume inicial de ácido clorídrico corresponde à quantidade de ácido necessária para protonar os grupos amino da quitosana. Assim, de acordo com a equação 1, descrita anteriormente no item 4.3.2.1, foi determinado um grau de desacetilação de 64%.

A quitosana possui grau de desacetilação (GD) entre 60 a 95% (CHATELET, DAMOUR, DOMARD, 2001; SANTOS et al., 2003). O grau de desacetilação influencia diretamente no tamanho das partículas a serem obtidas, na faixa de concentração dos eletrólitos envolvidos para a obtenção do sistema particulado e na incorporação do fármaco que se deseja encapsular (SANTOS et al., 2003). De acordo com a literatura, este grau de desacetilação é considerado baixo, esperando-se então a obtenção de partículas com tamanhos pequenos.

### 5.2.2 Massa molar viscosimétrica média

A massa molar determina o tamanho e a flexibilidade da cadeia das moléculas de quitosana em solução. Comercialmente, a massa molar da quitosana varia de 80.000 a 180.000 g.mol<sup>-1</sup> e é considerada baixa massa molar quando os valores se situam entre 80.000 e 110.000 g.mol<sup>-1</sup>, média massa molar, entre 120.000 e 150.000 g.mol<sup>-1</sup> e alta massa molar, acima de 150.000 g.mol<sup>-1</sup> (SANTOS et al., 2003).

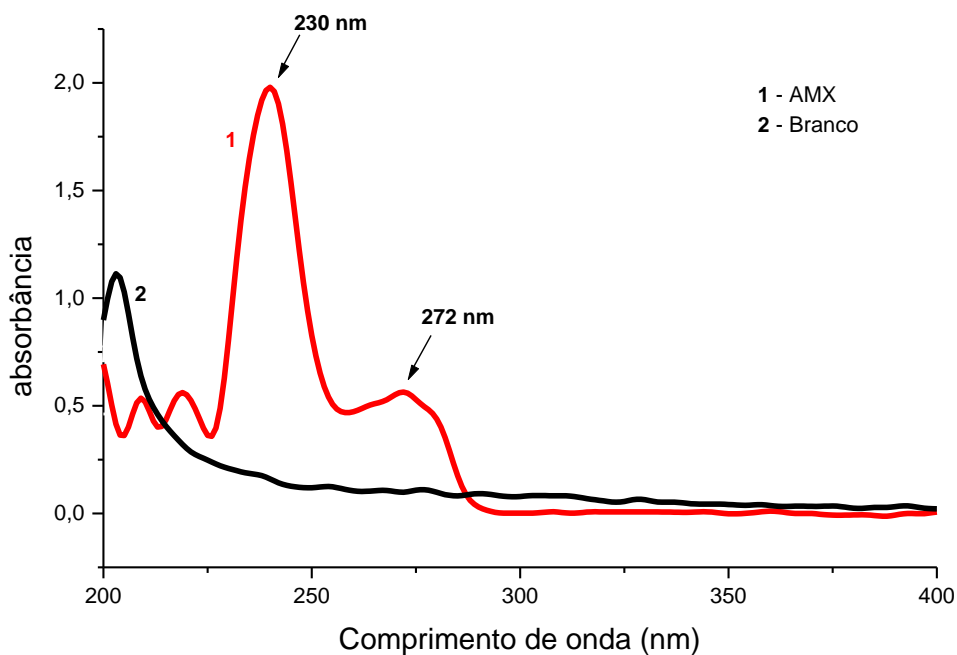
A quitosana em estudo apresentou uma alta massa molar viscosimétrica média, de 280.000 g.mol<sup>-1</sup> para a qual, de acordo com a literatura, espera-se obter partículas com tamanhos maiores (LUCAS, SOARES, MONTEIRO, 2001). Porém, Berthold e colaboradores (1986), em estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) relatam que a massa molar média da quitosana não teve influência no tamanho e nem na aparência das partículas obtidas.

## 5.3 Análise da amoxicilina por espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta (UV)

### 5.3.1 Obtenção do espectro de absorção da amoxicilina

Inicialmente foi verificado o comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\max}$ ) em que a solução de amoxicilina em ácido acético 2% absorve a radiação UV. A Figura 6 mostra o espectro de absorção da amoxicilina na região do ultravioleta em comparação à solução contendo os componentes utilizados na preparação das partículas (branco), ou seja, quitosana a 0,25% e Tween 80 a 1% em solução de ácido acético a 2%. O comprimento de onda de 272 nm foi selecionado para a quantificação da amoxicilina por apresentar melhor seletividade do que o

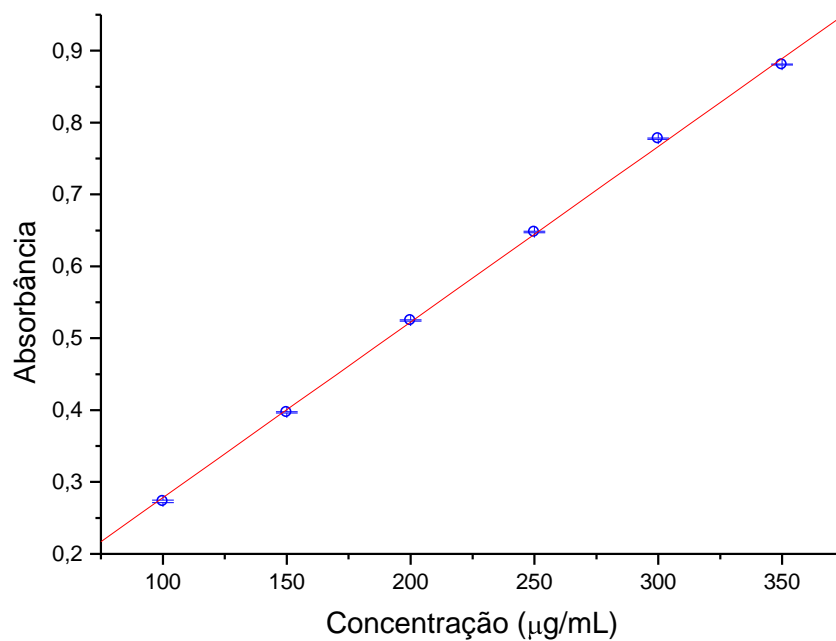
comprimento de onda de 230 nm (a absorvância do branco foi de 0,2172 em 230 nm e de 0,028 em 272 nm).



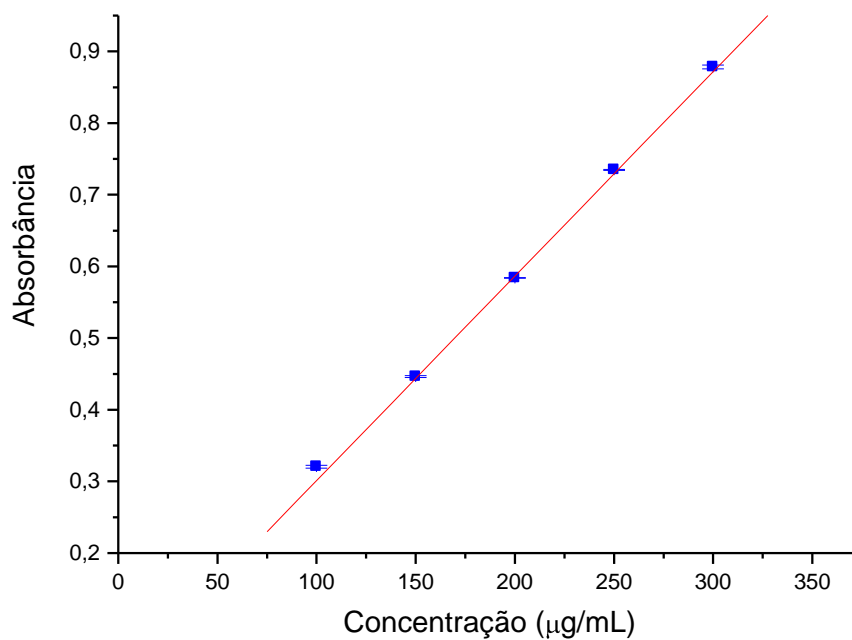
**Figura 6** - Espectro de absorção na região do ultravioleta (UV) da amoxicilina em solução de ácido acético 2% (1) e do branco (2)

### 5.3.2 Curvas analíticas para quantificação da amoxicilina

As Figuras 7 e 8 ilustram as curvas analíticas obtidas para quantificação da amoxicilina em solução de ácido acético 2% e em tampão fosfato pH 7,4.



**Figura 7** - Curva analítica da amoxicilina em ácido acético 2% em 272 nm



**Figura 8** - Curva analítica da amoxicilina em tampão fosfato pH 7,4 em 272 nm.



A equação linear representativa obtida para curva padrão para análise quantitativa da amoxicilina nas partículas em ácido acético foi  $y = 0,03385x + 0,00244$  ( $r^2 = 0,9994$ ), enquanto que para a análise em tampão fosfato foi  $y = 0,01581x + 0,00285$  ( $r^2 = 0,9987$ ).

Pôde-se verificar em todas as curvas um coeficiente de correlação ( $r$ ) muito próximo a 1, traduzindo assim, uma resposta linear do procedimento analítico, proporcional à concentração dos constituintes, possibilitando utilizar essas curvas analíticas para análises quantitativas da amoxicilina por apresentar uma boa correlação entre concentração e absorvância.

#### **5.4 Obtenção das partículas de quitosana**

##### **5.4.1 Partículas obtidas sem o fármaco pelo método de coacervação/precipitação**

Diferentes métodos têm sido utilizados na preparação de sistemas particulados de quitosana (BLECHER; NASIR; FRIEDMAN, 2011; PRASANTHI; PRASANTHI; MANIKIRAN, 2011).

Berthold e colaboradores (1996) propuseram primeiramente o uso do sulfato de sódio como agente de precipitação para formação de partículas de quitosana pelo método de coacervação. Na adição por gotejamento de sulfato de sódio em uma solução de quitosana, o ânion, ao entrar em contato com a carga positiva do polímero, forma uma ligação iônica, neutralizando a carga e obtendo assim, a partícula que, uma vez formada, precipita.

Inicialmente, foram testadas quantidades crescentes do agente precipitante na solução de quitosana até observar através da mudança da coloração de

---

ligeiramente amarelada para opalescente, a precipitação e conseqüentemente a formação das partículas. Neste processo, foram utilizados 2 mL de solução de sulfato de sódio a 20% para cada 0,25 g de quitosana (0,4 g de sulfato de sódio para cada 0,25 g de quitosana) o que corresponde aproximadamente a uma proporção 1:1 de sulfato : polímero em massa.

#### **5.4.2 Partículas obtidas sem o fármaco pelo método de secagem por aspersão (*spray drying*)**

Microesferas de quitosana com diversos fármacos têm sido preparadas para diferentes propostas de aplicação/interesses através do uso da técnica de *spray drying* (BOWEY; NEUFELD, 2010, HUANG; CHIANG; YEH, 2003). Dentre as vantagens deste método, está a produção reprodutível de partículas, sendo que os fatores de formulação e os parâmetros de processo determinam as propriedades das partículas produzidas (DESAI; PARK, 2005; RE, 1998; SANTOS; MOURA; RAFFIN, 2003; TEWA-TAGNE; BRIANC; FESSI, 2006).

No presente trabalho, partículas de quitosana sem a adição de qualquer agente de reticulação foram preparadas pela técnica de *spray drying*. Duas concentrações de quitosana (0,5% e 1,0%, em massa) foram utilizadas. Testes preliminares mostraram que as soluções com uma concentração mássica de 1% de quitosana resultaram em partículas bastante aglomeradas e ocorreu entupimento do bico atomizador durante o processo. A modificação da temperatura de entrada não diminuiu a ocorrência de entupimentos no bico atomizador, sendo, portanto a concentração 0,5% escolhida para a continuidade do trabalho.

A secagem por *spray drying* foi utilizada também para as partículas obtidas sem o fármaco pelo método de coacervação/precipitação, porém não houve sucesso visto que ocorreu também entupimento do sistema por aglomeração das partículas previamente formadas. Sugere-se que a utilização de uma elevada massa molar, resultando numa viscosidade elevada das soluções, tenha contribuído para o

insucesso do processo, visto que SANTOS; MOURA; RAFFIN (2003) obtiveram partículas utilizando o mesmo equipamento.

### **5.4.3 Partículas obtidas com o fármaco**

#### **5.4.3.1 Avaliação da estabilidade química das soluções de amoxicilina em ácido acético 2% (v/v)**

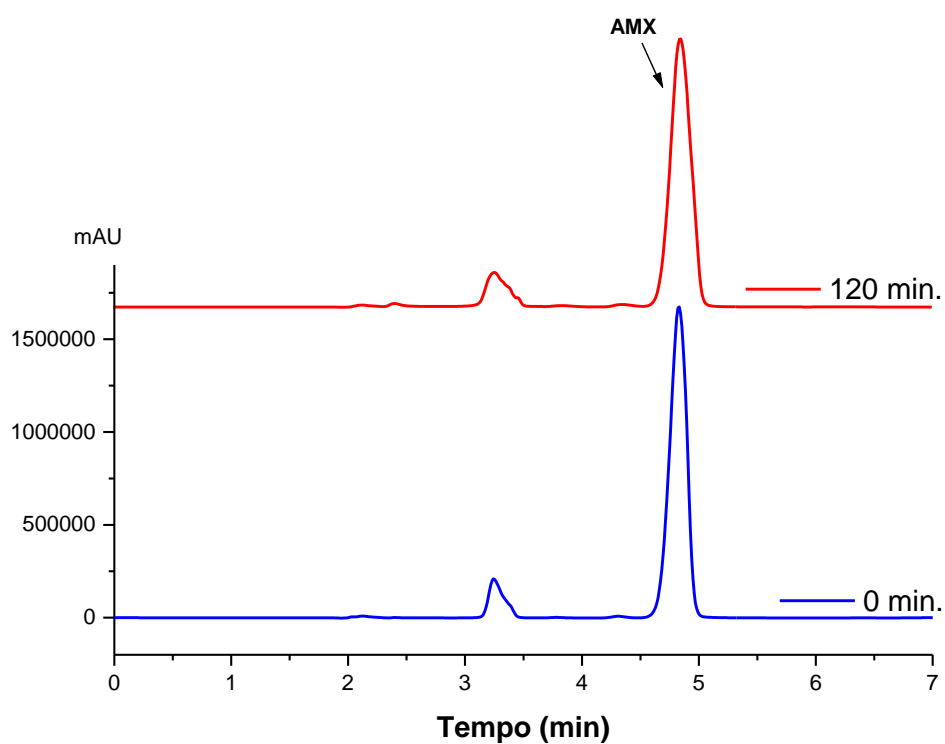
A incorporação de um fármaco sensível em pH ácido representa um dos principais problemas aos sistemas multiparticulados de quitosana, visto que a solubilização da quitosana é realizada em meio ácido. Sendo assim, inicialmente, foi feito um estudo da estabilidade da amoxicilina em ácido acético 2% (v/v), visando avaliar a estabilidade da mesma no meio ácido de obtenção das partículas.

A estabilidade química da amoxicilina em solução ácida foi avaliada através do teor de amoxicilina em função do tempo, determinado por cromatografia líquida de ultra eficiência, nas mesmas condições de preparação das partículas de amoxicilina - quitosana.

A Figura 9 apresenta os cromatogramas obtidos das soluções de amoxicilina em ácido acético 2% (v/v) nos tempos 0 e 120 min. A Tabela 1 mostra que a amoxicilina manteve-se estável durante 2 horas, tempo superior ao necessário para a obtenção das partículas, sugerindo que não há degradação da amoxicilina durante o processo de preparação das partículas.

**TABELA 1:** Avaliação da estabilidade química das soluções de amoxicilina em ácido acético 2% (v/v)

Tempo (min)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teor (%)
0	100,0	100,0
30	102,9	102,9
60	103,6	103,6
90	102,1	102,1
120	103,8	103,8

**Figura 9** - Cromatogramas das soluções de amoxicilina em ácido acético 2% (v/v) nos tempos 0 e 120 min

Erah e colaboradores (1997) realizaram um estudo sobre a estabilidade da amoxicilina em HCl 0,01 e 0,1 M e tampão fosfato 0,04 M (pH 1,0–8,0) a 37°C e verificaram que a amoxicilina foi mais estável na faixa de pH = 4 - 7. Na primeira hora, foram perdidos 12,2% e 3,5% em soluções de pH = 1,0 e 2,0 respectivamente. O anel  $\beta$ -lactâmico da amoxicilina é mais susceptível a degradação hidrolítica quando o pH desvia significativamente do seu ponto isoelétrico (pH = 4,8). Em nosso trabalho, a solução de quitosana-amoxicilina apresentou pH = 4,0, condição favorável a sua estabilidade o que corrobora com os resultados apresentados na Tabela 1 e Figura 9.

#### 5.4.3.2 Adição da amoxicilina durante a formação das partículas

Comparando-se aos outros processos de obtenção de nano e micropartículas, o método de coacervação/precipitação se caracteriza por ser um método simples, que não necessita de aparatos complexos nem o uso de solventes orgânicos e, dentre os diversos sistemas propostos para a melhoria da eficácia terapêutica da amoxicilina no tratamento de infecções bacterianas, especialmente por *H. pylori*, nenhum estudo propôs a utilização deste método para a obtenção dos sistemas particulados.

O encapsulamento de fármacos em sistemas particulados pode ser feito através de dois métodos, ou seja, durante a preparação das partículas (incorporação) e após a formação das partículas por sorção (incubação) (AGNIHOTRI et al, 2004). No primeiro método, o fármaco é incorporado fisicamente na matriz durante a preparação das partículas. A encapsulação máxima do fármaco pode ser conseguida por incorporação durante a formação das partículas, mas pode haver interferência dos parâmetros do processo, tais como método de preparação, a

presença de aditivos, natureza do fármaco, velocidade de agitação, entre outros (SINHA et al, 2004).

A relação quantitativa entre o polímero e o fármaco é um fator crítico durante a formação das partículas e pode influenciar os valores de eficiência de encapsulação (MAGHSOODI, 2009).

A Tabela 2 apresenta os resultados de eficiência de encapsulação e da concentração de amoxicilina incorporada (teor) nas partículas obtidas em etapa única, determinada pela diferença entre a quantidade inicial e final de amoxicilina livre medida no sobrenadante após a centrifugação da suspensão obtida pela adição de sulfato. Apenas os ensaios 2 e 3 foram satisfatórios, mostrando uma alta eficiência de encapsulação da amoxicilina nas partículas obtidas pelo método de coacervação / precipitação.

TABELA 2 – Eficiência de encapsulação e concentração de amoxicilina incorporada (teor) para diferentes concentrações de quitosana:fármaco

<b>Ensaio</b>	<b>RM</b> <b>Qs : AMX</b>	<b>Qs</b> <b>(%)</b>	<b>AMX</b> <b>(mg)</b>	<b>M<sub>i</sub></b> <b>(%)</b>	<b>EE</b> <b>(%)</b>
<b>1</b>	1 : 0,5	0,25	125	10,4	20,8 (± 0,02)
<b>2</b>	1 : 1	0,25	250	42,0	83,6 (± 0,03)
<b>3</b>	1 : 2	0,25	500	48,4	92,0 (± 0,02)

RM: Razão mássica; Qs: Quitosana; AMX: Amoxicilina; M<sub>i</sub>: concentração de amoxicilina incorporada (teor); EE: Eficiência de encapsulação; (±): Desvio Padrão.

A eficiência de encapsulação variou de 20 a 92%. Os resultados mostraram que a eficiência de encapsulação aumenta com a quantidade inicial de amoxicilina em relação ao polímero. Sugere-se que esse efeito pode ser simplesmente devido à

maior quantidade do fármaco em relação à quantidade de polímero adicionada, o que favoreceu a encapsulação.

Na encapsulação em partículas de quitosana por outros métodos é comum obter valores bem menores do que estes, por exemplo, Kumbaret e colaboradores (2002) encapsularam diclofenaco de sódio em microesferas de quitosana pelo método da emulsificação e obtiveram valores de 15 a 30%. Para microesferas de quitosana e amoxicilina obtidas por esse mesmo método, foi obtido um resultado melhor utilizando o glutaraldeído como agente reticulante, em que a eficiência de encapsulação foi de 70% (PATEL, PATEL, 2007). Porém, o inconveniente na utilização deste reticulante é sua toxicidade. Assim, outros agentes de reticulação têm sido utilizados como a genipina, o TPP, a epícloridrina, entre outros (BERGER et al., 2004).

Micropartículas de quitosana contendo cisplatina foram obtidas pelo método de emulsificação e o fármaco foi incorporado durante a formação das partículas. A eficiência de encapsulação variou de 28 a 99%. A concentração inicial de cisplatina e o volume de glutaraldeído não tiveram efeitos sobre a eficiência de encapsulação uma vez que essa aumentou com a concentração de quitosana (AKBUGA, BERGISADI, 1999).

SEZER e AKBUGA (1995) incorporaram piroxicam durante a obtenção de micropartículas de quitosana pelo método de geleificação ionotrópica com TPP e obtiveram 90% de eficiência de encapsulação. LUBBEN e colaboradores (2001) seguiram o mesmo método de coacervação/precipitação com o sulfato de sódio utilizado neste trabalho e obtiveram micropartículas de quitosana e ovalbumina com eficiência de encapsulação de 82%. Os valores elevados para a eficiência de encapsulação obtidos em nosso trabalho corroboram com esses resultados.

Tetraciclina, antibiótico também utilizado contra o *H. pylori*, foi incorporado em micropartículas de quitosana seguindo o mesmo procedimento proposto no presente trabalho. A incorporação do fármaco nesse sistema ocorreu de duas formas: durante a formação das micropartículas (antes da precipitação) e com as micropartículas previamente preparadas. Quando a tetraciclina foi adicionada durante a formação das micropartículas, apenas 8% do fármaco foi incorporado. Quando o fármaco foi

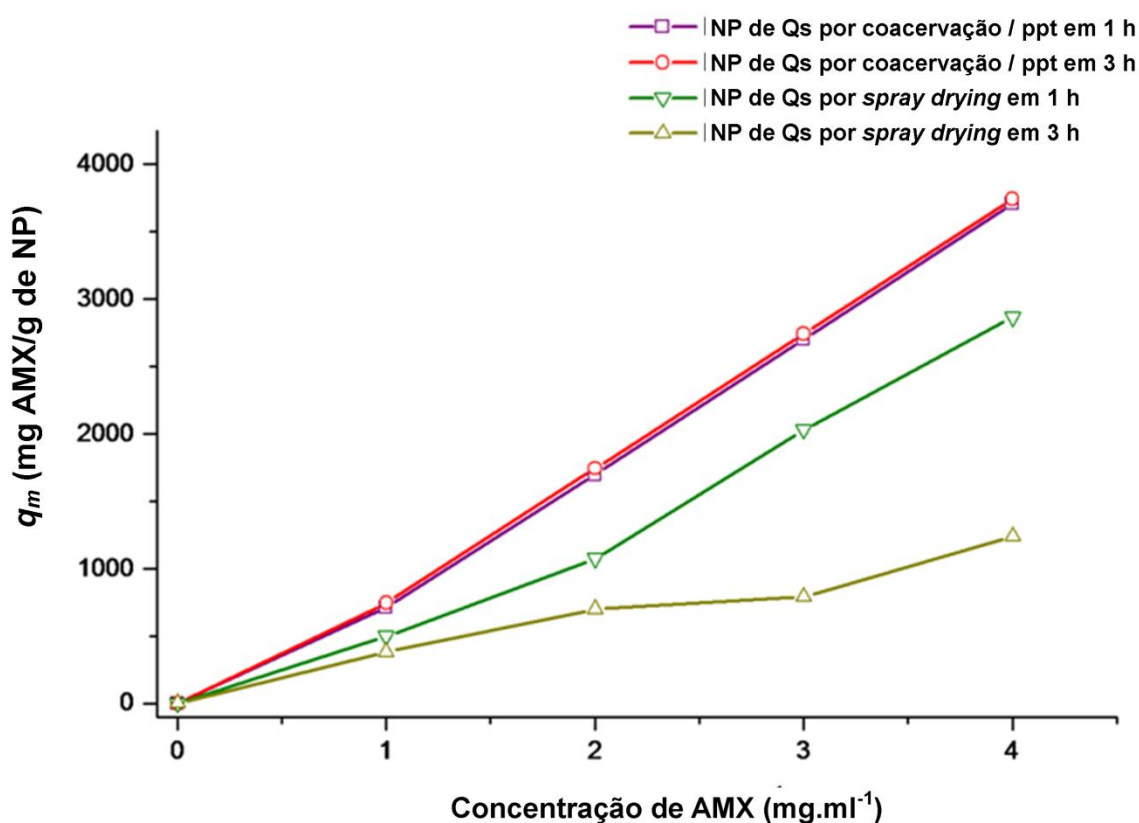
---

incubado com as micropartículas previamente preparadas, foi alcançada uma eficiência de encapsulação de 69% do fármaco. Os autores apontam o baixo encapsulamento para o primeiro método devido ao fármaco ter sido extraído durante o processo de lavagem antes da secagem ou ainda a possibilidade de ter ocorrido uma degradação do fármaco na solução ácida de quitosana (HEJAZI, AMIJI, 2002).

#### **5.4.3.3 Adição da amoxicilina por sorção nas partículas previamente preparadas**

O processo de sorção envolve o movimento das moléculas do fármaco em solução aquosa no sentido dos sítios ativos situados nos poros dos adsorventes (partículas poliméricas) e pode ser controlado pelos efeitos de transferência de massa das partículas (difusão externa e intrapartícula) e pela taxa de adsorção no sítio ativo do adsorvente (SILVA et al., 1999). Os resultados relacionados à sorção da amoxicilina em partículas de quitosana previamente preparadas são apresentados na Figura 10.





**Figura 10** - Incorporação da amoxicilina em partículas previamente preparadas por coacervação / precipitação e *spray drying* nos tempos de 1 e 3 horas.

Os valores da capacidade de sorção,  $q_m$ , nas partículas aumentou com a concentração inicial da amoxicilina,  $C_0$ . Os resultados mostram valores maiores de capacidade máxima de sorção para as partículas obtidas por coacervação/precipitação quando comparado com as obtidas por *spray drying*.

Prednisolona sódica foi sorvida em microesferas de quitosana previamente preparadas por coacervação/precipitação. O processo de sorção mostrou-se ser dependente da concentração inicial do fármaco, ou seja, para uma concentração inicial mais elevada, obteve-se uma maior eficiência de encapsulação (BERTHOLD et al., 1996), corroborando com os nossos resultados.

Entretanto, no tempo de 3 horas os valores de sorção não aumentaram quando comparados com 1 hora, indicando preenchimento e saturação dos sítios de

sorção na superfície externa e interna das partículas no menor tempo, sugerindo assim, que o tempo de 1 hora é suficiente para a incorporação da amoxicilina.

Para as partículas obtidas por *spray drying*, observa-se também um aumento da capacidade de sorção, porém essa capacidade é menor quando comparada com a capacidade de sorção das partículas obtidas por coacervação/precipitação, em especial quando  $C_o$  é aumentada. Os valores superiores de  $q_m$  obtidos para as partículas preparadas por coacervação/precipitação podem ser explicados, em parte, pela diferença entre os tamanhos das partículas obtidas através dos dois processos. Os resultados apresentados na seção 5.4.1 indicam que as partículas obtidas por coacervação/precipitação possuem menores tamanhos em relação às partículas obtidas por *spray drying*, indicando uma maior área superficial para as partículas resultantes do processo de coacervação/precipitação.

Por outro lado, as partículas obtidas pelo processo de coacervação/precipitação sofreram um processo de reticulação física através do sulfato de sódio, diferentemente das partículas obtidas por *spray drying*, onde não foi utilizado agente reticulante. As modificações das propriedades físico-químicas de sistemas particulados de quitosana podem ser realizadas pela adição de agentes que promoverão reticulação na cadeia polimérica, com a finalidade de modificar as características mecânicas, físicas e/ou químicas do polímero (BERGER et al., 2004; LANGER; PEPPAS, 2003).

Os diferentes tipos de reticulação (química e física) levam à formação de estruturas diferenciadas, o que conseqüentemente gera características heterogêneas (intumescimento, carga superficial e hidrofobicidade) para as partículas de quitosana (BERGER et al., 2004).

Ao comparar as capacidades de sorção das partículas obtidas por *spray drying* após 1 e 3 horas de experimento, observa-se uma diminuição da capacidade de sorção no tempo de 3 horas. Sugere-se que as partículas obtidas por essa técnica, pelo fato de não terem sofrido reticulação e, possivelmente apresentarem elevada porosidade (HE, DAVIS, ILLUM, 1999), tiveram maior grau de intumescimento, perdendo sua integridade física, ou ainda, a relação de

---

amoxicilina/quitosana não foi suficiente para manter a estrutura íntegra (SIEPMANN, PEPPAS, 2001).

Embora a reticulação reduza a capacidade de sorção da quitosana devido aos sítios de ligações estarem ocupados, promove a melhora da resistência mecânica contra o meio ácido e básico. Desta forma, modificações na estrutura da quitosana pela reticulação são necessárias para se aumentar a resistência mecânica, modificando sua hidrofobicidade e tornando-a mais resistente à erosão (BERGER et al., 2004).

Os resultados obtidos corroboram com a literatura visto que, em concentrações crescentes de amoxicilina, uma maior eficiência de encapsulação foi obtida e o sulfato de sódio (agente reticulante físico) pode ter conferido às partículas preparadas por coacervação/precipitação maior resistência mecânica em relação às partículas obtidas por *spray drying* durante o experimento.

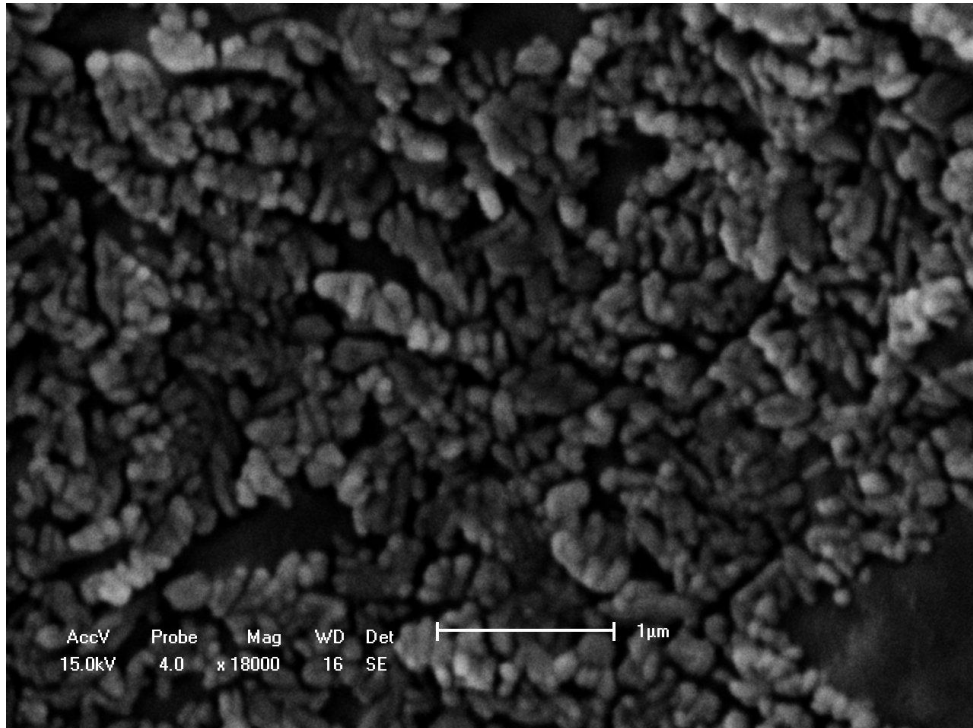
Dessa forma, experimentos para determinar o intumescimento das partículas obtidas por coacervação/precipitação e por *spray drying* devem ser realizados a fim de verificar sua influência na capacidade de sorção. Além disso, a fim de se averiguar o papel das interações eletrostáticas no processo de sorção da amoxicilina nas partículas, uma análise da carga superficial das partículas através do potencial zeta durante o processo de sorção pode ser realizado de modo a se obter um mecanismo mais definido do processo de sorção.

## **5.5 Caracterização físico-química das partículas**

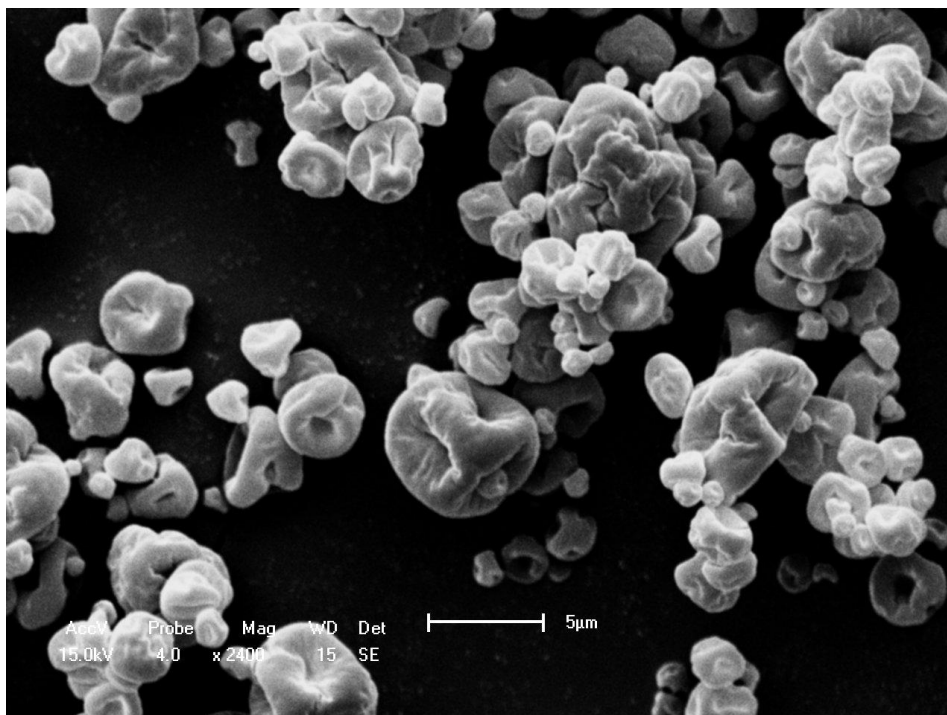
### **5.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a morfologia e o tamanho das partículas obtidas.

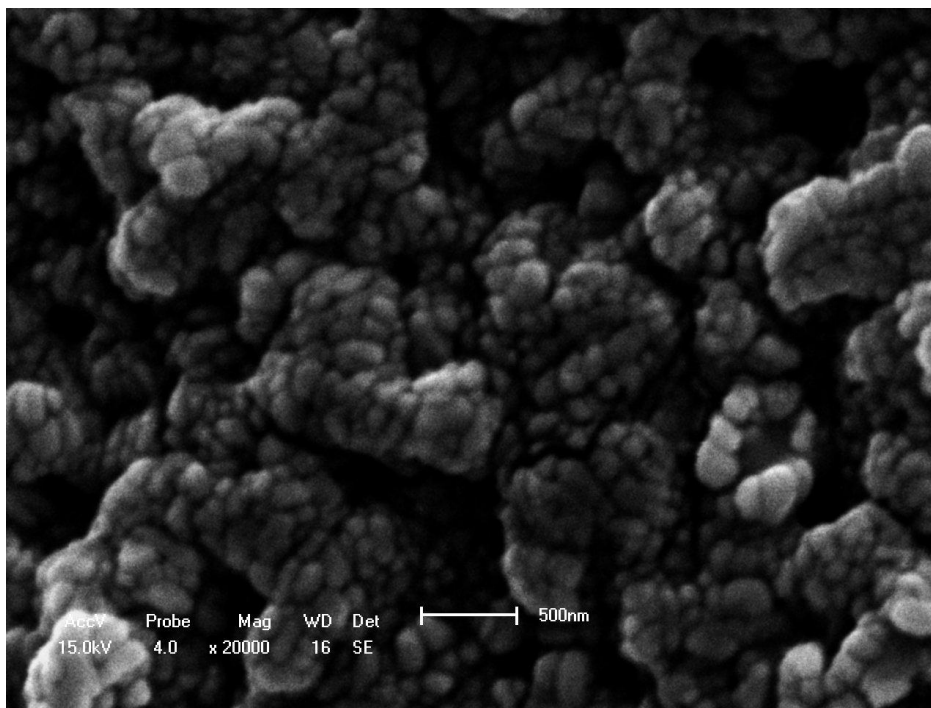
As imagens obtidas por MEV para as partículas sem o fármaco obtidas por coacervação/precipitação e *spray drying*, partículas com o fármaco obtidas em etapa única na razão 1:1 amoxicilina : polímero e por sorção durante 1 hora, são apresentadas nas figuras 11-14.



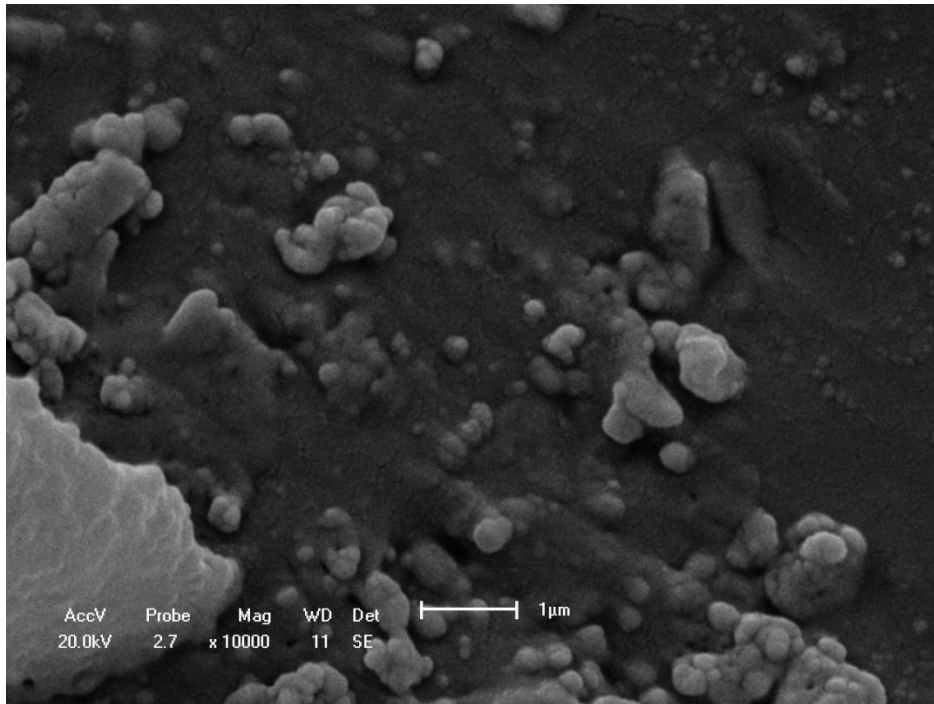
**Figura 11** - Fotomicrografias das partículas sem o fármaco obtidas por coacervação/precipitação obtidas por MEV (aumento 18.000 X)



**Figura 12** - Fotomicrografias das partículas sem o fármaco obtidas por *spray drying* obtidas por MEV (aumento 2400 X)



**Figura 13** - Fotomicrografias das partículas com o fármaco obtida em etapa única (coacervação/precipitação) na razão 1:1 amoxicilina : polímero obtidas por MEV (aumento 20.000 X)



**Figura 14** - Fotomicrografias das partículas com o fármaco obtida por sorção durante 1 hora obtidas por MEV (aumento 10.000 X)

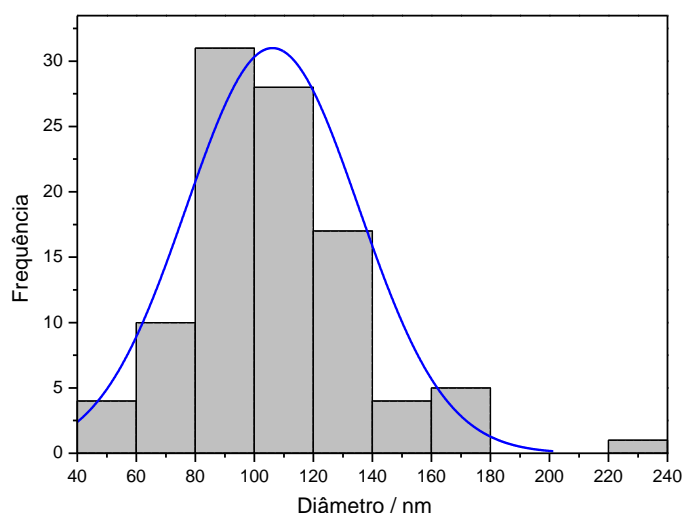
As fotomicrografias revelaram a formação de um sistema de partículas aproximadamente esféricas, interligadas ou aderidas entre si, de tamanho de ordem de grandeza nanométrica para as partículas obtidas por coacervação /precipitação e micrométrica para as partículas obtidas por *spray drying*. Além das características da quitosana, o tamanho das partículas é definido pela técnica de obtenção, uma vez que o método de *spray drying* resulta em partículas com tamanho variando entre 2 – 10 μm (RE, 1998).

De acordo com Chasteigner e colaboradores (1995) durante o estágio de congelamento, na etapa de liofilização, as tensões provocadas pela cristalização da água poderiam "quebrar" as partículas ou agregá-las. Tem sido relatado que a presença de um crioprotetor é fundamental para o processo de liofilização sendo que os crioprotetores mais comuns são os carboidratos (glicose, sacarose, manitol, frutose), considerados também os mais efetivos na manutenção das características iniciais de tamanho das partículas (NAGPAL, SINGH, MISHRA, 2010). Isso

explicaria o aspecto observado nas amostras obtidas por coacervação/precipitação, onde a secagem foi realizada por liofilização.

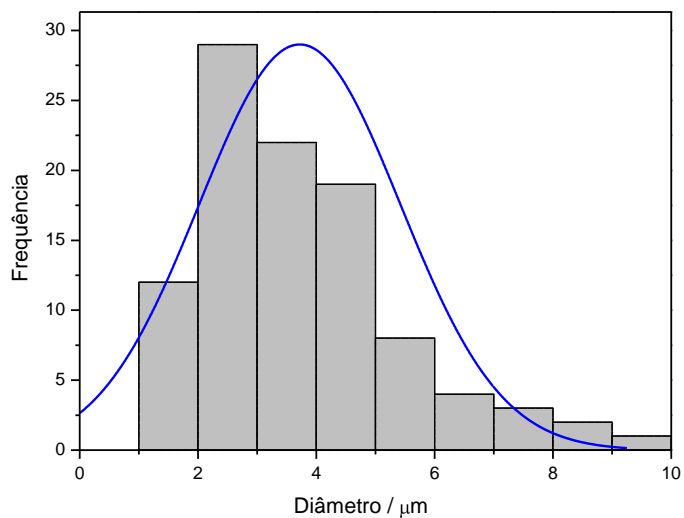
Alguns autores relatam que o formato esférico da partícula de quitosana seja influenciado também pelo valor de seu grau de desacetilação, ou seja, quanto maior o GD mais fácil a obtenção de esferas (DASH et al., 2011; VILLA NOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Por outro lado, Berthold e colaboradores (1996) afirmam, após estudos com quitosana de diferentes massas molares, que este parâmetro não influencia o formato das micropartículas nem o formato interfere na liberação do fármaco.

A partir das fotomicrografias, foi obtida a distribuição granulométrica das partículas. Os resultados da frequência de distribuição de partículas são mostrados nas Figuras 15-18. O diâmetro médio foi de 106, 561 e 139 nm para as partículas sem o fármaco obtidas por coacervação/precipitação, partículas com o fármaco obtidas em etapa única na razão 1:1 amoxicilina : polímero e por sorção durante 1 hora, respectivamente, e de 3,7  $\mu\text{m}$  para as partículas obtidas por *spray drying*. Pode-se verificar que a distribuição do tamanho de partículas foi monomodal para todas as amostras.

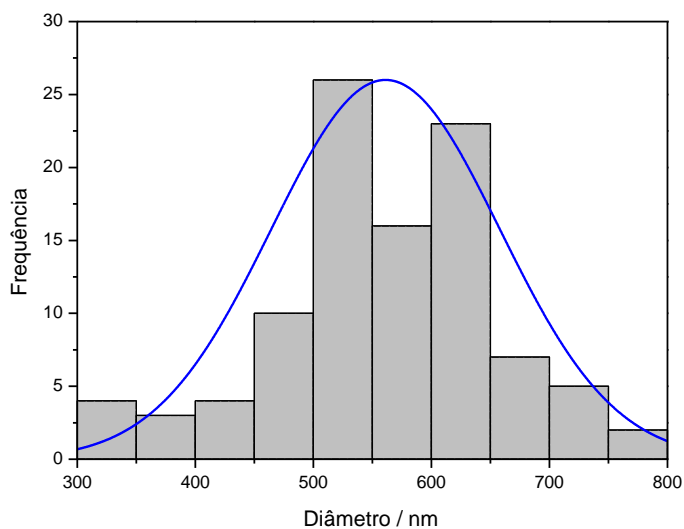


**Figura 15** - Distribuição granulométrica para partículas sem o fármaco (obtida por coacervação/precipitação)

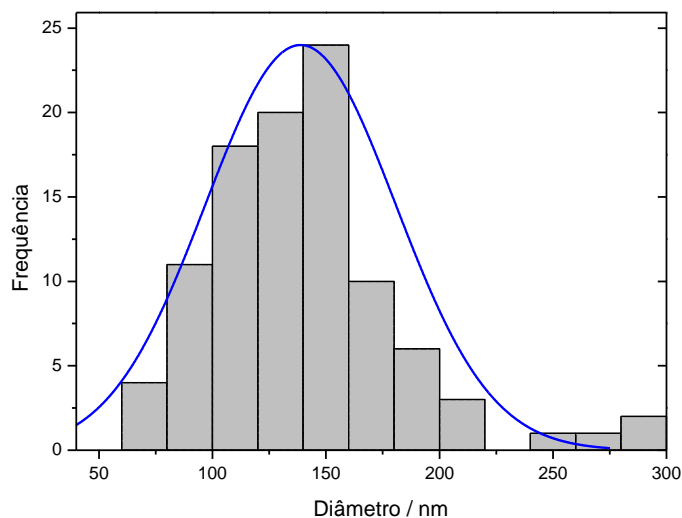




**Figura 16** - Distribuição granulométrica para partículas sem o fármaco (obtida por *spray-drying*)



**Figura 17** - Distribuição granulométrica para partículas com o fármaco obtidas em etapa única (coacervação / precipitação) na razão 1:1 amoxicilina : quitosana



**Figura 18** - Distribuição granulométrica para partículas com o fármaco obtidas por sorção durante 1 hora

Esse tamanho é condizente com o valor do grau de desacetilação do polímero (= 64%), visto que este tem influência diretamente no tamanho das partículas a serem obtidas, ou seja, quanto menor o grau de desacetilação, menor o tamanho de partículas obtidas (SANTOS et al., 2003).

Bardonnet e colaboradores (2008) relatam que o tamanho nanométrico desempenha um papel central na difusão das nanopartículas em alcançar o *H. pylori* na mucosa gástrica visto que intensificam a penetração na mucosa epitelial.

Em virtude da morfologia apresentada pelo sistema obtido por sorção, a caracterização posterior foi realizada apenas para as nanopartículas obtidas em etapa única.

### 5.5.2 Determinação do potencial zeta

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (WANG et al., 2000). Os valores médios de potencial zeta das nanopartículas obtidas por coacervação/precipitação sem o fármaco e com o fármaco incorporado na razão 1:1 em etapa única foram + 17 e + 20 mV, respectivamente.

Embora os íons sulfato tenham sido usados como precipitante/reticulante, as nanopartículas apresentaram carga positiva. Isto indica que apenas uma parte dos grupos amina foram neutralizados durante a formação das nanopartículas, sendo os grupos amino residuais os responsáveis pelo potencial zeta positivo. Além disso, esses grupos estariam livremente acessíveis para a interação com os fármacos e com os resíduos de ácido siálico carregados negativamente da mucina no estômago, através de interações eletrostáticas, favorecendo a mucoadesividade e prolongando assim, o tempo de residência da amoxicilina nos sítios de ação (BERTHOLD et al., 1996).

Também se observa que não houve alteração significativa nos valores do potencial zeta quando se comparam as nanopartículas com e sem o fármaco, o que mostra que a amoxicilina ficou mais no interior das partículas ou está em quantidade baixa.

### 5.5.3 Difração de raios-X (DRX)

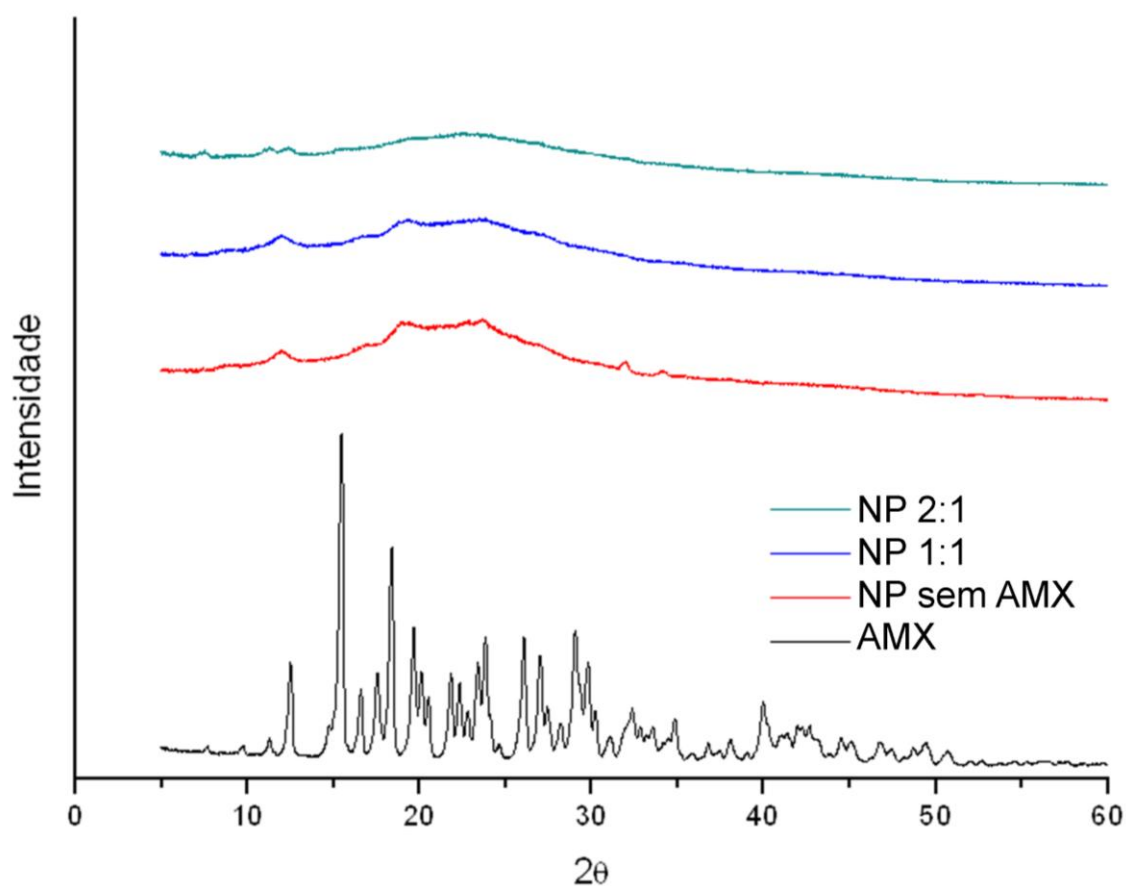
Substâncias no estado sólido podem apresentar características cristalinas ou amorfas e, em alguns casos ambos. A análise por difratometria de raios-X fornece informações importantes quanto à cristalinidade do material em estudo e,

---

consequentemente possíveis alterações do estado cristalino, quando submetidos a processos de encapsulação (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991).

A Figura 19 sumariza os resultados obtidos por difração de raios-X para as nanopartículas obtidas por coacervação/precipitação sem o fármaco, carregadas com amoxicilina (razão mássica AMX : QS, 1:1 e 2:1) além de amoxicilina matéria-prima. A amoxicilina possui características cristalinas, evidenciadas no difratograma sob a forma de picos, dos quais apresentam maior intensidade relativa os que aparecem em  $2\theta = 12^\circ, 15^\circ, 18^\circ, 19^\circ, 23^\circ, 25^\circ$  e  $28^\circ$  (CASTILLO-ORTEGA et al., 2011). Por outro lado, a quitosana apresenta um difratograma sem picos, indicando um comportamento amorfo (SANTOS, et al., 2003), dados não mostrados.

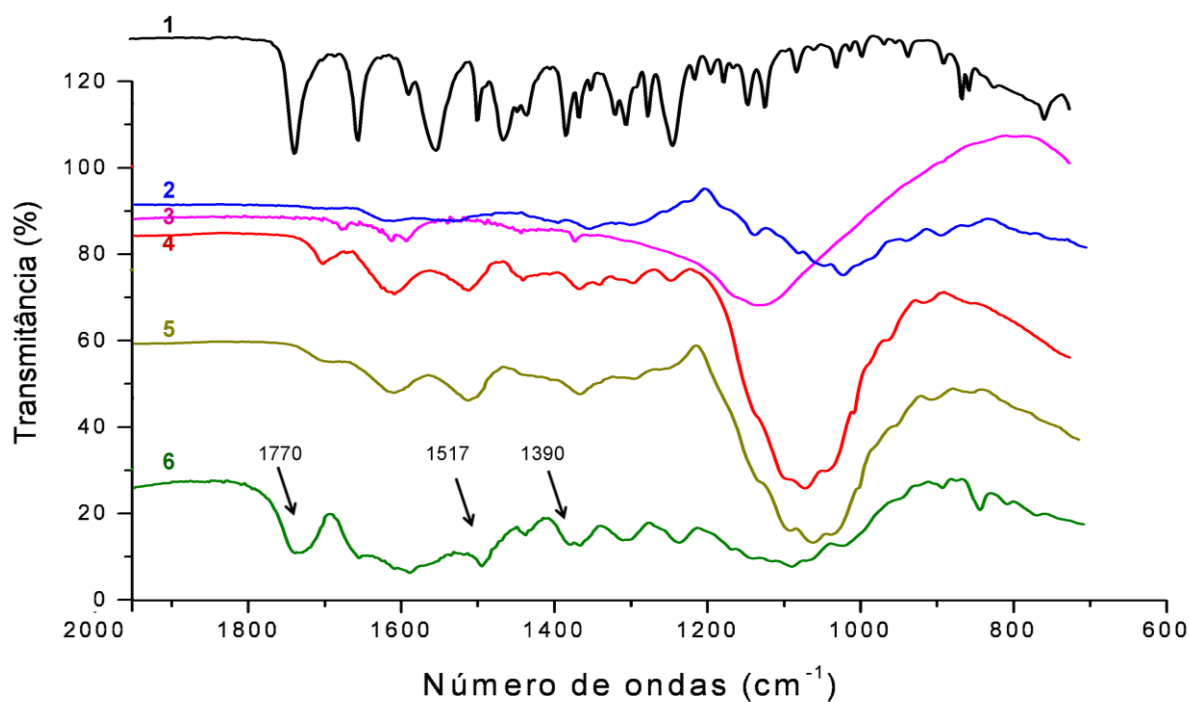
Comparando-se as partículas sem o fármaco às carregadas com amoxicilina (razão mássica AMX : QS, 1:1 e 2:1), observam-se perfis de difração semelhantes, denotando que amoxicilina apresentou um comportamento disperso no material polimérico, com redução expressiva de sua cristalinidade. Os resultados sugerem que o processo de encapsulação promoveu uma diminuição notável dos picos característicos da amoxicilina, levando a uma dispersão molecular do fármaco na partícula.



**Figura 19** -: Difractogramas das nanopartículas sem o fármaco (NP sem AMX), nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 1:1 (NP 1:1) e 2:1 (NP 2:1) e amoxicilina matéria-prima (AMX).

#### 5.5.4 Espectroscopia de absorção no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 20 apresenta os espectros de transmitância de infravermelho da quitosana, nanopartículas sem o fármaco, nanopartículas com amoxicilina na proporção 1:1 e 2:1 em relação ao polímero, amoxicilina e quitosana matérias-primas bem como sulfato de sódio.



**Figura 20** - Espectros de infravermelho da amoxicilina (1), quitosana (2), sulfato de sódio (3), nanopartículas sem o fármaco (4), nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 1:1 (5) nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 2:1 (6).

No espectro da amoxicilina (matéria-prima) é possível identificar eventos característicos do fármaco como a banda em  $1770\text{ cm}^{-1}$  atribuída à vibração do anel  $\beta$ -lactâmico, a deformação do grupamento amida (NH) vista em  $1517\text{ cm}^{-1}$  e a banda em  $1390\text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibração simétrica do  $\text{COO}^-$ , além de bandas mais sutis observadas por volta de  $750$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ , regiões de vibrações características da amoxicilina (ANGADI et al., 2012; BOUTELLIEZ et al., 2011).

O sulfato de sódio apresenta banda na região de  $1150\text{ cm}^{-1}$  característica do grupo sulfato (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991).

Para a quitosana, observam-se bandas de absorção em  $1080\text{ cm}^{-1}$  referentes à absorção das aminas primárias e secundárias, respectivamente (SANTOS et al., 2003).

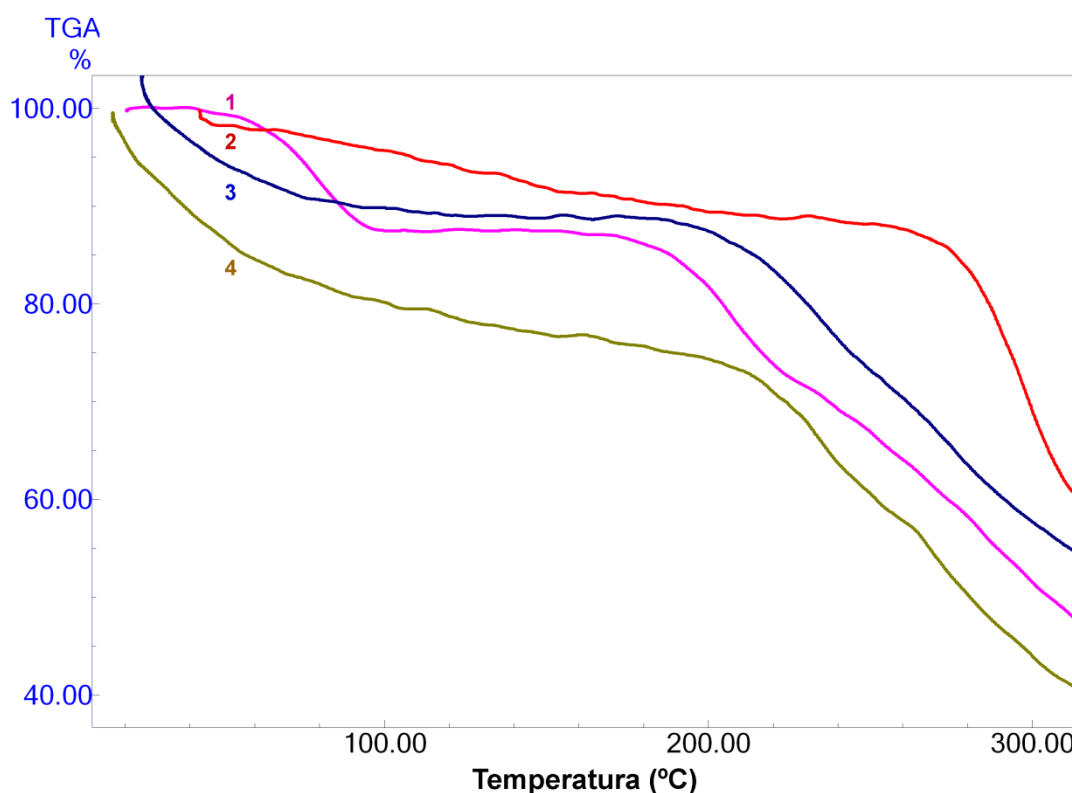
---

Na análise banda a banda do espectro do sistema particulado contendo o fármaco (1:1) não é possível identificar picos característicos da amoxicilina, provavelmente devido à baixa concentração nas partículas e a alta concentração do sulfato de sódio associado à intensidade do seu comportamento espectral, levam à sobreposição dos picos característicos do fármaco. A banda em  $1150\text{ cm}^{-1}$  é referente à porção do grupamento sulfato evidenciando a formação das partículas.

A partir dos espectros para o sistema particulado contendo o fármaco na proporção 2:1 em relação ao polímero, bandas de absorção características da amoxicilina (descritas anteriormente) foram observadas, confirmando a incorporação do fármaco à partícula em quantidade suficiente para a identificação por esta técnica.

#### **5.5.5 Análise termogravimétrica**

A Figura 21 mostra as análises termogravimétricas das matérias-primas amoxicilina e quitosana e das nanopartículas com amoxicilina na proporção 1:1 e 2:1 em relação ao polímero.



**Figura 21** - Curvas TG da amoxicilina (1), quitosana (2), nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 2:1 (3) e nanopartículas com amoxicilina na razão mássica fármaco : polímero 1:1 (4).

A curva TG da AMX (Figura 21-1) revela a presença de três etapas de perda de massa, sendo que a primeira ocorreu entre 64 e 92°C, com diminuição de 12,5% e está relacionada à perda de água. A segunda etapa ocorreu entre 172 e 222°C, com perda de massa de 13,8% e a terceira, entre 222 e 300°C com perda de massa de 25,3%, sugerindo que o fármaco se decompõe em duas etapas.

A curva TG da quitosana (Figura 21-2) revela duas etapas de perda de massa, a primeira ocorre até 137°C, correspondente a 7%, a qual está relacionada à perda de água e a segunda, referente à perda de massa do polímero de 27%, entre 260 e 300°C.

A curva TG da nanopartícula com o fármaco na proporção 2:1 (Figura 21-3) mostrou três etapas de perda de massa: a primeira, relativa à desidratação da



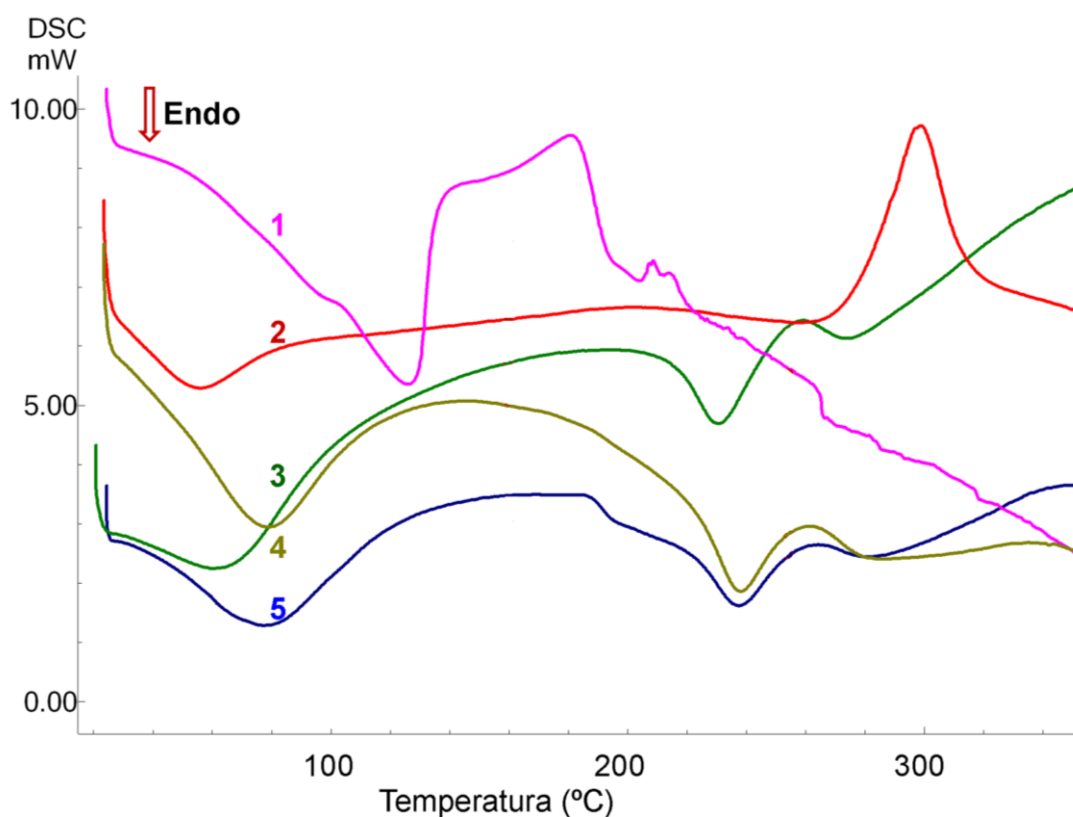
amostra na faixa de temperatura entre 37 e 63°C, com perda de massa de 9%; a segunda, entre 185 e 244°C e perda de massa de 14%, e a terceira, entre 244 e 300°C com perda de massa de 17,3%, correspondendo provavelmente à degradação do fármaco e da quitosana.

O mesmo perfil ocorreu para a curva TG da nanopartícula com o fármaco na proporção 1:1 (Figura 21-4), com a primeira etapa na faixa de temperatura de 25 a 105°C e perda de massa de 18,5% a segunda etapa entre 194 e 264°C com perda de massa de 18% e a terceira, entre 264 e 300°C com perda de massa de 13%.

De acordo com os resultados observados para a segunda etapa de perda de massa das nanopartículas e da amoxicilina matéria-prima, é possível inferir que a incorporação do fármaco em partículas de quitosana proporciona maior estabilidade térmica à amoxicilina, uma vez que a faixa de temperatura em que ocorre a perda de massa nas nanopartículas é superior ao que o verificado para a matéria-prima. Assim, o sistema que apresentou maior estabilidade térmica foram as nanopartículas obtidas na proporção 1:1, com início de degradação da amoxicilina em temperatura 22°C superior à observada para o fármaco (194 e 172°C respectivamente).

#### **5.5.6 Análise Calorimétrica Exploratória Diferencial (DSC)**

As curvas de DSC da amoxicilina e quitosana matérias-primas, nanopartículas sem e com o fármaco (1:1 e 2:1) encontram-se na Figura 22.



**Figura 22** - Curvas de DSC da amoxicilina (1), quitosana (2), nanopartículas sem o fármaco (3), nanopartículas com o fármaco na proporção 1:1 (4), e 2:1 (5) em relação ao polímero

A curva DSC da amoxicilina matéria-prima (Fig. 22 – 1) mostra a presença de três eventos calorimétricos característicos do seu comportamento térmico. O primeiro evento endotérmico está relacionado à desidratação entre 59 e 128°C, com  $T_{\text{pico}} = 85^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 35 \text{ J.g}^{-1}$ . O segundo evento, também endotérmico, correspondente à fusão da amoxicilina, ocorre entre 83 e 141°C, com  $T_{\text{pico}} = 125^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 436 \text{ J.g}^{-1}$ . Os demais eventos são exotérmicos e são observados acima de 171°C relacionados à decomposição do fármaco, corroborando com os dados termogravimétricos. A literatura aponta vários pontos de fusão para a amoxicilina: 109°C (NARKAR, SHER, PAWAR, 2010), 124°C (SINHG et al., 2010), 136°C (SONGSURA et al., 2011) e 152°C (HEMANT, SINGH, SHIVAKUMAR). O pico observado na Figura 22 está em acordo com o observado por SINHG e colaboradores (2010).

Na curva de DSC da quitosana (Fig. 22 – 2) são observados dois picos. O primeiro, endotérmico (entre 32 e 86°C,  $T_{\text{pico}} = 73^{\circ}\text{C}$  com  $\Delta H = 255 \text{ J.g}^{-1}$ ), corresponde ao processo de desidratação, cuja área segundo Santos e colaboradores (2003), dependerá do histórico de secagem da amostra. O segundo evento, exotérmico (entre 255 e 326°C,  $T_{\text{pico}} = 289^{\circ}\text{C}$  com  $\Delta H = - 221 \text{ J.g}^{-1}$ ), está relacionado ao processo de decomposição do polímero, evidenciado também pela perda de massa na curva de TG que ocorre nessa faixa de temperatura.

A curva DSC das nanopartículas sem o fármaco (Fig. 22 – 3) mostrou três eventos calorimétricos, sendo o primeiro endotérmico, entre 68 e 102°C ( $T_{\text{pico}} = 81^{\circ}\text{C}$  com  $\Delta H = 612 \text{ J.g}^{-1}$ ) relativo à perda de água remanescente do processo de obtenção das partículas. O segundo evento endotérmico foi observado entre 207 e 235°C, com  $T_{\text{pico}} = 225^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 44 \text{ J.g}^{-1}$  e é característico apenas das nanopartículas, podendo estar relacionado a alguma transição na estrutura polimérica reticulada pelo sulfato de sódio. O terceiro pico, exotérmico, entre 223 e 268°C ( $T_{\text{pico}} = 250^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = - 37 \text{ J.g}^{-1}$ ), refere-se ao evento de degradação da quitosana. Observa-se que a degradação do polímero no sistema particulado inicia a uma temperatura inferior à quitosana matéria-prima, conforme comparação com a curva 2 da Figura 22 e a curva TG da Figura 21.

A curva DSC das nanopartículas com o fármaco na proporção 1:1 (Fig. 22 – 4) mostra a presença de quatro eventos calorimétricos. O primeiro evento endotérmico relaciona-se à desidratação entre 25 e 74°C com  $T_{\text{pico}} = 52^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 65 \text{ J.g}^{-1}$ . O segundo evento ocorreu na faixa de 84 - 122°C com  $T_{\text{pico}} = 101^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 30 \text{ J.g}^{-1}$ . O terceiro evento indica um processo endotérmico que ocorreu entre 218 e 241°C (com  $T_{\text{pico}} = 230^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 37 \text{ J.g}^{-1}$ ), apresentado também pelos demais sistemas nanoparticulados, enquanto que o quarto processo observado é um fenômeno exotérmico entre 244 e 270°C ( $T_{\text{pico}} = 257^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = - 21 \text{ J.g}^{-1}$ ), referente ao evento de degradação dos componentes do sistema (polímero e fármaco).

A curva DSC das nanopartículas com o fármaco na proporção 2:1 (Fig. 22 – 5) apresentou quatro eventos calorimétricos. O primeiro evento endotérmico relaciona-se à desidratação entre 28 e 124°C com  $T_{\text{pico}} = 77^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = 268 \text{ J.g}^{-1}$ . O segundo evento, exotérmico ocorreu na faixa de 167 - 193°C com  $T_{\text{pico}} = 187^{\circ}\text{C}$  e  $\Delta H = - 13 \text{ J.g}^{-1}$ .

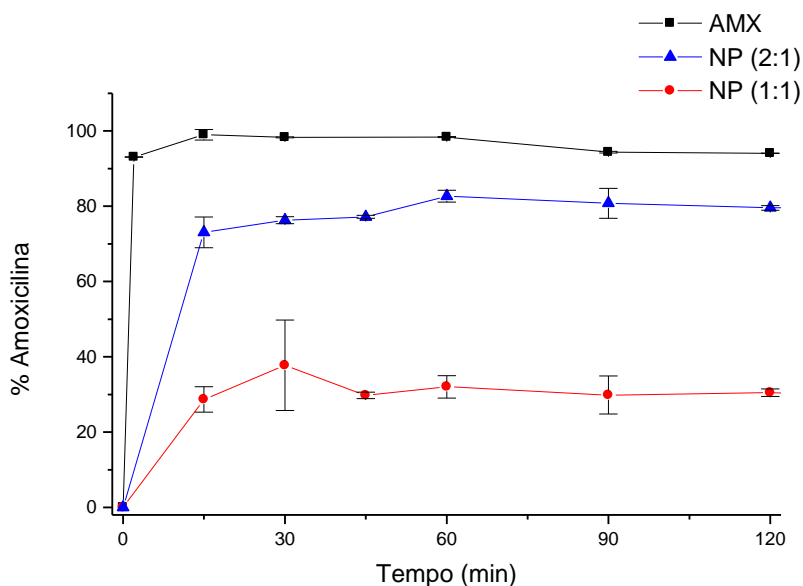
$\text{g}^{-1}$ , compatível com a primeira etapa de degradação observada na curva TG da amoxicilina. O terceiro evento está relacionado ao processo endotérmico característico do sistema nanoparticulado, que ocorreu entre 223 e 254°C (com  $T_{\text{pico}} = 237^\circ\text{C}$  e  $\Delta H = 90 \text{ J.g}^{-1}$ ) enquanto que o quarto processo é exotérmico, entre 268 e 304°C ( $T_{\text{pico}} = 280^\circ\text{C}$  e  $\Delta H = - 14 \text{ J.g}^{-1}$ ) referente ao evento de degradação dos componentes do sistema.

De um modo geral, a incorporação da amoxicilina nos sistemas nanoparticulados à base de quitosana conferiu maior estabilidade térmica ao fármaco, uma vez que o início da degradação foi retardado nas partículas quando comparado à matéria-prima. Além disso, foi verificada a ocorrência de um evento endotérmico característico apenas das nanopartículas, o que poderia ser utilizado em estudos futuros como uma comprovação da formação desses sistemas.

## 5.6 Estudos de liberação *in vitro*

O estudo do perfil de liberação traz informações fundamentais a respeito da estrutura, por exemplo, a presença de poros, e do comportamento molecular da formulação, com possíveis interações entre o fármaco e o polímero, e sua influência na velocidade e no mecanismo de liberação do fármaco (GIL; ORLANDO; MATIAS, 2001; SIEPMAN, PEPPAS, 2001).

A Figura 23 apresenta o perfil de liberação em pH 1,2 da amoxicilina a partir das nanopartículas durante 2 horas em comparação com a matéria-prima.



**Figura 23** - Perfil de liberação *in vitro* da amoxicilina em pH 1,2 a partir das nanopartículas obtidas com razão 2:1 e 1:1 fármaco: polímero e da amoxicilina matéria-prima

Nessa condição com pH semelhante ao ambiente gástrico, cerca de 95% da amoxicilina não encapsulada foi liberada nos primeiros 5 minutos de estudo, enquanto que a liberação máxima da amoxicilina dos sistemas nanoparticulados foi de aproximadamente 30% para o sistema na proporção 1:1 e em torno de 70% para o sistema na razão 2:1, em 15 minutos.

Analisando os perfis de liberação obtidos nos primeiros 30 minutos, verificou-se que a taxa de liberação foi mais lenta para a formulação com menor quantidade do fármaco (partículas na proporção 1:1 fármaco : polímero), aumentando quando a razão de amoxicilina era maior. A amoxicilina matéria-prima teve liberação imediata.

Embora as velocidades tenham sido distintas, a amoxicilina encapsulada nas partículas apresentou o mesmo perfil de liberação, com uma fase inicial mais rápida (efeito *burst*), a qual pode ser atribuída à dissolução da amoxicilina na superfície da partícula e migração do fármaco para o fluido externo por difusão pela matriz polimérica. Além disso, o tamanho nanométrico do sistema também pode ter

contribuído, visto que sistemas com tamanhos de partículas menores exibem uma liberação mais rápida.

Entretanto, após essa primeira fase do ensaio, não houve liberação do restante da amoxicilina nas partículas nas 2 horas de duração do experimento. Ao longo do tempo, a liberação do fármaco é devida ao processo de difusão ou intumescimento da malha polimérica que aprisiona as moléculas menores (PEPPAS, 2003). Desta forma, o sulfato de sódio teria sido capaz de formar múltiplas ligações cruzadas nas cadeias de quitosana proporcionando um sistema de rede mais estável, aprisionando a amoxicilina no interior das partículas. É sabido que o grau de reticulação influencia fortemente a velocidade de liberação do fármaco (BERGER et al., 2004). Nesse caso, para que mais amoxicilina fosse liberada ao meio, seria necessária uma diminuição do grau de reticulação para um maior intumescimento da matriz e conseqüentemente uma liberação devido à erosão da partícula e maior facilidade de difusão do fármaco.

Por outro lado, não pode ser descartada a hipótese já levantada por Hejazi e Amiji (2002) ao prepararem partículas de quitosana com tetraciclina utilizando a mesma técnica, de que o fármaco teria sido extraído das partículas durante a lavagem. Nesse caso, como os percentuais da amoxicilina liberada foram calculados empregando os valores de teor apresentados na Tabela 2, o platô atingido representaria a quantidade máxima incorporada às partículas, uma vez que as perdas não foram determinadas. Assim, para que a liberação da amoxicilina fosse mais prolongada, seria necessário um aumento do grau de reticulação para um maior controle da difusão do fármaco pela matriz polimérica.

Dessa forma, o processo de coacervação-precipitação para encapsulação da amoxicilina em etapa única mostrou-se vantajoso pela simplicidade e pela elevada eficiência de encapsulação obtida. Porém, estudos são ainda necessários para ajustar a cinética de liberação do fármaco de acordo com a aplicação pretendida.

---

## 6 CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho consistiu na obtenção e caracterização de partículas de quitosana – amoxicilina com o propósito de possível utilização como sistema de liberação controlada no tratamento do *H. pylori*. Diante dos resultados obtidos, concluímos que:

- Foi possível a obtenção do sistema particulado quitosana – amoxicilina pela técnica de coacervação/precipitação utilizando o sulfato de sódio como agente precipitante e reticulante, com eficiência de encapsulação superior a 80%. Desta forma, o método mostrou-se eficaz no encapsulamento da amoxicilina. Além disso, a amoxicilina manteve-se quimicamente estável na solução ácida de quitosana além do tempo necessário para a obtenção das partículas.

- A caracterização por MEV revelou a formação de partículas aproximadamente esféricas, interligadas ou aderidas entre si, de tamanho de ordem de grandeza nanométrica para as partículas obtidas por coacervação /precipitação e micrométrica para as partículas obtidas por *spray drying*. O tamanho nanométrico é de maior interesse pois é atribuída maior penetração do fármaco na mucosa gástrica, colonizada pelo *H. pylori*.

- Adequações do método de secagem, com a utilização de crioprotetores devem ser realizadas objetivando uma completa separação das partículas nos sistemas liofilizados.

- Os resultados de DRX denotam que amoxicilina apresentou um comportamento disperso no material polimérico, com redução expressiva de sua cristalinidade. A diminuição notável dos picos característicos da amoxicilina sugere que o processo de encapsulação promoveu uma dispersão molecular do fármaco na partícula.

- Através dos espectros de FTIR, os picos característicos da amoxicilina não foram evidenciados para as nanopartículas contendo o fármaco na proporção 1:1 em relação à quitosana, enquanto que nas partículas obtidas com a proporção 2:1 fármaco : polímero, as bandas de absorção características da amoxicilina foram identificadas, confirmando a incorporação do fármaco à partícula.

- A caracterização das nanopartículas por análise térmica indicou que a incorporação da amoxicilina nas nanopartículas de quitosana proporciona maior estabilidade térmica ao fármaco, com perda de massa das partículas observada nos estudos de TG ocorrendo em faixa de temperatura superior e evento exotérmico nas curvas DSC relacionado à degradação iniciando em temperatura maior à verificada para a matéria-prima. Além disso, foi verificada a ocorrência de um evento endotérmico característico apenas das nanopartículas, com ocorrência na faixa de 220-250°C, comprova a formação desses sistemas.

- Em comparação à amoxicilina não encapsulada, que teve liberação imediata, o fármaco foi liberado mais lentamente dos sistemas particulados. As nanopartículas apresentaram perfil de liberação com etapa inicial mais rápida (efeito *burst*) atingindo liberação máxima da amoxicilina em 30 minutos de apenas 35% para o sistema na proporção 1:1 fármaco : polímero e em torno de 80% para o sistema na razão 2:1, com nenhuma liberação posterior a esse período.

- Dessa forma, apesar de simples e de proporcionar elevada eficiência de encapsulação da amoxicilina, o processo de coacervação-precipitação em etapa única utilizando o sulfato de sódio como precipitante/reticulante deve ser otimizado com vistas ao ajuste da cinética de liberação do fármaco de acordo com a aplicação pretendida.



## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos objetivos alcançados na presente tese, tem-se como perspectivas:

- Adequações no processo de obtenção e método de secagem, para que sejam obtidas partículas esféricas mais definidas, sem aglomeração;
- Otimização do grau de reticulação das partículas de modo a obter uma liberação prolongada do fármaco em meio ácido;
- Avaliação *in vitro* da mucoadesividade das partículas;
- Desenvolvimento de processo de encapsulação simultâneo de dois fármacos utilizados no tratamento do *H. pylori* (amoxicilina e claritromicina).

## 8 REFERÊNCIAS

- AKBUGA, BERGISADI, Effect of formulation variables on cisplatin loaded chitosan microsphere properties, **J. Microencapsulation** v.16, p. 697– 703, 1999.
- ALONSO,M. J., Nanomedicines for overcoming biological barriers, **Biomed. Pharmacother.** v.58 p. 168–172, 2004.
- ANGADI, S. C. et al., Novel composite blend microbeads of sodium alginate coated with chitosan for controlled release of amoxicillin, **Int. J. Biol.** v. 51, p.45–55, 2012.
- ARORA, S. et al., Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for *H.pylori*, **Sci. Pharm.** v. 79, p.673–694, 2011.
- AXON, A. T. R.; QUINA, M. Ten-year milestones. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 10, p.1–5, 1994.
- AZEVEDO, N.F.; HUNTINGTON J.; GOODMAN K.J.The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. **Helicobacter**, v. 14, n.1, p.1–7, 2009.
- BANSODE, S.S et al.,Microencapsulation: a review, **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.** v.1, p. 38–43, 2010.
- BARDONNET, P. L et al., Pre-formulation of liposomes against *Helicobacter pylori*: characterization and interaction with the bacteria, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.69, p.908–922, 2008.
- BARDONNET, P. L. et al. V. Gastroretentive dosage forms: overview and special case of *Helicobacter pylori*, **J. Control. Release**, v.111, p. 1–18, 2006.
- BERGER, J., et al., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur. J. of Pharm. and Biopharm.**, vol. 57, p. 19-34, 2004.
- BERTHOLD,A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. **J. of Control. Release**, v.39. p.17-25, 1996.
- BISHOP, A. J. et al. FinafloxacinHCl - a novel experimental fluoroquinolone with monotherapeutic potential for *Helicobacter pylori* eradication. **Helicobacter**, v.12, p. 424-435, 2007.
- BISSON-BOUTELLIEZ, C ; et al Preparation and Physicochemical Characterization of Amoxicillin  $\beta$ -cyclodextrin Complexes **AAPS PharmSciTech.**, 2010, v.11, n.2, p.574-581, 2010.

- BLECHER, K., NASIR, A., FRIEDMAN, A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease, **Virulence.**, v.2, p.395–401, 2011.
- BOYANOVA, L. Prevalence of multidrug-resistant *Helicobacter pylori* in Bulgaria. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, p. 930–935, 2009.
- BRIONES, E., COLINO, C.I., LANAO, J.M. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells, **J. Control. Release** v.125 p. 210–227, 2008.
- BUCKLEY, M. J. M.; O'MORAIN, C. A. Helicobacter biology — discovery. **Br. Med. Bull.**, v. 5, p. 7–16, 1998.
- CALVET, X. et al. A meta-analysis of short versus long therapy with a proton pump inhibitor, clarithromycin and either metronidazole or amoxicillin for treating *Helicobacter pylori* infection. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 14, p. 603–609, 2000.
- CAROTHERS, J. J. et al. The relationship between previous fluoroquinolone use and levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, p. 5-8, 2007.
- CASTILLO-ORTEGA, M.M.; et al Preparation, characterization and release of amoxicillin from cellulose acetate and poly(vinyl pyrrolidone) coaxial electrospun fibrous membranes. **Mater. Sci. and Eng. C**. 31, p.1772–177, 2011.
- CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan — as a biomaterial. **Biomaterials, Art. Cel. and Art. Organs**. v.18, p.1-24, 1990.
- CHASTEIGNER, S.; et al Gastrointestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. **S.T.P. Pharma Sci.** v.5, p.242, 1995.
- CHAWLA, G.; GUPTA, P.; KORADIA, V.; BANSAL, A. K. Gastroretention: A Means to Address Regional Variability in Intestinal Drug Absorption. **Pharmac. Technol.** p.50-68, 2003.
- CHEY, W. D.; WONG, B.C. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. **Am. J. Gastroenterol**, v. 102, p. 1808–1825, 2007.
- CHISHOLM, S. A. et al. Surveillance of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* at centers in England and Wales over a six-year period (2000–2005). **Eur. Surveill.**, v. 12, n. 7, E3–4, 2007.
- CHIUNG-HUNG CHANG, et al. Nanoparticles incorporated in pH-sensitive hydrogels as amoxicillin delivery for eradication of *H. pylori*. **Biomacromol.**, v.11, p.133–142, 2010.

- CHOW, Y.; WU, J.; LI, R. Influence of 6-aminopenicillanic acid on amoxicillin synthesis and p-hydroxyphenylglycine methyl ester hydrolysis. **Biocatal. and Biotransform.**, v. 23, n. 5, p. 347-351, 2005.
- CHOWDARY, K. P. R.; RAO, Y. S. Mucoadhesive Microspheres for Controlled Drug Delivery. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n.11, p. 1717—1724, 2004.
- CHUN, M. K.; SAH, H.; CHOI, H. K. Preparation of mucoadhesive microspheres containing antimicrobial agents for eradication of *H. pylori*. **Int. J. Pharm.**, v. 297, n. 1-2, p. 172–179, 2005.
- CLARKE, G.M, NEWTON, J. M, SHORT, M.B, Comparative Gastrointestinal Transit of Pellet Systems of Varying Density, **Int. J. Pharm.** v.114, n.1, p.1–11, 1995.
- COELHO, L.G.V.; et al 3rd Brazilian Consensus on Helicobacter pylori infection. **Arquiv. de Gastroenterol.**, v.50, n.2, São Paulo, SP, Brasil, 2004.
- COLLNOT, E. M.; ALI, H.; LEHR, C. M. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **J. Control. Release.**,v. 161, p. 235–246, 2012.
- CONWAY B.R., Drug Delivery Strategies for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infections **Current Pharm. Design**, v. 11, p.775-790
- COOREMAN MP, KRAUSGRILL P, HENGELS KJ. Local gastric and serum amoxicillin concentration after different oral application forms. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.37p.1506-1509, 1993.
- COOREMAN, M.P.; KRAUSGRILL, P.; HENGELS, K.J.; Local gastric and serum amoxicillin concentrations after different oral application forms, **Antimicrobiol. Agents Chemotherapy.**, v. 37, p. 1506–1509, 1993.
- COVER, T.L.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* in health and disease. **Gastroenterology**, v.136, p.1863–1873, 2009.
- CREMER, K., Drug Delivery: Gastro-Remaining Dosage Forms, **Pharm. J.** v.108; p.259,1997.
- CUSTODIO, R. O. et al. Identificação do *Helicobacter pylori* pela citologia do escovado gástrico: comparação com o método histológico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 38, n. 4, p. 322-325, 2005.
- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E.; Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Polym. Sci.**, v.36, p. 981–1014, 2011.
- DE FRANCESCO V. et al. Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, p. 783–785, 2007.

- DE FRANCESCO, V.; Sequential treatment for *Helicobacter pylori* does not share the risk factors of triple therapy failure. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 19, p. 407–414, 2004.
- DES RIEUX, A et al., Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. **J. Control. Release.**, v.116, p.1–2, 2006.
- DESHPANDE, A. A.; SHAH, N. H.; RHODES, C. T.; MALICK, W. Development of a novel controlled-release system for gastric retention, **Pharm. Res.**, v.14, p. 815–819, 1997.
- DESHPANDE, A.A. et al. Controlled release drug delivery systems for prolonged gastric residence: an overview, **Drug. DevInd. Pharm.**, v. 22, n.6, p. 531– 539, 1996.
- DEVEREUX, J. E., NEWTON, J. M, SHORT, M.B. The Influence of Density on the Gastrointestinal Transit of Pellets, **J. Pharm. Pharmacol.** v.42, n.7, p.500–501, 1990.
- DHAWAN, S.; SINGLA, A. K.; SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n.4, p. 1-7,2004.
- DUBEY,R., SHAMI, T.C., BHASKER RAO, K.U. Microencapsulation technology and applications, **Def. Sci. J.** v.59, p. 82–95, 2009.
- DUNN, B. E.; COHEN, H.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. **Clin. Microbiol. Rev.**,v. 10, n. 4, p. 720-741, 1997.
- EI-OMAR, E.M.; et al. Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion, **Gastroenterol.**, v.113, p. 15-24, 1997.
- ENSIGN,L.M., CONE,R., HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers, **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.64, p. 557–570, 2012.
- ERAH, P.O.; et al The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **J. of Antimicrob. Chem.**, v. 39, p. 5-12, 1997.
- ERAHA, P. O. et al. The stability of amoxycillin, clarithromycin and metronidazole in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 39, p. 5–12, 1997.
- EVA-MARIA, C.; HUSSAIN, A.; CLAUS-MICHAEL, L.;Nano and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **J. of Control. Release.**, v. 16, p. 235-246, 2012.
- FELL, J.T.; WHITEHEAD, L.; COLLETT, J.H. Prolonged Gastric Retention Using Floating Dosage Forms, **Pharm. Technol.** p. 82–90, 2000.

- FERNANDES, M. et al., Modulation of stability and mucoadhesive properties of chitosan microspheres for therapeutic gastric application, **Int. J. Pharm.** v.454 p. 116–124, 2013.
- FUCCIO, L. et al. Meta-analysis: duration of first-line proton pump inhibitor based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. **Ann. Int. Med.**, v.147, p. 553–562, 2007.
- GEDDES, A. M.; KLUGMAN, K. P.; ROLINSON, G. N. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 30, n. 2, p. 109-112, 2007.
- GISBERT, J. P. et al. *Helicobacter pylori* first-line treatment and rescue options in patients allergic to penicillin. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 22, p.1041-1046, 2005.
- GISBERT, J. P. et al. Rescue therapy with rifabutin after multiple *Helicobacter pylori* treatment failures. **Helicobacter.**, v. 8, p. 90–94, 2003.
- GISBERT, J. P.; ABRAIRA, V. Accuracy of *Helicobacter pylori* diagnostic tests in patients with bleeding peptic ulcer: a systematic review and meta-analysis. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 101, p. 848–863, 2006.
- GISBERT, J. P.; PAJARES, J.M. *Helicobacter pylori* “rescue” therapy after failure of two eradication treatments. **Helicobacter**, v.10, p. 363–72, 2005.
- GISBERT, J.P. et al. Third-line rescue therapy with levofloxacin after two *H.pylori* treatment failures. **Am. J. Gastroenterol.**, v.101, p. 243-247, 2006.
- GIUNCHEDI, P., CONTE,U., Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: an overview, **S.T.P. Pharma. Sci.** v.5 p. 276–290, 1995.
- GONÇALVES, L. R. B., GIORDANO, R. L. C., GIORDANO, R. C. Mathematical modeling of batch and semi batch reactors for the enzymic synthesis of amoxicillin, **Proc. Biochem.**, v.40, p.247-256, 2005.
- GONZALEZ, C.P. et al. Efficacy of rifabutin based triple therapy in *Helicobacterpylori* infected patients after two standard treatments. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.22, p. 60–63, 2007.
- GRAHAM, D. Y. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: implications for therapy. **Gastroenterol.**, v. 115, p.1272–1277, 1998.
- GRAHAM, D. Y. Efficient identification and evaluation of effective *Helicobacter pylori* therapies.**Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 7, p.145-148, 2009.
- GREHA, A. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. **J. of Drug Targ.**, v.20, n.4, p.291–300, 2012.

- GUSTAFSON, J.; WELLING, D. "No acid, no ulcer"—100 years later: a review of the history of peptic ulcer disease, **Am. Coll. Surg.**, v. 210, p.110–116, 2010.
- HAO, S et al., A novel gastroretentive porous microparticle for anti-*Helicobacter pylori* therapy: preparation, in vitro and in vivo evaluation, **Int. J. Pharm.** v.463, p.10–21, 2014.
- HARSHA, S., Pharmaceutical suspension containing both immediate/sustained release amoxicillin-loaded gelatin nanoparticles: preparation and in vitro characterization, **Drug Des. Dev. Ther.** v.7, p.1027–1033, 2013.
- HEJAZI, R.; AMIJ.M Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **J. of Control. Release.**, v. 89 p.151–165, 2003.
- HEJAZI, R., AMIJI, M. Stomach-specific anti *H. pylori* therapy. I: Preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres. **Int. J. Pharm.**, v.235, p.87–94, 2002.
- HEMANT, K. S. Y.; SINGH, M. N.; SHIVAKUMAR, H. G. Chitosan/Sodium tripolyphosphate cross linked microspheres for the treatment of gastric ulcer. **Der. Pharm. Letter.**, v. 2, n. 6, p.106-113, 2010.
- HOU S.Y.E, COWLES V.E, BERNER B. Gastric retentive dosage forms: a review. **Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.**, v.20, p. 461-497, 2013.
- HSU, M. C.; SHU, P. W. High performance liquid chromatographic method for potency determination of amoxicillin in commercial preparations and for stability studies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, n. 6, p. 1276– 1279, 1992.
- HWANG S-J, PARK H, PARK K. Gastric retentive drug-delivery systems. **Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.**, v.15, p.243-284, 1998.
- JAIN, S. K.; JANGDEY, M. S.Lectin conjugated gastroretentive multiparticulate delivery system of clarithromycin for the effective treatment of *Helicobacter pylori*. **Mol. Pharm.**, v. 6, p. 295–304, 2009.
- KATELARIS, P. H.: A randomized comparison of quadruple and triple therapies for *Helicobacter pylori* eradication: The Quadrate Study. **Gastroenterol.**, v. 123, p. 1763-1769, 2002.
- KAWABAMI, E.et al. Triple therapy with clarithromycin, amoxicillin and omeprazole for *Helicobacter pylori* eradication in children and adolescents. **Arq. de Gastroenterol.**, v. 38, p. 203–206, 2001.
- KAWASHIMA, Y. et al., Hollow Microspheres for Use as a Floating Controlled Drug Delivery System in the Stomach, **J. Pharm. Sci.** v.81, n.2, p. 135–140, 1992.
- KENNETH E.L. McCOLL, M.D. *Helicobacter pylori* infection. **New Eng. J. of Medicine.**, v. 362, n.17, p.1597–1604, 2010.

- KIDD, M.; MODLIN, I. M. A century of *Helicobacter pylori*: paradigms lost-paradigms regained. **Digestion.**, v.59, p. 1–15, 1998.
- KIM, S. S. et al. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. **Canc. Lett.**, v.305, p. 228–238, 2011.
- KONTUREK, J. W. Discovery by jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, n.3, p. 23–41, 2003.
- KRISTEN BOWEY, K., NEUFELD, R.J Systemic and Mucosal Delivery of Drugs within Polymeric Microparticles Produced by Spray Drying. **Biodrugs.**, v.24 n.6, p.359-377, 2010.
- KUMARI, A., YADAV, S.K., YADAV, S.C., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Col. Surf. B. Biointerfaces.**, v.75, p.1-18, 2010.
- LAM, P.L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries: a review. **J. of Control. Release.**, v.178, p. 25–45, 2014.
- LAMPRECHT, A.; SCHAFFER, U.; LEHR, C. M. Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. **Pharmaceut. Res.**, v. 18, n. 6, p. 788–793, 2001.
- LANGER, R., TIRRELL, D.A. Designing materials for biology and medicine, **Nature** v.428, p.487–492, 2004.
- LEHR, C. M. et al. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **Int. J. Pharm.**, v. 78, p. 43-48, 1992.
- LIM, S.T et al., Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. **J. Control. Release**, v. 66, p.281-292, 2000.
- LIN, C. K. et al. One-week quadruple therapy is an effective salvage regimen for *Helicobacter pylori* infection in patients after failure of standard triple therapy. **J. Clin. Gastroenterol.**, v.34, p. 547–555, 2002.
- LIN, Y.-H. et al., Formulation and evaluation of water-in-oil amoxicillin-loaded nanoemulsions using for *Helicobacter pylori* eradication, **Proc. Biochem.**, v47 p.1469–1478, 2012.
- LIND, T. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study. **Helicobacter**, v.1, p.138–144, 1996.
- LIU, Z. et al. In vitro and in vivo studies on mucoadhesive microspheres of amoxicillin. **J. Control. Release.**, v. 102, n. 1, p. 135– 144, 2005.



- LOPES, D. et al. Eradication of *Helicobacter pylori*: Past, present and future. **J. Control. Release.**, v. 189, p.169–186, 2014.
- LOURENÇO, V.A. Desenvolvimento e avaliação de micropartículas de quitosana para a veiculação de DMAE na pele. 117f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2006.
- LUBBEN, van der, I.M.; VERHOEF, J.C.; AESLST van, A.C.; BORCHARD, H.E.; JUNGINGER, H.E. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. **Biomaterials.**, v. 22, p. 687-694, 2001.
- MAGALHÃES QUEIROZ, D. M.; LUZZA, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter.**, v. 11, n. 1, p. 1-5, 2006.
- MAJITHIYA, R. J.; MURTHY, R. S. R. Chitosan-Based Mucoadhesive Microspheres of Clarithromycin as A Delivery System for Antibiotic to Stomach. **Cur. Drug Delivery.**, v. 2, n.3, p. 235-242, 2005.
- MALFERTHEINER P. et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in non-infected volunteers: a phase I study. **Gastroenterol.**, v.135, p. 787–795, 2008.
- MALFERTHEINER, P. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. **Gut.**, v. 56, p.772–781, 2007.
- MALFERTHEINER, P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence Consensus Report. **Gut.**, v. 61, p. 646–664, 2012.
- MARSHALL, B. Gastrics pirochaetes: 100 years of discovery before and after Kobayashi. **Keio J. Med.**, v.51, n. 2, p.33–37, 2002
- MARSHALL, B. J.; Unidentified curved bacilli in gastric epithelium inactive chronic gastritis. **Lancet.**, v.1, p. 1273–1275, 1983.
- MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet.**, v. 1, n. 8390, p. 1311–1315, 1984.
- MARSHALL, B.J. et al. Antibacterial action of bismuth in relation to *Campylobacter pyloridis* colonization and gastritis. **Digestion.**, v. 37, n. 2, p.16–30, 1987.
- MARSHALL, B.J. et al. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. **Lancet.**, v.2, p. 1437–1442, 1988.
- MARSHALL, B.J. The *Campylobacter pylori* story. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 23, n. 146, p. 58–66, 1988.

MAZZARINO et al., Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications, **J. of Coll. and Int Sci.** v.370 p.58–66, 2012.

MEGRAUD, F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. **Gut.**, v. 53, p.1374–1384, 2004.

MERTINS, O. et al., Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nano vesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. **Chem. Phys. Lipids**, v.138, p.29-37, 2005.

MISHRA, S. Is *Helicobacter pylori* good or bad? **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 32, p. 301–304, 2013.

MLA style: "Press Release: The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine to Barry J. Marshall and J. Robin Warren". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014.Web. Disponível em: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html). Acesso em: 18 Jan 2015.

MORRIS, A.; NICHOLSON, G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 82, p. 192–199, 1987.

MYUNG-KWAN CHUNA, HONGKEE SAH B, HOO-KYUN CHOI. Preparation of mucoadhesive microspheres containing antimicrobial agents for eradication of *H. pylori*. **Int. J. of Pharmac.**, v.297 (2005) p.172–179, 2005.

NAGAHARA, N. et al. Mucoadhesive microspheres containing amoxicillin for clearance of *Helicobacter pylori*. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 42, n.10, p. 2492–2494, 1998.

NAGPAL, K., SINGH, S. K., MISHRA, D. N, Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 58, n.11, p.1423–1430,2010.

NARKAR, M.; PRAVEEN SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Ionotropic Gelation Method

NARKAR, M.; SHER, P.; PAWAR, A. Stomach-Specific Controlled Release Gellan Beads of Acid-Soluble Drug Prepared by Ionotropic Gelation Method. **AAPS PharmSciTech.**, v. 11, n. 1, p.267-277, 2010.

O'CONNOR, A.; GISBERT, J.; O'MORAIN, C. Treatment of *H. pylori* Infection. **Helicobacter**, v.14, n. 1, p. 46–51, 2009.

OGATA, S. K. et al . Evaluation of invasive and non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic children and adolescents. **São Paulo Med. J.**, São Paulo, v. 119, n. 2, p. 67-71, 2001.

- OSATO M. S. et al. Pattern of primary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole or clarithromycin in the United States. **Arch. Int. Med.**, v. 161, n. 9, p. 1217- 1220, 2001.
- PAL, R. et al., Preparation and characterization of sodium alginate-carbopol-924P based mucoadhesive microbeads, **Pharm. Lett.** v.3 p.1–11, 2011.
- PARK K, ROBINSON, J.R, Bioadhesive Polymers as Platforms for Oral-Controlled Drug Delivery:Method to Study Bioadhesion, **Int. J. Pharm.** v. 19, n. 1, p. 107–127, 1984.
- PATEL J, PATIL, J Preparation and characterization of amoxicillin mucoadhesive microparticles using solution-enhanced dispersion by supercritical CO<sub>2</sub>, **J. Microencapsul.**, v.29, p.398–408, 2012.
- PATEL, J. K.; CHAVDA, J. R. Formulation and evaluation of stomach-specific amoxicillin-loaded carbopol-934P mucoadhesive microspheres for anti-*Helicobacter pylori* therapy. **J. Microencapsul.**, v. 26, n. 4, p. 365–376, 2009.
- PATEL, J.K, PATEL, M.M.; Stomach specific anti-*Helicobacter Pylori* therapy: preparation and evaluation of amoxicillin-loaded chitosan mucoadhesive microspheres. **Curr. Drug Delivery.**, v.4, p.41-50, 2007.
- PATEL, Preparation and Characterization of Freeze-dried Chitosan-Poly(Ethylene Oxide) Hydrogels for Site-Specific Antibiotic Delivery in the Stomach **Pharm. Research.**, v.13 p.588 -593, 1996.
- PATIL J.S.;KAMALAPUR, M.V.;MARAPUR, S.C;KADAM, D.V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review, **Dig. J. Nanomater. Biostruct.** v.5, p. 241-248, 2010.
- PATIL, P., CHAVANKE, D., WAGH,M., A review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres, **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.** v.4, p. 27–32, 2012.
- PELGRIFT, R.Y., FRIEDMAN , A.J., Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance, **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.,65, p.1803–1815, 2013.
- PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J.J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. **Biomaterials.**, v. 17, p. 1553-1561, 1996.
- PONCHEL,G.; IRACHE, J.M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract, **Adv. Drug Del. Rev.** v.34 p. 191–219, 1998.
- PRASANTHI, C. H. et al. Focus on current trends in the treatment of *Helicobacter pylori* infection: an update. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v.9, p. 42–51, 2011.

QIU, Y., PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.53 p.321–339, 2001.

R. DUBEY, T.C. SHAMI, K.U. BHASKER RAO, Microencapsulation technology and applications, **Def. Sci. Journal** v.59, p.82–95, 2009.

RAMPINOVA, A.; BORGOGNANA, M.; BLASI, P.; BELLICH B. A, CESÀRO, A.. Chitosan particles: Preparation, size evolution and stability. **J. of Pharm.**, v.455, p.219–228, 2013.

Raval, et al., Formulation and in vitro characterization of spray dried microspheres of amoxicillin, **Acta Pharma.**, v.60, p. 455–465, 2010.

RAVAL, J.A.; PATEL, J.; PATEL, M. Formulation and in vitro characterization of spray dried microspheres of amoxicillin. **Acta Pharm.**, v.60, p.455–465, 2010.

RÉ M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technol.**, p. 1195-1236, 1998.

RINAUDO, M.; MILAS, M e DUNG, P. L. Characterization of Chitosan. Influence of Ionic Strength and Degree of Acetylation on Chain Expansion. **Int. J. of Biological Macromol.**, v.15, p. 28, 1993.

ROLINSON, G. N.; GEDDES, A.M. The 50<sup>th</sup> anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 29, n. 1, p. 3-8, 2007.

ROMANO M. et al. Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, p. 1–5, 2008.

ROSEN, H., ABRIBAT, T., The rise of drug delivery. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.4, p.381–385, 2005.

ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H. Burden of *Helicobacter pylori* and H. pylori-related diseases in developed countries: recent developments and future implications. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 8, p. 693–703, 2003.

SAHASATHIAN, T.; PRAPHAIRAKSIT, N.; MUANGSIN, N. Mucoadhesive and Floating Chitosan-coated Alginate Beads for the Controlled Gastric Release of Amoxicillin. **Arch. Pharm. Res.**, v. 33, n.6, p.889-899, 2010.

SAHASATHIAN, T.; PRAPHAIRAKSIT, N.; MUANGSIN, N. Mucoadhesive and Floating Chitosan-coated Alginate Beads for the Controlled Gastric Release of Amoxicillin. **Arch. Pharm. Res.** v. 33, n.6, p.889-899, 2010.

SANTOS J.V., MOURA, A.F.T., RAFFIN, N.F., Otimização dos Parâmetros de Secagem por Aspersão de Micropartículas de Quitosana Como Carreadores de Insulina **Lat. Am. J. Pharm.** v.22 (4) p.327-33, 2003.

- SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; FILHO, S.P.C.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v.13, n.4, p.1, 2003.
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L de C.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos Nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.
- SELGRAD, M., MALFERTHEINER, P. New strategies for *Helicobacter pylori* eradication, **Curr. Opin. Pharmacol.** v.8, p.593–597, 2008.
- SENG, C. H et al., Bioadhesive Polymers as Platforms for Oral Controlled Drug Delivery II—Synthesis and Evaluation of Some Swelling, Water-Insoluble Bioadhesive Polymers, **J. Pharm. Sci.** v.74, n.4, p.399–405, 1985.
- SEPPALA, K. et al. Cure of *Helicobacter pylori* infection in all compliant patients: report on 644 subjects. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 43, n.9, p. 1149–1150, 2008.
- SEZER, AKBU, Controlled release of piroxicam from chitosan beads, **Int. J. of Pharma.**, v.121, p. 113-116, 1995.
- SHAH et al., Evaluation of the factors influencing stomach-specific delivery of antibacterial agents for *Helicobacter pylori* infection. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.51, p. 667-672, 1999.
- SHEHADA, S.; SRUGO, I.; SHAOUL, R. Failure of sequential therapy to eradicate *Helicobacter pylori* in previously treated subjects. **Helicobacter**, v. 12, p. 645-647, 2007.
- SHINOHARA, K.; MIYAZAKI, K.; NODA, N.; TERADA, M.; WAKASUGI, H.; Gastric diseases related to *Helicobacter pylori* and Epstein–Barr virus infection, **Microbiol. Immunol.**, v.42, p.415-421, 1998.
- SIAO, D.; SOMSOUK, M. *Helicobacter pylori*: evidence-based review with a focus on immigrant populations. **J. Gen. Intern. Med.**, v. 29, p. 520-528, 2014.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. Wiley, Chichester, 1991, 419p.
- SINGH, S. K. et al. Pharmaceutical Characterization of Amoxicillin Trihydrate as Mucoadhesive Microspheres in Management of *H. Pylori*. **Int. J. Pharm. Tech. Research.**, v.2, n.1, p. 348-358, 2010.
- SINHA, S.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, S.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, **Int. J. of Pharm.**, v.274, p. 1-33, 2004.

- SOGIAS, I. A.; WILLIAMS, A. C.; KHUTORYANSKIY, V. V. Why is chitosanmucoadhesive? **Biomacromol.**, v. 9, p. 1837–1842, 2008.
- STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. **World cancer report**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2003.
- SUAVE, J et al., Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Rev. S. e Amb.** v. 7, p. 12-20, 2006.
- SUDHA, C.A.; LATA, S. M.; TEJRAJ, M.A.; Novel composite blend microbeads of sodium alginate coated with chitosan for controlled release of amoxicillin review. **J. Gastrointestin. Liver Dis.**, v. 19, n.4, p.409–414, 2010
- SUZUKI, H.; ISHII, H.; Role of apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric mucosal injury, **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.15, p.46-54, 2000.
- TAN, V.P.; WONG, B.C. *Helicobacter pylori* and gastritis: untangling a complex relationship 27 years on. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 26, n. 1, p. 42–45, 2011.
- TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2009.
- TOMARO–DUCHESNEAU, C., Microencapsulation for the therapeutic delivery of drugs, live mammalian and bacterial cells, and other biopharmaceutics: current status and future directions, **J. Pharm.** 103527, 2013.
- TONG, J. L. et al. Sequential therapy vs. standard triple therapies for *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 34, p.41–53, 2009.
- TSUJI, A. et al. Physico chemical properties of amphoteric  $\beta$ -lactam antibiotics I: stability, solubility, and dissolution behavior of amino penicillins as a function of pH. **J. Pharm. Sci.**, v.67, n. 8, p.1059–1066, 1978.
- TYTGAT, G.N. Colloidal bismuth subcitrate in peptic ulcer: —a review. **Digestion.**, v.37, n. 2, p.31–41, 1987.
- VAKIL, N.; VAIRA, D. Sequential therapy for *Helicobacter pylori*: time to consider making the switch? **J.A.M.A.**, v. 17, p. 300, 2008.
- VARUM, F.O., BASIT, A.W.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Braz. J. of Pharm. Sci.**, v. 44, n. 4, 2008.
- WANG J. et al. Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of *H pylori*. **Drug. Deliv.**, v. 7, p. 237-243, 2000.

WATARI, J. et al. *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, pre cancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. **World J. Gastroenterol.**, v.20, n. 18, p. 5461-5473, 2014.

XIONG M. H; Delivery of antibiotics with polymeric particles spray drying. **Int. J. Pharm.** v.187, p.53-65, 1999.

ZHANG, L., et al., Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clin. Pharmacol. Ther.** v.83, p.761–769, 2008.

ZULLO, A. et al. Standard triple and sequential therapies for *Helicobacter pylori* eradication: an update, **Eur. J. Intern. Med.**, v. 24, p. 16–19, 2012.