

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

JULIA DE OLIVEIRA PRIMO

**ESTUDO VISANDO À OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS E
GÉIS DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2015

JULIA DE OLIVEIRA PRIMO

**ESTUDO VISANDO À OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS E
GÉIS DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 (TCC2), do Curso de Licenciatura em Química do Departamento Acadêmico de Química – DAQUI da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaelle B. Romero.

CAMPO MOURÃO

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Câmpus Campo Mourão
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Departamento Acadêmico de Química - DAQUI
Curso de Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO VISANDO À OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS E GÉIS DE QUITOSANA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

por

JULIA DE OLIVEIRA PRIMO

Este trabalho foi apresentado em 11 de dezembro de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química. A Candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^a. Dr^a. Estela dos Reis Crespan

(UTFPR)

Prof. Msc. Adriano Lopes Romero

(UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Rafaelle Bonzanini Romero

(UTFPR)

AGRADECIMENTOS

Pensar sobre o percurso, é a melhor forma de agradecer a tantas pessoas que caminharam comigo durante a graduação. Tenho poucas certezas, mas uma delas é a de que não cheguei sozinha até aqui. A trajetória não foi nada fácil, mas ela me trouxe grandes amigos. Agradeço a Deus, por me guiar e colocar essas pessoas especiais no meu caminho e principalmente por me abençoar com as vitórias conquistadas até hoje.

Não tenho palavras para expressar o quanto todos significam para mim, não caberiam em um livro, apesar de ser sucinta.

Quero agradecer à minha família que é meu porto seguro, por estar sempre ao meu lado, me dando apoio, incentivo, amor, compreensão, acreditando na minha capacidade. Amo vocês!

Não tem como deixar de agradecer uma das pessoas que mais contribuiu para a minha formação, mesmo não fazendo parte da minha família me acolheu como uma filha, como ela mesma disse: são meus filhos de laboratório. Agradeço imensamente à Profa. Dra. Rafaelle B. Romero, uma orientadora dedicada, incansável, de uma capacidade incontestável e admirável. Sou muita grata por tudo que fez por mim nesses anos em que estive sob sua orientação, principalmente nestes últimos meses, pela amizade, incentivo, paciência, oportunidades e carinho, com certeza fui muito feliz na escolha que fiz. Minha imensa gratidão!

Aos professores Adriano e Estela por aceitar fazer parte da banca deste trabalho de conclusão de curso, e também por me ensinar valores que vai além de conteúdos. Sendo exemplos de professores a serem seguidos.

Ao professor Gustavo, por me ensinar a levantar questionamentos, a não se calar diante dos pré-conceitos, a ter opinião sobre normas e padrões, respeitando as diferenças, mas principalmente por despertar em mim o interesse em ser professora. Minha eterna admiração e gratidão, mesmo “mim” corrigindo.

Aos demais professores que contribuíram para minha formação.

Ao professor Dr. Adley F. Rubira da UEM, pelas análises realizadas e empréstimo do seu laboratório de pesquisa.

A todos os amigos do eterno laboratório G007, Danilo (adotado), João Pedro, Mirele, Thayle, Leandro, Letícia, Hellen, pessoas que para mim, tiveram vital importância, seja na realização de experimentos ou auxiliando na execução deste trabalho. Mas principalmente

pela amizade, por estarem sempre presentes em todos os momentos. Agradeço a minha parceira de laboratório Karin, com seu modo prestativo muitas vezes cedeu seu tempo para me auxiliar na conclusão deste projeto. Não tenho palavras para te agradecer.

Aos meus eternos amigos, confidentes e cúmplices em todos os momentos, Kamila, Mônica e Juliano, obrigada por essa amizade de grandes histórias e companheirismo. Por não me deixarem desistir quando todos queriam fazer o mesmo. Obrigada Ka, por sempre estar ao meu lado mesmo estando longe, os momentos com você sempre serão memoráveis. Moniquinha a jovem idosa de 20 e 1, obrigada por todo apoio, amizade, choro, risos e sinceridade. E ao Juliano, popularmente conhecido como baldinho ou professor universal, agradeço pela sua amizade e socorros ao longo dessa graduação. Foi uma longa caminhada.

À Isabel, Simone e Graciele pela amizade, apoio e orações.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

PRIMO, Julia O. P. Estudo Visando à Obtenção de Nanopartículas e Géis de Quitosana para Liberação Controlada de Substâncias Bioativas. 2015. 89 f. TCC (Curso de Licenciatura em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

Na busca de novos compostos farmacologicamente ativos, vários estudos tem buscado minimizar os efeitos indesejados dos anti-inflamatório não-esteróide, seja pela busca por uma forma de administração mais cômoda e eficiente, como também fornecer ao paciente um fármaco mais potente e com menos efeitos colaterais. Desse modo, buscando contribuir para os avanços no desenvolvimento de novos fármacos, o presente trabalho objetivou estudar a liberação controlada do naproxeno e dos derivados naproxenatos de eugenila e de timila. Para isso, géis, blendas e micropartículas de quitosana foram preparadas. A fim de se obter esses géis, uma amostra de quitosana com grau de desacetilação de 75-85% foi acetilada em meio heterogêneo utilizando piridina e anidrido acético. As características estruturais do produto obtido foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e determinação do grau de acetilação pelo método volumétrico (ASTM D871-72). Os resultados obtidos por estas técnicas sugerem um grau de *N*-acetilação de 99,5%, valor concordante com dados da literatura. Através da solubilização da *N*-acetilquitosana em uma mistura de *N,N*-dimetilformamida/5% LiCl foram obtidos géis que apresentaram alta estabilidade, mesmo após lavagens com água destilada. Géis de *N*-acetilquitosana e blendas de *N*-acetilquitosana/Acetato de celulose com substâncias bioativas (naproxeno, naproxenato de timila e de eugenila) foram produzidos utilizando o método *casting*. As características morfológicas das superfícies de fratura dos géis de *N*-acetilquitosana puro foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura. A morfologia revelou uma superfície lisa e indica um filme denso e uniforme. As blendas obtidas são opacas indicando imiscibilidade do sistema, entretanto com a incorporação das substâncias bioativas o sistema tornou-se transparente, sugerindo que o naproxeno atua como compatibilizante. As cinéticas de liberação das substâncias bioativas incorporadas nos géis de *N*-acetilquitosana foram avaliadas por espectroscopia UV-Vis em períodos de tempo pré-determinados. Para o sistema *N*-acetilquitosana/naproxeno, em 8 minutos observou-se a liberação de 90% de naproxeno. Já para a blenda observou-se uma liberação mais controlada, liberando 20% de naproxeno em 5 minutos. As micropartículas foram obtidas por diferentes métodos, de maneira geral as partículas possuem diferentes morfologias, com tamanho médio de 1 μm . As partículas de ALG-QT preparados com naproxeno, possuem morfologia semelhante das micropartículas puras. O estudo de liberação mostrou que as micropartículas preparados pelo método indireto, inicialmente apresentaram um perfil de liberação mais controlado. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que géis de *N*-acetilquitosana são promissores sistemas para liberação transdérmica de fármacos que, em condições reais (*in vivo*), poderão ser utilizados para melhorar/otimizar o tempo de ação e manter a concentração terapêutica de substâncias bioativas.

Palavras chave: Quitosana, Géis e Micropartículas, Liberação Controlada.

ABSTRACT

PRIMO, Julia O. P. Obtention of Chitosan Microparticles and Gels for Bioactive Substances Controlled Release. 2015. 89 f. TCC (Curso de Licenciatura em Química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

In the search for new pharmacologically active compounds, several studies have sought to minimize the unwanted effects of non-steroidal anti-inflammatory, is the search for a more comfortable and efficient form of management, but also provide the patient with a more potent drug with fewer side effects. Thereby seeking to contribute to advances in the development of new drugs, this study investigated the controlled release of naproxen and eugenyl and thymyl naproxenates. For this, gels, microparticles and chitosan blends were prepared. In order to obtain these gels, a sample of chitosan, with a degree of deacetylation of 75-85%, was acetylated in heterogeneous medium using pyridine and acetic anhydride. The structural characteristics of the obtained product was analyzed by infrared spectroscopy, ^{13}C nuclear magnetic resonance and *acetylation degree was determined by a volumetric method* (ASTM D871-72). The results suggest a *N*-acetylation degree of 99.5%, in agreement with the literature value. Through of the *N*-acetylchitosan solubilization in a mixture of *N,N*-dimethylformamide/5% LiCl were obtained gels that showed a high stability, even after washing with distilled water. *N*-acetylchitosan gels and of *N*-acetylchitosan/cellulose acetate blends with bioactive substances (naproxen, eugenyl and thymyl naproxenates) were produced using the casting method. The morphological characteristics of the fracture surfaces of the pure *N*-acetylchitosan gels were investigated by scanning electron microscopy. The morphology revealed a smooth surface and shows a dense and uniform film. The blends obtained are opaque indicating immiscibility of the system, however with the addition of bioactive substances the system became transparent, suggesting that naproxen acts as compatibilizer. The release kinetics of the bioactive substances incorporated in *N*-acetylchitosan gels were evaluated by UV-Vis spectroscopy at predetermined periods of time. For the *N*-acetylchitosan/naproxen system, in 8 minutes, was observed to release 90% of naproxen. As for the blends there was a more controlled release, by releasing 20% of naproxen in 5 minutes. The microparticles were obtained by different methods, the particles showed different morphologies, with an average size of 1 μm . The ALG-QT particles prepared with naproxen, have similar morphology that pure microparticles. The release study showed that the microparticles prepared by the indirect method, initially showed a more controlled release profile. The results of this study indicate that *N*-acetylchitosan gels are promising systems for transdermal drug delivery, in real conditions (in vivo), may be used to improve/optimize the time of action and maintain therapeutic concentration of bioactive substances.

Keywords: Chitosan, Gels and Microparticles, Controlled Release Drug.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da quitina e da quitosana, e o seu processo de desacetilação.....	19
Figura 2: Representação esquemática da quitina ($\text{NHCOCH}_3 > \text{NH}_2$) ou quitosana ($\text{NH}_2 > \text{NHCOCH}_3$).	20
Figura 3: <i>N</i> -acetilação seletiva no grupamento amínico ($-\text{NH}_2$)	21
Figura 4: Alquilação seletiva da quitosana.	22
Figura 5: Formação de base de Schiff da quitosana com aldeído	23
Figura 6: <i>N</i> -carboximetilação da quitosana por Alquilação redutiva.	23
Figura 7: Perfil de liberação de drogas em função do tempo: convencional x controlada.....	26
Figura 8: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.....	30
Figura 9: Representação esquemática do método de produção de partículas por coacervação.....	32
Figura 10: Processo de agregação de dois polieletrólitos com a formação do complexo..	33
Figura 11: Representação esquemática do método de produção de partículas por spray-drying.	34
Figura 12: Produção de partículas pelo método de emulsão/evaporação do solvente.....	35
Figura 13: Estrutura química do Naproxeno e dos Naproxenatos de eugenila e timila.	37
Figura 14: (a) Fotografia do processo de acetilação e (b) fotografia do produto obtido após a acetilação da quitosana.	40
Figura 15: Esquema para obtenção das partículas de Alginato e Quitosana (ALG-QT)..	47
Figura 16: Espectro de FTIR da quitosana pura (QT)...	51
Figura 17: Espectro de FTIR da <i>N</i> -acetilquitosa (A-QT).	51
Figura 18: Espectro de FTIR da quitosana pura (QT) e da <i>N</i> -acetilquitosana (A-QT)..	52
Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C da quitosana pura	53
Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C da <i>N</i> -acetilquitosana.....	53
Figura 21: Fotografia dos géis de <i>N</i> -acetilquitosana em DMA/5% LiCl: (a) gel sem lavagem, (b) gel após a lavagem com água destilada e (c) gel seco.....	58
Figura 22: Micrografias de MEV da superfície de fratura do géis de <i>N</i> -acetilquitosana puro.	59

Figura 23: Fotografia dos géis de <i>N</i> -acetilquitosana puro e com naproxeno e das blendas <i>N</i> -acetilquitosana/acetato de celulose puras e com naproxeno	60
Figura 24: Fotografia dos géis de <i>N</i> -acetilquitosana com naproxenato de eugenila (a) e timila (c) e das blendas <i>N</i> -acetilquitosana/acetato de celulose com naproxenato de eugenila (b) e timila (d).....	61
Figura 25: Curvas de intumescimento das amostras A-QT/NE, A-QT/11AC/NE, A-QT/NT, A-QT/11AC/NT, A-QT, A-QT/60AC, A-QT/11AC, A-QT/43AC em função do tempo.....	62
Figura 26: Espectro de absorbância versus comprimento de onda das soluções do naproxeno..	64
Figura 27: Curva analítica do naproxeno ($\lambda = 332 \text{ nm}$)	64
Figura 28: (a) Espectro de absorbância versus comprimento de onda do gel de <i>N</i> -acetilquitosana com naproxeno em função do tempo. (b) Ampliação da região de absorção máxima do naproxeno	65
Figura 29: (a) Espectro de absorbância versus comprimento de onda das blendas de <i>N</i> -acetilquitosana/acetato de celulose com naproxeno em função do tempo. (b) Ampliação da região de absorção máxima do naproxeno.....	65
Figura 30: Espectro de absorbância versus comprimento de onda do gel de <i>N</i> -acetilquitosana puro e do filme de acetato de celulose puro em função do tempo.	66
Figura 31: Espectro de absorbância versus comprimento de onda: (a) do gel de <i>N</i> -acetilquitosana com naproxenato de eugenila e (b) das blendas <i>N</i> -acetilquitosana/11 acetato de celulose com naproxenato de eugenila em função do tempo.....	66
Figura 32: Espectro de absorbância versus comprimento de onda: (a) do gel de <i>N</i> -acetilquitosana com naproxenato de timila e (b) das blendas <i>N</i> -acetilquitosana/11 acetato de celulose com naproxenato de timila em função do tempo.....	65
Figura 33: Curva de liberação do naproxeno dos géis de <i>N</i> -acetilquitosana e das blendas de <i>N</i> -acetilquitosana/acetato de celulose obtidos no comprimento de onda de 330 nm.	67
Figura 34: Imagens de Microscopia óptica das microesferas de quitosana obtidas pelo método de coagulação em meio alcalino.....	69
Figura 35: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana pura, obtidas pelo método direto, utilizando agitação magnética.	70
Figura 36: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana pura, obtidas pelo método indireto, utilizando agitação magnética.....	71

Figura 37: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana pura, obtidas pelo método direto, utilizando ultrassom.....	71
Figura 38: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana com naproxeno, obtidas pelo método direto, utilizando agitação magnética	71
Figura 39: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana com naproxeno, obtidas pelo método indireto, utilizando agitação magnética	72
Figura 40: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana com naproxeno obtidas pelo método direto, utilizando ultrassom.....	72
Figura 41: Representação esquemática dos hidrogéis de ALG/Ca revestidos com quitosana: (a) formação dos intra e inter-complexos e (b) formação dos intra-complexos.....	73
Figura 42: Teste de intumescimento das micropartículas em meio gástrico simulado (pH 1,2)..	74
Figura 43: Fotografia das micropartículas de quitosana: (a) ALG-QT - DU, (b) ALG-QT/N-DU, (c) QT/ALC e (d) ALG-QT/N-IM, antes e depois do teste de intumescimento em pH 1,2.	74
Figura 44: Teste de intumescimento das partículas em meio intestinal simulado (pH 7,4).....	76
Figura 45: Fotografia das partículas de quitosana: (a) ALG-QT - DU, (b) ALG-QT/N-DU, (c) QT/ALC e (d) ALG-QT/N-IM, antes e depois do teste de intumescimento em pH 7,4.	76
Figura 46: Espectros de absorvância versus comprimento de onda das micropartículas de ALG-QT com naproxeno obtidos pelo método direto, utilizando agitação magnética, em função do tempo em pH = 1,2.	77
Figura 47: Espectros de absorvância versus comprimento de onda das micropartículas de ALG-QT com naproxeno obtidos pelo método direto, utilizando ultrassom, em função do tempo em pH = 1,2.	78
Figura 48: Espectros de absorvância versus comprimento de onda das micropartículas de ALG-QT com naproxeno obtidos pelo método indireto, utilizando agitação magnética, em função do tempo em pH = 1,2.....	78
Figura 49: Curvas de liberação das micropartículas ALG-QT/N obtidas pelo método direto e indireto, com agitação magnética e ultrassom, no comprimento de onda de 330 nm, em fluídos de simulação gástrico	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Anti-inflamatórios não-esteróides
ALG	Alginato de sódio
ALG-Ca	Alginato de sódio / Cálcio
ALG-QT	Micropartículas de Alginato de sódio e Quitosana
ALG-QT - DU	Micropartículas de Alginato de sódio e Quitosana obtidas pelo Método Direto utilizando Ultrassom
ALG-QT-DM	Micropartículas de Alginato de sódio e Quitosana obtidas pelo Método Direto utilizando agitação Magnética
ALG-QT-IM	Micropartículas de Alginato de sódio e Quitosana obtidas pelo Método Indireto utilizando agitação magnética
ALG-QT/N - DM	Micropartículas de Alginato de sódio e Quitosana e naproxeno obtidas pelo Método Direto utilizando agitação magnética
ALG-QT/N-DU	Micropartículas de Alginato de sódio e Quitosana e naproxeno obtidas pelo Método Direto utilizando Ultrassom
ALG-QT/N-IM	Micropartículas de Alginato de sódio e Quitosana e naproxeno obtidas pelo Método Indireto utilizando agitação magnética
A-QT	Géis de <i>N</i> -acetilquitosana pura
A-QT/11AC	Blendas de <i>N</i> -acetilquitosana/11% de Acetato de Celulose
A-QT/11AC/N	Blendas de <i>N</i> -acetilquitosana/ 11% de Acetato de Celulose com naproxeno
A-QT/AC	Blendas de <i>N</i> -acetilquitosana/Acetato de Celulose
A-QT/N	Géis de <i>N</i> -acetilquitosana com naproxeno
A-QT/NE	Géis de <i>N</i> -acetilquitosana com Naproxenato de Eugenila
A-QT/NT	Géis de <i>N</i> -acetilquitosana com Naproxenato de Timila

CaCl₂	Cloreto de cálcio
DMA	<i>N,N</i> -dimetilacetamida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier
GI%	Grau de intumescimento
GS	Grau de substituição
HCl	Ácido clorídrico
LiCl	Cloreto de lítio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia óptica
NaOH	Hidróxido de sódio
QT	Quitosana
QT/ALC	Micropartículas de <i>N</i> -acetilquitosana e Alginato de sódio obtidas pelo método de coagulação alcalina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO TEÓRICA	18
2.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	18
2.2 QUITOSANA	18
2.2.1 Modificações da Quitosana	20
2.2.2 Blendas de Quitosana	24
2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	25
2.4 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO	26
2.4.1 Pele como via de administração	26
2.4.2 Via oral de administração	28
2.5 NANOTECNOLOGIA	29
2.5.1 Nanopartículas poliméricas	29
2.5.2 Técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas	30
2.5.2.1 Coacervação	31
2.5.2.2 Complexação Polieletrólítica	32
2.5.2.3 <i>Spray-drying</i>	33
2.5.2.4 Emulsificação/Evaporação do Solvente	34
2.6 SUBSTÂNCIA BIOATIVA	35
2.6.1 Naproxeno	36
3 OBJETIVO	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 REAGENTES	39
4.2 MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA: PREPARAÇÃO DA <i>N</i> -ACETILQUITOSANA	39
4.2.1 Teste de solubilidade do material obtido	40
4.2.2 Caracterizações da <i>N</i> -Acetilquitosana	40
4.2.2.1 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	40
4.2.2.2 Ressonância magnética nuclear de ¹³ C (RMN)	41
4.2.2.3 Determinação do grau de acetilação da <i>N</i> -acetilquitosana	41
4.3 PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE <i>N</i> -ACETILQUITOSANA	42
4.3.1 Preparação de géis de <i>N</i> -acetilquitosana (A-QT) e Blendas de <i>N</i> -acetilquitosana/Acetato de Celulose (A-QT/AC)	42
4.3.2 Caracterização dos géis <i>N</i> -Acetilquitosana	43
4.3.2.1 Caracterização Morfológica	43
4.3.2.2 Teste de intumescimento	44
4.3.2.3 Liberação controlada da substância bioativa	44
4.4 PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA	45
4.4.1. Método de Coacervação	45
4.4.2 Complexação Polieletrólítica: Método de reação indireta	45
4.4.3 Complexação Polieletrólítica: Método de reação direta	46
4.4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	47
4.4.4.1 Caracterização Morfológica	47
4.4.4.2 Teste de intumescimento	48
4.4.4.3 Liberação controlada da substância bioativa	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 CARACTERIZAÇÕES DA <i>N</i> -ACETILQUITOSANA	49

5.1.1 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	49
5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C.....	51
5.1.3 Determinação do grau de acetilação da <i>N</i> -acetilquitosana.....	53
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE N-ACETILQUITOSANA.....	54
5.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BLENDA DE <i>N</i> -ACETILQUITOSANA/ACETATO DE CELULOSE	58
5.2.2 Teste de Intumescimento.....	60
5.2.3 Liberação controlada da substância bioativa.....	62
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA	66
5.3.1 Grau de Intumescimento das Partículas	71
5.3.2 Liberação controlada da substância bioativa.....	75
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

O uso de polímeros, principalmente os naturais, tem sido de vital importância para o avanço das ciências, apresentando inúmeras vantagens como a sua fácil obtenção, biocompatibilidade e biodegradabilidade (AZEVEDO, 2007). Esses materiais poliméricos vêm sendo empregados em diversos campos como na engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, farmacêutica e odontologia (AZEVEDO, 2002). Além disso, esses materiais vêm ganhando destaque na indústria farmacêutica e química, com avanços na elaboração de sistemas de liberação controlada.

Sistema de liberação controlada é definido como um método em que as substâncias bioativas se fazem disponíveis para um alvo específico, a uma taxa e duração pré-determinadas, para gerar os efeitos necessários (SOPPIMATH, 2001). O emprego de matrizes poliméricas biodegradáveis para estes sistemas é o mais adequado, pois sua degradação *in vivo* gera fragmentos menores que podem ser excretados pelo corpo, devendo ser atóxicos, e assim não criando nenhuma resposta inflamatória (AZEVEDO, 2002). Esses produtos podem ser aplicados pelas vias parenterais, transdérmica, oral, vaginal, nasal, ocular etc. Destacando-se entre elas a administração cutânea, com desenvolvimento de sistemas transdérmicos, com a liberação chegando até a corrente sanguínea para uma ação local ou sistêmica (MARTINS; VEIGA, 2002).

Fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade, ou que possui na sua composição uma substância ativa com efeito colateral de irritação local, podem ter esses problemas solucionados quando preparados com uma matriz polimérica que proporciona uma liberação controlada (PALMIERI et al., 2002; SJOBLOM, 2004), encontrando-se disperso ou dissolvido no sistema.

A natureza dos polímeros empregados como matriz de liberação controlada de fármacos influencia significativamente no tamanho e no perfil de liberação do sistema, produzidos muitas vezes em uma escala reduzida de tamanho (FERRARI, 2005). Os biopolímeros mais estudados atualmente são: poli(ácido lático), poli(hidroxibutirato), poli(succinato de butileno), policaprolactona, poliésteres, celulose, colágeno, alginato de sódio e a quitosana (ZHANGA et al., 2013; PARVEEN et al., 2012; VASCONCELLOS et al., 2011), etc.

Dentre as matrizes poliméricas empregadas para liberação controlada de fármacos, destaca-se a quitosana, por ser um polissacarídeo catiônico obtido de fonte renovável,

hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade (SINHA et al., 2004). Seu emprego para a formação de sistemas de liberação controlada inclui a habilidade de controlar a liberação de agentes ativos, e de não necessitar de solventes orgânicos durante a síntese de partículas, devido a sua solubilidade em meio ácido (DASH et al., 2011). Os sistemas produzidos com quitosana são mucoadesiva, facilitando a passagem do princípio ativo, podendo ser administrada por via oral, nasal, ocular e cutânea.

A quitosana é obtida pela desacetilação alcalina da quitina, encontrada em exoesqueletos de crustáceos, insetos, parede celular de fungos etc. Quitina e Quitosana são copolímeros constituídos por unidades *N*-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções variáveis, sendo diferenciadas pelo grau médio de acetilação (GA), propriedades físico-químicas, como pKa, viscosidade e solubilidade (KUBOTA et al., 2000; MUZZARELLI, 1973).

A modificação da estrutura química de biopolímeros, a fim de conferir-lhes propriedades funcionais adicionais é uma atividade de pesquisa muito explorada (GONSALVES; ARAÚJO, 2011). Neste aspecto, a quitosana por ser um biopolímero que apresenta sítios reativos versáteis para modificações químicas, favorecendo interações com outras espécies moleculares, tanto dissolvidas quanto dispersas, pode sofrer modificações como a quelação, complexação, microencapsulação, emulsificação, floculação, estabilização ou suspensão, uma vez que derivados de quitosana obtidos por meio de uma de suas modificações apresentam diversas aplicações biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas (MUZZARELLI, 1996).

Devido à presença de grupamentos hidroxílicos e amínicos em sua cadeia, a quitosana, de caráter hidrofílico, permite sua utilização como biomaterial na forma de comprimidos, micro e nano partículas, géis, hidrogéis e membranas em diversas aplicações, como veículo de liberação de fármacos (BORCHARD, 2001; LEE; PARK, 1995). A quitosana apresenta várias propriedades farmacológicas, contribuindo para o processo de cicatrização de feridas. Antitumorais, efeito antifúngico, atividade antiácida e antiúlcera, ação hemostática, hipocolesterolêmico e hipouricêmico (MUZZARELLI, 1996; KUMAR, 2000).

Como visto, a quitosana possui propriedades que instigam o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, com isso o estudo crescente acerca dela é justificável e merece destaque. Mas é necessário um amplo estudo sobre a formação de um sistema com propriedades específicas, estabelecendo parâmetros no seu processo de produção. Assim, ao escolher o sistema adequado para a liberação do fármaco estudado, podemos utilizar meios na tentativa de aprimorar a processabilidade e as propriedades mecânicas para ser utilizado como

carregador de fármaco (ABREU, 2008), e as blendas poliméricas é uma forma simples de combinar as vantagens de diferentes materiais apresentando propriedades amplificadas de ação farmacológica. Podendo ser compostas de uma vasta variedade de polímeros, sendo os mais utilizados o polietileno glicol (PEG), poli (álcool vinílico) (PVA), poli (ácido acrílico) (PAA), poli(acetato de vinila) (PVAc) etc (ABREU, 2008).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nano e micropartículas e géis à base de quitosana, para o emprego em sistemas de liberação controlada de substâncias bioativas. Para este fim, o naproxeno, naproxenato de timila e o naproxenato de eugenila foram utilizados como substâncias bioativas modelo.

2 REVISÃO TEÓRICA

2.1 POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Polímeros biodegradáveis são materiais em que a sua degradação resulta da ação de microrganismos, tais como fungos, bactérias e algas de ocorrência natural, formando CO_2 , CH_4 e H_2O , componentes celulares (FRANCHETTI; MARCONATO 2006). Sua biodegradabilidade depende de fatores como a sua estrutura química, massa molar, origem, e condições em que é exposto.

Os polímeros biodegradáveis utilizados podem ser de origem natural ou sintética. Geralmente, os sintéticos apresentam vantagens por permitirem modificações de suas propriedades durante o processo de síntese, diferentemente dos naturais. Os *Polímeros naturais* tais como o amido, a celulose e a quitosana são biodegradáveis e amplamente utilizados como matrizes em liberação de fármacos (AZEVEDO, 2002). No entanto, devido ao grande tempo para degradabilidade dos polímeros naturais, estes são modificados adicionando-se grupos polares às cadeias, que por serem mais lábeis podem diminuir o tempo de degradação. Como exemplo pode-se citar os polímeros naturais modificados obtidos a partir da reticulação de quitosana utilizando-se glutaraldeído e da transformação de celulose em acetato de celulose (AZEVEDO, 2002). E por fim, temos os *Polímeros sintéticos*, que são aqueles que fazem parte do cotidiano, considerados versáteis e muito utilizados, por exemplo, os poli (etileno), poli (álcool vinílico) e poliésteres (ORÉFICE et al., 2006; LIU et al., 2009; SWARBRICK, 2007).

2.2 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo derivado da desacetilação alcalina da quitina (**Figura 1**), abundante no exoesqueleto de crustáceos, na parede celular de fungos e outros materiais biológicos, sendo considerado o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, ficando atrás apenas da celulose. Foi isolada pela primeira vez em 1859 pelo

Devido a sua grande versatilidade a quitosana apresenta várias aplicações na área farmacológica. Mas sua insolubilidade em água e em alguns solventes orgânicos limita seu uso como suporte de fármacos, estimulando assim modificações químicas na sua cadeia.

2.2.1 Modificações da Quitosana

A modificação da estrutura química de biopolímeros confere propriedades funcionais adicionais ou simplesmente melhora seus atributos já característicos. A quitosana é um biopolímero que apresenta sítios reativos versáteis para modificações químicas, o que a insere em um conjunto de biomoléculas de grande interesse para pesquisadores de diversos ramos da ciência, uma vez que derivados de quitosana obtidos por meio dessas transformações demonstram diversas aplicações biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Os biopolímeros quitina e quitosana apresentam duas hidroxilas (-OH) reativas, sendo uma primária na posição C-6 e a outra, secundária na posição C-3, como apresentado na **Figura 2**, sendo mais reativa a hidroxila do C-6. A diferenciação entre esses dois biopolímeros está no grupamento pendente na posição C-2, que no caso da quitina, o grupo acetamido (-NHCOCH₃) ali se apresenta, enquanto que na quitosana essa posição é ocupada pelo grupo amina (-NH₂) (LIMA, 2010). Sendo este o grupamento presente na quitosana que se comportam como um polieletrólito catiônico em meio ácido, tornando-a mais solúvel e conseqüentemente, mais reativa (SANTOS et al., 2003; JUSTI et al., 2004; COELHO et al., 2007; LIMA, 2010).

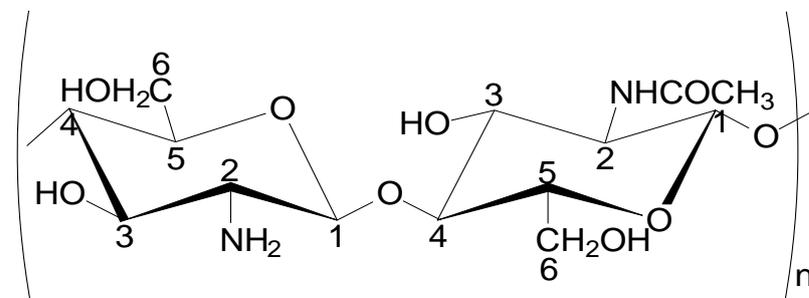


Figura 2: Representação esquemática da quitina (NHCOCH₃ > NH₂) ou quitosana (NH₂ > NHCOCH₃).
Fonte: Autoria própria.

Ambos os grupamento hidroxilas e amino possuem pares de elétrons livres, que podem ser compartilhados, podendo atuar como base em reações ácido-base e também como um nucleófilo em reações de substituição, como por exemplo, em acilação e em alquilação (SANTOS et al., 2003). Sendo o grupamento amino da quitosana mais reativo que os grupamentos hidroxílicos (LIMA, 2010).

E é devido a esses grupamentos reativos presentes em sua cadeia que, a quitosana apresenta uma das características mais interessantes, a sua versatilidade para modificação química. A presença de grupos amino propicia inúmeras modificações químicas na superfície do polímero (LAUS et al., 2006; LIMA, 2010). Podendo introduzir novos grupos funcionais na cadeia polimérica da quitosana obtendo-se inúmeros derivados a fim de atingir as finalidades desejadas. Nessa função, podem ser feitas várias reações de modificação, dentre as quais se destacam as reações de acilação, alquilação, formação de base de Schiff, carboxilação, N-ftaloilação, sililação, tosilação etc (BODNAR et al, 2005). Sendo algumas destas reações discutidas a seguir.

A acilação da quitosana com anidridos carboxílicos ocorre preferencialmente, nos grupos amino livre, conforme mostra a **Figura 3**, pois a reação nos grupamentos hidroxílicos é mais lenta (KURITA, 2006; LIMA, 2010). Este tipo de modificação dependendo da intensidade ao longo da cadeia confere ao produto obtido solubilidade em solventes orgânicos como o clorofórmio (ABRAM, 2004). Sendo uma modificação não regioseletivas por conta das condições heterogêneas da reação, por exemplo, as acilações com os anidridos ácidos na mistura do ácido acético e metanol aquosos, favorece quase que seletivamente o grupo amino, mas a *O*-acilação ocorre igualmente a baixas extensões, formando produtos acilados que precipitam ou formam géis devido à redução da solubilidade (LIMA, 2010).

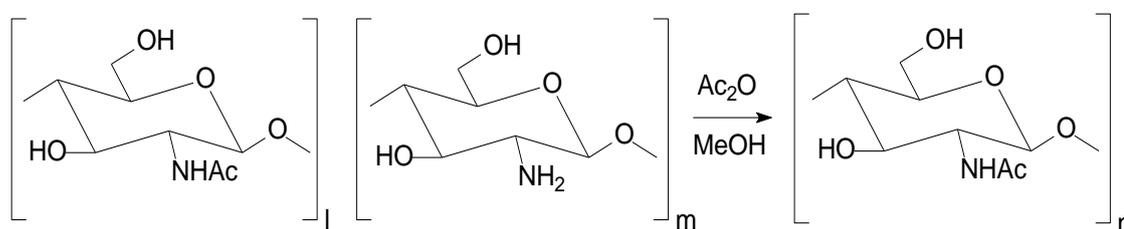


Figura 3: N-acetilação seletiva no grupamento amínicos (-NH₂).
Fonte: Autoria própria.

Diferentemente da acilação a alquilação, é regioseletiva, dependendo apenas do meio reacional, sendo que em condições alcalinas ocorre no grupamento hidroxila, mas em

condições neutras ou ácidas, o produto se forma pela alquilação da amina (ABRAM, 2004). A alquilação da quitosana com óxido de propileno, por exemplo, é controlado pelo pH da solução. Onde a reação ocorrerá preferencialmente nos grupos hidroxilícos ou amínicos dependendo da condição do meio submetido, como pode ser observado na **Figura 4** (KURITA, 2006).

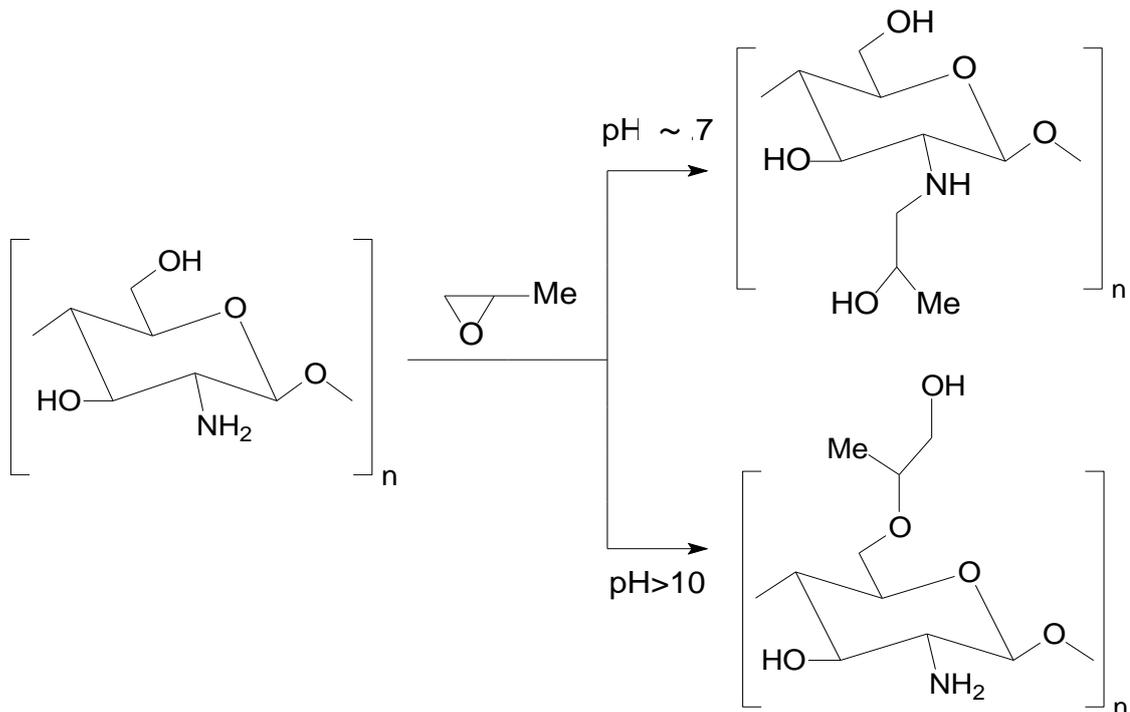


Figura 4: Alquilação seletiva da quitosana.
Fonte: Autoria própria.

A condensação do grupo amino livre da quitosana com aldeídos ou cetonas favorece a formação de bases de Schiff e a reação é dada pela mistura dos solventes, ácido acético e metanol, como ilustrado na **Figura 5**. A reação no estágio inicial é homogênea, com formação de um gel devido à baixa solubilidade das bases de Schiff resultantes. A formação de bases de Schiff pode ser usada para proteção do grupo amino na cadeia em modificações químicas dos grupos hidroxila restantes (KURITA, 2006). Um reticulante muito utilizado é o glutaraldeído, para a formação de base de Schiff em quitosana.

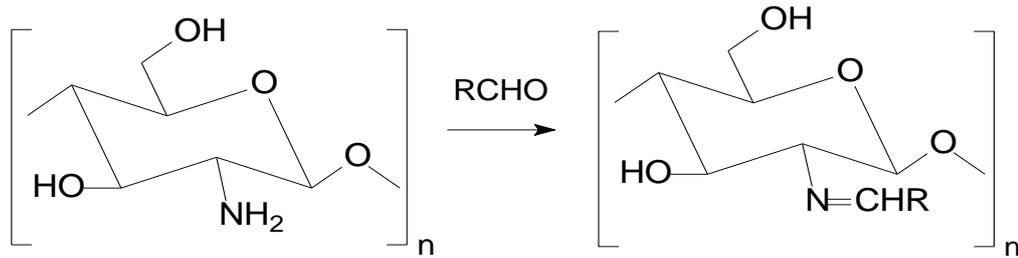


Figura 5: Formação de base de Schiff da quitosana com aldeído.
Fonte: Autoria própria.

A *N*-carboximetilação da quitosana é efetuada com a formação de uma base de Schiff com ácido glioxílico e sofre redução com cianoboridreto de sódio, como ilustrado na **Figura 6**. Este método conduz à carboximetilação regioesletivas do grupo amino. Outros derivados de quitosana *N*-carboxilados são preparados a partir de ácidos carboxílicos tendo um grupo aldeído ou cetona (KURITA, 2006; LIMA, 2010). Esses derivados são utilizados como biomateriais e como agentes fungicidas.

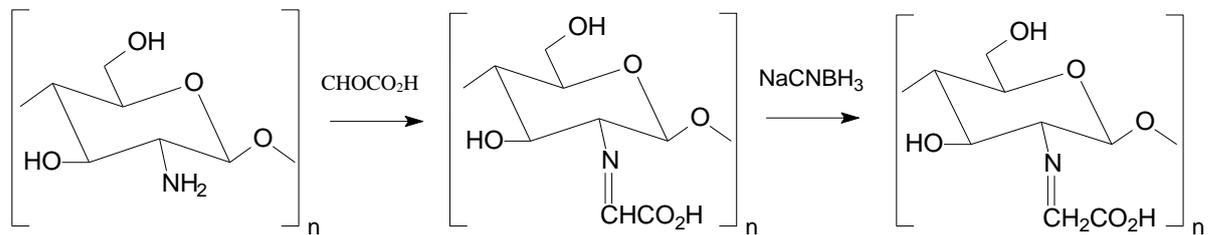


Figura 6: *N*-carboximetilação da quitosana por Alquilação redutiva.
Fonte: Autoria própria.

Essas modificações para obtenção de derivados estruturais da quitosana promovem a reticulação das cadeias poliméricas desse polímero, conferindo-lhes propriedades como, maior resistência à dissolução em meio ácido, geração de estruturas poliméricas densas ou porosas e redução da reatividade química do material obtido. Conferindo a ela aplicações específicas como a fabricação de resinas para extração em fase sólida de íons metálicos, corantes e poluentes orgânicos, desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos e construção de biossensores baseados na imobilização de enzimas ou de células vivas em filmes de quitosana reticulada (GONSALVES; ARAÚJO, 2011).

Devido a estas propriedades favoráveis, o interesse da quitosana e seus derivados em aplicações de liberação de fármacos têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Para

isto, é extremamente importante que a mesma seja hidrossolúvel e carregada positivamente. Essas propriedades permitem a interação com polímeros aniônicos, macromoléculas e poliânions em meio aquoso, favorecendo a difusão de fármacos no mecanismo de liberação, sendo assim um interessante excipiente para administração de fármacos via oral (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Diversos trabalhos são encontrados na literatura acerca de aplicações da quitosana e seus derivados. Por exemplo, a modificação da quitosana em *N*-trimetil quitosana, ou *N*-carboximetil quitosana, apresenta características especiais de aderir a superfícies da mucosa, sendo útil para a liberação de fármacos nesse local. A quitosana enxertada com poli (ácido acrílico) gera um copolímero de enxerto com propriedades hidrofílicas e mucoadesivas (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

Sistemas de liberação de fármacos a partir de quitosana tais como nano e microesferas, lipossomas e géis, têm demonstrado possuir boas características bioadesivas e intumescem facilmente quando em contato com a mucosa nasal. Além disso, vários sais de quitosana, tais como (lactato, aspartato, glutamato e cloridrato de quitosana) são obtidos a fim de serem utilizados para liberação controlada de fármacos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

2.2.2 Blendas de Quitosana

Uma das principais vantagens para a liberação controlada está na facilidade de fabricação e manipulação das propriedades do sistema (ABREU, 2008). As blendas poliméricas é uma forma simples de combinar as vantagens de diferentes materiais poliméricos, elas podem ser compostas de uma vasta variedade de polímeros, sendo os mais utilizados o polietileno glicol (PEG), poliálcool vinílico (PVA), ácido poliacrílico (PAA), poliacetatodevinila (PVAc) etc (ABREU, 2008).

Peppas e Tennenhouse (2004), adicionaram PEG em blendas de PVA com PAA, notando-se uma melhora na habilidade de inchamento e na sensibilidade ao pH do filmes, apresentando propriedades favoráveis para sua utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos. Pesquisadores também avaliaram o emprego de gelana em hidrogéis a base de PVA na liberação *in vitro* do hormônio humano do crescimento (GH), que apresentou melhora no perfil de liberação conforme houve o aumento do teor de gelana (CASCONE, 2001 apud ABREU, 2008).

Blendas a base de quitosana tem sido propostas a fim de aumentar a biocompatibilidade e a eficiência de encapsulamento dos fármacos (CASCONE, 2001; CASCONE, 2004; HIRANO, 2000 apud ABREU, 2008). Por exemplo, o emprego de quitosana com colágeno (HIRANO, 2004 apud ABREU, 2008), PVP (ZENG; FANNG; XU, 2004 apud ABREU, 2008) e com alginato (CASCONE, 2001; CASCONE, 2004 apud ABREU, 2004) foram produzidas e testadas para liberação de proteínas e fármacos. Nestes estudos verificou-se que o teor de quitosana é fundamental para o ajuste entre as propriedades mecânicas e de liberação de fármacos (ZENG; FANNG; XU, 2004 apud ABREU, 2008). Blendas de quitosana com alginato também apresentaram propriedades mecânicas e perfil adequado de liberação do fármaco, mostrando assim a importância do estudo desses compostos. Desta forma, considera-se que o emprego desses géis de quitosana ou suas blendas é uma proposta promissora como sistema de liberação controlada.

2.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Os sistemas de liberação controlada andam em crescente progresso. São sistemas promissores em relação ao aumento da eficácia terapêutica de um fármaco através da sua manutenção dentro da faixa terapêutica, diminuindo os níveis de toxicidade e reduzindo a necessidade de dosagens diárias, em relação ao sistema convencional (**Figura 7**). As nanopartículas são um exemplo destes sistemas, que possui cinética de adsorção rápida além da maior facilidade de manuseio e operação (VILA et al., 2002; DAUGHERTY; MRSNY, 2006).

A utilização de um sistema de liberação controlada contribui para o desenvolvimento da saúde humana, pois segundo Azevedo (2002), oferecem inúmeras vantagens quando comparados com o sistema convencional, como: maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência do fármaco na circulação; administração segura e conveniente (menor número de dose); direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas, e possível incorporação tanto de substâncias hidrofílicas como lipofílicas.

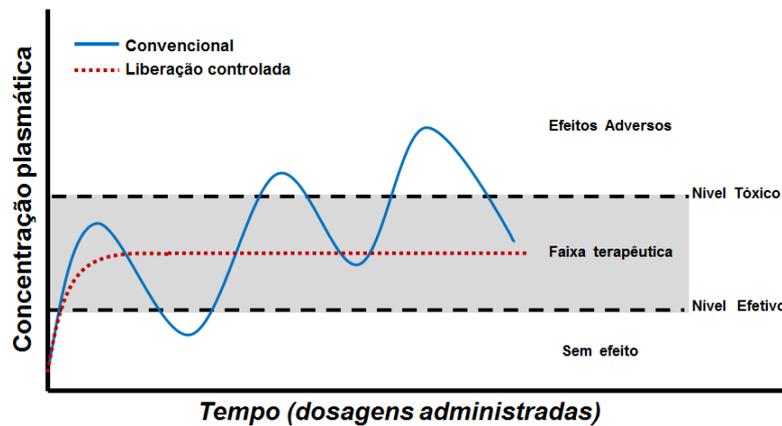


Figura 7: Perfil de liberação de drogas em função do tempo: convencional x controlada.
 Fonte: Adaptado de Azevedo, (2005).

No desenvolvimento de um sistema de liberação controlada, uma grande variedade de polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos podem ser aplicados, cuja característica principal é ser atóxico e biodisponível (COIMBRA, 2010).

A liberação do princípio ativo, no sistema de liberação controlada é moldada conforme a via de administração escolhida (MOURA, 2009). Sendo controlada por diversos mecanismos, como a erosão, difusão e intumescimento. Dependendo apenas do excipiente polimérico a ser utilizado (LOPES et al., 2005). Dentre as diferentes vias de administração pode-se citar a via oral, nasal, retal, sublingual e cutânea. Entre estas vias, as vias de administração cutânea e oral tem sido alvo de diversos estudos farmacêuticos visando o desenvolvimento de sistemas para liberação controlada de fármacos ou substâncias bioativas.

2.4 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

2.4.1 Pele como via de administração

A pele é o maior órgão do corpo, um órgão complexo que possui a maior variedade de tipos de células. Este órgão atua retendo água e como uma barreira contra a penetração de agentes externos. A penetração na pele é uma etapa essencial para que ocorra uma contaminação por microrganismos ou substâncias químicas, para liberação de fármacos na

pele (tratamentos dermatológicos) ou através da pele (transdérmicos), e para o cuidado e proteção (cosméticos) (BOLZINGER et al., 2012; PATZELT et al., 2008). Além de contribuir para o controle da temperatura corporal, apresenta funções endócrinas, como por exemplo, síntese da vitamina D e síntese periférica de pró-hormônios (como a conversão da testosterona em diidrotestosterona, mais ativa) e funções sensoriais (dor, tato, percepção de temperatura) (MENON, 2002).

Sendo cada dia mais utilizado como rota alternativa para dosagem de fármacos, a pele permite a liberação controlada diretamente na corrente sanguínea, evitando assim efeitos adversos, geralmente observados pela via oral (BOLZINGER et al., 2012). O uso desta via possui inúmeras vantagens, entre elas, o aumento da biodisponibilidade, evitar o metabolismo de primeira passagem do fígado e a degradação enzimática no sistema gástrico (LV et al., 2011; SMITH; WOOD; DORNISH, 2004).

Fatores diversos podem afetar a liberação de fármacos na pele, tais como o peso molecular, lipofilicidade e grau de ionização da substância, a formulação, a presença de modificadores de permeação e o estado físico e graus de hidratação do estrato córneo (FORSTER et al., 2009). O estrato córneo é o principal fator da pele ser uma das melhores barreiras biológicas. Nos últimos 10 anos têm-se mostrado em estudos que não é uma camada inerte, como acreditava-se no passado, mas sim uma parede ativa opondo-se à penetração de moléculas indesejáveis (MORGANTI et al., 2001).

E é na barreira do estrato córneo que é encontrada a principal limitação desta rota de administração, apesar de inúmeras vantagens, como grande área superficial, pequena degradação enzimática e o longo tempo de aplicação permitido pela liberação cutânea (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008; BOLZINGER et al., 2012). Geralmente, a barreira epidérmica apresenta danos no início da terapia tópica permitindo a livre penetração do fármaco. Porém com a recuperação da capacidade de barreira do estrato córneo durante o tratamento, poderá ocorrer uma redução desta penetração podendo prejudicar a eficácia do tratamento em doenças crônicas, onde é desejável que o fármaco aplicado topicamente mantenha uma penetração adequada por longos períodos (BENFELDT; SERUP; MENNE, 1999).

Assim, alguns estudos estão sendo feitos para reforçar a permeação na pele, que incluem a utilização de processos químicos, físicos e novos sistemas de liberação (THONG; ZHAI; MAIBACH, 2007). No desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, nanopartículas poliméricas, micelas e lipossomas são propostas para aumentar a absorção cutânea de ativos farmacológicos, diminuindo o dano causado na função do estrato córneo

(ALVAREZ-ROMAN et al., 2004; SHIM et al., 2004; KULKAMP et al., 2009). Assim, os sistemas nanoparticulados podem levar a uma maior penetração do ativo pelas subcamadas da epiderme a fim de alcançar seu local de ação, e a liberação controlada do fármaco a partir da nanoestrutura pode reduzir efeitos colaterais e prolongar o efeito terapêutico (ALENCASTRE et al., 2006; FORSTER et al., 2009).

Além disso, os medicamentos desenvolvidos para aplicação através de sistemas transdérmicos são apresentados geralmente na forma de adesivos e géis, formados por matrizes poliméricas, sendo o processo de difusão através da matriz o principal fator que vai controlar a liberação do fármaco para o meio de absorção. Nestes sistemas de liberação, a permeação dos fármacos na pele pode ser potencializada pelo uso de promotores de permeação - que são compostos químicos, farmacologicamente inativos, que podem permear ou interagir com os constituintes da pele e assim diminuir a resistência da mesma à difusão do fármaco (BARRY, 1987). Entre os promotores de liberação transdérmica destaca-se os óleos essenciais, que apresentam bons resultados na promoção de permeação e possuem baixa toxicidade e probabilidade de desenvolvimento de irritação dérmica (FOX et al., 2011).

2.4.2 Via oral de administração

Os medicamentos contêm substâncias ativas que devem ser administradas ao paciente através de uma das vias possíveis, veiculada em uma forma farmacêutica sólida, semi-sólida ou líquida. Sendo a administração oral de fármacos a primeira escolha no desenvolvimento de formas farmacêuticas e a mais usada, devido à sua facilidade de administração e melhor adesão à terapêutica por parte do paciente (PEZZINI et al., 2007; VARUM et al., 2008). Porém, a administração envolve cuidados na interpretação de três elementos chaves: o fármaco, a forma farmacêutica e sistema gastrointestinal (WILDING, 2000).

Devido alguns fármacos ser rapidamente absorvidos no estômago ou intestino delgado, sua formulação se dá por liberação imediata. Mas, muitos fármacos apresentam efeito subterapêutico ou um perfil indesejado de efeitos Claterais quando formulados neste tipo de formas farmacêuticas (VARUM, 2008). Assim, estes fármacos devem ser formulados em formas farmacêuticas de liberação controlada (VARUM et al., 2008), permitindo que se mantenha uma concentração sistêmica de fármaco dentro do nível efetivo, ou faixa terapêutica

(Figura 7) por um longo período de tempo, diminuindo assim o número de dosagens, e evitando níveis tóxicos. Outra vantagem é a liberação do fármaco no sítio específico.

Diversas tecnologias estão sendo empregadas para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. O método mais adequado para seu desenvolvimento depende de fatores como custo, perfil de liberação desejado, propriedades do fármaco etc. Este trabalho tem por finalidade utilizar técnicas para a obtenção de sistemas nanoparticulados para liberação controlada de fármacos, também por via oral.

2.5 NANOTECNOLOGIA

Considerada uma ciência, a nanotecnologia consiste na produção de sistemas em escala molecular e a manipulação de materiais em uma escala atômica. Definida também como o estudo e uso de estruturas com tamanho entre 1 e 100 nanômetros, sendo que, um nanômetro corresponde à 10^{-9} m (CAMARGO et al., 2009).

Nas últimas décadas observa-se um avanço no emprego de polímeros biocompatíveis, isto é, que possuem a capacidade de serem degradados, em fragmentos menores, por organismos vivos avança nas pesquisas (SCHAFFAZICK et al., 2003; VENKAT RATNAM et al., 2006; DURÁN; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2002). Apresentando aplicações importantes na área da química, biologia e farmacêutica. A aplicação da nanotecnologia na área das ciências da vida é denominada de nanobiotecnologia. A nanobiotecnologia, na área de farmácia, atua na liberação de fármacos (alterando a biodisponibilidade, promovendo a liberação controlada e o direcionamento do fármaco). A tecnologia de liberação modificada de fármacos representa diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana (DURÁN; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2002).

Para este fim, têm-se buscado métodos para produção de nanopartículas poliméricas que além de garantir a estabilidade da molécula e a manutenção de sua atividade biológica, possam formar estruturas estáveis, solúveis, com tamanho e carga favorável à aplicação desejada (REIS et al., 2006).

2.5.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são carregadores submicrométricos de fármacos, as que incluem as nanocápsulas e as nanoesferas. Sendo as nanocápsulas formadas por uma camada polimérica disposta ao redor de um núcleo geralmente oleoso, enquanto as nanoesferas são sistemas matriciais constituídos por polímeros (**Figura 8**) (PUISIEUX et al., 1994; SCHAFFAZICK et al., 2003). As nanoesferas são partículas sólidas coloidais com tamanho inferior a 1,0 μm que carregam substâncias ativas. Devido seu tamanho reduzido, podem facilmente atravessar barreiras biológicas assim como penetrar todos os tipos de células (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010).

Seu estudo se deve a inúmeras vantagens, tais como o controle da liberação de fármacos, a distribuição mais seletiva de substâncias ativas, aumentando os seus índices terapêuticos, a vetorização cerebral de fármacos, a veiculação de anti-inflamatórios não-esteróides, a proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal e o aumento de sua biodisponibilidade (SCHAFFAZICK et al., 2006).

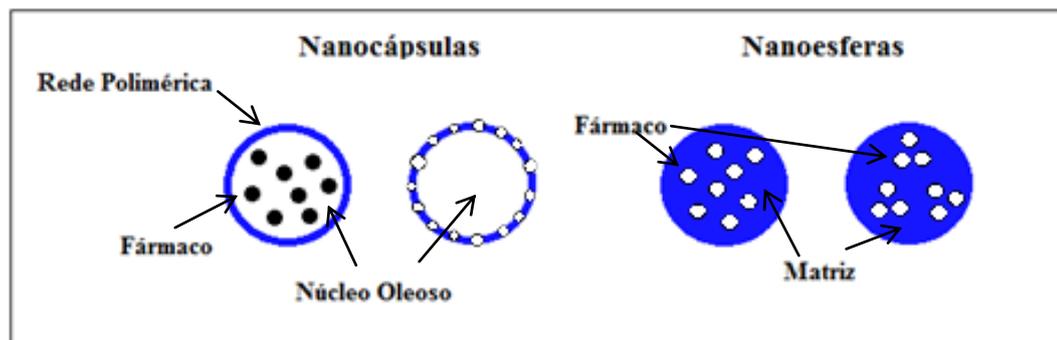


Figura 8: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas.
 Fonte: Adaptado de Azevedo (2002).

2.5.2 Técnicas de preparação de partículas de quitosana

Existem vários métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas, segundo Vila Jato (1999), o número de métodos existentes superam várias centenas, diferenciando-se entre eles no aprisionamento do material desejado, variando o seu tamanho, uma vez obtido o produto final.

Porém, a escolha do método mais adequado depende de alguns fatores, tais como, as propriedades físico-químicas do material a encapsular (solubilidade principalmente); a

aplicação das partículas; o tamanho, textura e forma da partícula e o mecanismo de liberação do material a ser encapsulado (BANSODE et al., 2010 apud BRASILEIRO, 2011). De acordo com a propriedade do agente encapsulante e do material encapsulado, os métodos podem ser subdivididos em métodos físicos, químicos e físico-químicos (TIWARI et al., 2010 apud BRASILEIRO, 2011). Alguns métodos empregados pode-se citar a polimerização interfacial de monômeros, emulsão seguida da evaporação do solvente, nanoprecipitação, *salting-out*, *spray-drying*, microemulsificação, coacervação simples ou complexa (AGNIHOTRI et al., 2004; SINHA et al., 2004). Sendo os métodos mais utilizados discutidos a seguir.

2.5.2.1 Coacervação

Este método é constituído por duas fases líquidas em sistemas coloidais. Sendo um método que utiliza as propriedades físico-químicas da quitosana, uma vez que esta é insolúvel em pH elevado, precipitando (coacervando) quando entra em contato com soluções alcalinas (AGNIHOTRI et al., 2004; DASH et al., 2011).

As partículas são produzidas pela dispersão de uma solução ácida de quitosana numa solução alcalina, utilizando-se de um bocal de ar comprimido para formar partículas dispersas que precipitam em contato com a solução alcalina (KO J. et al., 2002 apud MARTINS, 2013), sendo um método que pode ser adaptado, em que a solução ácida de quitosana é gotejada com o auxílio de uma seringa. O tamanho do bocal do atomizador e da seringa, bem como a pressão a que a solução é gotejada, controla o tamanho das partículas. A **Figura 9** representa esquematicamente o método de produção de micropartículas de quitosana por coacervação.

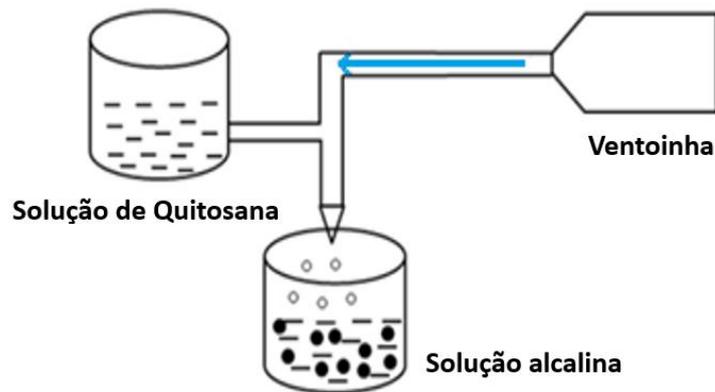


Figura 9: Representação esquemática do método de produção de partículas por coacervação.
Fonte: Adaptado de Martins (2013).

A coacervação se agrupa a uma série de técnicas de encapsulação a fim de rearranjar a cadeia do polímero introduzida por algum procedimento que conduz alteração das características do meio. Sendo constituída por dois processos, a coacervação simples, quando apenas uma única macromolécula está presente (KALOTI; BOHIDAR, 2010), e a coacervação complexa, também chamada de complexação de polieletrólitos, consistindo na interação de dois ou mais polieletrólitos com cargas elétricas opostas (DAVIDENKO et al., 2009). Ganhando destaque a complexação de polieletrólito, devido à sua peculiaridade de possuir características tanto de um polímero, quanto de um eletrólito.

2.5.2.2 Complexação Polieletrólítica

As dispersões de complexos de polieletrólitos é resultado de fortes interações eletrostáticas entre macromoléculas com cargas opostas. Estas interações possuem força suficiente para prevenir a dissolução do complexo em água (AELENEI et al., 2009; SILVA et al., 2008). A interação também pode ocorrer entre os resíduos de suas cadeias laterais ou pelas interações entre outro grupamento presente na macromolécula. Porém, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals podem complementar a formação (BHATTARAI et al., 2010).

A mistura de soluções contendo poliânions e policátions leva a formação espontânea de complexos polieletrólíticos (**Figura 10**), dependendo de fatores como a força e localização dos sítios iônicos, da rigidez da cadeia polimérica, do pH, temperatura, força iônica, peso

molecular, velocidade da mistura, entre outros fatores (HARTIG et al., 2007). É fundamental que exista um equilíbrio entre cargas positivas e negativas de modo que a maior parte dos sítios ativos esteja ligada (DUCEL et al., 2006). Essa técnica é simples e altamente vantajosa, pois polieletrólitos poliméricos são biodegradáveis e de lenta degradação, não alteram a função celular e utilizam água como solvente.

Os compostos geralmente utilizados na formação de complexos polieletrólíticos são os polissacarídeos (quitosana, alginato de sódio, pectina, dextrana, carboximetilcelulose, xantana, ácido hialurônico), proteínas (gelatina, albumina, queratina) e polímeros sintéticos (ácido poliacrílico) (AELENEI et al., 2009; BHATTARAI et al., 2010; COELHO et al., 2010). Sendo a quitosana um dos polímeros mais utilizado na produção de nanopartículas via complexação polieletrólítica, devido a sua capacidade de interagir com polímeros poliânions.

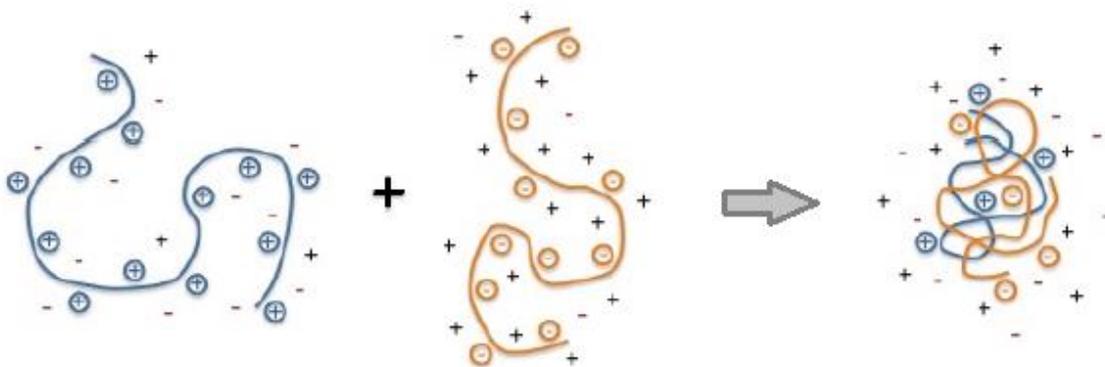


Figura 10: Processo de agregação de dois polieletrólitos com a formação do complexo.
 Fonte: Adaptado de Witt (2012).

2.5.2.3 *Spray-drying*

Este método consiste na solubilização da quitosana em uma solução aquosa de ácido acético, e nesta solução é incorporada a substância ativa, podendo ser tanto por dissolução, quando se trata de substâncias solúveis em água, quanto por dispersão, no caso de substâncias insolúveis em água. Adicionando-se no final o agente reticulante. A mistura final é, então, pulverizada sobre uma corrente de ar quente, formando gotículas pequenas das quais rapidamente o solvente evapora, deixando as partículas secas no sistema (AGNIHOTRI et al., 2004; SINHA et al., 2004; DASH et al., 2011). Este método elimina a necessidade de utilizar solvente, pois para separar as partículas formadas da corrente de ar é utilizado geralmente um

ciclone com a capacidade de reter partículas do tamanho das partículas obtidas no método de produção (MARTINS, 2008) A **Figura 11** representa o método de preparação de partículas por *spray-drying*.

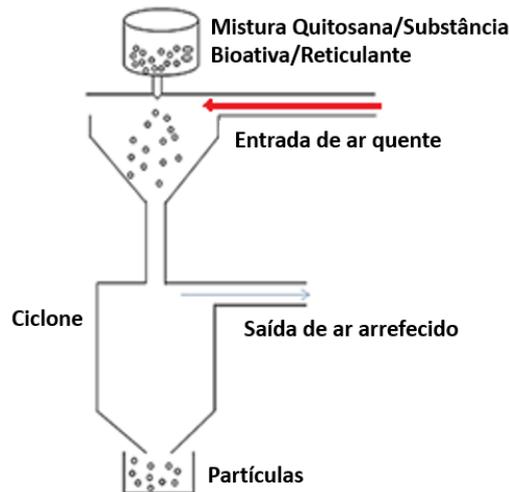


Figura 11: Representação esquemática do método de produção de partículas por *spray-drying*.
Fonte: Adaptado de Martins (2013).

2.5.2.4 Emulsificação/Evaporação do Solvente

No método emulsificação/evaporação do solvente o polímero e o fármaco são dissolvidos em um solvente orgânico imiscível em água, denominada fase orgânica, e emulsionados em uma solução aquosa contendo tensoativo, formando emulsões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Em que o solvente é evaporado e o polímero precipita formando partículas (SOPPIMATH et al., 2001; REIS et al., 2006). As partículas formadas são posteriormente submetidas a processos de separação, lavagem e secagem (ZANETTI, 2002), como pode ser observado na **Figura 12**.

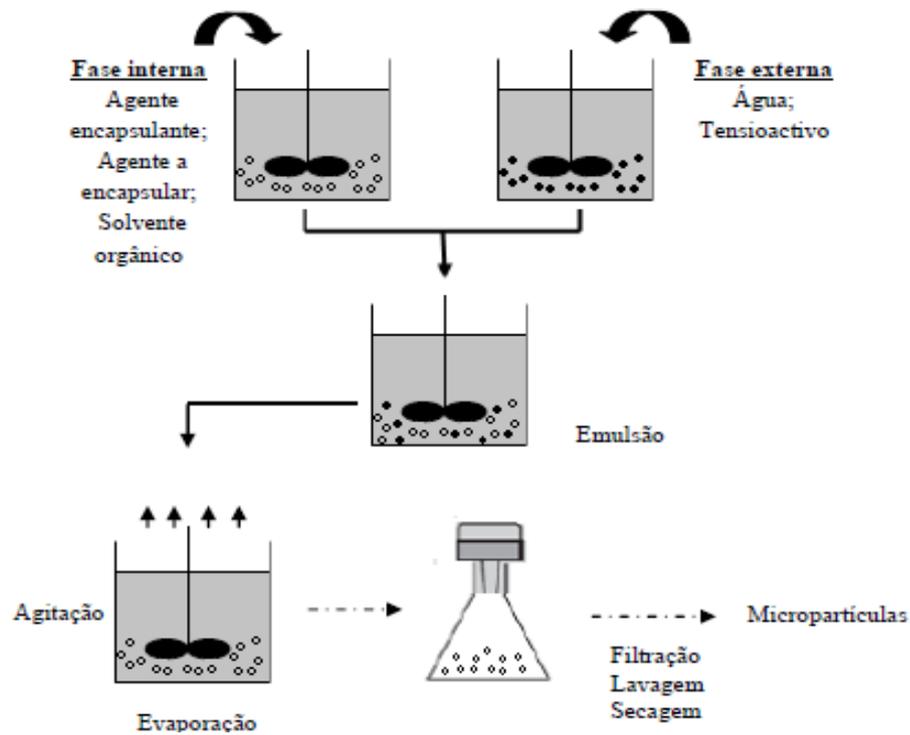


Figura 12: Produção de partículas pelo método de emulsão/evaporação do solvente.
Fonte: Adaptado de Zanetti (2002).

Diversos fatores influenciam nas propriedades das partículas produzidas, como o solvente utilizado na fase orgânica (ARSHADY, 1991), a velocidade de evaporação do solvente, temperatura e velocidade de reação, sendo o diâmetro da partícula controlado com a modulação da velocidade de agitação (REIS et al., 2006; BUDHIAN et al., 2007).

2.6 SUBSTÂNCIA BIOATIVA

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) vem sendo empregados ultimamente no tratamento de diversas patologias que requeiram atividade anti-inflamatória ou analgésica. Entre esses, destacam-se os derivados do ácido 2-arilpropiónico: ibuprofeno, naproxeno e cetoprofeno.

2.6.1 Naproxeno

O naproxeno é um anti-inflamatório não-esteróide, derivado do ácido propiônico, conhecidos como profenos. Mas, diferentemente de outros derivados do seu grupo, o naproxeno sobressai, pois possui longo tempo de meia-vida, permitindo uma administração eficaz e um menor número de dosagens durante o dia (AMARAL, 1997).

O Naproxeno é um pó cristalino branco com sabor e cheiro pouco ativo. Denominado quimicamente como ácido (S)-2-(6-metoxi-2naftil)propiônico (**Figura 13**) (AMARAL, 1997), este anti-inflamatório é comercializado enantiomericamente puro, pois o R é hepatotóxico.

A fórmula molecular do naproxeno é $C_{14}H_{14}O_3$, correspondendo a uma massa molecular de 230,3g/mol. Segundo Pereira, (2009) o naproxeno é solúvel em álcool, clorofórmio, metanol, acetona e lipídeos, sendo pouco solúvel a baixo pH, apresentando um coeficiente de partição (Log P) a pH 7 entre 1,4 à 1,8. Deste modo, conferindo ao naproxeno um caráter lipofílico.

O naproxeno pode ser administrado por diversas vias como a oral, cutânea e retal, entretanto a via oral possui uma biodisponibilidade de mais de 90% devido a sua maior absorção, em que os picos de concentração plasmática ocorrem passadas duas a três horas após a sua administração por esta via (AMARAL, 1997), já por via retal esses picos de administração são atingidos mais lentamente.

Segundo Amaral, (1997) o Naproxeno além de ser administrado por via oral, tem sido bastante utilizado em formas de administração cutâneas, pois se apresenta de modo geral, bem tolerado pela pele humana. Estudos recentes demonstraram níveis significativos deste fármaco em tecidos profundos como o músculo e o líquido sinovial, após aplicação tópica (AMARAL, 1997). O que representa uma vantagem quando se pretende aliviar sintomas locais, eliminando efeitos sistêmicos indesejados, quando administrado por via oral.

Porém, o uso do naproxeno por período prolongado pode desencadear toxicidade gastrointestinal em determinados pacientes, resultando em danos à mucosa, irritação e até mesmo hemorragia, quando tratados por via oral.

Estes danos gastrointestinais provocados são geralmente atribuídos a dois fatores: i) irritação local pela função ácido carboxílico, comum em muitos AINEs e ii) produção diminuída de prostaglandinas no tecido, que possui função fisiológica citoprotetora para manter a saúde gastrointestinal e homeostase.

Para contornar estes problemas, vários grupos de pesquisas têm estudado a modificação estrutural de AINEs. Por exemplo, a derivatização da função carboxilato, geralmente, fornecem um anti-inflamatório potente com efeito ulcerogênico reduzido.

Devido a isto, nos últimos anos foram sintetizados alguns ésteres derivados do ibuprofeno e do naproxeno, tal como o éster ibuprofeno-eugenol que apresentaria efeitos sinérgicos das duas substâncias isoladas e ainda ocasionaria menor irritação gastrointestinal (CASAGRANDE et al., 2011).

Por ser um dos fármacos mais utilizados comumente, estudos tem buscado minimizar os efeitos indesejados do Naproxeno, seja tanto pela busca por uma forma de administração mais cômoda e eficiente, como também fornecer ao paciente um fármaco mais potente e com menos efeitos colaterais possíveis.

Desse modo, buscando contribuir para os avanços no desenvolvimento de novos fármacos, nosso grupo de pesquisa vem sintetizando alguns derivados do naproxeno. O presente trabalho objetivou estudar a liberação controlada do naproxeno e dos derivados naproxenatos de eugenila e de timila. Estes derivados foram sintetizados e caracterizados por Souza (2015). A representação estrutural do naproxeno e dos derivados utilizados nesse trabalho estão apresentadas na **Figura 13**.

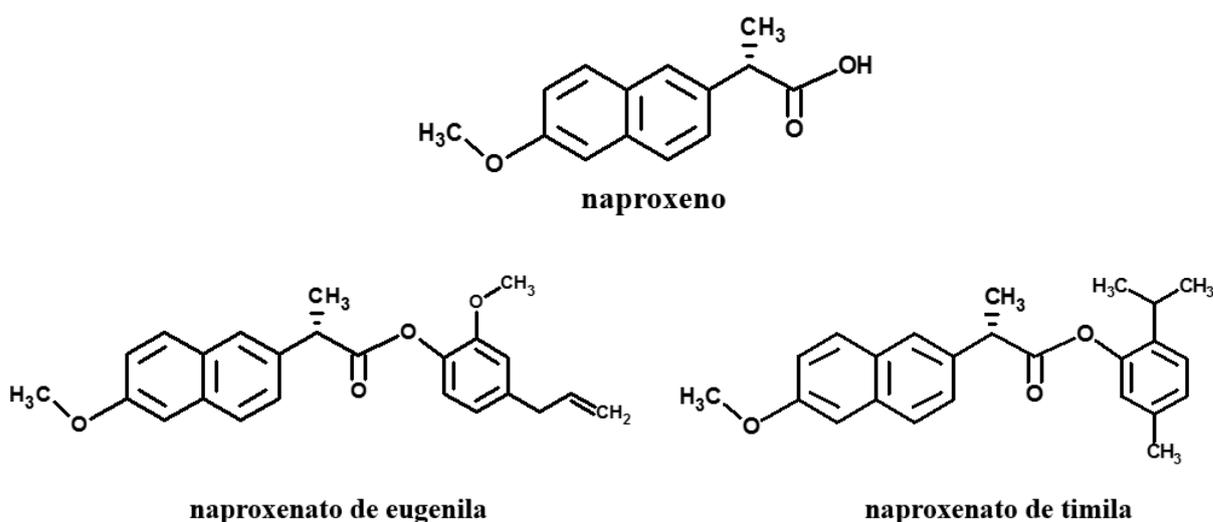


Figura 13: Estrutura química do Naproxeno e dos Naproxenatos de eugenila e de timila.
Fonte: Autoria própria.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção de micropartículas e géis a base de quitosana, para serem utilizados em sistemas de liberação controlada de substâncias bioativas (naproxeno, naproxenato de timila e naproxenato de eugenila).

3.2 Objetivos específicos

- Modificar a quitosana através de reações de acetilação;
- Obter géis a base de quitosana modificada contendo as substâncias bioativas (naproxeno, naproxenato de timila e eugenila);
- Obter blendas de quitosana modificada com acetato de celulose puras e contendo as substâncias bioativas (naproxeno, naproxenato de timila e de eugenila);
- Obter micropartículas a base de quitosana pura e contendo o naproxeno por diferentes técnicas;
- Avaliar a incorporação da substância bioativa nos materiais obtidos;
- Avaliar a liberação das substâncias bioativas através de medidas de espectrofotometria UV-Vis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os polímeros utilizado foram a quitosana de baixo peso molecular e grau de desacetilação de 75-85% e o acetato de celulose (CA, $M_n = 30.000 \text{ g.mol}^{-1}$, grau de substituição de 2,5) adquiridos da Sigma-Aldrich. Os reagentes utilizados foram: acetona (Synth), *N, N*-dimetilformamida P.A. (Cromato Produtos Químicos Ltda); anidrido acético P.A. (ISO FAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda); piridina P.A. (Vetec Química Fina Ltda); metanol P.A. (Vetec Química Fina Ltda); *N, N*-dimetilacetamida P.A. (Vetec Química Fina Ltda); cloreto de lítio (LiCl) e cloreto de cálcio (CaCl_2) P.A. (Êxodo Científica); hidróxido de sódio (NaOH) P.A (Proquímios); ácido clorídrico (HCl) P.A. (Proquímios); fenolftaleína P.A (Vetec Química Fina). Todos os demais reagentes utilizados apresentaram pureza analítica.

O Naproxeno (N) foi extraído de medicamento comercial e os naproxenatos de timila (NT) e eugenila (NE) foram sintetizados e cedidos pelo acadêmico João Pedro de Souza Albuquerque.

4.2 MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA: PREPARAÇÃO DA *N*-ACETILQUITOSANA.

A *N*-acetilquitosana foi obtida pela acetilação da quitosana em meio heterogêneo. Neste processo 12,5 g de quitosana (QT) foram adicionados em um balão de fundo redondo. Em seguida, 100 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF) foram adicionados, para que houvesse o intumescimento da quitosana e, assim favorecer a reação pela maior exposição dos grupos funcionais reativos. Esse contato foi mantido durante 30 minutos, sob agitação constante, como ilustrado na **Figura 14 (a)**. Posteriormente, o balão foi colocado em um banho de gelo e 500 mL de uma solução previamente preparada de anidrido acético e piridina, em uma proporção de 96 e 4% (v/v), respectivamente, foi adicionada. A mistura foi mantida sob agitação constante e transcorreu durante 12 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de água destilada e gelo. O material obtido apresenta

características de um pó branco, que foi filtrado e lavado com água destilada e, posteriormente, com metanol, que posteriormente foi seco sob pressão reduzida **Figura 14 (b)**.

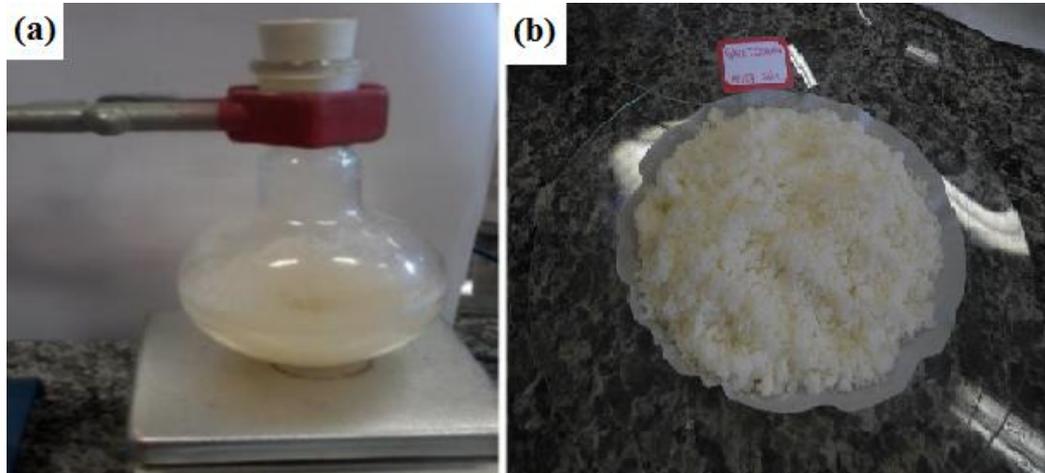


Figura 14: (a) Fotografia do processo de acetilação e (b) fotografia do produto obtido após a acetilação da quitosana.

Fonte: Autoria própria.

4.2.1 Teste de solubilidade do material obtido

Cerca de 50 mg da amostra foi pesada e, em seguida, adicionou-se 10 mL de diferentes solventes (água destilada, acetato de etila, diclorometano, acetona, *N,N*-dimetilacetamida (DMA), DMA com 5% de LiCl e ácido acético a 5%). As misturas foram mantidas sob agitação constante à temperatura ambiente e a solubilidade foi analisada após 24 e 48 h, considerando-se a massa residual de sólido após centrifugação e a formação de gel.

4.2.2 Caracterizações da *N*-Acetilquitosana

4.2.2.1 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização estrutural das amostras foi realizada através de um espectrofotômetro da marca Bomen, modelo MB-100. As amostras foram analisadas na forma de pastilhas de KBr, com resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá, por intermédio do prof. Dr. Adley Forti Rubira.

4.2.2.2 Ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN)

Os espectros de RMN de ^{13}C do estado sólido foram obtidos em um espectrômetro Varian, modelo Oxford 300. Os espectros foram obtidos utilizando a técnica de CP/MAS (polarização cruzada com rotação no ângulo mágico) nas seguintes condições: tempo de contato de $500\ \mu\text{s}$, pulso de 90 graus ($4,5\ \mu\text{s}$), intervalo entre pulsos de $1\ \text{s}$ e potência de pulsos de ^{13}C calibrados para atingir a condição Hartmana-Haha; velocidade de rotação no MAS de $4,5\ \text{KHz}$ e 2048 transientes. Os espectros serão processados utilizando-se função de alargamento de linha *line broadening* de $50\ \text{Hz}$ e os deslocamentos químicos referenciados pelo DMSO. As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá, por intermédio do prof. Dr. Adley Forti Rubira.

4.2.2.3 Determinação do grau de acetilação da *N*-acetilquitosana

A determinação do teor de grupos O-acetil no produto obtido foi feita pelo método volumétrico segundo a norma ASTM D871-72 da *American Society for Testing and Materials*, como descrito a seguir. Em um erlenmeyer adicionou-se álcool etílico a 75% , na proporção de $25\ \text{mL}$ de álcool etílico ($75\ \%$) para $0,25\ \text{g}$ de amostra. Em seguida, foram adicionados $20\ \text{mL}$ de hidróxido de sódio (NaOH) $0,5\ \text{mol/L}$. O recipiente foi vedado e mantido por cinco dias à temperatura ambiente, com ocasionais agitações. Após esse período, a quantidade de NaOH não consumido foi determinada por titulação com ácido clorídrico (HCl) $0,2\ \text{mol/L}$, utilizando como indicador fenolftaleína. A determinação do teor de acetato foi feita através da **Equação 1**.

$$\% \text{acetato} = \left(\frac{(V_{\text{Branco}} - V_{\text{Amostra}}) \times M_{\text{HCl}} \times 0,043}{m_{\text{Amostra}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Em que: V_{Branco} corresponde ao volume de ácido para a dosagem do branco; V_{Amostra} é o volume do ácido para a dosagem da amostra; M_{HCl} é a concentração da solução de HCl dada em mol/L e m_{Amostra} é a massa em grama da amostra utilizada.

Utilizando a **Equação 2** foi determinado o grau de substituição (GS) da amostra. Sendo a análise realizada em triplicata.

$$\text{GS} = \frac{181 \times (\% \text{acetato})}{4300 - 42 \times (\% \text{acetato})} \quad (2)$$

Em que 181 e 42 são respectivamente a massa molar da unidade repetitiva de quitosana e dos grupos carboximéticos. E 4300 é a quantidade em mg de quitosana utilizada na determinação.

4.3 PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE *N*-ACETILQUITOSANA

4.3.1 Preparação de géis de *N*-acetilquitosana (A-QT) e Blendas de *N*-acetilquitosana/Acetato de Celulose (A-QT/AC).

Os géis de quitosana pura e com as substâncias bioativas foram preparados utilizando o método *casting*.

Quantidades de *N*-acetilquitosana e das substâncias bioativas foram cuidadosamente pesadas e adicionadas a uma solução de *N,N*-dimetilacetamida contendo 5% de LiCl. A mistura foi mantida em agitação constante durante 12 horas, à temperatura ambiente. Após a homogeneização a solução foi espalhada em placa de Petri e o filme foi lavado e posteriormente deixado em temperatura ambiente, a fim de que o solvente fosse evaporado. Blendas de *N*-acetilquitosana com Acetato de Celulose (A-QT/AC) foram preparadas pela mesma metodologia descrita acima, variando a porcentagem do acetato de celulose.

Os géis com substâncias bioativas foram preparados utilizando a mesma metodologia do gel puro e das blendas. Sendo que, o naproxeno (N) ou naproxenato de timila (NT) ou naproxenato de eugenila (NE) foram incorporados ao final do procedimento, permanecendo em constante agitação e em temperatura controlada por mais 1 hora. Os filmes obtidos apresentam espessura de aproximadamente 500 µm. A **Tabela 1** apresenta as composições e os códigos das amostras obtidas.

Tabela 1 - Composição e códigos das amostras obtidas.

Código das Amostras	Porcentagem Mássica de Quitossana (%)	Porcentagem Mássica de Acetato de Celulose (%)	Massa da Substância Bioativa (mg)
A-QT	100	--	--
A-QT/N	100	--	20
A-QT/NT	100	--	20
A-QT/NE	100	--	20
A-QT/11AC	89	11	20
A-QT/11AC/N	89	11	20
A-QT/11AC/NT	89	11	20
A-QT/11AC/NE	89	11	20
A-QT/20AC	80	20	--
A-QT/20AC/N	80	20	20
A-QT/43AC	57	43	--
A-QT/43AC/N	57	43	20
A-QT/60AC	40	60	--
A-QT/60AC/N	40	60	20

Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Caracterização dos géis *N*-Acetilquitossana

4.3.2.1 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica dos géis foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Shimadzu, SS 550 Superscan, voltagem de aceleração de 15 kV e

intensidade de corrente de 30 mA). Sendo a superfície de fratura das amostras cobertas previamente com uma fina camada de ouro. As análises foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá, por intermédio do prof. Dr. Adley Forti Rubira.

4.3.2.2 Teste de intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado utilizando solução tampão salina (pH = 6,8). Para o ensaio dos géis, oito amostras foram cortadas, 0,5 x 0,5 cm², pesando cerca de 100 mg. Em seguida os filmes foram imersos em 50 mL da solução tampão salina, os filmes foram retirados, em intervalos de tempo determinados (15min, 30min, 60min, 120min e 1440 min), secos com auxílio de papel de filtro e pesados.

A partir dos resultados obtidos, o grau de intumescimento (GI%) foi calculado segundo a **Equação 3** (KOKABI, 2007):

$$GI\% = \frac{M_t - M_0}{M_0} \times 100 \quad (3)$$

Sendo:

GI % o grau de intumescimento;

M₀ a massa da amostra seca (g);

M_t a massa da amostra hidratada (g).

4.3.2.3 Liberação controlada da substância bioativa

A liberação das substâncias bioativa foi feita imergindo os géis em um fluido de simulação da pele com pH 6,8. Para analisar o tempo e a forma (rápida/lenta) de liberação das substâncias bioativas dos materiais obtidos, estas soluções foram mantidas sob agitação constante e com temperatura controlada de 37 °C. Alíquotas de 3 mL foram recolhidas, em intervalos de tempo variando de 5 min até 3 dias, e em seguida, leituras de absorção foram

realizadas em Espectrofotômetro UV-Vis T70+, *PG Instruments*. Posteriormente as alíquotas foram devolvidas para dentro do frasco. A concentração das substâncias bioativas liberadas foram determinadas a partir de uma curva analítica, correlacionando a absorção *versus* concentração das substâncias bioativas utilizadas.

4.4 PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

As micropartículas foram produzidas utilizando três métodos: o método de coagulação em meio alcalino; o método de complexação polieletrólítica reação direta e o método de complexação polieletrólítica reação indireta.

4.4.1. Método de Coacervação

As microesferas de quitosana foram obtidas através do gotejamento de 100 mL de uma solução de quitosana previamente preparada com ácido acético (3%) à vazão constante, em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 1,0 mol/L), sob agitação regular. As microesferas permaneceram em repouso por 24 horas na solução de NaOH 1,0 mol/L e posteriormente foram lavadas com água destilada até atingirem um pH neutro (aproximadamente 7,0), e então acondicionadas em água destilada. As microesferas obtidas por este método foram nomeadas como QT-ALC.

4.4.2 Complexação Polieletrólítica: Método de reação indireta

Adicionou-se de forma controlada, usando um sistema conforme a **Figura 15** e com auxílio de uma agulha de insulina de diâmetro 0,45 mm, 25 mL de uma solução aquosa 0,2% (m/m) de alginato de sódio (ALG) em 50 mL de uma solução 200 mMol/L de cloreto de cálcio (CaCl₂), a altura de gotejamento entre a agulha e a solução foi mantida constante (5 cm). A solução foi mantida sob agitação magnética por 20 minutos para a formação de um

pré-gel. Decorrido esse tempo, adicionou-se gota-a-gota 25 mL de uma solução de quitosana 0,2 % m/m em ácido acético 2% (v/v). Após o término da adição, a solução final foi deixada sob agitação por 24 horas. Por fim, as micropartículas obtidas foram filtradas e conservadas sob refrigeração. Micropartículas com a substância bioativa também foram preparadas, com a adição de 50 mg do naproxeno dissolvido em acetona durante a formação das micropartículas. Na **Tabela 2** constam as composições e os códigos das amostras obtidas.

4.4.3 Complexação Polieletrólítica: Método de reação direta

Preparou-se inicialmente uma mistura contendo 50 mL da solução de 200 mMol/L de CaCl_2 e 25 mL da solução 0,2% m/m de quitosana. Em seguida, gotejou de forma controlada, com o auxílio de uma seringa com agulha de insulina, 25 mL da solução aquosa 0,2% m/m de alginato de sódio (ALG), sob agitação magnética, em 75 mL da mistura das solução de cloreto de cálcio e quitosana (**Figura 15**). Após o término da adição, a solução final foi deixada sob agitação por 24 horas. Por fim, as micropartículas obtidas foram filtradas e conservadas sob refrigeração. Micropartículas com a substância bioativa também foram preparadas, com a adição de 50 mg do naproxeno dissolvido em acetona durante a formação das micropartículas.

Com intuito de obter nanopartículas, o procedimento descrito anteriormente foi repetido, onde o sistema ficou sob agitação por um ultrassom de ponta, utilizando uma frequência de 20 kHz por 30 min.

Na **Tabela 2** constam as composições e os códigos das amostras obtidas.

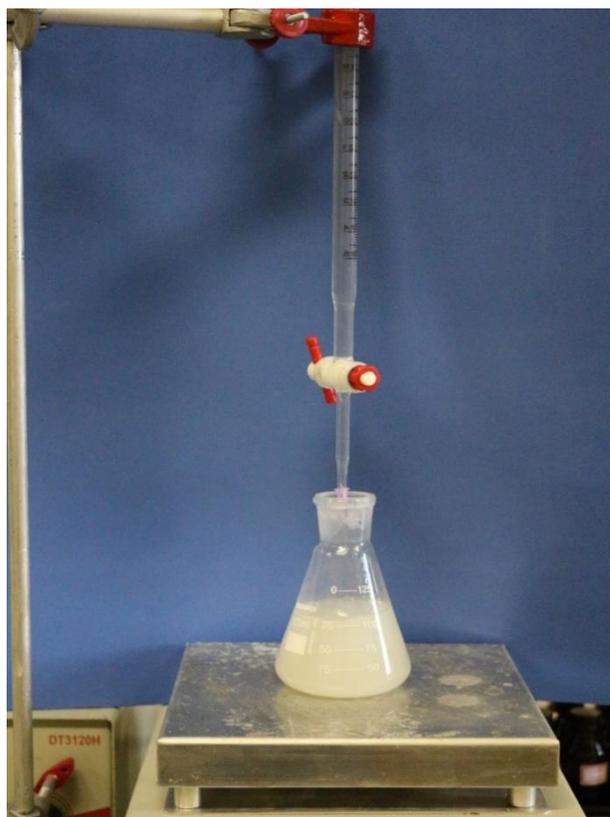


Figura 15: Esquema para obtenção das partículas de Alginato e Quitosana (ALG-QT).
Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 - Composição e código das micropartículas obtidas pelo método de complexação polieletrólítica.

Código das Amostras	Proporção mássica ALG/QT (v/v)	Massa do Naproxeno (mg)	Método	Tipo de Agitação
ALG-QT-IM	25/75	--	indireto	magnética
ALG-QT/N-IM	25/75	50	indireto	magnética
ALG-QT-DM	25/75	--	direto	magnética
ALG-QT/N - DM	25/75	50	direto	magnética
ALG-QT - DU	25/75	--	direto	ultrassom
ALG-QT/N-DU	25/75	50	direto	ultrassom

Fonte: Autoria própria.

4.4.4 Caracterização das Micropartículas

4.4.4.1 Caracterização Morfológica

A morfologia e tamanho das partículas foram analisadas por Microscopia Óptica (MO), utilizado um Microscópio Digital USB, ampliação 20-800x.

4.4.4.2 Teste de intumescimento das micropartículas

Este estudo foi realizado em soluções tampão de pH 1,2 e 7,4 afim de simular as condições fisiológicas do trato gastrintestinal. Inicialmente, pesou-se 100 mg das partículas secas que foram colocadas em contato com 50 mL de solução tampão de pH 1,2 e 7,4, e mantida termostaticada à 37°C e retiradas em intervalos de tempo determinados (15 min, 30 min, 60 min, 120 min e 1440 min) para pesagem. A solução acumulada na superfície das partículas foi retirada com auxílio de papel filtro antes da pesagem.

A partir dos resultados obtidos, o grau de intumescimento no equilíbrio (GI%) foi calculado segundo a **Equação 3** do item 4.3.2.2 (KOKABI, 2007).

4.4.4.3 Liberação controlada da substância bioativa

Para o estudo de liberação das micropartículas, as partículas foram colocadas dentro de membranas de celulose e posteriormente imergidas em um fluido de simulação intestinal com pH 7,4 ou em fluido de simulação estomacal com pH 1,2.

Para analisar o tempo e a forma (rápida/lenta) de liberação das substâncias bioativas dos materiais obtidos, estas soluções foram mantidas sob agitação constante e com temperatura controlada de 37 °C. Alíquotas de 3 mL foram recolhidas, em intervalos de tempo variando de 5 min até 3 dias, e em seguida, leituras de absorção foram realizadas em Espectrofotômetro UV-Vis T70+, *PG Instruments*. Posteriormente as alíquotas foram devolvidas para dentro do frasco. A concentração das substâncias bioativas liberadas foram determinadas a partir de uma curva analítica, correlacionando a absorção versus concentração das substâncias bioativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÕES DA *N*-ACETILQUITOSANA

5.1.1 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

O espectro de absorção no Infravermelho da quitosana (QT) é apresentado na **Figura 16**. O estiramento O-H, pode ser notado na banda intensa e larga em 3440 cm^{-1} , correspondente aos grupos C-OH e H_2O fisicamente adsorvida, com um ombro em aproximadamente em 3368 cm^{-1} atribuída ao estiramento N-H dos grupos NH_2 . Entre $2930\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ encontram-se os estiramento C-H de grupos CH, CH_2 e CH_3 . As absorções entre 1421 e 1378 cm^{-1} são características de diferentes modos de deformação C-H (CH, CH_2 e CH_3). A presença do grupo funcional amida é caracterizada pela presença no FTIR, de três bandas em 1660 cm^{-1} de C=O de amida, 1597 cm^{-1} do estiramento N-H e 1317 cm^{-1} associado ao estiramento CN, denominados de amida I, II e III, respectivamente. A banda aguda a 1378 cm^{-1} é atribuída à deformação simétrica do CH_3 . Na região de 700 a 600 cm^{-1} , observam-se osdas amidas IV, V e VI associados à deformação fora do plano de NH da quitosana. A banda larga e intensa com máximo em 1030 cm^{-1} está associada ao estiramento C-O-C da cadeia da quitosana (GARCIA; SILVA; COSTA, 2008).

O espectro de absorção da *N*-acetilquitosana A-(QT) é apresentado na **Figura 17**. A acetilação foi comprovada, devido ao aumento da intensidade relativa das bandas, a 1664 cm^{-1} (C=O de amida) e a 1559 cm^{-1} (NH de amina), **Figura 18**. Em 1744 cm^{-1} , observou-se o surgimento de uma banda na amostra acetilada, que corresponde à deformação axial C=O de éster. Com o tempo de reação de 12 horas, observamos o aumento de intensidade das bandas de carbonila de amida e de éster, possibilitando assim a acetilação, dos grupos amino livres e dos grupamentos hidroxílicos. A *O*-acetilação pode ser explicada pela quantidade significativa de unidades glicosídicas com grupamentos amino livres fazerem parte das regiões cristalinas do polímero. Como a reação de acetilação se processou em meio heterogêneo, possivelmente, somente as regiões amorfas foram acetiladas, assim os grupos OH tornaram-se mais expostos à reação, devido à menor exposição dos grupos NH_2 , sendo assim, a probabilidade dos grupos acetila reagirem com os grupamentos hidroxila aumenta (GARCIA; SILVA; COSTA, 2008).

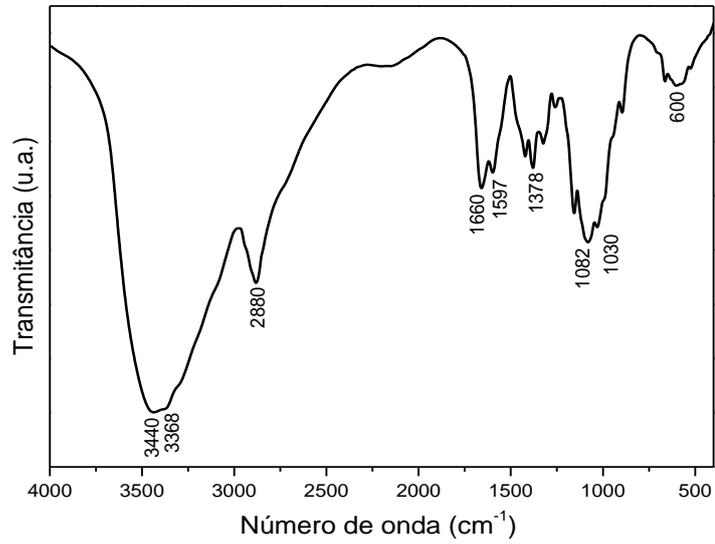


Figura 16: Espectro de FTIR da quitosana pura (QT).
Fonte: Aatoria própria.

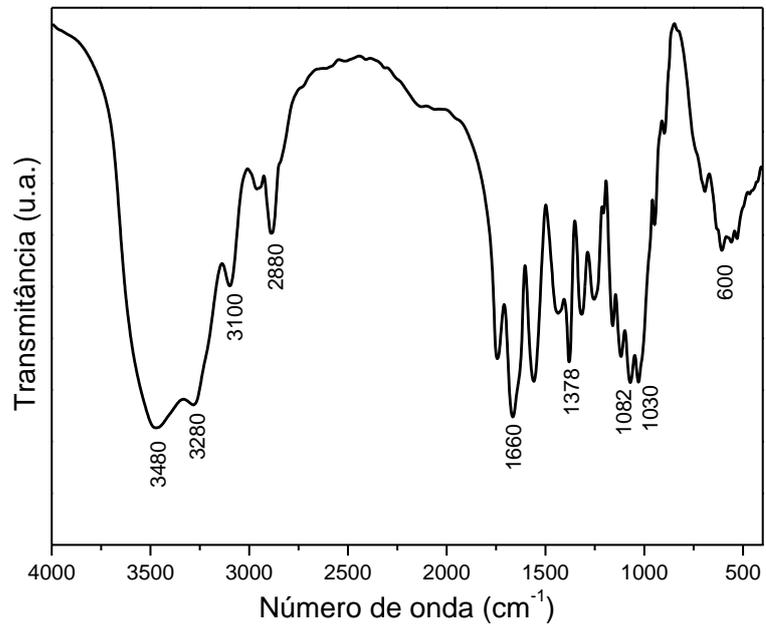


Figura 17: Espectro de FTIR da *N*-acetilquitosana (A-QT).
Fonte: Aatoria própria.

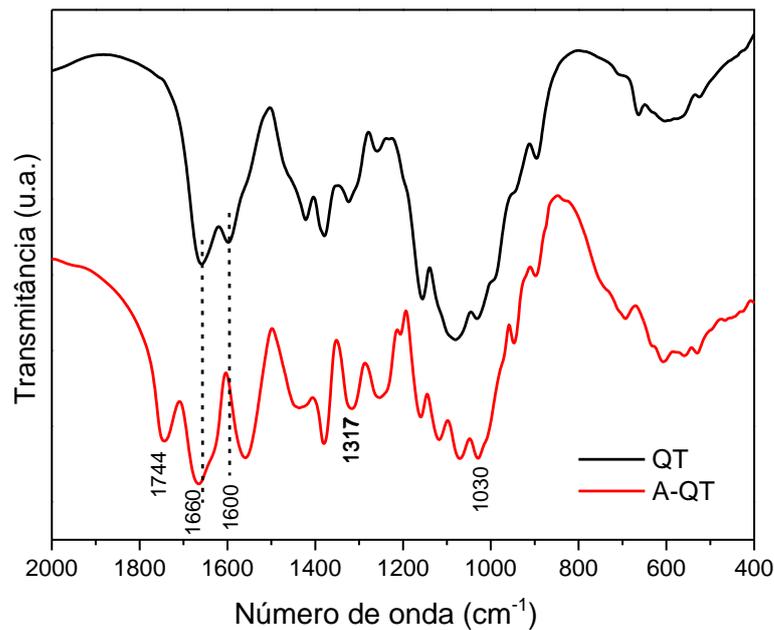


Figura 18: Espectro de FTIR da quitosana pura (QT) e da *N*-acetilquitosana (A-QT).
Fonte: Autoria própria.

5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

A **Figura 19** apresenta o espectro de RMN de ^{13}C no estado sólido da quitosana pura e a associação dos picos aos átomos de carbono. Os picos em 23,8 e 174,2 ppm são atribuídos, respectivamente, aos grupamentos metila (CH_3) e carbonila (CO) do resíduo da *N*-acetilglicosamina (MONTEIRO, 1999) presentes na quitosana original. Os demais picos associados aos carbonos se encontram indicados na estrutura presente na **Figura 19**.

A **Figura 20** apresenta o espectro de RMN de ^{13}C da *N*-acetilquitosana, onde se observou um aumento significativo na intensidade dos picos em 23,3 e 174,0 ppm (C8 e C7, respectivamente), comparado ao da quitosana pura, confirmando assim, a acetilação nos grupamentos amino livres. Confirmando com os resultados obtidos por FTIR. Além disso, o pico a 174 ppm está associado não só ao carbono da carbonila da amida (C7), mas também ao carbono da carbonila do grupo éster (C10). Dessa forma, a quantificação isolada dos grupamentos OH e NH_2 acetilados não foi possível através dessa técnica, devido à sobreposição dos picos dos carbonos C7 e C10.

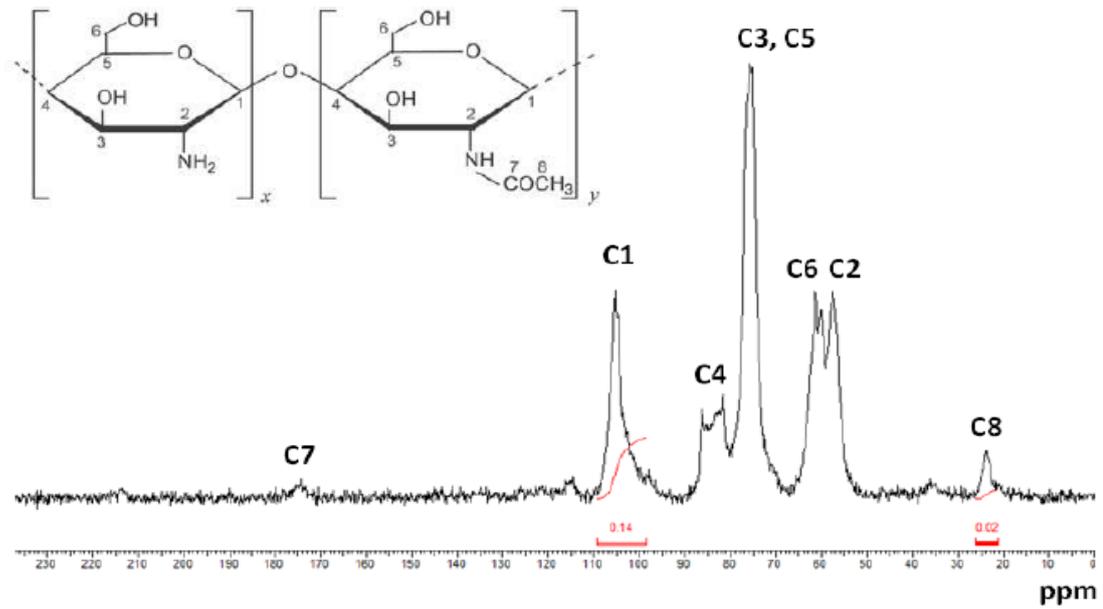


Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C da quitosana pura.
Fonte: Autoria própria.

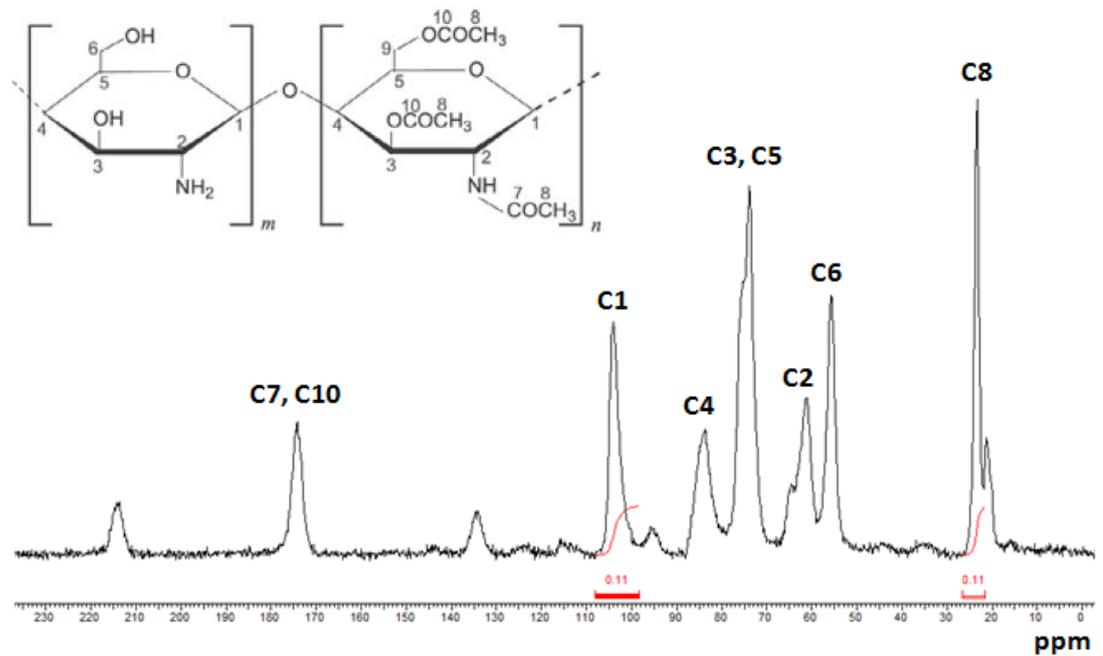


Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C da *N*-acetilquitosana.
Fonte: Autoria própria.

Uma estimativa do grau de substituição (*N*- e *O*-acetilação) foi realizada em função da razão entre as porcentagens de carbono presentes nas amostras a 23,3 ppm (C8) e a 104,0

ppm (C1), sendo este último o padrão interno de referência. De acordo com a **Tabela 3**, pode-se verificar que a amostra acetilada apresenta grau de substituição igual 1,0. Tendo em vista que o grau de substituição máximo seria 3 (as duas hidroxilas dos carbonos 3 e 6, e o grupo amino livre), o percentual de OH e NH₂ acetilados é de 33%. Em trabalhos anteriores GARCIA; SILVA; COSTA, 2008; VACHOUD; ZYDOWICZ; DOMARD, 2007, a acetilação da quitosana em meio homogêneo alcançou graus de *N*-acetilação na faixa de 25 a 99,5%. Entretanto, deve-se lembrar de que, nessas condições experimentais, a acetilação ocorre apenas nos grupos amino livres (GARCIA; SILVA; COSTA, 2008; VACHOUD; ZYDOWICZ; DOMARD, 2007). Dessa forma, por exemplo, um grau de *N*-acetilação de 99,5% corresponde a um GS de 0,995 e a um percentual global de acetilação de 33%, se forem levadas em consideração as duas hidroxilas presentes em cada unidade glicosídica. Comparando esse dado da literatura com os resultados obtidos nesse trabalho (GS de 33%), pode-se considerar que as amostras estudadas apresentam grau de acetilação da mesma ordem de grandeza daquelas obtidas por acetilação em meio homogêneo. A diferença básica entre as amostras obtidas por acetilação em meio homogêneo e heterogêneo seria a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia polimérica.

Tabela 3 - Estimativa do grau de substituição da quitosana e da *N*-acetilquitosana.

Amostras	Valores de Integração			Grau de substituição (GS) *
	C7, C10	C8	C1	
Quitosana	0,01	0,02	0,14	0,14
<i>N</i> -Acetilquitosana	0,07	0,11	0,11	1,0

*Grau de substituição: razão entre as porcentagens de carbono presentes nas amostras C8 e C1.

Fonte: Autoria própria.

5.1.3 Determinação do grau de acetilação da *N*-acetilquitosana.

Para determinar o grau de *O*-acetilação realizou-se também a caracterização volumétrica, baseado na norma ASTM D871-72. De acordo com a **Tabela 4**, verificamos o aumento da porcentagem em massa dos grupos *O*-acetil e do grau de substituição dos grupos OH. Os grupos *N*-acetil presentes na quitosana acetilada não foram quantificados pelo método volumétrico, pois se trata de um método específico para substituintes no grupo OH (GARCIA; SILVA; COSTA, 2008).

Tabela 4 - Determinação por método volumétrico do grau de substituição dos grupos OH dos derivados da *N*-acetilquitosana.

Amostras	<i>O</i>-acetil (% m/m)	Grau de substituição (GS)
Quitosana	0	0
<i>N</i>-Acetilquitosana	5,5	0,042

Fonte: Autoria própria.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GÉIS DE *N*-ACETILQUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação alcalina de ligações *N*-acetil presentes na quitina. Portanto, a quitosana é um biopolímero constituído por um conjunto de cadeias poliméricas parcialmente desacetiladas. As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho das cadeias poliméricas.

Devido às fortes interações intermoleculares e ao caráter semicristalino, a quitosana é insolúvel na maioria das solventes orgânicos, sendo solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6, sendo o ácido acético e o fórmico, os mais usados para a solubilização da mesma (MUZZARELLI, 1973).

Reações de modificação química da quitosana como desacetilação, *N*-acetilação, acilação, *O*-acetilação, *O*- e *N*-ftalação, *O*-carboximetilação, oxidação, entre outras, têm sido estudadas, de forma a preparar produtos com características específicas para determinadas

aplicações (GARCIA; SILVA; COSTA, 2008). Dentre elas, a reação de acetilação tem sido usada para obtenção de amostras de quitosana com grau de acetilação em torno de 50%, que possui solubilidade em água.

A quitosana utilizada neste trabalho apresenta grau de desacetilação $> 75\%$, para facilitar à obtenção dos géis, a quitosana foi acetilada em meio heterogêneo utilizando anidrido acético e piridina. A reação em meio heterogêneo consiste no intumescimento da quitosana em *N,N*-dimetilformamida (DMF), favorecendo a reação pela maior exposição dos grupos funcionais reativos.

Na presença de soluções aquosas diluídas de ácidos, a quitosana comporta-se como polieletrólito, causando o surgimento de interações repulsivas eletrostáticas entre os grupos amino ionizados ao longo da cadeia polimérica. Assim, para caracterizar o comportamento desse polímero em solução, é importante selecionar o sistema de solvente mais apropriado, de forma a eliminar os efeitos iônicos. Após a modificação da quitosana foi realizado um teste de solubilidade com a quitosana e com a *N*-acetilquitosana em diferentes solventes: água destilada, *N,N*-dimetilacetamida (DMA), DMA com 5% de LiCl e solução de ácido acético 5% (v/v), os resultados estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Teste de Solubilidade da quitosana e da *N*-acetilquitosana em diferentes solventes após 24 horas de agitação.

Solventes	Quitosana	<i>N</i> -acetilquitosana
Água destilada	Não Solúvel	Não Solúvel
Diclorometano	Não Solúvel	Não Solúvel
Ácido Acético 5%	Solúvel	Não Solúvel
Acetona	Não Solúvel	Não Solúvel
Acetato de etila	Não Solúvel	Não Solúvel
DMA	Não Solúvel	Parcialmente Solúvel
DMA/LiCl 5%	Não Solúvel	Formação de gel

Fonte: Autoria própria.

No teste de solubilidade da quitosana, observou-se a solubilização deste material em solução de ácido acético 5%. Esta solubilização está diretamente relacionada com o grau médio de acetilação da quitosana (GA), valor este que expressa à quantidade de grupos amino disponíveis para protonação e que geram cargas ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia do polímero, aumentando a repulsão eletrostática entre as cadeias e a solubilidade em meio ácido.

A solubilidade da *N*-acetilquitosana obtida também foi verificada, **Tabela 5**. A *N*-acetilquitosana mostrou-se insolúvel na maioria dos solventes testados, apresentando solubilidade apenas em DMA e na solução de DMA com 5% de LiCl. A insolubilidade da *N*-acetilquitosana, os solventes avaliados, pode ser explicada devido à diminuição do número de grupos hidrofílicos (-OH e -NH₂) livres do polímero. E por ser uma reação processada em meio heterogêneo, provavelmente houve a preservação das regiões cristalinas e assim contribuindo para o surgimento dos grupos acetil com distribuição desuniforme na cadeia polimérica (GARCIA; SILVA; COSTA, 2008).

Além disso, a parcial solubilidade da *N*-acetilquitosana em DMA concorda com a hipótese dos polímeros acetilados apresentarem forças de atração intermoleculares menos intensas que a quitosana original (GARCIA; SILVA; COSTA, 2008).

A solubilização completa e a formação do gel de *N*-acetilquitosana na solução de DMA com 5% de LiCl é explicada pelo aumento da força iônica do meio, sendo o LiCl o responsável pela quebra das regiões cristalinas. Os íons Li⁺ formam um complexo com as moléculas do DMA, formando um macrocátion, [DMA-Li]⁺, e os íons cloretos, passam a formar ligações que se assemelha às ligações de hidrogênio com os átomos de hidrogênio das hidroxilas do polissacarídeo, promovendo assim, a redução das interações entre as moléculas de quitosana e sua solubilização (STRIEGEL, 1997). A solução foi mantida em repouso para que a estabilização das interações, verificando que após 48 h do gel formado sua massa permaneceu constante.

Baseado na solubilidade da *N*-acetilquitosana os géis foram preparados utilizando uma mistura de DMA/LiCl. A **Figura 21** mostra a fotografia do gel obtido da *N*-acetilquitosana, podendo observar sua fácil gelificação, isso devido à redução da hidrofiliabilidade da quitosana pela introdução dos grupos acetil, e sua capacidade de conservação após a estabilização. Por se tratar de um gel para aplicação biomédica, os géis foram lavados, pois o DMA se trata de um solvente orgânico com elevada toxicidade. Após o processo de lavagem, observou-se que os géis de *N*-acetilquitosana se tornaram mais rígidos, isso devido à contração da estrutura do gel após a redução de seu volume, devido à formação de novas interações intermoleculares (GARCIA, 2008) apresentando um aspecto borrachoso, **Figura 21(c)**.

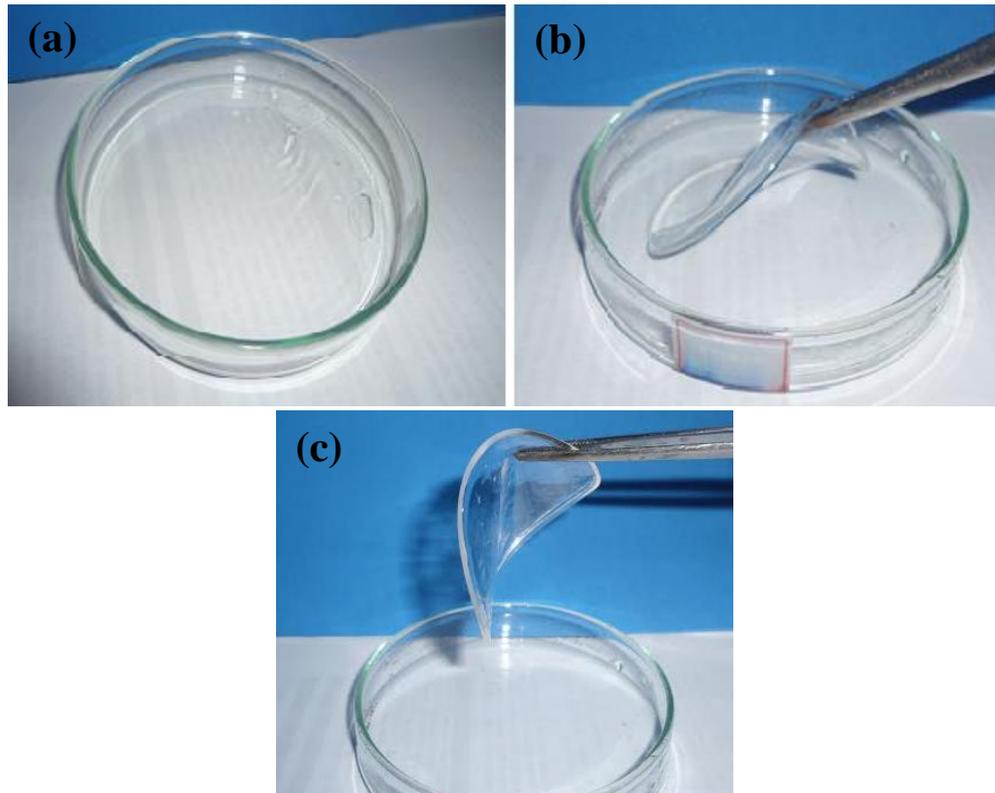


Figura 21: Fotografia dos géis de *N*-acetilquitosana em DMA/5% LiCl: (a) gel sem lavagem, (b) gel após a lavagem com água destilada e (c) gel seco.

Fonte: Autoria própria.

As características morfológicas das superfícies de fratura dos géis de *N*-acetilquitosana puro foram investigadas por MEV e algumas micrografias estão apresentadas na **Figura 22**. A morfologia da superfície de fratura dos géis revela uma superfície lisa e indica um filme denso e uniforme.

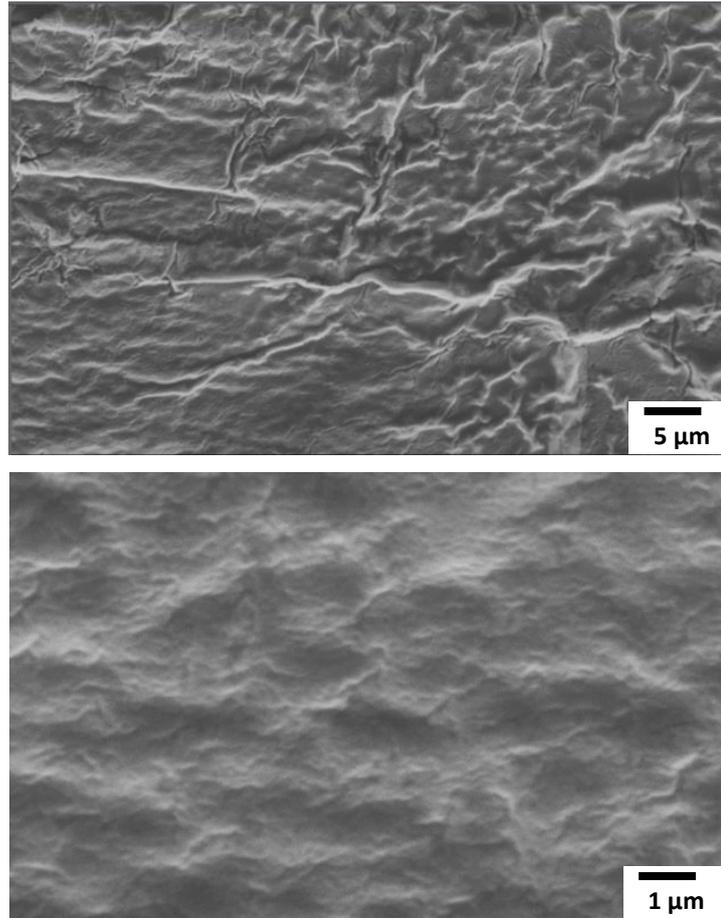


Figura 22: Micrografias de MEV da superfície de fratura do géis de *N*-acetilquitosana puro.
Fonte: Autoria própria.

5.2.1 Caracterização das Blendas de *N*-Acetilquitosana/Acetato de Celulose

Blendas a base de quitosana e acetato de celulose foram preparadas com objetivo de aumentar a biocompatibilidade e a eficiência de encapsulamento dos fármacos. A **Figura 23** mostra a fotografia dos géis obtido da *N*-acetilquitosana, das blendas de *N*-acetilquitosana/acetato de celulose puras e contendo naproxeno. Todos os géis obtidos possuem boas propriedades mecânicas, são estáveis mesmo após as lavagens com água destilada. Além disso, é possível observar que com aumento da porcentagem de acetato de celulose nas blendas os géis apresentam um aspecto esbranquiçado. Esta característica pode ser explicada pelo processo de separação de fase de ocorre após a evaporação do solvente, indicando que nestas composições a *N*-acetilquitosana não é miscível com o acetato de celulose. Entretanto, para as blendas contendo naproxeno é possível observar que os sistemas

são translúcidos, sugerindo que o naproxeno serve como agente compatibilizante, tornando o sistema mais miscível.

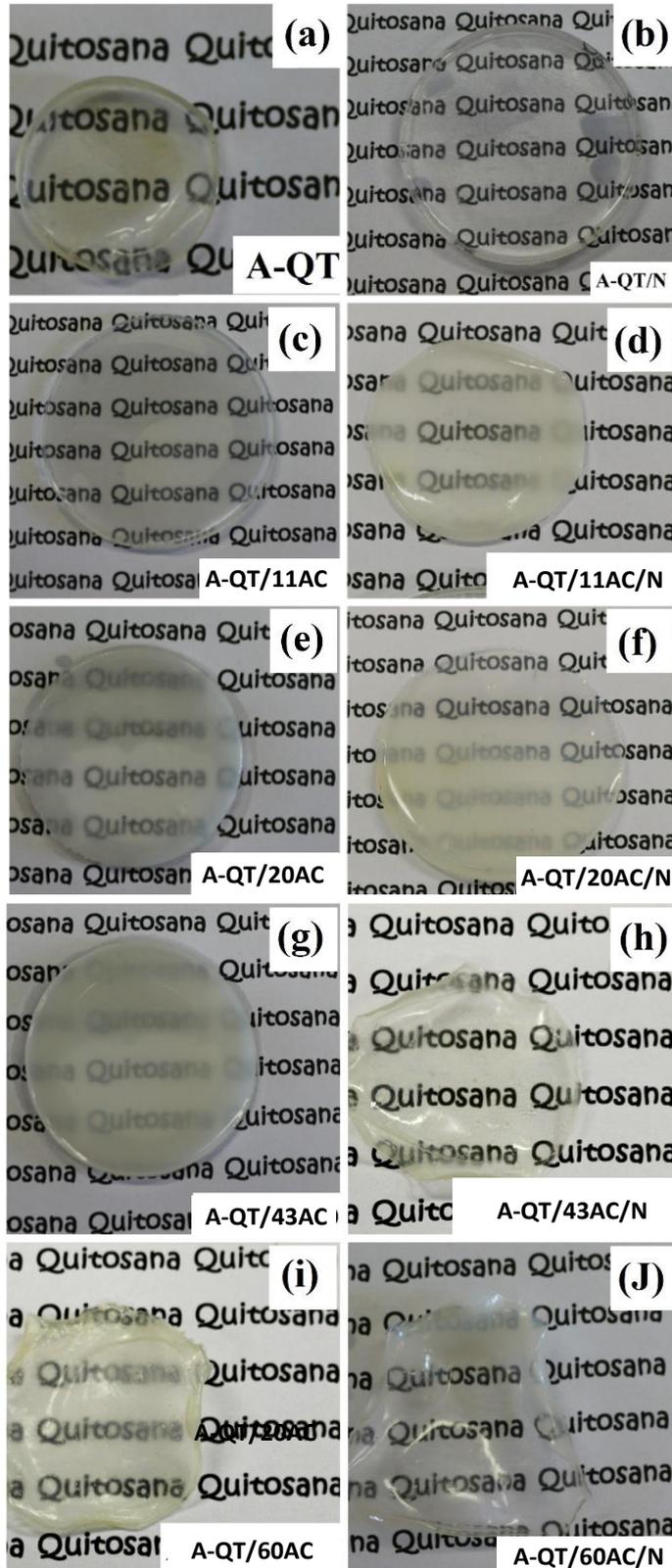


Figura 23: Fotografia dos géis de *N*-acetilquitosana puro e com naproxeno e das blendas *N*-acetilquitosana/acetato de celulose puras e com naproxeno.

Fonte: Autoria própria.

A fotografia dos géis obtido da *N*-acetilquitosana e das blendas de *N*-acetilquitosana/acetato de celulose contendo os naproxenatos eugenila e de timila estão apresentados na **Figura 24**. Pode-se observar que todos os géis são translúcidos e porosos.

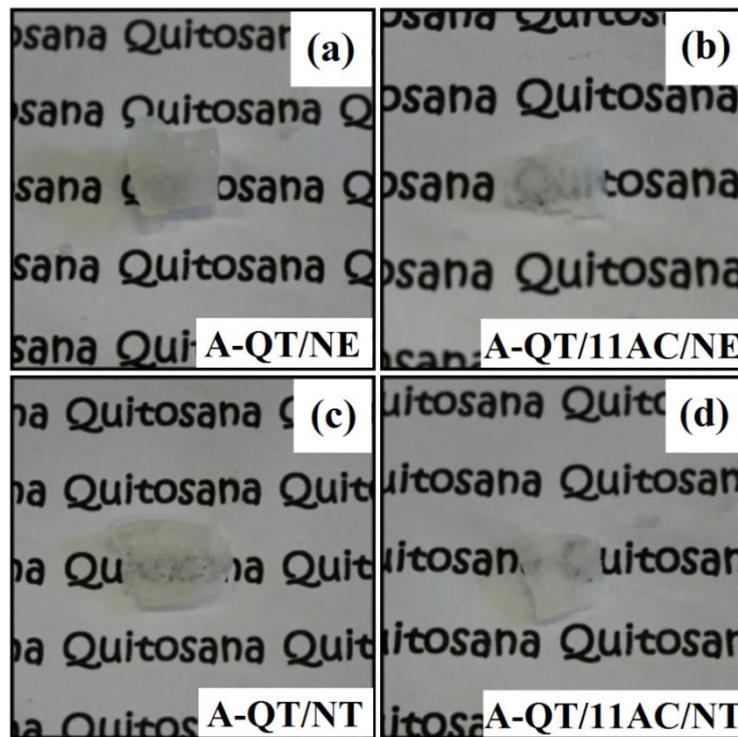


Figura 24: Fotografia dos géis de *N*-acetilquitosana com naproxenato de eugenila (a) e timila (c) e das blendas *N*-acetilquitosana/acetato de celulose com naproxenato de eugenila (b) e de timila (d).

Fonte: Autoria própria.

5.2.2 Teste de Intumescimento

As medidas de intumescimento (GI%) tem relevante importância quando se pretende estudar matrizes poliméricas, pois avalia a capacidade de hidratação do polímero, propriedade esta que está ligada diretamente com a capacidade de liberação da substância bioativa incorporada. Neste trabalho, as medidas do grau de intumescimento foram realizadas para avaliar as amostras após a imersão em solução tampão salina (pH 6,8).

A **Figura 25** mostra o perfil das curvas de intumescimento das amostras A-QT/NE, A-QT/11AC/NE, A-QT/NT, A-QT/11AC/NT, A-QT, A-QT/60AC, A-QT/11AC, A-QT/43AC em função do tempo de imersão em solução tampão salina. O teste foi realizado por 1440 min em temperatura controlada (36 °C).

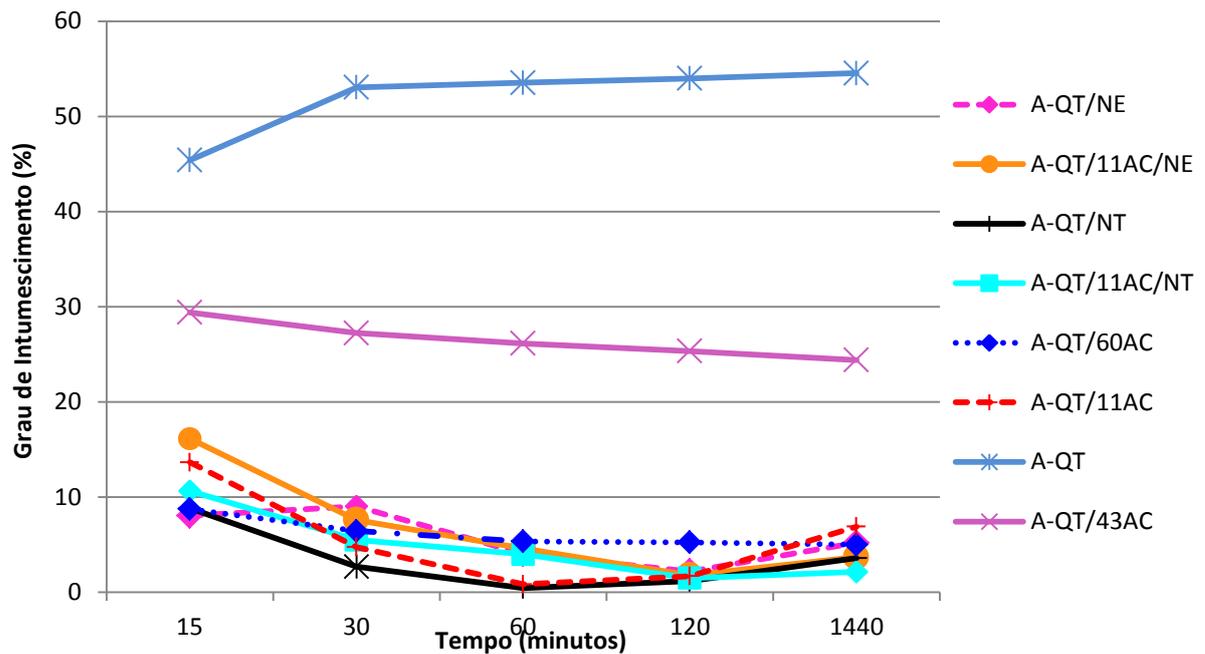


Figura 25: Curvas de intumescimento das amostras A-QT/NE, A-QT/11AC/NE, A-QT/NT, A-QT/11AC/NT, A-QT, A-QT/60AC, A-QT/11AC, A-QT/43AC em função do tempo.
Fonte: Autoria própria.

Observa-se que, as amostras A-QT, A-QT/43AC atingiram o grau de intumescimento no equilíbrio em 30 minutos, aumentando gradativamente, sendo a amostra A-QT a de maior grau de intumescimento (GI%), chegando em 45% em apenas 30 minutos. As demais amostras atingiram o grau máximo em 15 minutos, e se degradaram ao longo do teste. Assim, pode-se observar que as amostras contendo os derivados e as blendas com menor teor de acetato de celulose foram as que mais perderam massa, não intumescendo na presença de solução salina.

O maior grau de intumescimento, a de quitosana pura (A-QT), pode ser explicado devido às fortes interações eletrostáticas entre as cadeias poliméricas que facilitam uma melhor interação com o meio, permitindo um rápido e eficiente inchamento no local de interesse (ABREU, 2008). Já com a adição de acetato de celulose observa-se uma diminuição dessas interações, além de ser hidrofóbico, o que limita a penetração de água ou meios aquosos em suas cadeias, diminuindo assim o grau de intumescimento do gel, fazendo com que o sistema polimérico libere o fármaco mais lentamente na via de interesse (LOPES et al., 2005).

5.2.3 Liberação controlada da substância bioativa

Com intuito de verificar o potencial dos géis de quitosana como carreadores de fármaco, estudo de liberação controlada foram realizados. Os espectros de absorção do naproxeno em diferentes concentrações são apresentados na **Figura 26**. A partir deste gráfico foi possível contruir uma curva analítica, correlacionando a absorção versus concentração do naproxeno utilizado (**Figura 27**). A concentração de naproxeno liberado a partir dos géis foi determinada utilizando a Equação (5).

$$y = 0,00855 + 5,2x \quad (5)$$

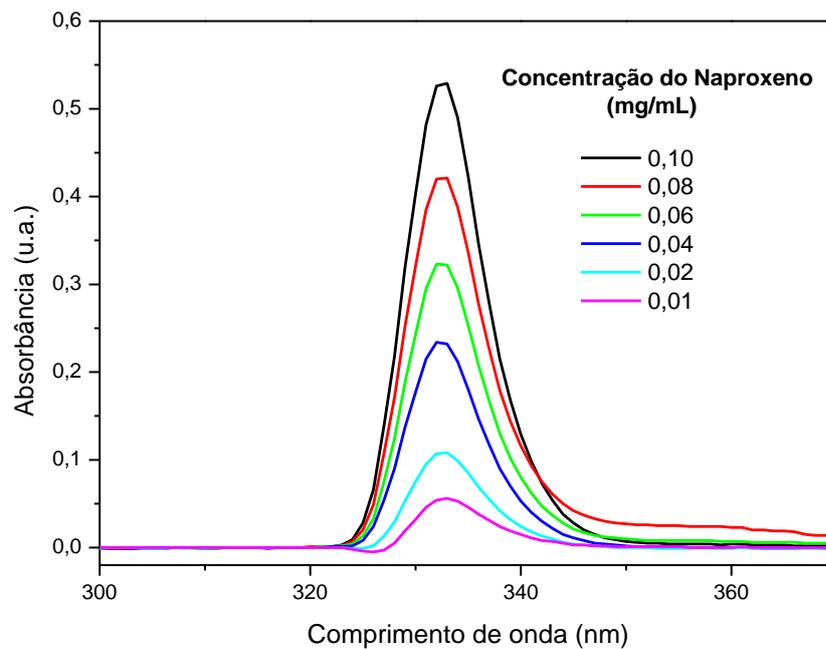


Figura 26: Espectro de absorbância *versus* comprimento de onda das soluções do naproxeno. Fonte: Autoria própria.

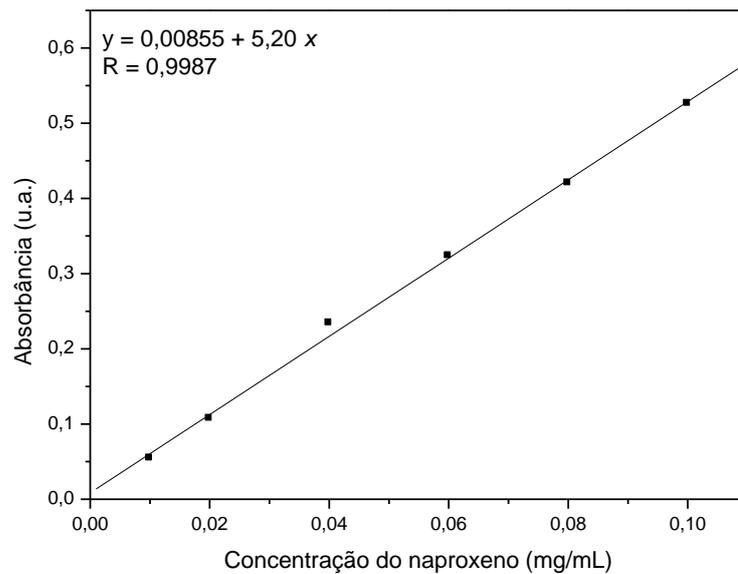


Figura 27: Curva analítica do naproxeno ($\lambda = 332$ nm).
Fonte: Autoria própria.

Os espectros de absorção do naproxeno em função do tempo do géis de *N*-acetilquitosana são apresentados na **Figura 28** e das blendas de *N*-acetilquitosana/acetato de celulose com naproxeno na **Figura 29**. Nos espectro de absorbância dos géis e das blendas é possível observar três picos de absorção máxima, em 220, 270 e 330 nm. As absorções máximas em 220 e 270 nm são relativas as absorções dos polímeros puros *N*-acetilquitosana e do acetato de celulose, respectivamente, **Figura 30**. O pico em 330 nm é referente a absorção máxima do naproxeno puro, como apresentado na **Figura 26**.

Os espectros de absorção dos géis de *N*-acetilquitosana e das blendas de *N*-acetilquitosana/acetato de celulose com os derivados naproxenato de eugenila e timila são apresentados nas **Figuras 31** e **32**, respectivamente. Para estes sistemas não observou-se a liberação dos naproxenatos de timila e de eugenila no intervalo de tempo avaliado neste trabalho.

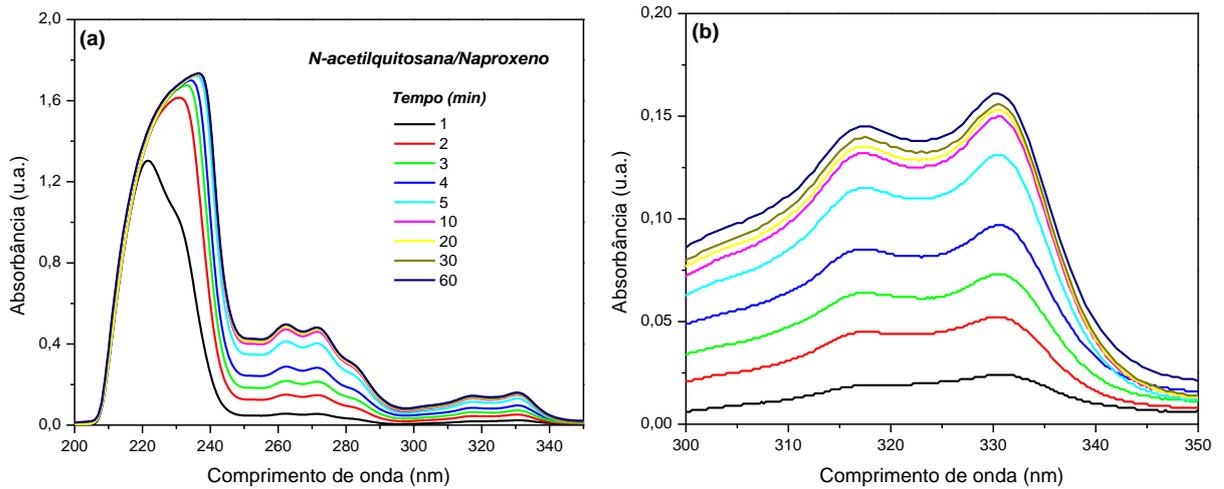


Figura 28: (a) Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda do gel de *N*-acetilquitosana com naproxeno em função do tempo. (b) Ampliação da região de absorção máxima do naproxeno.

Fonte: Autoria própria.

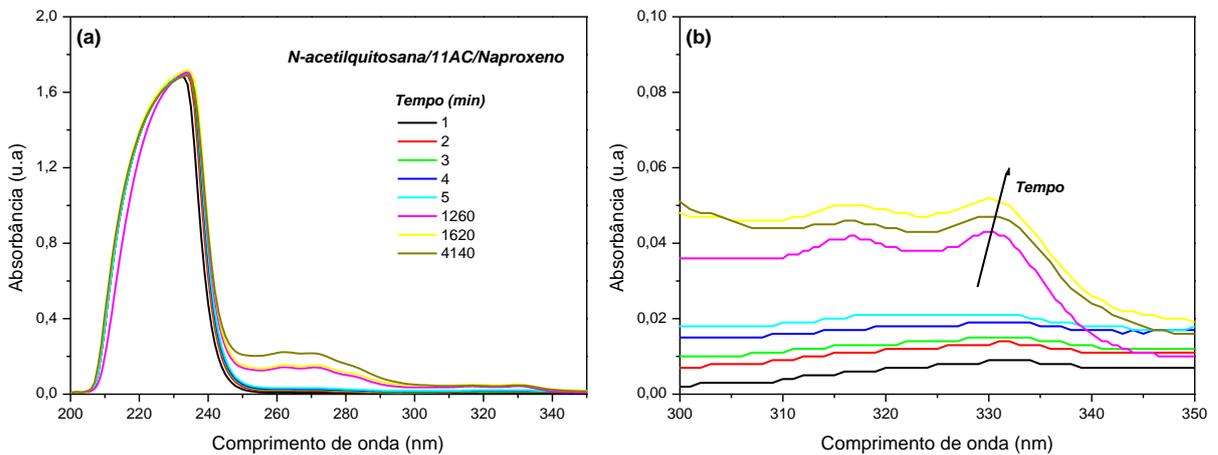


Figura 29: (a) Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda das blendas de *N*-acetilquitosana/acetato de celulose com naproxeno em função do tempo. (b) Ampliação da região de absorção máxima do naproxeno.

Fonte: Autoria própria.

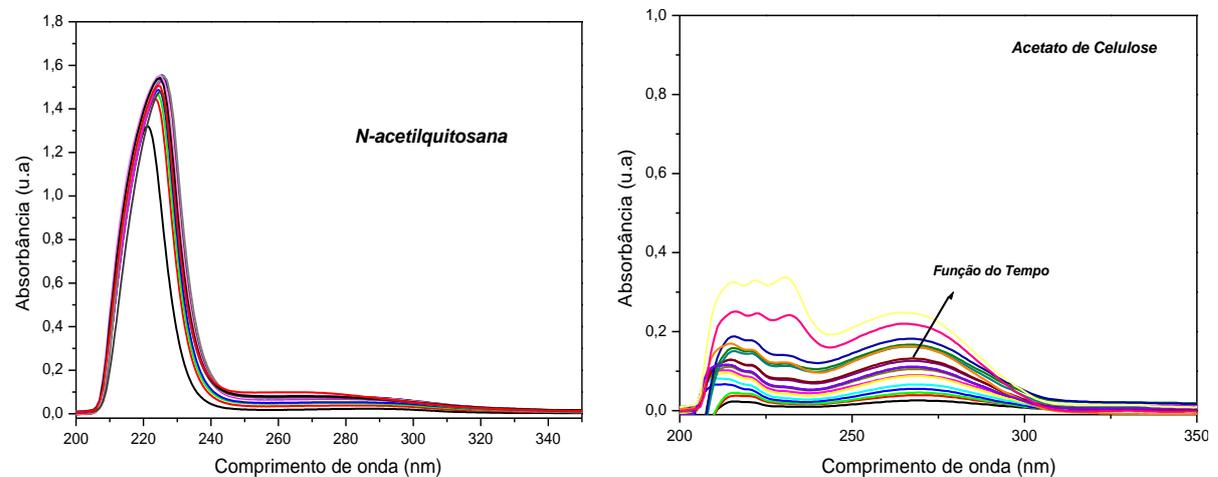


Figura 30: Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda do gel de *N*-acetilquitosana puro e do gel de acetato de celulose puro em função do tempo.

Fonte: Autoria própria.

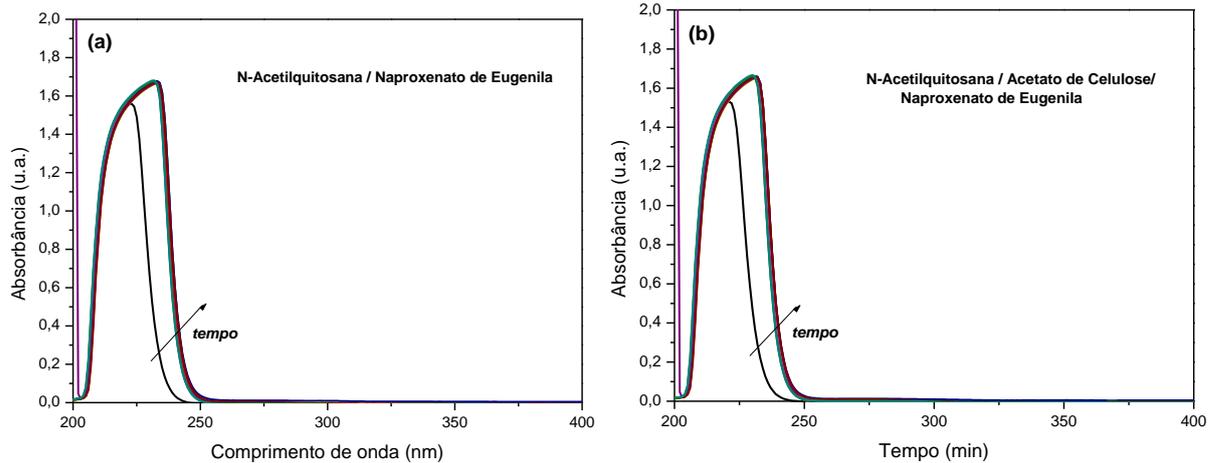


Figura 31: Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda: (a) do gel de *N*-acetilquitosana com naproxenato de eugenila e (b) das blendas *N*-acetilquitosana/11 acetato de celulose com naproxenato de eugenila em função do tempo.

Fonte: Autoria própria.

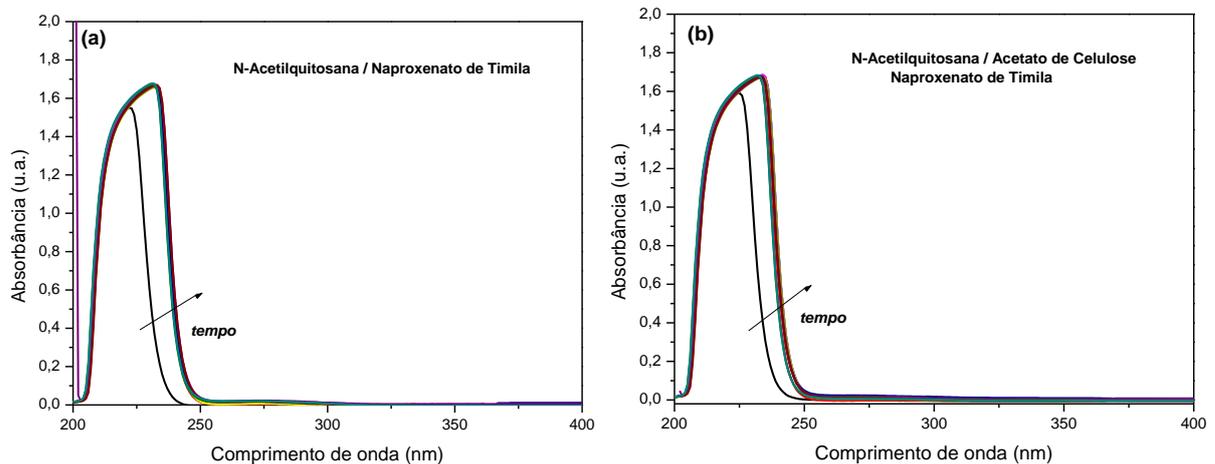


Figura 32: Espectro de absorvância *versus* comprimento de onda: (a) do gel de *N*-acetilquitosana com naproxenato de timila e (b) das blendas *N*-acetilquitosana/11 acetato de celulose com naproxenato de timila em função do tempo.

Fonte: Autoria própria.

A cinética de liberação do naproxeno incorporado nas amostras dos géis de A-QT/N e das blendas A-QT/11AC/N foram avaliadas por espectroscopia UV-Vis em períodos de tempo pré-determinados **Figura 33**. Segundo os dados de cinética de liberação observa-se para os géis de *N*-acetilquitosana, em 8 minutos, a liberação de 90% de naproxeno. Entretanto, para a blenda, em 5 minutos, é observada a liberação de 20%. Além disso, observou-se que a liberação continua até 3 dias para este sistema. Os resultados demonstraram que a liberação do naproxeno nas blendas é mais controlada em relação aos géis de *N*-acetilquitosana.

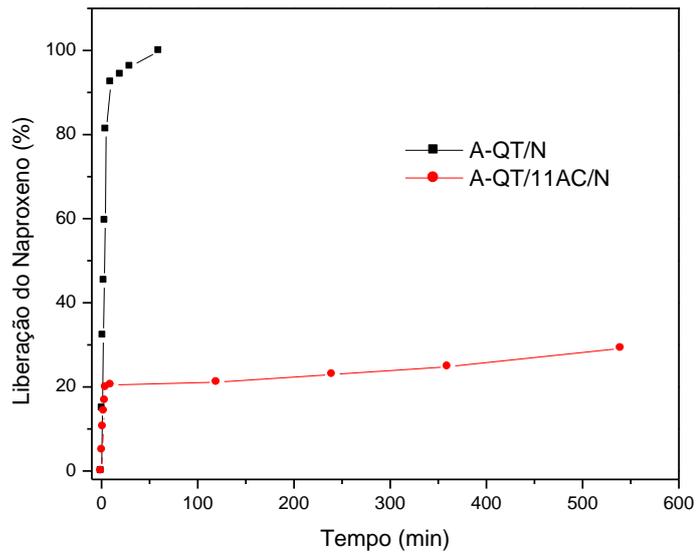


Figura 33: Curva de liberação do naproxeno a partir de géis de *N*-acetilquitosana e das blendas de *N*-acetilquitosana/acetato de celulose obtidos no comprimento de onda de 330 nm.

Fonte: Autoria própria.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Os métodos utilizados para obtenção das micropartículas foram três: coagulação em meio alcalino; de complexação polieletrólítica de reação direta e o método de complexação polieletrólítica de reação indireta.

Partículas de Quitosana têm sido produzidas e amplamente empregadas em diversas áreas da biotecnologia, principalmente como sistemas de transporte e liberação controlada (GENTA, 1998). O formato esférico é preferencialmente utilizado por apresentar a vantagem

de uma melhor área superficial, estabelecendo parâmetros geométricos úteis para reprodutibilidade do processo (GOY; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2004). Variadas metodologias podem ser empregadas para obtenção de partículas de quitosana com dimensões controladas, sendo elas por coagulação alcalina; inversão de fases e pela técnica *spray-drying*.

Considerada uma das técnicas mais simples de obtenção de partículas, o método de coagulação alcalina consiste no gotejamento de uma solução ácida de quitosana em uma solução alcalina de hidróxido de sódio, com o auxílio de uma seringa, provocando imediata coagulação do gel em formato esférico. A altura do gotejamento, as características da seringa e da viscosidade (concentração) são parâmetros fundamentais que devem ser observados para a reprodutibilidade do processo. Assim, cerca de 2 g de quitosana foram dissolvidas em 100 mL de solução de ácido acético 3%. A solução obtida, viscosa, foi gotejada manualmente com o auxílio de uma seringa de insulina sobre solução de hidróxido de sódio (1,0 mol/L), formando as partículas instantaneamente.

As imagens de microscopia óptica das microesferas obtidas pelo método de coagulação em meio alcalino estão apresentadas na **Figura 34**. A partir das imagens é possível observar a presença de macroesferas, sem a formação de agregados, com diâmetro médio de 1 mm. Além disso, é possível observar que as micropartículas produzidas por este método apresentaram uma morfologia regular.

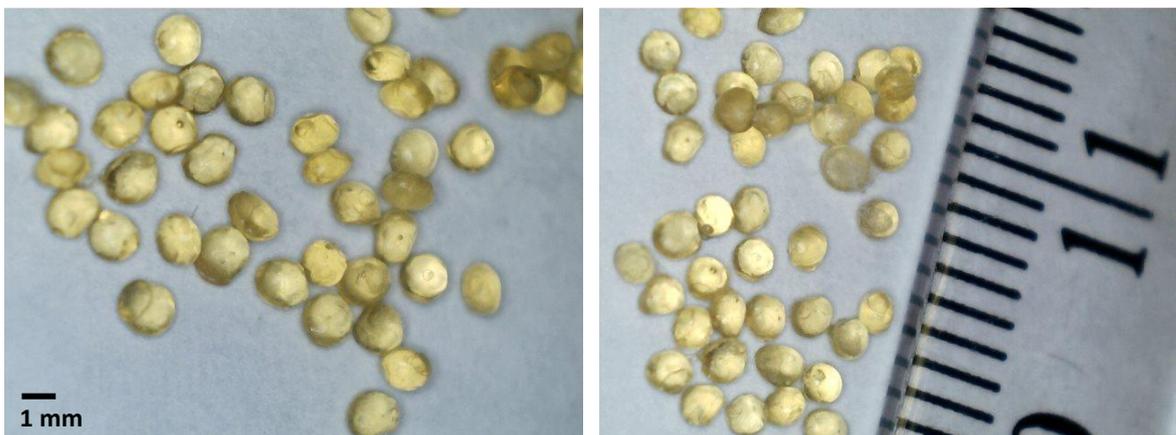


Figura 34: Imagens de Microscopia óptica das microesferas de quitosana obtidas pelo método de coagulação em meio alcalino.

Fonte: Autoria própria.

As partículas denominadas por ALG-QT-I foram obtidas pela técnica de complexação polieletrólítica, simultânea de soluções de QT em meio ácido e ALG em meio aquoso em um meio reacional controlado, sob agitação controlada, possibilitando a formação das partículas. As propriedades das partículas são determinadas pela extensão das interações

entre os polímeros na solução e o ambiente químico ao meio e, assim, as propriedades dos hidrogéis são controladas pelo controle da complexação polieletrólítica (ABREU, 2008). O meio reacional é composto unicamente das soluções de ALG, QT e cloreto de cálcio (CaCl_2), que foram misturados para obtenção das partículas em dois métodos distintos, direto e indireto, afim de melhor investigar as propriedades das partículas formadas em função das características importantes dos polissacarídeos e das interações entre eles. Parâmetros como composição relativa dos componentes e o método de adição e agitação foram alterados de forma a avaliar os efeitos destes no grau de encapsulamento e no perfil de liberação do naproxeno.

A amostra de quitosana utilizada apresenta grau de desacetilação de 75-85%, indicando um alto teor de grupamentos amino na cadeia polimérica. Uma vez que a reação de formação das partículas ocorre pela interação dos grupamentos carboxílicos do alginato com os grupamentos amino da quitosana, assim um elevado grau de desacetilação leva ao aumento do número de interação entre as cadeias da quitosana com as do alginato de sódio (ABREU, 2008). A quitosana dissolve em solução aquosa em pH menor que 6,5 na qual os grupos amino se tornam carregados positivamente, por outro lado, o alginato dissolve em solução aquosa neutra, na qual os grupos carboxílicos se tornam carregados negativamente. Em soluções aquosa com pH entre 3,5 e 6,5 os grupos amino da quitosana interagem com os grupos carboxílicos do alginato com formação de um complexo polimérico (BERGER, 2004 apud ABREU, 2008).

Devido à grande variedade de metodologia para produção de partículas e a necessidade de controle das condições do meio reacional para produção de partículas ALG-QT, o tempo de agitação foi fixado. O tempo de agitação determinado foi de 60 minutos, usada para garantir a formação homogênea das partículas (DE; ROBINSON, 2003; LAWRIE, 2007; RIBEIRO et al., 2005 apud ABREU 2008). A concentração estabelecida para obtenção das partículas foi de 0,2% m/m, uma vez que a concentração das soluções poliméricas é um dos fatores de avaliação das partículas formadas.

A obtenção das partículas foi realizado através da adição controlada das soluções poliméricas através do sistema conforme a **Figura 15**, usando o método indireto e direto, conforme descrito na seção **4.4.2** e **4.4.3**, variando o tipo de agitação magnética ou por ultrassom. Nas **Figuras 35, 36 e 37** são apresentadas as imagens de microscopia óptica das partículas de ALG-QT puras. De maneira geral é possível observar a formação de partículas com diferentes morfologias, com comprimento em torno de 1 mm e diâmetro 0,7 mm, sendo menos regular do que as obtidas pelo método de coagulação alcalina. Além disso, as

partículas obtidas pelo método indireto são mais alongadas em relação as obtidas pelo método direto. As partículas preparadas utilizando o ultrassom possuem morfologia mais arredonda.

As partículas de ALG-QT preparados com naproxeno, possuem morfologia semelhante das micropartículas puras, como pode ser visualizadas nas **Figuras 38, 39 e 40**.

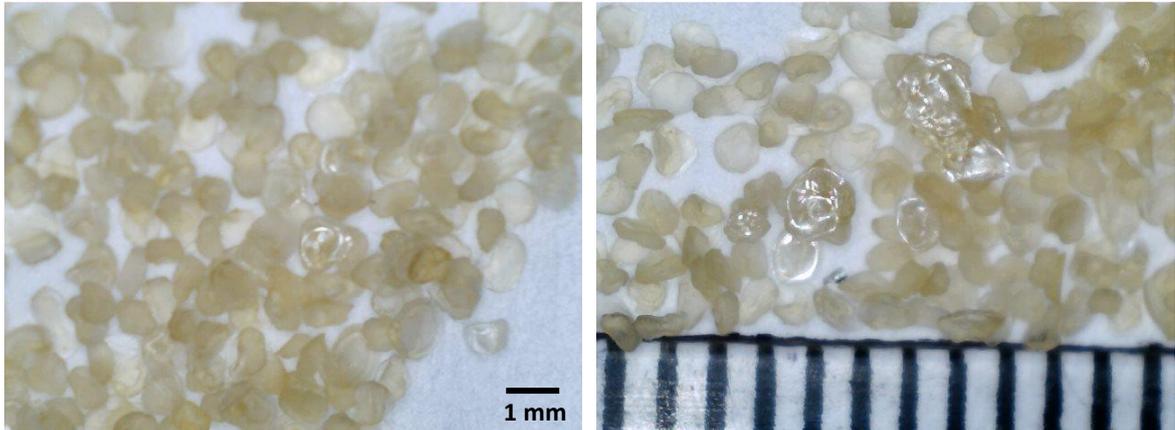


Figura 35: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana pura, obtidas pelo método direto, utilizando agitação magnética.

Fonte: Autoria própria.

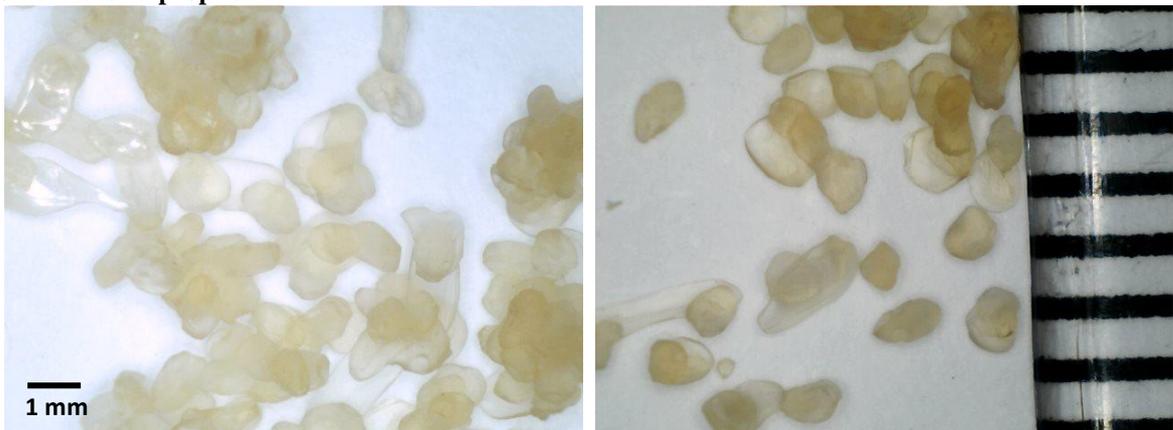


Figura 36: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana pura, obtidas pelo método indireto, utilizando agitação magnética.

Fonte: Autoria própria.

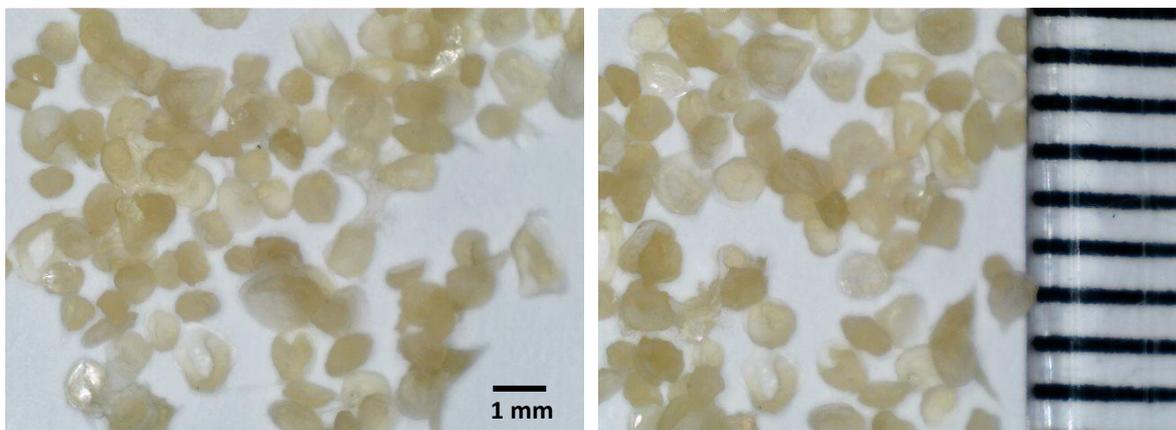


Figura 37: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana pura, obtidas pelo método direto, utilizando ultrassom.
Fonte: Autoria própria.

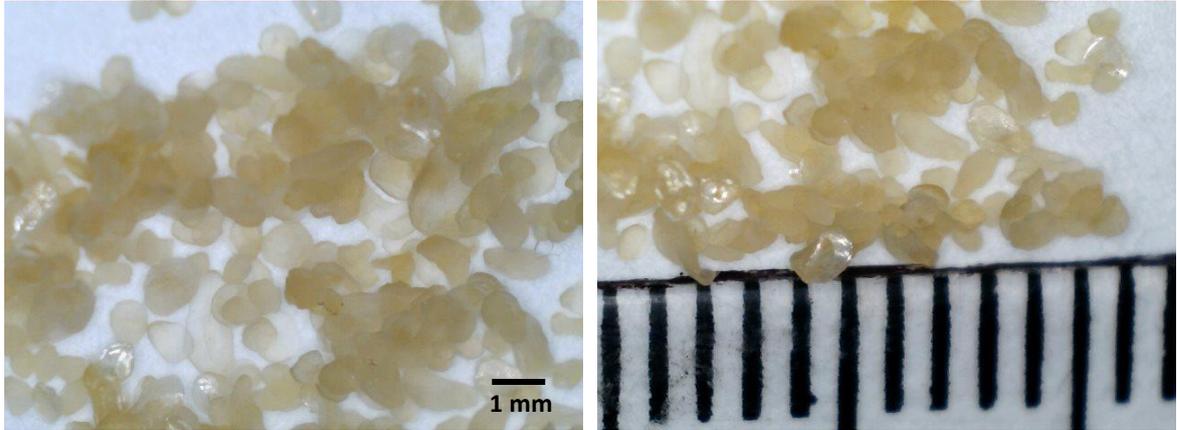


Figura 38: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana com naproxeno, obtidas pelo método direto, utilizando agitação magnética.
Fonte: Autoria própria.

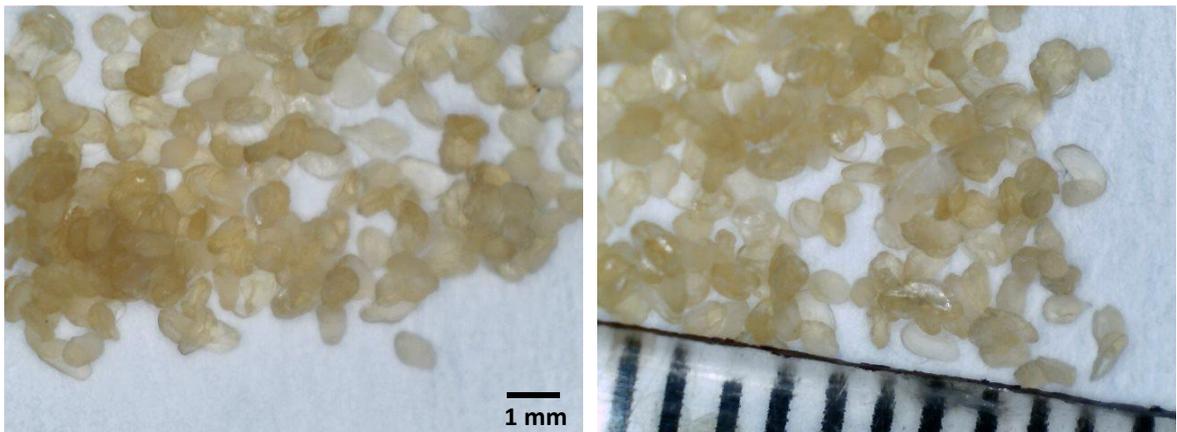


Figura 39: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana com naproxeno, obtidas pelo método indireto, utilizando agitação magnética.
Fonte: Autoria própria.

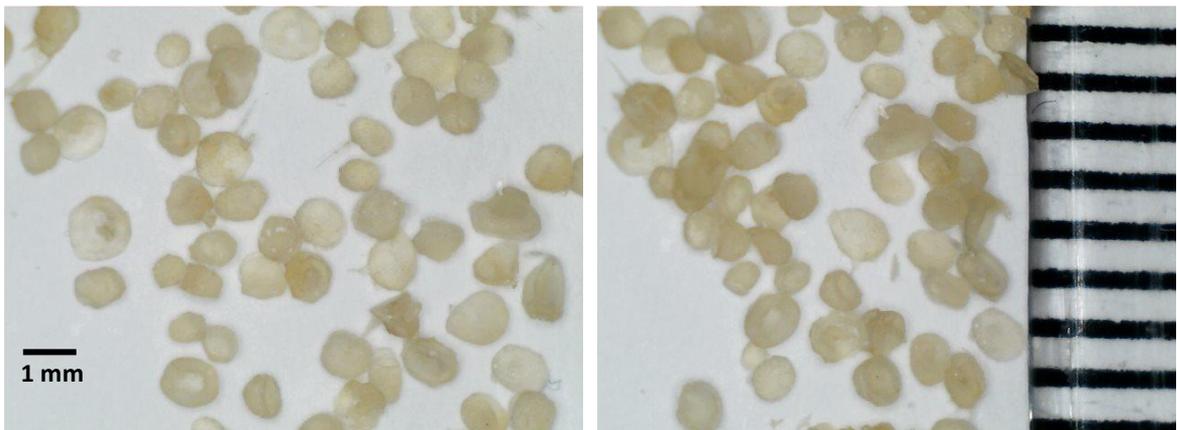


Figura 40: Imagens de Microscopia óptica das micropartículas de quitosana com naproxeno obtidas pelo método direto, utilizando ultrassom.

Fonte: Autoria própria.

Os íons cálcio (Ca^{2+}) no meio reacional fazem reticulações iônicas com os grupamentos carboxílicos do ALG, formando um complexo intra-agregado ALG-Ca pouco reticulado. Assim a quantidade de íons cálcio permite a formação de reticulações, sendo que, em maior quantidade há o aumento dessas reticulações iônicas entre os grupamentos carboxílicos de ALG entre os complexo intra-agregados, com a formação de complexos inter-agregados ALG-Ca. Assim, após a formação do gel ALG-Ca, com a adição da solução de quitosana, os grupamentos amino protonados reagem com os grupamentos carboxílicos livres, formando uma espécie de camada protetora de revestimento nas partículas ALG-Ca, sendo o teor de íons cálcio no meio reacional que determina o grau de reticulação iônica da partícula ALG-Ca formada e a adição da solução de quitosana, responsável por revestir as partículas. Podendo formar grandes complexos inter-agregados, ou de complexos intra-agregados, com morfologia esferoide (ABREU, 2008). A **Figura 41** representa o grau de agregação das partículas ALG/Ca/QT de acordo com o grau de reticulação iônico.

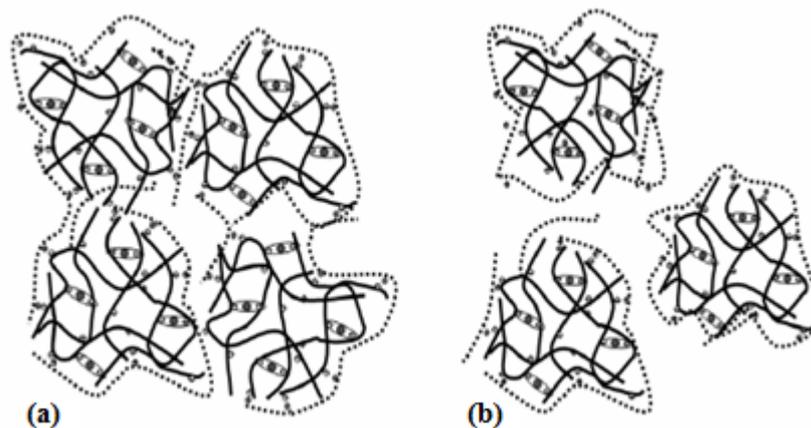


Figura 41: Representação esquemática dos hidrogéis de ALG/Ca revestidos com quitosana: (a) formação dos intra e inter-complexos e (b) formação dos intra-complexos.

Fonte: Abreu, 2008.

5.3.1 Grau de Intumescimento das Partículas

Para um perfil adequado de liberação oral de fármacos, partículas devem apresentar grau de inchamento mínimo no meio gástrico (pH 1,2), para que a liberação do fármaco também seja mínima e ao passar pelo meio intestinal (pH 7,4) o sistema particulado apresente moderado inchamento, de modo que se ocorra a liberação controlada do fármaco (GEORGE e ABRAHAM, 2006). Desta forma, o grau de intumescimento das partículas foi avaliada em pH 1,2 simulando meio gástrico e em pH 7,4 simulando meio intestinal. As análises foram feitas em duplicata. Foram medidas as massas das amostras úmidas, após a imersão por 15, 30, 60, 120 e 1440 minutos em solução de simulação intestinal e gástrica. Os resultados obtidos mostram que as partículas tem como característica diferentes graus de intumescimento em função do tempo e do pH da solução, como ilustrados nas **Figuras 42 e 44**.

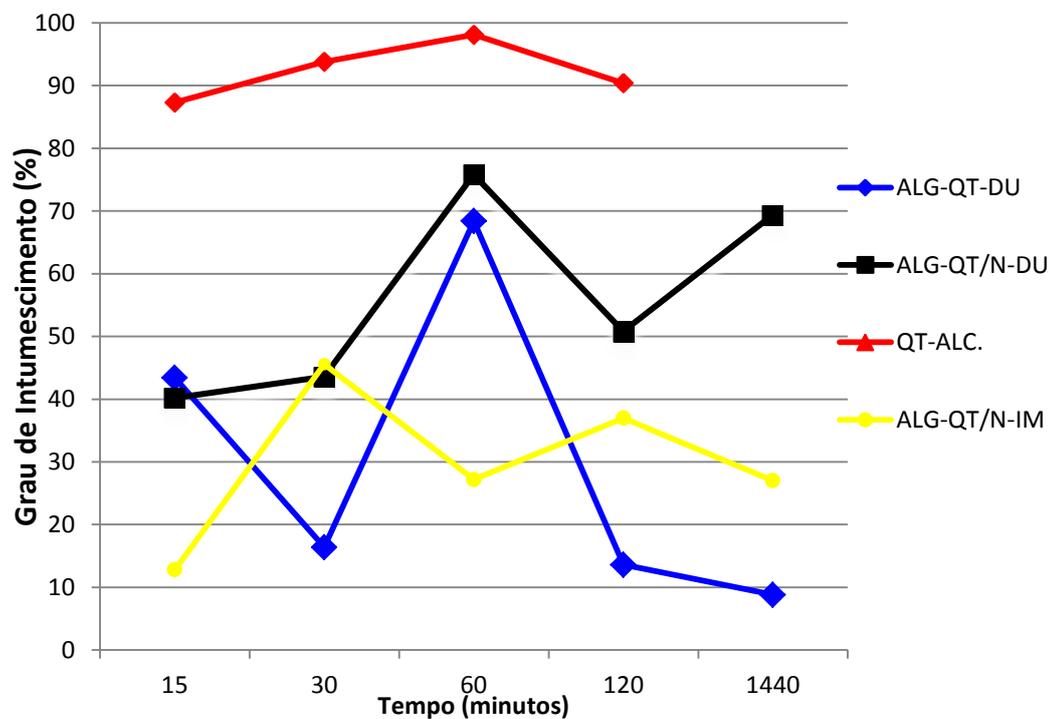


Figura 42: Teste de intumescimento das micropartículas em meio gástrico simulado (pH 1,2).
Fonte: Autoria própria.

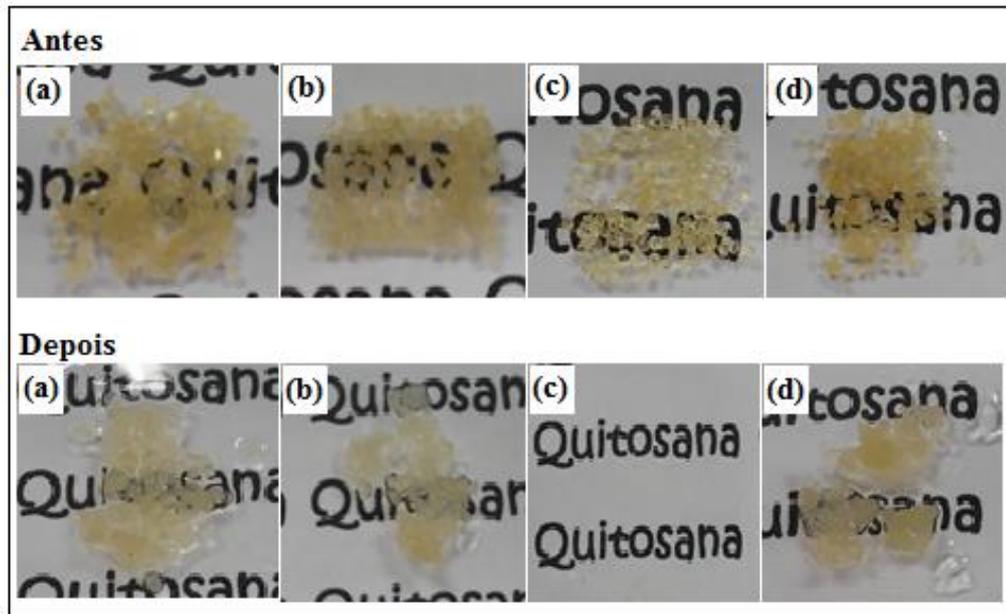


Figura 43: Fotografia das micropartículas de quitosana: (a) ALG-QT - DU, (b) ALG-QT/N-DU, (c) QT/ALC e (d) ALG-QT/N-IM, antes e depois do teste de intumescimento em pH 1,2.
Fonte: Autoria própria.

O grau de intumescimento em meio gástrico foi realizado através da pesagem dos géis após a imersão em solução em pH 1,2 com o tempo de exposição. A **Figura 42**, em meio gástrico simulado, observa-se que as partículas obtidas pelo método de coagulação alcalina (QT-ALC), foram as que apresentaram maior grau de intumescimento, apresentando um grau médio de intumescimento cerca de 90% em relação ao seu peso inicial após 15 min, solubilizando-se totalmente após 2 horas de imersão em meio gástrico simulado. As partículas obtidas pelo método de complexação polieletrólítica se comportaram melhor nesse meio, sendo que a amostra obtida pelo método indireto com agitação mecânica ALG-QT/N-IM, a qual melhor se comportou, apresentando o menor grau de inchamento (**Figura 43**). Segundo Abreu (2008), partículas de ALG-QT apresentam maior estabilidade e resistência ao inchamento, devido a quitosana revestir a partícula ALG-Ca através das interações entre os grupamentos amino e carboxílicos, resultando um maior entrelaçamento entre as cadeias.

Mas ao observamos a **Figura 44**, nota-se que as partículas expostas em meio intestinal, tem um comportamento inverso ao meio gástrico. As partículas de QT-ALC, apresentaram grau de intumescimento moderado, com 59% em 15 min, diferentemente das demais amostras obtidas pelo método de complexação polieletrólítica que atingiram o (GI%) máximo após 2 horas e solubilizaram completamente (**Figura 45**), sendo a amostra ALG-QT/-DU chegando a mais de 80% em apenas 15 minutos de exposição. Esse comportando pode ser explicado devido ao grande tamanho das cadeias poliméricas, que por resistência a

difusão no meio reacional forma uma fina camada de revestimento na superfície à partícula ALG-Ca, ficando assim mais suscetível ao intumescimento (ABREU, 2008).

A obtenção de partículas com um mínimo grau de intumescimento em meio intestinal simulado é influenciada principalmente pelo pH do meio reacional. Sendo que partículas preparadas em pH 6 com quitosana apresentam menor grau de intumescimento. Quando expostos em pH próximos da neutralidade, os grupamentos amino da quitosana não se encontram mais protonados, limitando a capacidade de expansão da rede polimérica. E quando a partícula apresenta menor teor de quitosana essa limitação é aumentada, contribuindo para um mínimo grau de inchamento (ABREU, 2008).

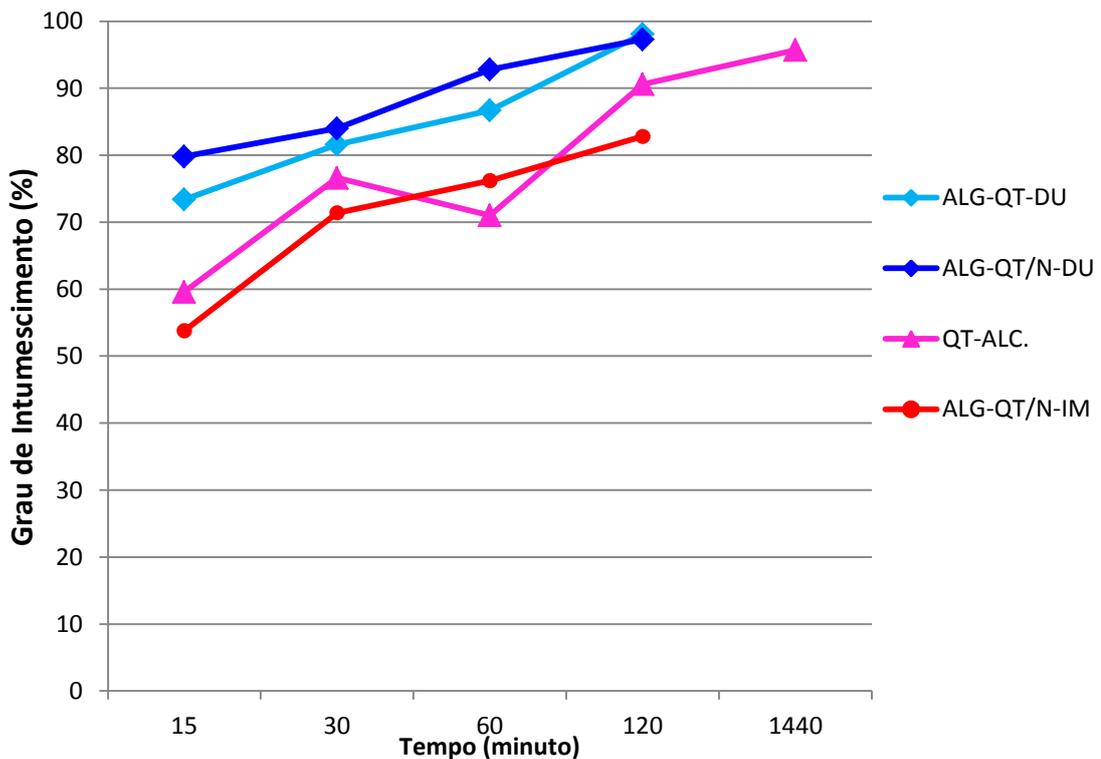


Figura 44: Teste de intumescimento das partículas em meio intestinal simulado (pH 7,4).
Fonte: Autoria própria.

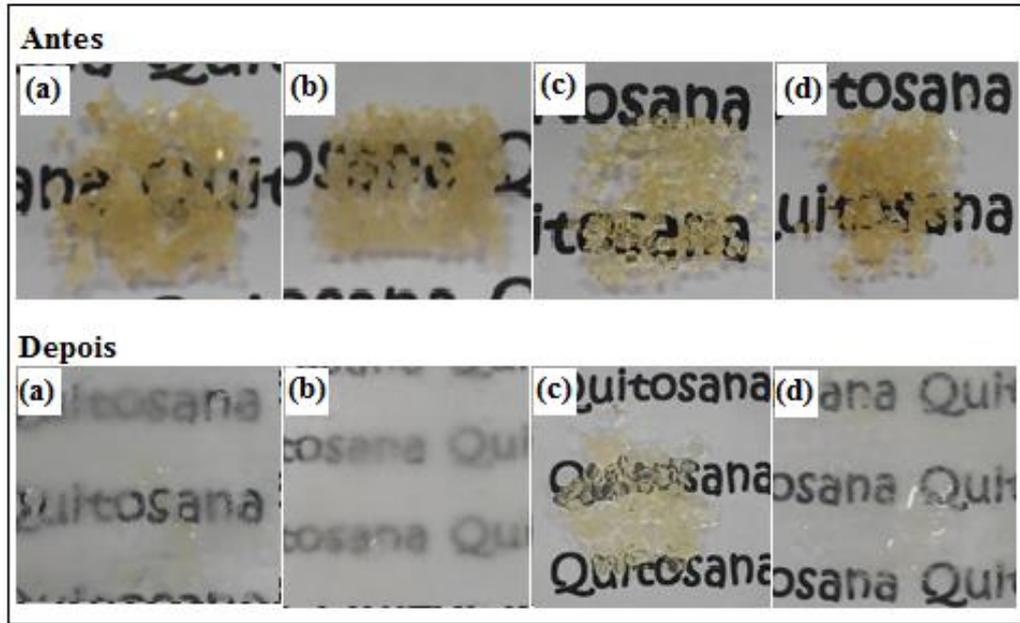


Figura 45: Fotografia das partículas de quitosana: (a) ALG-QT - DU, (b) ALG-QT/N-DU, (c) QT/ALC e (d) ALG-QT/N-IM, antes e depois do teste de intumescimento em pH 7,4.
Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Liberação controlada da substância bioativa

O estudo da liberação controlada também foi realizado com as micropartículas obtidas pelo método direto e indireto com intuito de verificar o potencial destes sistemas como carreadores de fármaco. Os espectros de absorvância *versus* comprimento de onda em função do tempo das micropartículas de ALG-QT com naproxeno estão apresentados nas **Figuras 46 a 48**, nos fluídos de simulação gástrico. Os resultados obtidos com as micropartículas em fluído de simulação intestinal não será apresentado, pois as micropartículas desagregaram durante o teste, tornando a solução opaca, o que inviabilizou o uso dos resultados. Os espectros de absorvância das micropartículas em função do tempo são similares aos obtidos para os géis de *N*-acetilquitosana, com absorção máxima do naproxeno em 330 nm.

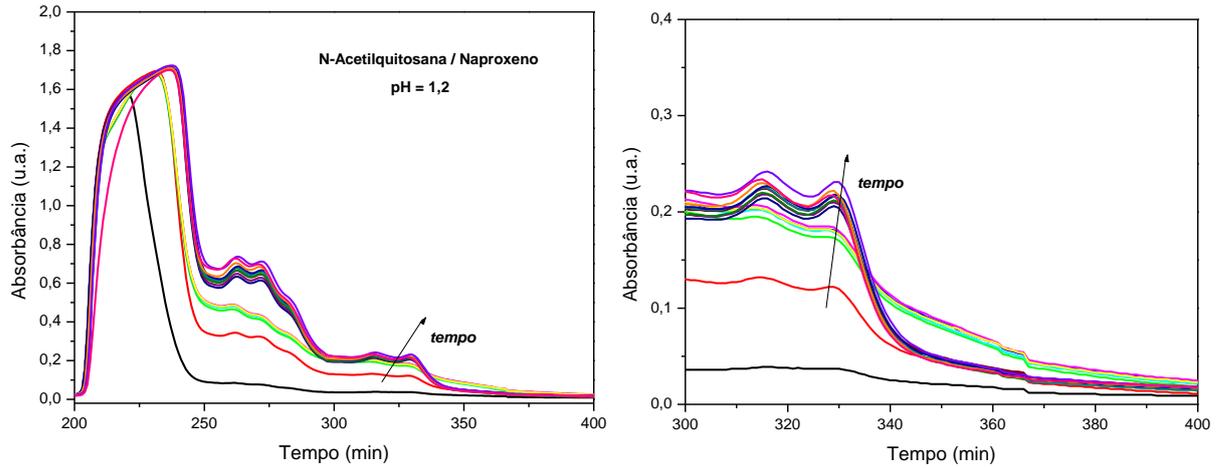


Figura 46: Espectros de absorvância *versus* comprimento de onda das micropartículas de ALG-QT com naproxeno obtidos pelo método direto, utilizando agitação magnética, em função do tempo, em pH = 1,2.

Fonte: Autoria própria.

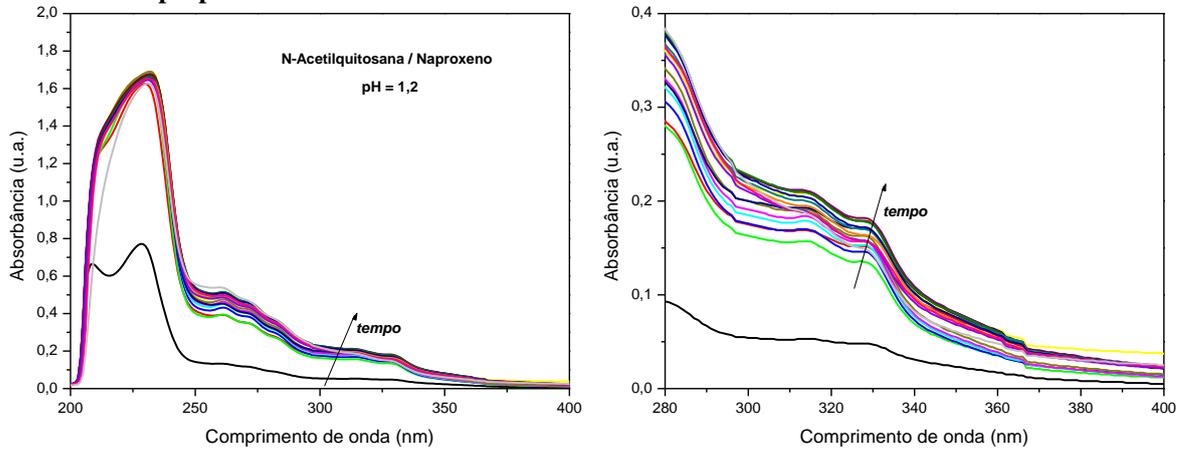


Figura 47: Espectros de absorvância *versus* comprimento de onda das micropartículas de ALG-QT com naproxeno obtidos pelo método direto, utilizando ultrassom, em função do tempo em pH = 1,2.

Fonte: Autoria própria.

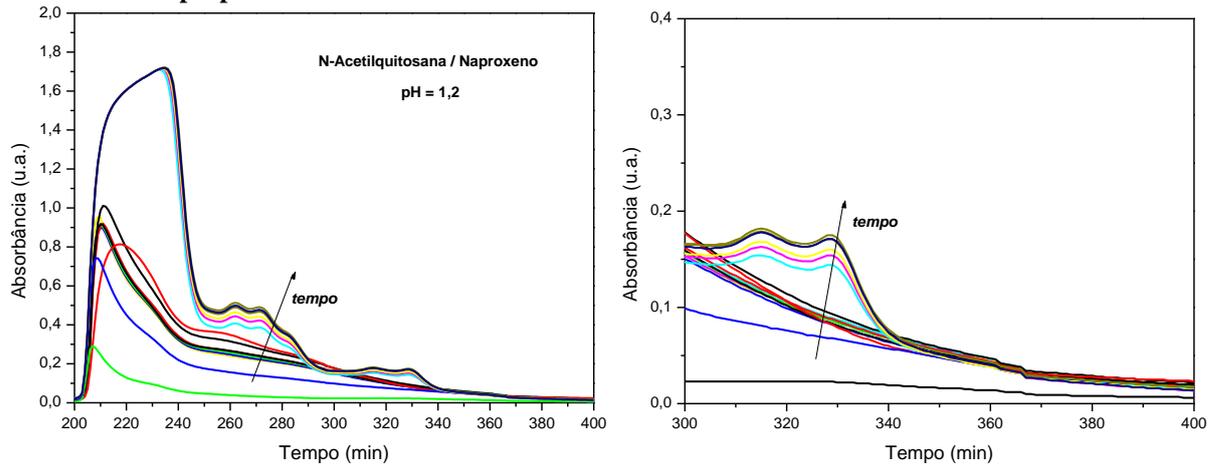


Figura 48: Espectros de absorvância *versus* comprimento de onda das micropartículas de ALG-QT com naproxeno obtidos pelo método indireto, utilizando agitação magnética, em função do tempo em pH = 1,2.

Fonte: Autoria própria.

Com base nos espectros de absorvância foi possível construir as curvas de liberação das micropartículas de ALG-QT/N (**Figura 49**). Para as micropartículas de ALG-QT/N obtidas pelo método direto, observou-se, inicialmente uma liberação rápida do naproxeno, sendo de 50% (ALG-QT/N-DM) e 62% (ALG-QT/N-DU) após 10 minutos em contato com o fluido de simulação gástrico. Já as micropartículas de ALG-QT/N obtida pelo método indireto, apresentaram um perfil de liberação mais lento, com liberação de 26% do naproxeno após 10 minutos. Porém, após uma hora em contato com o fluido de simulação gástrico todos os sistemas atingiram uma liberação de 70%.

Estes resultados sugerem que as micropartículas preparadas pelo método indireto, inicialmente apresentaram um perfil de liberação mais controlado. Entretanto, os perfis de liberação mostraram-se, em geral, mais satisfatórios quando as micropartículas foram produzidas pelo método direto. Estes resultados apontaram a necessidade de realizações de um estudo mais detalhado.

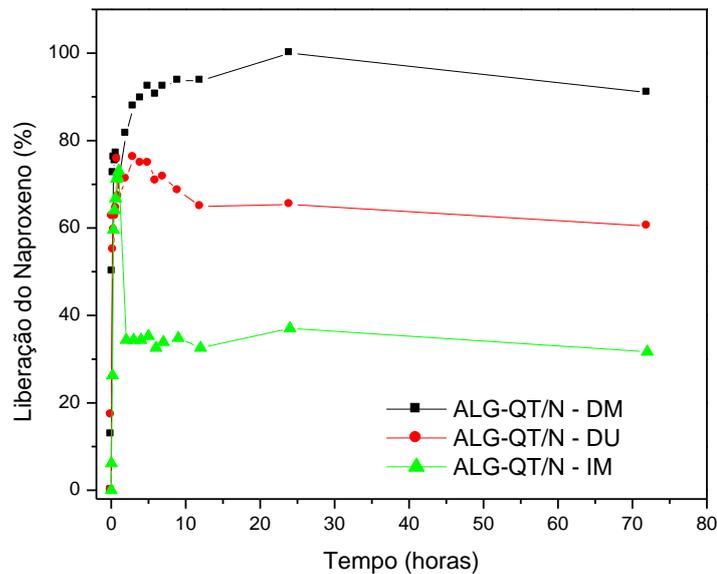


Figura 49: Curvas de liberação das micropartículas ALG-QT/N obtidas pelo método direto e indireto, com agitação magnética e ultrassom, no comprimento de onda de 330 nm, em fluidos de simulação gástrico.

Fonte: Autoria própria.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^{13}C e determinação do grau de acetilação apresentaram evidências da incorporação dos grupos acetila tanto nos grupamentos amino livres, quanto nos hidroxílicos. Por FTIR sugerem um grau de *N*-acetilação de 99,5% da quitosana modificada, valor concordante com dados da literatura. Como esperado, o grau de *O*-acetilação, determinado pelo método volumétrico, foi desprezível nas condições reacionais realizadas.

Através da solubilização da *N*-acetilquitosana em DMA/LiCl foram obtidos géis que apresentaram alta estabilidade, mesmo após lavagens com água destilada. Géis de *N*-acetilquitosana com substâncias bioativas (naproxeno e os naproxenatos de eugenila e timila) foram produzidos utilizando o método *casting*. As características morfológicas das superfícies de fratura dos géis de *N*-acetilquitosana puro foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura. A morfologia revelou uma superfície lisa e indica um filme denso e uniforme.

Blendas de *N*-acetilquitosana/Acetato de celulose com substâncias bioativas (naproxeno, naproxenato de timila e de eugenila) também foram produzidos utilizando o método *casting*. As blendas obtidas são opacas indicando imiscibilidade do sistema, entretanto com a incorporação das substâncias bioativas o sistema tornou-se transparente, sugerindo que o naproxeno atua como compatibilizante.

As micropartículas foram obtidas por diferentes métodos, de maneira geral as partículas possuem diferentes morfologias, com tamanho médio de 1 μm . As partículas de ALG-QT preparados com naproxeno, possuem morfologia semelhante das micropartículas puras. O estudo de liberação mostrou que as micropartículas preparados pelo método indireto, inicialmente apresentaram um perfil de liberação mais controlado.

As cinéticas de liberação das substâncias bioativas incorporadas nos géis de *N*-acetilquitosana foram avaliadas por espectroscopia UV-Vis em períodos de tempo pré-determinados, apresentando uma liberação mais controlada as blendas poliméricas de *N*-acetilquitosana com acetato de celulose.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que géis de *N*-acetilquitosana são promissores sistemas para liberação transdérmica de fármacos que, em condições reais (*in vivo*), poderão ser utilizados para melhorar/otimizar o tempo de ação e manter a concentração terapêutica de substâncias bioativas.

REFERÊNCIAS

ABRAM, A. P. **Quitina y Quitosano: Obtención, caracterización y aplicaciones**. Pontífica Universidad Católica Del Peru, p. 25-148, 2004.

ABREU, F. O. M. S. **Síntese e Caracterização de Hidrogéis Biodegradáveis à Base de Quitosana com Morfologia Controlada com Potencial Aplicação como Carregadores de Fármacos**. Tese (Doutorado em Engenharia de Ciência e Tecnologia de Materiais). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2008.

AELENEI, N.; POPA, M. I.; NOVAC, O.; LISA, G.; BALAITA, L. Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. **Journal of Material Science: Material Medical**, v. 20, p.1095–1102, 2009.

AGNIHOTRI, S.A.; NADAGOUDA, N.; MALLIKARJUNA, M.; TEJRAJ, M.; AMINABHAVI, L. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5 –28, 2004.

ALENCASTRE, J.B.; BENTLEY, M.V.; GARCIA, F.S.; MORAGAS, M.; VILADOT, J.; MARCHETTI, J.M. A study of the characteristics and in vitro permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.

ALVAREZ-ROMAN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53–62, 2004.

AMARAL, M. H. A. R. **Estudo do naproxeno em formas de aplicação cutânea**. Tese (Mestrado) – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto, 1997.

ANTON, N., BENOIT, J.P., SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nanoemulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

ARSHADY, R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules. Part. 2. Polyactides and related polyesters. **Journal Controlled Release**, v. 17, p. 1-21, 1991.

AZEVEDO, M. M. de. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectiva.** 2005. 177 f. Tese de Doutorado (Instituto de Química) Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, São Paulo, p.05, 2005.

AZEVEDO, M.M. **Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos.** Monografia – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas- Unicamp, 2002.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Elétrica de Materiais e Processo.** Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 85-97, 1987.

BENFELDT, E.; SERUP, J.; MENNE, T. Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. **British Journal of Dermatology**, v. 140, p. 739–748, 1999.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 83 –99, 2010.

BODNAR, M.; HARTMANN, J. F.; BOBERLY, J. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 6. p. 2521-2527. 2005.

BOLZINGER, M.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, p. 156– 165, 2012.

BORCHARD, G. Chitosans for gene delivery. **Advanced. Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 145-150. 2001.

BRASILEIRO, J. S. L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas.** Tese (Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2011.

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **Int. J. Pharm.**, v. 336, p. 367-375, 2007.

CAMARGO, P.H.C.; SATYANARAYANA, K.G.; WYPYCH, F. Nanocomposites: synthesis, structure, properties and new application opportunities. *Mater. Res.*, v. 12, n. 1, p. 1-39, 2009.

CASAGRANDE, D.S.; SPACIARI, A. C.; RANGEL, K. C.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L. **Síntese do Ester ibuprofeno-eugenol: um composto com potencial atividade anti-inflamatória.** Anais do CONCCEPAR, 2011.

CHIU, H.; TSAI, W. Topical use of systemic drugs in dermatology: A comprehensive review. *Journal of American Academy of Dermatology*, v. 65, n. 5, p. 1-22, 2011.

COELHO, J.; FERREIRA, P.; ALVES, P.; CORDEIRO, R.; FONSECA, A. C.; GÓIS, J.; GIL, M. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, v. 1, p. 164–209, 2010.

COELHO, T.C.; LAUS, R.; MANGRICH, A. S. FÁVERE, V. T. LARANJEIRA, M. C. M. Effect of heparin coating on epichlorohydrin cross-linked chitosan microspheres on the adsorption of copper (II) ions. *Reac. Funct. Polym.*, v. 67, n. 5, p. 468-475, 2007.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural.** Dissertação (Doutorado em engenharia química) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO, M. L. P. S.; TEIXEIRA, E. Quitosana: Um Amino Polissacarídeo Com Características Funcionais. *Alim. Nutr.*, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DASH, M.; CHIELLINI, F. F.; OTTENBRITEB, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan- A versatile semi-synthetic polymer in biomedical Applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, 2011.

DAUGHERTY, A. I.; MRSNY, R. J. Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, p. 686-706, 2006.

DAVIDENKO, N.; BLANCO, M.; PENICHE, C.; BECHERAN, L.; GUERRERO, S.; TEIJON, J. Effects of Different Parameters on the Characteristics of Chitosan–Poly(acrylic acid) Nanoparticles Obtained by the Method of Coacervation. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 111, p. 2362–2371, 2009.

DE, S.; ROBINSON, D. Polymer relationships during preparation of chitosan-Alginate and poly-L-lysine- alginate nanospheres. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 101-112, 2003.

DUCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIERA, P.; POPINEAUC, Y.; BOURY, F. Evidence and Characterization of Complex Coacervates Containing Plant Proteins: Application to the Microencapsulation of Oil Droplets. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 239-247, 2006.

DURÁN, N., DE OLIVEIRA, A. F., DE AZEVEDO, M. M. M. **Processo de obtenção de micro e nanoesferas de poli(e-caprolactona) na incorporação de isoniazida, composto com atividade antimicrobacteriana**. 2002.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**. v. 5, p. 161-171. 2005.

FÖRSTER, M.; BOLZINGER, M.; FESSI, H.; BRIANÇON, S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-23, 2009.

FOX, L.T. GERBER, M.; PLESSIS, J. D.; HAMMAN, J. H. Transdermal Drug Delivery Enhancement by Compounds of Natural Origin. **Molecules**, v. 16, p. 10507-10540, 2011.

FRANCHETTI, S. M. M., MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis- uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 4, p. 811 - 817 2006.

FREEPONS, D. Enhancing food production with chitosan seed-coating technology. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Ed.). **Chitin innature and technology**, New York: Plenum Press, 1986. p. 129-139.

GARCIA, R. B.; SILVA, D. L. P.; COSTA, M.; RAFFIN, F. N.; RUIZ, N. M. S. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo. **Quím. Nova**, v. 31, n. 3, p. 486-492, 2008.

GENTA, I.; CONSTANTINI, M.; ASTI, A.; CONTI, B.; MONTANARI, L. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 81-88, 1998.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GONSALVES, A. A., ARAÚJO, C. R. M. Diferentes Estratégias para reticulação de Quitosana. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223. 2011.

GOY, M. R. C.; ASSIS, O.B.G.; CAMPANHA-FILHO, S. P. Produção de esferas de Quitosana. **Revista Ciência e Desenvolvimento**, ed. 33, 2004.

HARTIG, S. M.; GREENE, R. R.; DIKOV, M. M.; PROKOP, A.; DAVIDSON, J. M. Multifunctional Nanoparticulate Polyelectrolyte Complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, 2007.

JUSTI, K. C.; LARANJEIRA, M.C.M.; NEVES, A.; MANGRICH, A. S.; FÁVERE, V. T. Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl) aminomethyl]4-methyl-6-formyl-phenol: equilibrium and kinetics of copper (II) adsorption. **Polymer**, v. 45, nº 18, p. 6285-6290, 2004.

KALOTI, M. & BOHIDAR, H.B. Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p.165-73, 2010.

KUBOTA, N.; TATSUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, p. 268-274, 2000.

KULKAMP, I.C.; PAESE, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Stabilization of lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p.672-678, 2009.

KUMAR, M. N. V. R. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. **J. Pharm. Pharmaceut Sci.**, p. 234-258, 2000.

KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Mar. Biotechnol.**, v. 8, p. 203-226, 2006.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M.; MARTINS, A. O. FÁVERE, V. T. PEDROSA, R. C. BENASSI, J. C. GEREMIAS, R. Microesferas De Quitosana Reticuladas Com Tripolifosfato Utilizadas Para Remoção Da Acidez, Ferro(III) E Manganês(II) De Águas Contaminadas Pela Mineração De Carvão. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 34-39, 2006.

LAWRIE, G. et al. Interactions between alginate and Chitosan Biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2533-2541, 2007.

LEE, K. Y.; HA, W. S.; PARK, W. H. Blood compatibility and biodegradability of partially *N*-acetylated chitosan derivatives. **Biomaterials**, v. 16, p. 1211-1216, 1995.

LIMA, E. C. N. L. **Quitosana modificada quimicamente através de cloretos orgânicos e o uso como fonte em remoção catiônica**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas-SP, 2010.

lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. **Quím. Nova**, v. 32, p. 2078–2084, 2009.

LIU, S.; MAHESHWARI, R.; KIICK, K.L. Polymer-Based Therapeutics. **Macromolecules**, v. 42, p. 3-13, 2009.

LOPES, C. M., LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrófilos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LOPES, Carla. M; LOBO, José. M. S; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LV, H.; ZHANG, Z.; WANG, X.; CHENG, Q.; WANG, W.; HUANG, X.; ZHOU, J.; ZHANG, Q.; HOU, L.; HUO, W. A Biomimetic Chitosan Derivates: Preparation, Characterization and Transdermal Enhancement Studies of *N*-Arginine Chitosan. **Molecules**, v. 16, p. 6778-6790, 2011.

MARTINS, M. R.F.R.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p.33 – 54, 2002.

MARTINS, S. P. **Preparação e caracterização de micro/nanopartículas de quitosano para liberação de cisplatina**. Tese (Mestrado) – Instituto Superior de Engenharia de Coimbra. Coimbra, 2013.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 3-17, 2002.

MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 26, p. 119, 1999.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**. 2001.

MOURA, R. E. **Síntese de nanopartículas à base de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. Dissertação (Mestrado em química) – Programa de Pós-graduação em química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan, em: Muzzarelli (Ed.), **Natural Chelating Polymer**, Pergamon Press. Oxford, 1973.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan-based dietary foods. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 309-316, 1996.

N. A.; YOUANA, B. B. C. Spray drying tenofovir loaded mucoadhesive and pH-sensitive microspheres intended for HIV prevention. **Antiviral Research**, v. 97, p. 334–346, 2013.

NAGPAL, K.; SINGH, S.K.; MISHRA, D.N. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. **Chemical Pharmacy Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423 - 1430, 2010.

ORÉFICE, R. L. **Materiais poliméricos – ciência e aplicações como biomateriais. Biomateriais fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 87-155, 2006.

PALMIERI, G. F.; BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P.; MARTELLI, S. Microencapsulation of semisolid ketoprofen/polymer microspheres. **Int. J. Pharm.**, v. 242, p. 175-178, 2002.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology, and Medicine**, v. 8, p.147-166, 2012.

PATZELT, A.; ANTONIOU, C.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Skin penetration from the inside to the outside: a review. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, p. 229, 2008.

PEPPAS, N. A.; TENNENHOUSE, D. J. Semicrystalline poly(vinyl alcohol) films and their blends with poly(acrylic acid) and poly(ethylene glycol) for drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science Technology**, vol. 14, p. 291-297, 2004.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J-P.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. **Polymeric Biomaterials**. Dimitriu, Marcel Dekker: New York, 1994.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, P. A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded Polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RIBEIRO, A. J.; SILVA, C.; FERREIRA, D.; VEIGA. Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 25, p. 31-40, 2005.

SANTOS, J. E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polim. Cienc. Tecnol**, v.13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SCHAFFAZICK, R. S.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. C. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, R.S.; POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA, G.; GUTERRES, S.S. Development of nanocapsules suspensions and nanocapsules spray-dried powders containing Melatonin. **Journal of Brazil Chemical Science**, v. 17, n. 3, p. 562-569, 2006.

SHIM, J.; KANG, H.S.; PARK, W.; HAN, S.; KIM, J.; CHANG, I. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.

SILVA, C.; PEREIRA, J.; RAMALHO, A.; PAIS, A.; SOUSA, J.J. Films based on chitosan polyelectrolyte complexes for skin drug delivery: Development and characterization. **Journal of Membrane Science**, v. 320, p. 268–279, 2008.

SINHA, V.R.; SING, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, K.; BANSAL, S.; DHAWAN, B. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 1–33, 2004.

SJOBLOM, B. **Method to obtain microparticles**. 2004.

SMITH, J.; WOOD, E.; DORNISH, M. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 1, 2004.

SOPPIMATH, K. S., AMINABHVI, T. M., KULKARNI, A. R., RUDZINSKI, W. E. J. **Jounal Control Release**, v. 1, n. 70, p. 1-20, 2001.

SOUZA, João P. de A. **Estudo de ancoragem molecular de derivados de ácido cinâmico frente a enzimas do ciclo replicativo do HIV-1**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

STRIEGEL, A. M. Theory and applications of DMAC/LICL in the analysis of polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, v. 34, p. 267-274, 1997.

SWARBRICK, J. Encyclopedia of pharmaceutical technology, vol. V, 3rd ed. Informa Health Care, New York, p. 3108-3127, 2007.

THONG, H.Y.; ZHAI, H.; MAIBACH, H.I. Percutaneous penetration enhancers: an overview. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 20, p. 272-282, 2007.

VACHOUD, L.; ZYDOWICZ, N.; DOMARD, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. **Carbohydr. Res.**, vol. 302, p. 169-177, 1997.

VARUM, F. O.; BASIT, A. W.; SOUSA, J.; VEIGA, F. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 535-548, 2008.

VASCONCELLOS F.C., GOULART G.A.S., BEPPU M.M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technology**, v. 205, p. 65-70, 2011.

VENKAT RATNAM, D.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, p. 189-207, 2006.

VILA JATO, J. L. Tecnologia farmacéutica: Aspectos fundamentais de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. **Sistesis Editorial**, p. 624, 1999.

VILA, A.; SANCHES, M.; TOBIO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 78, p. 15-24, 2002.

WILDING, I.R. Site-specific drug delivery in the gastrointestinal tract. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.**, v. 17, n. 6, p. 557 - 620, 2000.

WITT, M. A. **Obtenção e Caracterização de Filmes Finos de Multicamadas de Polieletrólitos Naturais Depositados por Layer-by-Layer**. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química. Florianópolis-SC, 2012.

ZANETTI, B. G.; SOLDI, V.; LEMOS-SENNA, E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamaepina e morfologia das partículas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 229-236, 2002.

ZHANGA, T.; CHI ZHANG, B.; AGRAHARI, V.; MUROWCHICKC, J. B.; OYLER, N.A.; YOUANA, B. B. C. Spray drying tenofovir loaded mucoadhesive and pH-sensitive microspheres intended for HIV prevention. **Antiviral Research**, v. 97, p. 334-346, 2013.