

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
MICROPARTICULADOS PLANEJADOS PARA
LIBERAÇÃO ORAL DO RISEDRONATO DE SÓDIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALINE DE ARCE VELASQUEZ

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS
MICROPARTICULADOS PLANEJADOS PARA LIBERAÇÃO
ORAL DO RISEDRONATO DE SÓDIO**

ALINE DE ARCE VELASQUEZ

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Cruz
Co-orientadora: Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS
PLANEJADOS PARA LIBERAÇÃO ORAL DO RISEDRONATO DE
SÓDIO**

elaborada por

Aline de Arce Velasquez

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Leticia Cruz, Dra.
(Presidente/orientadora)

Marta Palma Alves, Dra. (UNIFRA)

Scheila Rezende Schaffazick, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 27 de Agosto de 2012.

O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas, é quem faz as verdadeiras perguntas.

(Claude Lévi-Strauss)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e à Mãe Três Vezes Admirável de Schoenstatt pelo dom da vida.

À Profa. Dra. Leticia Cruz pela oportunidade concedida no mestrado, pela orientação durante os dois anos de pós-graduação, a qual foi de fundamental importância, estando sempre disposta a transmitir conhecimentos e a discutir os resultados obtidos. À Profa. Dra. Clarice Rolim pela co-orientação durante o mestrado e pela confiança. À Profa. Dra. Cristiane de Bona pelo empréstimo do Spray-Dryer.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM pela realização deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos, a CAPES pelo fornecimento da bolsa de mestrado, ao apoio financeiro do CNPq e FIPE Enxoval, pela oportunidade de participar de congressos e encontros da área de tecnologia farmacêutica.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, pela agradável convivência e troca de experiências: Sara, Janaíne, Daniele, Isabel, Alessandra, Roberta, Martina, Mônica, Leticia, Felipe, Fernanda, Nathali, Fernanda K. e Maíra. Especialmente, à Juliane, Luana e Lauren por todo empenho, persistência e dedicação com o trabalho desenvolvido, aos demais colegas e laboratórios deste Programa de Pós-Graduação que me emprestaram alguns auxílios e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho. Por fim, agradeço carinhosamente à minha família, Jairo, Eliane, Rodrigo, Diogo e Irmã Maria Eliane pelo incentivo, apoio, conselhos, afeto e compreensão.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS PLANEJADOS PARA A LIBERAÇÃO ORAL DO RISEDRONATO DE SÓDIO

AUTORA: ALINE DE ARCE VELASQUEZ

ORIENTADORA: LETÍCIA CRUZ

CO-ORIENTADORA: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de agosto de 2012.

Este trabalho objetivou o desenvolvimento de micropartículas poliméricas contendo risedronato de sódio a partir de Eudragit S100[®] (MP-EUD) e da blenda, Eudragit S100[®] e Pullulan (MP-EUD-PUL), através da técnica de secagem por aspersão. As MP-EUD foram obtidas com um rendimento de 54%, eficiência de encapsulamento de 90%, tamanho médio de partícula de 3,3 μm e apresentaram formato esférico. O teor de umidade foi de 8%, o Índice de Carr e o Fator de Hausner indicaram baixa fluidez. Em pH 1,2, 23% do risedronato de sódio foi liberado em 120 min, enquanto que em pH 6,8 o fármaco levou 90 min para ser liberado. A modelagem matemática mostrou que a liberação do fármaco seguiu cinética de primeira ordem e se deu por difusão Fickiana. Comprimidos preparados pela compressão direta das MP-EUD a partir de diferentes concentrações de polivinilpirrolidona apresentaram baixas variações de peso médio, espessura e teor de fármaco. Além disso, apresentaram baixa friabilidade e dureza adequada. Os estudos *in vitro* mostraram que não mais que 16% do fármaco foi liberado durante 120 min em pH 1,2 enquanto que em pH 6,8 a liberação do fármaco foi prolongada por 270 min, seguindo cinética de primeira ordem e difusão Fickiana. Com relação às MP-EUD-PUL, três proporções de Eudragit S100[®] e Pullulan (1:2, 1:1 e 2:1) foram estudadas. As micropartículas foram obtidas com rendimento variando entre 31% e 42%, com eficiência de encapsulamento próxima de 100% e umidade abaixo de 11%. O tamanho médio de partícula variou entre 2,9 μm e 4,8 μm com estreita distribuição de tamanho. O Índice de Carr e o Fator de Hausner indicaram baixa fluidez. Em meio gástrico simulado, as micropartículas com maior proporção de Eudragit S100[®] apresentaram melhor perfil de gastrorresistência, enquanto que em meio intestinal simulado todas foram capazes de prolongar a liberação do fármaco. As MP-EUD-PUL 2:1 sofreram compressão direta na ausência ou na presença de polivinilpirrolidona. Os comprimidos microparticulados apresentaram pesos médios aceitáveis, teor de fármaco próximo a 100%, dureza e friabilidade dentro do especificado. Os estudos *in vitro* mostraram que a gastrorresistência foi mantida e que os comprimidos microparticulados também foram capazes de prolongar a liberação do risedronato. Finalmente, as formulações desenvolvidas neste estudo representam alternativas promissoras para a administração oral do risedronato de sódio.

Palavras-chave: risedronato de sódio, bisfosfonatos, micropartículas, comprimidos, liberação oral.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT OF MICROPARTICULATE SYSTEMS INTENDED FOR ORAL RELEASE OF SODIUM RISEDRONATE

AUTHOR: ALINE DE ARCE VELASQUEZ

ADVISOR: LETÍCIA CRUZ

CO-ADVISOR: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Place and Date of Defense: Santa Maria, August 27, 2012.

This work aimed the development of polymeric microparticles containing sodium risedronate from Eudragit S100[®] (MP-EUD) and the blend, Eudragit S100[®] and Pullulan (MP-EUD-PUL), through spray-drying technique. MP-EUD were obtained with a yield of 54%, encapsulation efficiency of 90%, average particle size of 3.3 μm and presented spherical shape. The moisture content was 8% and the Carr Index and Hausner Factor indicated poor flowability. At pH 1.2 23% risedronate sodium was released after 120 min, while the drug at pH 6.8 took 90 min to reach 99.5%. The mathematical modeling showed that the drug release followed first order kinetics and Fickian diffusion. Tablets prepared by direct compression of MP-EUD using different polyvinylpyrrolidone concentrations showed low weight variation, thickness and drug content. Furthermore, they presented low friability and adequate hardness. *In vitro* studies indicated that no more than 16% of the drug was released in 120 min at pH 1.2. At pH 6.8 the risedronate release was prolonged for 270 min and followed first order kinetics and Fickian diffusion. Concerning MP-EUD-PUL, three proportions of Eudragit S100[®] and Pullulan (1:2, 1:1 and 2:1) were studied. Microparticles were obtained with yields ranging from 31% to 42%, encapsulation efficiencies close to 100%, moisture contents lower than 11%, mean particle size in the range of 2.9 μm - 4.8 μm and narrow size distributions. Carr index and Hausner ratio indicated poor flowability. In gastric simulated fluid the microparticles prepared with the highest amount of Eudragit S100[®] showed the best gastroresistance. In intestinal simulated fluid blend microparticles were able to prolong the drug release. MP-EUD-PUL 2:1 were compressed into tablets with or without a binder. Both tableted microparticles could be obtained with acceptable average weights, drug content close to 100%, sufficient hardness and low friability. *In vitro* studies showed that tablets maintained the gastroresistance observed for untableted microparticles and were also able to prolong risedronate release. Finally, the formulations developed in this study represent promising alternatives for sodium risedronate oral delivery.

Keywords: sodium risedronate, bisphosphonates, microparticles, tablets, oral release.

LISTA DE ABREVIATURAS

FDA	Food Drug Administration
T_{máx}	Tempo máximo
PLGA	Polilactídeo-co-glicolídeo
CH	Quitosana
CH – PVM/MA	Quitosana - poli (éter metilvinílico-co-anidrido maléico)
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ODTS	Orally Disintegrating Tablet
PVP	Polivinilpirrolidona
MSC	Critério de Seleção do Modelo

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estruturas químicas do pirofosfato e do risedronato de sódio e estrutura geral dos bisfosfonatos.....	20
Figura 2. Variações estruturais das micropartículas.....	25
Figura 3. Foto de um spray-dryer (a) e esquema da secagem por aspersão (b).....	27

CAPÍTULO 1: Apresentação

Figura 1 - Estrutura química do Eudragit S100 [®]	35
--	----

CAPÍTULO 1: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100[®] contendo Risedronato de sódio

Figure 1 - SEM photomicrograph of risedronate-loaded microparticles.....	48
Figure 2 - In vitro release profiles of pure risedronate and risedronate-loaded microparticles (SR-MP) in 0.1 mol/L HCl pH 1.2 and phosphate buffer solution pH 6.8.	49
Figure 3 - Risedronate release profiles from tableted microparticles in 0.1 mol/L HCl pH 1.2 and phosphate buffer solution pH 6.8.....	53

CAPÍTULO 2: Apresentação

Figura 1 - Estrutura química do Pullulan.	60
--	----

CAPÍTULO 2: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100[®] e Pullulan contendo Risedronato de sódio

Figure 1 - Photomicrographs of MP1:2 (A), MP1:1 (B) and MP2:1 (C).....	69
Figure 2 - In vitro release profiles of pure risedronate and risedronate-loaded blend microparticles in 0.1 mol/L HCl pH 1.2.....	70
Figure 3 - In vitro release profiles of pure risedronate and risedronate-loaded blend microparticles in phosphate buffer solution pH 6.8.	71
Figure 4 - Risedronate release profiles from tableted microparticles in 0.1 mol/L HCl pH 1.2 and phosphate buffer solution pH 6.8.....	74

Figure 5 - SEM photomicrographs of cross-sections of tableted microparticles F1 (A) and F2 (B).....74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100[®] contendo

Risedronato de sódio

Table 1 - Percent composition of tablets containing microparticles	46
Table 2 - Densities and powder flow properties of the microparticles.....	48
Table 3 - Parameters derived from the mathematical modeling of risedronate release profile from microparticles.....	50
Table 4 - Properties of tablets containing risedronate-loaded microparticles	51
Table 5 - Parameters derived from the mathematical modeling of risedronate release profile from tablets containing microparticle.....	54

CAPÍTULO 2: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100[®] e Pullulan contendo Risedronato de sódio

Table 1 - Characteristics of the prepared Pullulan/Eudragit S100 [®] blend microparticles.....	69
Table 2 - Bulk and tapped densities and flowability indexes of blend microparticles.....	70
Table 3 - Parameters derived from the mathematical modeling of risedronate release profile from blend microparticles.....	72
Table 4 - Properties of tableted microparticles.....	73

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS.....	18
1.1. Objetivo Geral.....	18
1.2. Objetivos Específicos.....	18
REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1. Bisfosfonatos e risedronato de sódio: características, aspectos farmacológicos e terapêuticos.....	20
2. Estratégias tecnológicas para o risedronato de sódio.....	23
3. Micropartículas poliméricas.....	24
3.1. Conceitos e aplicações.....	24
3.2. Preparação e caracterização com ênfase no processo de secagem por aspersão.....	26
3.3. Comprimidos obtidos a partir de sistemas microparticulados.....	31
CAPÍTULO 1: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100 [®] contendo risedronato de sódio.....	34
1.1. Apresentação.....	35
PUBLICAÇÃO 1: Risedronate-loaded Eudragit S100 [®] Microparticles Formulated into Tablets.....	37
CAPÍTULO 2: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100 [®] e Pullulan contendo risedronato de sódio.....	58
2.1. Apresentação.....	59
PUBLICAÇÃO 2: Novel Pullulan-Eudragit [®] S100 microparticles for oral delivery of risedronate: formulation, in vitro evaluation and tableting blend microparticles.....	61
DISCUSSÃO GERAL.....	79
CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

INTRODUÇÃO

O risedronato de sódio pertence ao grupo dos bisfosfonatos e figura atualmente entre os fármacos mais prescritos no tratamento da osteoporose e da doença de Paget, distúrbios relacionados ao metabolismo ósseo (EZRA; GOLOMB, 2000; KHOSLA et al., 2012). Seu mecanismo de ação se baseia na sua elevada afinidade pelo tecido ósseo, onde atua inibindo a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (STEPAN et al., 2003). Este fármaco induz apoptose das células osteoclásticas por efeitos citotóxicos (BAE; STEIN, 2004) e provoca mudanças na estrutura das proteínas destas células (BOONEN et al., 2004).

No mercado brasileiro estão disponíveis comprimidos de liberação imediata ou comprimidos revestidos nas doses de 5 mg, 35 mg, ou 150 mg de risedronato de sódio para administração diária, semanal ou mensal, respectivamente (ANVISA, 2009). Apesar de administrado oralmente, o risedronato de sódio apresenta importantes limitações por esta via. Assim como outros bisfosfonatos, o risedronato de sódio tem sido relacionado com o aparecimento de lesões no trato gastrointestinal, principalmente no esôfago. Além disso, devido a sua alta hidrofília, este fármaco apresenta uma biodisponibilidade oral muito baixa, menor que 1% (LANZA et al., 2000; LI; KENDLER, 2004; KHOSLA et al., 2012).

A fim de evitar os efeitos adversos, recomenda-se que o comprimido seja ingerido acompanhado de um copo de água (cerca de 300 ml) e que o paciente permaneça em posição ereta por no mínimo 30 minutos para facilitar a passagem do comprimido pelo esôfago e diminuir sua adesão à mucosa deste órgão (DE GROEN et al., 1996). Em consequência, a administração oral do risedronato de sódio em pacientes que se encontram acamados é contraindicada (DARAGON; POUPLIN, 2004). Além destes cuidados, recomenda-se ainda que o comprimido seja tomado meia hora antes da primeira ingestão de líquidos ou refeição do dia para que não haja interferências na absorção do fármaco (LI; KENDLER, 2004; REGINSTER et al., 2006). Cabe mencionar que apesar de comprimidos revestidos estarem disponíveis, as mesmas recomendações são indicadas.

Todas as orientações mencionadas representam obstáculos à adesão do paciente à terapia com risedronato de sódio e demais bisfosfonatos. Além disso, a maioria dos pacientes tem dificuldade de compreender a importância de se seguir todas estas recomendações. De acordo com a literatura, cerca de 50% dos pacientes abandonam a terapia com bisfosfonatos no primeiro ano de tratamento. Embora as formulações de administração semanal e mensal

tenham surgido para contornar os inconvenientes da ingestão diária, os níveis de adesão são subótimos (REGINSTER et al., 2006). Assim, torna-se relevante o desenvolvimento de novas formulações contendo bisfosfonatos que sejam mais seguras e convenientes.

Dentre os sistemas de liberação de fármacos, as micropartículas poliméricas têm sido estudadas para aumentar a eficácia terapêutica e reduzir efeitos adversos (VARDE; PARK, 2004). Como o próprio termo sugere, as micropartículas apresentam tamanhos situados entre 1 μm a 1000 μm , entretanto, o mais comum são sistemas que apresentam diâmetro médio no intervalo de 1 μm e 100 μm . Do ponto de vista morfológico, as micropartículas podem ser divididas, basicamente, em dois tipos: microesferas e microcápsulas. As primeiras são estruturas matriciais, enquanto que as segundas são consideradas sistemas reservatórios, as quais podem conter um ou mais microdomínios sólidos ou líquidos (BIRNBAUM; BRANONN-PEPPAS, 2004).

Dentre as vias de administração, a oral é uma das mais estudadas para a liberação de fármacos a partir de micropartículas (VARDE; PARK, 2004). Estes sistemas de liberação podem ser utilizados como obtidos ou servirem de intermediários para a produção de cápsulas e comprimidos (AULTON, 2005). Independente da forma de apresentação, tais sistemas multiparticulados apresentam vantagens importantes como tempo de trânsito gastrointestinal mais uniforme, menor variabilidade farmacocinética entre indivíduos e menor risco de toxicidade, principalmente se comparados com as formas unitárias revestidas, pois estas apresentam risco de rompimento prematuro com consequente liberação de altas concentrações localizadas do fármaco (LIN; KAO, 1991; AMORIM; FERREIRA, 2001). Além disso, o interesse nos sistemas multiparticulados também está relacionado com suas propriedades de controle da liberação e transporte de fármacos para sítios de ação específicos, com consequente aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos (HANS; LOWMAN, 2002; FREIBERG; ZHU, 2004).

Considerando o que foi exposto, a preparação de sistemas multiparticulados contendo risedronato de sódio pode ser considerada uma estratégia viável e promissora para a liberação oral deste bisfosfonato. Neste sentido, este trabalho estudou duas abordagens. A primeira correspondeu à obtenção de micropartículas a partir de um polímero gastrorresistente, o Eudragit S100[®], além da preparação de comprimidos a partir de tais sistemas. A segunda abordagem foi baseada no desenvolvimento de micropartículas e seus respectivos comprimidos a partir de uma blenda de Eudragit S100[®] e Pullulan. Este último polímero, um

polissacarídeo, ainda pouco explorado em sistemas de liberação de fármacos, foi selecionado com o intuito de estudar sua capacidade em prolongar a liberação do risedronato de sódio.

Finalmente, cabe mencionar que não há relatos na literatura científica sobre a preparação de micropartículas para a administração oral do risedronato de sódio, assim como não foram encontrados registros sobre a preparação de sistemas microparticulados com Pullulan.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo a preparação e a caracterização de sistemas microparticulados contendo risedronato de sódio a partir de Eudragit S100[®] ou da blenda Eudragit S100[®] e Pullulan.

1.2. Objetivos Específicos

- Preparar micropartículas de Eudragit S100[®], Eudragit S100[®] e Pullulan contendo risedronato de sódio pela técnica de secagem por aspersão;
- Caracterizar as micropartículas quanto ao rendimento, teor de fármaco, eficiência de encapsulamento, tamanho de partícula, distribuição de tamanho de partícula, morfologia, teor de umidade, densidade e fluxo;
- Avaliar *in vitro* a gastrorresistência das formulações em fluido gástrico simulado;
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* do risedronato de sódio a partir das micropartículas em fluido intestinal simulado;
- Preparar comprimidos por compressão direta das micropartículas;
- Caracterizar os comprimidos quanto ao peso médio, espessura, dureza, friabilidade e teor de fármaco;
- Avaliar *in vitro* a gastrorresistência dos comprimidos em meio gástrico simulado;
- Avaliar *in vitro* a cinética de liberação do risedronato de sódio a partir dos comprimidos microparticulados em meio intestinal simulado.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Bisfosfonatos e risedronato de sódio: características, aspectos farmacológicos e terapêuticos

O risedronato de sódio (figura 1) é um fármaco pertencente à classe dos bisfosfonatos, agentes amplamente empregados no tratamento de distúrbios do metabolismo ósseo (FLEISCH, 1991; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011). Os bisfosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato, uma substância endógena que inibe a dissolução de cristais de fosfato de cálcio da matriz óssea (FLEISCH, 1991). Os bisfosfonatos são caracterizados por uma ligação P-C-P, altamente estável nos fluidos biológicos, enquanto que o pirofosfato apresenta uma ligação P-O-P, a qual é lábil frente às fosfatases teciduais. A figura 1 ilustra as estruturas comentadas. Além de conferir maior estabilidade aos bisfosfonatos, a substituição de um átomo de oxigênio por um de carbono conduziu a obtenção de uma diversidade de compostos pela variação dos substituintes ligados a este átomo de carbono central (LIN, 1996; EZRA; GOLOMB, 2000; PAPAPOULOS, 2006).

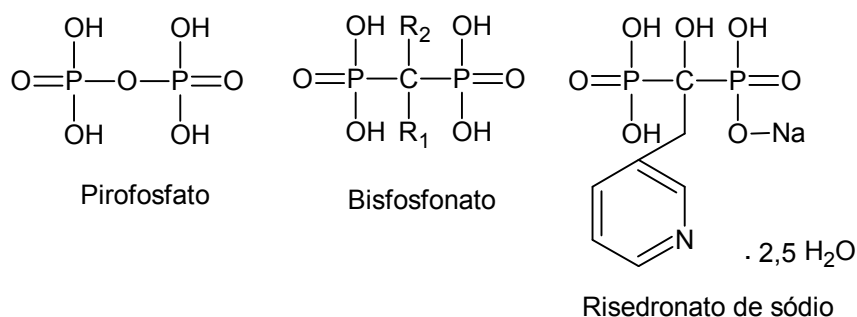


Figura 1. Estruturas químicas do pirofosfato e do risedronato de sódio e estrutura geral dos bisfosfonatos

Devido à analogia estrutural com o pirofosfato, os bisfosfonatos apresentam uma elevada afinidade pelo tecido ósseo. Uma vez incorporados ao osso, atuam inibindo a formação e agregação dos cristais de fosfato de cálcio e tornam mais lenta a dissolução destes (FLEISCH, 1991). Apesar destes efeitos físico-químicos, o principal mecanismo de ação dos bisfosfonatos ocorre em nível celular, pois atuam inibindo a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Estes fármacos induzem apoptose osteoclástica por efeitos citotóxicos (BAE; STEIN, 2004) e provocam mudanças na estrutura das proteínas destas células (BOONEN et al., 2004).

Ao contrário do que poderia se pensar o osso não é um tecido estático, mas está sujeito a um processo contínuo de degradação e renovação, chamado de remodelagem, que se estende por toda a vida. É preciso que as células osteoclásticas reabsorvam a matriz óssea para que um novo osso possa ser depositado pelos osteoblastos. Portanto, os bisfosfonatos são capazes de inibir a perda de massa óssea em distúrbios como a osteoporose, a doença de Paget e a hipercalcemia maligna (FLEISCH, 1991; CREMERS; PAPAPOULOS, 2011).

Os principais bisfosfonatos disponíveis para o uso clínico são o alendronato e o risedronato, os quais representam, respectivamente, a segunda e a terceira geração desta família de fármacos. Outros usados em menor proporção incluem o etidronato (primeiro bisfosfonato), pamidronato, clodronato, ibandronato e zoledronato (PÉREZ-LÓPEZ, 2004).

O risedronato de sódio (2-hidroxietilideno-2-(3-piridinila)-1,1-bisfosfonato sódico), fármaco abordado neste trabalho, é um sal monossódico hemipentahidratado derivado do ácido risedrônico, cujo peso molecular é 350 g/mol. Apresenta-se como um pó fino, branco ou quase branco, inodoro e cristalino. É solúvel em água e em soluções aquosas, mas praticamente insolúvel em solventes orgânicos (FORSLIND, 1994).

Em 1998, o FDA aprovou o uso do risedronato de sódio para o tratamento da doença de Paget. No mesmo ano, Warner Chilcott iniciou a comercialização do medicamento Actonel[®]. Dois anos mais tarde, este fármaco foi aprovado para prevenção e tratamento da osteoporose pós-menopausa e da osteoporose induzida por corticosteróides (CRANDALL, 2001). Atualmente, estão disponíveis no mercado brasileiro comprimidos de liberação imediata ou comprimidos revestidos nas doses de 5 mg, 35 mg ou 150 mg de risedronato de sódio para administração diária, semanal ou mensal, respectivamente (ANVISA, 2009).

Assim como os demais bisfosfonatos, a administração oral do risedronato de sódio tem sido associada à ocorrência de efeitos adversos no trato gastrointestinal superior, tais como esofagites, úlceras e pontos hemorrágicos na mucosa gástrica (KHOSLA et al., 2012). Apesar de bem tolerados em estudos clínicos, dados obtidos no período de farmacovigilância indicam uma considerável prevalência destes efeitos adversos para os bisfosfonatos (LANZA et al., 2000; LI; KENDLER, 2004). Ao contrário dos antiinflamatórios não-esteróides, a toxicidade na mucosa gastrointestinal causada pelos bisfosfonatos não está relacionada à inibição da síntese de prostaglandinas citoprotetoras. Alguns estudos indicam que o dano ao epitélio esofágico e gástrico é resultado de um efeito irritante tópico que ocorre em consequência da ruptura da camada de fosfolípidos que está aderida no muco protetor (ELLIOT et al., 1998; WALLACE et al., 1999). Outros trabalhos relatam que ocorre um dano oxidativo no tecido epitelial seguido por infiltração de neutrófilos (SENER et al., 2004).

Além dos efeitos adversos em comum, os bisfosfonatos também se assemelham quanto às propriedades farmacocinéticas. Estudos farmacocinéticos em voluntários saudáveis indicam que a absorção do risedronato de sódio é rápida (T_{max} ~1 hora) e é independente do local de administração no trato gastrointestinal (MITCHELL et al., 1998). A absorção do fármaco é independente da dose oral, no intervalo de 2,5 mg a 30 mg (MITCHELL et al., 2000). Apesar de serem usados oralmente, os bisfosfonatos apresentam uma biodisponibilidade baixa por esta via, menor do que 1%. No caso do risedronato de sódio, um estudo envolvendo 33 voluntários sadios determinou que apenas 0,6% do fármaco é absorvido após ingestão (MITCHELL et al., 2001). Após a administração, aproximadamente 50% da dose absorvida fica retida nos ossos, enquanto que o restante é excretado na urina sem metabolismo prévio após 72 horas. Uma vez incorporado ao tecido ósseo, a eliminação dos bisfosfonatos é prolongada, com meia-vida terminal de cerca de 10 anos. A baixa absorção destes fármacos pela via oral é atribuída à elevada hidrofília e carga, que impedem o transporte transcelular através da barreira epitelial. A pequena fração de fármaco que atinge a circulação sistêmica é absorvida por transporte paracelular (LIN, 1996; YATES; RODAN, 1998). Outro fator que afeta a absorção dos bisfosfonatos é a sua propriedade quelante, pois complexam com metais divalentes no lúmen do trato gastrointestinal, principalmente com o cálcio. Em consequência desta complexação, ocorre a precipitação do fármaco antes que este possa ser absorvido (LIN, 1996).

Apesar da farmacocinética desfavorável, os bisfosfonatos são os únicos fármacos que apresentam uma biodisponibilidade oral baixa e são empregados por esta via. As razões para isto se baseiam na elevada potência destes fármacos e na conveniência desta via na administração em tratamentos prolongados, como é o caso da osteoporose (LIN, 1996; YATES; RODAN, 1998).

Considerando as limitações associadas ao uso dos bisfosfonatos pela via oral, como os efeitos adversos e a baixa biodisponibilidade, recomenda-se a ingestão do comprimido 30 minutos antes do primeiro alimento, bebida, ou medicação do dia, somente com água para não afetar a biodisponibilidade. Além disso, após a ingestão do medicamento, a orientação é para que o paciente permaneça em posição ereta para minimizar o contato do comprimido com a mucosa do esôfago, local de maior incidência de lesões (LI; KENDLER, 2004).

2. Estratégias tecnológicas para o risedronato de sódio

Apesar da relevância clínica do risedronato de sódio, existem poucos estudos dedicados ao desenvolvimento de novas formulações para contornar as limitações apresentadas por este fármaco. Visando melhorar a biodisponibilidade e reduzir os efeitos adversos foram preparadas matrizes flutuantes a partir de Gelucire[®] 39/01 para liberação sustentada do risedronato de sódio. O Gelucire[®] 39/01 é um excipiente de origem semissintética, constituído por uma mistura de glicerídeos que apresenta ponto de fusão de 39 °C. *In vitro*, a formulação promoveu uma liberação sustentada do fármaco, que foi atribuída à elevada hidrofobicidade deste excipiente. *In vivo*, foi demonstrada por cintilografia uma gastrorretenção por 6 horas em voluntários humanos. Segundo os autores, estes resultados demonstram a potencialidade do sistema desenvolvido em diminuir a irritação do fármaco (CHAUAN et al., 2004).

Em outro estudo visando à administração oral do risedronato de sódio, adutos entre o bisfosfonato e partículas de dióxido de titânio foram preparados pela técnica de sol-gel objetivando o aumento da biodisponibilidade do fármaco. Adutos constituídos de nanopartículas de 50 nm agrupados em clusters de 2,5 µm contendo 7,2% de risedronato apresentaram estabilidade em pH ácido e liberação por 3 horas do fármaco em pH alcalino. Estudos *in vivo* mostraram níveis plasmáticos do risedronato durante 8 horas após administração oral em ratos, resultando em, aproximadamente, o dobro da absorção em relação ao fármaco livre (DISSETTE et al., 2010).

Polietrólitos nanoestruturados foram desenvolvidos pela complexação entre o risedronato de sódio com β-ciclodextrina ligada covalentemente a poli-*l*-lisina para liberação local do fármaco na prevenção de metástases ósseas. Os resultados mostraram uma elevada eficácia do carreador em vetorizar o fármaco diretamente para as células tumorais (DAUBINÉ et al., 2009).

Em outro trabalho objetivando o desenvolvimento de implantes, foram preparadas microesferas biodegradáveis de polilactídeo-co-glicolídeo (PLGA) pela técnica de emulsificação múltipla. Esta técnica foi utilizada tendo em vista a elevada hidrofília do risedronato de sódio, o que resulta em baixas eficiências de encapsulamento pelas técnicas usuais. Através de um estudo fatorial foram investigadas as seguintes influências sobre a eficiência de encapsulamento: tipo de PLGA (50:50 ou 75:25), quantidade de polímero (250 ou 500 mg), quantidade de fármaco (50 ou 100 mg) e proporção de fase aquosa interna (1:2 ou 1:5). Os resultados mostraram que uma elevada eficiência de encapsulamento (80%) foi

alcançada pela utilização de 500 mg de PLGA, 50 mg de fármaco e proporção de fase aquosa de 1:5. Apesar deste resultado promissor, o trabalho não demonstrou a performance *in vitro* e *in vivo* das formulações (NASR et al., 2011a).

Os mesmos autores do trabalho anterior prepararam formulações otimizadas de microesferas de PLGA contendo risedronato de sódio com base no estudo fatorial conduzido previamente e avaliaram seu potencial para liberação pulmonar do fármaco. Os resultados mostraram que a maioria das formulações preparadas exibiu elevada eficiência de encapsulamento, cinética de liberação sustentada por 15 dias e propriedades aerodinâmicas adequadas. Após administração intratraqueal em ratos, as micropartículas foram consideradas seguras, pois mostraram alto percentual de viabilidade para células Calu-3, bem como histologia normal do pulmão. Além disso, foi observada uma alta deposição do risedronato de sódio no tecido ósseo (NASR et al., 2011b).

Recentemente, Nam e colaboradores (2011 e 2012) estudaram a liberação transdérmica do risedronato de sódio no sentido de buscar uma via alternativa para administração deste fármaco. No primeiro trabalho, foram preparadas três soluções com *l*-arginina, *l*-lisina e dietilenotriamina para formação de par iônico com o bisfosfonato. Cada formulação continha 10% de polietilenoglicol. Os resultados mostraram que o fármaco apresentou uma penetração através da pele de camundongos sem pelo cerca de 36 vezes maior que a administração do fármaco sozinho. Além disso, dados *in vivo* indicaram que as formulações não são irritantes para a pele. No segundo trabalho, os autores estudaram a aplicação de uma solução de risedronato de sódio contendo 10% de polietilenoglicol na pele de camundongos fêmeos ovariectomizadas (modelo experimental de osteoporose). Análises por tomografia microcomputadorizada mostraram um aumento de 29% da densidade mineral nos fêmures dos animais após cinco semanas de tratamento em relação ao grupo controle.

3. Micropartículas poliméricas

3.1. Conceitos e aplicações

Micropartículas poliméricas são estruturas que apresentam tamanho entre 1 μm e 1000 μm e podem ser preparadas a partir de polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos. Sob o ponto de vista morfológico, micropartículas se diferenciam em dois tipos: microcápsulas, que podem ser definidas como sistemas reservatórios constituídos de um ou mais microdomínios sólidos ou líquidos; e microesferas, que são estruturas matriciais. A figura 2 ilustra as variações estruturais que as micropartículas podem apresentar. Nestes sistemas, o fármaco

pode estar molecularmente disperso em seu interior ou retido neste e/ou adsorvido na superfície das partículas (RAVI KUMAR, 2000; YANG; ALEXANDRIDIS, 2000; BIRNBAUM; BRANONN-PEPPAS, 2004).

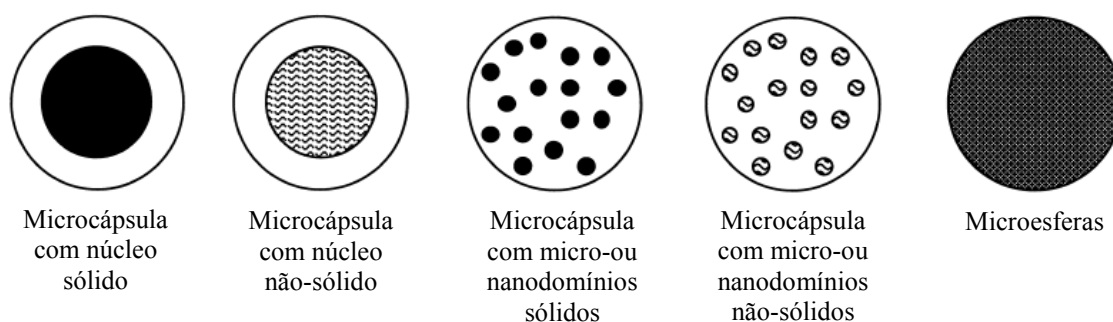


Figura 2. Variações estruturais das micropartículas (Adaptado de BIRNBAUM; BRANONN-PEPPAS, 2004).

No campo farmacêutico, as micropartículas poliméricas têm sido pesquisadas com o objetivo de contornar problemas apresentados pelas formas farmacêuticas convencionais. Os sistemas microparticulados permitem o fracionamento de dose e proporcionam uma distribuição mais uniforme e rápida do fármaco no trato gastrointestinal, além de uma menor variação na biodisponibilidade entre indivíduos (PALMIERI et al., 2000; FREIBERG; ZHU, 2004; KURKURI; AMINABHAVI, 2004). Em comparação aos sistemas revestidos convencionais, ou seja, aqueles em que há a deposição de um filme ao redor do núcleo, as micropartículas estão associadas a um menor risco de toxicidade devido à *dose dumping* (rompimento do sistema de liberação) (WASHINGTON, 1990; KURKURI et al., 2004; VARDE; PACK, 2004).

Com relação às aplicações específicas na área farmacêutica, as micropartículas têm sido desenvolvidas visando diversas finalidades. Dentre estas, sem dúvida, o controle da liberação do fármaco é a mais explorada. Neste contexto, o que se almeja é a manutenção de concentrações plasmáticas do fármaco relativamente constantes, o que requer liberação a uma velocidade constante. Por outro lado, alguns antibióticos e vacinas necessitam de uma liberação mais abrupta do fármaco em intervalos de tempo específicos (VARDE; PACK, 2004).

Os sistemas microparticulados podem ser planejados também visando um aumento da estabilidade da substância ativa. Neste sentido, alguns trabalhos relatam o desenvolvimento de micropartículas para prevenir a degradação química, enzimática ou imunológica do fármaco e, ainda, evitar interações com outros constituintes da formulação (ESPOSITO et al., 2002; DESAI; PARK, 2005; BILATI et al., 2005; CRUZ, 2006; COLOMÉ et al., 2007).

Dentre as vias de administração, a mais estudada para a aplicação das micropartículas é a oral. As micropartículas têm demonstrado suas potencialidades como carreadores de fármacos por esta via, uma vez que são capazes de aumentar a biodisponibilidade, diminuir a toxicidade gastrointestinal, além de serem úteis no transporte de antígenos para imunização (DESAI et al., 1996). Outras aplicações envolvem o desenvolvimento de sistemas microparticulados visando às vias de administração oftálmica, pulmonar, nasal e parenteral (ZIMMER; KREUTER, 1995; VARDE; PACK, 2004; ALPAR et al., 2005).

3.2. Preparação e caracterização com ênfase no processo de secagem por aspersão

Com relação aos métodos de preparação de micropartículas poliméricas, a literatura reporta uma grande variedade de técnicas, sendo as mais empregadas a polimerização interfacial, a emulsificação-difusão/evaporação de solvente, a extrusão polimérica, a secagem por aspersão e a coacervação ou precipitação (RAVI KUMAR, 2000; FREIBERG; ZHU, 2002; VARDE; PACK, 2004). Apesar de funcionarem por princípios diferentes, alguns requisitos devem ser atendidos por todos os métodos (JAIN et al., 1998; VARDE; PACK, 2004):

- Deve ser passível de transposição de escala para produção de micropartículas industrialmente com condições de limpeza e esterilidade adequadas;
- O rendimento do processo e a eficiência de encapsulamento do fármaco devem ser elevados;
- O perfil de liberação deve ser reprodutível;
- Deve proporcionar um controle de tamanho e uniformidade das micropartículas e produção de um pó de fluxo livre, que não exiba agregação ou aderência;
- Deve ser compatível com a substância a ser encapsulada, evitando condições como temperaturas extremas, presença de solventes orgânicos ou forças físicas que apresentem um impacto negativo na atividade do fármaco.

Apesar de vários métodos serem descritos para a preparação de micropartículas poliméricas, nem todos mostram boa capacidade para encapsular fármacos hidrofílicos, como é o caso do risedronato de sódio. Geralmente, as formulações apresentam baixas eficiências de encapsulamento e cinética de liberação rápida devido à grande afinidade do fármaco pelo meio aquoso (LEE et al., 2000; NARAHARISSETTI et al., 2005). Neste contexto, as técnicas de secagem por aspersão e evaporação de solvente têm sido empregadas para a preparação de

micropartículas poliméricas usando fármacos e polímeros tanto hidrofílicos, como hidrofóbicos (IWATA; McGINITY, 1993; BITTNER et al., 1998; ESPOSITO et al., 2002; CHAW et al., 2003).

Considerando que o foco do presente trabalho é a preparação de micropartículas pela técnica de secagem por aspersão, esta será abordada com maiores detalhes.

A secagem por aspersão (ou *spray-drying*) destaca-se por apresentar menor dependência da solubilidade da substância ativa do que outros métodos. Além disso, é uma técnica de fácil execução, apresenta um baixo custo em comparação a outras técnicas, não envolve a utilização de solventes orgânicos e é passível de transposição de escala (O'DONELL; McGINITY, 1997; PALMIERI et al., 2001; ONEDA; RÉ, 2003).

A técnica de secagem por aspersão consiste na passagem de uma solução ou suspensão contendo a substância ativa, por um orifício atomizador, para a câmara de secagem, onde um fluxo de ar quente promove a rápida secagem das gotículas. As partículas sólidas secas são, então, separadas e recolhidas e podem apresentar-se na forma de pós finos, granulados ou aglomerados (PALMIERI et al., 1994, 2001). A figura 3 apresenta um esquema do processo. A secagem por aspersão apresenta a vantagem de ser uma técnica rápida, onde a água é removida em uma só etapa. Pode ser aplicada a fármacos e polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos e materiais sensíveis ao calor, além de permitir um controle do tamanho de partícula (PALMIERI et al., 1994; ESPOSITO et al., 2002).

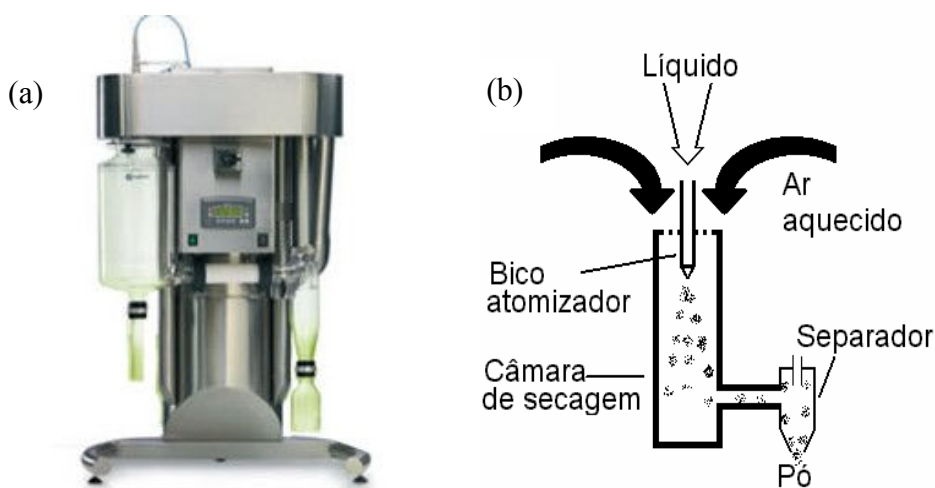


Figura 3. Foto de um spray-dryer (a) e esquema da secagem por aspersão (b).

Alterações nas condições operacionais de secagem ou até mesmo no *design* do equipamento influenciam as características do produto obtido. Desse modo, o tamanho de

partícula e distribuição granulométrica, porosidade, fluxo, umidade, estabilidade e aparência podem ser modificados e/ou controlados alterando-se os parâmetros do processo (BILLON et al., 1999; BARAS et al., 2000; HUNTINGTON, 2004).

Após a preparação, as micropartículas são geralmente caracterizadas sob os seguintes aspectos: rendimento do processo, eficiência de encapsulamento, teor de umidade, morfologia por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura ou microscopia confocal, tamanho de partícula e distribuição granulométrica e determinação da cinética de liberação (KRISTMUNDSDÓTTIR et al., 1996; PALMIERI et al., 2001; ESPOSITO et al., 2002; ONEDA; RÉ, 2003).

Na literatura, alguns estudos demonstram a incorporação de fármacos hidrofílicos em micropartículas poliméricas preparadas por secagem por aspersão. Em um destes, foi demonstrada a obtenção de micropartículas de Eudragit RS[®] contendo brometo de piridostigmina. Para tanto, dois métodos de preparação foram estudados: a solubilização e a dispersão do princípio ativo. Os resultados mostraram 36% de eficiência de encapsulamento para as micropartículas preparadas por dispersão e 100% para aquelas preparadas pela solubilização do fármaco. As cinéticas de liberação em água destilada, determinadas pelo método de incubação, apresentaram uma alta liberação inicial do fármaco, entre 65% e 70% para as duas formulações, sendo que a totalidade do fármaco foi liberada em 12 horas para a formulação preparada por dispersão, enquanto que quando o fármaco foi previamente solubilizado, este mostrou liberação de 100% em 3 horas. Segundo os autores, os resultados obtidos demonstram que é possível alterar a cinética de liberação de acordo com o método utilizado para incorporação do fármaco na formulação (HEGAZY et al., 2002).

Chaw e colaboradores (2003) preparam micropartículas de PLGA contendo fosfato dissódico de betametasona e compararam as técnicas de secagem por aspersão, evaporação de solvente por formação de emulsão A/O/A e A/O/O quanto à eficiência de encapsulamento do fármaco. Através do método de secagem por aspersão, aproximadamente 90% do fármaco foi encapsulado. Por outro lado, através da formação de uma emulsão múltipla A/O/A, a eficiência de encapsulamento não foi mais do que 15%. Quando foi utilizada uma dupla emulsão A/O/O, houve um aumento da eficiência de encapsulamento de 59% para 80%, dependendo da proporção de lactídeo e glicolídeo do polímero.

Em um estudo visando à obtenção de um sistema de liberação sustentada para a via nasal, foram preparadas e caracterizadas micropartículas de quitosana (CH) e de quitosana-poli (éter metil vinílico-co-anidrido maléico) (CH-PVM/MA) contendo cloridrato de propranolol. A taxa de encapsulamento foi próxima de 90% para ambas as formulações. As

análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram que as micropartículas de CH apresentaram uma superfície lisa, enquanto que as de CH-PVM/MA apresentaram-se mais rugosas. Os estudos de liberação *in vitro*, realizados em pH 5,5 e 7,4, demonstraram que as formulações proporcionaram uma liberação sustentada do fármaco. As micropartículas de CH liberaram 50% do fármaco em 6 horas, enquanto que para o mesmo período de tempo, 60% do propranolol foi liberado a partir da formulação de CH-PVM/MA (CERCHIARA et al., 2005).

Em outro trabalho visando liberação controlada, micropartículas de sílica contendo etidronato foram preparadas pela técnica de secagem por aspersão. As partículas incubadas em meio NaCl 0,9% apresentaram liberação do fármaco em 58 dias, demonstrando a capacidade da formulação em liberar lentamente o fármaco (CZURYSZKIEWICS et al., 2005).

Colomé e colaboradores (2007) desenvolveram micropartículas de Eudragit S100[®] (M1), Eudragit RS30D[®] (M3) e micropartículas constituídas da blenda Eudragit S100[®]/Eudragit RS30D[®] (M2) contendo pantoprazol pela técnica de secagem por aspersão. Apresentaram bom rendimento do processo, eficiência de encapsulamento de $100,7 \pm 1,7\%$, $99,5 \pm 2,1\%$, $93,0 \pm 2,4\%$ para M1, M2 e M3, respectivamente. O tamanho de partícula encontrado para as micropartículas foi adequado para a administração oral. Os estudos *in vitro* de gastrorresistência mostraram que as micropartículas M1 e M2 foram capazes de proteger o fármaco no meio gástrico simulado e estudos *in vivo* em ratos mostraram que as micropartículas preparadas protegeram eficazmente o estômago da formação de úlceras por etanol.

Micropartículas contendo pantoprazol foram preparadas pelo método de secagem por aspersão. Micropartículas contendo Eudragit S100[®] apresentaram bom rendimento, eficiência de encapsulamento e estabilização do fármaco em meio ácido. A mesma técnica também foi utilizada para a preparação de micropartículas a partir de uma blenda de Eudragit S100[®] e HPMC. As micropartículas produzidas apresentaram alta eficiência de encapsulamento e também reduziram a formação de úlceras gástricas por etanol em ratos. Com a conclusão do trabalho observou-se que as micropartículas aumentaram a estabilidade do fármaco em meio ácido e frente à luz, além de reduzir o tempo para atingir a concentração máxima do mesmo. (RAFFIN, et al. 2007a).

Micropartículas de Eudragit S100[®] e Methocel F4M[®], preparadas por secagem por aspersão, apresentaram uma alta eficiência de encapsulamento, cerca de 92% para o fármaco hidrofílico pantoprazol (RAFFIN et al., 2007b). A partir das micropartículas foram

preparados comprimidos usando estearato de magnésio como adjuvante. Os resultados mostraram que as formulações apresentaram boa gastrorresistência e liberação controlada do fármaco.

Em outro trabalho, o alendronato de sódio foi encapsulado utilizando uma blenda de Eudragit S100[®] e Methocel K15M[®], através da técnica de secagem por aspersão. As micropartículas obtidas foram caracterizadas em termos de morfologia, tamanho de partícula, eficiência de encapsulamento e cinética de liberação *in vitro*. Os resultados indicaram uma eficiência de encapsulamento próxima de 80% e os estudos *in vitro* demonstraram que, em pH 6,8, as micropartículas foram capazes de prolongar a liberação do alendronato por 12 horas. Desta forma, conclui-se que as micropartículas são excelentes carreadores para o alendronato de sódio, uma vez que foram capazes de manter o efeito do fármaco e reduzir a toxicidade gastrointestinal (CRUZ et al., 2010a). Comparando os resultados apresentados neste trabalho com os obtidos para as micropartículas preparadas com blendas de Eudragit S100[®] e Methocel K100[®] ou Methocel F4M[®] (CRUZ et al., 2009) é importante ressaltar que as micropartículas preparadas com Methocel K15M[®] apresentaram um controle de liberação do alendronato por até 12 horas, enquanto as formulações acima citadas liberaram o fármaco em 9 horas. Este fato pode ser explicado considerando que a taxa de liberação do fármaco a partir de sistemas contendo HPMC diminui com o aumento da viscosidade do polímero (LI et al., 2005; SIEPMANN; PEPPAS, 2001).

Já em outro experimento, o fármaco alendronato de sódio foi microencapsulado em blendas de Eudragit S100[®] e Methocel F4M[®] ou Methocel K100LV[®]. Ambas as formulações foram preparadas pelo método de secagem por aspersão e apresentaram eficiência de encapsulamento de 85 e 82%, respectivamente. Estudos de dissolução *in vitro*, demonstraram boa gastroresistência das formulações em pH 1,2. Em pH 6,8, a liberação do fármaco a partir das micropartículas foi retardada. Como conclusão, este estudo demonstrou que ambas as formulações foram capazes de conferir gastrorresistência e controle da liberação das micropartículas contendo alendronato de sódio. Além disso, a técnica de secagem por aspersão possibilitou uma alta eficiência de encapsulamento para o fármaco hidrofílico. Também se observou que a preparação das micropartículas com dois tipos de HPMC (Methocel F4M[®] e Methocel K100[®]) não influenciou as cinéticas de liberação do fármaco (CRUZ et al., 2009).

Em outro trabalho, visando avaliar a gastroresistência de micropartículas de alendronato de sódio, foram preparadas micropartículas usando Eudragit S100[®] ou uma blenda de Eudragit S100[®]/Methocel E4M[®], através da técnica de secagem por aspersão.

Verificou-se que ambas as formulações apresentaram altas eficiências (80%-100%) de encapsulamento e adequada gastroresistência. Os resultados demonstraram que ambas as formulações garantiram um efeito de proteção gástrica contra a lesão da mucosa induzida pelo alendronato após sua administração oral. Além disso, as formulações retardaram a liberação do fármaco, sendo que as micropartículas preparadas com HPMC tiveram uma liberação mais lenta em comparação com as formulações preparadas exclusivamente com Eudragit S100[®]. Observou-se também que a natureza multiparticulada das formulações também contribuiu para minimizar os efeitos colaterais, uma vez que impedem uma alta concentração local do fármaco (CRUZ, et al., 2010b).

3.3. Comprimidos obtidos a partir de sistemas microparticulados

A via oral é a via amplamente empregada na administração de fármacos por ser conveniente ao paciente, de fácil aplicação e por não precisar de profissional capacitado para a aplicação. Os fármacos podem ser administrados através de diferentes formas farmacêuticas por esta via, sendo os mais populares, os comprimidos, as cápsulas, as suspensões e as soluções. Os comprimidos são utilizados desde o final do século XIX e sua popularidade persiste até hoje. É provável que 90% de todos os fármacos usados na terapia por ação sistêmica sejam administrados pela via oral (ANSEL, 2000; LACHMAN, 2001).

Sistemas capazes de controlar a liberação oral do fármaco, tais como comprimidos microparticulados, tem-se tornado relevante devido às vantagens frente aos sistemas convencionais. Uma vez que comprimidos microparticulados são capazes de distribuir uniformemente o fármaco no trato gastrintestinal, melhoram a reprodutibilidade durante a absorção, além de evitar a liberação prematura do fármaco e consequentemente os riscos de toxicidade através de altas concentrações locais do fármaco (CHOURASIA, 2004). Comprimidos microparticulados são capazes de controlar a liberação do fármaco, uma vez que as partículas mantêm-se intactas durante o processo de compressão e não sofrem ruptura ou fusão (LIU, 2003; DESAI, 2007; SHIDHAYE, 2008).

Deste modo, Desai (2007) desenvolveu comprimidos microparticulados a partir do amido de milho e da pectina contendo diclofenaco de sódio pela técnica de secagem por aspersão. O diâmetro médio obtido das micropartículas variou entre 5,8 µm e 7,3 µm. As micropartículas foram comprimidas por compressão direta da mistura utilizando excipientes adequados. Os comprimidos em cortes transversais foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura e verificou-se o formato esférico característico das micropartículas, enquanto

que os estudos de liberação *in vitro* indicaram que o sistema mostrou-se adequado para a liberação do diclofenaco de sódio no trato gastrointestinal. Através da modelagem matemática, pode-se verificar que a liberação do fármaco ocorreu por difusão Fickiana.

Malik e colaboradores (2011) prepararam comprimidos a partir de microesferas de Eudragit E100[®] contendo ofloxacino pela técnica de evaporação do solvente. As micropartículas apresentaram eficiência de encapsulamento entre $69,54 \pm 1,98\%$ e $86,52 \pm 2,25\%$. Através de análises de DSC não foi verificada interação entre o fármaco e o polímero. Os comprimidos foram avaliados quanto à espessura, diâmetro médio de tamanho, dureza e friabilidade. Pelos estudos da cinética de liberação verificaram que cerca de 97,25% do ofloxacino foi liberado dentro de 2 h e, além disso tais formulações podem ser preparadas com goma de alfarroba como um natural superdesintegrante.

Mundargi e colaboradores (2007) prepararam comprimidos microparticulados a partir de microesferas contendo ampicilina pela técnica de emulsificação (A/O). Verificaram uma eficiência de encapsulamento de 70%. Os resultados indicaram dispersão molecular do fármaco nas microesferas. A microscopia eletrônica de varredura confirmou a forma esférica e a superfície lisa das microesferas, que apresentaram diâmetro médio de 96 μm e 158 μm . Estudos de liberação *in vitro* indicaram a importância da proporção do polímero na mistura e a extensão da reticulação. A seguir, estas foram comprimidas por compressão direta e através da microscopia eletrônica de varredura, de cortes transversais dos comprimidos, pôde-se observar discretas microesferas, sugerindo que o sistema foi adequado. Também foi observado o efeito *burst*, comprovando a efetividade da liberação da ampicilina em 24 h.

Patel e colaboradores (2011) investigaram microesferas a partir de goma guar contendo cloridrato de mebeverina preparadas e caracterizadas para liberação no cólon. Estudos *in vitro* descreveram liberação prematura do fármaco no estômago e no intestino delgado. Como revestimento entérico das microesferas é difícil, estas foram comprimidas. Estudos de liberação e as características morfológicas da microesferas revelaram que em comprimidos as microesferas mantiveram-se intactas durante o processo de compressão, enquanto que nos estudos *in vivo* em coelhos o sistema permaneceu intacto até atingir a parte inferior do trato gastrointestinal, onde as microesferas foram dispersas entericamente, revelando o potencial do sistema desenvolvido para a liberação colônica.

Sheshala e colaboradores (2011) mascararam o sabor amargo do succinato de sumatriptano em comprimidos de desintegração (ODTs) do fármaco. A dissimulação do sabor foi realizada por revestimento do succinato de sumatriptano com Eudragit EPO[®] utilizando a técnica de secagem por aspersão. As microesferas resultantes foram avaliadas quanto ao

rendimento, tamanho de partícula, eficiência de encapsulamento e liberação *in vitro*. Os comprimidos foram formulados misturando as microesferas com diferentes tipos e concentrações de desintegrantes por compressão direta. Os comprimidos foram avaliados quanto à variação de peso, espessura, dureza, friabilidade, teor de fármaco, teor de umidade e tempo de desintegração. Todas as formulações de comprimidos desintegraram entre 37 s a 410 s. A formulação otimizada contendo Kollidon 5% liberou mais do que 90% do fármaco dentro de 15 min e a liberação foi comparável à do produto comercial (Suminat[®]). Em voluntários humanos, a formulação foi otimizada para ter um sabor e sensação na boca agradáveis, desintegrando-se na cavidade bucal dentro de 41s. Logo, a formulação otimizada foi bioequivalentes ao Suminat[®].

Do mesmo modo, Shidhaye e colaboradores (2008) avaliaram o potencial das microesferas em dissimular o sabor da teofilina quando incorporadas em comprimidos. As microesferas foram produzidas pelo método de emulsificação e evaporação do solvente usando um polímero dissimulador do sabor, o Eudragit E100[®]. O método de evaporação do solvente foi otimizado para se obter microesferas com características desejáveis. As microesferas foram misturadas com outros excipientes para que a desintegração oral dos comprimidos ocorresse. As microesferas foram melhor formadas com acetona em 40 ml de parafina líquida a 1600 rpm de velocidade de agitação durante 90 min. O rendimento foi de $85 \pm 2\%$, o tamanho das partículas foi de $315 \pm 10.84 \mu\text{m}$ e os resultados do ensaio mostraram eficiência de encapsulamento de $93.77 \pm 0.53\%$. Os comprimidos formados mostraram dureza de $3 \pm 0.5 \text{ kg/cm}^2$ e desintegração *in vitro* de $25 \pm 3 \text{ s}$. A liberação do fármaco *in vitro* foi de $88 \pm 4\%$ no final de 30 min. Em conclusão, as microsferas mostraram-se eficazes em mascarar o sabor amargo do fármaco em combinação com a desintegração oral dos comprimidos.

CAPÍTULO 1: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100[®] contendo risedronato de sódio

CAPÍTULO 1: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100[®] contendo risedronato de sódio.

1.1. Apresentação

Um dos fatores que norteiam o delineamento de uma forma farmacêutica de liberação modificada é a seleção das matérias-primas que a comporão, a fim de que esta apresente a performance requerida. No caso de formulações gastrorresistentes, o polímero selecionado deve ser insolúvel em pH ácido, mas permitir a liberação do fármaco em pH intestinal. Dentre os polímeros mais utilizados para esta finalidade, destaca-se o Eudragit S100[®] (Figura 1), um copolímero do ácido metacrílico e metacrilato de metila insolúvel em meio ácido, mas solúvel em pH próximo da neutralidade. A dissolução ocorre como resultado da ionização dos grupos carboxílicos que apresentam pKa próximo de 6.0 (ROWE et al., 2009). Segundo El-Kamel e colaboradores (2001), em pH ácido, micropartículas preparadas com Eudragit S100[®] possuem baixa permeabilidade devido às ligações de hidrogênio entre as hidroxilas dos grupos carboxílicos e o oxigênio da carbonila dos grupamentos éster, o que minimiza a liberação do princípio ativo neste meio. Devido a estas características, o Eudragit S100[®] foi selecionado para a preparação de micropartículas de risedronato de sódio.

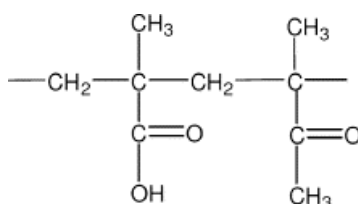


Figura 1 - Estrutura química do Eudragit S100[®]. A proporção dos grupos carboxílicos para os grupos ésteres é de aproximadamente 1:2.

Sistemas multiparticulados são alternativas interessantes para veiculação de fármacos associados a complicações no trato gastrointestinal, pois estão associados a menor irritação da mucosa gastrointestinal. As formas farmacêuticas convencionais podem se alojar nas depressões do trato gastrointestinal, causando danos à mucosa. Por outro lado, isso não ocorre com sistemas multiparticulados devido ao seu tamanho reduzido e distribuição mais uniforme pelo trato gastrointestinal (ZERBINI; FERRAZ, 2011). Além disso, estes sistemas oferecem menor risco de *dose dumping*, ou seja, liberação prematura do fármaco por falhas no

revestimento (DEY et al., 2008). Na literatura científica, há vários relatos de preparação de micropartículas visando à redução da toxicidade de fármacos no trato gastrointestinal (CASTELLI et al., 1998; PALMIERI et al., 2000; LUPPI et al., 2009; CRUZ et al., 2010; CRUZ et al., 2011).

Diante do exposto, o primeiro capítulo desta dissertação versa sobre a preparação inédita de micropartículas de Eudragit S100[®] contendo risedronato de sódio, bem como formulação de comprimidos obtidos pela compressão direta destas micropartículas. Os resultados desta parte da dissertação estão apresentados na forma de artigo que será submetido ao periódico *Pharmaceutical Development and Technology*.

PUBLICAÇÃO 1: Risedronate-loaded Eudragit S100[®] Microparticles
Formulated into Tablets

Artigo submetido para publicação no periódico Pharmaceutical Development and technology.

Risedronate-loaded Eudragit S100[®] microparticles formulated into tablets

Aline A. Velasquez,¹ Juliane Mattiazzi,¹ Luana M. Ferreira,¹ Lauren Pohlmann,¹ Cristiane B. Silva,¹ Clarice M. B. Rolim,¹ Letícia Cruz^{1*}

¹Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

Abstract

Risedronate, an anti-osteoporotic drug, is associated with low patient compliance due to the upper gastrointestinal side-effects and stringent dosing regimes. This study aimed to prepare and characterize risedronate-loaded Eudragit[®] S100 microparticles and develop a final dosage form by the compression of microparticles using direct tableting excipients. Microparticles were prepared by spray-drying and presented yield of 54%, encapsulation efficiency higher than 90%, mean diameter of 3.3 μm , moisture content around 8% and exhibited spherical shape and poor flowability. At pH 1.2, 23% of risedronate was released in 120 min, while at pH 6.8 the drug took 90 min to reach 99.5%. Microparticles were compressed into tablets using microcrystalline cellulose, magnesium stearate, colloidal silicon dioxide and 2 polyvinylpyrrolidone concentrations (5 and 15%). Tablets presented low variations in weight, thickness and drug content. Besides, the formulations showed sufficient hardness, low friability and disintegrated in less than 15 minutes. In acid medium, no more than 16% of the drug was released in 120 min, while in intestinal medium the formulations prolonged the risedronate release for 240 min. Finally, the developed tableted microparticles can be considered a promising dosage form for oral risedronate administration.

Keywords: bisphosphonate; spray-drying; controlled release; oral delivery.

Introduction

Osteoporosis is a widespread skeletal disorder characterized by low bone mass and increased fragility (1,2). Because of the high prevalence of fractures, osteoporosis is considered as a global public health problem (3). Among the pharmacological agents available for the treatment of osteoporosis, bisphosphonates are the most prescribed drugs due to their potent antiresorptive activity (2). Risedronate is a third-generation bisphosphonate licensed for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis by oral route (4,5). In clinical trials, tablets of risedronate decreased the risk of vertebral and nonvertebral fractures proving that the drug can be considered an appropriate therapy for the management of osteoporosis (6-8).

Even though risedronate being one of the most prescribed drugs in the treatment of osteoporosis, its oral administration presents some drawbacks. Like all of bisphosphonates, risedronate is poorly absorbed orally (less than 1%) owing to its hydrophilicity and polarity. Foods and beverages other than water reduce its bioavailability (9). Moreover, bisphosphonates have been associated with esophagitis, gastritis, esophageal ulcerations and gastroduodenal ulcerations (10,11). In order to ensure adequate absorption and minimize the risk of gastrointestinal irritation is recommended to take the tablet at least 30 minutes before the first food, drink or medication of the day. The tablet must be swallowed whole with a glass of plain water while the patient is in an upright position. In addition, patients should not lie down for 30 minutes after taking the tablet (12). To follow such stringent dosing instructions is inconvenient, which can lead to poor patient adherence. Regarding the literature, about 50% of patients leave the bisphosphonate therapy within 1 year, resulting in a reduced antifracture effect (13). Thus, it is relevant to develop an alternative formulation for risedronate oral administration.

Over the last years, polymeric microparticles have been shown to be a promising approach to reduce drug toxicity in the gastrointestinal tract (14-17). In this context, enteric polymers are promising materials to protect gastric mucosa from drug irritation. Among the polymers employed for this purpose, Eudragit[®] S100 is one of the most used. It is a pH-dependent copolymer derived from methacrylic acid and methyl methacrylate that dissolves at pH 7.0 and, therefore, provides protection against stomach environment and enables controlled release in the intestine (18). So, the preparation of Eudragit[®] S100 microparticles could be an interesting alternative for risedronate oral administration. However, microparticles are rarely used directly in powder form, thus requiring the development of a final formulation.

Considering the solid dosage forms, tablets are the most popular due to their ease of manufacture, convenience of dosing, stability and release mechanism (19). In addition, a tablet made of multiple units presents advantages in relation to a single-unit preparation such as more uniform spread out in the gastrointestinal tract, reduced local irritation, more reproducible drug absorption and less variability among individuals (20,21).

With the aim to obtain a safer formulation for risedronate oral administration, the present study was designed to prepare and characterize Eudragit[®] S100 microparticles containing risedronate, as well as to develop a final dosage form by the compression of microparticles into tablets using direct tableting excipients such as microcrystalline cellulose, polyvinylpyrrolidone, magnesium stearate and colloidal silicon dioxide. As far as we know, there is no report on the preparation of microparticulate systems containing risedronate intended for its oral administration.

Materials and Methods

Materials

Sodium risedronate was obtained from Pharma Nostra (Rio de Janeiro, Brazil). Eudragit[®] S100 [Poly (methacrylic acid-co-methyl methacrylate) 1:2] and colloidal silicon dioxide (Aerosil[®] 200) were kindly donated by Almapal (São Paulo, Brazil). Microcrystalline cellulose (Avicel[®] PH101) was purchased from FMC Corporation (Philadelphia, USA) and polyvinylpyrrolidone (Kollidon[®] 30) was provided by Delaware (Porto Alegre, Brazil). Stearate magnesium was acquired from Henrifarma (São Paulo, Brazil). All other chemicals and solvents were of pharmaceutical grade and used as received.

Preparation of risedronate-loaded microparticles

Microparticles of Eudragit[®] S100 were prepared by spray-drying technique. Briefly, Eudragit[®] S100 (8.0 g) was dissolved in 500 mL of 0.05 mol/L NaOH under magnetic stirring at 50°C. Then, risedronate (2.0 g) was added in the solution before spray-drying (MSD 1.0, LabMaq, Brazil). For comparison, a formulation was prepared without drug (placebo). The following operational conditions were previously optimized: feed rate of 0.33 L/h, air flow rate of 70 NL/h, atomizing air pressure of 3.0 Kgf/cm², inlet temperature of 150°C and nozzle diameter of 1.2 mm.

Characterization of microparticles

The spray-drying yield was calculated by the ratio of experimental mass of powder and the total mass of all components, discounting the water content, multiplied by 100. The encapsulation efficiency and drug loading were determined by weighing an exact amount of microparticles equivalent to 5 mg of risedronate and dissolving it in 50 mL of 0.05 mol/L

NaOH. After sonication for 20 min, the sample was filtered through a quantitative filter-paper Unifil C41. Then, 10 mL of the filtrate were transferred to another 50 mL volumetric flask and the volume was completed with water. Risedronate concentrations were determined by a spectrophotometric method at 262 nm. Linear calibration curves were obtained in the range of 5.00 to 60.00 $\mu\text{g/mL}$ with correlation coefficient of 0.9992. Inter- and intra-day variability did not exceed 3% and accuracy was $100.01 \pm 2.81\%$. The encapsulation efficiency was calculated based on the relation of the theoretical and the experimental risedronate concentrations, and expressed as percentage. In its turn, drug loading was calculated by dividing the mass of drug in microparticles by the mass of microparticles, multiplied by 100. Each formulation was assayed in triplicate.

Particle sizes were determined by laser diffraction using dry disperser mode at dispersing pressure of 1 bar (Malvern Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK). The particle sizes were expressed as the mean diameter over the volume distribution, $d_{4,3}$, and the size distributions (*Span*) were calculated using equation 1:

$$Span = \frac{d_{(0.9)} - d_{(0.1)}}{d_{(0.5)}} \quad (1)$$

where $d_{(0.1)}$, $d_{(0.5)}$, and $d_{(0.9)}$ are, respectively, the particle diameters at 10%, 50%, and 90% of the undersized particle distribution curve.

The morphology of microparticles was observed by scanning electron microscopy (SEM). The samples were previously gold sputtered on a Desk II Cold Sputter (Denton Vacuum, USA) and subsequently analyzed using an accelerating voltage of 15 kV (Scanning microscope JSM-6360, Jeol, Japan).

Moisture content of spray-dried powders (2 g) was assayed using an infrared drying equipment IV 2500 (Gehaka, Brazil) kept at 115°C until constant weight. Bulk density (ρ_b) was determined by transferring 2.0 g microparticles to 25 mL graduated cylinder. The powder volume was determined and then the bulk density was calculated. The sample contained in the

measuring cylinder was tapped 1250 times using a tapped density tester PT-TD (Pharma Test, Germany) to obtain the tapped density (ρ_t). The powders flowability was inferred by calculating Carr index (CI) and Hausner ratio (H). Both parameters were determined from the values of the bulk and tapped densities results according equations to 2 and 3:

$$CI = \frac{\rho_t - \rho_b}{\rho_t} \times 100 \quad (2)$$

$$H = \frac{\rho_t}{\rho_b} \quad (3)$$

The *in vitro* drug release experiments were performed in a dissolution apparatus PTW II (Pharma Test, Brazil) at 37°C, using the method of baskets at a rotation speed of 100 rpm. Aiming at evaluating the gastroresistance, a portion of microparticles corresponding to 25 mg risedronate was poured into a vessel containing 900 mL of 0.1 mol/L HCl (pH 1.2). Aliquots of the dissolution medium (5 mL) were collected every 30 min up to 120 min and the same volume of the medium was replaced to keep a constant volume in the vessel. The samples were analyzed spectrophotometrically at 262 nm. To evaluate the drug dissolution in a simulated intestinal fluid (without enzymes), microparticles were poured in 900 mL phosphate buffer pH 6.8. Under these conditions, the samples were collected (5 mL) at predetermined times (10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 and 270 min) and the volume was subsequently replaced. The amount of risedronate released was assayed spectrophotometrically ($\lambda=262$ nm). The dissolution of the pure drug was also determined in both mediums for comparison. All the profiles were obtained in triplicate.

The release profiles of risedronate from microparticles were analyzed by fitting experimental data to monoexponential (4), biexponential (5) equations and to Korsmeyer-Peppas model (Power law) (6):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - [e^{-k.t}] \quad (4)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - [A.e^{-\alpha.t} + B.e^{-\beta.t}] \quad (5)$$

where M_t is the amount of the drug released at time t , M_∞ is the initial concentration of the drug, k , α and β are the apparent release kinetic rate constants, and A and B are the fractions of the drug that released in each phase of the exponential function (22).

$$ft = \frac{M_t}{M_\infty} = a.t^n \quad (6)$$

where ft is the ratio of absolute cumulative amount of the drug released at time t and at infinite time, a is a constant incorporating structural and geometric characteristic of the carrier, and n is the release exponent, indicative of the mechanism of the drug release (23).

The fitting program Scientist 2.0 (Micromath, USA) was used in all the cases.

Preparation of tablets containing microparticles

Tablets containing microparticles were prepared by direct compression method. Initially, an amount of microparticles (147 mg) corresponding to 25 mg of risedronate was mixed with polyvinylpyrrolidone (dry binder), microcrystalline cellulose (diluent), magnesium stearate (lubricant) and colloidal silicon dioxide (glidant) in a glass mortar by geometric dilution. Then, an exact amount of the powder mixture was compressed (arbitrary pressure of 5 on the load scale) in a single punch machine (Korsch, Germany) to form flat faced tablets of diameter 10 mm and thickness 3 mm. The influence of the binder on the characteristics of the tablets was investigated by using 5.0 and 15.0% of polyvinylpyrrolidone in the formulation. The proportion of diluent in each formulation varied to achieve 200 mg of tablet weight. The composition of the tablets is shown in Table 1.

Table 1 - Percent composition of tablets containing microparticles

Component	Tablets	
	T1	T2
Microparticles (%)	14.5	14.5
Polyvinylpyrrolidone (%)	5.00	15.00
Microcrystalline cellulose (%)	79.25	69.25
Magnesium stearate (%)	0.75	0.75
Colloidal silicon dioxide (%)	0.50	0.50

Characterization of the tablets

After preparation, 10 tablets were weighed individually in an analytical balance AY220 (Shimadzu, Japan) to determine the weight variation of tablets. Thickness variation was evaluated using a manual caliper ($n=10$). The mean hardness of 10 tablets was assessed using a portable hardness tester (Off Tec Galileo, Brazil). To test the uniformity of content, the tablets were individually pulverized in a glass mortar and the fine powder was subsequently dissolved in 50 mL of 0.05 mol/L NaOH in a volumetric flask. After sonication for 30 min, the sample was filtered through a quantitative filter-paper, and 10 mL of the filtrate were transferred to another 50 mL volumetric flask with water. Then, the absorbance was measured at 262 nm. Determinations were made in triplicate. Disintegration test was carried out in simulated intestinal fluid maintained at 37°C using a USP disintegration tester (Ética, Brazil). For the determination of friability, 10 tablets were accurately weighed (W_0) and subjected to 100 rotations in a friabilator (Ética, Brazil) for 5 minutes and then the tablets were reweighed (W). The friability, F , was calculated according to equation 7:

$$F = 100 \frac{(1 - W_0)}{W} \quad (7)$$

In vitro release tests and mathematical modeling of the experimental data obtained for tablet formulations were performed as the same way described above for microparticles.

Statistical analysis

The data were analyzed by Student's t-test, one-way and two-way ANOVA. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results and discussion

Preparation and characterization of microparticles

The spray-drying process conducted at 150°C produced microparticles of Eudragit® S100 presenting a yield of 39.12±0.05%. However, it was interesting to note that the presence of the drug in the feed solution increased the yield to 54.30±0.02%. According to the literature, microparticles obtained by spray-drying technique usually present yield between 30 and 50% at laboratory scale (24,25). Powder loss may be due to the adhesion of sprayed droplets to the walls of the drying chamber and the poor efficiency of cyclone in collecting fine particles (24,26).

Concerning the encapsulation efficiency, risedronate-loaded microparticles presented a high value of 93.82±4.15%, corresponding to a drug loading of 169.82±7.53 mg/g. According to the literature, the spray-drying technique is considered efficient to encapsulate hydrophilic drugs (24,27,28) as risedronate.

Placebo and drug-loaded microparticles presented mean diameter ($d_{4.3}$) of 3.7 and 3.3 µm and *Span* of 1.2 and 1.1, respectively. The presence of risedronate did not influence this parameter since the difference was not significant ($p > 0.05$).

In contrast to other works that reported a collapsed shape for Eudragit® S100 microparticles (17,29), we observed that risedronate-loaded microparticles were nearly spherical in shape and had a smooth surface (Figure 1).

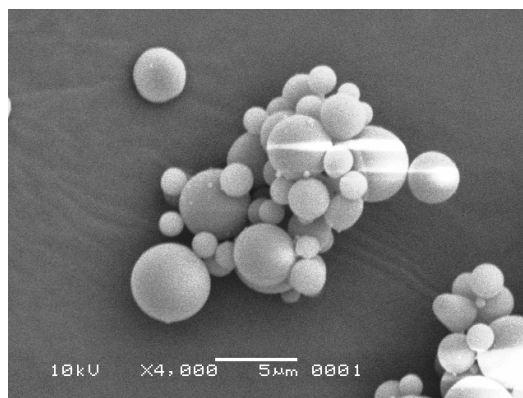


Figure 1 - SEM photomicrograph of risedronate-loaded microparticles.

Placebo and drug-loaded microparticles exhibited moisture content of $6.60 \pm 0.03\%$ and $8.31 \pm 0.02\%$, respectively. Concerning the evaluation of powder densities and flowability (Table 2), the presence of risedronate decreased the values of bulk and tapped densities. Both powders showed high values of Carr index and Hausner ratio, which indicate poor flowability. This result could be explained by the reduced size of the microparticles, as well as by their cohesive properties. As consequence, it is necessary selecting excipients with good flow properties to prepare tablets from these microparticles.

Table 2 - Densities and powder flow properties of the microparticles.

	P-MP*	SR-MP**
Bulk density (g/cm^3)	0.32 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Tapped density (g/cm^3)	0.49 ± 0.02	0.39 ± 0.03
Carr index (%)	35 ± 3	30 ± 3
Hausner ratio (%)	1.58 ± 0.07	1.43 ± 0.07

*P-MP: placebo microparticles; **SR-MP: risedronate-loaded microparticles

Regarding the gastroresistance evaluation, absolute protection against acidic environment could not be achieved as 23% of risedronate was released from Eudragit[®] S100 microparticles in 0.1 mol/L HCl (pH 1.2) in 2 h (Figure 2). This result can be related to the portion of the drug which is more externally located in the microparticles or to the leaching of the drug from the microparticles.

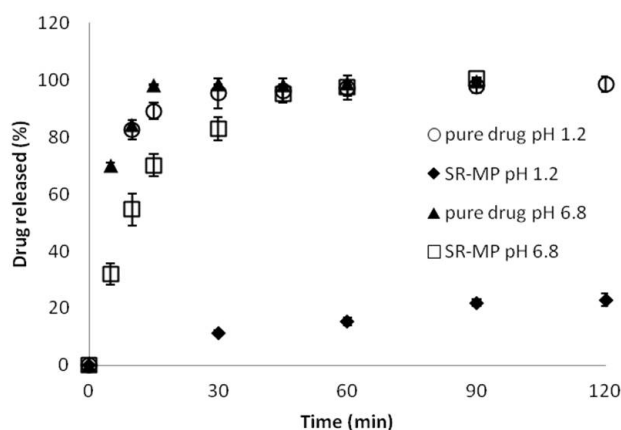


Figure 2 - In vitro release profiles of pure risedronate and risedronate-loaded microparticles (SR-MP) in 0.1 mol/L HCl pH 1.2 and phosphate buffer solution pH 6.8.

Drug dissolution study at pH 6.8 showed that 98% of pure risedronate was released in 15 min, which is due to its hydrophilicity. On the other hand, the release of the drug from microparticles was 99% in 90 min (Figure 2). Regarding the literature, other water soluble drugs showed different times of release from Eudragit[®] S100 microparticles. In the case of alendronate, 95.6% of the drug was released in 150 min at pH 6.8 (17), while pantoprazole took 40 min to reach 93.5% at pH 7.4 (29).

In order to understand the behavior of the drug release, the mathematical modeling of the experimental data was performed using Eqs. 4 and 5. Comparing the values of correlation coefficient and MSC (Table 3), the data showed a better adjustment to monoexponential equation. The apparent rate constant was $0.0746 \pm 0.0015 \text{ min}^{-1}$, corresponding to a half-life of approximately 9 min.

Table 3 - Parameters derived from the mathematical modeling of risedronate release profile from microparticles

Models/Parameters	
Monoexponential	
k (min ⁻¹)	0.0746±0.0015
R	0.9987±0.0010
MSC	4.6292±0.0008
Biexponential	
α (min ⁻¹)	0.1914±0.0011
β (min ⁻¹)	0.0516±0.0008
A	0.3439±0.0010
B	0.6565±0.0013
R	0.9901±0.0009
MSC	3.9819±0.0010
Power law	
A	0.3434±0.0012
N	0.2500±0.0011
R	0.9910±0.0014

The experimental data were also analyzed by the Power law (Eq. 6) with the aim to elucidate the drug release mechanism. The release exponent n presented value of 0.2500±0.0011 (Table 3). According to Peppas (30), for a drug delivery system presenting spherical geometry, n value around 0.43 is an indicative of diffusion-controlled drug release, while value of n about 0.85 is related to swelling-controlled drug release. n values between 0.43 and 0.85 mean that the release is due to an anomalous transport (superposition of both mechanisms). So, the risedronate release is mainly governed by its diffusion outside the particle due to the high drug affinity for the aqueous phase.

Preparation and characterization of tablets containing microparticles

Risedronate-loaded microparticles were tableted using microcrystalline cellulose as a directly compressible diluent. This excipient is one of the most useful fillers for direct compression due to its plastic behavior upon compression and disintegration properties (19). In a pilot study, microparticles were compressed into tablets using only the filler, but a great weight variation and low hardness were seen (data not shown). Probably, the poor flowability of the powder mixture was responsible for the variation in tablet weight. In addition, the low hardness was due to the absence of binder in the formulation. Hence, in order to produce tableted microparticles with good properties, magnesium stearate and colloidal silicon dioxide were added in the formulation to improve the flowability. Polyvinylpyrrolidone was chosen to impart sufficient hardness to the tablets. Regarding the literature, the concentration of polyvinylpyrrolidone varies considerably, being usually more than 2% (31). For this reason, 2 levels of concentration of the dry binder were tested and the formulations were compared with each other. After preparation, the tablets were characterized in terms of average weight, thickness, hardness, friability, uniformity of content and disintegration time (Table 4).

Table 4 - Properties of tablets containing risedronate-loaded microparticles

	T1	T2
Average weight (mg)	198±6	197±5
Thickness (mm)	0.3±0.0	0.3±0.0
Hardness (Kgf)	9.70±0.48	11.90±0.21
Uniformity of content (%)	101.71±3.13	100.76±4.68
Friability (%)	0.2±0.1	0.3±0.5
Disintegration time (min)	14.31±4.60	12.50±4.80

Variations in tablet weight, thickness and drug content were low, which indicated a consistent compression process. Comparing both tablet formulations, there were no significant differences in average weight and uniformity of content ($p>0.05$). In relation to the loss of mass during friability evaluation, the values found were lower than 0.5% for both

formulations. The differences among the groups were not significant ($p>0.05$). Regarding tablet hardness, which is considered as the force required to break the tablet in a diametric compression test, both formulations showed sufficient hardness, being greater than 9.70 Kgf. In addition, the results showed that as the polyvinylpyrrolidone concentration increases, crushing strength values also increases ($p<0.05$). Disintegration test showed that both tablets disintegrated in less than 15 min. Although the results show a tendency of decrease of disintegration time for the tablet prepared with the higher amount of polyvinylpyrrolidone, the difference between the formulations is not significant ($p>0.05$).

Figure 3 shows the *in vitro* release profiles of risedronate from both tablets in simulated gastric and intestinal fluids. Gastroresistance evaluation showed a similar profile for both formulations in acid medium. No more than 16% of the drug was released in 2 h meaning that the conversion of the microparticles into tablets ameliorates the ability of the formulations to resist the acid environment. Regarding dissolution profiles at pH 6.8, the release of risedronate from tablets was remarkably slower than from microparticles. Tablet formulations took 240 min to release 100% of the drug. Despite the similarity, statistical analysis showed that both profiles are significantly different between 45 and 210 min ($p<0.05$). The slower release of risedronate from T2 could be explained by the lower disintegration time of this formulation. Compared to the untableted microparticles, tablets exhibited a prolonged drug release, which could be explained by the reduced surface area and by the presence of the excipients. Formulations that present slow release of the drug have the potential to reduce side effects in the gastrointestinal tract because high local drug concentrations are avoided.

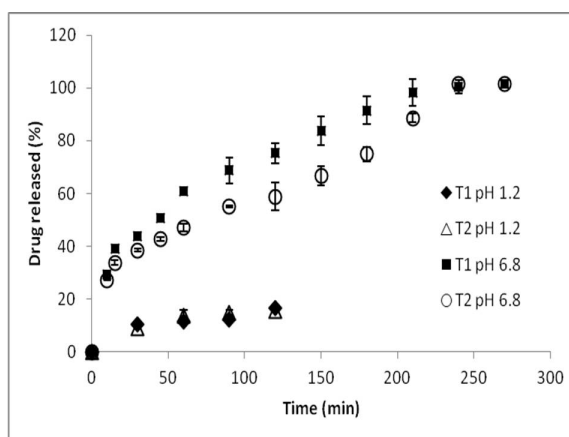


Figure 3 - Risedronate release profiles from tableted microparticles in 0.1 mol/L HCl pH 1.2 and phosphate buffer solution pH 6.8.

The mathematical modeling of release profiles showed a good fit to the monoexponential equation (correlation coefficients greater than 0.99), as observed for microparticles (Table 5). The apparent rate constants (k) were $0.0119 \pm 0.0007 \text{ min}^{-1}$ (T1) and $0.0111 \pm 0.0009 \text{ min}^{-1}$ (T2), presenting half-lives of 58 and 62 min, respectively. In relation to the drug release mechanism, the values of n determined for tablets were lower than 0.43, indicating that the formulations followed Fickian diffusion kinetics, as observed for untableted microparticles.

Table 5 - Parameters derived from the mathematical modeling of risedronate release profile from tablets containing microparticle

	T1	T2
Monoexponential		
k (min ⁻¹)	0.0119±0.0007	0.0111±0.0009
r	0.9970±0.0010	0.9902±0.0007
MSC	2.2518±0.0005	2.4333±0.0003
Biexponential		
α (min ⁻¹)	0.0091±0.0014	0.0100±0.0011
β (min ⁻¹)	1.9923 ±0.0011	1.3308±0.0012
A	0.8894±0.0015	0.8091±0.0015
B	0.1204±0.0007	0.1899±0.0009
r	0.9278±0.0015	0.9555±0.0010
MSC	1.7895±0.0010	1.6041±0.0011
Power law		
a	0.0994±0.0008	0.1345±0.0007
n	0.3960±0.0009	0.3662±0.0090
r	0.9936±0.0005	0.9957±0.0060

Conclusion

In conclusion, risedronate-loaded Eudragit[®] S100 microparticles were successfully prepared by spray-drying technique. These microparticles were tableted and the tablets showed good technological properties, higher gastroresistance and slower drug release than untableted microparticles. Therefore, the results indicate that the tableted microparticles can be considered a promising dosage form for improve patient compliance in the treatment of osteoporosis with risedronate.

Acknowledgements

The authors thank FAPERGS/Brazil, CNPq/Brazil and FIPE/UFSM/Brazil Program for the financial support, as well as S. S. Guterres and A. R. Pohlmann for the laser diffractometry analyses. A. A. V. thanks CAPES/Brazil for a master fellowship.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

1. Mundy GR. Pathogenesis of osteoporosis and challenges for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;42:165-173.
2. Pérez-Lopez FR. Postmenopausal osteoporosis and alendronate. *Maturitas* 2004;48: 179-192.
3. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2006;17:1726-1733.
4. Chaiamnuay S, Saag KG. Postmenopausal osteoporosis. What have we learned since the introduction of bisphosphonates? *Rev Endocr Metab Disord* 2006; 7:101-112.
5. Reid IR. Bisphosphonates. *Skeletal Radiol.* 2007;36:711-714.
6. Harris ST, Watts NB, Genant HK, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *J Am Med Assoc* 1999;282:1344-1352.
7. Reginster J, Minne HW, Sorensen OH, et al. Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *Osteoporos Int* 2000;11:83-91.
8. McClung MR, Geusens P, Miller PD, et al. Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. Hip Intervention Program Study Group. *N Engl J Med* 2001;344:333-340.
9. Lin JH. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996;18:75-85.
10. Graham DY, Malaty HM. Alendronate gastric ulcers. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:515-519.

11. Lanza F, Schwartz H, Sahba B, et al. An endoscopic comparison of the effects of alendronate and risedronate on upper gastrointestinal mucosae. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3112-3117.
12. Li WW, Kendler, DL. Pharmaceutical care and community pharmacists understanding of bisphosphonate dosing information. *J Clin Pharm Ther* 2004;29:531-536.
13. Reginster JY. Adherence and persistence: Impact on outcomes and health care resources. *Bone* 2006;38:18-21.
14. Castelli F, Conti B, Maccarrone DE, et al. Comparative study of 'in vitro' release of anti-inflammatory drugs from polylactide-co-glycolide microspheres. *Int J Pharm* 1998;176:85-98.
15. Palmieri GF, Michelini S, Di Martino P, Martelli S. Polymers with pH-dependent solubility: Possibility of use in the formulation of gastroresistant and controlled-release matrix tablets. *Drug Dev Ind Pharm* 2000;26:837-845.
16. Luppi B, Bigucci F, Zecchi V, Cerchiara T. Gastroresistant microcapsules: new approaches for site-specific delivery of ketoprofen. *Drug Deliv* 2009;16:24-29.
17. Cruz L, Assumpção E, Andrade SF, et al. Microencapsulation of sodium alendronate reduces drug mucosal damage in rats. *Drug Deliv* 2010;17:231-237.
18. Khan MZI, Prebeg Z, Kurjakovic N. A pH-dependent colon targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers. I. Manipulation of drug release using Eudragit® L100-55 and Eudragit® S100 combinations. *J Control Release* 1999;58:215-222.
19. Jivraj M, Martini LG, Thonsom CM. An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets. *Pharm Sci Technol To* 2000;3:58-63.
20. Follonier N, Doelker E. Biopharmaceutical comparison of oral multiple-unit and single-unit sustained-release dosage forms. *STP Pharma Sci* 1992;2:141-155.
21. Desai GK. Properties of tableted high-amylose corn starch–pectin blend microparticles intended for controlled delivery of diclofenac sodium. *J Biomater Appl* 2007;21:217-233.

22. Cruz L, Assumpção E, Andrade SF, et al. Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. *Eur J Pharm Sci* 2010;40:441-447.
23. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* 1983;15:25-35.
24. Bittner B, Morlock M, Koll H, et al. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: influence of the encapsulation technique and polymer purity on microsphere characteristics. *Eur J Pharm Biopharm* 1998;45:295-305.
25. Bruschi ML, Cardoso MLC, Lucchesi MB, Gremião MPD. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *Int J Pharm* 2003;264:45-55.
26. Goula AM, Adamopoulos KG. Spray drying performance of a laboratory spray dryer for tomato powder preparation. *Dry Technol* 2003;21:1273-1289.
27. Esposito E, Cervellati F, Menegatti E, et al. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *Int J Pharm* 2002;242:329-334.
28. Cruz L, Assumpção E, Guterres SS, Pohlmann, AR. High encapsulation efficiency of sodium alendronate in Eudragit S100/HPMC blend microparticles. *Quím Nova* 2009;32:1170-1174.
29. Colomé LM, Raffin RP, Jornada DS, et al. Pantoprazole-loaded Eudragit blended microparticles: preparation, characterization, in vitro gastro-resistance and in vivo anti-ulcer evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol* 2007;17:113-118.
30. Peppas NA. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharm Acta Helv* 1985;60:110-111.
31. Gennaro, A. R. Remington: the science and practice of pharmacy. 21st ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.

CAPÍTULO 2: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100[®] e Pullulan contendo risedronato de sódio

CAPÍTULO 2: Sistemas microparticulados a base de Eudragit S100[®] e Pullulan contendo risedronato de sódio.

2.1. Apresentação

No capítulo anterior foi demonstrado que sistemas microparticulados a base de um polímero gastrorresistente, o Eudragit S100[®], constituem alternativas promissoras para liberação oral do risedronato de sódio. No presente capítulo, uma segunda abordagem é explorada visando à obtenção de formas farmacêuticas mais seguras contendo o referido bisfosfonato. A estratégia em questão baseia-se no desenvolvimento de sistemas microparticulados gastrorresistentes e de liberação controlada. Formas farmacêuticas de liberação sustentada têm sido consideradas apropriadas para liberação de fármacos associados a efeitos adversos no trato gastrointestinal por cederem lentamente o princípio ativo e evitar sua concentração em um único ponto do trato gastrointestinal (DEY et al., 2008). Um exemplo que ilustra esta abordagem é a proibição da incorporação de KCl em formas farmacêuticas de liberação imediata devido ao alto risco de lesões na mucosa gástrica (WU et al., 2003).

A preparação de um sistema microparticulado combinando gastrorresistência e liberação controlada pode ser obtida pela formação de blendas poliméricas. O desenvolvimento de micropartículas a partir de blendas poliméricas tem-se mostrado vantajoso para modular a liberação de fármacos a partir de tais sistemas (LIONZO et al., 2007; CRUZ et al., 2010). Uma blenda polimérica é definida como uma mistura de polímeros com o objetivo de se obter um material com características diferenciadas, mas conservando as vantagens de cada polímero (ROBESON, 2007). Com base neste conceito, o Eudragit S100[®] foi selecionado para conferir gastrorresistência, enquanto que o Pullulan foi escolhido para controlar a liberação do risedronato de sódio.

O Pullulan é um polissacarídeo extracelular excretado pelo fungo não-patogênico *Aureobasidium pullulans*. Quimicamente, é constituído por unidades de maltotriose unidas por ligações α -1.6 (Figura 1). É solúvel em água e pode formar soluções viscosas com este solvente, dependendo da concentração e do seu peso molecular, que geralmente varia entre 100-250 kDa (SINGH et al., 2008; CHENG et al., 2011). Por sua capacidade de formar filmes flexíveis e impermeáveis ao oxigênio, é empregado na composição de invólucros de cápsulas e formulações de máscaras faciais. Além disso, é usado como excipiente em comprimidos,

por promover maior aderência e brilho quando usado como revestimento (CHENG et al., 2011). Apesar destas aplicações farmacêuticas, ainda não há relatos de trabalhos que tenham empregado o Pullulan para promover liberação controlada.

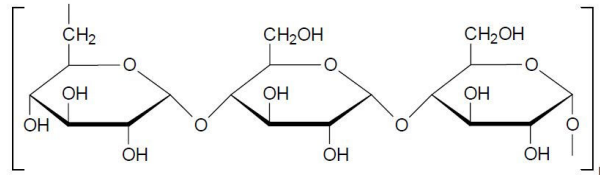


Figura 1 - Estrutura química do Pullulan.

(Fonte: <http://www.chihonbio.com/english/products/pullulan.html>)

Diante do exposto, o segundo capítulo desta dissertação apresenta a preparação inédita de micropartículas de Eudragit S100[®] e Pullulan contendo risedronato de sódio, bem como a formulação de comprimidos obtidos pela compressão direta de uma formulação de micropartículas selecionada. Os resultados desta parte da dissertação estão apresentados na forma de artigo que será submetido ao periódico *Carbohydrate Polymers*.

PUBLICAÇÃO 2: Novel Pullulan-Eudragit[®] S100 microparticles for oral delivery of risedronate: formulation, *in vitro* evaluation and tableting blend microparticles

Artigo submetido para publicação no periódico Carbohydrate polymers

Novel Pullulan-Eudragit[®] S100 microparticles for oral delivery of risedronate: formulation, *in vitro* evaluation and tableting blend microparticles

Aline A. Velasquez, Luana M. Ferreira, Mônica F. Stangarlin, Cristiane B. Silva, Clarice M. B. Rolim, Leticia Cruz*

Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Abstract

Novel Pullulan/Eudragit[®] S100 blend microparticles for oral delivery of risedronate are proposed in the present study. These biocompatible systems were prepared by spray-drying at 3 different ratios of Pullulan and Eudragit[®] S100 (2:1, 1:1 and 1:2). Microparticles were obtained with yields ranging from 31 to 42%, encapsulation efficiencies close to 100%, moisture contents lower than 11%, mean particle size in the range 2.9-4.8 μm and narrow size distributions. Carr's index and the Hausner ratio indicated poor flowability. In gastric simulated fluid, the microparticles prepared with the highest amount of Eudragit[®] S100 showed the best gastroresistance. In intestinal simulated fluid, blend microparticles were able to prolong drug release. Microparticles prepared with the 2:1 ratio were compressed into tablets with or without a binder. Both tableted microparticles could be obtained with acceptable average weights, drug content close to 100%, sufficient hardness and low friability. *In vitro* studies showed that tablets maintained the gastroresistance observed for untableted microparticles and were also able to prolong risedronate release. In conclusion, the developed Pullulan/Eudragit[®] S100 blend microparticles are promising alternatives to oral delivery of risedronate in the future.

Keywords: Pullulan, Eudragit S100, microparticles, risedronate, tablets, oral delivery.

1. Introduction

Polymeric microparticles have been widely studied for drug delivery applications (Freiberg & Zhu, 2004; Varde & Pack, 2004). In this context, polysaccharides including chitosan, alginate and pectin are very attractive natural polymers because of their biocompatibility, biodegradability and abundant availability (Reddy et al., 2011). In recent years, pullulan, a maltotriose polysaccharide obtained from starch by *Aureobasidium pullulans*, has been investigated for drug delivery (Choudhary et al., 2012) and gene delivery (Thomsen et al., 2011). As a result of its bioadhesive, non-toxic, non-immunogenic, non-mutagenic and non-carcinogenic properties (Singh et al., 2008; Cheng et al., 2011), pullulan can be considered a promising biopolymer for the development of drug-loaded microparticles. However, until now, there are no reports on the preparation of pullulan microparticles. A few studies demonstrated the development of microparticulate systems, but using semisynthetic pullulan derivatives (Mocanu et al., 2002; Constantin et al., 2003; Fundueanu et al., 2008; Yang et al., 2009; Lee et al., 2012).

The blending of polymers has been considered a successful approach to tailor drug release of microparticles (Desai, 2007; Poletto et al., 2007; Angadi et al., 2010). For instance, it has been shown that blend microparticles combined prolonged release, due to the use of hydroxypropyl methylcellulose, and gastroresistance, which was attributed to the presence of Eudragit[®] S100 in the blend (Cruz et al., 2010). Eudragit[®] S100 is an anionic copolymer insoluble in acid but soluble in intestinal medium from pH 7 upwards, providing gastroresistance to the formulations (Rowe et al., 2009). In this sense, we hypothesized that the combination of pullulan and Eudragit[®] S100 could provide formulations with gastroresistance and controlled release properties, which could benefit patients in treatment with drugs associated with gastrointestinal complications.

Risedronate, an antiresorptive drug widely prescribed for the treatment of osteoporosis, is associated with injuries of the upper gastrointestinal tract (Lin, 1996; Lanza et al., 2000; Chaiamnuay & Saag, 2006; Reid, 2007). In order to circumvent this limitation, the tablet should be swallowed with a full glass of water, and the patients should avoid lying down for at least 30 min to facilitate esophageal passage and decrease mucosal adherence (Lanza et al., 2000; Li & Kendler, 2004). Therefore, the incorporation of risedronate in blend microparticles with suitable characteristics is a promising approach to circumvent the side-effects of the drug. Because of their small size and high surface area, microparticles spread over the gastrointestinal tract more uniformly than single-unit dosage forms as tablets. This

reduces the risk of local irritation and improves the bioavailability of the drug (Freiberg & Zhu, 2004; Varde & Pack, 2004).

In the present study, we reported the preparation of a novel microparticulate formulation containing risedronate based on the Pullulan/Eudragit S100[®] blend by spray-drying. The physicochemical properties as well as the *in vitro* release profiles were evaluated. Moreover, the preparation of tablets from a selected formulation was demonstrated.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Sodium risedronate was purchased from Pharma Nostra (Rio de Janeiro, Brazil). Eudragit[®] S100 (Poly (methacrylic acid-co-methyl methacrylate) 1:2) was a gift of Almapal (São Paulo, Brazil) and Pullulan was kindly donated by Corn Products (São Paulo, Brazil). Microcrystalline cellulose (Avicel[®] PH101) was obtained from FMC Corporation (Philadelphia, USA). Poly(vinyl pyrrolidone) (PVP - Kollidon[®] 30) was purchased from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Colloidal silicon dioxide (Aerosil[®]) and stearate magnesium were acquired from Degussa (São Paulo, Brazil) and Henrifarma (São Paulo, Brazil), respectively. All other chemicals and solvents were of pharmaceutical grade and were used as received.

2.2 Preparation of Pullulan/Eudragit[®] S100 blend microparticles

The blend microparticles were produced by the spray-drying technique using three different ratios of Pullulan:Eudragit[®] S100 (1:2, 1:1 and 2:1). Firstly, an Eudragit[®] S100 alkaline solution was prepared at 50°C by magnetic stirring of the polymer (2.50 g, 3.75 g or 5.00 g), in 500 mL 0.05 mol/L NaOH. In the next step, Pullulan (2.50 g, 3.75 g or 5.00 g) was added in the Eudragit[®] S100 solution under mechanic stirring for 10 min. The mixture was maintained at 4°C for 24h. Then, 2 g risedronate were dissolved in the blend polymeric solution under magnetic stirring for 10 min before spray-drying (Spray Dryer MSD 1.0, LabMaq, Brazil). Spray-drying conditions were given as: air flow rate of 70 NL/h, atomizing air pressure of 3.0 Kg/cm², inlet air temperature of 100°C, feed rate of 0.33 L/h and nozzle diameter of 1.2 mm. For comparison, batches prepared without the drug (placebo microparticles) were used as control. The formulations were named MP1:2 (2.50 g Pullulan and 5.00 g Eudragit[®] S100), MP1:1 (3.75 g Pullulan and 3.75 g Eudragit[®] S100) and MP2:1 (5.00 g Pullulan and 2.50 g Eudragit[®] S100).

2. 3 Characterization of Pullulan/Eudragit[®] S100 blend microparticles

The yield of spray-drying process was calculated by the mass ratio of microparticles obtained and the total amounts of components used, excluding water, and multiplying the result by 100. The encapsulation efficiency was determined by accurately weighing a portion of microparticles relative to 5 mg of risedronate and dissolving it in 50 mL 0.05 mol/L NaOH. After being sonicated for 20 min, the sample was filtered using quantitative filter paper Unifil C41. Subsequently, 10 mL of the filtrate was diluted with deionised water in another 50 mL volumetric flask. The absorbance was measured spectrophotometrically at 262 nm. Calibration curves were prepared in a range between 5.00 and 60.00 µg/mL ($r = 0.9992$). Repeatability and intermediate precision did not exceed 3% and accuracy was $99.10 \pm 1.34\%$. The calculation of encapsulation efficiency was done by the ratio of theoretical and experimental risedronate concentrations, and expressed as percentage. Each formulation was assayed in triplicate. As regards particle sizes and their distribution, the analyzes were carried out by laser diffraction using the dry disperser mode at dispersing pressure of 1 bar (Malvern Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK). The particle sizes were expressed as the mean diameter over volume distribution, $D[4,3]$, and the size distributions were based on the 10%, 50% and 90% quantile, $Span = (d_{90} - d_{10}) / d_{50}$. In relation to the microscopic examination, the samples were previously gold sputtered on a Desk II Cold Sputter (Denton Vacuum, USA) and subsequently analyzed using an accelerating voltage of 15 kV (Scanning microscope JSM-6360, Jeol, Japan). The microparticles were also evaluated for moisture content by using an infrared drying equipment IV 2500 (Gehaka, Brazil) kept at 115°C until constant weight. As for powder densities, bulk density (ρ_b) was determined by transferring 2.0 g microparticles to a 25 mL graduated cylinder. Powder volume was determined and then bulk density was calculated. The sample contained in the measuring cylinder was tapped 1250 times using a tapped density tester PT-TD (Pharma Test, Germany) to obtain the tapped density (ρ_t). The flowability of the powders was inferred by calculating Carr's index, $CI = ((\rho_t - \rho_b) / \rho_t) \times 100$, and the Hausner ratio, $H = \rho_t / \rho_b$. Carr's index and the Hausner ratio values greater than 25% and 1.25, respectively, were considered to be indications of poor flowability.

2. 4 *In vitro* drug release studies

Risedronate release from microparticles was carried out with a USP I (basket) apparatus (PTW II, Pharma Test, Brazil) at a rotation speed of 100 rpm with 900 mL of medium maintained at 37°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$). In order to evaluate gastroresistance, 0.1 mol/L HCl

(pH 1.2) was used as medium. Aliquots of the gastric simulated medium (5 mL) were collected every 30 min up to 120 min and the absorbances were analyzed at 262 nm. To evaluate the dissolution of the drug, phosphate buffer pH 6.8 was employed as medium. The samples (5 mL) were withdrawn at predetermined times (10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 and 270 min) and the amount of risedronate released was assayed spectrophotometrically ($\lambda=262$ nm). For both experiments, after each withdrawal, the same volume of medium was replaced to keep a constant total volume. For comparison purposes, the dissolution of the pure drug was conducted in both mediums. All the experiments were performed in triplicate.

In order to determine the kinetics of risedronate release from microparticles, the data were fitted to mathematical models such as the monoexponential model, $Q_t/Q_\infty=1-[e^{-kt}]$, the biexponential model, $Q_t/Q_\infty=1-[A.e^{-\alpha t} + B.e^{-\beta t}]$, and the Korsmeyer-Peppas model, $Q_t/Q_\infty=a.t^n$. In these models, Q_t is the amount of the drug released at time t , Q_∞ is the initial amount of the drug, k , α and β are the apparent release kinetic rate constants, and A and B are the fractions of the drug that were released in each phase of the exponential function (Cruz et al., 2010), a is a constant incorporating structural and geometric characteristics of the carrier, and n is the release exponent, indicative of the mechanism of drug release (Korsmeyer et al., 1983). Mathematical modeling was performed using the software Scientist 2.0 (Micromath, USA).

2. 5 Preparation of tablets containing microparticles

Two tablet formulations were prepared by direct compression of risedronate-loaded microparticles using direct tableting excipients. The tablets consisted of MP1:2 (156 mg equivalent to 25 mg risedronate), polyvinylpyrrolidone (10 mg), colloidal silicon dioxide (1 mg), stearate magnesium (1.5 mg) and microcrystalline cellulose (31.5 mg). For comparison purposes, a formulation without polyvinylpyrrolidone was prepared. In both tablets, the proportion of filler (microcrystalline cellulose) was adjusted to achieve 200 mg of tablet weight. All components were mixed in a glass mortar by geometric dilution and the powder mixture was compressed (arbitrary pressure of 4 on the load scale) in a single punch machine (Korsch, Germany).

2. 6 Characterization of tablets

The tablets were evaluated with respect to different physical parameters such as weight variation, thickness, hardness and friability. In all, 10 tablets from each formulation

were evaluated. The weight variation was determined by individually weight the tablets in an analytical balance AY220 (Shimadzu, Japan). Thickness was measured using a manual caliper. Mean hardness was assessed using a portable hardness tester (Off Tec Galileo, Brazil). In the friability test, the tablets were accurately weighed (W_0) and placed in a friabilator (Ética, Brazil). These were submitted to 100 rotations for 5 min. The tablets were dusted of adherent particles and then reweighed (W). Friability (F) was calculated as $F=100[(1-W_0)/W]$.

Content uniformity was determined by pulverizing each tablet ($n=3$) in a glass mortar and dissolving the fine powder into 50 mL 0.05 mol/L NaOH in a volumetric flask. Then, the sample was sonicated for 30 min and filtered through a quantitative filter-paper. Ten milliliters of the filtrate were transferred into a 50 mL volumetric flask with water and the absorbance was measured at 262 nm.

In vitro release tests and mathematical modeling of the experimental data obtained for tablet formulations were performed in the same way as described previously for microparticles.

2. 7 Statistical analysis

The data were analyzed by the Student's t-test and one-way ANOVA.

3. Results and Discussion

Spray-drying processes were conducted at 100 °C for all formulations because temperatures higher than that resulted in yellow powders, which were attributed to the caramelization of Pullulan. Previous tests carried out at 150 °C indicated that spray-dried powders without Pullulan did not have this problem. Characteristics of risedronate-loaded blend microparticles and placebo formulations are shown in Table 1. The theoretical value of drug loading in the blend microparticles was 190.4 mg/g. Encapsulation efficiencies close to 100% were achieved for the formulations prepared with the higher amounts of Pullulan (MP2:1 and MP1:1), probably because of the high hydrophilicity of the polysaccharide and the drug. The yield of spray-drying process ranged from 31 to 42%. Increasing the amount of Pullulan in the formulations decreased the yield percentage due to the higher adhesion of the powder on the walls of the drying chamber. On the other hand, decreasing Pullulan concentration in the feed solution decreased the moisture content of the powders. Laser diffraction analyses showed that the mean diameter of blend microparticles ranged from 2.9-

4.8 μm , presenting *Span* lower than 1.4, and indicating narrow size distributions. The presence of the drug did not influence the particle sizes.

Table 1 - Characteristics of the prepared Pullulan/Eudragit® S100 blend microparticles.

Samples	Yield (%)	Encapsulation Efficiency (%)	Moisture content (%)	$D[4,3]$ (μm)	<i>Span</i>
MP1:2placebo	38 \pm 2	-	7.9 \pm 0.9	3.9 \pm 0.6	1.4 \pm 0.2
MP1:2	39 \pm 1	84.32 \pm 0.10	7.7 \pm 0.6	4.6 \pm 0.5	1.0 \pm 0.1
MP1:1placebo	39 \pm 0	-	10.4 \pm 0.2	3.6 \pm 0.1	1.1 \pm 0.3
MP1:1	42 \pm 2	98.26 \pm 0.23	9.2 \pm 1.1	4.1 \pm 0.6	1.3 \pm 0.2
MP2:1placebo	33 \pm 5	-	10.3 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3	1.2 \pm 0.1
MP2:1	31 \pm 2	95.82 \pm 0.66	10.0 \pm 0.5	3.3 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1

The morphology of blend microparticles was investigated by scanning electron microscopy (Figure 1). The photomicrographs showed that all samples appeared spherical in shape and presented smooth surface, regardless of the proportion of polymers used.

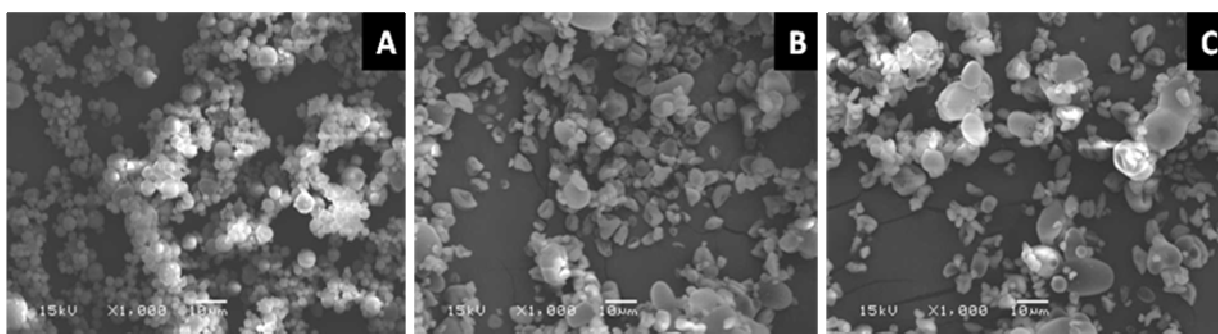


Figure 1 - Photomicrographs of MP1:2 (A), MP1:1 (B) and MP2:1 (C) formulations (bar = 10 μm).

The bulk and tapped densities were determined and the flowability was inferred by calculating Carr's index and the Hausner ratio. The results shown in Table 2 indicated that the powders had poor flowability, which is related to the reduced size and cohesive properties of microparticles. In addition, the drug influenced the flowability of the powders, since its presence in the blend microparticles lowered the values of both indexes. The values of Carr's index and the Hausner ratio presented by sample MP1:2 suggest that the flowability of this powder can be improved by the addition of excipients with good flow properties.

Table 2 - Bulk and tapped densities and flowability indexes of blend microparticles.

Samples	Bulk density (g/cm ³)	Tapped density (g/cm ³)	Carr index (%)	Hausner ratio
MP1:2placebo	0.24±0.02	0.39±0.01	38±1	1.61±0.03
MP1:2	0.22±0.01	0.29±0.03	25±2	1.34±0.03
MP1:1placebo	0.20±0.01	0.34±0.03	42±5	1.73±0.15
MP1:1	0.27±0.06	0.40±0.04	33±2	1.48±0.09
MP2:1placebo	0.18±0.03	0.31±0.02	42±1	1.72±0.06
MP2:1	0.21±0.02	0.30±0.04	30±3	1.42±0.05

Risedronate release from blend microparticles was evaluated in gastric and intestinal simulated fluids. As shown by Figure 2, the lower the ratio of Eudragit[®] S100 in the blend, the lower the gastroresistance of the microparticles. The formulation prepared with the highest proportion of Eudragit[®] S100 showed the lowest percentage of drug release at pH 1.2. About 10% of risedronate was released from MP1:2 within 2 hours of the experiment, whereas MP1:1 and MP1:2 released 28% and 37% of the drug, respectively, at the same time. Despite the low percentage of drug release observed for MP1:2, absolute protection could not be achieved, probably as a result of the drug trapped on the surface of the microparticles or to the leaching of the drug from the microparticles.

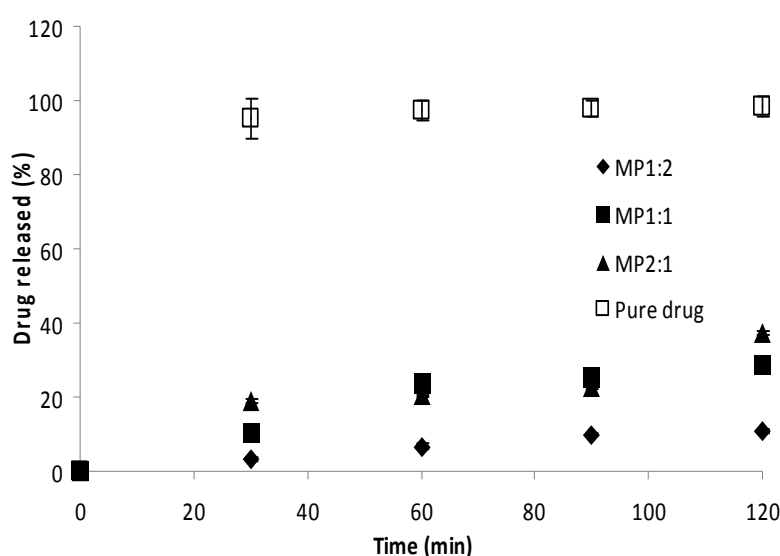


Figure 2 - In vitro release profiles of pure risedronate and risedronate-loaded blend microparticles in 0.1 mol/L HCl pH 1.2.

As for drug dissolution in intestinal simulated fluid, 99.0% of pure risedronate was released in 10 min, as a result of its hydrophilicity. In their turn, blend microparticles were able to prolong risedronate release, as shown in Figure 3. The greater the ratio of pullulan in the blend, the slower the release of the drug. For instance, in 150 min of the experiment, MP1:2, MP1:1 and MP2:1 released 64, 58 and 49% of risedronate, respectively. Risedronate took 420 min to reach 100% from MP2:1, while the totality of the drug was released from MP1:2 and MP1:1 in 480 min. The statistical analysis showed that the MP2:1 profile is significantly different from the other two formulations ($p < 0.05$). The ability to prolong the release of risedronate is attributed to Pullulan, since microparticles prepared only with Eudragit[®] S100 released 99.5% of the drug in 90 min (data not shown). Probably, the interaction between the two polymers hindered the diffusion of the drug outside the particles.

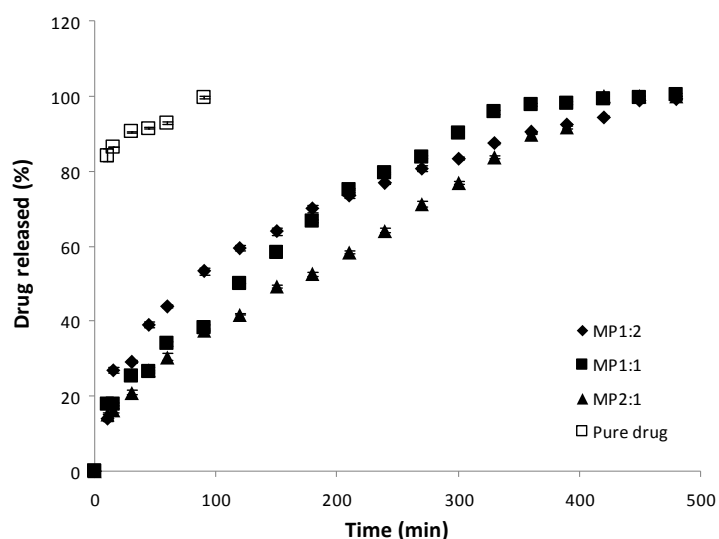


Figure 3 - In vitro release profiles of pure risedronate and risedronate-loaded blend microparticles in phosphate buffer solution pH 6.8.

Drug release profiles were analyzed using mono- and biexponential equations and the Korsmeyer-Peppas model. Table 3 shows the results of mathematical modeling. By comparing the values of the correlation coefficient and MSC, the best data fitting was observed for the monexponential equation. In this case, the release of risedronate followed first order kinetics in a single step. The apparent rate constants decreased as the ratio of pullulan in the blend was increased, confirming that the release of the drug is slower for the formulation MP2:1. The half-lives calculated for MP1:2, MP1:1 and MP2:1 were 86, 118 and 169 min, respectively, confirming that the proportion of the polymers in the blend plays an important role in risedronate release.

Table 3 - Parameters derived from the mathematical modeling of risedronate release profile from blend microparticles.

Model/Parameters	MP1:2	MP1:1	MP2:1
Monoexponential			
k (min ⁻¹)	0.0081±0.0003	0.0059±0.0011	0.0041±0.0003
r	0.9972±0.0004	0.9958±0.0009	0.9983±0.0005
MSC	4.3692±0.5008	4.1127±0.3428	4.7304±0.5673
Biexponential			
α (min ⁻¹)	0.1264±0.0004	0.1769±0.0010	0.0976±0.0007
β (min ⁻¹)	0.0077±0.0002	0.0053±0.0008	0.0038±0.0006
A	0.0467±0.0013	0.0345±0.0011	0.06543±0.0007
B	0.9478±0.0010	0.9300±0.0005	0.9425±0.0009
r	0.9843±0.0003	0.9864±0.0009	0.9902±0.0002
MSC	3.3412±0.4441	3.6903±0.5108	3.8993±0.3215
Korsmeyer-Peppas			
a	0.2398±0.0008	0.3572±0.0004	0.2913±0.0007
n	0.4267±0.0002	0.5037±0.0006	0.4803±0.0002
r	0.9904±0.0012	0.9913±0.0004	0.9923±0.0005

The experimental data were also fitted to Korsmeyer-Peppas model. The value of release exponent (n) derived from mathematical modeling provides an indication of drug release mechanism. In the case of spherical geometries, $n=0.43$ corresponds to a Fickian diffusion release, whereas $n=0.85$ is indicative of swelling-controlled drug release. n values ranging between 0.43 to 0.85 are related to anomalous transport, in other words, superposition of both mechanisms (Peppas, 1985). Therefore, for the microparticles prepared with the higher amounts of pullulan, MP2:1 and MP1:1, the drug release is non-Fickian. In this case, the release of risedronate depends on the dissolution/swelling of the polymers in addition to drug diffusion. In contrast, the drug release from MP1:2 is governed by Fickian diffusion.

Considering that microparticles MP1:2 showed the best gastroresistance profile and flowability as well as the lowest moisture content, this formulation was selected for the preparation of tablets. Previous attempts showed that the compression of microparticles using only microcrystalline cellulose resulted in great weight variation among the units, which was attributed to the poor flowability of the powder. Hence, magnesium stearate and colloidal silicon dioxide were added to the powder mixture to ameliorate its flowability. In order to

investigate the need for addition of a dry binder, formulations with (F1) or without (F2) polyvinylpyrrolidone were prepared. The flowability of both powder mixtures was improved in relation to microparticles, since F1 and F2 presented Carr's indexes of $25\pm 1\%$ and $18\pm 3\%$ and Hausner ratios of 1.35 ± 0.12 and 1.22 ± 0.04 , respectively.

Table 4 shows the properties of tableted microparticles. Both formulations exhibited low variations in tablet weight, thickness, hardness, friability and drug content, indicating that the compression process was consistent. The results showed that polyvinylpyrrolidone did not influence the characteristics of the tablets, since no significant differences were observed among both F1 and F2 ($p > 0.05$). Tablets could be obtained with acceptable average weights and thickness, drug content close to 100%, sufficient hardness and low friability without the need of a binder. Probably in view of its adhesive qualities, pullulan imparts cohesiveness to microparticles, which results in good binding properties and mechanical strength.

Table 4 - Properties of tableted microparticles.

Properties	F1	F2
Average weight (mg)	193 ± 5	195 ± 4
Thickness (mm)	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02
Hardness (Kgf)	10.6 ± 0.5	9.7 ± 0.5
Friability (%)	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.06
Drug content (%)	100.3 ± 1.8	99.7 ± 2.1

Regarding *in vitro* release experiments (Figure 4), tablets maintained the gastroresistance observed for untableted microparticles. To explain this result, we assumed that microparticles did not suffer damage because of the compression force. In order to confirm this assumption, SEM analyzes of tablet cross-sections were performed. The photomicrographs of both F1 and F2 (Figure 5a and 5b) showed the presence of particles with the same morphology observed for MP1:2 (Figure 1a).

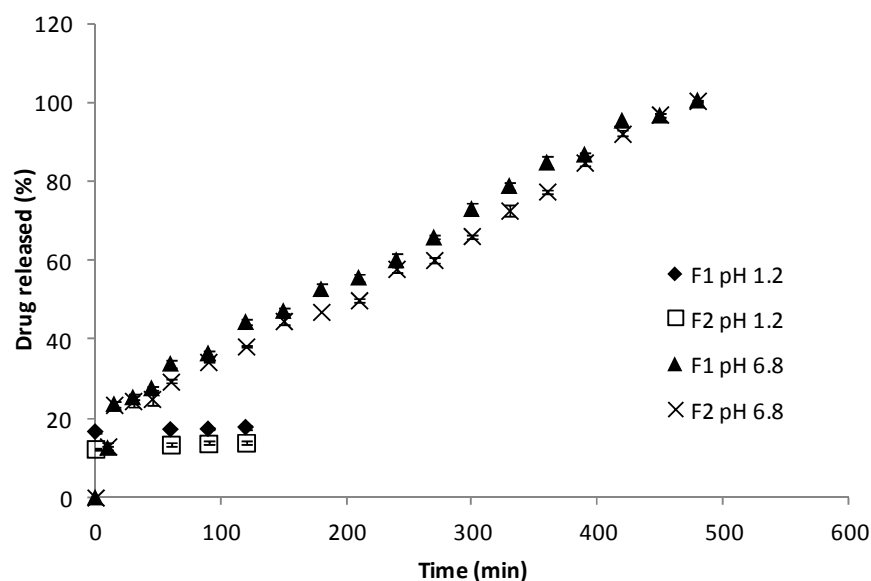


Figure 4 - Risedronate release profiles from tableted microparticles in 0.1 mol/L HCl pH 1.2 and phosphate buffer solution pH 6.8.

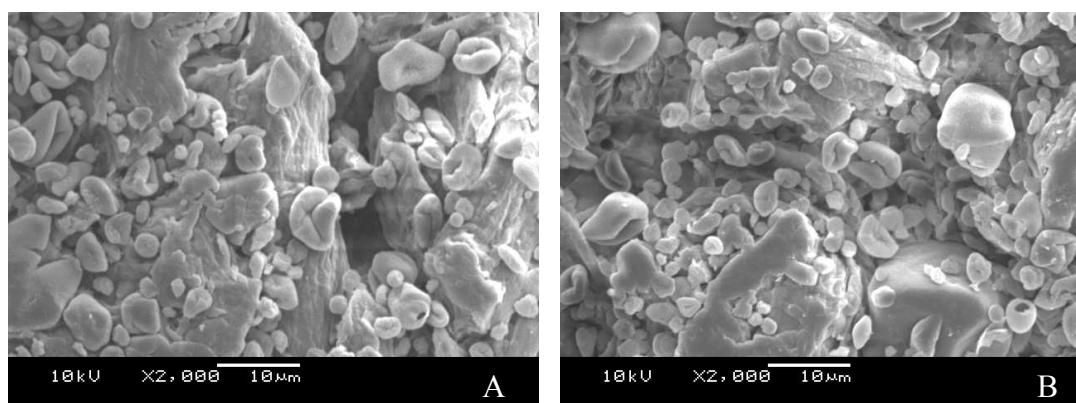


Figure 5 - SEM photomicrographs of cross-sections of tableted microparticles F1 (A) and F2 (B) (bar = 10 μm).

Tablets were also evaluated with respect to their dissolution in simulated intestinal fluid (Figure 4). Complete release of risedronate was achieved in 480 min, showing that the compression of microparticles as well as the presence of the excipients did not alter the release time in relation to untableted microparticles. Regardless of the presence of polyvinylpyrrolidone, drug release profiles of both F1 and F2 were similar to one another ($p > 0.05$). The *in vitro* profiles of tablets were further analyzed by mathematical modeling with the aim to better understand the behavior of drug release from these formulations and compare them to the untableted microparticles.

As observed for untableted microparticles, the monoexponential equation described the experimental data for F1 and F2 tablets (correlation coefficients and MSC higher than

0.99 and 5, respectively). However, the determination of the rate constants allowed the differentiation of the profiles of tableted and untableted microparticles. The rate constants for F1 and F2 ($0.0036 \pm 0.0008 \text{ min}^{-1}$ and $0.0039 \pm 0.0005 \text{ min}^{-1}$, respectively) showed a significantly slower release of risedronate from the tableted microparticles ($p < 0.05$). The half-lives calculated for both F1 and F2 were 193 min and 178 min, respectively, showing that the compression of microparticles or the presence of excipients influenced drug release at pH 6.8. Release exponents obtained from the Korsmeyer-Peppas model indicated Fickian diffusion as the main mechanism of risedronate release from F1 and F2 ($n = 0.4318 \pm 0.0010$ and 0.4198 ± 0.0008 , respectively).

4. Conclusion

Pullulan/Eudragit[®] S100 blend microparticles containing risedronate with high encapsulation efficiency were prepared by the spray-drying technique. In spite of the high water solubility of risedronate, all formulations were able to prolong the release of the drug, which was influenced by the amount of Pullulan in the blend. However, only the microparticles prepared with the highest amount of Eudragit[®] S100 (MP1:2) resulted in a satisfactory gastroresistance profile. These blend microparticles could be easily compressed into tablets and were able to maintain gastroresistance and prolonged release profile of untableted microparticles. The combination of gastroresistance and slow release can be considered an interesting strategy for risedronate oral delivery in view of the reduced possibility of a high drug local concentration near the gastrointestinal mucosa.

References

- Angadi, S. C., Manjeshwar, L. S., & Aminabhavi, T. M. (2010). Interpenetrating polymer network blend microspheres of chitosan and hydroxyethyl cellulose for controlled release of isoniazid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(171-179).
- Chaiamnuay, S., & Saag, K. G. (2006). Postmenopausal osteoporosis. What have we learned since the introduction of bisphosphonates? *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 7(101-112).
- Cheng, K.-C., Demirci, A., & Catchmark, J. M. (2011). Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(29-44).
- Choudhary, D. R., Patel, V.A., Chhalotiya, U.K., Patel, H.V & Kundawala, A.J. Natural polysaccharides as film former: A feasibility study for development of rapid dissolving films of ondansetron hydrochloride. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(78-85).

Constantin, M., Fundueanu, G., Cortesi, R., Esposito, E., & Nastruzzi, C. (2003). Aminated polysaccharide microspheres as DNA delivery systems. *Drug Delivery*, 10(139-149).

Cruz, L., Assumpcao, E., Andrade, S. F., Conrado, D. J., Kulkamp, I. C., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2010). Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(441-447).

Desai, K. D. (2007). Properties of Tableted High-Amylose Corn Starch–Pectin Blend Microparticles Intended for Controlled Delivery of Diclofenac Sodium. *Journal of Biomaterials Applications*, 21(217-233).

Freiberg, S., & Zhu, X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1-18).

Fundueanu, G., Constantin, M., & Ascenzi, P. (2008). Preparation and characterization of pH- and temperature-sensitive pullulan microspheres for controlled release of drugs. *Biomaterials*, 29(2767-2775).

Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 15(25-35).

Lanza, F., Schwartz, H., Sahba, B., Malaty, H. M., Musliner, T., Reyes, R., Quan, H., & Graham, D. Y. (2000). An endoscopic comparison of the effects of alendronate and risedronate on upper gastrointestinal mucosae. *American Journal of Gastroenterology*, 95(3112-3117).

Lee, S. J., Hong, G.-Y., Jeong, Y.-I., Kang, M.-S., Oh, J.-S., Song, C.-E., & Lee, H. C. (2012). Paclitaxel-incorporated nanoparticles of hydrophobized polysaccharide and their antitumor activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 433(121-128).

Li, W. W., & Kendler, D. L. (2004). Pharmaceutical care and community pharmacists' understanding of bisphosphonate dosing information. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 29(531-536).

Lin, J. H. (1996). Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, 18(75-85).

Mocanu, G., Mihai, D., Picton, L., LeCerf, D., & Muller, G. (2002). Associative pullulan gels and their interaction with biological active substances. *Journal of Controlled Release*, 83(41-51).

Peppas, N. A. (1985). Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60(110-111).

Poletto, F. S., Jaeger, E., Re, M. I., Guterres, S. S., & Pohlmann, A. R. (2007). Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 345(70-80).

- Reddy, K., Mohan, G. K., Satla, S. & Gaikwad, S. (2011). Natural polysaccharides: versatile excipients for controlled drug delivery systems. *Natural Polysaccharides/Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(275-286).
- Reid, I. R. (2007). Bisphosphonates. *Skeletal Radiology*, 36(711-714).
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Cook, W. G & Fenton, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. (2th ed.).
- Singh, R. S., Saini, G. K., & Kennedy, J. F. (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 73(515-531).
- Thomsen, L. B., Lichota, J., Kim, K. S., & Moos, T. (2011). Gene delivery by pullulan derivatives in brain capillary endothelial cells for protein secretion. *Journal of Controlled Release*, 151(45-50).
- Varde, N. K., & Pack, D. W. (2004). Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(1-17).
- Yang, H. J., Park, I. S & Na, K. (2009). Biocompatible microspheres based on acetylated polysaccharide prepared from water-in-oil-in-water (W¹/O/W²) double-emulsion method for delivery of type II diabetic drug (exenatide). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*, 340(115-120).

DISCUSSÃO GERAL

As formulações foram preparadas a partir da adaptação da metodologia descrita na obtenção de micropartículas contendo alendronato de sódio (CRUZ et al., 2010). A solução de risedronato de sódio e Eudragit S100[®] em solução aquosa alcalina ou a mistura do fármaco em gel aquoso alcalino da blenda Eudragit S100[®] e Pullulan foram secos por aspersão para obtenção das micropartículas. O processo de secagem por aspersão conduzido a 150 °C produziu micropartículas de Eudragit S100[®] apresentando um rendimento de $39,12 \pm 0,05\%$. No entanto, a presença do fármaco na solução de alimentação aumentou o rendimento para $54,30 \pm 0,02\%$. De acordo com a literatura, micropartículas obtidas por secagem por aspersão apresentam um rendimento entre 30% e 50% em escala laboratorial (CHAW, 2003). A perda de pó pode ser devido à adesão das gotículas aspergidas nas paredes da câmara de secagem e à dificuldade para recolher as partículas finas presentes no ciclone (BRUSCHI, 2003). Para as micropartículas desenvolvidas a partir da blenda polimérica, o processo de secagem por aspersão foi conduzido a 100 °C, pois temperaturas mais elevadas originaram um pó amarelo, que foi atribuído à caramelização do Pullulan. O rendimento do processo de secagem por aspersão variou de 31% a 42%. Aumentando a quantidade de Pullulan nas formulações, diminuiu o rendimento devido à maior adesão do pó nas paredes da câmara de secagem. Por outro lado, a diminuição da concentração de Pullulan na solução de alimentação diminuiu o teor de umidade do pó.

Em relação à eficiência de encapsulamento, as micropartículas de Eudragit S100[®] contendo risedronato apresentaram valor elevado de $93,82 \pm 4,15\%$, correspondendo a $169,82 \pm 7,53$ mg/g. Conforme a literatura, a técnica de secagem por aspersão é considerada eficaz para encapsular fármacos hidrofílicos (CRUZ et al., 2010), como o risedronato de sódio. Logo, as micropartículas de Eudragit S100[®] e Pullulan contendo risedronato com maior proporção de Pullulan (MP1:1 e MP1:2) apresentaram aproximadamente 100% de eficiência de encapsulamento, o que corresponde a 190,4 mg/g provavelmente devido à elevada hidrofílicidade do polissacarídeo e do fármaco (BIRNBAUM, 2004).

Os diâmetros ($d_{4,3}$) das micropartículas de Eudragit S100[®] contendo ou não o fármaco apresentaram valores entre 3,7 µm e 3,3 µm com SPAN de 1,2 e 1,1, respectivamente. Já as micropartículas de Eudragit S100[®] e Pullulan contendo risedronato apresentaram valores que variaram entre 2,9 µm e 4,8 µm com Span inferior a 1,4, indicando estreitas distribuições de tamanho. Comparando-se o tamanho de ambas as formulações, a presença do risedronato não influenciou.

As micropartículas de Eudragit S100[®], contendo ou não o risedronato, exibiram teor de umidade de $8,31 \pm 0,02\%$ e $6,60 \pm 0,03\%$, respectivamente. Já as micropartículas de Eudragit S100[®] e Pullulan contendo o fármaco apresentaram um teor de umidade entre $7,7 \pm 0,6\%$ e $10,4 \pm 0,2\%$.

Morfologicamente, as micropartículas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. As fotomicrografias mostraram que todas as formulações apresentaram formato colapsado e superfície lisa, independentemente da presença do fármaco e da proporção dos polímeros utilizados. Além disso, é importante destacar que a presença do Pullulan na blenda não afetou a morfologia das micropartículas. Adicionalmente, nenhum cristal do fármaco foi observado na superfície das mesmas (CHOURASIA, 2004).

Quanto à avaliação da densidade e fluidez do pó, as micropartículas apresentaram valores elevados de Índice de Carr e Fator de Hausner, o que indica baixa fluidez. Este resultado pode ser explicado pelo tamanho reduzido das micropartículas, bem como pelas suas propriedades coesivas. Como consequência, é necessário selecionar excipientes com boas propriedades de escoamento para preparar comprimidos a partir destas micropartículas. Além disso, a presença do risedronato influenciou a fluidez dos pós, uma vez que a sua presença na mistura de micropartículas diminuiu os valores de ambos os índices.

Com o objetivo de verificar se as micropartículas foram capazes de resistir ao ambiente ácido do estômago sem liberar o risedronato de sódio, as formulações foram submetidas a ensaios de dissolução em meio HCl 0,1 mol/L pH 1,2. Em 2 h, as micropartículas de Eudragit S100[®] não conferiram proteção absoluta do fármaco frente ao ambiente ácido, pois 23% do risedronato foram liberados. As micropartículas constituídas da blenda polimérica com maior proporção de Eudragit S100[®] apresentaram a melhor gastroresistência, ou seja, a formulação preparada com a maior proporção de Eudragit S100[®] mostrou a menor percentagem de liberação do risedronato em pH 1,2 (CRUZ, 2010). Cerca de 10% do risedronato foi liberado a partir da MP2: 1 em 2 horas do período experimental, enquanto que a partir das MP1: 1 e MP1: 2 o fármaco foi liberado em 28% e 37% no mesmo tempo. Apesar da baixa percentagem de liberação do fármaco observada para MP 2:1, uma proteção absoluta não foi alcançada. Estes resultados podem ser relacionados com a porção do fármaco mais externamente localizado nas micropartículas ou pela lixiviação do fármaco a partir das micropartículas.

Considerando que 99% do fármaco puro dissolveu-se completamente em 10 min após sua adição em meio tampão fosfato pH 6,8, as cinéticas de liberação do risedronato de sódio a partir das micropartículas foram avaliados nesse meio. Por sua vez, as micropartículas

demonstraram suas capacidades em controlar a liberação do risedronato de sódio, mostrando que a liberação do fármaco a partir de micropartículas de Eudragit S100[®] foi de 99,5% em 90 min. No que diz respeito à literatura, fármacos hidrofílicos apresentam diferentes tempos de liberação a partir das micropartículas de Eudragit S100[®], como por exemplo, no caso do alendronato, 95,6% do fármaco foram liberados em 150 min em pH 6,8, enquanto que o pantoprazol levou 40 minutos para atingir 93,5%, em pH 7,4 (RAFFIN et al., 2007; CRUZ et al., 2010). As micropartículas de Eudragit S100[®] e Pullulan com maior proporção de Pullulan na mistura mostraram liberação mais lenta do fármaco. Por exemplo, em 150 min do experimento, MP 2:1, MP 1:1 e MP 1:2 liberaram 64%, 58% e 49% de risedronato, respectivamente. O risedronato levou 420 min para atingir uma liberação de 100% a partir de MP 1:2, enquanto que a totalidade do fármaco liberada a partir de MP 2:1 e MP 1:1 levou 480 min. A análise estatística mostrou que a cinética de liberação de MP 1:2 foi significativamente diferente das outras duas formulações. A capacidade para prolongar a liberação do risedronato é atribuída ao Pullulan, uma vez que as micropartículas preparadas apenas com Eudragit S100[®] liberaram 99,5% do fármaco em 90 min. Provavelmente, a interação entre os dois polímeros retardou a difusão do risedronato a partir das partículas.

As cinéticas de liberação obtidas foram analisadas através do ajuste dos dados experimentais à equação monoexponencial, que fornece uma constante cinética para o processo de primeira ordem em uma única etapa (PEPPAS, 2005). Considerando a comparação entre os coeficientes de correlação e os valores de MSC, a monoexponencial é a que melhor descreveu a cinética de liberação do risedronato de sódio a partir das formulações. A constante cinética observada, k , foi de $0,0746 \pm 0,0015 \text{ min}^{-1}$, correspondendo a uma meia-vida de cerca de 9 min para as micropartículas de Eudragit S100[®]. Já para as micropartículas de Eudragit S100[®] e Pullulan, as constantes de velocidade aparente diminuíram de acordo com o aumento de Pullulan na mistura, confirmando que a liberação do fármaco é mais lenta para a formulação de MP 1:2. As meias-vidas calculadas para MP 2:1, MP 1:1 e MP 1:2 foram de 86 min^{-1} , 118 min^{-1} e 169 min^{-1} , respectivamente, confirmando que a proporção do polímero na mistura teve um importante papel na liberação do risedronato (BIRNBAUM, 2004).

Os dados experimentais foram também analisados pela lei das potências, com o objetivo de elucidar o mecanismo de liberação do fármaco. Para as micropartículas de Eudragit S100[®] e MP 2:1 (Eudragit S100[®] : Pullulan), o valor de n foi inferior a 0,43 o que indica difusão Fickiana. Por outro lado, para micropartículas preparadas com quantidades

mais elevadas de pullulan, MP 1:1 e MP 1:2, apresentaram n entre 0,43 e 0,85, o que indica transporte anômalo.

As micropartículas de Eudragit S100[®] foram submetidas à compressão usando celulose microcristalina pH 101 como um diluente diretamente compressível. Este excipiente é um dos agentes de enchimento mais úteis para a compressão direta, devido ao seu comportamento plástico e à capacidade de desintegração (SHIDHAYE, 2008). Em um estudo piloto, foram produzidos comprimidos somente com as micropartículas e observou-se uma grande variação de peso e baixa dureza. Provavelmente, a pobre fluidez da formulação foi responsável pela variação de peso dos comprimidos. Além disso, a baixa dureza foi atribuída à ausência de um agente aglutinante na formulação. Assim, a fim de produzir comprimidos microparticulados com boas propriedades tecnológicas, estearato de magnésio e dióxido de silício coloidal foram adicionados à formulação para melhorar a fluidez e a polivinilpirrolidona foi escolhida para conferir dureza suficiente aos comprimidos. Foram testadas duas concentrações do aglutinante, 5% e 15%. Observou-se pequenas variações de peso, de espessura e teor do fármaco, o que indicou um processo de compressão consistente. Comparando-se ambas as formulações, não houve diferenças significativas no peso médio e na uniformidade de conteúdo ($p > 0,05$). No que diz respeito a dureza dos comprimidos, que é considerada como a força necessária para quebrar o comprimido em um teste de compressão diametral, todas as formulações mostraram dureza suficiente, sendo maior do que 7,80 Kgf. Além disso, os resultados mostraram que o aumento da concentração de polivinilpirrolidona consequentemente aumentou os valores de resistência. Em relação à perda de massa durante a avaliação da friabilidade, os valores encontrados foram inferiores a 0,5% para todas as formulações. As diferenças entre os grupos não foram significativas ($p > 0,05$).

A avaliação da gastroresistência dos comprimidos demonstrou que não mais do que 16% do fármaco foi liberado em 2 h, indicando que a conversão das micropartículas em comprimidos melhorou a capacidade das formulações em resistir ao ambiente ácido. Em relação a dissolução em pH 6,8, a liberação do risedronato a partir dos comprimidos foi notavelmente mais lenta do que a partir das micropartícula a partir dos comprimidos. 100% do fármaco foi liberado em 270 min. O fármaco a partir dos comprimidos levou 270 min para ser 100% liberado. Independentemente da concentração de polivinilpirrolidona empregada, a cinética de liberação do fármaco foi semelhante ($p > 0,05$). Em comparação com as micropartículas, os comprimidos exibiram liberação prolongada do fármaco, o que pode ser explicado pela área da superfície reduzida e pela presença dos excipientes. Formulações

capazes de liberar o fármaco lentamente possuem o potencial de reduzir os efeitos secundários no trato gastrointestinal, pois elevadas concentrações locais do fármaco são evitadas.

A modelagem matemática mostrou um bom ajuste dos dados experimentais à equação monoexponencial (coeficientes de correlação maior do que 0,99), como observado para as micropartículas. As constantes de velocidade aparentes (K) foram $0,0111 \text{ min}^{-1} \pm 0,0007$ (T1) e $0,0119 \text{ min}^{-1} \pm 0,0009$ (T2), apresentando meias-vidas de 58 min e 62 min, respectivamente. Em relação ao mecanismo de liberação do risedronato, os valores de n foram inferiores a 0,43, indicando que as formulações seguiram a cinética de difusão Fickiana, como observado para micropartículas.

Para a preparação de comprimidos a partir das micropartículas constituídas pela blenda Eudragit S100[®] e Pullulan, foi selecionada a proporção de 2:1 entre estes dois polímeros, respectivamente, pois foi a que apresentou melhores resultados quanto a gastrorresistência, fluidez e umidade. Para a preparação destas, foram selecionados os mesmos excipientes empregados na preparação dos comprimidos microparticulados de Eudragit S100[®]. Neste caso, foram preparados dois tipos de formulação: uma com (F1) e outra sem polivinilpirrolidona (F2). A fluidez de ambas as misturas de pós foi melhorada em relação a das micropartículas, uma vez que F1 e F2 apresentaram Índices de Carr e Fatores de Hausner inferiores. Ambas as formulações apresentaram pequenas variações de peso, espessura, dureza, friabilidade e teor de fármaco, indicando que o processo de compressão foi consistente. Os resultados mostraram que a polivinilpirrolidona não influenciou as características dos comprimidos, uma vez que não foi observada diferença significativa entre F1 e F2 ($p > 0,05$). Os comprimidos puderam ser obtidos com pesos médios e espessuras aceitáveis, conteúdo de fármaco de aproximadamente 100%, dureza e friabilidade adequadas, sem a necessidade do aglutinante específico. Provavelmente, o pullulan por suas características adesivas, conferiu coesividade às micropartículas, o que resultou em boas propriedades de ligação e resistência mecânica.

No que diz respeito a liberação *in vitro*, os comprimidos mantiveram a gastrorresistência observada para as micropartículas, concluindo-se portanto, que estas não sofreram alteração devido a força de compressão. A fim de confirmar esta hipótese, os comprimidos foram analisados por MEV, que mostrou a presença de partículas com a mesma morfologia, observada nas fotomicrografias das micropartículas.

Os comprimidos foram também avaliados quanto à sua dissolução em fluido intestinal simulado. A liberação completa do risedronato ocorreu em 480 min, mostrando que a compressão das micropartículas e a presença dos excipientes não alteraram o tempo de

liberação do fármaco. Independentemente da presença da polivinilpirrolidona, as cinéticas de liberação de F1 e F2 foram semelhantes ($p > 0,05$). As cinéticas *in vitro* dos comprimidos foram ainda analisadas por modelagem matemática com o objetivo de compreender melhor o comportamento da liberação do fármaco a partir destas formulações e compará-las com as micropartículas. Tal como observado para as micropartículas, a equação monoexponencial descreveu os dados experimentais para os comprimidos, F1 e F2 apresentaram coeficientes de correlação e MSC superiores que 0,99 e 5, respectivamente. No entanto, a partir da determinação das constantes de velocidade, foi possível diferenciar as cinéticas das micropartículas em relação aos comprimidos. As constantes de velocidade para F1 e F2 mostraram uma liberação significativamente mais lenta do risedronato a partir dos comprimidos microparticulados ($p < 0,05$). As meias-vidas calculadas para F1 e F2 foram de 193 min e 178 min, respectivamente, mostrando que a compressão das micropartículas ou a presença de excipientes influenciaram a liberação do fármaco em meio intestinal simulado. De acordo com o modelo de Korsmeyer-Peppas e conforme os valores de n obtidos para F1 e F2 ($n = 0,4318 \pm 0,0010$ e $0,4198 \pm 0,0008$, respectivamente), o fármaco foi liberado a partir dos comprimidos pelo mecanismo de difusão Fickiana.

CONCLUSÕES

- . Foi possível a preparação de micropartículas de Eudragit S100[®] e da blenda polimérica (Eudragit S100[®] e Pullulan) por secagem por aspersão;
- . O polissacarídeo Pullulan foi utilizado pela primeira no desenvolvimento de micropartículas;
- . As formulações apresentaram altos valores de eficiência de encapsulamento para o risedronato, fato que deve ser ressaltado por se tratar de um fármaco hidrofílico;
- . As micropartículas foram capazes de controlar a liberação do risedronato, fármaco hidrofílico com grande afinidade pelo meio aquoso;
- . Das proporções utilizadas para a preparação de micropartículas constituídas de Eudragit S100[®] e Pullulan, somente a relação 2:1 destes polímeros, respectivamente, apresentou características tecnológicas adequadas. Por esta razão, esta formulação foi selecionada para a preparação de comprimidos;
- . Foi viável preparar comprimidos a partir das micropartículas de Eudragit S100[®] e de Eudragit S100[®] e Pullulan usando excipientes comumente empregados em compressão direta;
- . Os comprimidos microparticulados apresentaram características tecnológicas adequadas;
- . Os comprimidos microparticulados de Eudragit S100[®] foram capazes de manter o perfil de gastrorresistência do risedronato a partir das micropartículas;
- . Os comprimidos desenvolvidos a partir das micropartículas de Eudragit S100[®] e Pullulan foram capazes de prolongar a liberação do risedronato. Deste modo foi possível concluir que as micropartículas não sofreram alterações pela força de compressão;
- . Os resultados obtidos indicam que os comprimidos microparticulados podem ser promissores para o tratamento da osteoporose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPAR, H. O. et al. Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonary antigen and DNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 3, p. 411-430, 2005.

AMORIM, M. J. L. G. B.; FERREIRA, J. P. M. Microparticles for delivering therapeutic peptides and proteins to the lumen of the small intestine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 39-44, 2001.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed: Porto Alegre, 2005.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, Jr. L.V. Farmacotécnicas – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. 6ª ed. **Baltimore: Editorial PREMIER**, v. 90-91; p. 201-236p, 2000.

ANVISA. Histórico. Brasília, 2009. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acesso em 12 nov. de 2009

BAE, D.C.; STEIN, B.S. The diagnosis and treatment of osteoporosis in men on androgen deprivation therapy for advanced carcinoma of the prostate. **Journal of Urology**, v. 172, p. 2137–2144, 2004.

BARAS, B.; BENOIT, M.A.; GILLARD, J. Influence of various technological parameters on the preparation of spray-dried poly(*ε*-caprolactone) microparticles containing a model antigen. **Journal of Microencapsulation**, v. 17, n. 4, p. 485-498, 2000.

BILATI, U. ; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 375-388, 2005.

BILLON, A. et al. Development of Spray-Dried acetaminophen microparticles using experimental designs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, p. 159-168, 2000.

BIRNBAUM, D.T.; PEPPAS, L.B. Microparticle drug delivery systems. **Drug Delivery Systems in Cancer Therapy**, Ed. Brown DM, Humana Press , p. 117-135, 2004.

BITTNER, B. et al. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: influence of the encapsulation technique and polymer purity on microsphere characteristics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, n. 3, p. 295-305, 1998.

BOONEN, S. et al. Preventing osteoporotic fractures with antiresorptive therapy: implications of microarchitectural changes. **Journal of Internal Medicine**, v. 255(1), p. 1–12, 2004.

BRUSCHI, M. L. et al. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 264, p. 45–55, 2003.

CASTELLI, F. et al. Comparative study of ‘*in vitro*’ release of anti-inflammatory drugs from polylactide-co-glycolide microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 176, p. 85-98, 1998.

CERCHIARA, T. et al. Chitosan and poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) microparticles as nasal sustained delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 195-200, 2005.

CHAUHAN, B. Preparation and evaluation of floating risedronate sodium Gelucire 39/01 matrices. *Acta Pharmaceutica*, v. 54, p. 205-214, 2004.

CHAW, C. S. et al. Water-soluble betamethasone-loaded poly(lactide-co-glycolide) hollow microparticles as a sustained release dosage form. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 3, p. 349-359, 2003.

CHENG, K.C, DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J.M. Pullulan: biosynthesis, production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 29–44, 2011.

CHOURASIA, M.K.; JAIN, S.K. Potential of guar gum microspheres for target specific drug release to colon. **Journal of drug targeting**, v. 12, p. 435-442, 2004.

COLOMÉ, L. M. et al. Pantoprazole-loaded Eudragit blended microparticles: preparation, characterization, *in vitro* gastro-resistance and *in vivo* anti-ulcer evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 113-118, 2007.

CRANDALL, C. The role of serial bone mineral density testing for osteoporosis. **Journal of Womens health and Gender-based medicine**, v. 10, p. 887-895, 2001.

CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S. Pharmacology of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, p. 42-49, 2011.

CRUZ, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

CRUZ, L. et al. High encapsulation efficiency of sodium alendronate in Eudragit S100/HPMC blend microparticles. **Química Nova**, v. 32, p. 1170-1174, 2009.

CRUZ, L. et al. Gastroresistant microparticles containing sodium alendronate prevent the bone loss in ovariectomized rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p. 441-447, 2010a.

CRUZ, L. et al. Microencapsulation of sodium alendronate reduces drug mucosal damage in rats. **Drug Delivery**. v.17, p. 231–237, 2010b.

CRUZ, L. et al. Formulation and in vivo evaluation of sodium alendronate spray-dried microparticles intended for lung delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 152, p. 370-375, 2011.

CZURYSZKIEWICZ, T. et al. Synthesis of sol-gel silica materials providing a slow release of biphosphonate. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 254, p. 69-74, 2005.

DARAGON, A.; POUPLIN, S. Potential benefits of intermittent biphosphonate therapy in osteoporosis. **Joint Bone Spine**, v. 71, p. 2-3, 2004.

DAUBINÉ, F. et al. Nanostructured polyelectrolyte multilayer drug delivery systems for bone metastasis prevention. **Biomaterials**, v. 30, p. 6367-6373, 2009.

DE GROEN, P. C. et al. Esophagitis associated with the use of alendronate. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, p. 1016-1021, 1996.

DESAI, M. P. et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 12, p. 1838-1845, 1996.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, n. 2, p. 179-192, 2005.

DESAI, K.G. Properties of tableted high-amylose corn starch-pectin blend microparticles intended for controlled delivery of diclofenac sodium. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 21, p. 217-233, 2007.

DEY, N.S. et al. Multiparticulate Drug Delivery Systems for Controlled Release. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1067-1075, 2008.

DISSETTE, V. et al. Particulate adducts based on sodium risedronate and titanium dioxide for the bioavailability enhancement of oral administered bisphosphonates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 328-336, 2010.

EL-KAMEL, A.H. Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 220, p. 13-21, 2001.

ESPOSITO, E. et al. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **International Journal of Pharmacy**, v. 242, p. 329-334, 2002.

EZRA, A.; GOLOMB, G. Administration routes and delivery systems of biphosphonates for the treatment of bone resorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 42, p. 175-195, 2000.

FLEISCH, H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. **Drugs**, v. 42, p. 919-44, 1991.

FORSLIND, B. A domain mosaic model of the skin barrier. **Acta Dermato- Venereologica**, v.1, p. 74, 1994.

FREIBERG, R.J.; COZEAN, C. Pulsed erbium laser ablation of hard dental tissue: the effects of atomized water spray vs water surface film. **Lasers in Dentistry**, v. 4610, p. 74-84, 2002.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 1-18, 2004.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319-327, 2002.

HEGAZY, N.; DEMIREL, M.; YAZAN, Y. Preparation and *in vitro* evaluation of pyridostigmine bromide microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 171-174, 2002.

HUNTINGTON, D. H. The influence of the spray drying process on product properties. **Drying Technology**, v. 22, n. 6, p. 1261-1287, 2004.

IWATA, M.; MCGINITY, J. N. Dissolution, stability and morphological properties of conventional and multiphase poly(DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing water soluble compounds. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 8, 1219-1227, 1993.

JAIN, F. et al. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: Different preparative approaches. **Drug Development and industrial Pharmacy**, v. 24, p. 703-727, 1998.

KHOSLA, S. et al. Benefits and Risks of Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, p. 2272-2282, 2012.

KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, p. 25-35, 1983.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T.; GUDMUNDSSON, O.S.; INGVARSDOTTIR, K. Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 137, p. 159-165, 1996.

KURKURI, M. D.; AMINABHAVI, T. M. Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 9– 20, 2004.

LACHMAN, L. et al. Teoria e prática na indústria farmacêutica. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 1ª ed., v. 2, p. 551-578, 2001.

LANZA, F. L. et al. Endoscopic comparison of esophageal and gastroduodenal effects of risedronate and alendronate in postmenopausal women. **Gastroenterology**, v. 119, p. 631-638, 2000.

LI, W. W.; KENDLER, D. L. Pharmaceutical care and community pharmacists understanding of biphosphonate dosing information. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 29, p. 531-536, 2004.

LI, C. L. et al. The use of hypromellose in oral drug delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 533-546, 2005.

LIN, S.Y.; KAO, Y.H. Tablet study of spray-dried sodium diclofenac enteric-coated microcapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 7, p. 919-24, 1991.

LIN, J. H. Biphosphonates: a review of their pharmacokinetics properties. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 75-85, 1996.

LIONZO, M.I.Z. et al. Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(epsilon-caprolactone) blends to control the release of a drug model. **Journal of Microencapsulation**, v.24, p. 175-186, 2007.

LIU, L. et al. Pectin-based Systems for Colon-specific Drug Delivery via Oral Route, **Biomaterials**, v. 24, p. 3333-3343, 2003.

LU, L. et al. Controlled release of transforming growth factor beta 1 from biodegradable polymer microparticles, **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 50, p. 440-451, 2000.

LUPPI, B. et al. Gastroresistant microcapsules: new approaches for site-specific delivery of ketoprofen. **Drug Delivery**, v. 16, p. 24-29, 2009.

MALIK, K.; ARORA, G.; SINGH, I. Taste Masked Microspheres of Ofloxacin: Formulation and Evaluation of Orodispersible Tablets. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, p. 653-672, 2011.

MITCHELL, D.Y. et al. Risedronate gastrointestinal absorption is independent of site and rate of administration. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 228-232, 1998.

MITCHELL, D.Y. et al. Effect of renal function on risedronate pharmacokinetics after a single oral dose. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, p. 215-222, 2000.

MITCHELL, D.Y. et al. Risedronate Pharmacokinetics and Intra- and Inter-Subject Variability Upon Single-Dose Intravenous and Oral Administration. **Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 166-170, 2001.

MUNDARGI, R.C. et al. Formulation and in-vitro evaluation of novel starch-based tableted microspheres for controlled release of ampicillin. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 42-53, 2007.

NAM, S. H. et al. Ion pairs of risedronate for transdermal delivery and enhanced permeation rate on hairless mouse skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 114– 120, 2011.

NAM, S.H. et al. Topically administered Risedronate shows powerful anti-osteoporosis effect in ovariectomized mouse model. **Bone**, v. 50, p. 149-155, 2012.

NARAHARISETTI, P. K. et al. *In vitro* and *in vivo* release of gentamicin from biodegradable discs. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 329-337, 2005.

NASR, M. et al. A Reliable Predictive Factorial Model for Entrapment Optimization of a Sodium Bisphosphonate into Biodegradable Microspheres. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, p. 612-621, 2011a.

NASR, M. et al. Different modalities of NaCl osmogen in biodegradable microspheres for bone deposition of risedronate sodium by alveolar targeting. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 601–611, 2011b.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 1, p. 25-42, 1997.

ONEDA, F.; RÉ, M. I. The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic calcium salts. **Powder Technology**, v. 130, n. 1, p. 377-384, 2003.

PALMIERI, G. F. et al. Evaluation of spray-drying as a method to prepare microparticles for controlled drug release. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 20, p. 2859-2879, 1994.

PALMIERI, G. F. et al. Polymers with pH-dependent solubility: Possibility of use in the formulation of gastroresistant and controlled-release matrix tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 8, p. 837-845, 2000.

PALMIERI, G. et al. Spray-Drying as a method for microparticulate controlled release systems preparation: advantages and limits. I. Water-soluble drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 3, p. 195-204, 2001.

PAPAPOULOS, S. E. Bisphosphonate actions : Physical chemistry revisited. **Bone**, v. 38, p. 613-616, 2006.

PATEL, M.M.; AMIN, A.F. Process, optimization and characterization of mebeverine hydrochloride loaded guar gum microspheres for irritable bowel syndrome. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 536- 545, 2011.

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, n. 4, p. 110-111, 1985.

PÉREZ-LÓPEZ, F. R. Postmenopausal osteoporosis and alendronate. **Maturitas**, v. 48, p. 179-192, 2004.

RAFFIN, R. P. et al. Development of HPMC and Eudragit S100[®] blended microparticles containing sodium pantoprazole. **Pharmazie**, v. 62, n. 5, p. 361-364, 2007a.

RAFFIN, R.P. et al. Soft agglomerates of pantoprazole gastro-resistant microparticles for oral administration and intestinal release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 17, p. 407-413, 2007b.

RAVI KUMAR, M. N. V. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

REGINSTER, J. Y.; RABENDA, V.; NEUPREZ, A. Adherence, patient preference and dosing frequency: Understanding the relationship. **Bone**, v. 38, p. S2–S6, 2006.

ROBESON, L.M. Polymer Blends: A comprehensive review. 1 ed., **Munich: Carl Hanser Verlag**, 2007.

ROWE, R.C. et al. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, ed. 6, 2009.

SENER, G. et al. Protective effect of taurine against alendronate-induced gastric damage in rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, p. 93-100, 2004.

SHESHALA, R.; KHAN, N.; DARWIS, Y. Formulation and Optimization of Orally Disintegrating Tablets of Sumatriptan Succinate. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, p. 920-928, 2011.

SHIDHAYE, S. et al. Taste Masked, Orally Disintegrating Tablet Containing Microspheres for Immediate Release. **Journal of Pharmacy Research**, v.1, p. 225- 229, 2008.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SINGH, R.S. ; SAINI, G.K.; KENNEDY, J.F. Pullulan: microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 515-531, 2008.

STEPAN, J.J. et al. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. **Endocrine Regulations**, v.37, p. 225–238, 2003.

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

VARDE, N. K.; PACK, D. W. Microspheres for controlled release drug delivery. **Expert Opinion on Biology Therapy**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2004.

ZERBINI, A.P.N.A.; FERRAZ, H.G. Sistemas multiparticulados: minicomprimidos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, n. 2, v. 32, 2011.

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

YATES, A. J.; RODAN, G. A. Alendronate and osteoporosis. **Drug Delivery Today**, v. 3, n. 2, p. 69-78, 1998.

WALLACE, J.L. et al. N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, p. 1675-1682, 1999.

WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 1-12, 1990.

WU, P.C. et al. Preparation and evaluation of sustained release microspheres of potassium chloride prepared with ethylcellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 115-121, 2003.