

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS-PPGEM

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BIODEGRADÁVEIS À BASE
DE QUITOSANA COM MORFOLOGIA CONTROLADA COM POTENCIAL
APLICAÇÃO COMO CARREADORES DE FÁRMACOS**

Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu

Tese para obtenção do título de Doutor em Engenharia

Porto Alegre

2008

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de
Materiais - PPGEM

Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos

Flávia Oliveira Monteiro da Silva Abreu

Trabalho realizado no Laboratório de Materiais Poliméricos (LAPOL) do Depto de Materiais da Escola de Engenharia e no Depto de Biofísica do Instituto de Biociências, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGEM - UFRGS, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Engenharia.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Porto Alegre, 2008

Esta tese foi julgada adequada para obtenção de título de Doutor em Engenharia, área de concentração de Ciência e Tecnologia dos Materiais e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela banca examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dra. Maria Madalena Camargo Forte

Banca Examinadora:

Prof Dr Haroldo César Beserra de Paula
UFC / Depto de Química analítica e Físico-Química

Dr^a. Fernanda Oliveira Vieira da Cunha
BRASKEM /III Pólo Petroquímico

Prof^a Dr^a Nadya Pesce da Silveira
UFRGS/Instituto de Química

Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann
Coordenador do PPGEM

*O mais importante na ciência não está
na obtenção de novos fatos, mas na descoberta
de novas maneiras de pensar a respeito deles*
Sir. William Lawrence Bragg

A meus pais, pelo carinho e por me
fazerem acreditar que tudo era possível

Ao meu amor Antônio, pelo apoio e por
tornar realidade os meus sonhos

AGRADECIMENTOS

A prof^a. Dra. Maria Madalena de Camargo Forte, pela orientação, dedicação e estímulo, resultando em uma parceria produtiva, que espero que continue com o passar dos anos.

Aos integrantes da banca de qualificação pela contribuição produtiva no andamento deste trabalho. Em especial, agradeço a Profa. Adriana Polhmann do Instituto de Química da UFRGS pelo empréstimo de equipamentos e ao prof. Dr. Tarso Kist do Instituto de Biofísica da UFRGS pela colaboração direta e efetiva no andamento do doutorado, ao ceder espaço físico, reagentes e equipamentos
Ao professor Karlkeruth e a doutoranda Marleny do Laboratório de Carvão do Instituto de Geologia da UFRGS pela receptividade e pela utilização do microscópio ótico com fluorescência.

Ao LAPROM e em especial ao mestrando Marco Antonio Batistella pelo auxílio na determinação do potencial Zeta dos hidrogéis.

A Dra. Tatiana Bressel, que me auxiliou nas técnicas de encapsulamento de alginato no início do meu trabalho

A minha família e aos meus amigos Sandro, Tati e Paola pelo apoio moral e psicológico nos momentos difíceis. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Em especial, gostaria de agradecer ao grande amigo Dr. Jones de Andrade por estar presente me apoiando nos momentos mais difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, em especial ao mestrando Pedro, à Carla e as colegas Michele e Carolina do LAPOL. Agradeço ao mestrando Gabriel Rubensam pela troca de idéias na fase final do trabalho, bem como à Luiza Honaiser pelo auxílio na execução dos experimentos, ambos integrantes do Laboratório de Métodos Biofísicos, do Instituto de Biofísica da UFRGS.

A Renata Osório, que muitas vezes me auxiliou na revisão de artigos e trabalhos internacionais

Ao PPGEM e a universidade Federal do Rio grande do Sul pelo ensino gratuito e de alta qualidade

Ao CNPQ e a CAPES, pela concessão da Bolsa de doutorado.

PUBLICAÇÕES

PERIÓDICOS:

ABREU, F. O. M. S.; BIANCHINNI, C. ; KIST, T. B. L. ; FORTE, M. M. C. . Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate chitosan hydrogels. Carbohydrate Polymers, v. 74, p. 283-289, 2008.

ABREU, F. O. M. S. ; BIANCHINNI, C. ; KIST, T. B. L. ; FORTE, M. M. C. . Effects of chemical modification of chitosan on the properties of ionic based ALG hydrogels. Polymer International (em correção).

ABREU, F. O. M. S. ; HONAISSER, L. P. , KIST, T. B. L. ; FORTE, M. M. C.

Novel Water-in-Oil Preparation Method of Alginate-Chitosan Nanoparticles with Improved Encapsulation Efficiency. Journal of Nanoscience and Nanotechnology (Submetido).

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS:

BIANCHINNI, C. ; KIST, T. B. L. ; FORTE, M. M. C.; ABREU, F. O. M. S. . Design of alginate-chitosan microcapsules with proper morphology for drug delivery. MACRO World Polymer Congress, Rio de Janeiro, 2006.

BIANCHINNI, C. ; KIST, T. B. L. ; FORTE, M. M. C. ; ABREU, F. O. M. S. . Swelling behavior and zeta potential of alginate chitosan microcapsules prepared by different reaction parameters. XI international Macromolecular Colloquium, Gramado, 2007

KIST, T. B. L. ; FORTE, M. M. C.; ABREU, F. O. M. S. .Influence of preparation method Of Alginate-Chitosan nanoparticles in the encapsulation efficiency. 3th NANOSmat, Barcelona, Spain, 2008.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da formação de um hidrogel físico e de um hidrogel químico a partir da modificação química de um polímero hidrofóbico [7].	7
Figura 2: Comparativo dos níveis de fármaco no organismo quando realizada terapia de fármacos convencional e por liberação controlada [5].	8
Figura 3: Morfologia porosa e multifásica das blendas QUI/PEG de composição relativa: (a) QUI/PEG 2/1 e (b) QUI/PEG 1/1 [83].	10
Figura 4: Curvas de liberação de paracetamol de hidrogéis de alginato, quitosana e de misturas entre os dois componentes. [84].	10
Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de inchamento em função do pH da membrana de composto quitosana-TEOS [90].	12
Figura 6: Representação esquemática dos tipos de copolímeros que podem ser sintetizados para formação de hidrogéis [66].	13
Figura 7: Representação esquemática da formação de hydrogel através da micelização de domínios terminais hidrofóbicos de um copolímero tipo BAB [91].	13
Figura 8: Representação esquemática de redes (a) interpenetrantes [1], (b) semi-interpenetrantes [9] e (c) híbridas [9].	15
Figura 9: Representação esquemática da formação de hidrogéis ionotrópicos e de complexos eletrolíticos a partir de um polímero aniônico [7].	17
Figura 10: Esquema representativo da reação de desacetilação da quitina, formando a estrutura química da quitosana (n= número de unidades de açúcar por polímero).	20
Figura 11: Estruturas possíveis de hidrogéis de quitosana a partir da: (a) reticulação entre as cadeias da quitosana; (b) formação de uma rede polimérica híbrida; (c) formação de uma rede semi-interpenetrante; e (d) reticulação iônica da quitosana [9].	21
Figura 12: Morfologia das partículas de quitosana de acordo com o grau de reticulação das cadeias de quitosana: a) 10% de reticulação e b) 100% de reticulação [154].	21
Figura 13: Morfologia de IPNs de QUI/PVP 7/3 reticuladas com glutaraldeído. [116].	24
Figura 14: Micrografias de microesferas de QUI-TPP sem (a) e (b) com (27,1%) de nifedipina [124] e nanopartículas de quitosana carregadas com manitol (c) (QUI-NP/manitol) 20/80 e (d) (QUI-NP/manitol) 50/50; [125].	26
Figura 15: Diagrama esquemático do inchamento e erosão de complexos polieletrólíticos de PAA/QUI/Amoxicilina: (A) (0/2,5/2) em solução 1,75 M ácido acético; (B) (1/2,5/2) em solução 1,75 M ácido acético e (C) (1/2,5/2) em solução 5,25 M de ácido acético [167].	28
Figura 16: Perfis de liberação de amoxicilina a 37°C em ambiente gástrico simulado (pH 1,2) dos hidrogéis de PAA/QUI com diferentes composições relativas (a) 0: 2,5 (—▲—), 0: 5 (—◆—) e 0:15 (—■—); (b) 1: 2,5 (—▲—), 1: 5 (—◆—) e 1: 15 (—■—) [59].	30

Figura 17: Modelos de fármaco encapsulado, dissolvido ou disperso na matriz ou ainda adsorvido em a) cápsulas e b) esferas. [76].....	32
Figura 18: Métodos para preparação de microesferas de quitosana [130]	33
Figura 19: Estrutura química do alginato de sódio, um copolímero composto de unidades de ácido gulurônico (G) e manurônico (M) [45].	35
Figura 20: Representação esquemática da formação de hidrogéis através de interações entre íons cálcio com os grupos carboxílicos do alginato de sódio	35
Figura 21: Estrutura e alteração do grau de inchamento com o pH do meio de um complexo polieletrólítico [9]	36
Figura 22: Hidrogéis de ALG- QUI reticulado com cálcio carregados com (a) prednisona [32] e (b) Dextrana [172]	37
Figura 23 : Partículas pré-formadas de MF e partículas com 5 camadas de ALG-QUI [171]	39
Figura 24: Relação linear entre a massa de azul de metileno liberada como função da concentração de NaCl nas nanopartículas de ALG com QUI e com PLL [21]	40
Figura 25: Nanopartículas de QUI-ALG: (a) morfologia das nanopartículas de QUI-ALG (b) perfil de liberação de <i>in vitro</i> de nanopartículas de QUI sem revestimento de ALG (o) e com revestimento de ALG (•) na superfície [33].	41
Figura 26: Complexos de alginato: A) Pré-partículas de alginato-Ca e B) PEC formado por ALG-QUI sem cálcio [23]; C) Partículas ALG-Ca-QUI.	42
Figura 27: a) Efeito da massa molar da quitosana depolimerizada na reatividade [188].; b) perfis de liberação de partículas de ALG-Ca feitas com alginato oxidado parcialmente (●), (■), e não oxidado (▲) [27].	48
Figura 28: Estrutura química da quitosana e da carboximetil-quitosana [28]	49
Figura 29: Mecanismo de formação de complexos agregados de CMQUI em meio aquoso [196]	50
Figura 30: Ilustração esquemática das estruturas de ALG-CMQUI reticulados com íons cálcio, e o simulação do comportamento do hidrogel em pH 1,2 e 7,4 [40].	51
Figura 31: Perfis de liberação de BSA para os hidrogéis ALG-carboximetil quitosana (NOCC) reticulados com íons cálcio [40] e com genipina [41]	51
Figura 32: Amostras de Quitosana (à esquerda) e Carboximetilquitosana em pó.	53
Figura 33: Sistema de reação de formação dos hidrogéis em meio aquoso: 1 – reservatório da solução de alginato e ou quitosana . 2 – bomba peristáltica que transfere a solução até o béquer; 3- béquer contendo solução de cálcio e 4- placa de agitação magnética.	57
Figura 34: Representação esquemática do processo de isolamento das microesferas carregadas com fármaco do meio reacional.	60
Figura 35: Representação esquemática do processo de obtenção dos hidrogéis por meio de emulsão em óleo.	61

Figura 36: Curva padrão de absorvância x concentração para (a) o peptídeo TYR-PHE em pH 6,8 e em pH 1,2; (b) o peptídeo ASP-PHE em pH 6,8 e em pH 1,2 e (c) para os fármacos Lisinopril-FITC e Fluoresceína sódica em meio alcalino (pH 8).	66
Figura 37: Espectro de infravermelho da quitosana de baixa e média massa molar (BQUI e MQUI), do alginato de sódio e dos hidrogéis ALG/QUI de diferente composição relativa.	75
Figura 38: Morfologia das partículas ALG-QUI produzidas conforme as condições de reação 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e), 6 (f), 7 (g) e 8 (h). Escala: cada foto apresenta bordas de 80 μ m de comprimento.....	78
Figura 39: Hidrogéis ALG/Ca revestidos com QUI com diferente grau de aglomeração em função do teor de íons cálcio: a) formando intra e inter-complexos; b) formando intra-complexos.....	79
Figura 40: Micrografias de MEV das partículas ALG-QUI obtidas através do método indireto com (a) BQUI (R.1, R.2 R.3 e R.4) e (b) MQUI (R.5, R.6, R.7 e R.8)	82
Figura 41: Morfologia das partículas ALG-QUI para cada condição realizada; (a) Microesferas obtidas pelo método de adição direta e (b) microesferas obtidas pelo método de adição indireta. Legenda: A35/A75: composição relativa de ALG 35% ou 75%;BQUI/MQUI-Quitosana de baixa e média massa molar	84
Figura 42: Curvas de liberação <i>in vitro</i> de fluoresceína em pH 7,4 dos hidrogéis obtidos pelo método indireto (●,◆,▲ e ■) e pelo método direto (○,◇,△ e □).....	88
Figura 43: Morfologia das partículas ALG-QUI obtidas em diferentes condições de reação com MQUI: (a) A35, pH 4, DM (b) A75, pH6, IM (c) A35, pH6, DM; e com BQUI: (d) A35, pH6 DM (e) A75, pH6,IM f) A75, pH 4, IM.....	93
Figura 44: Micrografias de MEV ilustrando a morfologia das partículas ALG-QUI produzidas com 35% de ALG pelo método indireto com (a) MQUI e pH 6 e (b) BQUI e pH 4.....	94
Figura 45: Variação do diâmetro de partícula dos hidrogéis em função do tempo de exposição em pH 1,2, pH 6,8 e pH 7,4.....	96
Figura 46: Micrografia de MO ilustrando a morfologia irregular e aglomerada das micropartículas obtidas pela reação 3 (A35, pH6, BQUI ,IM) após 24h de exposição em pH 1,2,.....	97
Figura 47: Tamanho de partícula obtido em pH 6,8 após 48h para os hidrogéis produzidos com 75% ALG e pH 6 com a) BQUI pelo método indireto e b) MQUI pelo método direto.....	98
Figura 48: Variação do potencial zeta em função do pH para os hidrogéis ALG-QUI produzidos em diferentes condições de reação	101
Figura 49: Grau de inchamento em pH 1,2 e ponto isoelétrico do hidrogel em função do pH. Dados experimentais (pontos) e os resultados previstos pela equação (linhas).....	103
Figura 50: Espectro de infravermelho da QUI e da CMQUI	107
Figura 51: a) Curva alcalinimétrica da Quitosana e da carboximetilquitosana ; b) Derivada 1ª e derivada 2ª da curva alcalinimétrica da carboximetilquitosana.	109
Figura 52: Termogramas das amostras quitosana (QUI) e carboximetilquitosana (CMQUI): (a) calorimetria diferencial de temperatura e (b) análise termogravimétrica	110

Figura 53: Viscosidade específica das soluções 0,2% de QUI e CMQUI em pH 6 e Transmitância das soluções 0,2% de QUI e CMQUI em função do pH	111
Figura 54: Tamanho de partícula em função do tipo de hidrogel produzido	114
Figura 55: Micrografias MEV dos hidrogéis com 80%ALG produzidos com QUI em pH 4 (a), QUI em pH 6 (b), CMQUI em pH 4 (c) CMQUI em pH 6 (d).	116
Figura 56: Variação no grau de inchamento em função do tipo de hidrogel: a) em fluido gástrico simulado (SGF), pH 1,2 e b) em fluido intestinal simulado (SIF) pH 7,4.	117
Figura 57: Micrografias de microscopia ótica de hidrogéis produzidos com 40%ALG hidratados em pH 7,4 por 24h e produzidos em diferentes condições de reação: com CMQUI em pH 4 (a) e pH 6 (b), e com QUI em pH 4 (c) e pH 6 (d).	119
Figura 58: Análise termogravimétrica contendo a variação de massa com a temperatura (eixo Y principal) e a primeira derivada da perda de massa (eixo Y secundário) dos hidrogéis com 40% de ALG.	121
Figura 59: Variação do potencial zeta em função do pH para os hidrogéis produzidos com 40% de ALG em pH 6 com QUI e CMQUI.	122
Figura 60: Curvas de dissolução dos peptídeos em pH 1,2 e pH 6,8.....	123
Figura 61: Perfis de liberação dos peptídeos TYR-PHE e ASP-PHE nas matrizes ALG-QUI e ALG-CMQUI em meio gástrico simulado (pH 1,2).	125
Figura 62: Representação das etapas de formação de nanopartículas em emulsão; 1: dissolução do surfactante na solução; 2: Formação de emulsão estável; 3: formação das partículas ALG-QUI no interior das micelas; 4: fase aquosa contendo as partículas ALG-QUI.	127
Figura 63: Micrografias de MEV de hidrogéis de ALG-QUI produzidos em meio aquoso com genipina (a) e com CaCl ₂ (b), e por emulsão com PVA e genipina (c) e CaCl ₂ (d) e com PVP e genipina (e) e CaCl ₂ (f).	129
Figura 64: Micrografias de MO de hidrogéis ALG-QUI obtidos em meio aquoso com genipina (a) em com CaCl ₂ (b), e em emulsão com PVA e genipina (c) e PVP e CaCl ₂ (d).	130
Figura 65: Micrografias de FOM dos hidrogéis ALG-QUI ilustrando o padrão de distribuição do fármaco em meio aquoso com CaCl ₂ (a) e com genipina (b), e por emulsão com PVA e CaCl ₂ (c) e com PVP e genipina (c).	131

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Relação entre a quantidade de Carbopol® adicionada na blenda com a força bioadesiva e a densidade das blends [88]	11
Tabela 2: Tamanho médio e eficiência do encapsulamento de nanoesferas contendo proteínas [143].....	18
Tabela 3 : Formula, estrutura, massa molar e limite de solubilidade da genipina.....	22
Tabela 4: Polieletrólitos que formam complexos com a quitosana [8].....	27
Tabela 5: Diferentes sistemas de ALG-QUI usados para liberação de fármacos, contendo os parâmetros controlados por cada autor, o tamanho médio de partícula e o grau de encapsulamento dos hidrogéis e tempo decorrido quando 30% do fármaco é liberado <i>in vitro</i> em SGF	45
Tabela 6: Matriz de experimentos 2 ³ , contendo as variáveis independentes e seus níveis, e a variável dependente.	69
Tabela 7: Características dos polissacarídeos usados para obtenção dos hidrogéis.....	73
Tabela 8: Condições de reação para cada hidrogel produzido	77
Tabela 9: Planejamento Experimental da produção de hidrogéis ALG-QUI, contendo as variáveis independentes e os níveis das variáveis	81
Tabela 10: Diâmetro médio das partículas de acordo com as condições de reação, as colunas de contraste das variáveis e seus respectivos efeitos.....	85
Tabela 12: Grau de encapsulamento (GE) de fluoresceína nos hidrogéis de acordo com as condições de reação, os valores de contraste para cada variável principal e os seus respectivos efeitos	86
Tabela 13: Rendimento e tamanho de partícula dos hidrogéis ALG-QUI de acordo com as condições de reação.	90
Tabela 14: Variáveis independentes e grau de inchamento dos hidrogéis em função do pH.....	97
Tabela 15: Potencial Zeta em função do pH para os hidrogéis ALG-QUI	100
Tabela 16: Condições de reação para cada hidrogel produzido e seu respectivo rendimento.....	112
Tabela 17: Resultados da estatística ANOVA para o tamanho de partícula, com a soma dos quadrados, (SQ), grau de liberdade (gl), media quadrada (MQ) e teste F para todas as variáveis e suas interações	114
Tabela 18: Resultados da estatística ANOVA para o grau de inchamento em SGF (pH 1,2), com a soma dos quadrados, (SQ), grau de liberdade (gl), media quadrada (MQ) e teste F para todas as variáveis e suas interações.....	116
Tabela 19: Resultados da estatística ANOVA para o grau de inchamento em SIF (pH 7.4) , com a soma dos quadrados, (SQ), grau de liberdade (gl), media quadrada (MQ) e teste F para todas as variáveis e suas interações.....	120
Tabela 20: Nomenclatura, estrutura, massa molar e limite de solubilidade dos fármacos modelo124	

Tabela 21 : Eficiência do encapsulamento em diferentes sistemas de Hidrogel –Peptídeo	124
Tabela 22 : Fórmula, estrutura química, massa molar e limite de solubilidade do lisinopril.....	127
Tabela 23 : Método de preparação, agente de reticulação, eficiência do encapsulamento e tamanho de partícula dos Hidrogéis ALG-QUI.....	128

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	XII
SUMÁRIO.....	XIV
RESUMO.....	XX
ABSTRACT	XXI
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO E METODOLOGIA.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 HIDROGÉIS COMO CARREADORES DE FÁRMACOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA	7
3.1.1 <i>Hidrogéis a Base de Blendas Poliméricas</i>	8
3.1.2 <i>Hidrogéis formados por compósitos</i>	10
3.1.3 <i>Hidrogéis formados por copolímeros</i>	12
3.1.4 <i>IPNS e HPNS</i>	14
3.1.5 <i>Complexos iônicos</i>	16
3.2 QUITOSANA	19
3.2.1 <i>Redes reticuladas entre as cadeias</i>	20
3.2.2 <i>Redes interpenetrantes (IPNs)</i>	23
3.2.3 <i>Redes com interações iônicas</i>	25
3.3 HIDROGÉIS DE QUITOSANA COM MORFOLOGIA CONTROLADA.....	32
3.3.1 <i>Micropartículas</i>	36
3.3.2 <i>Nanopartículas</i>	39
3.3.3 <i>Influência dos parâmetros de reação na morfologia dos hidrogéis ALG-QUI</i>	41
3.4 MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA E ALGINATO	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 MATÉRIAS PRIMAS.....	52
4.2 MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA - SÍNTESE DA CARBOXIMETILQUITOSANA (CMQUI).....	52
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	53
4.3.1 <i>Viscosimetria</i>	53
4.3.2 <i>Solubilidade</i>	54
4.3.3 <i>Espectroscopia de Infravermelho - FTIR</i>	54
4.3.4 <i>Calorimetria Diferencial de Varredura - DSC</i>	55
4.3.5 <i>Análise termogravimétrica - TGA</i>	55
4.3.6 <i>Titulação Potenciométrica</i>	55
4.4 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS EM MEIO AQUOSO	56
4.4.1 <i>Preparação das soluções</i>	57
4.4.2 <i>Produção dos hidrogéis em micropartículas</i>	58

4.4.2.1	Método de reação indireta:	58
4.4.2.2	Método de reação direta:	59
4.4.2.3	Preparação de micropartículas com fármaco	59
4.4.3	<i>Lavagem e conservação das microesferas</i>	59
4.5	PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS EM EMULSÃO ÁGUA-EM-ÓLEO	60
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	62
4.6.1	<i>Rendimento</i>	62
4.6.2	<i>Microscopia Ótica (MO)</i>	62
4.6.2.1	Determinação do tamanho médio de partícula	63
4.6.2.2	Determinação do grau de inchamento	63
4.6.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	63
4.6.4	<i>Potencial zeta</i>	64
4.7	CARACTERIZAÇÃO DOS FÁRMACOS	64
4.7.1	<i>Grau de encapsulamento de fármaco nos hidrogéis</i>	65
4.7.2	<i>Perfis de liberação de fluoresceína</i>	67
4.7.3	<i>Perfis de liberação de peptídeos e lisinopril</i>	68
4.8	PLANEJAMENTO E ANÁLISE FATORIAL	68
4.9	MÉTODO ESTATÍSTICO	70
4.9.1	<i>Regressão linear</i>	71
4.9.2	<i>ANOVA</i>	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1	METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE COMPLEXOS IÔNICOS DE QUITOSANA COM MORFOLOGIA CONTROLADA	76
5.1.1	<i>Determinação dos fatores de controle a serem usados na produção de hidrogéis ALG-QUI</i>	76
5.1.2	<i>Otimização das variáveis significantes para produção dos hidrogéis</i>	76
5.2	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS PARÂMETROS NAS PROPRIEDADES DOS COMPLEXOS IÔNICOS DE QUITOSANA	80
5.2.1	<i>Morfologia dos hidrogéis ALG-QUI</i>	81
5.2.2	<i>Grau de encapsulamento (GE)</i>	85
5.2.3	<i>Perfis de liberação de Fluoresceína dos hidrogéis</i>	87
5.3	ESTUDO ESTATÍSTICO DA INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS NAS PROPRIEDADES DOS HIDROGÉIS ALG-QUI.....	88
5.3.1	<i>Rendimento da reação</i>	89
5.3.2	<i>Morfologia dos hidrogel ALG-QUI</i>	92
5.3.3	<i>Grau de inchamento em função do pH</i>	94
5.3.3.1	<i>Grau de inchamento em meio gástrico simulado</i>	94

5.3.3.2	Grau de inchamento em meio intestinal simulado	98
5.3.4	<i>Potencial Zeta dos Hidrogéis</i>	100
5.3.5	<i>Balanço global de variáveis</i>	102
5.3.6	<i>Conclusões</i>	104
5.4	MODIFICAÇÃO DA ESTRUTURA DA QUITOSANA PARA APRIMORAMENTO DE PROPRIEDADES..	105
5.4.1	<i>Considerações sobre a síntese da CMQUI</i>	106
5.4.2	<i>Caracterização da CMQUI</i>	106
5.5	EFEITO DA CARBOXIMETILAÇÃO NAS PROPRIEDADES DOS HIDROGÉIS COM ALG.....	112
5.5.1	<i>Morfologia dos hidrogéis ALG-CMQUI</i>	113
5.5.2	<i>Grau de inchamento dos hidrogéis ALG-CMQUI</i>	115
5.5.2.1	Grau de inchamento em SGF	116
5.5.2.2	Grau de inchamento em SIF	118
5.5.3	<i>Grau de degradação em função do tempo</i>	120
5.5.4	<i>Potencial Zeta</i>	121
5.5.5	<i>Eficiência do encapsulamento e perfis de liberação dos hidrogéis ALG-QUI e ALG-CMQUI</i>	123
5.5.6	<i>Conclusões</i>	125
5.6	INFLUÊNCIA DE UM AGENTE DE RETICULAÇÃO E DA INCLUSÃO DE FASE ORGÂNICA NO MEIO REACIONAL NAS PROPRIEDADE DOS HIDROGÉIS ALG-QUI	126
5.6.1	<i>Morfologia dos hidrogéis ALG-QUI obtidos em emulsão</i>	128
5.6.2	<i>Distribuição do fármaco no hidrogel e eficiência do encapsulamento</i>	130
5.6.3	<i>Conclusões</i>	132
5.7	PERSPECTIVAS DE MELHORIA NO DESEMPENHO DE COMPLEXOS IÔNICOS DE QUITOSANA ATRAVÉS DO CONTROLE DE SUA SÍNTESE	133
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	134
7	CONCLUSÕES FINAIS	137
8	SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS	139
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
10	ANEXOS	159
10.1	ANEXO A1- COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA ABSORÇÃO (λ MAX) PARA OS PEPTÍDEOS ASP-PHE, TYR-PHE E O COMPLEXO LISINOPRIL-FITC.....	160
10.2	ANEXO A2- ANÁLISE CHN PARA A QUITOSANA DE BAIXA MASSA MOLAR (BQUI) E A CARBOXIMETILQUITOSANA (CMQUI)	161

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAm	Acrilamida
ALG	Alginato de sódio
ALG-QUI	Alginato-quitosana
ASP-PHE	Aspartato-fenilalanina
BQUI	Quitosana de baixa massa molar
BSA	Albumina bovina
CMQUI	Carboximetilquitosana
CF	Carboxi-fluoresceína
CSA	Ácido câncer sulfônico
DA	Grau de acetilação
DD	Grau de desacetilação
DM	Método direto
DMAEMA	Dietil-amino etil-metacrilato
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DS	Grau de Substituição
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
G	Fração gulurônica da cadeia do alginato
GH	Hormônio do crescimento
GI	Grau de inchamento
gl	Graus de liberdade
GP	Glicerofosfato
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HPN	Redes polimericas híbridas
IM	Método indireto
IPNs	Redes interpenetrantes
KGM	Konjac glucomannan (Fibra)

M	Fração Manurônica da cadeia do alginato
Mdsc	Calorimetria diferencial de varredura modulada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Resina formaldeído-melamina
MO	Microscopia ótica
MPC	2-metacrilóiloxi-etil fosforilcolina
MQ	Média quadrada
MQUI	Quitosana de média massa molar
MW	Massa molecular
NAGly	Poli n-acrilóilglicina
p	Fator de significância
PAA	Ácido poliacrílico
PAAm	Poli(acrilamida)
PANI	Polianilina
PBLA	Poli(benzil-L-aspartato)
PBS	Tampão salino de fosfato
PCL	Policaprolactona
PEC	Complexo polieletrólítico
PELA	poli-dl-lactico-polietileno glicol
PEGA	poli(lactico-glicólico)
PEO	poli(óxido de polietileno)
PEOZ	Poli-2 etil-2-oxazolina
PEG	Polietileno glicol
P(FASA)	Poli (anidrido fumárico-co-sebárico)
PGLA	Acido poli(lactico-co-glicólico)
pHEMA	Poli(hidroxi-etil-acrilato)
PLA -	Ácido poli(lactico)
PLLA	Ácido poli(l-lactico)

PMADQUAT	2-metacrilóiloxi-etil cloreto de amonio
PMA	Poli Metilacrilato
PMB	Poli Butilmetacrilato
PMMA	Polimetacrilato de metila
PMMA-g-EG	Polimetacrilato de metila- graftizado-etileno glicol
PNIPAM	Poli(isopropilacrilamida)
PPO	Poli(óxido de polipropileno)
PU	Poliuretana
PVP	Poli(vinil pirrolidona)
PVA	Alcool Polivinílico
PVAc	Poliacetato de vinila
QUI	Quitosana
RMN	Ressonância magnética nuclear
SD	Sulfato de dextrana
SEPs	Sólidos eletrólitos poliméricos
SGF	Fluido gástrico simulado
SIF	Fluido intestinal simulado
s-IPN	Rede Semi-interpenetrante
SQ	Soma Quadrada
TEOS	Tetra-Etil-Orto-Silicato
TYR-PHE	Tirosina-fenilalanina
TGA	Análise Termogravimétrica
TPP	Tripolifosfato
UV	Espectroscopia de ultravioleta-visível

RESUMO

Neste trabalho, hidrogéis a base de quitosana (QUI) com alginato (ALG), com morfologia controlada (micro e nanoesferas) foram obtidos através de complexação polieletrólítica, buscando-se otimizar os parâmetros de reação para produção de hidrogéis com propriedades adequadas para liberação controlada de fármacos. Os fatores principais e secundários foram definidos em um estudo preliminar na investigação da formação dos hidrogéis sob diferentes condições de reação (composição relativa do hidrogel, massa molar da quitosana dos polímeros, pH da solução e método de adição dos componentes) e o efeito destas nas propriedades finais dos hidrogéis. Através da seleção apropriada das variáveis independentes, foram obtidos hidrogéis com morfologia esférica e com tamanho de partícula em torno de $5,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$, com grau de inchamento mínimo de 708% em pH 1,2. Posteriormente, propôs-se a modificação química da quitosana através da inserção de grupamentos carboxila na estrutura para maior solubilidade em meio neutro, condição necessária para encapsulamento de peptídeos e proteínas. Complexos polieletrólíticos de quitosana carboximetilada (CMQUI) com alginato foram desenvolvidos em condições otimizadas de reação e tiveram suas propriedades comparadas com as dos hidrogéis ALG-QUI. Os resultados mostraram que os hidrogéis ALG-CMQUI apresentaram menor tamanho de partícula ($2,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$), menor grau de inchamento em pH 1,2 (314%), e maior estabilidade térmica. Os hidrogéis com melhor balanço de propriedades foram avaliados utilizando-se um fármaco-modelo. O efeito das diferentes técnicas de produção dos hidrogéis na eficiência de encapsulamento e nos perfis de liberação do fármaco modelo foi avaliado sendo apontado o melhor sistema para utilização em sistemas de liberação controlada. Os hidrogéis apresentaram baixos valores de encapsulamento para os peptídeos avaliados devido à forte natureza hidrofílica destes. Como resultado deste estudo, um novo método de produção de complexos polieletrólíticos em emulsão foi proposto, levando-se em conta a natureza hidrofílica do fármaco, para a produção de hidrogéis nanoparticulados com morfologia controlada e excelente grau de encapsulamento (acima de 80%), sendo um método alternativo para o encapsulamento de fármacos hidrofílicos.

ABSTRACT

In this study, alginate-chitosan hydrogels were produced in aqueous medium with controlled morphology through polyelectrolyte complexation, aiming to establish the optimum reaction parameters for producing hydrogels with improved properties for drug delivery applications. A preliminary study settled the main and secondary factors to be evaluated and ALG-CHI hydrogels were obtained under different reaction conditions (hydrogel relative composition, chitosan molecular weight, pH and the components addition method). The hydrogels presented spherical shape an average diameter around $5.0 \pm 2.0 \mu\text{m}$, and the swelling degree and point of zero surface charge showed a linear dependence on the alginate content. The appropriate parameters have led to hydrogels with minimum swelling degree of 708% in pH 1,2. The chitosan chemical modification through carboxymethyl group's insertion favored higher solubility in neutral aqueous media, and provided mild conditions for proteins and peptides' encapsulation. Polyelectrolyte complexes made of carboxymethylchitosan (CMCHI) and ALG were produced following the previous established optimized reaction conditions and had their properties compared with ALG-CHI hydrogels. Results showed that ALG-CMCHI hydrogels presented smaller and more homogeneous microparticles ($2.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$), significantly lower swelling degree in pH 1,2 (314%) and superior thermal stability. The hydrogels with best properties balance were used to encapsulated a model peptide, and the parameters were evaluated regarding to encapsulation efficiency and peptide release profile and the best hydrogel-peptide system for employment in drug delivery systems was pointed out. The hydrogels presented low peptide encapsulation efficiency due to the hydrophilic nature of these. A new water-in-oil emulsion method was developed for nanoparticle hydrogels production with controlled morphology and improved encapsulation efficiency (over 80%) for encapsulation of hydrophilic drugs.

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação controlada têm sido extensivamente estudados nos últimos 20 anos, com notável aplicação farmacêutica e/ou biomédica [1-3]. Esses sistemas são desenvolvidos para liberar, com reprodutibilidade, um princípio ativo em um local específico do organismo por um período mais prolongado de tempo que a administração convencional, mantendo uma concentração terapêutica e evitando a necessidade de repetição da administração. Desta forma, os sistemas de liberação controlada podem apresentar uma melhor performance, com reduzidos efeitos colaterais e eficácia prolongada [4] em comparação com a administração convencional de medicamentos [5]. De maneira geral, o princípio ativo de interesse pode ser desde um fármaco de pequena massa molar até grandes proteínas biologicamente ativas ou DNA, e o futuro do uso destas moléculas como agentes terapêuticos claramente depende do *design* de um veículo adequado para a sua liberação.

Os hidrogéis poliméricos tem se destacado dentre os possíveis materiais de emprego em sistemas de liberação controlada, devido a seu caráter hidrofílico, e propriedades únicas de volume e de superfície [6], bem como alta permeabilidade à água, biocompatibilidade e resistência à tração. Os hidrogéis são redes macromoleculares de polímeros hidrofílicos que incham em água ou fluidos biológicos, podendo absorver de entre duas a centenas de vezes a sua massa em água [1,7-9]. Muitos hidrogéis têm sido preparados, projetados para responder a mudanças de condições ambientais (encolher ou expandir), onde se pode controlar a extensão desta resposta através de vários parâmetros [1], dentre os quais se podem citar o pH [10-11], a temperatura [12-13], o campo elétrico [14-15], assim como o tipo de solvente [16,17].

Inicialmente, muitos hidrogéis de polímeros e co-polímeros sintéticos foram produzidos formando redes com ligações cruzadas. Entretanto, a falta de biodegradabilidade apresentou limitações intrínsecas para a produção de implantes de liberação controlada, como difícil processabilidade e a necessidade de remoção

do implante após a liberação do princípio ativo. O sistema de liberação controlada mais desejável é aquele que não apresenta reminiscência do hidrogel após a liberação do princípio ativo. No entanto, desenvolver um sistema completamente degradável e que esteja de acordo com os critérios para liberação controlada de uma grande variedade de fármacos é um grande desafio [6]. Diferentes metodologias têm sido propostas na expectativa de melhorar os mecanismos de liberação do fármaco, processabilidade e propriedades mecânicas, entre outros [7,18]. Uma das abordagens visa à utilização de polímeros naturais a base de polissacarídeos no desenvolvimento de novos sistemas de liberação, a fim de aprimorar a biocompatibilidade e biodegradabilidade destes. Dentre os polissacarídeos, a quitosana é um polímero catiônico em meio ácido que apresenta alta capacidade de adsorção, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade [2, 6, 8,9].

Os hidrogéis de quitosana podem apresentar ligações covalentes entre as cadeias [8] ou podem ser formados pela interação iônica com polímeros aniônicos [9], como alginato ou pectina entre outros. Os hidrogéis obtidos por interações iônicas não apresentam agentes de reticulação química, o que os constitui com vantagens adicionais frente aos hidrogéis covalentes [19]. Particularmente, hidrogéis formados pela complexação entre alginato e quitosana tem merecido destaque no meio acadêmico devido à facilidade de produção e o conjunto de propriedades exibidas. [3, 8,9].

Na última década, com o avanço da tecnologia e os métodos de produção, passou-se a produzir hidrogéis de quitosana com alginato com morfologia controlada [20-22]. Existem inúmeros fatores que afetam as propriedades relevantes destes hidrogéis [23,24], como a composição relativa, a massa molar e o grau de desacetilação da quitosana [25-28]. Uma análise dos trabalhos publicados na área revela que o método de produção dos hidrogéis por co-acervação complexa tem recebido grande destaque, porém, o método de preparação e os parâmetros de reação usados não são uniformes, e por conseqüência, obtêm-se partículas de tamanho variado e com propriedades bem distintas [21, 28,29]. Desta forma, faz-se necessário um estudo amplo sobre a formação destes hidrogéis com propriedades específicas em função dos parâmetros de reação, ou seja, a relação específica entre

a combinação dos parâmetros de reação e o desenvolvimento de hidrogéis com propriedades determinadas. Portanto, é possível estabelecer o domínio do processo de produção dos hidrogéis, onde para cada fármaco escolhido seja possível parametrizar as condições de reação de forma a produzir o hidrogel com propriedades específicas.

Apesar do sucesso da utilização de hidrogéis a base de quitosana para liberação controlada de proteínas, [29,30] fármacos [31-32] e antígenos [33], existem algumas restrições para encapsular determinados fármacos, uma vez que a quitosana necessita ser solubilizada em meio ácido. Desta forma, alguns princípios ativos podem sofrer modificações na estrutura de acordo com o pH, perdendo suas propriedades terapêuticas. Portanto, a modificação da estrutura química da quitosana visando aumentar a solubilidade em meio aquoso neutro tem sido proposta para ampliar a utilização destes hidrogéis para aplicações específicas [34-39]. A carboximetilquitosana (CMQUI) é um dos derivados de quitosana mais importantes, que é obtido pela introdução de grupos carboximetil em alguns sítios amino e hidroxilas das unidades glucosaminas da estrutura da quitosana, visando aumentar a solubilidade em meio aquoso. Muitos estudos sobre a síntese, caracterização e avaliação das propriedades da CMQUI foram realizados [39-42]. Todavia, poucos estudos investigaram a influência da modificação química da quitosana nas propriedades de hidrogéis formados pela complexação com poliânions tipo alginato, ou seja, de que forma a inserção dos grupos carboxila afeta as interações iônicas com outros poliânions na formação do complexo polieletrólítico.

Neste trabalho, desenvolveu-se hidrogéis a base de quitosana com alginato de sódio com morfologia controlada (micro e nanoesferas), através de complexação polieletrólítica, buscando-se estabelecer os parâmetros ótimos de reação para produção de hidrogéis com propriedades adequadas para liberação controlada. Em um estudo preliminar, definiram-se os fatores principais e secundários a serem estudados. Posteriormente, prepararam-se hidrogéis de ALG-QUI em meio aquoso sob diferentes condições de reação, valendo-se de planejamento fatorial 2^4 e usando regressão linear como ferramenta estatística. Investigou-se a influência dos principais parâmetros de reação nas propriedades finais dos hidrogéis, a fim de modular as suas propriedades a partir da seleção apropriada das condições de

reação. Propôs-se a modificação química da quitosana para seu posterior uso na produção de complexos polieletrólíticos com alginato, buscando obter condições mais brandas para a reação de complexação com potencial ganho de propriedades em relação ao sistema convencional. Por fim, os hidrogéis que obtiveram um melhor balanço de propriedades foram produzidos com um fármaco-modelo, e estudou-se o efeito das diferentes técnicas de produção destes hidrogéis na eficiência de encapsulamento de um fármaco modelo, de forma a poder definir o melhor sistema tendo em vista grande aplicabilidade dos mesmos como carreadores de fármacos para liberação controlada.

2 OBJETIVO E METODOLOGIA

O objetivo desta Tese de Doutorado é o estudo de metodologias de produção de hidrogéis à base de quitosana com morfologia controlada por complexação eletrolítica, e a sua posterior correlação com as propriedades desejadas dos mesmos para uso como sistemas de liberação controlada de fármacos. O estudo abrange:

1- Definição preliminar dos parâmetros principais a serem estudados e dos parâmetros secundários a serem controlados na reação de complexação polieletrólítica.

2-Determinação dos principais fatores que influenciam na formação e propriedades físico-químicas dos hidrogéis.

3-Obtenção e caracterização de hidrogéis ALG-QUI com morfologia controlada e propriedades otimizadas em função da modulação dos parâmetros de reação.

4-Síntese do derivativo funcional carboximetilado da quitosana visando o desenvolvimento de hidrogéis diferenciados, com potencial ganho de propriedades em relação ao sistema convencional.

5-Estudo da eficiência de encapsulamento de um fármaco modelo nos hidrogéis com melhor balanço de propriedades, tendo em vista grande aplicabilidade dos mesmos como carreadores de fármacos para liberação controlada.

6-Definição do melhor sistema hidrogel-fármaco para fármacos de natureza hidrofílica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os hidrogéis representam uma classe importante de materiais poliméricos que podem inchar retendo grandes quantidades de água no seu interior, sem dissolverem. Uma vez inchados, as propriedades destes hidrogéis são influenciadas em grande parte pelo teor de água no seu interior que, freqüentemente, excede 100% do seu peso em volume [10]. São considerados sólidos elásticos no sentido da existência de uma configuração referencial a qual o sistema retorna até mesmo depois de deformado por períodos longos [6].

Os hidrogéis são usualmente constituídos de moléculas poliméricas hidrofílicas que são reticuladas tanto por ligações químicas [7,9] ou outras forças coesivas como interações iônicas [43], ligações de hidrogênio [44] ou interações hidrofóbicas [45]. Podem ser quimicamente estáveis ou podem degradar e eventualmente desintegrar e dissolver. Estes são considerados reversíveis ou géis físicos quando a rede é mantida unida por entrelaçamento molecular, e/ou forças de interação secundárias, incluindo forças iônicas, pontes de hidrogênio ou forças hidrofóbicas, ou podem ser considerados géis permanentes ou químicos quando formam redes covalentemente reticuladas [7]. A Figura 1 ilustra a formação de um hidrogel físico e ou químico partir da modificação química de um polímero hidrofóbico [7].

Entre as principais características dos hidrogéis está a biocompatibilidade e a baixa tensão interfacial com os fluidos biológicos e tecidos. Os hidrogéis apresentam similaridade nas propriedades hidrodinâmicas de géis naturais biológicos, células e tecidos. A natureza elastomérica dos hidrogéis minimiza a irritação mecânica e de fricção ao tecido das vizinhanças, não causa dor nem dano à mucosa ou ao íntimo dos vasos sanguíneos, sem risco de infecção [6]. Estas características os fazem aplicáveis na área biomédica [3], na regeneração de tecidos [46] e em implantes [47] e na área farmacêutica, para liberação controlada de fármacos [48] e proteínas [49] em locais específicos do organismo,

via ocular [50], vaginal [51], oral e nasal [52], entre outros.

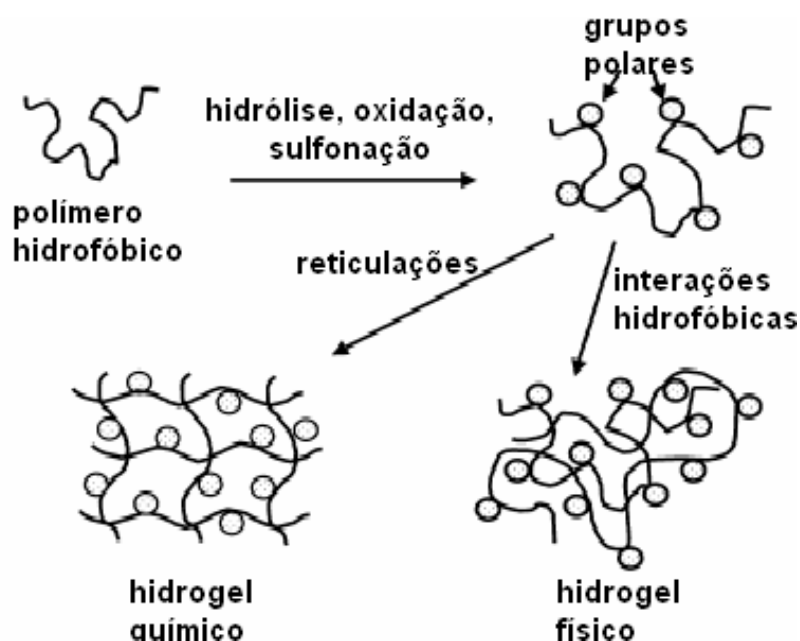


Figura 1: Representação esquemática da formação de um hidrogel físico e de um hidrogel químico a partir da modificação química de um polímero hidrofóbico [7].

3.1 Hidrogéis como carreadores de fármacos para liberação controlada

O uso de hidrogéis poliméricos como carreadores de fármacos é uma proposta promissora porque visa à liberação controlada de um princípio ativo em um local específico do organismo por um período mais prolongado de tempo que a administração convencional, mantendo uma concentração terapêutica e evitando a necessidade de repetição da administração. As vantagens da administração por liberação controlada incluem aumento da eficácia e redução dos efeitos colaterais [4,5]. A Figura 2 mostra, comparativamente, os níveis de fármaco no plasma atingidos na administração terapêutica convencional e na administração por liberação controlada.

Os hidrogéis destinados a encapsular fármacos devem ser formados por polímeros com características de permeabilidade a água, biocompatibilidade e resistência mecânica. Diversas metodologias de produção de hidrogéis a partir de diferentes polímeros têm sido propostas, na tentativa de aprimorar a processabilidade e propriedades mecânicas do hidrogel bem como os

mecanismos de liberação do fármaco. Polímeros sintéticos como poliuretano (PU) [15], ácido poliacrílico (PAA) [11, 53] poliacrilonitrila (PAN) [54], poliacrilamida (PAAm) [14,55] e poli (N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) [11, 13, 56] e polímeros naturais como quitosana [52,57-59], pectina [12,13] e gelatina [60-63] tem sido usados para diversas aplicações biomédicas e farmacêuticas.

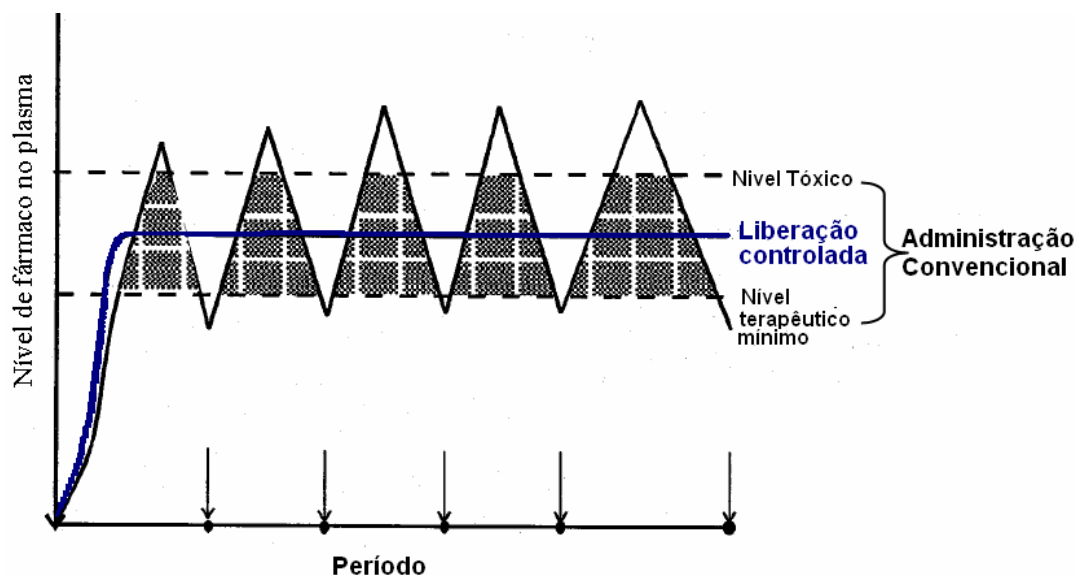


Figura 2: Comparativo dos níveis de fármaco no organismo quando realizada terapia de fármacos convencional e por liberação controlada [5].

Existem muitas estruturas macromoleculares possíveis para a formação de hidrogéis. Estes podem ser constituídos de redes poliméricas reticuladas como as redes de polímeros interpenetrantes (IPNs) [60] ou complexos polieletrólíticos [9], assim como por misturas físicas emaranhadas ou reticuladas de homopolímeros ou copolímeros lineares, graftizados ou em bloco [1,6,7,18,64-70]. Cada uma dessas categorias de hidrogel será descrita a seguir:

3.1.1 Hidrogéis a Base de Blendas Poliméricas

Blendas poliméricas são formas simples de combinar as vantagens de diferentes materiais mostrando propriedades sinérgicas. Uma das principais vantagens para liberação controlada está na fácil fabricação e manipulação das propriedades. As blendas poliméricas podem ser compostas de uma ampla variedade de polímeros, tendo entre os mais utilizados o polietileno glicol PEG [71-73], poliacetato de vinila (PVAc), poliálcool vinílico (PVA) [74-79],

policaprolactona (PCL) [80], ácido poliacrílico (PAA) [64,76], ácido poli-láctico-co-glicólico (PGLA) [79,83] e ácido poli (láctico) (PLA) [83].

Filmes feitos a partir de blendas de PVP e PEG [71-73] produziram adesivos altamente biocompatíveis em sistemas terapêuticos transdérmicos. Peppas e Tennenhouse [64] adicionaram PEG em blendas de PVA com PAA e avaliaram o efeito sobre o grau de inchamento, sensibilidade ao pH e cristalinidade. A adição de PEG e PAA ocasionou melhora na habilidade ao inchamento e na sensibilidade ao pH dos filmes, exibindo boas propriedades para utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos. Cascone e colaboradores. [77] avaliou o efeito da adição de gelana em hidrogéis a base de PVA na liberação *in vitro* do hormônio humano do crescimento (GH), no qual os perfis de liberação foram aprimorados com o aumento do teor de gelana. Outros trabalhos do autor propõem o uso de PVA [78] ou PVA misturado com dextrana [79] como matriz na liberação de dexametasona encapsulada em nanoesferas de PLGA. Blendas de anidrido poli-fumárico-co-sebácico [p(FASA)] e PCL [80] tiveram um aumento da bioadesão e da tração e com considerável melhora no controle da liberação com a adição de anidrido fumárico.

Blendas a base de polissacarídeos tem sido propostas com o objetivo de aumentar a biocompatibilidade e a eficiência de encapsulamento entre outras propriedades [75, 76, 81-84]. A adição de polissacarídeos em blendas de PVA e PAA causou um aumento da bioadesão e biocompatibilidade para produção de adesivos transdérmicos [76]. Blendas de PVA e gelatina foram preparadas e apresentaram propriedades desejáveis para sistemas de liberação [75]. Blendas de quitosana com colágeno [82], PVP [83] e com alginato [81, 84] foram produzidas e testadas para liberação de proteínas e fármacos. De maneira geral, o teor de quitosana é fundamental para o ajuste entre as propriedades mecânicas e de liberação de fármacos [83]. A Figura 3 mostra a morfologia porosa e multifásica de hidrogéis de QUI/PEG conforme o teor relativo de QUI. As blendas de QUI com alginato também mostraram que o ajuste do teor de quitosana na blenda foi determinante para a obtenção de um balanço entre as propriedades mecânicas e um perfil adequado de liberação do fármaco. A Figura 4 ilustra os perfis de liberação de paracetamol em formulações a base de quitosana e

alginate, mostrando que somente as formulações com quitosana mostraram liberação controlada.

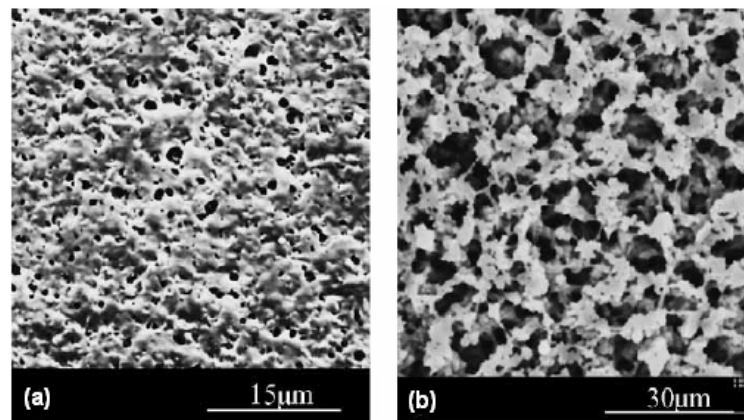


Figura 3: Morfologia porosa e multifásica das blendas QUI/PEG de composição relativa: (a) QUI/PEG 2/1 e (b) QUI/PEG 1/1 [83].

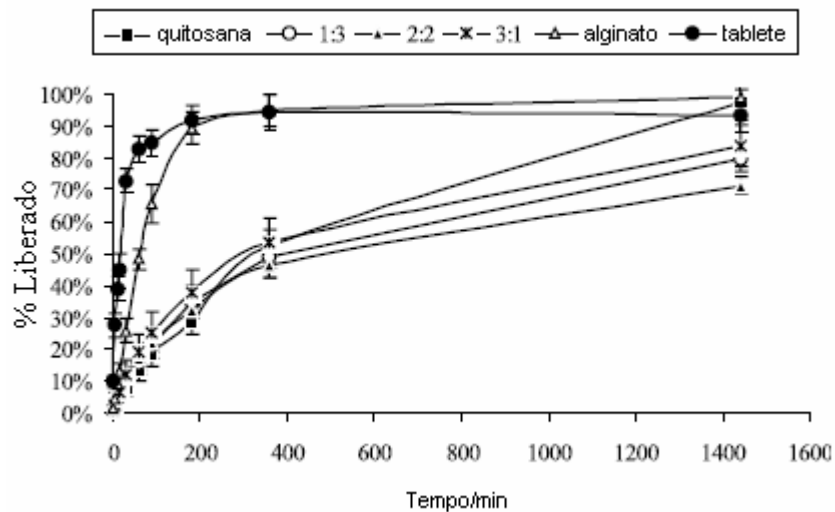


Figura 4: Curvas de liberação de paracetamol de hidrogéis de alginate, quitosana e de misturas entre os dois componentes [84].

3.1.2 Hidrogéis formados por compósitos

Hidrogéis compostos de polímeros e material particulado ou fibras são referidos como hidrogéis compósitos. Poucos estudos foram feitos sobre o encapsulamento e a liberação de fármacos usando estes materiais como matrizes [85-90]. Polissacarídeos e Carbopol® foram produzidos para migração transdérmica do diclofenaco [85] para liberação controlada do maleato de timolol.

Aminabhavi [86] preparou hidrogéis compósitos *in situ* com Carbopol®, alginato de sódio e goma arábica para aplicações oftálmicas, onde o uso destes compósitos prolongou em 5 vezes a liberação do fármaco em comparação com formulações oftálmicas convencionais. Compósitos hidrogéis superporosos com carbopol foram produzidos visando aprimorar a liberação trans mucosa [87] e a absorção intestinal [88,89]. O aumento dos poros no hidrogel, observado pela diminuição da densidade, proporcionou rápida adesão à mucosa intestinal e rápido inchamento, um indicativo para liberação peroral de peptídeos e proteínas. A Tabela 1 relaciona a quantidade de Carbopol® adicionada com a força bioadesiva e com a densidade do hidrogel final [88].

Tabela 1: Relação entre a quantidade de Carbopol® adicionada na blenda com a força bioadesiva e a densidade das blendas [88]

Solução aquosa 1,3% (p/p) de Carbopol ® 934P		
Quantidade adicionada (μl)	Força Bioadesiva (N/m^2)	Densidade (g/cm^3)
0	$3333,4 \pm 842,3$	$0,78 \pm 0,08$
200	$5588,8 \pm 1840,3$	$0,67 \pm 0,04$
400	$7669,6 \pm 977,9$	$0,69 \pm 0,01$
600	$2712,8 \pm 772,1$	$0,65 \pm 0,03$
Solução aquosa 1,3% (p/p) de Carbopol ® 974P		
Quantidade adicionada (μl)	Força Bioadesiva (N/m^2)	Densidade (g/cm^3)
0	$3333,4 \pm 842,3$	$0,78 \pm 0,08$
200	$5916,0 \pm 1377,4$	$0,73 \pm 0,06$
400	$8601,2 \pm 1388,9$	$0,72 \pm 0,05$
600	$3754,9 \pm 561,7$	$0,68 \pm 0,01$

Hidrogéis compósitos a base de quitosana com Tetra-etil-orto-silicato (TEOS) foram preparados a fim de avaliar o efeito das propriedades iônicas de diversos fármacos na permeação do hidrogel [90]. Os resultados mostraram que a quitosana incorporada no TEOS inchou em pH 2.5 e se contraiu em pH 7.5, apresentando um comportamento completamente reversível baseado na mudança do pH do meio, e a permeação dos fármacos também foram influenciadas pelas interações iônicas entre os fármacos e a membrana. Uma representação esquemática da variação do inchamento do compósito de quitosana-TEOS é mostrada na Figura 5.

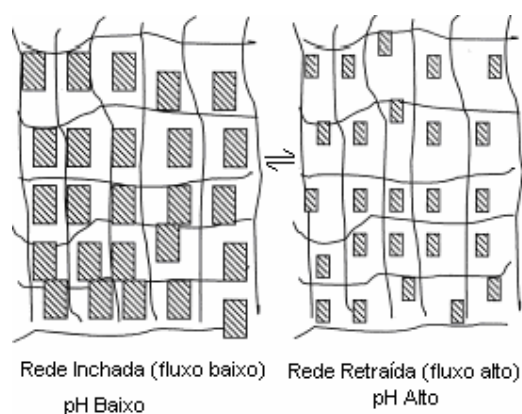


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de inchamento em função do pH da membrana de composto quitosana-TEOS [90].

3.1.3 Hidrogéis formados por copolímeros

Os hidrogéis podem ser formados a partir da síntese de copolímeros que combinam segmentos poliméricos hidrofílicos e hidrofóbicos, com algumas vantagens em relação às blendas e compósitos poliméricos, como a capacidade de produzir um biomaterial com uma ampla gama de características anfífilas, assim como a liberação dos fármacos em local específico do organismo [66,91]. A Figura 6 ilustra tipos de copolímeros que podem ser usados para a formação de hidrogéis [66], e a Figura 7 ilustra a formação de uma rede através de copolímeros em bloco [91].

Muitos sistemas para liberação controlada de fármacos a partir de copolímeros em bloco são descritos na literatura [2,43-45,47], muitos deles classificados de acordo com a resposta dada a um estímulo externo como pH, temperatura ou solvente [47,48]. Outros sistemas mais recentes descrevem hidrogéis a base de polímeros naturais [92,93], N-Isopropilacrilamida [94-96], PVP [97], PEG/PPO [98] e PLLA [99-101].

Grodzinski [2] descreve a formação de hidrogéis por copolímeros em bloco de PEO com PLA ou com poli-b-benzil-L-aspartato (PBLA), testados como carreadores para liberação de fármacos antiinflamatórios e antitumor. Wang e colaboradores [99] sintetizaram e avaliaram a biodegradabilidade de copolímeros a base de ácido poli (lático) (PLLA) com poli (2-etil-2-oxazolona) (PEOZ) formando triblocos PLLA-PEOZ-PLLA, com diferente quantidade relativa de PLLA nas extremidades. A degradação enzimática foi avaliada pela enzima proteinase K, a

qual se mostrou eficiente, diminuindo o tamanho das partículas em 5 vezes após 34 h e o sistema apresentou potencial aplicação em sistemas de liberação controlada.

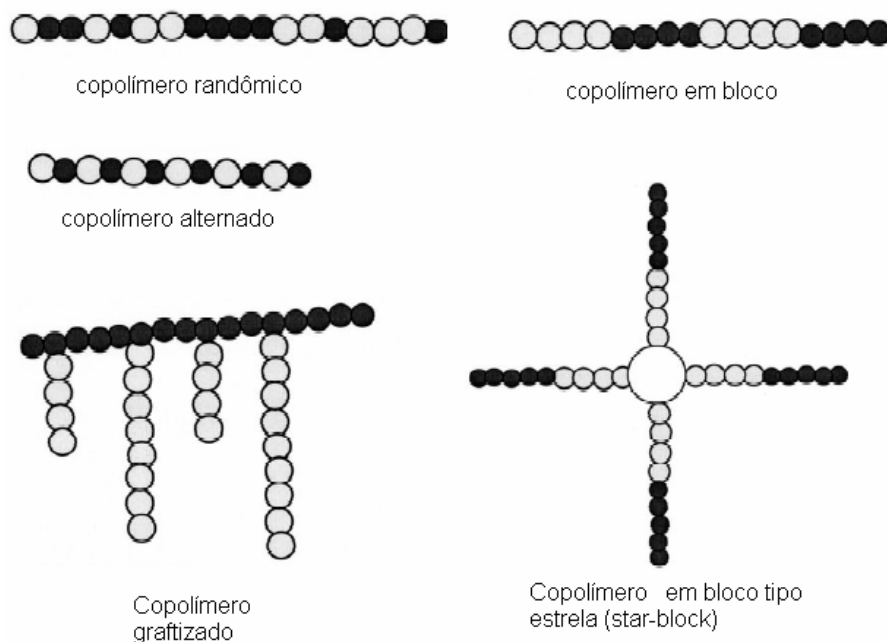


Figura 6: Representação esquemática dos tipos de copolímeros que podem ser sintetizados para formação de hidrogéis [66].

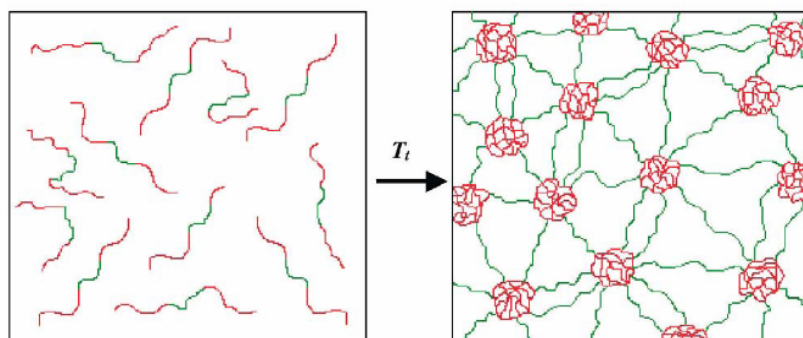


Figura 7: Representação esquemática da formação de hydrogel através da micelização de domínios terminais hidrofóbicos de um copolímero tipo BAB [91].

Hidrogéis produzidos a partir da síntese de copolímeros em bloco poli-éster-éter e poli-éter-éster-amida [66, 68] são encontrados na literatura, versando sobre as propriedades físico-químicas e rotas sintéticas para a produção destes copolímeros para uso potencial na liberação de proteínas. Outros trabalhos descrevem a produção de hidrogéis de copolímeros de ácido poliacrílico e

poliéteres [45, 47, 67,69] e sobre interações de copolímeros tri bloco (PEO–PPO–PEO) com PAA [70]. Os copolímeros PEO-PPO-PEO-PAA mostraram maior mucoadesão com o aumento das cadeias PEO-PPO-PEO necessária para liberação via oral.

Copolímeros graftizados de ácido poliacrílico com etileno glicol P(MAA-g-EG) [55, 67, 102,103] e com acrilamida (AAm) [53] tem sido propostos para a produção de hidrogéis. Peppas [102] avaliou a adesão de P(MAA-g-EG) na mucosa para liberação de proteínas via oral, e demonstrou que ocorre um aumento da adesão em pH 7,4, onde a insulina anteriormente aderida no hidrogel sofre descomplexação e é liberada no meio. A síntese e propriedades para aplicações farmacêuticas de copolímeros a base de PEG para liberação controlada de fármacos são discutidos em artigos de revisão [45,104].

Namazi e Adeli [69] sintetizaram dendrímeros biocompatíveis tipo tribloco a partir de ácido cítrico e PEG e avaliaram a liberação *in vitro* de diversos fármacos, cujos perfis de liberação indicaram que o sistema é potencialmente aplicável para liberação de ácido salicílico, piridina, ácido mefenâmico e diclofenaco. Qiu e colaboradores [105] descreve um novo copolímero a base de PEG com múltiplos grupos tiol (–SH) reticulado *in situ*, formado em condições brandas de reação. O perfil de liberação de BSA e de outras proteínas mostrou-se lento mantendo a atividade biológica das proteínas, tornando-o um bom carreador de proteínas.

3.1.4 IPNS e HPNS

Redes de polímeros interpenetrantes (IPN) é o nome dado à combinação íntima de dois ou mais polímeros na forma de rede, na qual pelo menos um dos polímeros é reticulado na presença de outro. Diferente do que ocorre na copolimerização, não existem ligações covalentes entre os dois polímeros. Existem três possibilidades de formação: rede interpenetrante (IPN), semi-interpenetrante (s-IPN) e rede híbrida (HPN). A Figura 8 ilustra a representação dos tipos de redes poliméricas possíveis. A síntese de IPNs propicia que polímeros diferentes permaneçam entrelaçados através da adição de um agente de reticulação sem que haja extensa separação de fases, podendo ser produzidas

com polímeros como poliuretana (PU) [15], poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAm) [55,106-108] e acrilatos [109, 110].

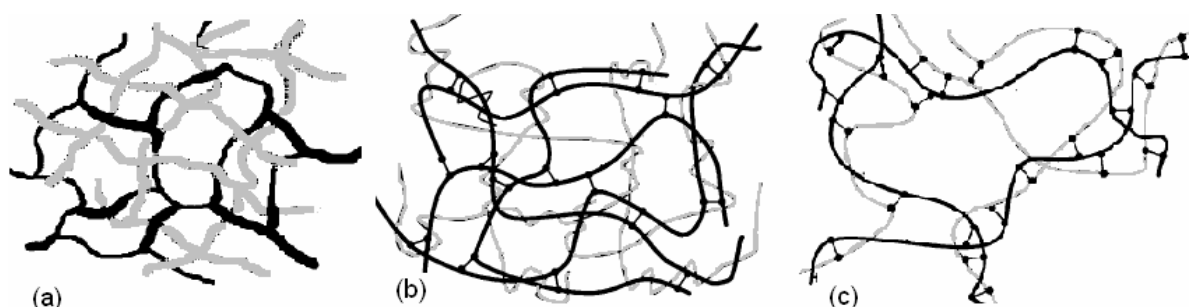


Figura 8: Representação esquemática de redes (a) interpenetrantes [1], (b) semi-interpenetrantes [9] e (c) híbridas [9].

Para a preparação de uma semi-IPN, devem ser utilizados polímeros não contêm grupos funcionais capazes de reagir com o agente de reticulação. Exemplos de polímeros que podem ser usados na preparação destes são poliéteres [111-112], poliálcool vinílico [113-114], poli-vinil-pirrolidona (PVP) [61, 114-116], fibra da seda [117] e polióxido de etileno [118]. Redes híbridas (HPNs) são formadas quando a reação de reticulação ocorre entre os dois polímeros a serem combinados, podendo haver reticulação entre as cadeias de um mesmo polímero.

IPNs a base de poliuretana são reportados na literatura em combinação com PMMA [15], e PAAm [23,55]. Na IPN PU-PMMA [15] estudou-se o efeito da adição de polianilina dopada com ácido câncr sulfônico (PAni)CSA nas propriedades finais, onde a adição de (PAni)CSA aumentou a resistência à tração e a resistência a degradação. Baek [55] preparou IPNs de PU-PAAm, buscando otimizar as propriedades do gel variando-se o grau de polimerização do PU, e densidade de reticulação do PAAm. Observou-se um efeito sinérgico na mistura dos dois polímeros, e a adição de 10% de PU foi o suficiente para aumentar em 100% a flexibilidade do hidrogel. IPNs de quitosana com poli-N-acrilóilglicina (NAGly) [119] foram avaliadas quanto ao grau de inchamento em diferentes pHs e temperatura, e revelaram um inchamento sensível a mudanças de pH e temperatura, apresentando propriedades promissoras para liberação controlada de fármacos. IPNs de quitosana com poli-hidroxi-etil-metacrilato (pHEMA) [120] foram produzidas e avaliadas para aplicação em adsorção de proteínas. Os

resultados mostraram bons perfis de adsorção de lisozima, sendo potencialmente eficientes na adsorção de grandes volumes de fluidos biológicos contendo a proteína alvo.

HPNs foram produzidas pela combinação entre PVA e quitosana [121], no qual a influência da composição química foi avaliada para aplicação como sólidos eletrólitos poliméricos (SPEs). Lin-Gibson [122] sintetizou copolímero tipo bloco de isocianato e reticulou com quitosana formando uma rede híbrida. A elasticidade da rede híbrida pode ser ajustada pelo razão entre o teor da quitosana ao reticulador, tornando-os materiais quimicamente processáveis com propriedades mecânicas bem determinadas.

3.1.5 Complexos iônicos

Hidrogéis formados por complexos iônicos podem ser considerados uma subcategoria dos hidrogéis físicos, devido à natureza reversível das interações iônicas que caracterizam a estrutura do hidrogel. Os complexos iônicos podem ser divididos entre hidrogéis ionicamente reticulados, e os complexos polieletrólíticos.

Os hidrogéis ionicamente reticulados ou géis ionotrópicos são formados por um polímero de características iônica, com um contra íon de valência múltipla, enquanto que os complexos polieletrólíticos (PEC) são formados por um par de polímeros iônicos de cargas contrárias. A Figura 9 ilustra a formação de hidrogéis ionotrópicos e de complexos eletrolíticos (PEC) a partir de um polímero aniônico [7]. Hidrogéis ionotrópicos podem ser formados quando polímeros aniônicos como os poliacrílicos, policaprolactona [123], ácido algínico [124-125] ou amido [126], é combinado com íons como Ca^{+2} e Fe^{+2} ou Fe^{+3} . Polímeros catiônicos como quitosana, poli-lisina ou hidroxietil-celulose formam hidrogéis ionotrópicos combinados com anions como tripolifosfato [30,127-131] glicerol-fosfato [58,132,133] e dodecilsulfato [134]. Na reação de formação de hidrogéis por complexação eletrolítica (PEC) é uma forma alternativa de produzis hidrogéis com reticulações iônicas, onde a principal vantagem da formação de PEC é a sua simplicidade de preparação. Nesta reação, é realizada a mistura de polímero

aniônico com um catiônico geralmente em meio aquoso, favorecendo a biocompatibilidade e dispensando a etapa de purificação após a sua formação.

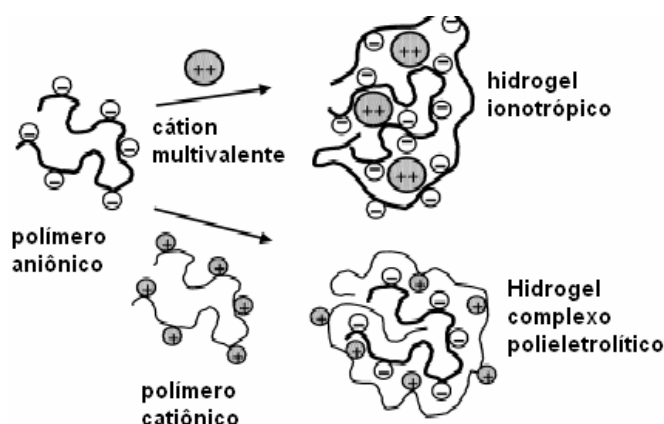


Figura 9: Representação esquemática da formação de hidrogéis ionotrópicos e de complexos eletrolíticos (PEC) a partir de um polímero aniônico [7].

Muitos estudos discorrem sobre a formação de hidrogéis por PEC [12,21, 28-29,40,135-144]. Alguns deles estudaram a dissociação e liberação de fármacos polipeptídicos encapsulados em hidrogéis de polímeros acrílicos com poli-L-lisina [135] ou derivados acrílicos como ácido Dietil-amino-etil-metacrilato (DMAEMA) [136] 2-metacrilóiloxi-etil fosforilcolina (MPC) [137] e 2-metacrilóiloxi-etil cloreto de amônio (PMADQUAT) [138].

O grau de erosão é a perda de material do hidrogel de acordo com o tempo, que pode ocorrer principalmente com polímeros solúveis em água unidos por reticulações degradáveis ou quando polímeros insolúveis em água são solubilizados por hidrólise, ionização ou protonação de grupos laterais [167]. Foi estudado o grau de erosão e de inchamento de hidrogéis preparados a partir de soluções aquosas de copolímeros de MPC com ácido polimetacrílico (PMA) e com polimetacrilato de butila (PMB) para a liberação de fármacos polipeptídicos no trato gastrointestinal, onde a liberação de insulina foi dependente do grau de inchamento, mas principalmente do grau de erosão do hidrogel, onde ocorre dissolução das cadeias poliméricas.

Ácidos Poli-lácticos e copolímeros destes também têm sido propostos como materiais para uso biomédico e farmacêutico, tendo sido reportado em muitos trabalhos [139-143]. Jong e colaboradores propuseram o uso de

oligômeros de ácido láctico de quiralidade oposta [139], onde os principais parâmetros que afetam a estereocomplexação foram a composição relativa e a massa molar das seqüências das unidades L-lactil e D-lactil acopladas pelos terminais hidroxilas à dextrana. A formação dos hidrogéis dextrana-lactato pode ser modulada para liberação de moléculas apresentando amplo potencial para aplicações farmacêuticas e biomédicas. Recentemente, Tsuji [140] revisou os métodos de complexação polieletrólítica, avaliando parâmetros que afetam a complexação como a formação, estrutura, propriedades, degradação e aplicações de complexos de PLA. Liu e colaboradores [141] propuseram a formação de hidrogéis entre ácido poli-DL-lactico-co-glicólico (PLGA) e PVA. Testou-se a liberação de hidrocortisona nos quais os hidrogéis híbridos mostraram melhor performance do que os hidrogéis de PLGA e de PVA devido à formação de interações positivas nos complexos poli-iônicos. Zhou e colaboradores [142] desenvolveram microesferas tipo *core-shell* para liberação de fármacos, composta de alginato e poli-DL-lactico-polietileno glicol (PELA). Vila e colaboradores [143] desenvolveram nanopartículas compostas de quitosana revestidas de ácido poli-láctico-glicólico (PEGA). O revestimento de quitosana na superfície das partículas ALG-PELA aumentou significativamente a eficiência do encapsulamento. A Tabela 2 mostra o tamanho médio e a eficiência do encapsulamento de nanoesferas contendo proteínas.

Tabela 2: Tamanho médio e eficiência do encapsulamento de nanoesferas contendo proteínas [143]

Sistema	Tipo de proteína	Tamanho partícula (nm)	Grau de encapsulamento (%)
PLA	<i>Tetanus toxoid</i>	192 ± 12	36,7 ± 0,3
PEG-PLA	<i>Tetanus toxoid</i>	196 ± 20	31,1 ± 0,5
QUI-PLGA	<i>Tetanus toxoid</i>	500 ± 29	90,0 ± 3,8
QUI	<i>Tetanus toxoid</i>	354 ± 27	55,1 ± 3,4
QUI	Insulina	337 ± 14	94,7 ± 2,1

Complexos interpoliméricos compostos de polímeros naturais como xantana e gelatina foram estudadas [144], nos quais as interações entre os polímeros ora apresentou-se de natureza física e ora apresentou-se de natureza

iônica dependendo do pH do meio. Abaixo do pH 4 ocorreu completa separação de fase.

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos muitos sistemas a base de quitosana para atender a demanda produção de sistemas de liberação de fármacos, proteínas e genes ecologicamente interessantes e de baixo custo. Por se tratarem do tema específico desta tese, estes casos serão discutidos na seção a seguir.

3.2 Quitosana

A quitosana associa propriedades interessantes como biocompatibilidade, biodegradabilidade e facilidade de bioabsorção no organismo [145,146]. Devido à formação de géis em pH baixos, a quitosana é também considerada bioadesiva, o que aumenta a retenção do hidrogel no local de aplicação [147], além de possuir atividade antiácida e anti-ulcerfca, que previnem ou diminuem a irritação do fármaco no estômago. Associado ao seu baixo custo e abundância na natureza, este polímero natural tem despertado crescente interesse nos últimos anos para aplicações médicas e farmacêuticas, em especial para produção de hidrogéis carreadores de fármaco para liberação controlada.

A quitosana é um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose de composição variável em função do grau médio de acetilação [129,130,148]. Este polímero policatiônico é obtido pela desacetilação parcial da quitina, que é o componente principal do exoesqueleto dos crustáceos, como os camarões. A Figura 10 representa esquematicamente as estruturas da quitina e da quitosana.

A quitosana é solúvel em alguns ácidos diluídos e suas propriedades dependem de vários fatores, porém o peso molecular e grau de desacetilação determinam muitas características em solução [149-151]. O monitoramento do grau de acetilação pode ser feito através de espectroscopia de infravermelho, GPC e RMN- H^1 [25,26,152] entre outros e a massa molar média ponderal (MW) e

a distribuição de peso molecular podem ser determinadas por espalhamento de luz ou viscosimetria [5,9,152,115]. A quitosana pode formar hidrogéis que apresentam reticulações formando ligações covalentes, ou interações iônicas [8,9]. Os hidrogéis de quitosana reticulados com ligações covalentes podem ser classificados em três tipos: hidrogéis com reticulações entre suas cadeias, hidrogéis com rede híbrida (HPN) e hidrogéis com redes interpenetrantes (IPN, ou semi-IPN). A Figura 11 ilustra as possibilidades de formação de redes de quitosana. Nos três primeiros exemplos, (Fig. 11 (a),(b), e (c)), as ligações covalentes são as principais interações que formam as redes, porém, outros tipos de interações podem ser considerados. Nos hidrogéis unidos por ligações covalentes, as cadeias poliméricas são interconectadas pelos agentes de reticulação, levando a formação de uma rede tridimensional, onde as propriedades do reticulado vão depender da densidade de reticulação. Cada um dos tipos de hidrogel será discutido a seguir.

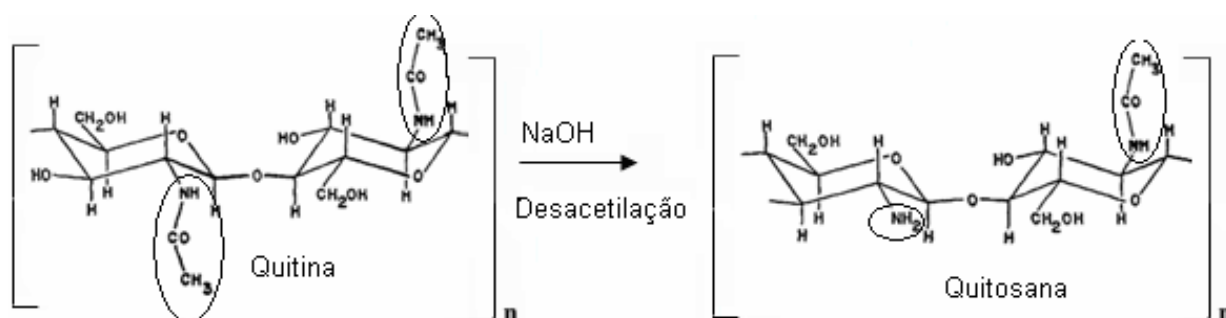


Figura 10: Esquema representativo da reação de desacetilação da quitina, formando a estrutura química da quitosana (n = número de unidades de açúcar por polímero).

3.2.1 Redes reticuladas entre as cadeias

Hidrogéis de quitosana formados pela adição de um agente de reticulação, representados na Fig 11 (a), foram os primeiros tipos de hidrogéis de quitosana produzidos., Vários trabalhos propõem a produção de sistemas particulados de quitosana reticulada, usando geralmente glutaraldeído ou genipina. [153-156], Nanopartículas de quitosana reticuladas com gluraraldeído foram preparadas por sistema micelar reverso usando hexano [154]. Mostrou-se que tamanhos maiores de partícula (120 nm) são atingidos quando o grau de reticulação da rede polimérica é máximo.

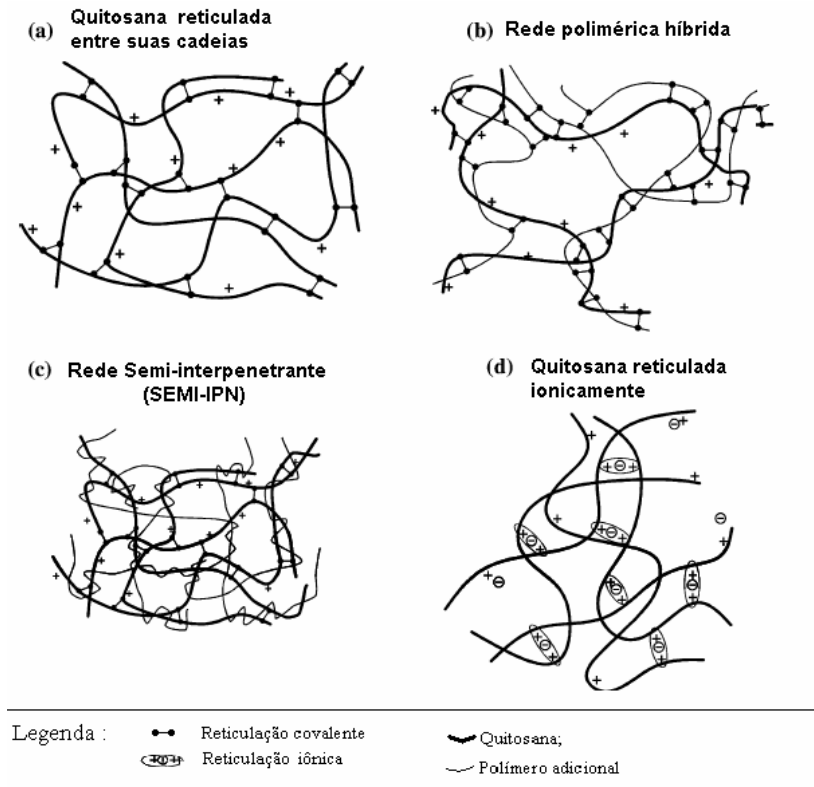


Figura 11: Estruturas possíveis de hidrogéis de quitosana a partir da: (a) reticulação entre as cadeias da quitosana; (b) formação de uma rede polimérica híbrida; (c) formação de uma rede semi-interpenetrante; e (d) reticulação iônica da quitosana [9].

A Figura 12 ilustra o tamanho de partícula das nanopartículas reticuladas com glutaraldeído. Quando injetadas em organismos vivos, as nanopartículas rapidamente atingiram a corrente sanguínea e permaneceram no sangue por mais de 2 horas e se distribuíram igualmente no coração, fígado, bexiga e coluna vertebral, podendo ser usados para liberação de fármacos nos locais mencionados, cujos perfis de liberação podem ser controlados conforme o grau de reticulação entre as cadeias.

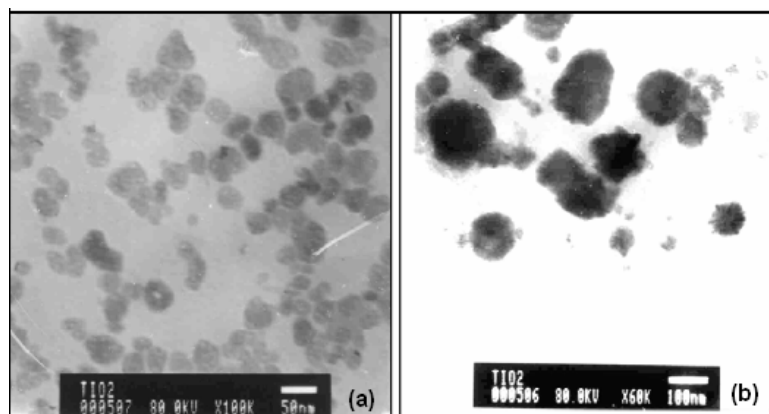
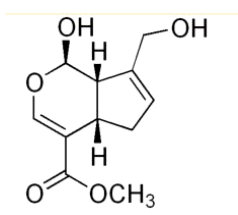


Figura 12: Morfologia das partículas de quitosana de acordo com o grau de reticulação das cadeias de quitosana: (a) 10% de reticulação e (b) 100% de reticulação [154].

Nos últimos anos, a inserção no mercado de um novo agente de reticulação de origem natural, que reage somente com grupos amino, denominado genipina, gerou novos trabalhos com hidrogéis reticulados, pois este agente é obtido pela extração da gardênia cuja toxicidade é cerca de dez vezes inferior aos agentes de reticulação convencionais [154-157]. Na Tabela 3 consta a fórmula química, a estrutura, a massa molar e solubilidade da genipina em meio aquoso.

Tabela 3 : Formula, estrutura, massa molar e limite de solubilidade da genipina

<i>Fórmula</i>	<i>Estrutura</i>	<i>Massa molar</i>	<i>Limite de Solubilidade</i>
$C_{11}H_{14}O_5$		226,2 g/mol	2 mg/mL

Foi estudada a influência da quantidade relativa de genipina adicionada nas propriedades reológicas dos hidrogéis em solução à temperatura ambiente e pH fisiológico [156]. Foi feito um monitoramento dos parâmetros viscoelásticos *in situ* durante a reticulação das cadeias, onde através do acompanhamento do Módulo de elasticidade G' mostrou-se que a adição de pequenos teores de genipina aumenta significativamente a elasticidade de hidrogéis de quitosana, podendo produzir hidrogéis para encapsulamento de moléculas *in situ*. As propriedades mecânicas e de inchamento de hidrogéis de QUI, BSA e QUI/BSA reticulados com genipina foram estudadas por Butler [157]. Os hidrogéis híbridos formados por BSA e quitosana apresentaram melhor resistência mecânica e menor grau de inchamento em meio gástrico comparados com os hidrogéis de QUI e de BSA, sendo considerados mais adequados para liberação controlada em meio gástrico devido ao aumento da retenção destes em meio de pH baixo.

Hidrogéis iônicos de quitosana com tripolifosfato foram reforçados pela adição de genipina [155] para a liberação prolongada de indometacina. A presença de reticulador iônico (tripolifosfato) e covalente (genipina) no hidrogel causou um grau de inchamento dependente do pH, onde o reticulador covalente

foi responsável por conter o inchamento em hidrogéis produzidos em maior pH (pH 7-9) e o reticulador iônico foi responsável por regular o inchamento em pH abaixo de 6. A presença de ambos reticuladores pode aperfeiçoar o desempenho dos hidrogéis de quitosana, onde de acordo com o meio fisiológico, um dos mecanismos poderá preponderar para prolongar o tempo de liberação de fármacos. Já no posterior trabalho do autor onde o alginato e a genipina foram usados na formação de hidrogéis de QUI, os perfis de liberação do fármaco mostraram-se dependentes da concentração relativa alginato/genipina e do pH, devendo ser ajustados para liberação de fármacos específicos [158]. O efeito da adição e do teor de genipina como agente de reticulação em microesferas de quitosana carregadas com BSA foi estudado por Yuan. O grau de reticulação das microesferas atingiu 34% variando-se o tempo de incubação do agente e a concentração de genipina. Em particular, utilizando-se concentrações de 1 a 2 mM de genipina mantendo-se um tempo de incubação de 4 horas, o perfil de liberação de BSA prolongou-se de forma que liberou de 27,1% a 12,4% após 24 dias, demonstrando que proteínas e fármacos podem ser liberados através de microesferas de quitosana de forma controlada, onde o controle do grau de reticulação do sistema é regulado pelo teor e tempo de incubação da genipina.

3.2.2 Redes interpenetrantes (IPNs)

Quando outro polímero é adicionado para a formação da rede, a importância das interações secundárias entre este polímero e a quitosana aumenta, influenciando nas características do hidrogel formado. Fortes interações do tipo pontes de hidrogênio são formadas no caso da formação de HPNs com gelatina [60], (representado na Figura 11 b) ou na formação de semi-IPNs com poliéter [147] ou polietileno glicol [115] (Figura 11 c).

Hidrogéis de quitosana foram desenvolvidos em combinação com diversos outros polímeros sintéticos [53,121,145-147,159-161]. Hidrogéis de quitosana com polióxido de etileno [147] apresentaram propriedades de inchamento dependentes de pH e de temperatura podendo ser utilizada para vetorização de fármacos e para liberação controlada via oral. Outros trabalhos estudaram a mistura com polivinil pirrolidona (PVP) seguido de reticulação, cujos hidrogéis apresentam morfologia porosa e, portanto, eficiente para a liberação de

antibióticos em ambientes ácidos do organismo [116]. A mistura com PEG tem sido feita para desenvolvimento de sistema injetável termo-sensível para liberação controlada de proteínas [115,160]. A graftização de quitosana em ácido poli-acrilico-co-acrilamida produziu hidrogéis com sensibilidade a mudanças de pH e salinidade [53], sendo potencialmente considerados como carreadores de agentes bioativos. Crescenzi [163] e colaboradores desenvolveram redes híbridas de quitosana acetilada com vários derivados de ácido hialurônico, com adição de glutaraldeído como agente de reticulação. A preparação de hidrogéis com reticulações entre os grupos amino apresentou vantagens como facilidade e rapidez da síntese em condições brandas de reação, onde os hidrogéis apresentaram boa compatibilidade entre os reagentes, tornando-os factíveis para produção de biomateriais *in situ*.

No entanto, os hidrogéis gerados pela reticulação covalente de cadeias poliméricas podem vir a apresentar reminiscências do agente de reticulação no hidrogel com potencial toxicidade, o que implica em realizar uma etapa de purificação do hidrogel durante a sua manufatura [8]. Assim, hidrogéis formados pela interação direta entre as cadeias poliméricas sem a adição de agentes de reticulação podem ser promissores no desenvolvimento de hidrogéis alternativos [9].

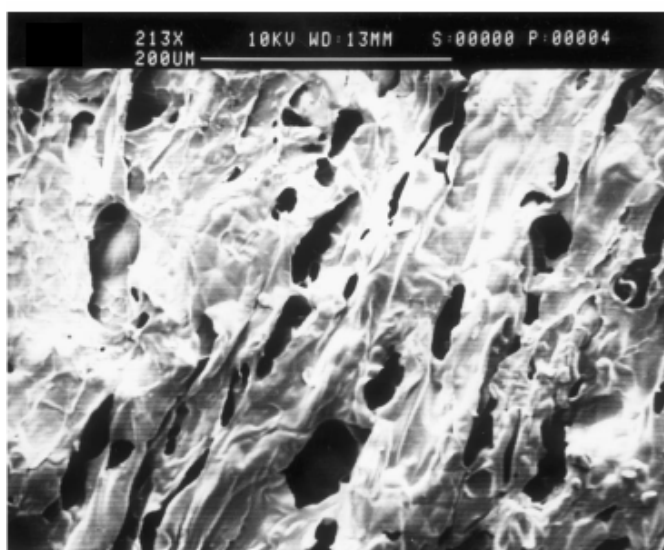


Figura 13: Morfologia de IPNs de QUI/PVP 7/3 reticuladas com glutaraldeído [116].

3.2.3 Redes com interações iônicas

A quitosana pode formar hidrogéis iônicos pelos processos de gelificação ionotrópica e por coacervação complexa, ambos discutidos no item 3.1.5. A presença de grupos amino em grande parte da cadeia polimérica da quitosana faz com que apresente cargas positivas em pH baixo, o que oportuniza a reação com outro componente de carga oposta em solução aquosa. Estes hidrogéis podem oferecer propriedades similares aos hidrogéis produzidos com ligações covalentes, com a vantagem de não adicionar agentes de reticulação. Géis ionotrópicos são formados quando o ânion atua como reticulador iônico das cadeias de quitosana, e coacervados complexos são obtidos pela complexação da quitosana com um poliânion. Cada um dos tipos de hidrogéis de quitosana será discutido a seguir.

Géis ionotrópicos formados por quitosana com tripolifosfato (TPP) foram desenvolvidos para liberação de proteínas [30,127-131]. Xu e Du [30] estudaram a influência da massa molar, do grau de desacetilação e o teor de quitosana nas propriedades de nanopartículas. A eficiência do encapsulamento e os perfis de liberação mostraram-se dependentes dos parâmetros estudados, tornando possível modular os parâmetros para satisfazer a liberação de proteínas específicas. Os hidrogéis de quitosana com TPP apresentaram morfologia e perfis de liberação de proteínas satisfatórios [128-130], melhorando a adsorção nasal de insulina para diabéticos [128], podendo ser também utilizados como ferramenta no tratamento de doenças do pulmão, como fibrose cística ou câncer [129]. A Figura 14 mostra micrografias de nanoesferas de QUI/TPP obtidas por diferentes métodos [130, 131].

Géis ionotrópicos feitos de quitosana com glicerofosfato (GP) [58,132,133] têm sido propostos para reparação de tecidos e para liberação controlada. Ruel-Gariepy estudou o efeito dos hidrogéis termossensíveis nas propriedades viscoelásticas e nos perfis de liberação de carboxi-fluoresceína (CF) dos hidrogéis QUI-GP [58] e de QUI-GP com lipossomas [132]. A taxa de liberação mostrou-se dependente do tamanho do lipossoma e da composição deste, assim como da presença de fosfolipase. Ganguly [133] propôs a formação de um gel *in situ* para liberação prolongada oral ou parenteral de dexametasona, onde QUI-GP com

lipossomas apresenta uma taxa de liberação lenta para liberação controlada de moléculas hidrofílica de pequena massa molar. Hidrogéis de quitosana gerados por formação de gel ionotrópico com β -glicerofosfato [28,58] mostraram-se eficientes para a liberação controlada de compostos hidrofílicos de baixo peso molecular, enquanto os hidrogéis *in situ* com gliceril-mono-oleato mostraram-se bastante úteis para a liberação de medicamentos via oral [130,133].

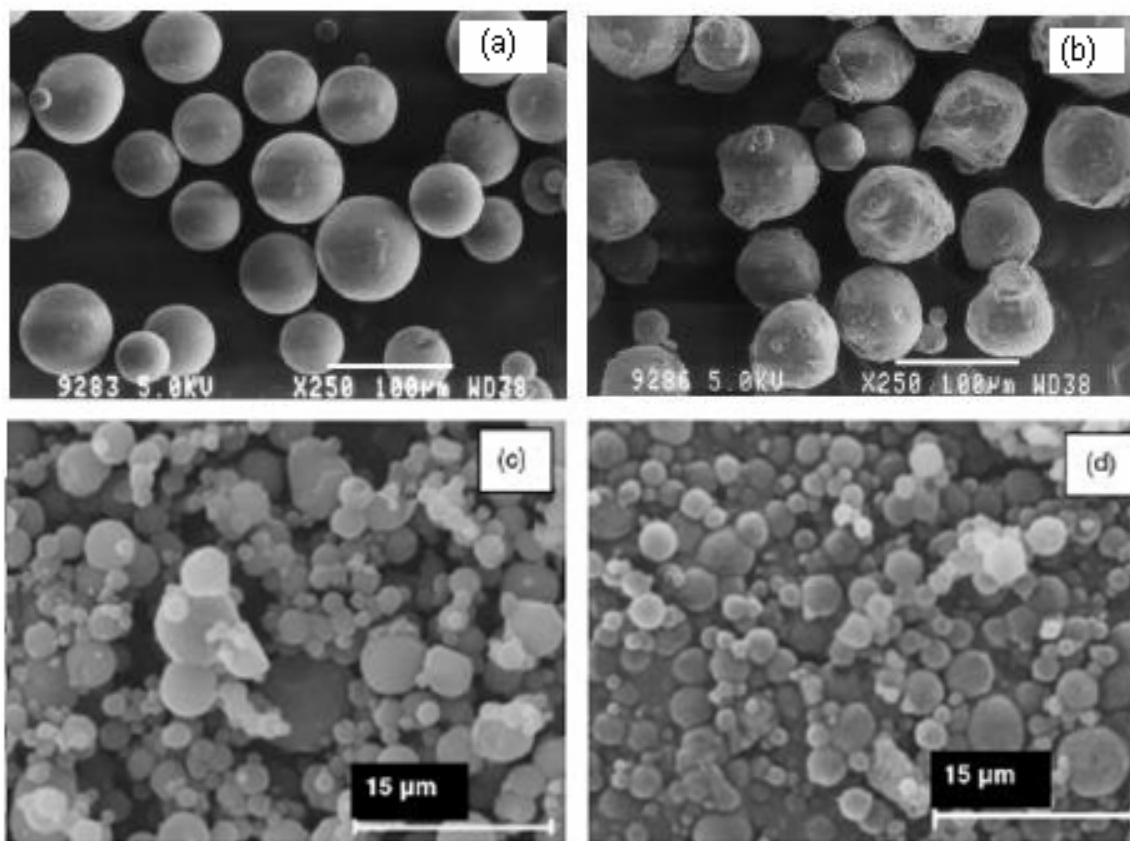


Figura 14: Micrografias de microsferas de QUI-TPP sem (a) e (b) com (27,1%) de nifedipina [124] e nanopartículas de quitosana carregadas com manitol (c) (QUI-NP/manitol) 20/80 e (d) (QUI-NP/manitol) 50/50; [125].

Coacervados complexos de quitosana ou complexos polieletrólíticos (PEC) podem ser obtidos pela combinação com polímeros que contêm grupos carboxílicos, como o ácido poliacrílico [59,167-168] ou ainda grupos sulfato como o sulfato de dextrana [164-165]. Em especial, polissacarídeos como xantana [165], pectina [12] e alginato [24, 26], têm sido usados para obtenção de hidrogéis carreadores de fármacos e proteínas com propriedades diferenciadas. Na Tabela 4, estão dispostos alguns polieletrólitos que formam complexos iônicos com quitosana.

Tabela 4: Polieletrólitos que formam complexos com a quitosana [8]

Classe química	Polieletrólito	Grupo ácido	
Polissacarídeos	Acácia	COO-	
	Alginato	COO-	
	k-carragenana	OSO ₃ ⁻	
	Sulfato de condroitina	COO-	
		OSO ₃ ⁻	
	Carboximetilcelulose	COO-	
	Derivados de quitina com carga negativa		OSO ₃ ⁻
			COO-
		OPO ₃ ⁻	
	Sulfato de dextrana	OSO ₃ ⁻	
	Goma gelana	COO-	
	Heparina	OSO ₃ ⁻	
	Ácido hialurônico	COO-	
	Pectina	COO-	
	Xantana	COO-	
Xilan	COO-		
Proteínas	Colágeno	COO-	
	a-keratose	COO-	
Polímeros sintéticos	Ácido poliacrílico (PAA)	COO-	
	Ácido polifosfórico	OPO ₃ ⁻	
	Polifosfato	OPO ₃ ⁻	
	Ácido Poli-láctico	OPO ₃ ⁻	

Hidrogéis iônicos de quitosana com o ácido poliacrílico foi investigada por Torre [167-168] e Torrado [59], onde se estudou a influencia do meio de formação de complexos entre quitosana e ácido poliacrílico (QUI-PAA) no grau de inchamento e liberação gástrica de amoxicilina [59,167-168]. Os hidrogéis de QUI-PAA apresentaram maior grau de inchamento do que hidrogéis de quitosana, e o controle da difusão nestes hidrogéis foram dependentes do tamanho da rede polimérica. A natureza regular porosa dos complexos iônicos produzidos por liofilização devido às fortes interações eletrostáticas entre ambas as cadeias poliméricas facilitam uma melhor interação com o solvente, permitindo um rápido e eficiente inchamento no local de interesse. A presença de maior teor de PAA no complexo pode propiciar uma estrutura na qual é mais fácil obter a quebra rápida da rede interpolimérica, devido a uma maior separação entre as cadeias poliméricas.

A Figura 15 representa o inchamento e a erosão de complexos polieletrólíticos de PAA/CS encapsulados com amoxicilina. Os hidrogéis de quitosana sem ácido poliacrílico (PAA) (PAA:CS:A 0:2,5:2) apresentaram menor grau de inchamento em fluido gástrico simulado (SGF) do que os hidrogéis com

PAA na sua formulação (PAA:CS:A 1:2,5: 2), conforme representado na Figura 15 (a) e (b).

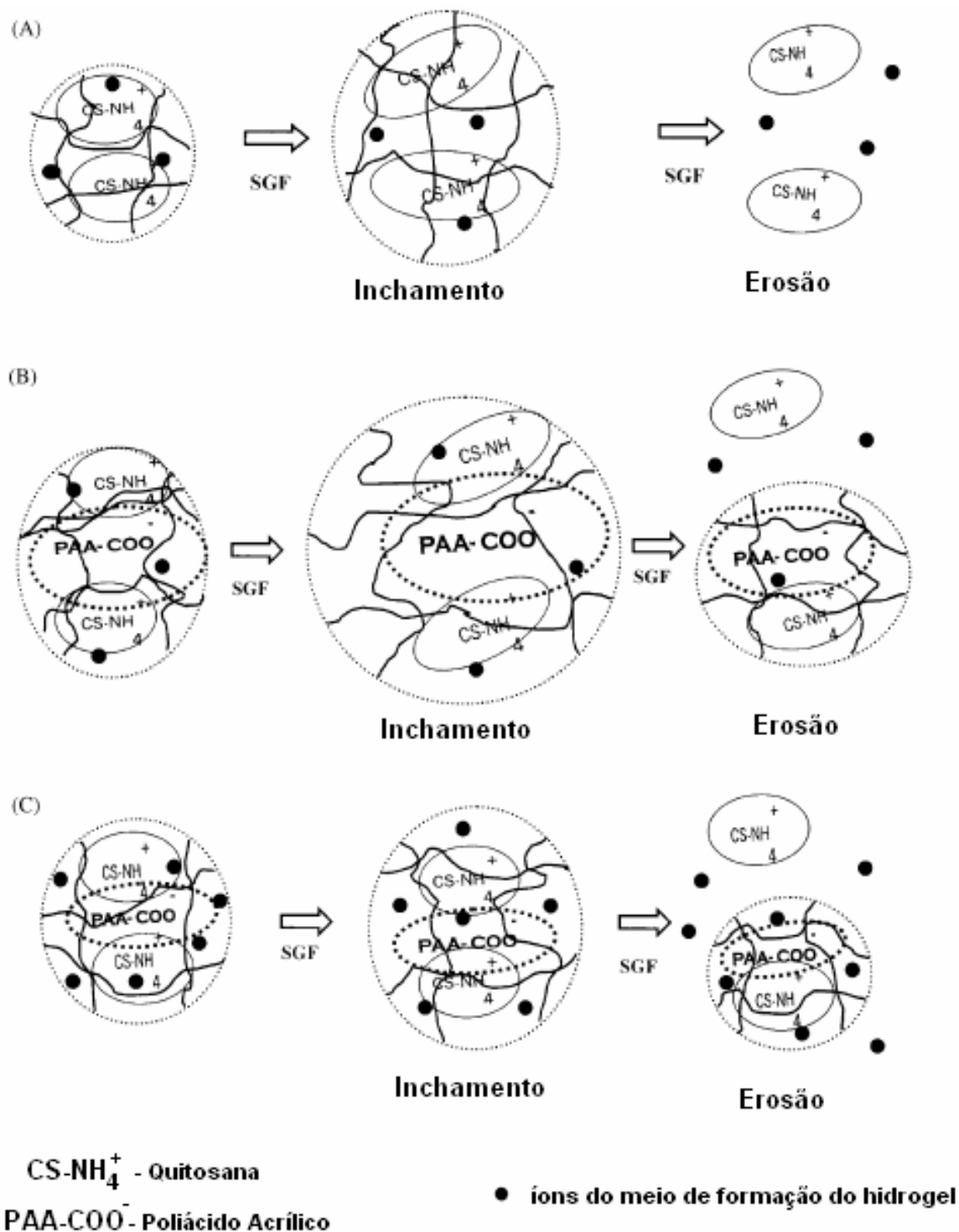


Figura 15: Diagrama esquemático do inchamento e erosão de complexos polieletrólíticos de PAA/QUI/Amoxicilina: (A) (0/2,5/2) em solução 1,75 M ácido acético; (B) (1/2,5/2) em solução 1,75 M ácido acético e (C) (1/2,5/2) em solução 5,25 M de ácido acético [167].

A presença de PAA torna os complexos polionicos liofilizados com natureza regular porosa, onde uma maior interação eletrostática entre ambas as cadeias poliméricas facilita a interação matriz-solvente, permitindo um inchamento rápido e eficiente. Hidrogéis sem a presença de reticulações químicas não são permanentes e podem dissolver ou erodir quando as interações entre os polímeros se dissociam. A adição de PAA nos hidrogéis de quitosana diminuiu a taxa de erosão, porém um maior teor de PAA causou um aumento da taxa de erosão, conforme representado na Figura 15 (b) e (c). A presença de maior teor de PAA no complexo produziu uma estrutura na qual a separação da rede interpolimérica foi facilitada devido a maior separação entre as cadeias poliméricas.

Os perfis de liberação de amoxicilina a 37°C dos hidrogéis PAA:QUI em pH 1,2, conforme ilustrados na Figura 16 mostraram que os complexos poliiônicos são sistemas adequados para liberação de fármacos em ambiente gástrico, devido ao rápido perfil de liberação apresentado.

As propriedades dos hidrogéis iônicos podem ser reforçadas pela adição de reticuladores para a quitosana, levando a formação de redes semi-interpenetrantes. No entanto, a adição de reticuladores pode diminuir a biocompatibilidade. Íons metálicos também podem ser adicionados no sistema levando a formação de um sistema com reticulações iônicas. Geralmente, essa interação ocorre com o auxílio de um agente de gelificação, como cloreto de cálcio ou cloreto de potássio em polímeros como alginato ou a pectina [12,129]. Hidrogéis iônicos a base de quitosana com pectina foram preparados para liberação de indometacina e sulfametoxazol no intestino [12]. Os hidrogéis multiparticulados foram produzidos através da gelificação de soluções de pectina na presença de cálcio e a taxa de liberação dos fármacos foi dependente do pH do meio e do tipo de fármaco. Em meio gástrico simulado, a liberação de sulfametoxazol foi maior devido a sua maior solubilidade, porém ambos fármacos tiveram a taxa de liberação reduzida a níveis satisfatórios pela formação do complexo polieletrólito de quitosana na superfície dos hidrogéis e em meio intestinal simulado, todas as formulações testadas levaram 135 minutos para liberação completa dos fármacos. O efeito das condições de complexação de

hidrogéis iônicos de quitosana com xantana foi estudado recentemente [166]. O efeito do pH do meio e da densidade de reticulação entre a quitosana e a xantana foram investigados por MDSC e por grau de inchamento. Resultados apontaram que a densidade de reticulação mostrou-se dependente de uma combinação de fatores entre o pH do meio e da concentração de xantana, indicando que os fatores que influenciam no grau de inchamento devem ser considerados interdependentes.

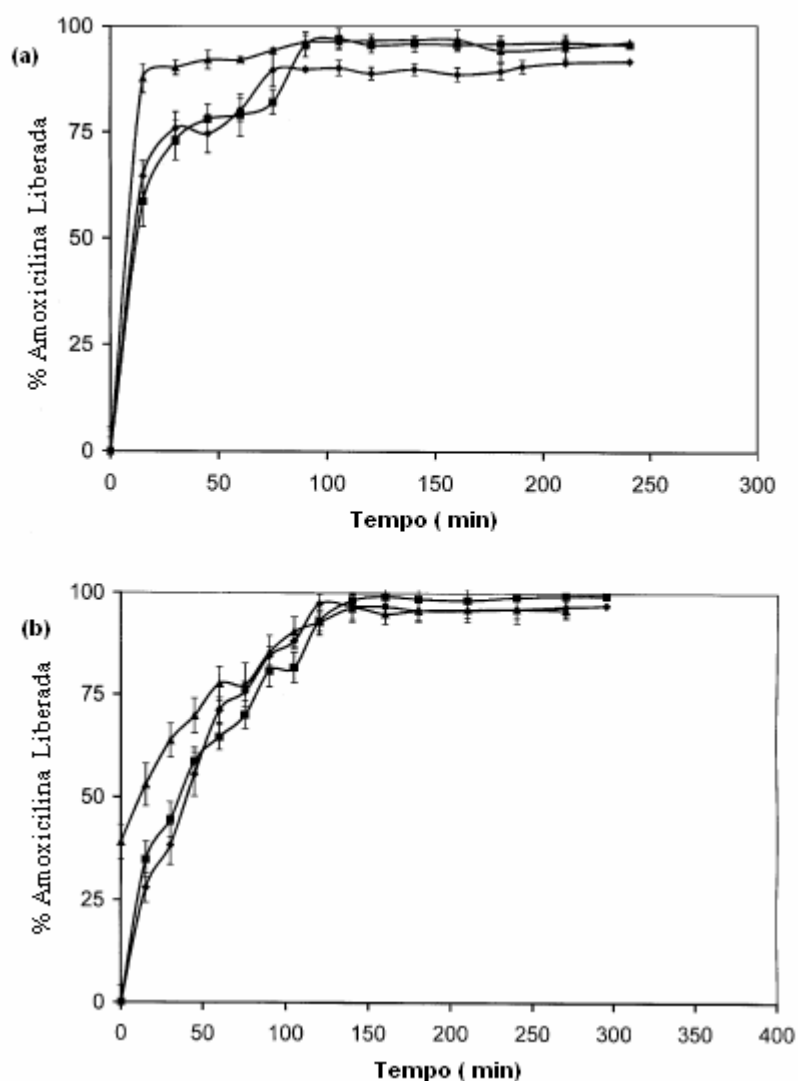


Figura 16: Perfis de liberação de amoxicilina a 37°C em ambiente gástrico simulado (pH 1,2) dos hidrogéis de PAA/QUI com diferentes composições relativas (a) 0: 2,5 (-▲-), 0: 5 (-◆-) e 0:15 (-■-); (b) 1: 2,5 (-▲-), 1: 5 (-◆-) e 1: 15 (-■-) [59].

Hidrogéis iônicos de quitosana com sulfato de dextrana (SD) foram estudados por Drogoz [164], onde a ordem de adição dos componentes alterou os

mecanismos de formação da partícula acordo com o polímero em concentração limitante. A adição de quitosana em excesso consumiu SD em uma razão estequiométrica que variou de 1,5/1 a 1,9/1 SD/quitosana. No entanto, quando o SD foi adicionado em excesso, a razão estequiométrica variou de 6/1 a 1/1 entre quitosana/SD. Esta diferença nos mecanismos de formação de complexo pode ser atribuída a diferenças na reatividade química dos íons em excesso e devido à conformação e a flexibilidade das moléculas influenciarem no potencial eletrostático da molécula. Em trabalho posterior [165], encapsulou-se um antígeno em complexos de quitosana com sulfato de dextrana, comparando-se os perfis de liberação do antígeno em diferentes formulações. Os resultados apontaram que complexos formados com excesso de SD apresentam maior capacidade de interação com o antígeno, conseguindo encapsular quantidades maiores que 600mg/g e apresentando imunogenicidade em camundongos, sendo potenciais carreadores de antígenos em sistemas de liberação controlada.

Os hidrogéis de quitosana com alginato são amplamente estudados, devido ao conjunto de excelentes propriedades que estes podem apresentar para a liberação de fármacos e proteínas. [21, 23, 28, 29,40,81,172-176]. Uma vez que as propriedades desses complexos são determinadas pelo grau de interação entre os polímeros e são afetados por inúmeros fatores que envolvem a formação do complexo, os complexos ALG-QUI serão discutidos em maior profundidade separadamente, em seção 3.3.3, por se constituir do sistema específico de estudo nesta tese.

Nos últimos anos, tem-se dispensado muita atenção para o desenvolvimento de hidrogéis a base de quitosana com morfologia controlada em escala micro ou nanométrica [20-22, 60, 66-69]. Diversas razões motivam a produção destes, sendo as principais devido ao aumento da área superficial frente ao volume [60,66-68], podendo ser usada para entrega controlada de fármacos insolúveis [68]. Como outras vantagens, pode-se prevenir ou minimizar a degradação do medicamento e o efluxo celular, aumentando o tempo de ação do fármaco no organismo [60]. A definição de hidrogéis de morfologia controlada bem como as diversas técnicas de produção destes serão discutidos no item a seguir.

3.3 Hidrogéis de Quitosana com morfologia controlada

Os hidrogéis com morfologia controlada apresentam formato esferóide ou esférica e podem ser produzidos em dimensões específicas que variam de milímetros a nanômetros. As vantagens associadas destes sistemas particulados à base de quitosana constituem-se na biodegradabilidade, na potencialidade terapêutica e na maior estabilidade durante o armazenamento [177]. As partículas de morfologia controlada podem ser classificadas conforme o seu tamanho em micropartículas e nanopartículas. De acordo com a sua classificação, os sistemas particulados com morfologia controlada podem se apresentar sob forma de cápsulas ou ainda esferas, as quais diferem entre si de acordo com a composição qualitativa e organização em nível molecular [178]. Cápsulas são carreadores formados por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo lipofílico, podendo o fármaco estar disperso ou dissolvido no núcleo lipofílico ou adsorvido a parede polimérica. Esferas, por sua vez, não possuem óleo em sua composição, onde fármaco pode estar retido ou adsorvido à parede polimérica. A Figura 17 ilustra os modelos de encapsulamento de fármaco em cápsulas e esferas [182]. Apesar dessa definição distinta para cápsulas e esferas é comum observar na literatura os dois nomes sendo usados como sinônimos [5].

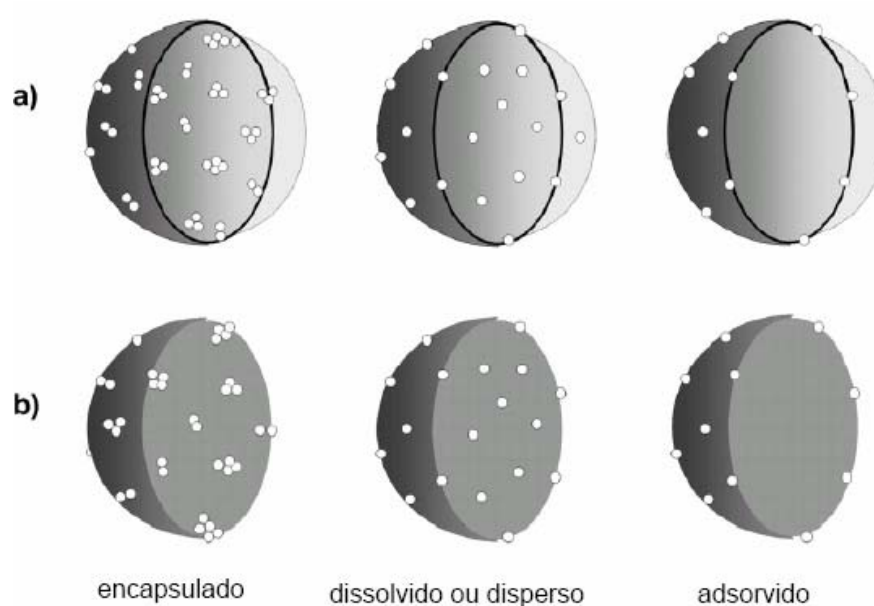


Figura 17: Modelos de fármaco encapsulado, dissolvido ou disperso na matriz ou ainda adsorvido em a) cápsulas e b) esferas [76].

A formação de hidrogéis com morfologia controlada permite que a liberação do medicamento possa ocorrer sob medida a algum tratamento específico, através da escolha e formulação de várias combinações de medicamentos com polímeros [51]. A dose total da medicação e a cinética da taxa de liberação é variável e podem ser manipuladas a fim de atingir o resultado desejado. Hidrogéis particulados podem aumentar a vida útil dos princípios ativos e controlar a liberação de agentes bioativos [39,51]. Hidrogéis de quitosana particulados têm sido utilizados para a liberação controlada de muitos fármacos e para aprimoramento da bioavaliabilidade de substâncias degradáveis como proteínas ou ainda para melhorar a permanência de substâncias hidrofílica nas camadas epiteliais [47,54]. Através da variedade das técnicas de encapsulamento, da composição relativa do segundo polímero, e da natureza química da quitosana (massa molar, grau de desacetilação), micro ou nano partículas podem ser desenvolvidas em um sistema otimizado de entrega controlada, o qual poderá fornecer o perfil de liberação desejado [50]. Muitas técnicas já foram propostas para produção de hidrogéis de quitosana, tendo sido reunidas em artigos de revisão [130] incluindo os fatores principais que afetam a eficiência de cada processo. Algumas técnicas desenvolvidas produzem hidrogéis por evaporação de solvente, *spray drying* [47], revestimento, reticulação térmica ou pela formação de complexos. A Figura 18 ilustra a grande variedade de processos que tem sido utilizado para a preparação das microesferas.

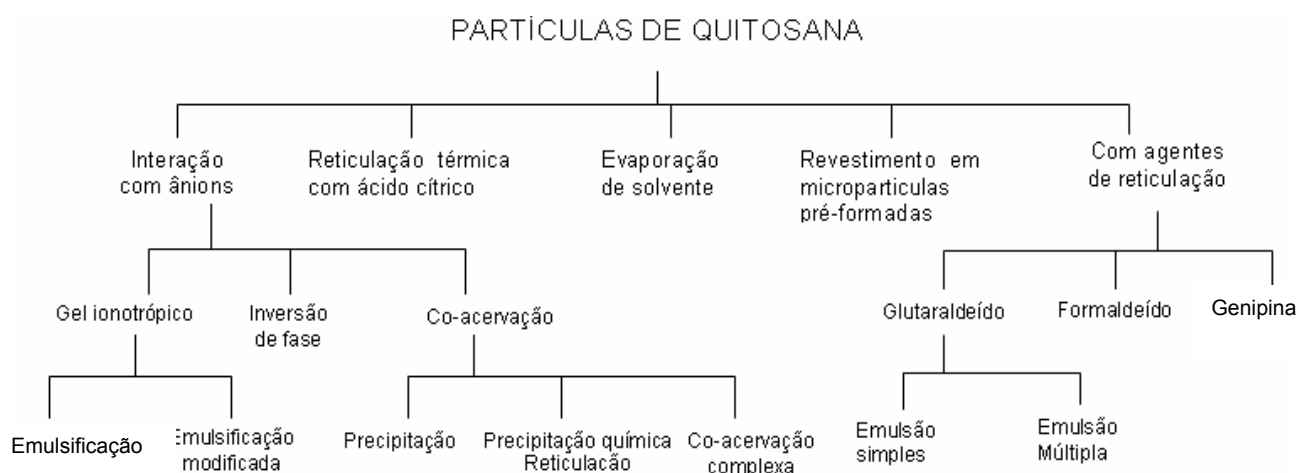


Figura 18: Métodos para preparação de microesferas de quitosana [130].

Dentre as possibilidades existentes para a fabricação de hidrogéis em morfologia controlada, os métodos de formação através da interação com ânions apresentam algumas vantagens. Os principais meios de obtenção de hidrogéis iônicos de quitosana são pelos processos de gelificação ionotrópica e por co-acervação complexa, ambos já discutidos nas seções 3.1.5 e 3.2.3. O método de complexação polieletrólítica ou a co-acervação complexa é um método onde as micropartículas são formadas pela interação iônica entre polímeros de cargas opostas. A formação em meio aquoso é uma vantagem, pois, não necessita uma etapa posterior de retirada de solvente, e ainda favorece a biocompatibilidade [52,54]. A facilidade e simplicidade do método minimizam problemas ambientais associados com solventes orgânicos, constituindo-se em um processo promissor de desenvolvimento de tecnologia limpa [19].

No entanto, a produção de complexos co-acervados por emulsão tem sido proposta para aumentar o encapsulamento de fármacos com reduzida solubilidade em água [179-181]. Hidrogéis de Alginato de Cálcio e quitosana foram produzidos por emulsão óleo em água e usados para liberação via oral de alil-isotiocianato [179]. Microesferas de quitosana de tamanho uniforme, reticuladas com glutaraldeído, foram produzidas por emulsificação via membrana [180], e uma técnica de emulsão de água em óleo vegetal foi proposta para a produção de microesferas de quitosana [181]. Os dois métodos produziram microesferas com tamanho controlado, característica desejável em sistemas de liberação controlada [180, 181].

Dentre vários polímeros possíveis para complexar com a quitosana (veja Tabela 2, seção 3.2.3), o alginato de sódio tem recebido especial destaque devido em grande parte ao conjunto de propriedades estabilizantes, em sua habilidade em formar géis espontaneamente e sua alta viscosidade, sendo amplamente usado nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica. O alginato de sódio é um copolímero formado por unidades de ácido gulurônico e manurônico, cuja distribuição e quantidade de cada um dos copolímeros depende da origem do alginato [179]. A Figura 19 ilustra a estrutura química do alginato de sódio com as unidades de ácido gulurônico (G) e manurônico (M). Na presença de cátions divalentes, como cálcio, o alginato forma um gel espontaneamente como

resultado da ligação cooperativa dos cátions com as cadeias de alginato adjacentes, levando a formação de pontes entre as cadeias. A formação destas pontes entre os íons cálcio e as cadeias da estrutura do alginato está representada esquematicamente na Figura 20.

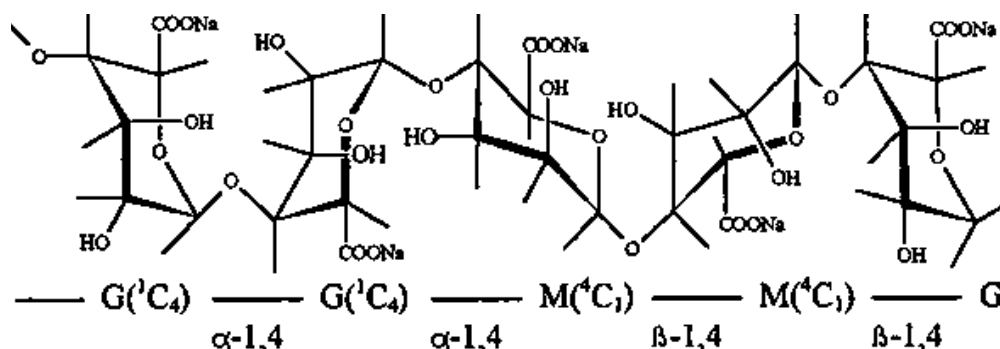


Figura 19: Estrutura química do alginato de sódio, um copolímero composto de unidades de ácido gulônico (G) e manurônico (M) [45].

Hidrogéis formados pela complexação entre ALG e QUI podem apresentar propriedades muito vantajosas para a liberação de fármacos e proteínas, dependendo da combinação das variáveis no processo de formação das partículas [21,28,29,40,170-175].

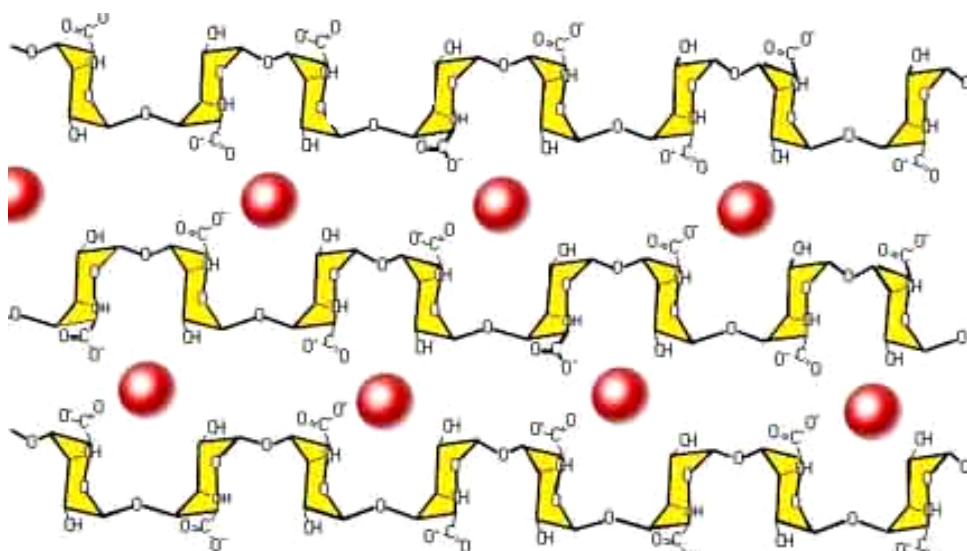


Figura 20: Representação esquemática da formação de hidrogéis através de interações entre íons cálcio com os grupos carboxílicos do alginato de sódio.

De maneira geral, os hidrogéis ALG-QUI são complexos formados em meio aquoso e são sensíveis a alterações de pH do meio. Quando expostos em meio com pH próximo da neutralidade, as cadeias poliméricas de cargas opostas

permanecem emaranhadas, mantidas unidas pela atração eletrostática. No entanto, quando diminui o pH, as cadeias de quitosana tendem a expandir devido à repulsão das cargas positivas presentes em um meio ácido, causando o inchamento do hidrogel. Da mesma forma, as cadeias de alginato tendem a expandir suas cadeias em função do aumento de basicidade quando o pH aumenta. A Figura 21 ilustra a estrutura e variação do inchamento com o pH do meio de um complexo polieletrólítico.

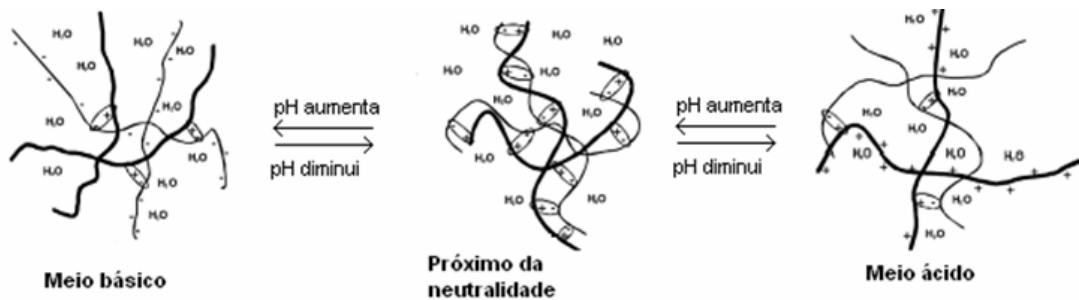


Figura 21: Estrutura e variação do inchamento de um complexo polieletrólítico com o pH do meio [9].

Um dos grandes avanços dos últimos anos foi o desenvolvimento de hidrogéis com morfologia controlada, que apresentam inúmeras vantagens em relação aos sistemas convencionais para a liberação controlada de fármacos. Estes hidrogéis são esféricos, mas dependendo do método de preparação, apresentam diferente escala de grandeza, com dimensões que variam desde milímetros a nanômetros, com grande variação nas suas propriedades em função da redução do seu tamanho. Por esta razão, primeiramente será discutida a influência das variáveis na reação de co-acervação complexa ALG-QUI nas propriedades finais dos complexos e, posteriormente, serão descritos complexos ALG-QUI na forma de micropartículas e nanopartículas.

3.3.1 Micropartículas

As partículas de quitosana foram os primeiros hidrogéis com morfologia controlada produzidos, com dimensões entre $2\mu\text{m}$ e $1000\mu\text{m}$, visíveis a olho nu ou com auxílio de um microscópio ótico. Sua morfologia permite uma melhor distribuição do fármaco em relação aos hidrogéis convencionais, aumentando suas concentrações no local específico de ação. O tamanho reduzido das

partículas tende a aprimorar a bioavaliabilidade de proteínas e prolongar a permanência de uma substância hidrofílica nas camadas epiteliais [47,54].

A produção de hidrogéis de quitosana com micrometros ou até mesmo milímetros é descrita por diversos autores [5, 20,29,31,113]. Sistemas particulados a base de quitosana com alginato tem sido produzidos e testados para liberação de ampicilina [20] diclofenaco de sódio [31], verapamil [175], hemoglobina [5] e proteínas como insulina e BSA [31]. Gaserod [172] e Wittaya [32] prepararam partículas de ALG-QUI em diferentes composições relativas e diferentes métodos de preparação das partículas nas propriedades dos hidrogéis. Gaserod avaliou a influência das variáveis na bioadesão e na porosidade das partículas. A bioadesão foi melhorada com o aumento do grau de desacetilação da quitosana e com o aumento do pH de 4 para 6. A adição de cálcio contribuiu na diminuição da porosidade do hidrogel. Wittaya avaliou a influência da concentração dos íons cálcio e de prednilosona no encapsulamento. Os resultados mostraram que o tamanho de partícula e o grau de encapsulamento variaram principalmente com a concentração inicial de prednilosona. Em especial, contrapondo-se a Gaserod, mostrou que bioadesividade das partículas foi dependente do método de preparação e aumentou significativamente com o teor de quitosana no complexo. A Figura 22 ilustra a morfologia e o tamanho de partículas produzidas com ALG-QUI e CaCl_2 por diferentes autores [32,172], onde observa-se que apesar de produzida com os mesmos polissacarídeos e o mesmo reticulador, são formadas partículas de diferente tamanho e com diferente porosidade, de acordo com o método de preparação.

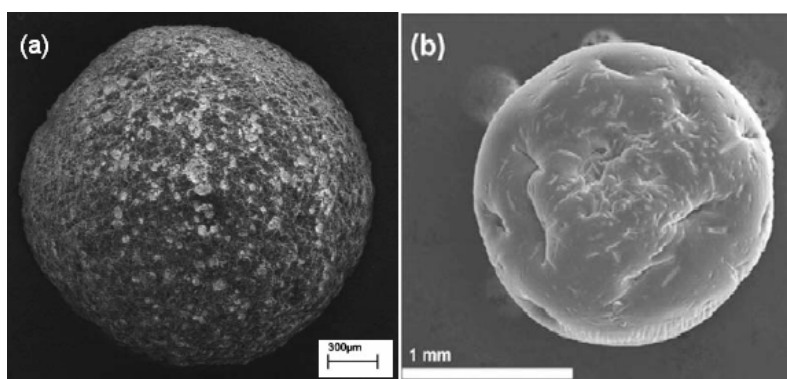


Figura 22: Hidrogéis de ALG- QUI reticulado com cálcio carregados com (a) prednilosona [32] e (b) Dextrana [172].

Gonzáles-Rodrigues e colaboradores [31] prepararam partículas de ALG-QUI em diferentes composições relativas e testaram a eficiência de cálcio e alumínio como reticuladores iônicos nos perfis de liberação de diclofenaco de sódio. Os resultados apontaram que a formulação ALG-QUI reticulada com Al^{+3} prolongou em 50% a liberação em comparação ao sistema convencional ALG-QUI-Ca. Anal e Stevens [20] prepararam leitos de quitosana para liberação de ampicilina em camada simples e em multicamada, cujos perfis de liberação mostraram que após 4h em ambiente gástrico, o sistema em multicamada liberou 30% de ampicilina, um desempenho superior de controle em comparação com o sistema de camada simples, que liberou 70% de ampicilina no mesmo período. O sistema em multicamada desta forma retém o fármaco durante a passagem gastrointestinal, sendo adequados para liberação no intestino até de fármacos pequenos. Wang [29] preparou leitos de ALG-QUI com adição de fibra konjac de glucomannan (KGM), no qual a adição desse aditivo provocou um aumento no grau de inchamento (GI) em meio ácido e diminuição do GI em meio básico, alterou a viscosidade e o perfil difusional de proteínas.

Micropartículas com tamanho entre 2-100 μm têm sido produzidas e testadas para liberação de fármacos e proteínas por diversos autores [5,20,29,31]. Dai [19] revisa concisamente os avanços feitos quanto ao desenvolvimento comercial de micropartículas carreadoras, citando complexos de ALG-QUI como promissores para encapsulamento de formulações comerciais de proteínas. A eficiência do encapsulamento de indometacina e insulina em micropartículas em multicamada de quitosana com alginato foram comparadas as convencionais [170, 176]. O sistema em multicamada causou uma diminuição na taxa de liberação. Os hidrogéis encapsulados com indometacina, o tempo no qual a liberação é de 50% ($t_{1/2}$) foi estendido conforme o aumento numero de camadas acrescentada no sistema, diminuindo inclusive a taxa de liberação imediata. Posteriormente, Ye [171] propõe uma nova técnica para produzir um sistema de micropartículas em multicamada encapsuladas com insulina. As multicamadas de ALG e QUI são depositadas camada por camada sobre micropartículas pré-formadoras de formaldeído de melamina (MF), que após a formação da multicamada estas são dissolvidas em pH baixo e retiradas do complexo. Os resultados mostraram que o encapsulamento de insulina foi facilitado em pH

abaixo de 5.5 devido a sua atração eletrostática com o complexo. A reticulação de ALG com íons cálcio e a adição de multicamadas diminuiu substancialmente a taxa de liberação de insulina. A Figura 23 mostra a morfologia das partículas de MF pré-formadoras das multicamadas e a das partículas multicamada. Devido à biodegradabilidade dos polissacarídeos, e dos vários métodos de controle da taxa de liberação, a construção de multicamadas apresenta um potencial promissor para encapsular e liberar fármacos de baixa solubilidade. As interações entre os grupos carboxílicos do alginato com os grupos amino protonados da quitosana na formação de micropartículas foram estudados foi Liu [28], onde se testou a influência das diferentes técnicas de para reticulação do hidrogel, usando uma fonte externa de cálcio (convencional) e interna. A massa molar da quitosana, bem como concentração e o pH trabalhado influenciaram no grau de inchamento das microcápsulas, onde técnica de gelificação interna revelou-se uma alternativa para produção de micropartículas em larga escala.

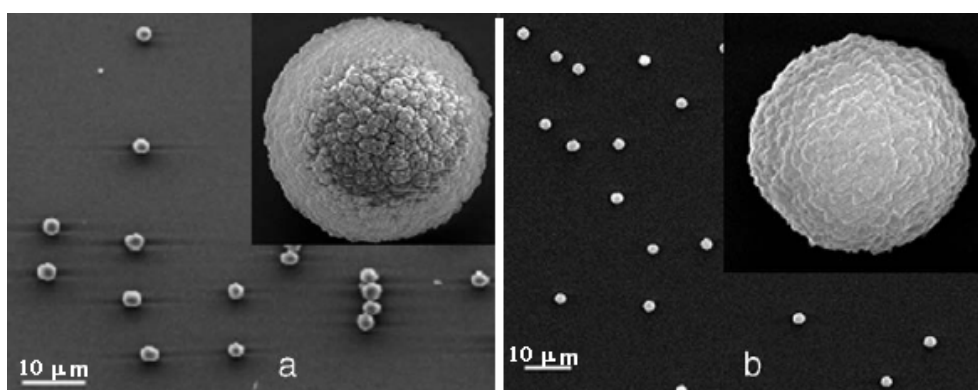


Figura 23 : Partículas pré-formadas de MF e partículas com 5 camadas de ALG-QUI [171].

3.3.2 Nanopartículas

As nanopartículas apresentam dimensões entre 10 e 1000 nm [178,182], aumentando ainda mais a disponibilidade oral e a possibilidade de serem administrados pela via parenteral [185,186], prevenindo a degradação gastrointestinal dos fármacos. Como consequência, sistemas nanoparticulados apresentam um maior controle da liberação, com maior especificidade e seletividade, diminuindo a dosagem administrada bem como seus efeitos colaterais. A dose total da medicação e a cinética da taxa de liberação é variável e podem ser manipuladas a fim de atingir o resultado desejado, podendo

aumentar a vida útil dos princípios ativos e controlar a liberação de agentes bioativos [39,51].

Nanoesferas de alginato (ALG) com quitosana (QUI) e com poli-L-lisina (PLL) foram descritas por De e Robinson [21], onde a influência da composição relativa de ALG, CaCl_2 , PLL e QUI foram considerados fatores críticos pra a formação de nanoesferas ao invés de microesferas. A taxa liberação de azul de metileno das nanoesferas de ALG-QUI e de ALG-PLL foi diretamente proporcional à concentração de íons sódio no meio de dissolução. A Figura 24 mostra a relação linear entre a massa de azul de metileno liberada como função da concentração de NaCl.

Borges [33] produziu nanopartículas de quitosana para adsorção de antígenos para uso em vacinas, reticulando as partículas de quitosana com sulfato de sódio e revestindo com alginato para aumentar a estabilidade das partículas e para prevenir a dessorção nos fluidos gastrintestinais.

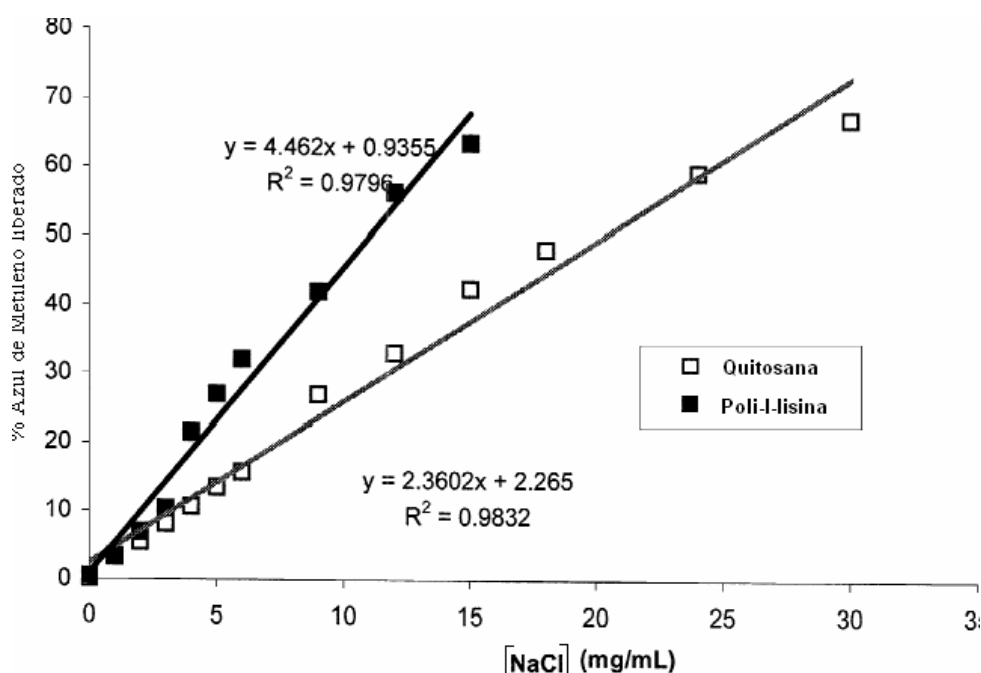


Figura 24: Relação linear entre a massa de azul de metileno liberada como função da concentração de NaCl nas nanopartículas de ALG com QUI e com PLL [21].

A presença de 35% de alginato em peso nas partículas de quitosana evitou a liberação instantânea em meio intestinal simulado a 37°C e aumentou significativamente a estabilidade das partículas, com tamanho adequado para a

aplicação em vacinas. A Figura 25 ilustra a morfologia das nanopartículas de QUI-ALG e os perfis de liberação de fármaco modelo. Pandey [187] testou diferentes nanopartículas no encapsulamento de clotrimazol e econazol, visando melhorar a bioavaliabilidade oral dos fármacos. Os polímeros usados foram ácido poli-láctico-co-glicólico, PLG ou ALG-QUI. As partículas de ALG-QUI apresentaram maior eficiência no encapsulamento (90%) em comparação com as partículas de PLG (50%). A farmacocinética e a biodistribuição sugeriram um perfil de liberação em 5 dias em comparação com os fármacos não encapsulados, que foram liberados após 3 h de administração oral ou intravenosa. Posteriormente, os fármacos encapsulados foram detectados no fígado, pulmões e baço até 7 dias depois, mostrando um avanço significativo na melhora da disponibilidade oral de fármacos.

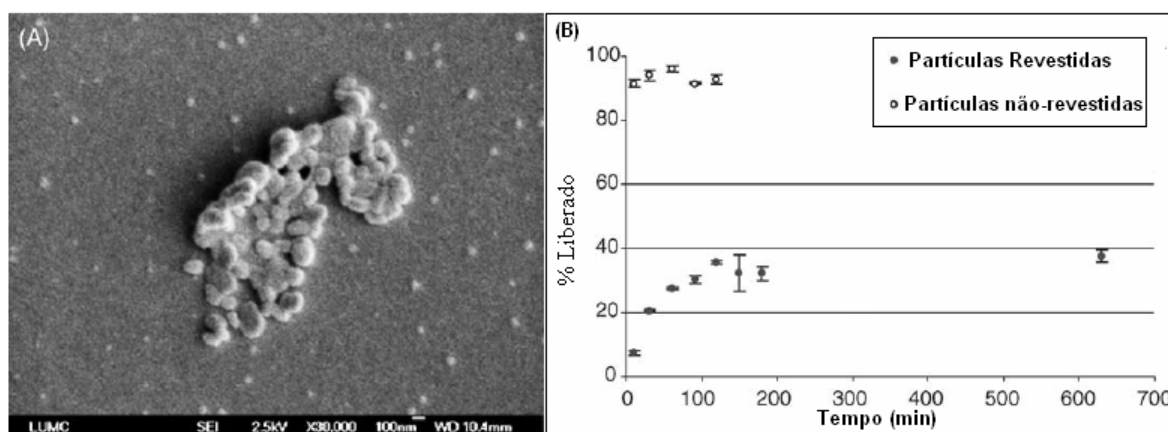


Figura 25: Nanopartículas de QUI-ALG: (A) morfologia das nanopartículas de QUI-ALG (B) perfil de liberação de *in vitro* de nanopartículas de QUI sem revestimento de ALG (○) e com revestimento de ALG (●) na superfície [33].

3.3.3 Influência dos parâmetros de reação na morfologia dos hidrogéis ALG-QUI

O sistema de co-acervação complexa é realizado em meio aquoso, sendo necessário que ambos polieletrólitos estejam na forma ionizada para permitir a formação do complexo iônico, o que acontece em intervalo de pH próximo aos intervalos de pKa dos dois polímeros [57]. O Alginato, composto de seqüências de ácido manurônico (M) e gulurônico (G), apresenta os valores de pKa de 3,38 e 3,65 para as seqüências M e G, respectivamente. A quitosana apresenta um valor médio de pKa 6,3, logo, para o sistema ALG-QUI, o intervalo da reação de complexação deve ocorrer entre 3,5-6,3 acima do pKa do alginato e abaixo do pKa da quitosana. Usualmente, utilizam-se os intervalos de pH 4 a 6.

As partículas formadas por co-acervação complexa são geralmente produzidas pela adição gota a gota, geralmente com o auxílio de uma bomba dosadora, de uma solução de um dos polímeros em uma solução contendo um agente de reticulação iônico. No sistema ALG-QUI, geralmente adiciona-se sob gotejamento a solução de alginato de sódio em uma solução contendo íons cálcio, que vai formando a partícula ALG-Ca. O revestimento de quitosana pode ser feito por imersão das partículas ALG-Ca em solução de quitosana, também chamado de método indireto, ou pelo método direto, no qual a solução de alginato é gotejada diretamente em uma solução que contém a quitosana e os íons cálcio. Variações desta técnica podem ser feitas, pela formação de uma pré-partícula de quitosana reticulada com anions como tripolifosfato, seguido do revestimento de alginato. Também podem ser produzidas partículas em multicamada, onde após a formação da partícula ALG-Ca-QUI, esta é incubada por um período de tempo em soluções de ALG e QUI. Também tem sido proposta como método alternativo a gelificação externa, na qual se utiliza carbonato de cálcio (pó) disperso em solução de alginato e adiciona-se sob gotejamento em fase oleosa em pH ácido. Nesta etapa, ocorre solubilização do carbonato de cálcio em pH ácido, que se ioniza e reticula o alginato. Após esta etapa, o revestimento de quitosana é feito por imersão em solução desta em meio ácido. A Figura 26 ilustra a formação de pré-partículas de alginato-Ca, de partículas ALG-QUI sem cálcio e de partículas ALG-Ca-QUI.

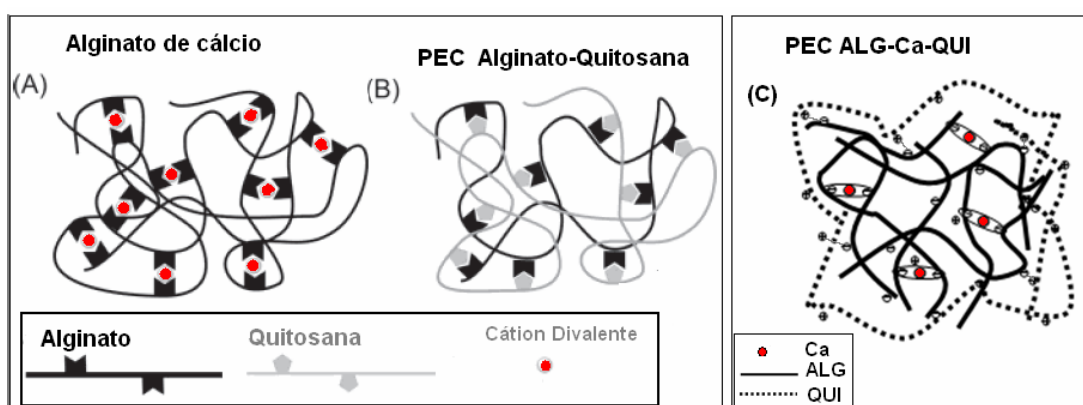


Figura 26: Complexos de alginato: (A) Hidrogel de alginato-Ca; (B) Hidrogel (PEC) de ALG-QUI sem cálcio [23]; (C) Hidrogel (PEC) de ALG-Ca-QUI.

Os sistemas particulados obtidos por co-acervação complexa podem apresentar grande variação nas propriedades finais, conforme o método de

preparação das mesmas. De fato, não só o tamanho, mas as demais propriedades dos hidrogéis, como grau de inchamento, bioadesividade, potencial da superfície das partículas, o grau de encapsulamento e os perfis de liberação de fármacos são determinados pelo grau de interação entre os polímeros, que são afetados por inúmeros fatores que envolvem a formação do complexo. O pH, a temperatura e a força iônica da solução são variáveis que influenciam nas propriedades do complexo, bem como o método de adição dos componentes. As propriedades intrínsecas dos polímeros, como a massa molar, o grau de desacetilação da quitosana e relação de ácidos manurônico e gulurônico no alginato são fatores que também influenciam diretamente na formação do complexo [67]. A seleção adequada dos parâmetros pode levar a formação de hidrogéis com características ótimas para encapsular fármacos e proteínas. A partir do domínio das variáveis da reação de complexação, é possível ter o domínio das interações entre os polímeros e assim modular as propriedades do hidrogel [66]. Muitos trabalhos versando sobre hidrogéis ALG-QUI avaliaram em algum grau a influência dos parâmetros de reação nas propriedades dos hidrogéis particulados. A Tabela 5 sumariza diferentes sistemas de ALG-QUI usados para liberação de diferentes tipos de fármacos, bem como os parâmetros controlados por cada autor, o tamanho médio de partícula e o grau de encapsulamento dos hidrogéis. Observa-se que o reticulador mais usado do sistema ALG-QUI é o cloreto de cálcio, que reage rapidamente na formação de pontos de reticulação iônica com o ALG, e o tamanho de partícula dos hidrogéis é bem variado. As partículas produzidas pelos sistemas 1-3 (Tabela 5) apresentam tamanho inferior a 1 μm , sendo consideradas nanopartículas. Uma das razões para a formação de complexos nanométricos está na concentração das soluções (inferior a 0,05% p/p) usada para a formação do complexo. As adições de agentes que evitam a agregação das partículas ou o uso de sonificadores auxiliam na dispersão do sistema mantendo as partículas com tamanho reduzido. A razão entre a concentração de ALG e o reticulador iônico também contribuem no tamanho das partículas, na medida que uma maior razão ALG/Ca assegura a formação de um hidrogel pouco reticulado, que evita a reticulação intercadeias de géis de alginato. No entanto, é mais comum a formação de partículas micrométricas, (sistema 4-18, Tabela 5), com tamanho superior a 1 μm . Estes sistemas têm em comum a

concentração de alginato, que é maior que 1% p/p, e que quando entra em contato com os íons cálcio em excesso forma uma rede altamente reticulada, a qual após o revestimento com quitosana, podem apresentar até milímetros de diâmetro. De maneira geral, o excesso de íons cálcio em solução pode causar agregação entre os géis de alginato, e com o revestimento de quitosana pode levar a formação de intercomplexos agregados, com diâmetros da ordem de milímetros. [40,195].

Existe uma produção significativa de trabalhos sobre hidrogéis de ALG/QUI, conforme visto nos item 3.3.1 e 3.3.2, nos quais são testados a influencia de alguns parâmetros de reação. Os principais parâmetros estudados na formação de hidrogéis tem sido a composição relativa ALG/QUI, massa molar da QUI e método de adição dos componentes na eficiência do encapsulamento e nos perfis de liberação de diferentes fármacos. No entanto, existem outros parâmetros que podem influenciar nas propriedades das partículas que não têm sido considerados. Em geral, testam-se diversas formulações possíveis e a que apresentar o melhor resultado é escolhida para o fim específico. Desta maneira, faz-se necessário um estudo mais amplo para se ter um melhor domínio do processo de produção dos hidrogéis, onde já se saiba de antemão de que forma os parâmetros de reação irão influenciar nas propriedades dos hidrogéis. Desta forma, para cada fármaco que se deseja realizar liberação controlada, é possível selecionar os parâmetros de reação nos níveis desejados para produzir o hidrogel com propriedades específicas. Para o estudo da influência de diversos fatores nas propriedades de hidrogéis, o planejamento fatorial auxilia na redução do número de variáveis para que os experimentos realizados possam ser peças chaves no entendimento de um processo. Desta forma será possível estudar diversos fatores de interesse em uma única formulação [206, 31].

Uma linha alternativa de estudo tem sido através da síntese de derivados funcionais de polissacarídeos para modificar as propriedades destes polímeros, em geral buscando uma propriedade específica. A quitosana tem sido modificada para aumentar a solubilidade em meio aquoso neutro, a fim de encapsular fármacos em pH próximo da neutralidade, mantendo a atividade biológica do fármaco ou proteína.

Tabela 5: Diferentes sistemas de ALG-QUI usados para liberação de fármacos, contendo os parâmetros controlados por cada autor, o tamanho médio de partícula e o grau de encapsulamento dos hidrogéis e tempo decorrido quando 30% do fármaco é liberado *in vitro* em SGF

Nº	Fármaco encapsulado	Concentração das soluções	Razão da adição dos componentes	Reticulador	Tamanho partícula (µm)	GE (%)	t _{30%} liberação (in vitro- SGF)	Ref.
1	Clotrinazol Econazol	<ul style="list-style-type: none"> •ALG 0,06%-95ml •CaCl₂ 0,2%-0,5 ml •QUI 0,05%- 2 ML 	$\frac{ALG(g)}{CaCl_2(g)} = 5,7$ $\frac{ALG(g)}{QUI} = 5,7$	CaCl ₂	0,24	> 90%	_____	[185]
2	Azul de metileno (modelo)	<ul style="list-style-type: none"> •ALG 0,06% - 10ml •CaCl₂ 0,067% - 2 ml •QUI 0,03% - 2 ml 	$\frac{ALG(g)}{CaCl_2(g)} = 4,5$ $\frac{ALG(g)}{QUI} = 10$	CaCl ₂	0,65	41%	90 min* *Só liberou quando adicionou NaCl	[21]
3	Proteína (ovalbumina)	<ul style="list-style-type: none"> •QUI 0,25%-200 ml •Na₂SO₄ 10% 3,5 ml •ALG 0,5% 	$\frac{QUI \cdot (g)}{SO_4^{-2}(g)} = 1,43$ $\frac{ALG}{Particula} = 2,5$	Na ₂ SO ₄ CaCl ₂	0,95 ± 0,2	60%	80 min	[33]
4	HSA	<ul style="list-style-type: none"> •ALG 1,5% • CaCl₂-3% 	*(poli ácido lactico-dl- polietileno glicol)	CaCl ₂	2,96	64%	4 dias	[142]
5	BSA	<ul style="list-style-type: none"> •QUI 0,1% •PELA * ALG 1%-20ml •CaCl₂ 8%- 8 ml •QUI -1% 		CaCl ₂	31	87-92%	18 h	[83]
6	Hemoglobina	<ul style="list-style-type: none"> •ALG 2% •CaCO₃ 5% •óleo de parafina com Span 1% •QUI 0,3% em excesso 	$\frac{ALG}{Ca} = 4,2$ $\frac{Aq}{Oleo} = 0,43$	CaCO ₃	20 (met. direto)	89%	10 min	[202]
7	S. cerevisae	<ul style="list-style-type: none"> •ALG 1,5%(NaCl 0,9%) • CaCl₂-1,1% •QUI 0,5% 	$\frac{particula}{QUI} = 0,2$	CaCl ₂	250 (mét. Indir.) 200-700	-----	-----	[203]
8	_____	<ul style="list-style-type: none"> •ALG 1,5%(NaCl 0,9%) • CaCl₂-1,1% •QUI 	$\frac{particula}{QUI} = 0,2 e 0,1$	CaCl ₂	650	-----	-----	[28]
9	ampicilina (multicamada)	<ul style="list-style-type: none"> •QUI 2% -20ml •TPP-8% •ALG 0,8% •ALG -0,08% • CaCl₂ -2,0% •QUI -0,08% • TPP -2,0% 	$\frac{QUI}{TPP} = 0,025$ $\frac{ALG(g)}{QUI} = 4$	CaCl ₂ TPP	706	57%	16h	[20]

Nº	Fármaco encapsulado	Concentração das soluções	Razão da adição dos componentes	Reticulador	Tamanho partícula (µm)	GE (%)	t _{30%} liberação (in vitro- SGF)	Ref.
10	indometacina	•QUI 1,5%- 2 ml 0,05% •Genipina	$\frac{ALG(g)}{QUI} = 0,2$	Genipina	800	-----	30 min (pH 6) 160 min (pH 8)	[81]
11	ampicilina	•ALG 0,06%- 10ml •ALG 2% -20ml •CaCl ₂ -3%... •QUI 0,8% (200 ml)	$\frac{ALG(g)}{CaCl_2(g)} = 0,07$ $\frac{ALG(g)}{QUI} = 0,25$	CaCl ₂	885	60%	8 h	[20]
12	Prednilosona	(multicamada) • QUI -0,08% • ALG -0,08% • CaCl ₂ -0,5% •ALG 2%-5ml • CaCl ₂ -0,5% (250 ml) •QUI 1%	$\frac{ALG(g)}{CaCl_2(g)} = 0,08$ $\frac{ALG(g)}{QUI} = 0,04$	CaCl ₂	1000-2000	60- 80%	135 min	[32]
13	Insulina	•Melamina formaldeído – pré-partícula •QUI 0,1% - 1 ml •ALG 0,1% - 1 ml	$\frac{ALG(g)}{QUI} = 1$	-----	2	1,5x10 ⁸ moléculas/partícula	t _{15%} 6 h	[171] [176]
15	Verapamil	•ALG 4%-10ml •CaCl ₂ 1,1%- •QUI -0,1%- 20 ml	$\frac{ALG(g)}{CaCl_2(g)} = 1,82$ $\frac{ALG(g)}{QUI} = 20$	CaCl ₂	1700	88%	60 min	[175]
16	Insulina e BSA	•ALG 2,5%- 1ml • CaCl ₂ -0,2M (20 ml) • QUI 0,5%	$\frac{ALG(g)}{CaCl_2(g)} = 0,045$ $\frac{ALG(g)}{QUI} = 0,25$	CaCl ₂	1000-2000	93%	15 min (ALG-QUI)	[29]
17	Insulina e BSA	•ALG 2,0%- (1ml) • KGM 0,5% - • CaCl ₂ -0,2M • QUI 0,5%	$\frac{ALG(g)}{CaCl_2(g)} = 4,5$ $\frac{ALG(g)}{QUI} = 0,2$	CaCl ₂	1000-2000	96%	37 min (ALG-QUI-KGM)	[29]
18	Dextrana Azul (modelo)	•ALG 2%-5ml • NaCl-200 mM •QUI 0,15% • CaCl ₂ -50 mM	-----	CaCl ₂	1500	-----		[172]

3.4 Modificações na estrutura química da quitosana e alginato

A modificação química da quitosana e do alginato tem sido reportada em alguns trabalhos [25,27,188] de forma a permitir a modulação da capacidade de complexação dos seus componentes, tornando-os mais adequados como matrizes para liberação de vários fármacos, ampliando o seu escopo de aplicação.

Uma das primeiras modificações realizadas foi através da depolimerização do alginato, onde a diminuição do tamanho das cadeias poliméricas poderia aumentar a taxa de degradação deste no organismo, tornando a molécula mais susceptível a hidrólise [25,27]. Os resultados mostraram que a oxidação parcial e a depolimerização aumentaram as taxas de degradação, de forma que estas podem ser ajustadas de acordo com a necessidade de aplicação final. Derivados de alginato produzidos através da ligação química covalente com grupos alquil foram propostos para formar hidrogéis com boas propriedades de encapsulamento de proteínas [188].

A desacetilação e a depolimerização da quitosana [188] também tem sido proposta, onde a reatividade da quitosana aumenta com a depolimerização devido ao aumento dos grupos iônicos disponíveis para um mesmo grau de desacetilação. A Figura 27 ilustra o efeito da massa molar na reatividade da quitosana depolimerizada, e os perfis de liberação de partículas ALG-ca.

Derivados sulfanil-amidados de quitosana foram preparados com a finalidade de obter hidrogéis com atividade antifúngica [190]. Mais recentemente, a modificação da quitosana através da reação dos grupos amino com ácido alfa-cetoglutárico e hidrocloreto de hidroxilamina produziu derivados com maior poder de complexação e melhor adsorção de íons metálicos [191].

De maneira geral, uma das maiores restrições quanto ao uso de quitosana para liberação controlada de fármacos e proteínas está no pH do meio no qual a quitosana deve estar dissolvida, que pode causar perda da atividade do fármaco.

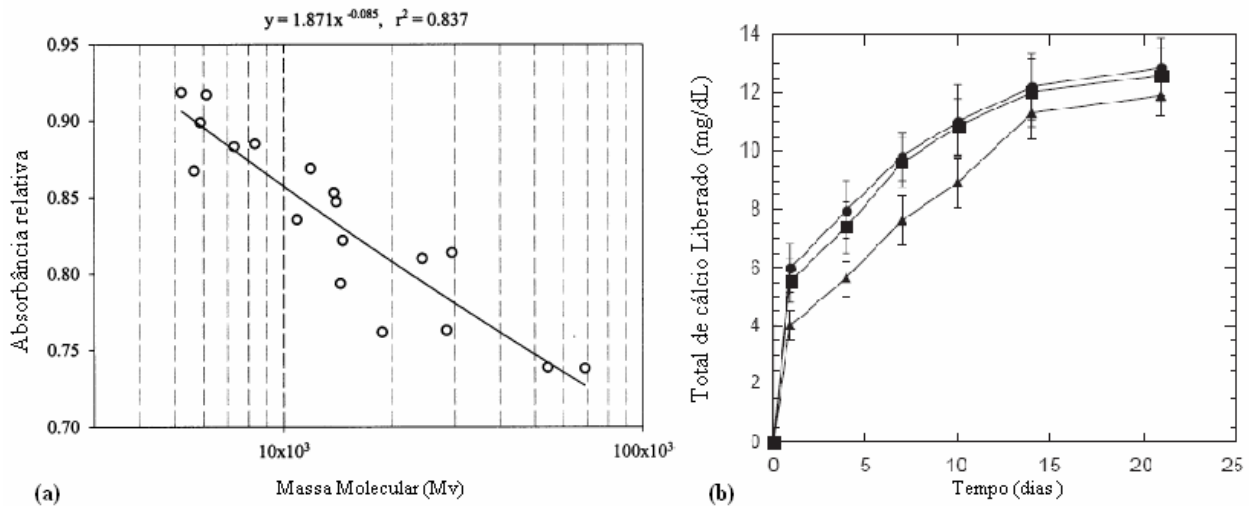


Figura 27: Efeito da massa molar da quitosana depolimerizada na reatividade [188] (a); perfis de liberação de partículas de ALG-Ca com alginato parcialmente oxidado (● e ■), e não oxidado (▲) [27] (b).

A sulfonação da quitosana foi proposta [192] com o objetivo de produzir derivados solúveis em água. Fatores como o pH quanto à força iônica tiveram um efeito na solubilidade dos derivados, mas todos as quitosanas sulfonadas apresentaram-se solúveis em meio neutro e formaram complexos com polímeros naturais como xantana, heparina e carboximetilcelulose, podendo ser úteis para algumas aplicações específicas. Outra proposta de modificação da quitosana para aumentar a solubilidade em meio aquoso neutro e alcalino foi pela reação desta com solução saturada de carbonato de amônio, formando um complexo a temperatura ambiente entre os grupos amino da quitosana e o carbonato de amônio ($\text{QUI-NHCO}_2^- \text{NH}_4^+$), denominado carbamato de quitosana [193]. A mistura deste produto em meio alcalino com vários tipos de polissacarídeos, como alginato, ácido poligalacturônico, carboximetil-celulose, xantana e ácido hialurônico entre outros foram estudados por muzzarelli [162], com intenção de produzir hidrogéis pela técnica de spray drying. Sugimoto [194] modificou a quitosana misturando-a com PEG-aldeído, produzindo alguns derivados solúveis em água, onde a solubilidade foi dependente do grau de substituição de PEG-aldeído, grau de acetilação e massa molar do PEG. A modificação química da quitina e da quitosana para fins biomédicos foi revisada por Sashiwa, com ênfase no papel individual dos grupos funcionais inseridos nas aplicações finais dos polímeros [34].

Atualmente, tem-se proposto a modificação da quitosana através da substituição dos grupos funcionais hidroxilados da molécula por radicais que possam apresentar um aumento da solubilidade em meio neutro [34-39]. A Carboxi-metil-quitosana (CMQUI) é um dos derivados da quitosana mais importantes, devido à presença de grupos carboximéticos em alguns grupos amino e nas hidroxilas primárias das unidades glucosaminas da sua estrutura. A presença de cargas positivas e negativas na molécula faz com que a CMQUI apresente características especiais e novas propriedades.

A Figura 28 mostra a estrutura química da quitosana e o seu derivativo funcional carboximetilado. Muitos estudos relacionados com a síntese, caracterização e avaliação de propriedades foram conduzidos [38-40,189]. O comportamento de agregação da CMQUI em solução diluída [195] e com adição de sais [196] foi estudado por Zhu e colaboradores, mostrando que CMQUI forma agregados em pH neutro e os complexos assumem tamanho diferente segundo a concentração de CaCl_2 . Complexos intra-agregados são formados quando o teor de CaCl_2 é (126 μM), e os complexos são compactos, pequenos e esféricos. No entanto, aumentando-se o teor de Ca os agregados são grandes, compactos e esféricos, devido à formação de complexos interagregados. A Figura 29 ilustra o mecanismo de formação dos complexos agregados a partir da CMQUI em solução aquosa.

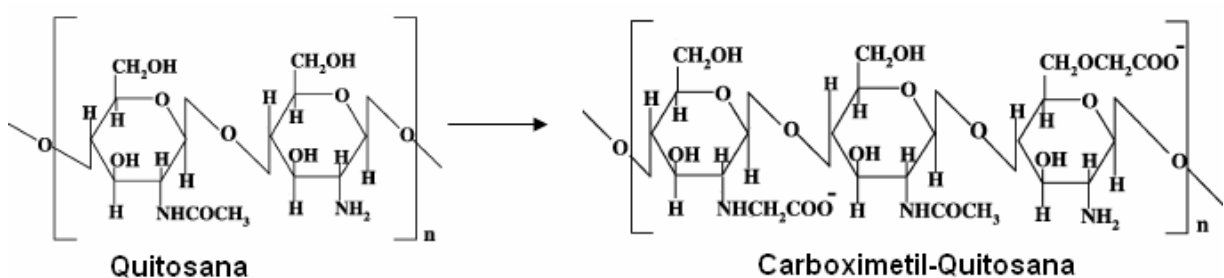


Figura 28: Estrutura química da quitosana e da carboximetil-quitosana [28].

Hidrogéis de CMQUI reticulado com cálcio [40], com glutaraldeído [191] e genipina [41] foram produzidos para liberação de fármacos e proteínas. Entretanto, poucos estudos investigaram a influência da modificação química na interação com outras moléculas ou polímeros. Miranda [197] e colaboradores estudaram o efeito da N-carboximetilação nas propriedades térmicas e dinâmico-mecânicas de filmes,

onde a CMQUI apresentou maior estabilidade térmica, suportou maior tensão e mostrou menor elasticidade do que a QUI. Colo [198] colaboradores estudou o efeito do tipo de quitosana (hidroclorato e carboximetilada), em formulações oftálmicas para liberação de ofloxacina.

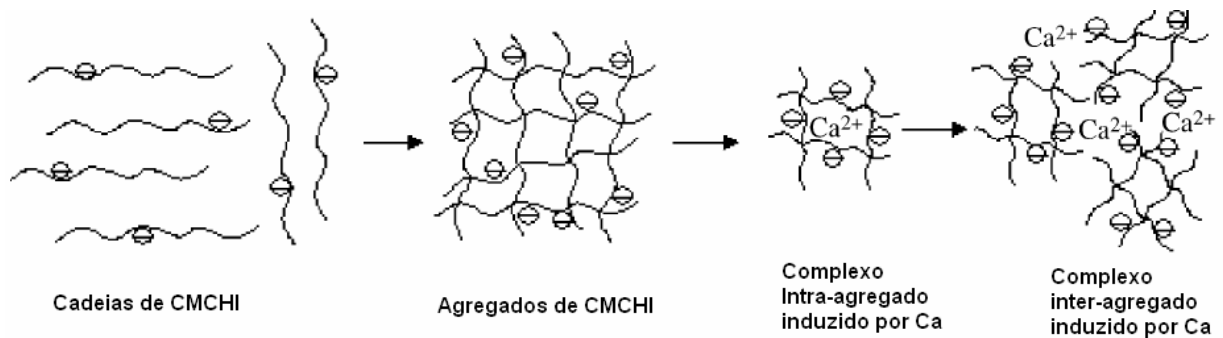


Figura 29: Mecanismo de formação de complexos agregados de CMQUI em meio aquoso [196].

Mais recentemente, redes de carboxi-metil-quitosana (CMQUI) [40,41] mostraram-se aplicáveis para entrega controlada de medicamentos no trato intestinal e gástrico. Lin [40] preparou um complexo IPN formado por interações entre CMQUI e alginato foi proposto para liberação via oral de proteínas, onde o hidrogel apresentou grau de inchamento dependente da composição. As redes produzidas com ALG:CMQUI 1:1 apresentaram melhores características de inchamento e de sensibilidade à variação no pH. Aumentando a concentração total das soluções de ALG e CMQUI houve um aumento na densidade de reticulação, aumentando a porcentagem de fármaco retida no interior das redes (mais de 77%) e diminuindo a taxa de liberação de proteínas. Chen [41] desenvolveu redes de CMQUI com Alginato, e usou Genipina como reticulador covalente do CMQUI, formando s-IPNS. Em ambos os trabalhos, a liberação em meio ácido foi limitada devido à formação de ligações de hidrogênio entre CMQUI-ALG. Em pH 7,4, os grupos iônicos carboxílicos se tornam ionizados e a repulsão entre os grupos causa a expansão progressiva da rede, causando a liberação do fármaco. A Figura 30 mostra esquematicamente o comportamento do hidrogel ALG-CMQUI reticulado com íons cálcio em diferentes pHs e a Figura 31 mostra os perfis de liberação de BSA para os hidrogéis ALG-CMQUI reticulados com íons cálcio e com genipina.

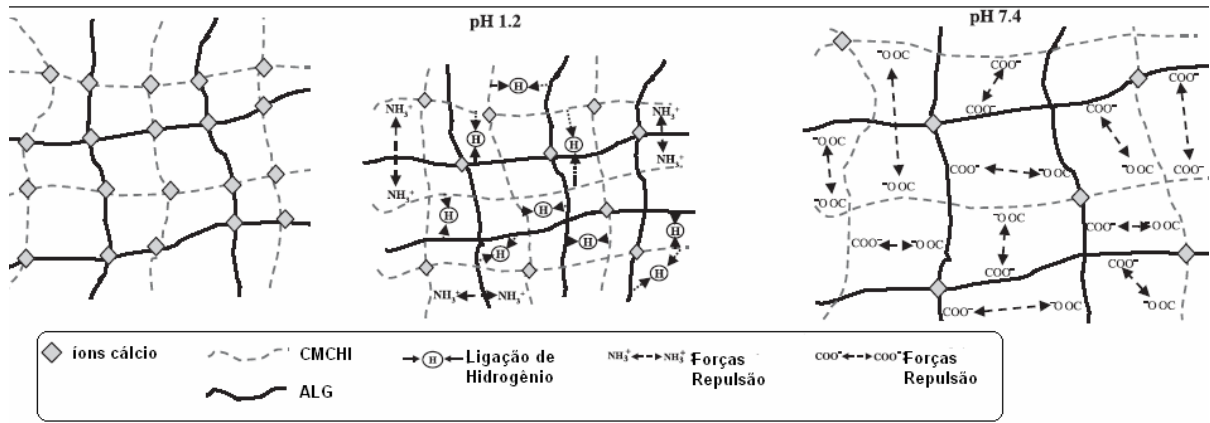


Figura 30: Ilustração esquemática das estruturas de ALG-CMQUI reticulados com íons cálcio, e o simulação do comportamento do hidrogel em pH 1,2 e 7,4 [40].

Pode-se observar que nos perfis de liberação cumulativos, o tempo decorrido onde ocorre liberação de 50% do fármaco é bastante semelhante para ambos os sistemas, apresentando taxas de liberação bastante eficiente para liberação de proteínas. Os dois sistemas estudados são adequados para encapsulamento e liberação de proteínas, mantendo a bioatividade destas, uma vez que as condições de reação são brandas e ocorrem em meio aquoso neutro.

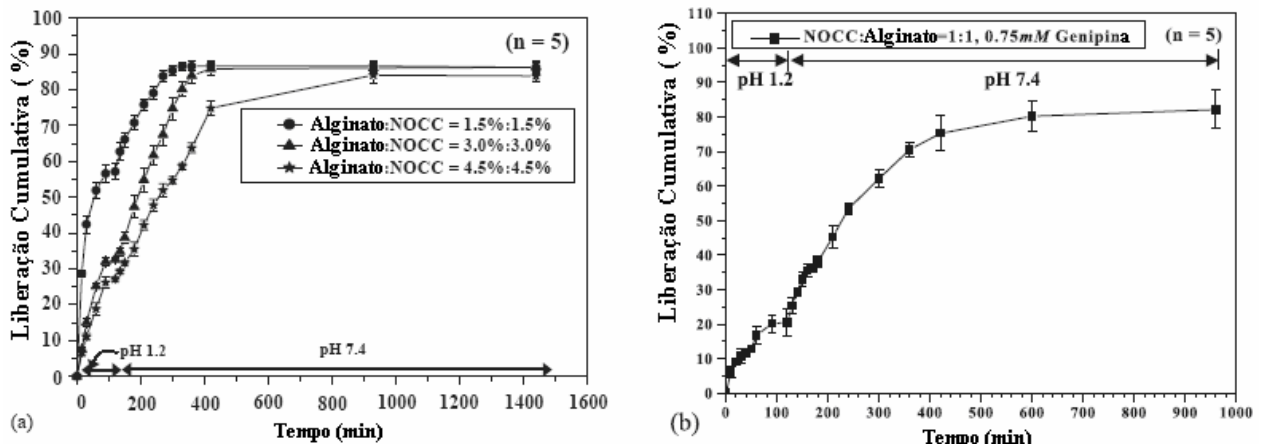


Figura 31: Perfis de liberação de BSA para os hidrogéis ALG-carboximetil quitosana (NOCC) reticulados com (a) íons cálcio [40] e (b) com genipina [41].

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Matérias Primas*

Os polímeros escolhidos para síntese dos hidrogéis foram alginato de sódio e dois tipos de quitosana, uma de baixa massa molar e outra de média massa molar. As quitosanas são amostras comerciais obtidas da Aldrich com grau de desacetilação médio entre 75% e 85%. O Alginato de sódio é um copolímero formado por unidades de ácido Gulurônico (G) e Manurônico (M) com razão G/M (35/65) com baixa viscosidade (~250 cP em 2% (25 °C) em H₂O), adquirido da Sigma. Os polímeros poliálcool vinílico (PVA) (Vetec, 100.000,00 g/mol, grau de hidrólise de 88%,) e polivinilpirrolidona (PVP), (Sigma, massa molar 10.000 g/mol) foram usados como emulsificantes. Os produtos cloreto de cálcio dihidratado (P.A, Synth) e genipina (Genipa americana L. Jenipapo) com 98% de grau de pureza (Challenge Bioproducts, Taiwan) foram usados como agentes de reticulação dos hidrogéis. Os compostos Fluoresceína sódica (P. A., Synth), aspartato-fenilalanina (ASP-PHE, 96% de pureza, Aldrich), Tirosina-fenilalanina (TYR-PHE, 96% de pureza, Aldrich), Lisinopril (Sigma, 99% de pureza) e isotiocianato de fluoresceína (FTIC), (P.A, Sigma) foram usados para encapsulamento dos hidrogéis. Todos os reagentes obtidos foram utilizados conforme recebidos, sem qualquer tipo de purificação prévia.

4.2 *Modificação da quitosana - Síntese da carboximetilquitosana (CMQUI)*

A carboximetilquitosana (CMQUI) foi sintetizada de forma análoga à reportada na literatura [42], pela reação da quitosana e do ácido cloroacético em álcool isopropílico em ambiente alcalino (solução concentrada de KOH). A quitosana em pó (10 g) foi suspensa em 200 ml de álcool isopropílico e agitada em um frasco de 500ml a temperatura ambiente. A mistura foi adicionada gradualmente a 25 ml de solução aquosa 10M de NaOH, durante um período de 30 min e agitada por 30 minutos adicionais. Posteriormente, ácido mono-cloroacético (60g) foi adicionado

gradualmente por um período de 10 min. A mistura reacional foi então aquecida a 50°C sob agitação por 4h. Depois disso, a mistura reacional foi filtrada e o produto (CMQUI) foi lavado com metanol e então seco em um forno a 60°C. As amostras de quitosana de origem e o respectivo produto após a reação constam na Figura 32.



Figura 32: Amostras de Quitosana (à esquerda) e Carboximetilquitosana em pó.

4.3 Caracterização dos polímeros

4.3.1 Viscosimetria

A viscosidade específica dos polímeros foi determinada segundo a Eq. 1 através de um viscosímetro Cannon-Feske, usando soluções poliméricas de várias concentrações em um banho termostático a $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$. A viscosidade específica reduzida dos polímeros foi determinada segundo a Eq. 2 utilizando-se a viscosidade específica em solução 0,2M de cloreto de sódio e 0,1 M de ácido acético.

$$\eta_{esp} = \left(\frac{t - t_o}{t_o} \right) \quad (1)$$

$$\eta_{esp_{red}} = \left(\frac{\eta_{esp}}{c} \right) \quad (2)$$

Onde: η_{esp} = viscosidade específica, t= tempo de escoamento da solução no viscosímetro; t_o = tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro, c= concentração em gramas de polímero em 100ml de solução e $\eta_{esp_{red}}$ = viscosidade específica reduzida.

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é obtida através do limite da viscosidade específica reduzida quando a concentração da solução tende a zero, conforme definido pela Eq. 3., determinada graficamente através da extrapolação da reta em concentração igual a zero. A determinação da massa molar viscosimétrica dos polímeros foi estimada através da relação entre a viscosidade intrínseca de uma solução polimérica com a massa molar viscosimétrica média, através da equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada, indicada na Eq. 4:

$$\eta_{\text{intrínseca}} = [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{\text{especifica}}) \quad (3)$$

$$[\eta] = k (\overline{M}_v)^\alpha \quad (4)$$

Onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca do polímero [dl/g], α e k são constantes que são dependentes das interações entre o polímero e um solvente específico para uma dada solução.

Determinou-se a massa molar viscosimétrica das amostras de quitosana a 25°C em 0,1M CH₃COOH, usando $\alpha=0,93$ e $k=0,00181$ conhecidos da literatura [5]. A massa molar viscosimétrica do alginato de sódio foi determinado a 25°C em 0,1M NaCl, usando $\alpha=0,963$ e $k= 0,000123$ conhecidos da literatura [199].

4.3.2 Solubilidade

A solubilidade da QUI e da CMQUI foi avaliada em função do pH através de transmitância, no comprimento de onda de 600 nm em um espectrofotômetro (Beckman Co. USA) usando uma cubeta de vidro com um caminho ótico de 1 cm. As soluções foram preparadas dissolvendo-se 0,2 mg de CMQUI e QUI em 1 ml de solução tampão acético de pH 4,0, 6,8, e 7,4.

4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho - FTIR

Os polímeros e os hidrogéis foram analisados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier em um espectrômetro Spectrum 1000 (Perkin Elmer), usando discos de KBr. As duas amostras de quitosana tiveram o grau de desacetilação (DA) determinado através do método desenvolvido por

Brugnerotto e colaboradores [152] através da razão entre a área das bandas 1320 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} , atribuídas respectivamente aos grupamentos N-acetilglucosamina e glucosamina. Este método compara diretamente a razão entre a forma acetilada e a forma desacetilada da quitosana, podendo-se obter com maior precisão o grau de acetilação ($r = 0,99$), conforme a Eq. 5 :

$$DA = 31.92 \left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 12.2 \quad (5)$$

Onde: A_{1320} e A_{1420} significam área de absorção da banda da quitosana a 1320cm^{-1} e 1420 cm^{-1} , respectivamente.

A modificação estrutural da quitosana para sua forma carboximetilada também foi avaliada por FTIR para confirmar a síntese da CMQUI bem como estimar o grau de substituição da reação de carboximetilação.

4.3.4 Calorimetria Diferencial de Varredura - DSC

A quitosana e a carboximetilquitosana foram caracterizadas em um calorímetro da TA *Instruments*, DSC modelo 2910, em atmosfera de nitrogênio. Aproximadamente 5mg das amostras foram aquecidas até 200°C , usando-se uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.3.5 Análise termogravimétrica - TGA

A quitosana e a carboximetilquitosana e seus hidrogéis com ALG foram avaliados quanto a sua estabilidade térmica em um analisador termogravimétrico TGA 2050 da TA *Instruments*, no intervalo de temperatura de 25°C a 1000°C sob atmosfera de nitrogênio, usando uma taxa de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

4.3.6 Titulação Potenciométrica

A titulação potenciométrica foi construída para a quitosana e a carboximetilquitosana em um pHmetro (metroterm) de forma análoga ao descrito na literatura [198,200] dissolvendo-se 0,4 g de amostra em 100 ml de água destilada e acidificando a solução com ácido clorídrico 0.1M até atingir pH igual a 2. Posteriormente, titulou-se a amostra com 0,1 M de KOH e registrou-se o incremento de volume adicionado de KOH em função da variação de pH obtida. O grau de

substituição de carboxilas na quitosana modificada foi determinado através da Eq. 6, conforme descrito por Ge e Luo [200].

$$GS = \frac{161 \times (V_{KOH} \times c_{KOH})}{m_{CMQUI} - 58 \times (V_{KOH} \times c_{KOH})} \quad (6)$$

Onde: V_{KOH} e c_{KOH} são o volume e a molaridade da solução aquosa de KOH, m_{CMQUI} é a massa de carboximetilquitosana (g), e 161 e 58 são respectivamente a massa molar da unidade repetitiva de quitosana e dos grupos carboximéticos.

4.4 Preparação dos hidrogéis em meio aquoso

A preparação dos hidrogéis na forma de microesferas foi realizada pelo método de co-acervação complexa, que envolve a formação de um complexo insolúvel em água, formado por dois componentes originalmente solúveis em água. Nesta tese, usou-se o ALG como núcleo do hidrogel. Para a formação do complexo em micropartículas, são preparadas soluções aquosas dos polímeros alginato de sódio e quitosana e de cloreto de cálcio. A formação dos hidrogéis em meio aquoso é realizada pela adição de soluções aquosas dos componentes com o auxílio de uma bomba dosadora a uma vazão de 2ml/min. O sistema de reação montado para execução das reações consta na Figura 33.

Avaliou-se, primeiramente, dentre os diversos parâmetros, quais destes seriam usados em níveis fixos e quais seriam escolhidos como variáveis independentes. Estudou-se a influência da quantidade relativa dos polímeros estudados, o teor de cálcio, a velocidade de agitação, o pH do meio reacional e a massa molar da quitosana. A partir dos métodos descritos na literatura, escolheram-se dois métodos de reação para o desenvolvimento deste trabalho, o método de reação indireta, adaptado do trabalho de De e Robinson [21] e o método de reação direta, modificado do descrito por Wang e He [29]. Padronizou-se em ambos os métodos o tempo de agitação.



Figura 33: Sistema de reação de formação dos hidrogéis em meio aquoso: 1 – reservatório da solução de alginato e ou quitosana . 2 – bomba peristáltica que transfere a solução até o béquer; 3- béquer contendo solução de cálcio e 4- placa de agitação magnética.

4.4.1 Preparação das soluções

Solução de alginato de sódio: adicionou-se 2g de alginato de sódio em 100ml de água destilada, sob agitação magnética por aproximadamente 4 horas, formando uma solução 2% p/p. Posteriormente foi realizada uma diluição em balão volumétrico e se obteve 200 ml de uma solução de alginato de sódio 0,2% p/p.

Solução de quitosana: adicionou-se 2g de quitosana de baixa massa molar em 100ml de solução de ácido acético 2% v/v, formando uma solução 2% p/p. Manteve-se o sistema sob agitação magnética na temperatura de 60°C por aproximadamente duas horas para garantir a solubilização. Posteriormente, foi realizada uma diluição em balão volumétrico e se obteve 100ml de solução de quitosana de baixa viscosidade 0,2% p/p. Repetiu-se o mesmo procedimento para obtenção da solução 0,2%p/p de quitosana de média massa molar.

Solução de carboximetilquitosana: adicionou-se 1g de CMQUI em 100ml de água, formando uma solução 1% p/p. Manteve-se o sistema sob agitação magnética na temperatura de 60°C por aproximadamente duas horas para garantir a solubilização. Posteriormente, foi realizada uma diluição em balão volumétrico para obtenção da solução 0,2%p/p de CMQUI.

Solução tampão em pH 6,8 (meio intestinal): Dissolveu-se 6,805 g KH_2PO_4 em aproximadamente 300 ml de água. Em outro frasco, dissolveu-se 0,896 g de NaOH e completou-se o volume em balão volumétrico de 500ml. As duas soluções foram então misturadas e completou-se o volume em balão volumétrico de 1000ml para formação do tampão salino de fosfato de pH 6,8.

Solução tampão em pH 7,4 (meio intestinal -colônico) : Dissolveu-se 6,805 g KH_2PO_4 em aproximadamente 250 ml de água. Em outro frasco, dissolveu-se 1,564 g de NaOH em 195,5 ml de água destilada. As duas soluções foram então misturadas e completou-se o volume em balão volumétrico de 1000ml para formação do tampão salino de fosfato de pH 7,4.

Solução tampão em pH 1,2 (Meio gástrico simulado): Adicionou-se 7,083 ml de HCl 12M (37%) e 417,92 ml de água destilada, resultando em 425 ml de HCl 0,2M. Em outro frasco, adicionou-se 3,7275g de KCl em 250 ml em água destilada, formando uma solução 0,05M de KCl. As duas soluções de HCl 0,2M e de KCl 0,05M foram adicionadas em balão volumétrico e completadas até 1000ml.

Também foram preparadas soluções aquosas de 200 mM e 600 mM de cloreto de cálcio e soluções de 2 mM de Fluoresceína sódica, e de lisinopril.

4.4.2 Produção dos hidrogéis em micropartículas

Os hidrogéis foram produzidos por dois métodos: o método de reação direta e o método de reação indireta, descritos a seguir:

4.4.2.1 Método de reação indireta:

Adicionou-se de forma controlada um volume definido da solução 0,2% p/p de alginato de sódio usando uma bomba peristáltica sob fluxo de 1 ml/min com uma agulha de diâmetro 27G em uma solução 200 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2). A solução foi mantida sob agitação magnética a 80 rpm por 20 minutos para formação de um pré-gel. Decorrido esse tempo, adicionou-se gota-a-gota com o auxílio da bomba peristáltica um volume definido da solução de quitosana. Após o termino da adição, a solução final foi deixada sob agitação por 30 minutos.

4.4.2.2 Método de reação direta:

Adicionou-se de forma controlada um volume definido da solução 0,2% p/p de alginato de sódio com o auxílio de uma bomba peristáltica sob fluxo de 1 ml/min usando uma agulha de diâmetro 27G. Esta solução foi gotejada diretamente em um béquer sob agitação magnética a 80rpm contendo uma quantidade pré-determinada das soluções de 200 mM de CaCl_2 e 0,2% p/p de quitosana. Após o término da adição, deixou-se sob agitação por 20 minutos. A solução final foi mantida sob agitação magnética por 20 minutos.

4.4.2.3 Preparação de micropartículas com fármaco

As micropartículas foram preparadas de forma análoga aos itens 4.4.2.1 e 4.4.2.2, com o adicional de presença do fármaco em solução aquosa durante a formação dos hidrogéis. Foram testados a fluoresceína, os peptídeos Arg-Phe e Tyr-Phe e lisinopril como fármaco. A quantidade de fármaco adicionada foi calculada para que a concentração final do meio reacional fosse 5 μM para fluoresceína, 50 mM para Arg-Phe, 16 mM de Tyr-Phe e 40 mM de lisinopril, cada qual calculado segundo seus limites de solubilidade, para fins de determinação do grau de encapsulamento por UV. Para isolar as microesferas com medicamento, centrifugou-se o meio reacional por 40 min a 3500 rpm. Coletou-se o centrifugado em frascos de vidro escuros e estes foram armazenados sob refrigeração. O precipitado foi lavado com água destilada por meio de filtração a vácuo utilizando-se de membranas descartáveis de 0,45 μm de porosidade. Na Figura 34, consta uma representação esquemática deste processo.

4.4.3 Lavagem e conservação das microesferas

Após o término da reação, o meio reacional contendo o complexo foi transferido para tubos Falcon de 50 ml e as microesferas foram isoladas do meio reacional em uma centrífuga Western, modelo H102-RS, utilizando-se a rotação de 3500 rpm por 30 minutos. Após o descarte do centrifugado (meio reacional), para lavagem das microesferas adicionou-se 5 ml de água destilada, e centrifugou-se novamente. Descartou-se a água de lavagem e repetiu-se a operação de lavagem. Ao término da lavagem, completou-se o volume para 1 ml, conservando as microesferas em meio aquoso sob refrigeração. Alternativamente, as microesferas foram liofilizadas após o descarte da água de lavagem e conservadas a temperatura

ambiente para avaliação de grau de inchamento, tamanho de partícula e grau de encapsulamento.

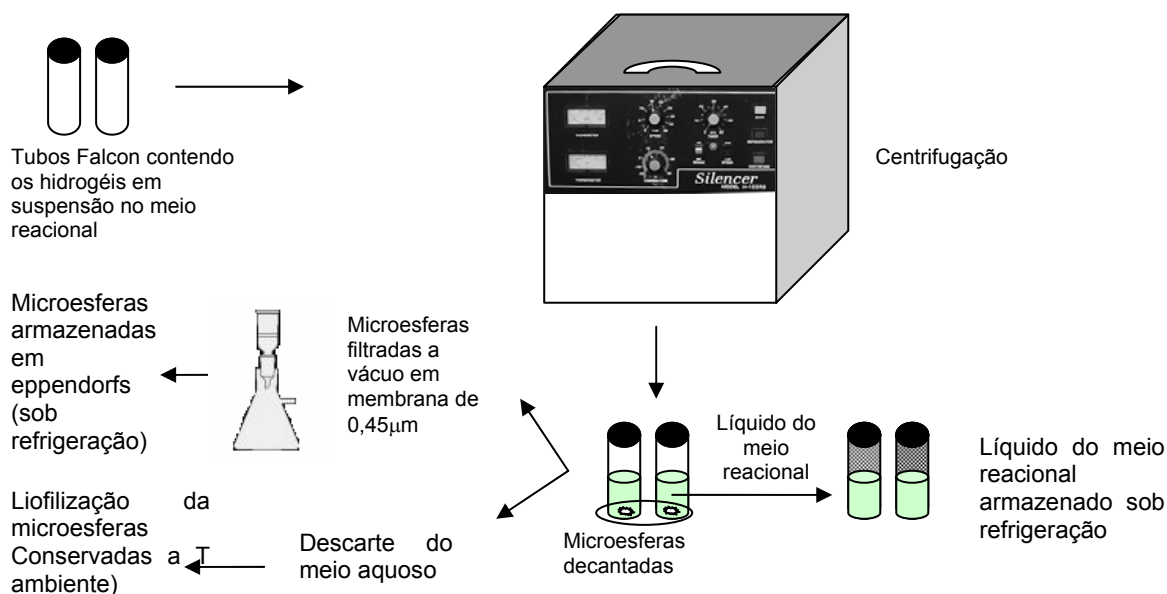


Figura 34: Representação esquemática do processo de isolamento das microesferas carregadas com fármaco do meio reacional.

4.5 Preparação dos hidrogéis em emulsão água-em-óleo

Preparou-se hidrogéis de ALG-QUI fazendo a reação de complexação polieletrólítica em emulsão água-em-óleo, usando poliálcool vinílico (PVA) ou polivinil pirrolidona (PVP) como emulsificante. Através deste método, as soluções aquosas de ALG e QUI descritas no item 4.4.1, foram adicionadas separadamente em quantidades 35%ALG/65%QUI em tubos falcon 15ml. Adicionaram-se íons cálcio ou genipina em um dos tubos. Posteriormente, adicionou-se PVA ou PVP na quantidade de 1,5% p/v em relação ao volume total de solução de cada tubo. Colocou-se no banho ultrassônico por 20 min para solubilizar o emulsificante. Após esta etapa, a solução de ALG foi adicionada em um tubo Falcon contendo um volume de óleo 6x maior do que o volume total aquoso. Colocou-se em um sonicador por 1 min para homogeneizar a mistura. Posteriormente, adicionou-se a solução de quitosana e sonicou-se novamente por mais 3 vezes de 1 min, homogeneizando a mistura.

O tubo com a mistura solução aquosa/óleo mineral foi colocado no banho ultrassônico por mais 16 minutos, tendo após este período centrifugado 3 vezes de 20 min a 3500 rpm para a separação das fases. A fase aquosa foi retirada do meio com auxílio de uma micropipeta. Seguiu-se com mais 2 centrifugações para retirar reminiscências de óleo mineral e liofilizou-se os hidrogéis, obtendo a amostra final em pó. A Figura 35 esquematiza o processo de obtenção dos hidrogéis por meio de emulsão em óleo.

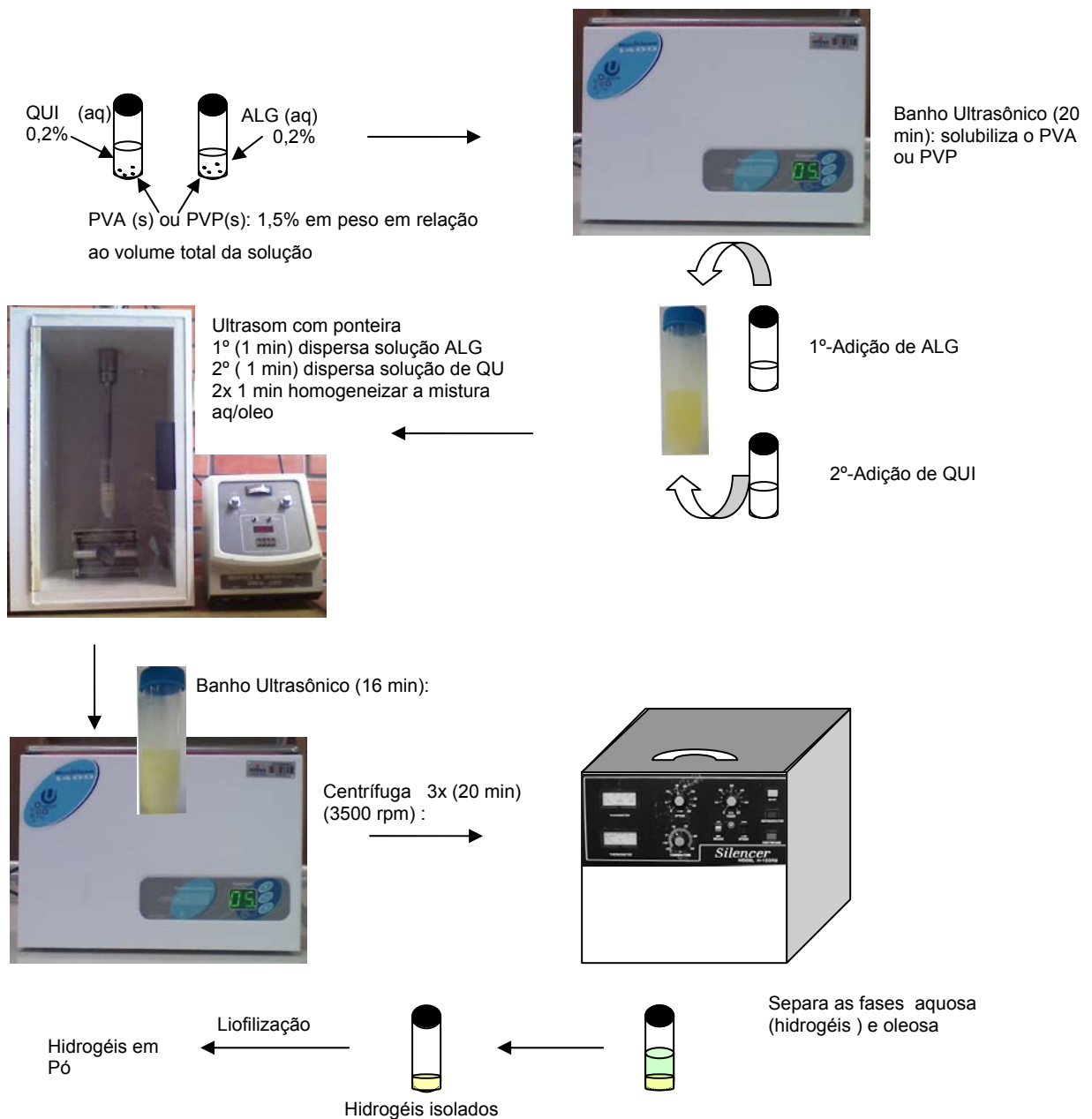


Figura 35: Representação esquemática do processo de obtenção dos hidrogéis por meio de emulsão em óleo.

4.6 Caracterização dos hidrogéis

Os hidrogéis sintetizados foram caracterizados quanto a sua morfologia e grau de inchamento por microscopia ótica (MO), quanto à carga potencial da superfície por potencial zeta, quanto à taxa de degradação por TGA, e quanto ao encapsulamento e distribuição de fármaco usando microscopia ótica com fluorescência. Hidrogéis carregados com fluoresceína tiveram os perfis de liberação avaliados com o auxílio de espectrofotômetro de absorção UV-Visível. Também se avaliou a morfologia de alguns hidrogéis por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4.6.1 Rendimento

Foi determinado o rendimento dos hidrogéis através relação entre a massa do hidrogel seco com a massa total adicionada no sistema de reação. A massa de hidrogel seca foi obtida através de uma série de etapas: primeiramente, os hidrogéis foram isolados da solução por centrifugação a 3500 rpm por 40 minutos. O precipitado foi então lavado repetidas vezes e colocado em frascos previamente pesados, sendo levados a uma estufa a 50°C até a secura, sendo posteriormente pesados em uma balança analítica.

4.6.2 Microscopia Ótica (MO)

A análise por microscopia ótica foi realizada amplamente ao longo deste trabalho, devido à importância da caracterização de hidrogéis com morfologia controlada. Inicialmente avaliou-se a regularidade da morfologia dos hidrogéis, em um microscópio ótico invertido Carl Zeiss com uma lente de magnificação 10/025mm, onde se acoplou uma câmera digital Vivicam 3695 2,2 megapixel na lente. As fotos obtidas foram todas calibradas com uma régua externa denominada câmera de Neubauer, que apresenta raias quadriculadas de 40 μ m x 40 μ m, para determinação do tamanho médio de partícula e do grau de inchamento dos hidrogéis. Posteriormente, avaliou-se o tamanho dos hidrogéis secos e hidratados em um microscópio ótico invertido (Carl Zeiss, Axiovert 200), acoplado com câmera para melhor caracterizar a regularidade da morfologia e o tamanho médio de partícula.

4.6.2.1 Determinação do tamanho médio de partícula

Aproximadamente 100µl das microesferas em suspensão aquosa foram adicionadas em uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula, posteriormente observadas em microscópio óptico invertido, acoplado com câmera de vídeo para captura de imagem. O software Axiovision AC Release 4.5 foi usado para obtenção das fotos e para avaliação da morfologia e o tamanho médio de partícula de um mínimo de 50 partículas.

4.6.2.2 Determinação do grau de inchamento

A determinação de grau de inchamento foi realizada através da diferença de diâmetro que as partículas apresentaram em suspensão aquosa e após secagem, em uma adaptação do sistema desenvolvido por Liu e colaboradores [28]. Desta forma, 100ul da suspensão aquosa contendo os hidrogéis foram secos em estufa por 2 horas a 45°C. Após a secagem, as lâminas de vidro foram novamente analisadas no microscópio e foram tiradas aproximadamente 8 fotos de cada amostra. Com o auxílio do programa analisador de imagens Axiovision AC Release 4.5, determinou-se o diâmetro médio de no mínimo 50 partículas. A diferença entre o diâmetro obtido dos hidrogéis em suspensão aquosa em diferentes períodos e diferente pH e o obtido após secagem foi denominado grau de inchamento, utilizando-se da Eq. 7:

$$\%GI = 100 \left[\left(\frac{\overline{d}_{hyd}}{\overline{d}_{sec o}} \right)^3 - 1 \right] \quad (7)$$

onde: GI= grau de inchamento; \overline{d}_{hyd} = diâmetro médio das partículas em suspensão aquosa e $\overline{d}_{sec o}$ = diâmetro médio das partículas após secagem

4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos hidrogéis secos também foi avaliada em um microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM 5800, utilizando-se de uma voltagem de aceleração de 5kv. 100µl das microesferas em suspensão aquosa foram adicionadas em um suporte de alumínio e levadas em estufa a vácuo para retirada de umidade. Após a secagem, a superfície foi metalizada com ouro em um

metalizador marca BAL-TEC SCD 050. O tamanho médio de partícula hidrogéis foi determinado utilizando-se o software analisador de imagens Image Tool.

4.6.4 Potencial zeta

O potencial da superfície das micropartículas em função do pH e a determinação do ponto isoelétrico dos hidrogéis foram determinados através da análise de potencial zeta (ZetaMeter, USA).

4.7 Caracterização dos Fármacos

O grau de encapsulamento dos fármacos e o perfil prévio de liberação foram avaliados através da medida da absorção do meio reacional em um espectrofotômetro de Absorção UV-Visível. Foram usados os fármacos modelo fluoresceína, que absorve em 489 nm, e os peptídeos ASP-PHE e TYR-PHE que absorvem respectivamente em 223 nm e 275 nm. Uma vez que o fármaco lisinopril não absorve em UV-visível, realizou-se uma reação de complexação com isotiocianato de fluoresceína (FTIC). Prepararam-se soluções de isotiocianato e fluoresceína 2,95 μM e de lisinopril 2,95 μM , adicionou-se 4 ml de cada solução em balão volumétrico 10 ml e 50 μl de solução de NaOH 0,1M e completou-se o volume com água destilada. Agitou-se no banho ultra-sônico por 20 min, e a mistura permaneceu em repouso por 24h antes do uso. Assumiu-se que a reação ocorre na razão estequiométrica molar 1:1, obtendo-se o complexo lisinopril-FITC na concentração de 2,36 μM . Este complexo absorve em 499 nm. A determinação dos comprimentos de onda máximo foi realizada através de varredura da espectro de UV-visível, conforme consta no anexo A1.

As curvas de calibração de fluoresceína, os peptídeos ASP-PHE e TYR-PHE e o complexo Lisinopril-FTIC foram feitos em água destilada, e em solução tampão pH 6,8 e pH 1,2. Através da relação de Lambert-Beer (Eq. 8), pode-se estabelecer uma relação de proporcionalidade entre absorbância e concentração da solução.

$$A = a b c \tag{8}$$

onde A: Absorção, a: absortividade b: caminho ótico, c: concentração da solução.

Desta forma, prepararam-se soluções de fármacos de várias concentrações, realizou-se a leitura de absorvância lida no aparelho para cada solução de cada fármaco preparada. A curva de calibração padrão dos fármacos é obtida através do gráfico de concentração versus a absorvância medida. Na Figura 36 constam as equações lineares construídas a partir da curva de calibração.

A equação linear obtida para a fluoresceína e o lisinopril em pH 8 e os peptídeos modelo Asp-Phe e Tyr-Phe em pH 6,8 estão representadas pelas Eqs. 9, 10, 11 e 12. É possível observar que todas apresentaram um excelente fator de ajuste, ($R^2 > 0,99$), e através destas obteve-se a concentração de cada fármaco através da absorvância medida.

$$Abs_{Fluores} = 0,0356x - 0,0041 \quad R^2 = 0,9983 \quad (9)$$

$$Abs_{Lisinopril} = 0,0204x - 0,0715 \quad R^2 = 0,9918 \quad (10)$$

$$Abs_{Asp-Phe} = 0,0266x + 0,005 \quad R^2 = 0,9992 \quad (11)$$

$$Abs_{Tyr-Phe} = 0,00784x + 0,0041 \quad R^2 = 1 \quad (12)$$

4.7.1 Grau de encapsulamento de fármaco nos hidrogéis

A determinação do grau de encapsulamento de fármacos retidos dentro do hidrogel foi determinada de duas formas, pela medida da concentração de fármaco na solução e pela concentração de fármaco liberada dos hidrogéis após 48h.

A medida do grau de encapsulamento pela quantidade de fármaco remanescente no meio reacional foi baseada na quantia total de fármaco adicionada na solução. Para isso, tomou-se o cuidado de adicionar sempre a mesma quantidade de fármaco em todas as reações, mantendo fixa a concentração total da solução. Presume-se que uma quantidade de fármaco ficará retida nas redes dos hidrogéis e o restante permanece no meio reacional. Após a centrifugação realizada para separar os hidrogéis do meio da reação, o líquido centrifugado teve a concentração de fármaco determinada através da leitura da absorvância, utilizando as Equações determinadas para cada curva padrão.

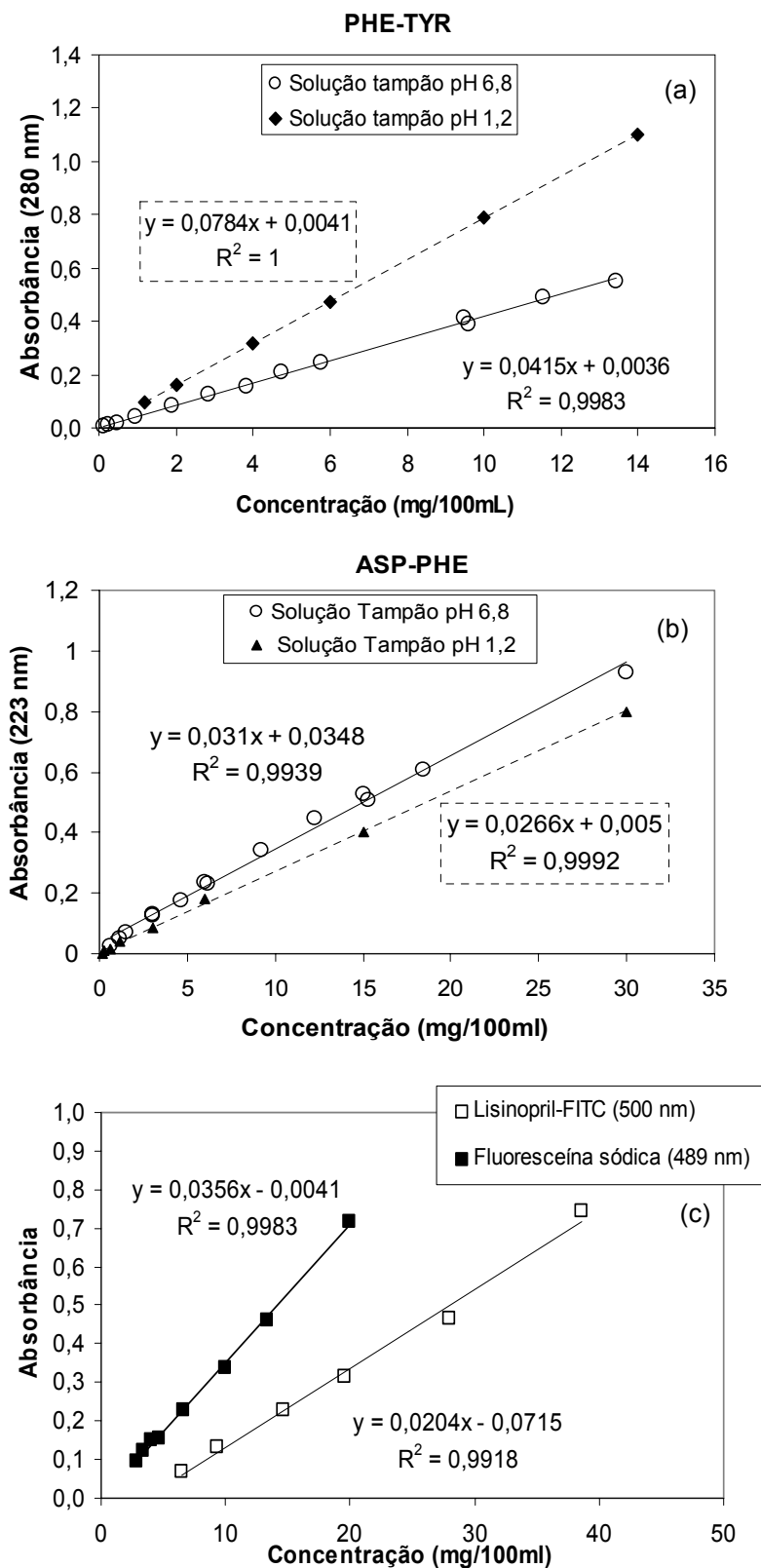


Figura 36: Curva padrão de absorbância x concentração para (a) o peptídeo TYR-PHE em pH 6,8 e em pH 1,2; (b) o peptídeo ASP-PHE em pH 6,8 e em pH 1,2 e (c) para os fármacos Lisinopril-FITC e Fluoresceína sódica em meio alcalino (pH 8).

Através da Eq. 13 determina-se a concentração de fármaco nos hidrogéis, uma vez que a concentração total de fármaco adicionada no meio é conhecida.

$$\%GE = \frac{[fármaco]_{hidrogeis}}{[fármaco]_{total}} \quad (13)$$

onde: %GE : Grau de encapsulamento. onde: $[fármaco]_{hidrogeis}$: concentração de fármaco presente nos hidrogéis. $[fármaco]_{total}$: Concentração de fármaco total adicionada no meio.

Alternativamente, o grau de encapsulamento foi determinado através do fármaco total liberado dos hidrogéis em solução, no qual através da absorbância se obtém a concentração de fármaco na solução.

A medida do grau de encapsulamento também foi avaliada pela quantidade de fármaco liberada pelos hidrogéis após 48h em solução de pH 1,2. Para isso, uma quantidade pré-determinada de hidrogel contendo fármaco foi previamente pesada, e colocada em 50ml de solução de pH 1,2. Após 48h retirou-se uma alíquota de 2 ml, a que foi filtrada em filtro de 0,45 μ m, e adicionou-se 2 ml de solução tampão fosfato de pH 9,0. Esta solução teve a concentração de fármaco determinada através da leitura da absorbância, utilizando as equações de cada curva padrão, determinando a quantia exata de fármaco nos hidrogéis.

4.7.2 Perfis de liberação de fluoresceína

As curvas de liberação de fluoresceína foram realizadas através da leitura periódica da absorbância de cada amostra *in vitro*. Para isto, as microesferas suspensas em 0,5ml de água destilada foram transferidas para um tubo falcon de centrifuga, onde se adicionou 3 ml de solução padrão de PBS (tampão salino de fosfato, pH 7,4), e acompanhou-se a mudança da absorbância da solução a intervalos regulares de tempo. Uma solução foi preparada contendo 0,5ml de água destilada e 3ml de solução de PBS para obtenção do branco necessário para calibração do aparelho.

Considerando-se que a presença de partículas em solução leva a interferência na leitura de absorvância, a alíquota retirada da solução foi centrifugada por 3 minutos a 3500 rpm e após transferida para uma cubeta de vidro, medindo-se a absorvância no espectrofotômetro a 489nm. O procedimento foi realizado a intervalos regulares de tempo, até que a absorvância ficasse constante. A absorvância foi convertida para concentração utilizando-se a Eq. 9.

4.7.3 Perfis de liberação de peptídeos e lisinopril

As curvas de liberação de peptídeos foram realizadas através da leitura periódica da absorvância de cada amostra *in vitro*. Para isto, 3 mg das microesferas liofilizadas contendo cada fármaco foram adicionadas em um frasco contendo 100 ml de solução tampão em pH 1,2. Em períodos regulares foram retirado 2 ml de solução, filtrou-se as soluções em filtro de 0,45 μm e mediu-se a absorvância da solução, onde a absorvância foi convertida para concentração utilizando-se das Eq.10, Eq.11 e Eq.12.

4.8 Planejamento e Análise fatorial

Os planejamentos experimentais, baseados nos fundamentos estatísticos, são sem dúvida alguma, uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas de um processo, desenvolver produtos ou simplesmente avaliar os efeitos dos fatores nas respostas desejadas [202]. Experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores. Os delineamentos em esquema fatorial 2^k ocorrem quando se tem k fatores, todos com dois níveis.

A análise fatorial permite estimar a significância dos efeitos principais dos parâmetros independentes. Todos os parâmetros estudados são dispostos em uma matriz, e o fator de contraste é realizado atribuindo-se o valor -1 para o nível baixo e 1 para o nível alto de cada parâmetro. A Tabela 6 ilustra uma matriz de experimentos 2^3 contendo as variáveis independentes e seus níveis de contraste, e a variável dependente. Define-se contraste como um somatório da combinação linear dos efeitos dos tratamentos multiplicados pelo sinal atribuído na matriz. Os

efeitos são calculados dividindo-se o contraste pelo valor numérico correspondente à metade dos experimentos realizados. As equações Eq. 14 e Eq. 15 ilustram respectivamente o cálculo para obtenção do contraste A e do efeito da variável independente A na variável dependente Z.

$$\text{Contraste A} = (-1) \cdot J + (1) \cdot K + (-1) \cdot L + (1) \cdot M + (-1) \cdot N + (1) \cdot O + (-1) \cdot P + (1) \cdot Q \quad (14)$$

$$\text{Efeito A} = \frac{\text{Contraste A}}{8/2} \quad (15)$$

Tabela 6: Matriz de experimentos 2^3 , contendo as variáveis independentes e seus níveis, e a variável dependente.

EXP.	Variáveis independentes			Variável dependente
	A	B	C	Z
1	-1	-1	-1	J
2	1	-1	-1	K
3	-1	1	-1	L
4	1	1	-1	M
5	-1	-1	1	N
6	1	-1	1	O
7	-1	1	1	P
8	1	1	1	Q

Utilizou-se planejamento experimental fatorial em varias etapas deste trabalho, a fim de avaliar a influência de diversos parâmetros de reação nas propriedades finais dos hidrogéis. Inicialmente, para seleção dos parâmetros que seriam estudados a nível fixo e quais seriam trabalhados em dois níveis, estudou-se através de um fatorial 2^4 a influência de 4 fatores (composição relativa ALG/QUI, pH, tipo de quitosana e teor de CaCl_2) na morfologia dos hidrogéis produzidos em micropartículas, buscando obter hidrogéis com morfologia controlada. Posteriormente, a influência de novos fatores foram estudados no tamanho de partícula, no grau de inchamento e no ponto

isoelétrico dos hidrogéis de morfologia controlada. Este estudo foi realizado com os fatores em dois níveis, totalizando 16 experimentos conduzidos em ordem aleatória, permitindo o estudo de 15 efeitos possíveis; 4 efeitos principais, 6 interações de primeira ordem, 4 interações de segunda ordem, e 1 fator de interação de terceira ordem, executando um total de 16 experimentos em duplicata, divididos em blocos de 4 experimentos para minimizar ruídos, ou seja, erros cumulativos nos resultados. No andamento do trabalho, à medida que alguns fatores foram definidos em seus níveis ótimos e outros fatores foram incluídos, fez-se necessário um estudo do efeito da modificação química da quitosana na formação de hidrogéis com alginato, através de um planejamento fatorial 2^3 . Um total de oito experimentos em triplicata foram realizados para cada variável dependente testada, divididos em blocos de 4 experimentos para minimizar ruídos dos erros experimentais cumulativos.

4.9 Método estatístico

Foram usadas as ferramentas estatísticas ANOVA e regressão linear para auxiliar na interpretação dos resultados. A ANOVA é uma ferramenta básica mais simples que divide e compara a variabilidade do experimento em variabilidade *entre grupos* e variabilidade *dentro de grupos*. Quanto maior for a primeira comparada à segunda, maior é a evidência de que existe variabilidade entre grupos, ou seja, médias diferentes. Esta ferramenta é muito utilizada quando se deseja saber se a mudança de uma ou mais variáveis no estudo de um sistema modificam as características do produto final em questão, permitindo a identificação dos fatores que influenciam nas propriedades do produto. Já a regressão linear é uma análise onde se obtém não somente os fatores que influenciam nas propriedades do produto, mas tenta-se explicar uma variável, a qual é chamada variável dependente, descrevendo-a em função de uma ou mais variáveis independentes. Este sistema é utilizado quando o planejamento fatorial tem muitas variáveis e deseja-se otimizar uma reação ou um produto através da seleção dos níveis dos fatores. Os dois métodos serão brevemente descritos a seguir:

4.9.1 Regressão linear

O método de regressão linear realiza uma modelagem entre as variáveis através do ajuste de uma equação linear aos dados observados e costuma indicar os parâmetros significantes de um sistema. Em geral, para matrizes de planejamento fatorial envolvendo um número igual ou acima de 4 fatores em dois níveis (fatorial 2^4), a regressão linear é uma ferramenta mais completa, que determina não somente a significância dos fatores que influenciam em cada variável dependente estudada, mas também gera equações lineares onde a variável dependente é descrita em função dos fatores independentes significativos. O tratamento estatístico foi realizado usando o programa Excel, conforme descrito por Ribeiro e colaboradores [203], realizado em duas etapas. Na primeira etapa todas as variáveis estudadas e as possíveis combinações entre elas são dispostas em uma matriz. O coeficiente e o valor de significância (p) foram determinados. O coeficiente de correlação foi determinado, uma medida numérica valiosa de associação entre duas ou mais variáveis, assume valores entre -1 e 1 indicando a força da associação da informação observada para as variáveis. As variáveis significativas são selecionadas, considerando o fator de significância (p) menor do que 0,05 para uma confiança de 95%. Posteriormente, uma equação de função de resposta das variáveis dependentes foi obtida na forma linear considerando somente as variáveis significativas na forma codificada, e uma constante que corresponde a média dos valores, conforme a representação na equação na Eq. 16:

$$Y = k + \alpha A + \beta B + \gamma C + \dots + \varepsilon AB + \dots + \varphi ABC + \dots \quad (16)$$

Onde: Y é a variável dependente; k é a interseção; A, B e C representa as variáveis independentes; AB e ABC representam efeitos combinados e α , β , γ , ε e φ são coeficientes.

4.9.2 ANOVA

O tratamento estatístico ANOVA foi conduzido usando o Algoritmo de Yates no programa Excel. A ANOVA compara a variabilidade do experimento em variabilidade *entre grupos* e variabilidade *dentro de grupos*. O método envolve o cálculo das somas quadradas, (SQ), os graus de liberdade (gl) e média quadrada

(MQ) para os efeitos principais, suas interações e resíduos. O Teste F (media quadrada dos efeitos/media quadrada do resíduo) foi usado para avaliar os efeitos significativos. Se o valor F para um dado efeito for maior do que o valor de referencia F então este efeito é considerado significativo. Neste estudo, um valor de referencia de 4,0 foi usado para avaliar a significância dos fatores, com uma confiança de 93% na análise estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambos os polímeros utilizados neste estudo são polissacarídeos, sendo um a quitosana (QUI), um copolímero com estrutura composta de 2-deoxi-D-glicopiranosose, alternando grupamentos amino (~90%) com grupamentos acetamido (~10%) e o outro, alginato de sódio (ALG), um copolímero formado por unidades de ácido Gulurônico (G) e Manurônico (M) com razão G/M (35/65). A massa molar viscosimétrica (g/mol), a viscosidade intrínseca (dl/g) e o grau de desacetilação dos polissacarídeos se encontram na Tabela 7, sendo o grau de desacetilação das quitosana de baixa (BQUI) e média massa molar (MQUI) determinado por FT-IR, de acordo com o procedimento descrito por Brugnerotto [152].

Tabela 7: Características dos polissacarídeos usados para obtenção dos hidrogéis

	Viscosidade intrínseca (dl/g)	Massa molar viscosimétrica (g/mol)	Grau de desacetilação (%)
Alginato de sódio (ALG)	5,25	54.600	---
Quitosana baixa massa molar (BQUI)	6,53	6.683	90
Quitosana média massa molar (MQUI)	12,84	13.827	92

Os hidrogéis designados por ALG-QUI com morfologia controlada foram produzidos por complexação polieletrólítica, pela adição concomitante de soluções de ALG em meio aquoso e QUI em meio ácido em um meio reacional controlado, sob agitação moderada (80 rpm) possibilitando a formação do complexo. As propriedades dos hidrogéis são determinadas pela extensão das interações entre os polímeros na solução e o ambiente químico circundante e, portanto, as propriedades dos hidrogéis são controladas pelo controle da complexação polieletrólítica. O meio reacional é composto unicamente das soluções de ALG, QUI e CaCl_2 , que foram misturados para obtenção dos hidrogéis em dois pHs distintos, afim de melhor investigar as propriedades do hidrogel formado em função unicamente das características intrínsecas dos polissacarídeos e das interações entre os polissacarídeos. Alguns parâmetros como composição relativa dos componentes, acidez do meio e o método de adição foram selecionados e alterados de forma a

avaliar os efeitos destes na morfologia das microesferas, no grau de encapsulamento e no perfil de liberação de fluoresceína.

As amostras de quitosana usadas BQUI e MQUI apresentam grau de desacetilação semelhante, 90% e 92%, respectivamente, indicando um alto teor de grupamentos amino na cadeia polimérica. Uma vez que a reação de formação do hidrogel ocorre pela interação dos grupamentos carboxílicos do alginato com os grupamentos amino da quitosana, um elevado grau de desacetilação leva ao aumento do número de interação entre as cadeias da quitosana com as do alginato de sódio. Neste contexto, assumiu-se que as duas amostras de quitosana diferem entre si somente no tamanho de suas cadeias. A quitosana (QUI) dissolve em solução aquosa em pH menor que 6,5 na qual os grupos amino se tornam carregados positivamente. O alginato (ALG), por outro lado, dissolve em solução aquosa neutra, na qual os grupos carboxílicos se tornam carregados negativamente. Em soluções aquosas com pH entre 3,5 e 6,5, os grupos amino da QUI interagem com os grupos carboxílicos do ALG com formação de um complexo iônico polimérico [9].

A Figura 37 mostra os espectros de infravermelho das amostras de quitosana, sendo estes similares, o espectro do alginato de sódio e dos hidrogéis formados pela combinação entre alginato e quitosana. Os grupamentos hidrocarbônicos das amostras de quitosana apresentam os picos de absorção em 2900 e 1589 cm^{-1} ; e em 1320 cm^{-1} , devido aos grupamentos de acetil-glucosamina. As unidades glucosamina da quitosana apresentam absorção em 1420 e 3300 cm^{-1} [21]. Através da razão entre a área das bandas das formas acetil-glucosamina (1320 cm^{-1}) e glucosamina (1420 cm^{-1}) se determina o grau de desacetilação das amostras de quitosana através da Eq. 5, disposta na pg. 57. A quitosana apresenta grupos amino protonados (NH_3^+) em solução ácida, que apresentam uma banda de absorção larga em torno de 3300 cm^{-1} . Os principais modos de vibração dos grupamentos da quitosana são a deformação angular assimétrica e simétrica do NH_3^+ em 1654, 1596 e 1421 cm^{-1} . O alginato de sódio é um polissacarídeo, copolímero de ácido gulurônico e manurônico, tendo um grupamento de ácido carboxílico por unidade repetitiva e apresenta picos de absorção em 2950 cm^{-1} e 1413 cm^{-1} , devido a estiramentos $-\text{CH}_2$. Os grupamentos carboxílicos C-O-O

apresentam uma banda de absorção larga devido ao estiramento assimétrico em 1610 cm^{-1} e devido ao estiramento simétrico em 1418 cm^{-1} . A banda de absorção em 1030 cm^{-1} é devido ao estiramento COH. A interação entre a quitosana e o alginato leva à formação do complexo ALG-QUI, cuja interação entre os polieletrólitos pode ser observada através da modificação dos modos vibracionais dos grupamentos principais da QUI e do ALG. Os hidrogéis de composição relativa ALG/QUI 75/25 e 35/65 apresentam uma redução da largura na banda de absorção em 1610 cm^{-1} dos grupos COO^- do ALG, bem como se observa o desaparecimento da banda de absorção dos grupos amino em 1596 cm^{-1} . No entanto, devido a sobreposições dos modos vibracionais dos polissacarídeos, não foi possível constatar a interação entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxílicos do alginato.

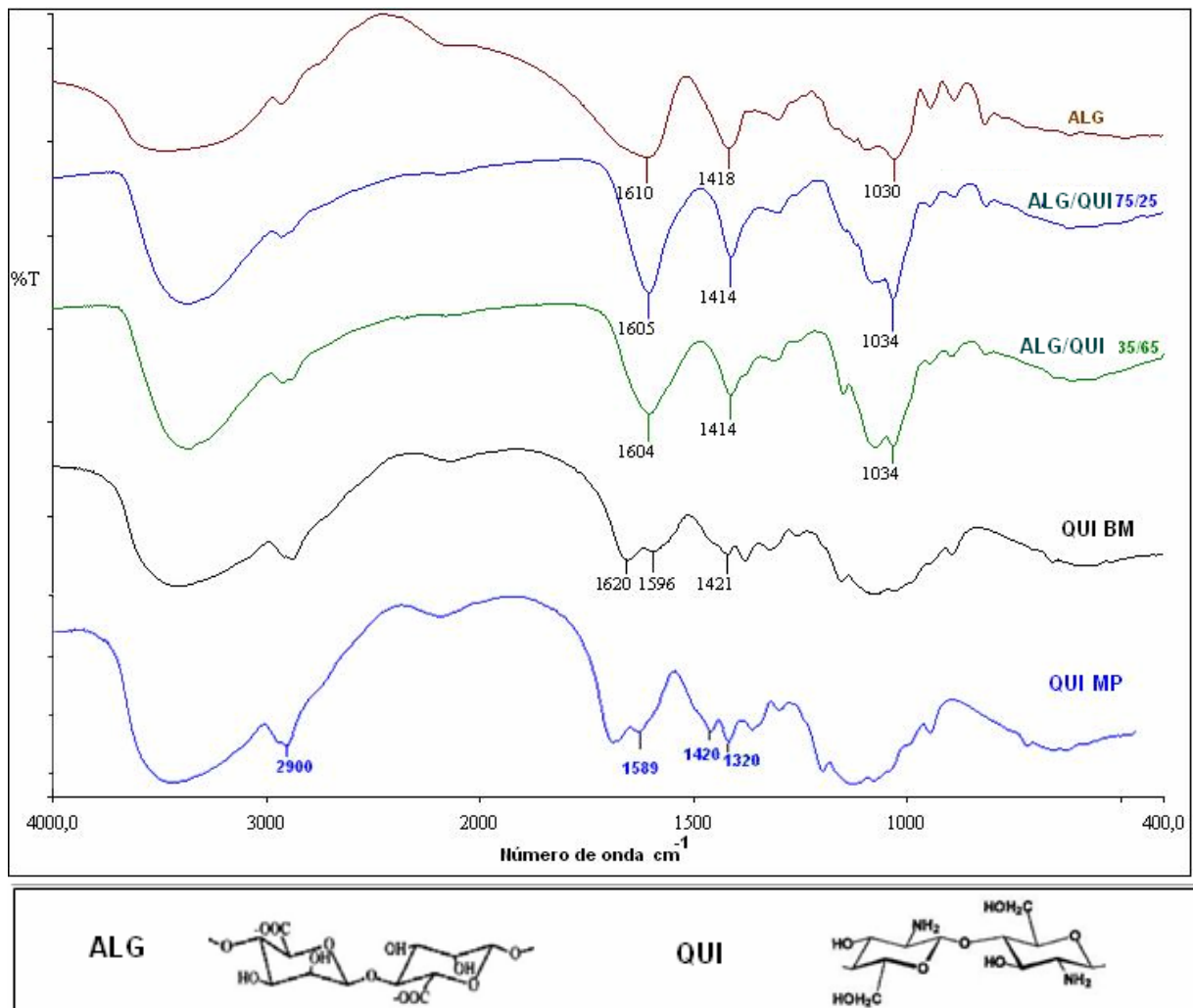


Figura 37: Espectro de infravermelho da quitosana de baixa e média massa molar (BQUI e MQUI), do alginato de sódio e dos hidrogéis ALG/QUI de diferente composição relativa.

5.1 Metodologia para obtenção de complexos iônicos de quitosana com morfologia controlada

Devido a diferenças encontradas nos procedimentos descritos na literatura que levam a obtenção de hidrogéis com características bastante distintas, foi feita uma investigação preliminar para seleção de fatores com eventual influência na morfologia dos hidrogéis. Desta forma, definiram-se os fatores que seriam trabalhados sem alteração de níveis e os fatores de controle ou variáveis independentes, que foram trabalhados em dois níveis.

5.1.1 Determinação dos fatores de controle a serem usados na produção de hidrogéis ALG-QUI

Dado a grande variedade de metodologias para produção de hidrogéis [20-22, 24,23,206] e a necessidade de controle das condições do meio reacional para a produção de hidrogéis ALG-QUI, alguns fatores foram fixados, sendo estes velocidade e tempo de agitação do meio reacional. Para isto, foi necessário avaliar previamente o efeito da velocidade da agitação magnética na preparação do hidrogel, bem como o tempo de agitação do meio reacional. Após alguns testes, definiu-se uma velocidade intermediária de agitação (~80 rpm), rápida o suficiente para garantir uma homogeneização do meio e que não houvesse a formação de turbilhões. O tempo de agitação escolhido foi de 30 min., usada para garantir a formação homogênea dos hidrogéis [21,23,204]. A definição da concentração das soluções poliméricas foi outro fator que demandou avaliação prévia. Dados da literatura reportam concentrações de ALG e QUI que variam desde 0,06%-0,5% para produção de nanopartículas [21, 33, 142, 171, 176, 185, 203] até 1%-2% para produção de micropartículas [20, 28, 29, 32, 81, 83, 175]. Apesar da existência de outros fatores que diferenciam as formulações é possível perceber que existe uma tendência de se obter partículas menores partindo-se de soluções mais diluídas. Estabeleceu-se a concentração inicial de 0,5% p/p, com velocidade de 80 rpm, e tempo de agitação de 30 minutos.

5.1.2 Otimização das variáveis significantes para produção dos hidrogéis

Definiram-se como variáveis independentes a composição relativa de ALG/QUI no hidrogel, o pH e a concentração de reticulador iônico (CaCl_2) no meio

reacional. Sabe-se que a composição relativa, a acidez do meio reacional e o reticulador iônico são parâmetros que influenciam diretamente nas propriedades do hidrogel, baseados em trabalhos que avaliaram separadamente estes parâmetros [20, 21, 28, 29, 32, 33]. Cada fator foi estudado em dois níveis, totalizando 8 experimentos, visando à obtenção de hidrogéis com morfologia controlada, na forma de microesferas. A obtenção dos hidrogéis foi realizada através da adição controlada das soluções poliméricas através de uma bomba peristáltica, usando o método indireto, conforme descrito na seção 4.4.2.1. Durante a obtenção dos hidrogéis, a alta viscosidade das soluções de ALG e QUI causou por vezes o entupimento da agulha, prejudicando no controle da adição. Na Tabela 8 constam as condições de reação utilizadas para cada tipo de hidrogel produzido.

Tabela 8: Condições de reação para cada hidrogel produzido

Reação	Relação ALG/QUI ^a	pH	CaCl ₂ (mM)	ALG/Ca (p/p)
1	35/65	4,0	300	2/1
2	75/25	4,0	300	2/1
3	35/65	6,0	300	2/1
4	75/25	6,0	300	2/1
5	35/65	4,0	600	1/1
6	75/25	4,0	600	1/1
7	35/65	6,0	600	1/1
8	75/25	6,0	600	1/1

^aSoluções 0,5% p/p ALG e 0,5% p/p QUI.

A morfologia dos hidrogéis, observada por microscopia ótica, apresentou-se irregular e com inúmeros aglomerados, conforme lustrado pela Figura 38. No entanto, é possível observar os hidrogéis obtidos pelas reações 1, 3 e 4, (Fig. 38 (a), (c) e (d)) apresentaram morfologia esférica, mais regular do que os produzidos pelas demais condições. Na Tabela 8 podemos observar que os hidrogéis produzidos pelas condições de reação 1, 3 e 4 têm em comum o mesmo teor de CaCl₂. Os hidrogéis produzidos com CaCl₂ em maior concentração, conforme indicado pela Tabela 8 nas reações 5, 6 7 e 8, apresentaram morfologia irregular (Fig. 39 (e), (f), (g) (h)), devido à aglomeração dos hidrogéis devido a um excesso de íons cálcio no meio.

Cada íon cálcio em solução (Ca^{++}), interage com dois grupamentos COO^- do ALG, formando um complexo intra-agregado, conforme representado na Eq. 17:

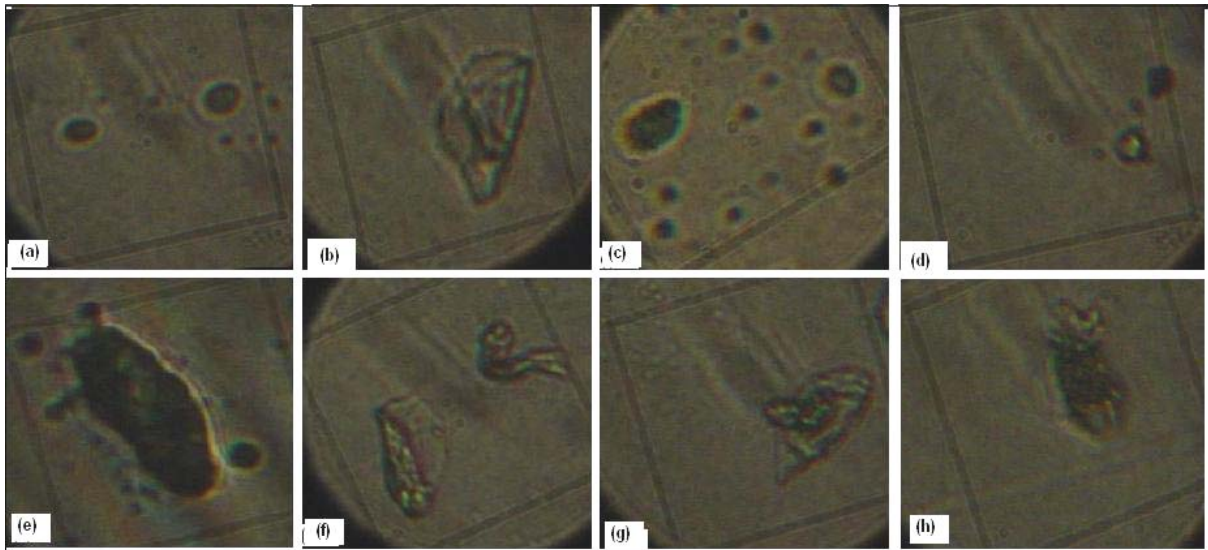


Figura 38: Morfologia das partículas ALG-QUI produzidas conforme as condições de reação 1 (a), 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e), 6 (f), 7 (g) e 8 (h). Escala: cada foto apresenta bordas de 80 μm de comprimento.

Quando em menor teor, os íons cálcio no meio reacional fazem reticulações iônicas com os grupamentos carboxílicos do ALG, formando um complexo intra-agregado ALG-Ca pouco reticulado. No entanto, a presença de uma quantidade de íons cálcio em excesso permite a formação de múltiplas reticulações iônicas entre grupamentos carboxílicos de ALG entre os complexos intra-agregados, com a formação de complexos inter-agregados ALG-Ca. Neste caso, as reticulações iônicas ocorrem não somente na estrutura do gel ALG-Ca, mas por interações eletrostáticas os hidrogéis se aglomeram e os íons cálcio atuam como agente de reticulação entre as cadeias de ALG de diferentes complexos ALG-Ca. O resultado é um gel altamente reticulado, formando grandes aglomerados de morfologia irregular.

Após a formação do gel ALG-Ca, com a adição da solução de quitosana, os grupamentos amino protonados reagem com os grupos carboxílicos livres, formando uma camada protetora de revestimento no hidrogel ALG-Ca, conforme equacionado pela Eq. 18:



Desta forma, o teor de íons cálcio no meio reacional determina o grau de reticulação iônica do hidrogel ALG-Ca formado e a adição da solução de quitosana, responsável por revestir o hidrogel, pode formar grandes complexos inter-agregados, ou de complexos intra-agregados, com morfologia esférica. A importância do teor do reticulador iônico no grau de agregação de carboximetilquitosana foi reportada por Zhu [195,196], onde foi observada a formação de inter-complexos agregados de carboximetilquitosana com o aumento significativo do teor de íons cálcio no meio reacional. A Figura 39 representa o grau de agregação dos hidrogéis ALG/Ca/QUI de acordo com o grau de reticulação iônico.

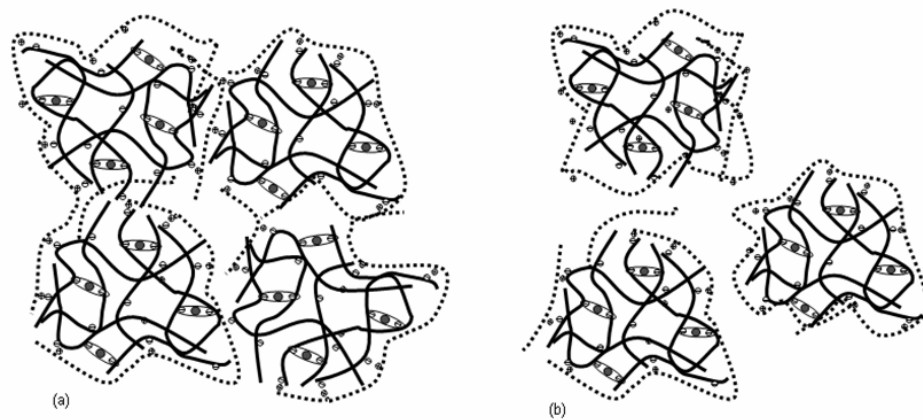


Figura 39: Hidrogéis ALG/Ca revestidos com QUI com diferente grau de aglomeração em função do teor de íons cálcio: a) formando intra e inter-complexos; b) formando intra-complexos.

A influência da concentração de íons cálcio no controle do tamanho do complexo Ca-ALG-QUI é mencionada por De e Robinson [21], que determina que a quantidade de ALG deve ser dez vezes maior do que a de íons cálcio (10/1) para garantir a formação de um estado de pré-gel na formação de nanopartículas. Observando a Tabela 8, observa-se que a razão ALG/Ca trabalhada nos experimentos variou de 1/1 a 2/1, ou seja, com uma quantidade muito elevada de íons cálcio no meio reacional, levando a formação de hidrogéis com morfologia irregular. Com isso, este estudo preliminar permitiu a realização de um ajuste nos parâmetros selecionados para obtenção dos hidrogéis. Ajustou-se a concentração de íons cálcio de forma a manter fixa a razão ALG/CaCl₂ em 10/1 no meio reacional e as soluções de ALG e QUI foram diluídas 0,2% p/p para diminuir a viscosidade das mesmas para que a adição das soluções poliméricas ocorresse de forma controlada. Após o ajuste destes parâmetros, foi realizado um estudo sobre a influência destas

variáveis na morfologia, grau de inchamento, no potencial superficial das partículas e na eficiência de encapsulamento.

5.2 Avaliação da influência dos parâmetros nas propriedades dos complexos iônicos de quitosana

Estudou-se a influência de quatro parâmetros em dois níveis na morfologia, no grau de encapsulamento e nos perfis de liberação de fluoresceína. Foram escolhidos como parâmetros a composição relativa de ALG/QUI, o pH do meio reacional, a massa molar da quitosana e a metodologia de preparação dos hidrogéis. Foi mantida fixa a velocidade de agitação (80 rpm), tempo de reação (30 min), a concentração das soluções de ALG e QUI (0,2%) e a razão ALG/Ca (10/1). Para isto, utilizou-se de planejamento fatorial, através da montagem de uma matriz de experimentos. Nesta matriz de experimentos, atribuem-se sinais de contraste para cada nível estudado, representando por um sinal negativo (-) o nível baixo de cada variável e por um sinal positivo (+) o nível alto de cada variável. A matriz experimental contendo os fatores independentes, os sinais de contraste e seus níveis de estudo estão mostrados na Tabela 9 e os fatores foram definidos como se segue:

- Fator A: Composição relativa de ALG no hidrogel; nível alto (+) = 75% w/v (A75) e nível baixo (-) = 35% w/v (A35)
- Fator B: pH da solução; Nível alto (+) = 6 (P6) e nível baixo (-) = 4 (P4)
- Fator C: massa molar da QUI; nível alto (+) = quitosana de media massa molar e (MQUI) nível baixo (-) = quitosana de baixa massa molar (BQUI)
- Fator D: método de produção dos hidrogéis; Nível alto (+) = adição direta (DM) e nível baixo (-) = método de adição indireta (IM).

O planejamento fatorial levou a execução de 16 condições de reação distintas para formação de hidrogéis, realizados em ordem aleatória, para avaliação da morfologia. As mesmas 16 reações foram repetidas para produção de hidrogéis encapsulados com fluoresceína, para avaliação do grau de encapsulamento e para avaliação do perfil de liberação *in vitro*. A existência de uma eventual sinergia entre

as condições previamente citadas leva a formulação de um hidrogel adequado para entrega controlada de fármacos via oral. É desejável que um hidrogel apresente morfologia esférica, com grau de inchamento mínimo em meio gástrico e moderado em meio intestinal, associados a um alto grau de encapsulamento e tempo prolongado de liberação do fármaco.

Tabela 9: Planejamento Experimental da produção de hidrogéis ALG-QUI, contendo as variáveis independentes e os níveis das variáveis

Reação Nº	Condições de preparação ^a	Variáveis independentes				
		ALG	pH	QUI	Método adição	de
1	A35,pH4,BQUI,IM	-1	-1	-1		-1
2	A75,pH4, BQUI ,IM	1	-1	-1		-1
3	A35,pH6, BQUI ,IM	-1	1	-1		-1
4	A75,pH6, BQUI ,IM	1	1	-1		-1
5	A35,pH4, MQUI ,IM	-1	-1	1		-1
6	A75,pH4, MQUI,IM	1	-1	1		-1
7	A35,pH6, MQUI,IM	-1	1	1		-1
8	A75,pH6, MQUI,IM	1	1	1		-1
9	A35,pH4, BQUI, DM	-1	-1	-1		1
10	A75,pH4, BQUI,DM	1	-1	-1		1
11	A35,pH6, BQUI,DM	-1	1	-1		1
12	A75,pH6, BQUI,DM	1	1	-1		1
13	A35,pH4, MQUI ,DM	-1	-1	1		1
14	A75,pH4, MQUI ,DM	1	-1	1		1
15	A35,pH6, MQUI,DM	-1	1	1		1
16	A75,pH6, MQUI,DM	1	1	1		1

^a A35 ou A75: 35% ou 75% de teor de ALG; BQUI ou MQUI: quitosana de baixa ou média MW; IM ou DM: método de adição indireto ou direto.

5.2.1 Morfologia dos hidrogéis ALG-QUI

A variação das condições de reação de complexação eletrolítica pode levar à formação de hidrogéis com diferente morfologia, podendo estes apresentar uma maior regularidade na sua estrutura esférica e no tamanho das partículas. A Figura 40 mostra micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV), que ilustram a morfologia dos hidrogéis ALG-QUI obtidos em diferentes condições de reação. Pode-se observar uma grande variação no tamanho das partículas, bem como na regularidade da morfologia de acordo com a condição de reação. Em particular, os hidrogéis produzidos com BQUI e pH 6, conforme ilustrado na Figura 40 (a) pelas

reações R.3 e R.4 apresentaram uma morfologia mais regular do que os demais hidrogéis.

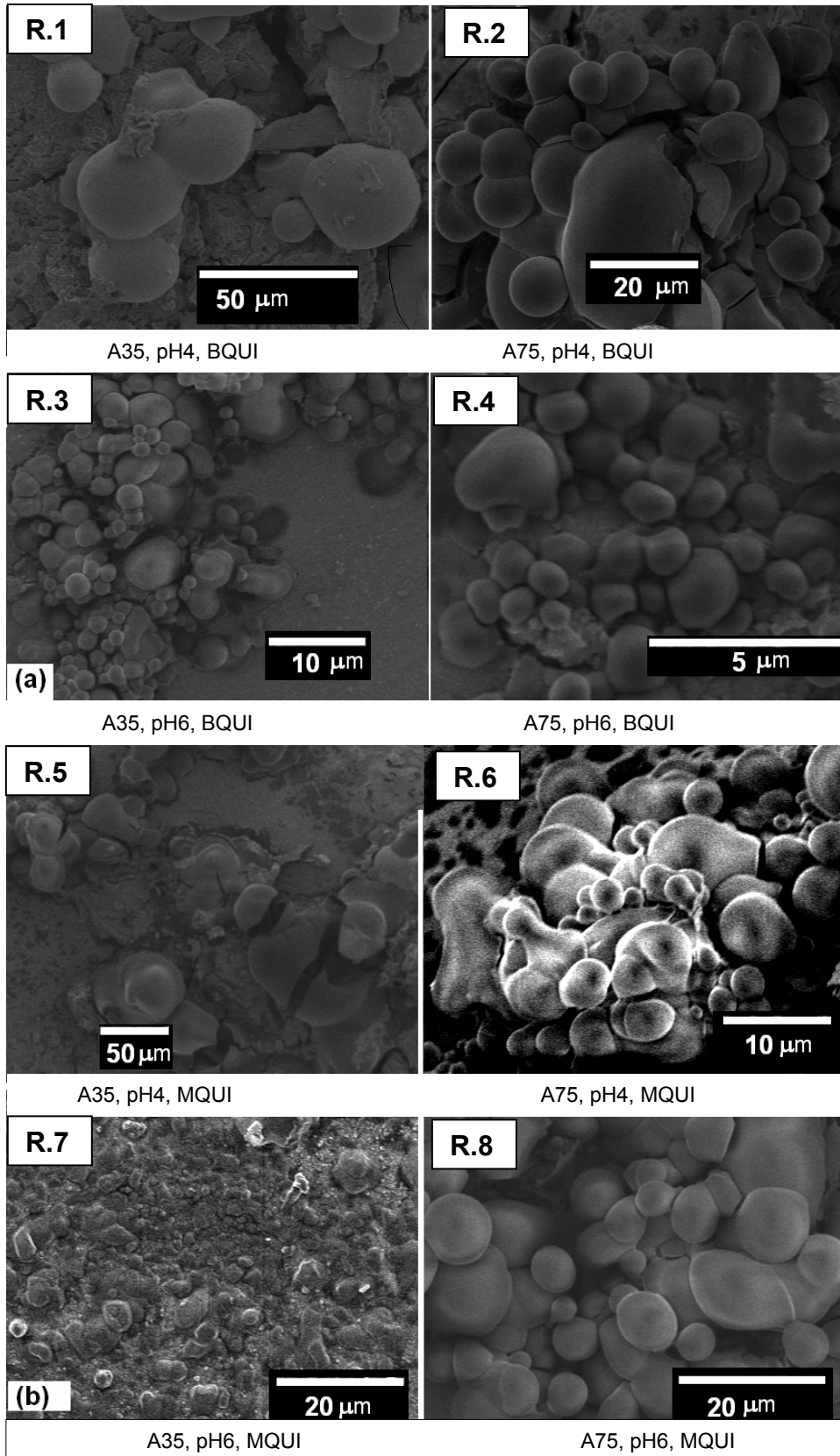


Figura 40: Micrografias de MEV das partículas ALG-QUI obtidas através do método indireto com (a) BQUI (R.1, R.2 R.3 e R.4) e (b) MQUI (R.5, R.6, R.7 e R.8).

Os hidrogéis ALG-QUI foram caracterizados por microscopia ótica (MO), para obtenção do tamanho médio das partículas. A Figura 41 ilustra as micrografias de MO dos hidrogéis ALG-QUI de acordo com a condição de reação. Pode-se observar que todos hidrogéis produzidos nas condições de reação desta matriz de experimentos apresentaram uma morfologia regular, evidenciando a formação de complexos iônicos intra-reticulados, sem formação de agregados entre as partículas. Desta forma, a definição dos parâmetros selecionados levou a formação de hidrogéis com morfologia controlada. E, ainda, a variação dos níveis de cada parâmetro selecionado levou a formação de hidrogéis com diferente tamanho de partícula.

Observa-se que as partículas obtidas através do método de reação indireto (Fig. 41 (b)) encontram-se mais aglomeradas do que no método direto (Fig. 41 (a)). Esta aglomeração ocorrida durante a formação dos hidrogéis pelo método indireto pode ser atribuída à etapa inicial de formação do pré-gel ALG-Ca, que, depois de formado, permanece 20min sob agitação, o que pode favorecer a formação alguns pontos de reticulação iônica entre as cadeias de ALG de um complexo com outro complexo, levando também a formação de partículas com morfologia menos regular do que as obtidas pelo método direto.

Os efeitos das variáveis independentes foram calculados através da análise fatorial, conforme descrito no item 4.8, pg. 70. Na Tabela 10 estão dispostos os valores de tamanho médio das partículas, bem como os efeitos das principais variáveis. O tamanho médio das partículas variou de 3,0 a 6,6 μm de acordo com a condição da reação, tendo como média geral o valor de 4,3 $\mu\text{m} \pm 1,0$. O alto valor de desvio padrão de cada experimento indica que os hidrogéis formados são polidispersos. No entanto, pelo método direto, (Reações 9-16), o valor do desvio padrão foi menor, logo, pode-se dizer que pelo método direto, as partículas apresentam menor polidispersão.

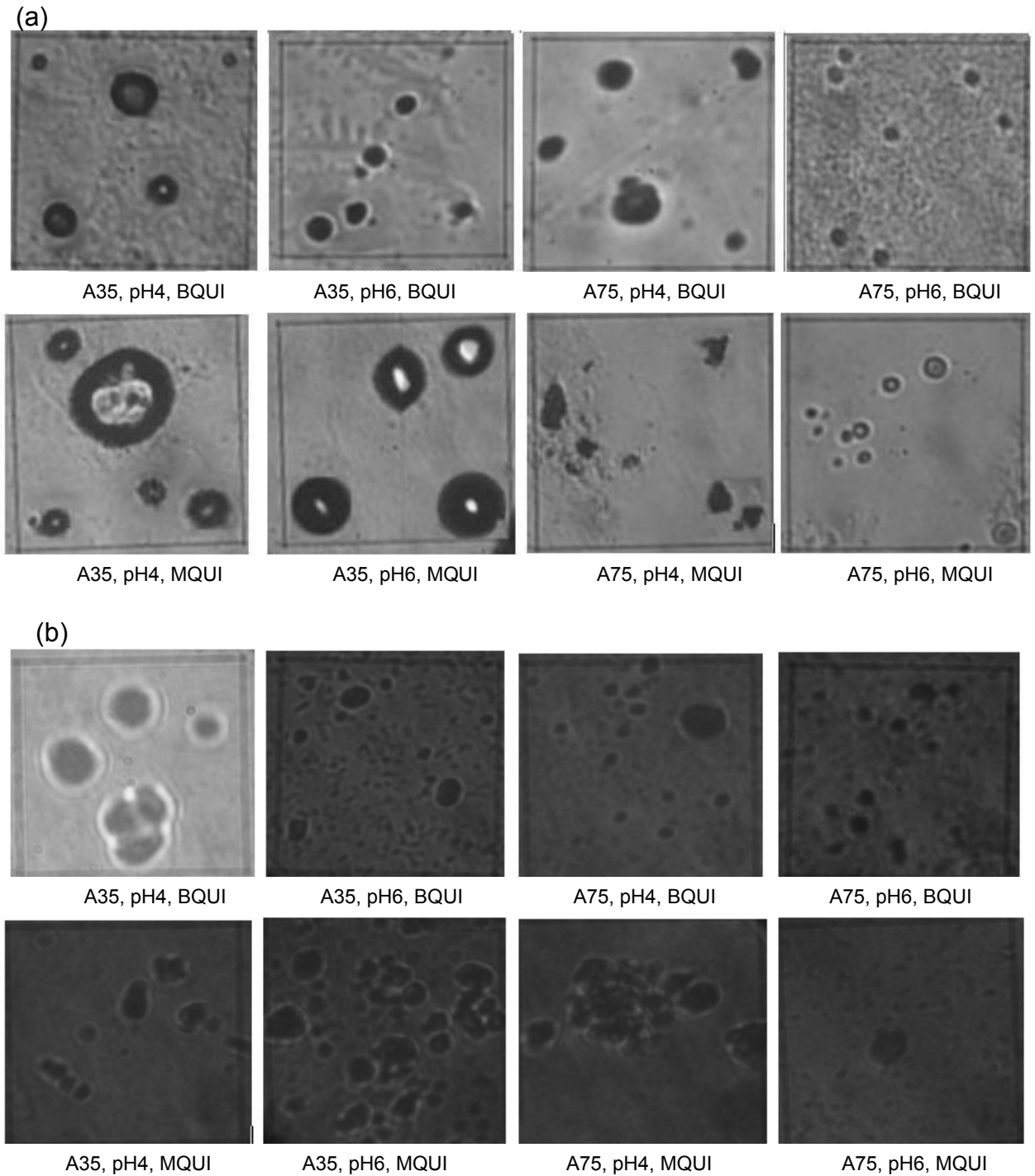


Figura 41: Morfologia das partículas ALG-QUI para cada condição realizada; (a) Microesferas obtidas pelo método de adição direta e (b) microesferas obtidas pelo método de adição indireta. Legenda: A35/A75: composição relativa de ALG 35% ou 75%;BQUI/MQUI-Quitossana de baixa e média massa molar

Através da análise dos efeitos das variáveis, (Tabela 10), observa-se que o fator relativo ao teor de ALG é o único significativo, por apresentar o efeito com maior valor e sendo este valor cerca de 2 a 4 vezes superior aos demais efeitos.

Tabela 10: Diâmetro médio das partículas de acordo com as condições de reação, as colunas de contraste das variáveis e seus respectivos efeitos

Nº Reação	Tamanho médio de partícula (μm)	Coluna Contraste ALG	Coluna Contraste pH	Coluna Contraste QUI	Coluna Contraste MW método	Condições de preparação
1	3,5 \pm 6,1	-3,5	-3,5	-3,5	-3,5	A35, pH4, BQUI, IM
2	6,6 \pm 4,5	6,6	-6,6	-6,6	-6,6	A75, pH4, BQUI, IM
3	3,1 \pm 4,2	-3,1	3,1	-3,1	-3,1	A35, pH6, BQUI, IM
4	4,1 \pm 2,9	4,1	4,1	-4,1	-4,0	A75, pH6, BQUI, IM
5	4,5 \pm 3,2	-4,5	-4,5	4,5	-4,5	A35, pH4, MQUI, IM
6	4,0 \pm 2,2	4,0	-4,0	4,0	-4,0	A75, pH4, MQUI, IM
7	4,7 \pm 2,9	-4,7	4,7	4,7	-4,7	A35, pH6, MQUI, IM
8	5,2 \pm 2,5	5,2	5,2	5,2	-5,2	A75, pH6, MQUI, IM
9	4,5 \pm 2,5	-4,5	-4,5	-4,5	4,5	A35, pH4, BQUI, DM
10	6,2 \pm 1,8	6,2	-6,2	-6,2	6,2	A75, pH4, BQUI, DM
11	4,4 \pm 1,8	-4,4	4,4	-4,4	4,4	A35, pH6, BQUI, DM
12	3,3 \pm 1,6	3,3	3,3	-3,3	3,3	A75, pH6, BQUI, DM
13	3,0 \pm 1,4	-3,0	-3,0	3,0	3,0	A35, pH4, MQUI, DM
14	4,0 \pm 3,1	4,0	-4,0	4,0	4,0	A75, pH4, MQUI, DM
15	3,8 \pm 1,9	-3,8	3,8	3,8	3,8	A35, pH6, MQUI, DM
16	4,7 \pm 1,9	4,7	4,7	4,7	4,7	A75, pH6, MQUI, DM
MÉDIA	4,3 \pm 1,0	6,6	-3,0	-1,8	-1,7	CONTRASTES
		0,825	-0,375	-0,225	-0,2125	EFEITOS

Desta forma, pode-se afirmar que existe uma tendência dos hidrogéis produzidos com menor teor de ALG apresentarem menor tamanho médio ($3,9 \pm 0,6$) do que os produzidos com maior teor de alginato ($4,8 \pm 1,2$). No entanto, o alto valor de desvio do tamanho de partícula para cada condição de reação associado à inexistência de réplicas do experimento limita as conclusões que podem ser tiradas deste experimento.

5.2.2 Grau de encapsulamento (GE)

Foi avaliada a influência das condições de reação de formação dos hidrogéis no grau de encapsulamento dos hidrogéis. A concentração de fluoresceína no meio reacional foi de $5 \mu\text{M}$. A Tabela 11 mostra a estrutura química, massa molar e solubilidade da fluoresceína sódica.

A Tabela 12 mostra os resultados das concentrações obtidas em solução, nas microesferas e no GE obtido para as microesferas, bem como os contrastes e os efeitos das variáveis. O grau de encapsulamento variou de 4% a 83% de acordo com as condições de reação.

Tabela 11: Formula, estrutura, massa molar e limite de solubilidade da fluoresceína sódica

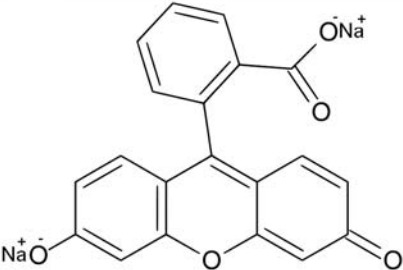
Formula	Estrutura	Massa molar (g/mol)	Limite de Solubilidade
C ₂₀ H ₁₀ Na ₂ O ₅		376,27	100 mg/mL

Tabela 12: Grau de encapsulamento (GE) de fluoresceína nos hidrogéis de acordo com as condições de reação, os valores de contraste para cada variável principal e os seus respectivos efeitos

Nº	GE (%)	Coluna Contraste ALG	Coluna Contraste pH	Coluna Contraste QUI MW	Coluna Contraste método	Condições de preparação
1	61,6	-61,6	-61,6	-61,6	-61,6	A35, pH4, BQUI, IM
2	74,8	74,8	-74,8	-74,8	-74,8	A75, pH4, BQUI, IM
3	65,4	-65,4	65,4	-65,4	-65,4	A35, pH6, BQUI, IM
4	42,7	42,7	42,7	-42,7	-42,7	A75, pH6, BQUI, IM
5	83	-83	-83	83	-83	A35, pH4, MQUI, IM
6	15,9	15,9	-15,9	15,9	-15,9	A75, pH4, MQUI, IM
7	42,7	-42,7	42,7	42,7	-42,7	A35, pH6, MQUI, IM
8	32,7	32,7	32,7	32,7	-32,7	A75, pH6, MQUI, IM
9	49,7	-49,7	-49,7	-49,7	49,7	A35, pH4, BQUI, DM
10	64,8	64,8	-64,8	-64,8	64,8	A75, pH4, BQUI, DM
11	4,4	-4,4	-4,4	4,4	4,4	A35, pH6, BQUI, DM
12	33,3	33,3	33,3	-33,3	33,3	A75, pH6, BQUI, DM
13	54,7	-54,7	54,7	-54,7	54,7	A35, pH4, MQUI, DM
14	13,2	13,2	-13,2	13,2	13,2	A75, pH4, MQUI, DM
15	55,1	-55,1	55,1	55,1	55,1	A35, pH6, MQUI, DM
16	44,6	44,6	44,6	44,6	44,6	A75, pH6, MQUI, DM
MÉDIA	46,2	-94,6	3,8	-155,4	-99	CONSTRATES
		-11,825	0,475	-19,425	-12,375	EFEITOS

Observando os valores dos efeitos na Tabela 12, existe uma tendência de que o efeito referente à massa molar da quitosana ser mais significativo do que os demais, sendo cerca de duas vezes maior do que os demais efeitos. De modo geral, hidrogéis produzidos com MQUI tiveram em média um GE menor (36,5%) do que as realizadas com BQUI (55,9%). Aparentemente, a quitosana de menor massa molar (BQUI) devido ao menor tamanho das cadeias consegue revestir o hidrogel de

maneira mais efetiva do que a quitosana de média massa molar. De fato, em concordância com o relatado com Liu [28], apesar da MQUI apresentar mais grupos amino por cadeia do que a BQUI, ou seja, mais sítios de interação com os grupamentos carboxílicos de ALG, o grande tamanho espacial das cadeias de MQUI resulta em alta resistência a difusão, que leva a formação de camada fina de proteção ao sistema ALG-Ca. Esta camada fina tem pouca resistência ao inchamento, logo, não é capaz de conter o fármaco dentro das microesferas. Logo, a BQUI tem cadeias menores e uma taxa de difusão superior, o que leva a formação de uma camada protetora mais eficiente no sistema ALG-Ca.

5.2.3 Perfis de liberação de Fluoresceína dos hidrogéis

Avaliou-se o perfil de liberação dos hidrogéis produzidos em diferentes condições de reação em meio intestinal simulado (solução de PBS, pH 7,4). Com o objetivo de observar o efeito de todas as variáveis, em especial o método de adição, escolheram-se seletivamente oito hidrogéis que apresentaram um bom grau de encapsulamento. Os perfis de liberação de fluoresceína dos hidrogéis foram comparados aos pares. A Figura 42 ilustra a curva de dissolução da fluoresceína sódica (linha preta) e os perfis de liberação *in vitro* em solução tampão de PBS. (pH 7,4) dos hidrogéis produzidos sob condições diferentes.

Primeiramente, observa-se que a dissolução da fluoresceína sódica ocorre em 5 min, estando 100% disponível no meio intestinal simulado após este período. Os hidrogéis de formulação A35, pH 4 e BQUI não apresentaram um perfil de liberação satisfatoriamente controlado, independente do método de preparação. No entanto, de maneira geral, os hidrogéis produzidos pelo método indireto apresentaram um perfil de liberação de fluoresceína mais controlado do que os obtidos pelo método direto. Após 30 minutos, foram liberados cerca de 20-30% do fármaco pelos hidrogéis produzidos pelo método indireto, e cerca de 60% do fármaco pelos hidrogéis produzidos pelo método direto. Após 70 min, os hidrogéis A35, pH6, BQUI (reação 4), A75, pH4, MQUI (reação 6) e A35, pH6, MQUI (reação 7) haviam liberado cerca de 40% do total encapsulado, apresentando um perfil de liberação compatível com o observado na literatura [44]. Pode-se observar que nenhum dos parâmetros teve influência direta no perfil de liberação, embora a massa molar da quitosana influenciar no grau de encapsulamento.

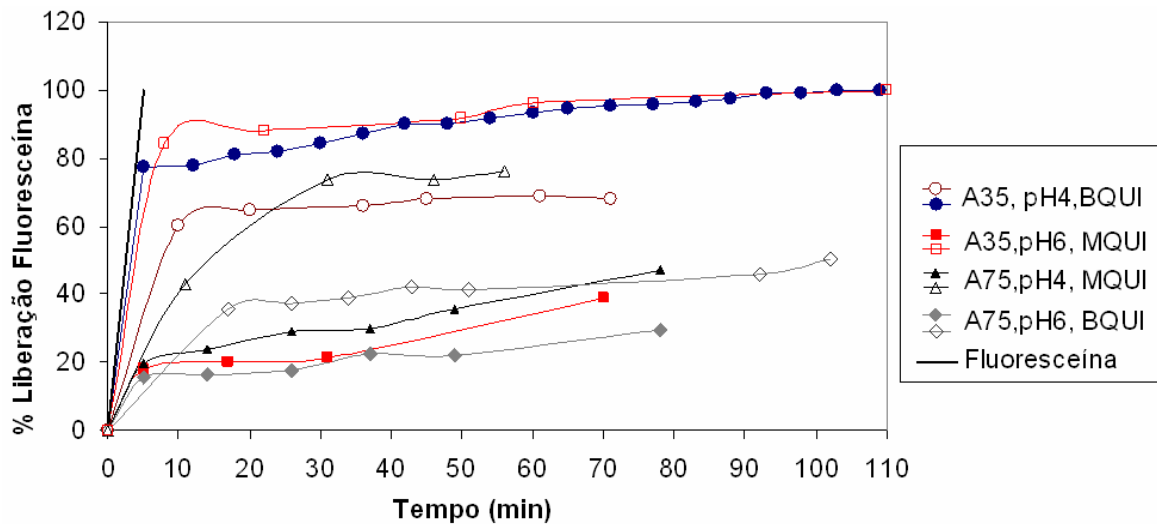


Figura 42: Curvas de liberação *in vitro* de fluoresceína em pH 7,4 dos hidrogéis obtidos pelo método indireto (●,◆,▲ e ■) e pelo método direto (○,◇,△ e □).

Sumarizando, este estudo permitiu observar que os níveis de cada variável principal foram satisfatoriamente bem escolhidos, de forma a produzir hidrogéis com morfologia controlada, na forma de microesferas. Através da observação das variáveis dependentes, houve indicativos de que o tamanho de partícula pode variar com a alteração do teor de ALG e o grau de encapsulamento pode ser aumentado quando o hidrogel é revestido pela quitosana de baixa massa molar. Os perfis de liberação mostraram-se em geral satisfatórios quando os hidrogéis foram produzidos pelo método indireto. Estes resultados apontaram a necessidade de realização de um estudo mais detalhado, no qual, valendo-se de produção de replicatas e utilizando ferramentas estatísticas adequadas, seja possível estabelecer a significância de cada variável independente nas propriedades dos hidrogéis.

5.3 Estudo estatístico da influência das variáveis nas propriedades dos hidrogéis ALG-QUI

Conforme discutido no item anterior, estabeleceu-se um indicativo de que a alteração das condições de reação de complexação dos hidrogéis pode afetar de forma significativa a morfologia, o grau de encapsulamento e os perfis de liberação. De fato, a alteração de condições de reação tem sido estudada em diversos trabalhos [20,21,81-83,205]. Entre estes fatores, a composição relativa, a massa molar e o grau de desacetilação da quitosana têm recebido maior destaque [25-28].

No entanto, apesar de encontrar divergência na literatura entre os métodos de preparação dos hidrogéis [21, 29, 30], cujo tamanho de partícula e demais propriedades são distintos, dificilmente o método de preparação é considerado como um parâmetro. Desta forma, realizou-se um estudo abrangente com validade estatística que pudesse estabelecer quais variáveis influenciavam em diversas propriedades do hidrogel. Para isto, a partir da matriz de planejamento experimental ilustrada na Tabela 9, prepararam-se novamente os hidrogéis segundo as 16 condições de reação citadas em duplicata. Para maior confiabilidade nos valores dos resultados das variáveis dependentes, tamanho de partícula, grau de inchamento e potencial zeta, utilizou-se uma maior amostragem de partículas. A análise estatística foi feita através de regressão linear, que aponta quais são os parâmetros significativos e ainda fornece uma equação para cada propriedade estudada, com 95% de confiabilidade.

A influência estatística de cada uma das propriedades estudadas (rendimento, tamanho de partícula, grau de inchamento e potencial zeta) são discutidas separadamente, a seguir.

5.3.1 Rendimento da reação

Na Tabela 13 constam os valores de rendimento e tamanho de partícula dos hidrogéis ALG-QUI segundo as condições de preparação. O rendimento da reação de produção dos hidrogéis mostrou-se dependente das condições de reação estudadas, variando de 17% a 99%. Os hidrogéis que obtiveram melhor rendimento da reação (superior a 80%) foram os das condições de reação 3, 4, 11 e 12, todos produzidos com BQUI e em pH 6.

A análise estatística por regressão linear permitiu a identificação de todas as variáveis relevantes e as dispôs como função das variáveis independentes e das interações entre variáveis (Eq. 19).

$$R_{\text{rendimento}}(\%) = 55,4 - 11,7C - 10BC + 9,6CD \quad R^2 = 0,70 \quad (19)$$

Onde: $R_{\text{rendimento}}$ = rendimento da reação (% p/p), B= pH, C= massa molar da quitosana e D =método de preparação do hidrogel.

Tabela 13: Rendimento e tamanho de partícula dos hidrogéis ALG-QUI de acordo com as condições de reação.

Variáveis Independentes ^a		Variáveis Dependentes ^a	
Nº	Condições de preparação dos Hidrogeis	Rendimento (%)	Tamanho de partícula (µm)
1	A35, pH4, BQUI, IM	59	7,0 ± 1,7
2	A75, pH4, BQUI, IM	55	6,8 ± 2,6
3	A35, pH6, BQUI, IM	99	3,2 ± 2,6
4	A75, pH6, BQUI, IM	95	4,8 ± 2,1
5	A35, pH4, MQUI, IM	61	4,8 ± 2,8
6	A75, pH4, MQUI, IM	27	4,6 ± 1,9
7	A35, pH6, MQUI, IM	17	5,5 ± 2,4
8	A75, pH6, MQUI, IM	36	4,6 ± 2,6
9	A35, pH4, BQUI, DM	52	4,5 ± 2,5
10	A75, pH4, BQUI, DM	36	5,3 ± 1,5
11	A35, pH6, BQUI, DM	92	5,3 ± 1,5
12	A75, pH6, BQUI, DM	79	3,3 ± 1,6
13	A35, pH4, MQUI, DM	47	5,7 ± 2,7
14	A75, pH4, MQUI, DM	77	4,0 ± 2,7
15	A35, pH6, MQUI, DM	51	3,8 ± 1,9
16	A75, pH6, MQUI, DM	62	7,4 ± 2,1

^aA35/A75 =composição relativa de ALG; P4/P6=pH 4 e 6; BQUI/MQUI= QUI de baixa e média massa molar; IM/DM= preparação hidrogel metodo indireto e direto;

Nesta equação, o valor de intersecção (55,4%) representa o valor do rendimento médio da reação de produção do hidrogel e os demais fatores são as variáveis significativas que contribuem para a variação do rendimento. O R-quadrado da regressão (R^2) mede a proporção da variabilidade do rendimento que é explicada pelos fatores C, BC e CD, indicando a força da relação entre o rendimento e as variáveis. Desta forma, pode-se afirmar que 70% da variabilidade do rendimento pode ser atribuído à massa molar da quitosana (fator C) e aos efeitos de interação da quitosana com o pH da solução (interação BC) e com o método de adição (interação CD).

Atribuindo-se os valores normalizados de -1 para nível baixo e +1 para nível alto, os níveis das variáveis B, C e D da Eq. 19 são substituídos através de seleção adequada para que o rendimento da reação do hidrogel ALG-QUI seja maximizado. Substituindo o fator C pelo valor -1 o produto torna-se positivo ($-11,7 \times (-1) = +11,7$), contribuindo para um aumento de 11,7% no rendimento da reação. Considerando a

variável de interação, BC, uma vez que foi atribuído o valor de (-1) para C, atribui-se (+1) para B, de forma que o produto entre as variáveis seja positivo ($-10 \times (1) \times (-1) = +10$). E ainda, na variável CD, atribui-se (-1) ao fator D de forma que o produto CD seja positivo ($+9,6 \times (-1) \times (-1) = +9,6$). A soma dos termos aditivos da equação resulta em um rendimento teórico de 87%, cujos níveis dos parâmetros (C=-1, B=1 e D=-1) correspondem ao hidrogéis produzidos com BQUI, em pH 6, através do método de adição indireta, como os obtidos nas reações 3 e 4.

A massa molar da quitosana foi principal fator de influência no rendimento da reação. Os complexos ALG-QUI são formados devido à interação cooperativa entre os íons cálcio e os grupos carboxílicos do ALG, seguido pelo revestimento de quitosana pela interação dos grupos amino da cadeia com os grupos carboxílicos livres do ALG. Uma vez que a BQUI tem menor massa molar, apresenta cadeias com menor comprimento e com uma menor quantidade de grupos amino por cadeia molecular. Apesar de oferecer menos sítios de ligação com o ALG, o menor tamanho das cadeias de BQUI permite a rápida difusão no meio reacional, fazendo com que a interação com o ALG seja facilitada para formação da camada protetora de ALG, resultando em um maior rendimento. Por outro lado, o maior tamanho das cadeias de MQUI apresenta maior resistência à difusão, o que pode ter dificultado a formação à camada protetora de QUI durante o tempo de reação.

O efeito de interação BC, entre o pH e a massa molar da QUI é atribuído ao aumento do grau de interação da QUI com o ALG com o aumento do pH, conforme reportado por Gaserod [172]. Devido à proximidade do pH do meio reacional com o valor do pKa da quitosana, em pH 6, a densidade de cargas da molécula da quitosana é significativamente reduzida, levando a uma molécula menos estendida com maior coeficiente de difusão, que proporciona uma maior taxa de interação entre QUI e ALG.

O efeito de interação CD entre a massa molar da QUI e o método de preparação (CD) pode ser atribuído a maior eficiência no revestimento quando o hidrogel é produzido pelo método indireto. Becherán-Marón e colaboradores [26] reportou que a composição dos complexos polieletrólíticos ALG-QUI é independente da massa molar da quitosana. No entanto, uma vez que o revestimento de quitosana

no hidrogel é controlado por processos difusionais, o método de preparação pode ocasionar uma diferença no rendimento. Pelo método direto a adição da solução de ALG é feita no meio reacional contendo a solução de QUI e os íons cálcio. Deste modo, os íons cálcio de alta mobilidade se difundem para formação dos pontos de reticulação iônica do ALG. A baixa mobilidade difusional da MQUI pode fazer com que no tempo estabelecido de reação, devido a dificuldade de difundir para dentro da rede do hidrogel, a interação entre MQUI e ALG ocorra somente na superfície do hidrogel, causando uma diminuição do rendimento.

5.3.2 Morfologia dos hidrogel ALG-QUI

Os hidrogéis ALG-QUI apresentaram morfologia esférica, com variação nos seus diâmetros. A Figura 43 ilustra micrografias de microscopia ótica dos hidrogéis produzidos por diferentes condições de reação. A alteração de uma ou mais condições de reação, como o pH, massa molar da QUI ou teor relativo de alginato não causa mudança significativa na morfologia, onde em todos os sistemas as partículas apresentaram variação no seu tamanho. Wittaya-areekul e colaboradores [32] constataram em seu estudo a não variância do tamanho médio de partícula em função das condições de reação estudadas.

Os valores de diâmetro médio das partículas ALG-QUI (Tabela 13), mostram a variação de tamanho de partícula em cada tipo de condição de reação, que foi de 3,1 a 7,4 μm , com tamanho médio de $5,1 \pm 2,1 \mu\text{m}$. Através da análise do desvio padrão, foi constatada uma tendência das partículas produzidas pelo método direto apresentarem menor dispersão de tamanho, como os hidrogéis obtidos pelas reações 10, 11 e 12.

A Figura 44 ilustra micrografias de MEV das partículas ALG-QUI produzidas pelo método indireto com 35% de ALG, em diferentes valores de pH e tipo de quitosana. Hidrogéis produzidos em pH 6 com MQUI (Fig. 44 (a)) apresentaram menor distribuição de tamanho comparada com as produzidas em pH 4 com BQUI (Fig. 44 (b)). Desta forma, pode-se dizer que os parâmetros de estudo não influenciaram no tamanho médio das partículas, entretanto, hidrogéis produzidos pelo método direto apresentaram tamanho mais homogêneo, de forma que ainda

que de forma indireta, a morfologia das partículas mostrou-se dependente das condições de reação.

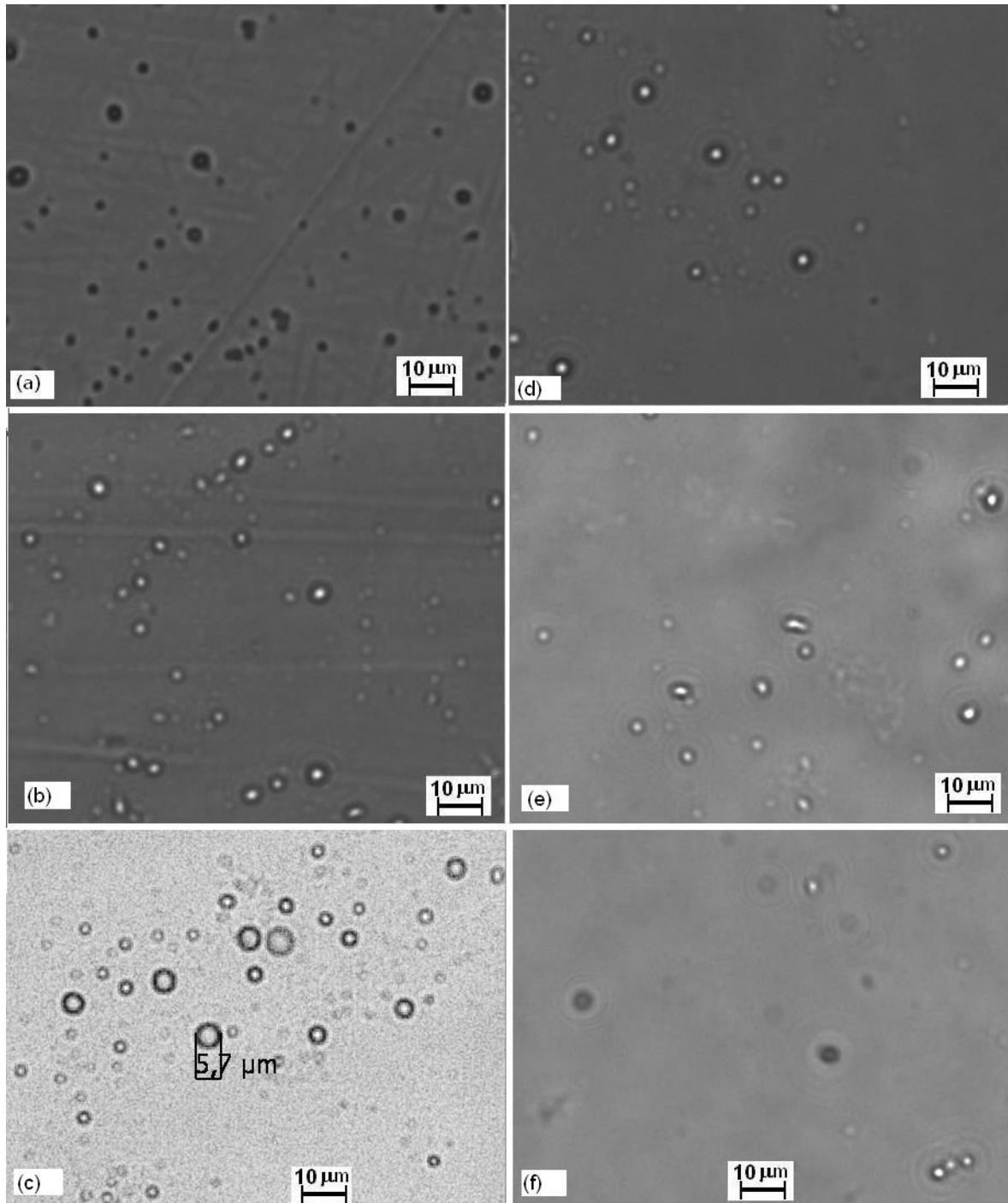


Figura 43: Morfologia das partículas ALG-QUI obtidas em diferentes condições de reação com MQUI: (a) A35, pH 4, DM (b) A75, pH6, IM (c) A35, pH6, DM; e com BQUI: (d) A35, pH6 DM (e) A75, pH6,IM f) A75, pH 4, IM.

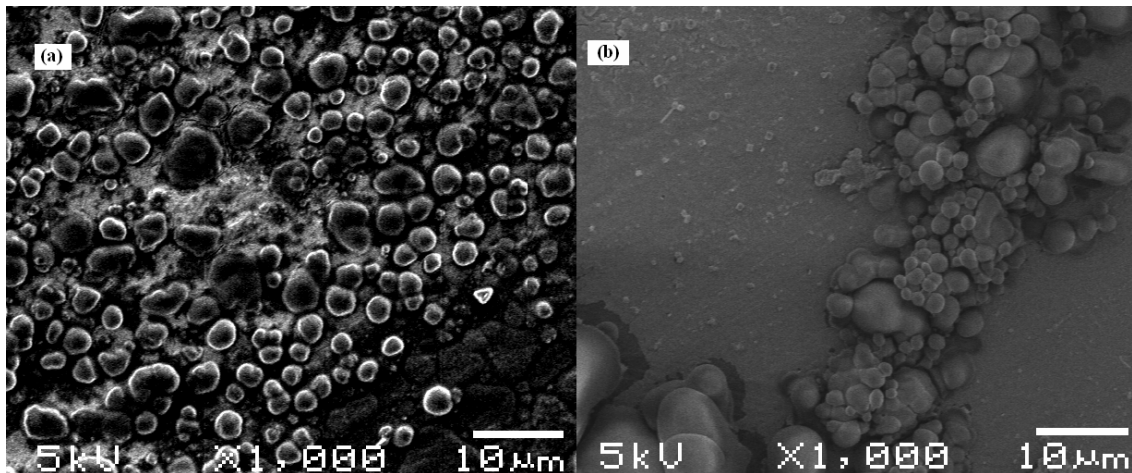


Figura 44: Micrografias de MEV ilustrando a morfologia das partículas ALG-QUI produzidas com 35% de ALG pelo método indireto com (a) MQUI e pH 6 e (b) BQUI e pH 4.

5.3.3 Grau de inchamento em função do pH

O grau de inchamento é uma propriedade que avalia a capacidade dos hidrogéis em expandir-se em meio ácido e alcalino. Hidrogéis adequados para liberação oral de fármacos devem apresentar mínimo grau de inchamento no meio gástrico (pH 1,2), para que a liberação do fármaco também seja mínima e ao passar através no meio intestinal (pH 7,4) o hidrogel apresente inchamento moderado, de forma a permitir a liberação controlada do fármaco [24]. Desta forma, o grau de inchamento dos hidrogéis foi avaliado em pH 1,2 simulando meio gástrico e em pH 6,8 e pH 7,4 simulando meio intestinal. Um fatorial fracionado 2^{4-1} foi conduzido, em duplicata, de forma a obter dados confiáveis sobre os efeitos principais. Os resultados mostraram que os hidrogéis apresentaram diferente grau de inchamento em função do tempo e do pH da solução e constam discutidos separadamente a seguir.

5.3.3.1 Grau de inchamento em meio gástrico simulado

O grau de inchamento em meio gástrico foi realizado através da observação do aumento do diâmetro dos hidrogéis imersos em pH 1,2 com o tempo de exposição. A Figura 45 ilustra os diâmetros médios de partículas com o tempo de exposição em pH 1,2, pH 6,8 e pH 7,4. Em meio gástrico simulado, (Fig. 46 (a)) observa-se que após 1h30min que o diâmetro médio das partículas não aumentou significativamente de tamanho, apresentando um valor médio de cerca de 5,0 μm , e após 6h, todos os hidrogéis aumentaram de tamanho, com uma variação no diâmetro de 10 a 14 μm . Após 24 h de exposição, o diâmetro médio das partículas

aumentou para $19 \pm 8 \mu\text{m}$, com morfologia irregular, devido à ruptura do hidrogel e aglomeração de partes, ocorrido com os hidrogéis produzidos pelas reações 3, 5 e 7.

Na Figura 46 está ilustrada na micrografia de MO da reação 3 (A35, pH6, BQUI ,IM) a irregularidade e grau de aglomeração das micropartículas após 24h de exposição em pH 1,2. A ruptura das partículas ocorre devido as expansão das cadeias de quitosana em meio ácido que, uma vez separadas do hidrogel, tornam-se solúveis. A solubilização da quitosana desfaz a camada protetora do hidrogel, fazendo com que o hidrogel ALG-Ca, por interações eletrostáticas se aproximem e se aglomerem em domínios de diferentes tamanhos.

O grau de inchamento dos hidrogéis foi calculado a partir do diâmetro médio das partículas através da Eq. 7 e constam na Tabela 14. Em meio ácido, os hidrogéis mostraram um grau de inchamento dependente do tempo de exposição, com boa resistência ao inchamento após 1h30min. Depois de 6h, o grau de inchamento do hidrogel mostrou-se dependente do teor de ALG. Observa-se que os hidrogéis contendo menor teor de ALG apresentaram menor grau de inchamento do que os obtidos com maior teor de ALG, assumindo valores de 593% e 1495%, respectivamente. Através da análise estatística de regressão linear, baseado nos valores de grau de inchamento obtidos, foi possível correlacionar o teor de ALG com o grau de inchamento após 6h em meio simulado gástrico (Eq. 20):

$$GI_{pH1,2}(\%) = 1009 + 416A \quad R^2 = 0,59 \quad (20)$$

Onde: %GI = grau de inchamento em pH 1,2 e A= teor de ALG

A equação permite algumas considerações importantes, indicando que cerca de 60% da variabilidade do grau de inchamento é atribuída exclusivamente ao teor de ALG. Para a otimização das propriedades dos hidrogéis, é desejável que estes apresentem menor grau de inchamento em pH 1,2. Desta forma, a substituição da variável A pelo seu valor normalizado (-1), que corresponde aos hidrogéis produzidos com menor teor de ALG, o produto torna-se negativo ($416 \times (-1) = -416$), contribuindo para a diminuição do grau de inchamento.

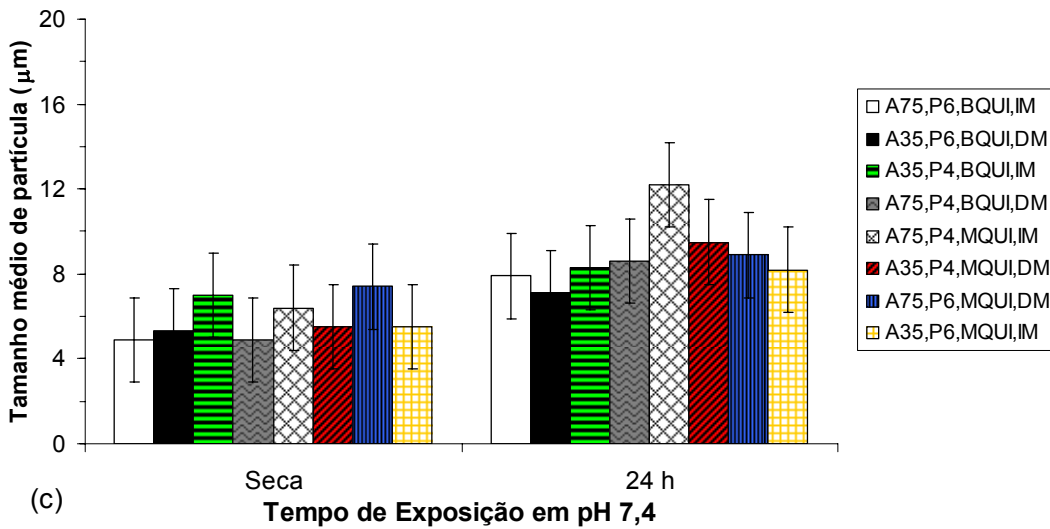
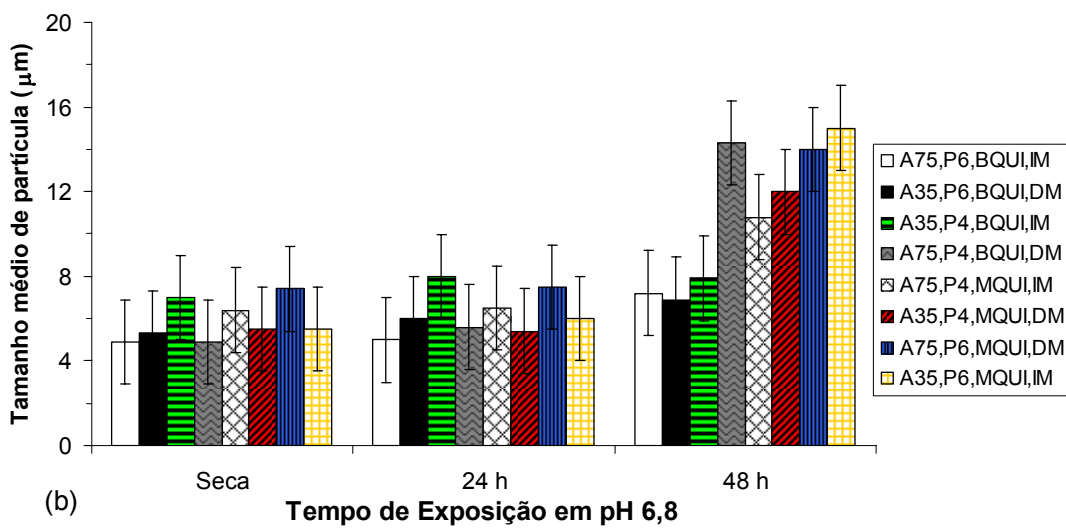
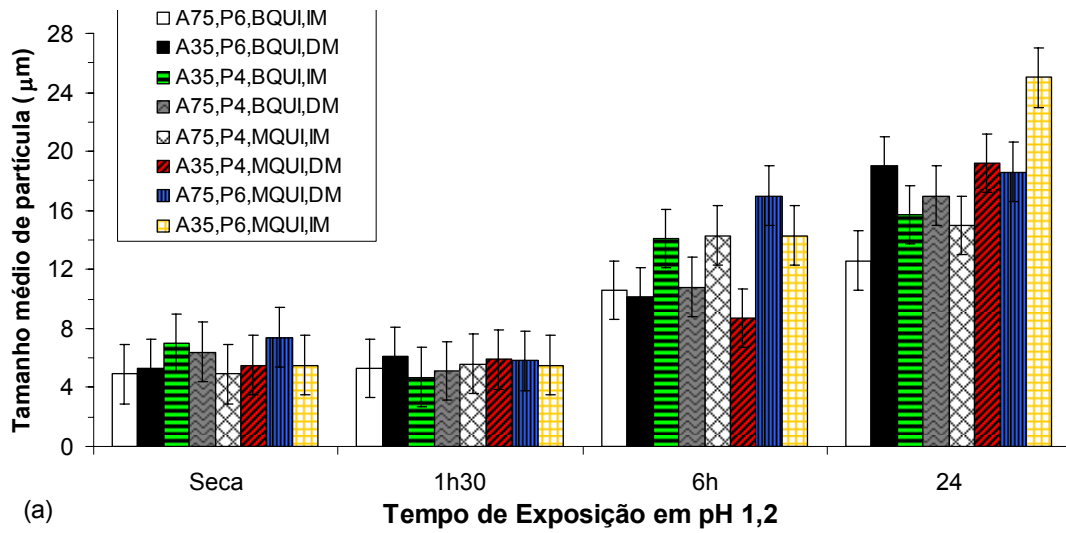


Figura 45: Variação do diâmetro de partícula dos hidrogéis em função do tempo de exposição em pH 1,2, pH 6,8 e pH 7,4.

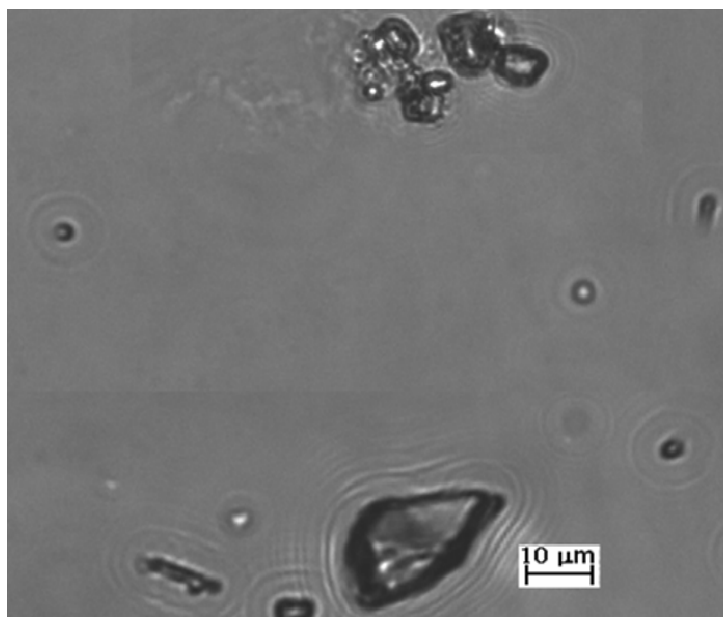


Figura 46: Micrografia de MO ilustrando a morfologia irregular e aglomerada das micropartículas obtidas pela reação 3 (A35, pH6, BQUI ,IM) após 24h de exposição em pH 1,2.

Tabela 14: Variáveis independentes e grau de inchamento dos hidrogéis em função do pH

Nº	Variáveis Independentes Condições de reação	Grau de Inchamento (%)			
		pH=1.2 ^a	pH=6.8 ^b	pH=7.4 ^c	pH=7.4 ^d
1	A35, pH4, BQUI, IM	717	146	99	155
4	A75, pH6, BQUI ,IM	2386	273	319	339
6	A75, pH4, MQUI,IM	958	335	466	653
7	A35, pH6, MQUI,IM	296	1771	81	189
10	A75, pH4, BQUI,DM	1015	422	495	329
11	A35, pH6, BQUI,DM	700	151	284	513
13	A35, pH4, MQUI ,DM	657	965	353	479
16	A75, pH6, MQUI,DM	1339	521	22	15
		Média A35: 593	Média BQUI: 248		
		Média A75: 1425	Média MQUI: 898		

^a após 6h; ^b após 48h; ^c após 24h; ^d resultados teóricos, calculados pela Eq. 21

Após 6h em pH 1,2, os hidrogéis produzidos com menor teor de ALG tem estatisticamente comprovado um menor grau de inchamento do que os produzidos com maior teor de ALG. Uma vez que a função da quitosana é a de revestir o pré-gel ALG-Ca através da interação entre os grupamentos amino e carboxílicos, um maior teor de QUI pode contribuir com um maior número de interações com ALG, e o resultante entrelaçamento contribui para a estabilidade das micropartículas, oferecendo uma maior resistência ao inchamento.

5.3.3.2 Grau de inchamento em meio intestinal simulado

O grau de inchamento em meio intestinal simulado foi realizado através da observação do aumento do diâmetro dos hidrogéis imersos em pH 6,8 e pH 7,4 em função do tempo de exposição, conforme ilustrado na Figura 46 (b) e (c). em pH 6,8, os hidrogéis apresentaram um diâmetro médio de partícula hidratado próximo dos obtidos para os hidrogéis secos após 24h de exposição, como mostrado na Figura 46 (b). Após 48h de exposição, houve aumento significativo do diâmetro de alguns hidrogéis, conforme ilustrado na Figura 47. O grau de inchamento dos hidrogéis em pH 6,8 após 48h está ilustrado na Tabela 14. Através dos valores médios do grau de inchamento conforme a massa molar de QUI, observa-se que os hidrogéis com MQUI apresentaram um grau de inchamento muito maior do que os hidrogéis com BQUI (898% e 248%, respectivamente). Os hidrogéis MQUI podem apresentar um maior grau de inchamento devido ao grande tamanho das cadeias poliméricas, que por resistência a difusão no meio reacional forma uma fina camada de revestimento na superfície ao hidrogel ALG-Ca, mais suscetível ao inchamento, conforme discutido no item 5.3.1.

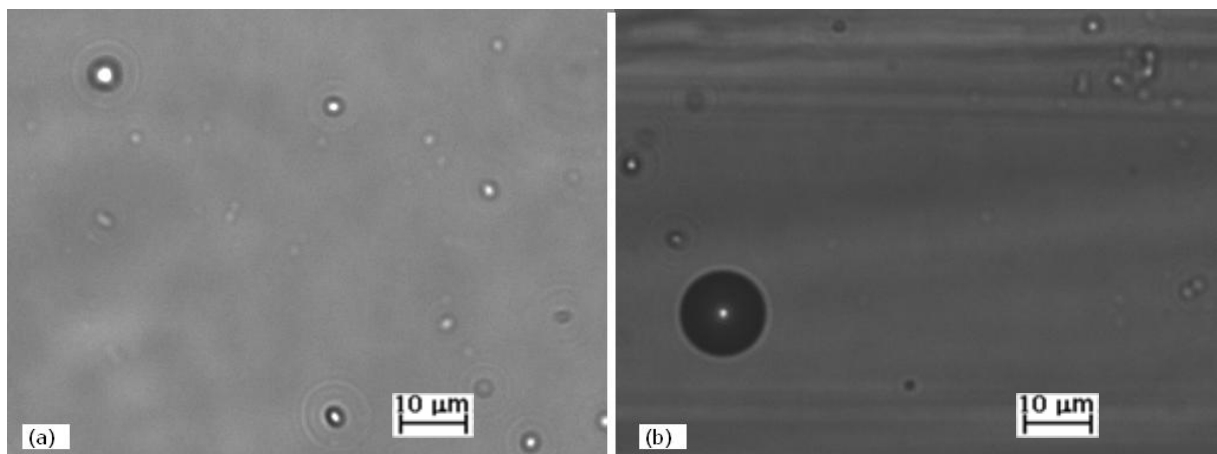


Figura 47: Tamanho de partícula obtido em pH 6,8 após 48h para os hidrogéis produzidos com 75% ALG e pH 6 com a) BQUI pelo método indireto e b) MQUI pelo método direto.

Em meio levemente alcalino, (pH 7,4), alguns hidrogéis apresentaram aumento no seu diâmetro após 24h, conforme ilustrado na Figura 45 (c). Uma comparação com os valores do grau de inchamento fornecidos na Tabela 14 indica que a variação de acordo com a condição de reação foi de 22% a 495%. Através da análise estatística através de regressão linear, baseado nos valores de grau de inchamento obtidos, foi possível correlacionar equacionar as variáveis que influenciam no grau de inchamento após 24h em intestinal simulado (pH 7,4) (Eq. 21):

$$GI_{pH7,4}(\%) = 334 - 69,7B - 87AB - 162BC \quad R^2 = 0,96 \quad (21)$$

Nesta equação, tem-se o grau de inchamento médio dos hidrogéis, que é o valor de intersecção (334%) e os fatores que contribuem para a variação do grau de inchamento neste pH. Esta equação atribui 96% da variabilidade do GI ao pH da solução nos quais foram produzidos (fator B) e aos efeitos de interação entre o teor de ALG e o pH (fator de interação AB) e da quitosana com o pH da solução (interação BC). Neste pH, é desejável que o hidrogel apresente moderado grau de inchamento, pois corresponde ao meio simulado no qual deve haver liberação controlada de fármacos.

A seleção dos níveis de cada variável foi feita de forma que o hidrogel ALG-QUI tenha um grau de inchamento moderado. Com isto, calculou-se através da equação 21 o grau de inchamento teórico para todas as condições de reação, cujo resultado experimental e os resultados teóricos, previstos pela equação 21, constam na Tabela 14. Os hidrogéis que apresentaram um grau de inchamento moderado foram obtidos pelas condições de reação com 35%ALG e pelo método indireto.

A obtenção de um hidrogel com um mínimo do grau de inchamento em meio intestinal simulado é grandemente influenciada pelo pH do meio reacional. Hidrogéis preparados em pH 6 com MQUI apresentaram menor grau de inchamento. Quando expostos em pH próximo da neutralidade, os grupamentos amino da QUI não se encontram mais protonados, limitando a capacidade de expansão da rede polimérica, conforme ilustrado na Figura 21. Quando o hidrogel apresenta menor teor de QUI a limitação da expansão da rede é aumentada, contribuindo para um

mínimo grau de inchamento. E ainda, devido à desprotonação da quitosana em meio neutro associado à maior massa molar da MQUI, as interações dos grupos amino são com o grupos carboxílicos de natureza física, e devido a maior capacidade de entrelaçamento das cadeias de MQUI com o complexo ALG-Ca, limita a expansão do hidrogel em meio neutro.

5.3.4 Potencial Zeta dos Hidrogéis

A carga relativa dos hidrogéis foi determinada através da medida do potencial zeta. Primeiramente, mediu-se o potencial em três valores de pH, a fim de observar eventuais diferenças no potencial da superfície. Assim, os valores de potencial zeta obtidos para os hidrogéis em pH 3,0, 6,8 e 7,4 estão mostrados na Tabela 15. De acordo com estes resultados, houve variação do potencial em função da composição relativa de ALG e em função do pH. O potencial Zeta no pH 3,0 e 6,8 foi negativo para hidrogéis com alto teor de ALG (reações 4, 6, 10 e 16) e positivo para os produzidos com baixo teor de ALG (reações 1, 7, 11 e 13). O mesmo comportamento se observa em pH 7,4, com exceção do hidrogel obtido pela reação 7, onde ocorre inversão do valor do potencial entre pH 6,8 e 7,4. Os hidrogéis com maiores valores de potencial têm uma maior densidade de grupos amino na superfície, que é o caso dos hidrogéis produzidos com maior teor de QUI, em particular com MQUI, como obtido na reação 13.

Tabela 15: Potencial Zeta em função do pH para os hidrogéis ALG-QUI

Nº	Condições das reações	pH do Ponto isoelétrico	Potencial Zeta (mV)		
			pH 3,0	pH 6,8	pH 7,4
1	A35, P4,CBM, IND	5,1	+25 ± 2	+17 ± 1	+19 ± 1
4	A75, P6,CBM,IND	2,5	-27 ± 1	-36 ± 3	-40 ± 2
6	A75, P4,CMM,IND	2,0	-28 ± 4	-23 ± 2	-37 ± 3
7	A35, P6,CMM,IND	7,0	+39 ± 5	+23 ± 2	-9,7± 2
10	A75, P4,CBM,DIR	3,0	-9 ± 3	-31 ± 2	-36 ± 3
11	A35, P6,CBM,DIR	9,5	+45 ± 2	+17 ± 1	+4 ± 1
13	A35, P4,CMM,DIR	6,5	+42 ± 4	+30 ± 2	+21 ± 3
16	A75, P6,CMM,DIR	3,0	-12 ± 2	-24 ± 3	-28 ± 2

A Figura 48 mostra a variação do potencial zeta em função do pH para os hidrogéis ALG/QUI. Todos os hidrogéis apresentaram uma diminuição no potencial com o aumento do pH. O ponto isoelétrico indica o pH no qual existe um balanço entre as cargas positivas e negativas. Para todas as formulações, um padrão de comportamento foi observado de acordo com o teor relativo de ALG. Para os hidrogéis com maior teor de ALG, o ponto isoelétrico situou-se entre pH 2,5 e 3,0, enquanto que para os hidrogéis com menor teor de ALG situou-se entre o pH 7,5 e 8,5. Esta constatação está de acordo com Becherán [26], no qual a carga do hidrogel mostrou uma variação com a composição relativa, com o ponto isoelétrico assumindo valores de pH em torno de 2 e 8.

Através da análise estatística por regressão linear, baseado nos valores de potencial da superfície em função do pH, relacionou-se a dependência do ponto isoelétrico com o teor de ALG nos hidrogéis (Eq. 22).

$$P_{\text{isoelétrico}} = 5,43 - 2,85A \quad R^2 = 0,96 \quad (22)$$

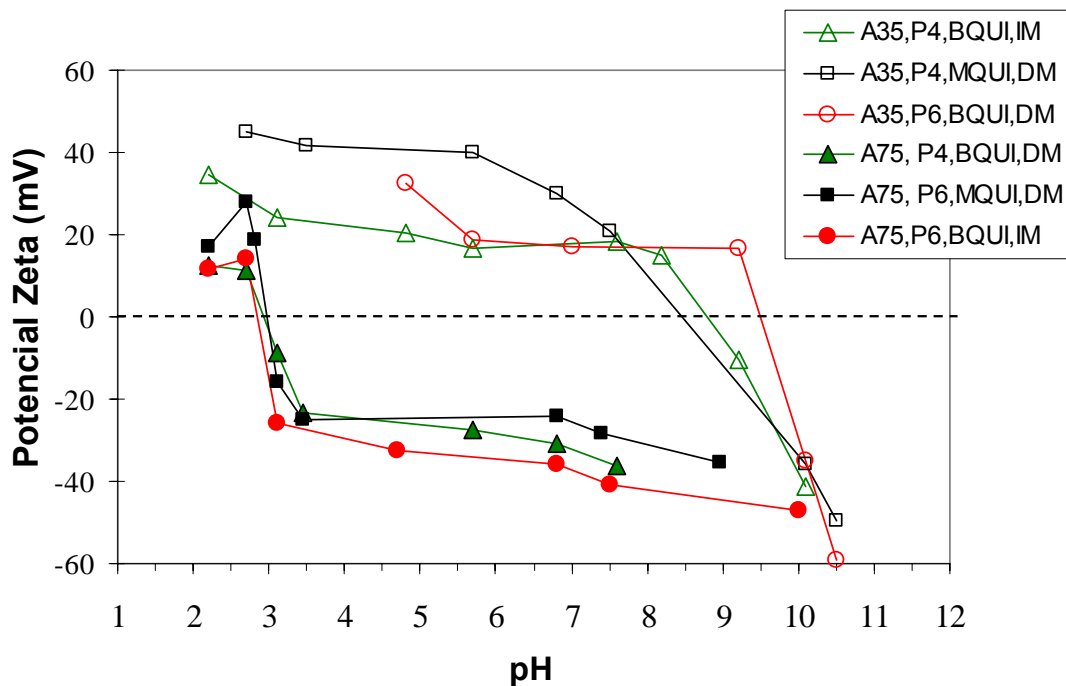


Figura 48: Variação do potencial zeta em função do pH para os hidrogéis ALG-QUI produzidos em diferentes condições de reação.

Através da análise da Eq. 22 vemos que 96% da variabilidade do potencial zeta foi atribuída ao teor de ALG. Substituindo na equação 22 a variável A pelo valor normalizado (-1), referente ao menor teor de ALG, vemos que o produto torna-se positivo ($-2,85 \times (-1) = +2,85$) e assim contribui para o aumento do pH do ponto isoelétrico.

Hidrogéis com menor teor de ALG apresentam um maior teor de QUI (35/65 ALG/QUI), logo, a superfície interna núcleo ALG-Ca do hidrogel que é carregada negativamente é revestida por uma maior quantidade de grupos amino protonados. Isto causa a neutralização das cargas negativas dos grupos carboxílicos do ALG e causa a inversão dos potenciais zeta dos hidrogéis para valores positivos até que o pH em torno de 8, que é o ponto isoelétrico do hidrogel. Em meio ácido, os grupos amino da QUI estão protonados, responsáveis pelo valor positivo dos potenciais. Assim que o pH aumenta, os grupos amino protonados se tornam desprotonados e os grupos carboxílicos do ALG se tornam ionizados, levando a uma diminuição nos potenciais. Isto implica que hidrogéis produzidos com menor teor de ALG apresentam propriedades adesivas, uma vez que a superfície carregada positivamente favorece a adesão a membranas celulares, que normalmente são carregadas negativamente [25, 28].

5.3.5 Balanço global de variáveis

O estudo da influência das variáveis através de planejamento fatorial com análise estatística através de regressão linear determinou quatro equações lineares, cada uma na qual o rendimento, o grau de inchamento em meio simulado gástrico e em meio intestinal e a carga superficial dos hidrogéis foram descritas como função dos parâmetros utilizados. Determinou-se através da Eq. 19 a existência da dependência direta da massa molar da QUI no rendimento. Considerando aceitável um rendimento superior a 80%, as reações 3, 4, 11 e 12 são enquadradas por estes requerimentos. Com a equação foi possível estabelecer que as reações realizadas em pH 6, com BQUI pelo método indireto maximizam o rendimento do hidrogel. O grau de inchamento em meio simulado intestinal se mostrou dependente principalmente do pH de formação dos hidrogéis e interações deste com o teor de ALG e com o tipo de quitosana. Com a equação foi estabelecido que hidrogéis produzidos com 35%ALG, em pH 4 com BQUI, ou em pH 6 com MQUI, condições

das reações 1,7,9 e 15, apresentam grau de inchamento moderado, o que pode permitir uma liberação prolongada e eficaz.

O grau de inchamento em meio gástrico e o potencial zeta foram variáveis que se mostraram dependente exclusivamente do teor de ALG. As equações 20 e 22 estabeleceram o grau de inchamento em pH 1,2 e o ponto isoelétrico em função do teor de ALG. Os dados experimentais e as equações previstas para estas variáveis constam na Figura 49.

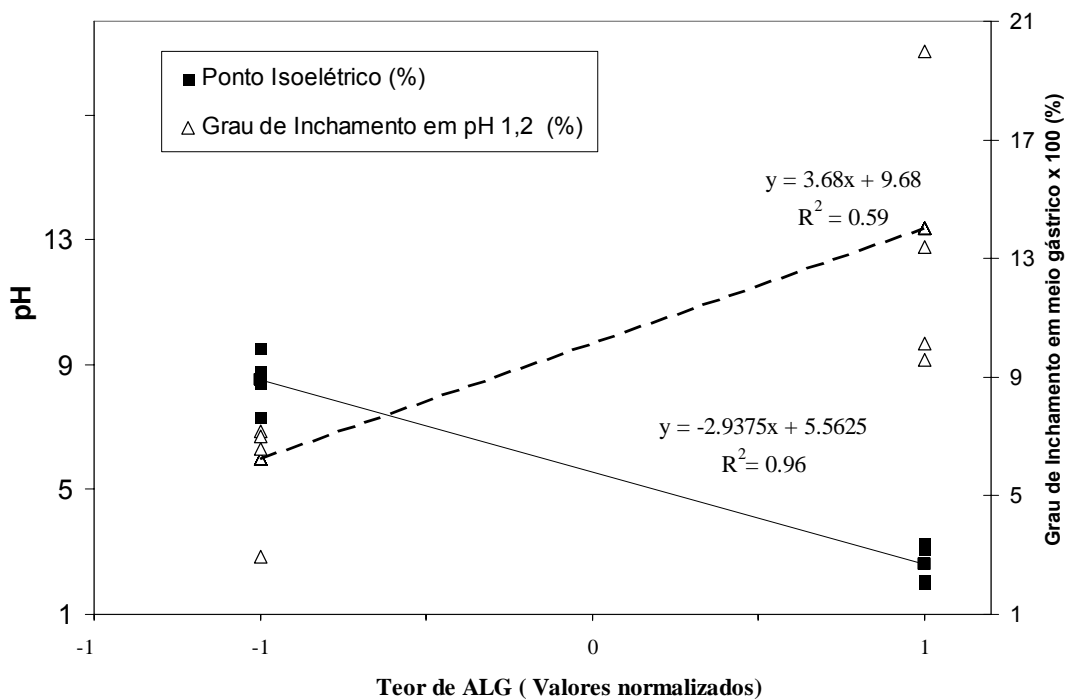


Figura 49: Grau de inchamento em pH 1,2 e ponto isoelétrico do hidrogel em função do pH. Dados experimentais (pontos) e os resultados previstos pela equação (linhas).

Considerando que os valores normalizados -1 e 1 correspondem aos teores de ALG de 35% e 75%, respectivamente, é possível prever o inchamento do hidrogel e o potencial da superfície através das equações propostas. Através da seleção das condições de reação, é possível produzir hidrogéis com propriedades adequadas para liberação de fármacos específicos, com cargas positivas na superfície e determinado grau de inchamento em meio gástrico em função do fármaco escolhido para encapsulamento e liberação. Para fármacos de tamanho pequeno, é desejável que o hidrogel apresente o menor grau de inchamento

possível em meio gástrico, e, observando através deste gráfico, é possível deduzir que o hidrogel deve ser produzido com 35% de alginato, condição que ainda favorece a formação de hidrogéis com carga potencial positiva em pH abaixo de 8, que contribui para a adesão dos hidrogéis nos tecidos do organismo. Para liberação de proteínas grandes como a insulina, deve-se considerar uma formulação que privilegie um grau de inchamento um pouco maior. Observando no gráfico, vemos que com teor relativo de alginato normalizado de -0,5 (45% ALG) obtém-se hidrogéis com maior grau de inchamento em meio gástrico e cargas positivas na superfície em pH abaixo de 7. Formulações com teor de ALG acima de 50% (acima de 0 no eixo x do gráfico) são desejáveis para liberação em meio gástrico.

5.3.6 Conclusões

Este estudo estatístico demonstrou que as variáveis independentes testadas (teor de ALG, pH da solução, massa molar da QUI e método de preparação) têm influência nas variáveis dependentes (rendimento, tamanho de partícula, grau de inchamento e potencial zeta). Apesar do tamanho médio de partícula dos hidrogéis permanecer inalterado com a mudança das condições de reação, os hidrogéis produzidos com BQUI através do método direto apresentaram um tamanho de partícula mais homogêneo. A análise estatística foi uma ferramenta útil para a interpretação dos resultados. As equações estimaram o rendimento otimizado da produção dos hidrogéis, a carga superficial do hidrogel em função do pH e o grau de inchamento em meio simulado gástrico e intestinal de acordo com as variáveis estudadas. As variáveis devem ser cuidadosamente selecionadas para produzir hidrogéis com um balanço apropriado de propriedades. Hidrogéis produzidos com BQUI em pH pelo método indireto geraram a maximização do rendimento. O grau de inchamento do hidrogel e o potencial de carga da superfície mostraram-se dependentes do teor de ALG as quais podem ser alteradas para produzir hidrogéis adequados para liberação em locais específicos do organismo. Em particular, hidrogéis produzidos com BQUI, em pH 6 com e menor teor de ALG apresentaram maior rendimento, menor grau de inchamento em meio gástrico e moderado grau de inchamento em meio intestinal, com carga superficial positiva. Estas propriedades são indicativas de que os hidrogéis apresentariam mínima liberação de um fármaco em meio gástrico simulado, limitando teoricamente a liberação de fármaco durante a passagem pelo estômago e liberação gradual de fármacos no meio intestinal. A

superfície positiva das micropartículas pode contribuir na adesão das micropartículas nas paredes do intestino.

5.4 Modificação da estrutura da quitosana para aprimoramento de propriedades

Até então, a produção de hidrogéis de QUI com ALG foi discutida, com ênfase na influência das condições de preparação nas propriedades dos hidrogéis, incluindo um estudo estatístico sobre a contribuição individual de cada fator nas propriedades finais dos hidrogéis. Estes hidrogéis são produzidos em meio ácido, com pH entre 4 e 6 e têm sido utilizados para liberação de um grande número de fármacos e proteínas. A QUI reconhecidamente melhora a penetração de peptídeos in vivo quando em pH inferior a 6,5, restrição devido à solubilidade [209]. A potencial perda da atividade biológica de fármacos em pH ácido restringe a aplicabilidade dos hidrogéis ALG-QUI.

Uma alternativa de superar as limitações da QUI é através da modificação química, na síntese de um derivativo funcional solúvel em pH neutro, que possa oportunizar a produção de hidrogéis em condições mais brandas de reação. Desta forma, os hidrogéis a base de quitosana podem melhorar a penetração de fármacos em meio intestinal, e favorecer o encapsulamento de fármacos em meio neutro, ampliando o escopo de aplicação dos hidrogéis [34-39].

A síntese de derivados carboximetílicos de quitosana é uma das propostas que se enquadram neste objetivo, pois a introdução de grupos aniônicos na estrutura química aumenta a solubilidade em meio neutro, onde as propriedades são governadas pelos grupos carboximetílicos. Estudos sobre a síntese, caracterização e avaliação das propriedades da CMQUI em meio neutro foram conduzidos nos últimos anos. [38-40, 195-196].

No entanto, enquanto que grande parte dos estudos enfatiza a produção de derivados carboxílicos altamente carboxilados [195,196], poucos estudos exploram a síntese de CMQUI com um grau intermediário de substituição para que os grupos

amino e carboxílicos possam interagir com outros polímeros iônicos na formação de hidrogéis com morfologia controlada para liberação no trato gastrointestinal.

Neste trabalho, sintetizou-se a CMQUI e se avaliou o efeito da modificação química da QUI na morfologia, no grau de inchamento em meio gástrico e intestinal e no grau de degradação do hidrogel, a fim de estabelecer diferenças no desempenho do hidrogel para utilização em liberação prolongada de fármacos no trato gastrointestinal.

5.4.1 Considerações sobre a síntese da CMQUI

Partiu-se da quitosana de baixa massa molar para realização da síntese da CMQUI, uma vez que os hidrogéis produzidos com BQUI apresentaram maior rendimento e superior desempenho no grau de inchamento em meio gástrico e intestinal do que os produzidos com MQUI. O melhor desempenho se deve a maior energia de interação da BQUI com o ALG, que reveste o hidrogel de forma efetiva. Com a síntese, busca-se aprimorar as propriedades dos hidrogéis através da introdução de grupamentos carboximetílicos na QUI.

Na síntese convencional da CMQUI, é utilizado álcool isopropílico como solvente da quitosana onde o meio reacional é alcalinizado através da adição de pequenas quantidades NaOH sólido ou em solução concentrada [40-42]. Posteriormente, é adicionado ácido cloroacético em partes, onde ocorre a inserção dos grupos carboximetílicos pela substituição de um hidrogênio das unidades glucosaminas da quitosana, que pode ser nos grupos amino e/ou nas hidroxilas primárias da quitosana. Neste trabalho, foi usada uma mistura de água e álcool isopropílico em uma razão 1:8. Conforme reportado por Chen e Park [208], a adição de água no solvente influencia a alcalinização da QUI, aumentando o grau de carboximetilação e o rendimento da reação.

5.4.2 Caracterização da CMQUI

A caracterização da síntese da CMQUI foi feita através da observação dos grupos funcionais através de FT-IR. Desta forma, os grupos funcionais do derivativo produzido foram observados e comparado com os da QUI, conforme mostra a Figura 50.

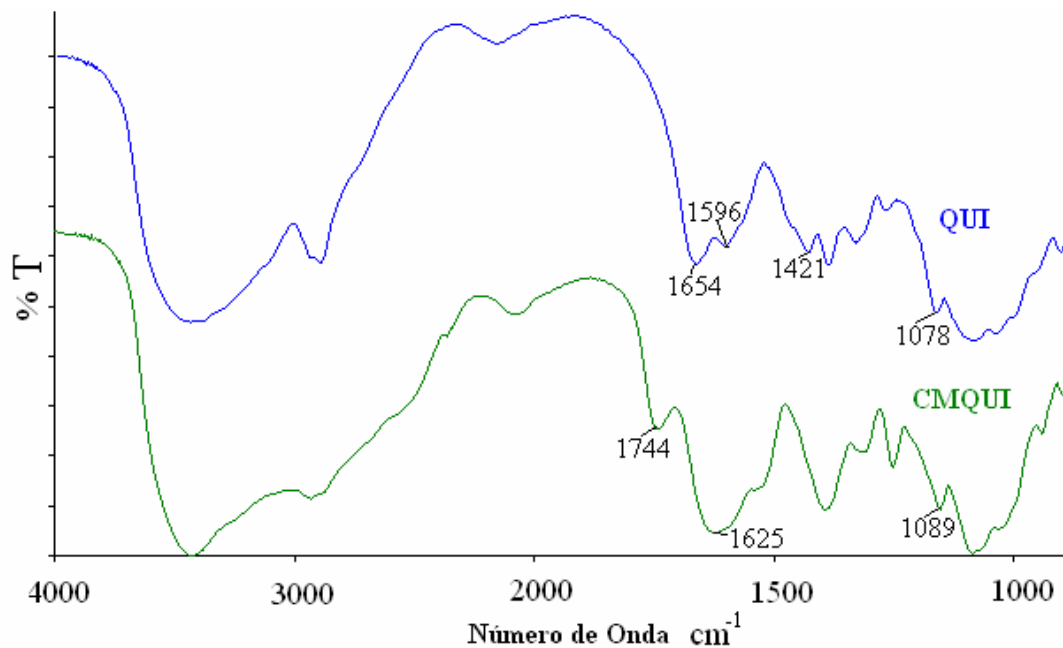


Figura 50: Espectro de infravermelho da QUI e da CMQUI

Conforme discutido anteriormente no início do Cap. 5, a cadeia de quitosana apresenta duas bandas de absorção forte do tipo amida em 1654 e 1596 cm^{-1} , correspondentes à deformação simétrica e assimétrica de amida I e II, respectivamente. Com a inserção de grupamentos carboxílicos na quitosana (CMQUI), observa-se o aparecimento de um picos de absorção em 1744 cm^{-1} , associado à formação de interações intermoleculares de dímeros carboximéticos ($\text{O}=\text{COH}\dots\text{O}=\text{COH}$). Também é possível observar que o pico característico de amida I se deslocou de 1654 para 1624 , ($\delta=20\text{ cm}^{-1}$) devido à formação de ligações intermoleculares de hidrogênio entre o grupo amida e o carboxílico ($\text{O}=\text{CNH}_2\dots\text{O}=\text{COH}$). Conforme elucidado no trabalho de Spinks e colaboradores, [209], este deslocamento ocorre devido às ligações de hidrogênio entre a amida e os grupos carboxílicos serem mais fortes do que na quitosana, uma vez que os momentos dipolares das ligações N-H são mais fracos do que as ligações O-H. A inserção de grupos carboximéticos nos sítios hidroxilados da quitosana pode ser estimada através da razão entre as áreas dos picos [208] A_{1029}/A_{1070} . Os picos em 1029 e 1070 cm^{-1} correspondem ao estiramento C-O dos grupos hidroxílicos em álcoois cíclicos secundários e primários, respectivamente. A intensidade da razão entre os picos A_{1029}/A_{1070} decresceu de $0,97$ para $0,90$, ($\delta=0,07$), um indicativo de que houve carboximetilação parcial da quitosana nos sítios de álcoois primários.

Uma curva potenciométrica foi construída segundo método descrito por Di Colo [198] para determinação do grau de carboximetilação total da amostra. As curvas de titulação da QUI e da CMQUI estão mostradas na Figura 51. Observa-se que a quitosana apresenta um ponto de inflexão, atribuído à neutralização do HCl e à desprotonação da quitosana. Uma comparação com a curva do branco (solução ácida de HCl) revela que o volume gasto para neutralização do HCl coincide com o ponto de inflexão da curva da quitosana (Fig. 51 (a)). A CMQUI apresenta dois pontos de inflexão, devido à presença de diferentes grupos ácidos que apresentam constantes de acidez semelhantes. Realizou-se uma análise derivativa da curva para identificação precisa dos pontos de inflexão, conforme consta na Fig. 51 (b). Desta forma, o primeiro ponto de máximo (30ml) corresponde ao volume de base adicionado para a neutralização do ácido clorídrico em solução (H_3O^+), onde ocorre o ponto isoelétrico da CMQUI. O segundo ponto de máximo (42 ml) corresponde à neutralização completa dos grupos ácidos, e a diferença entre os volumes dos pontos de máximo corresponde ao volume necessário para neutralizar os grupos carboximéticos (CH_2COO^-). Utilizando a equação 6, determinou-se um grau de substituição total de 55%.

Propriedades térmicas como fusão e degradação podem apresentar variação conforme suas características estruturais. A Figura 52 apresenta as curvas endotérmicas obtidas por DSC, e as curvas de estabilidade térmica da QUI e da CMQUI realizadas por TGA. Nas curvas endotérmicas, (Fig. 52a), observa-se nas duas amostras a existência de um pico centrado em cerca de 75°C devido à evaporação de água presente na amostra [210]. A amostra de CMQUI apresenta ainda um segundo pico endotérmico, em 220°C devido degradação do polímero. A estabilidade térmica dos polímeros foi avaliada por TGA, ilustrada na Fig. 52 (b). A QUI e a CMQUI apresentaram cerca de 10% de perda de massa em ~70°C, devido à evaporação de água. A segunda região de perda de massa, referente ao processo de degradação do polímero, incluindo a desidratação dos anéis sacarídeos, depolimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero, apresentou um deslocamento de 80°C em direção a maior temperatura para a CMQUI, em cerca de 2 [211]. Desta forma, estabeleceu-se que a CMQUI apresenta um aumento de estabilidade em relação a QUI, devido à inserção de um maior número de ligações covalentes por unidade repetitiva da molécula, que

requerem mais energia para serem rompidas. Este resultado está de acordo com o apresentado por Miranda [212], no qual filmes de CMQUI apresentaram maior estabilidade térmica, suportaram maior tensão e apresentam menor elasticidade que a QUI.

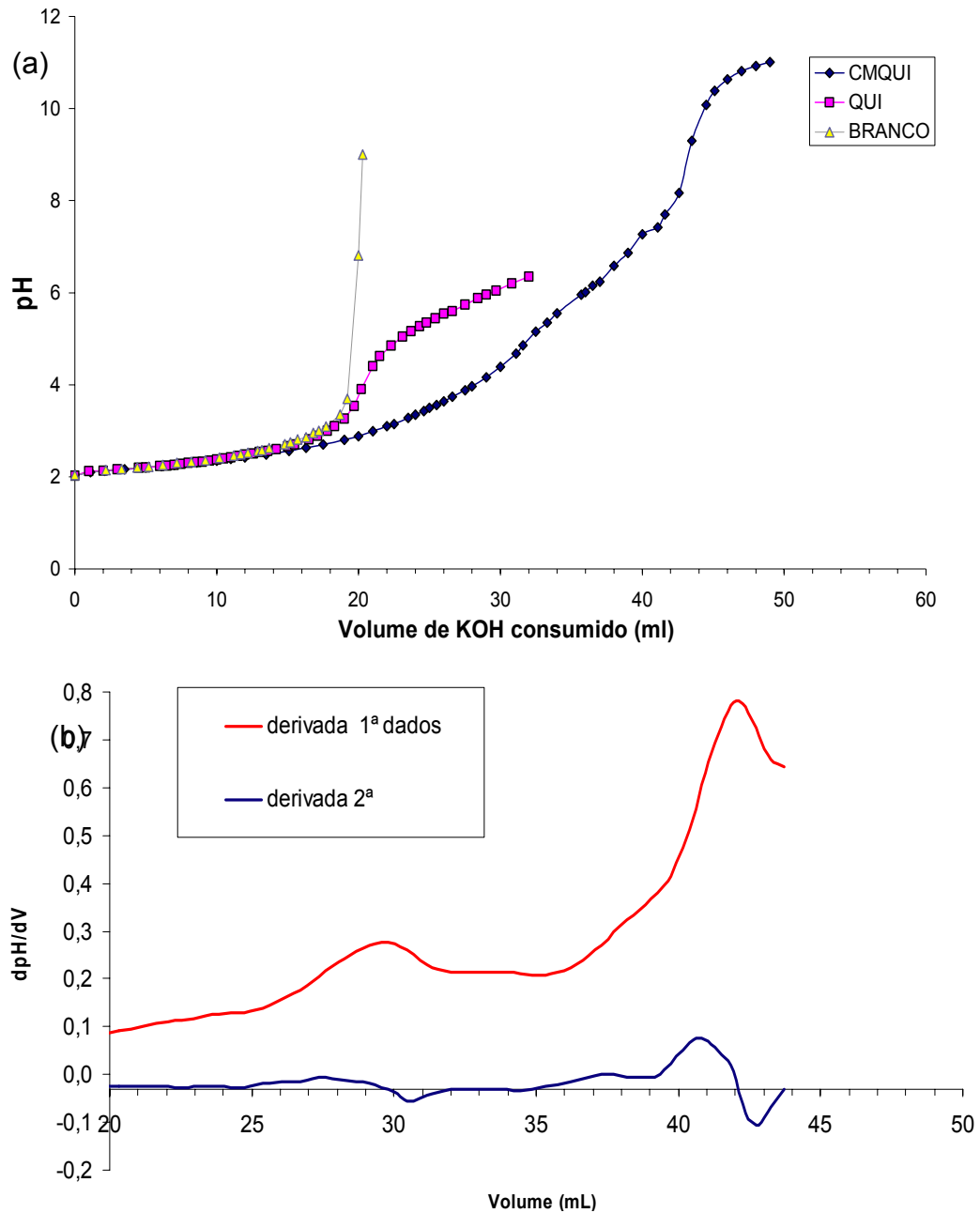


Figura 51: a) Curva potenciométrica da Quitosana e da carboximetilquitosana ; b) Derivada 1ª e derivada 2ª da curva potenciométrica da carboximetilquitosana.

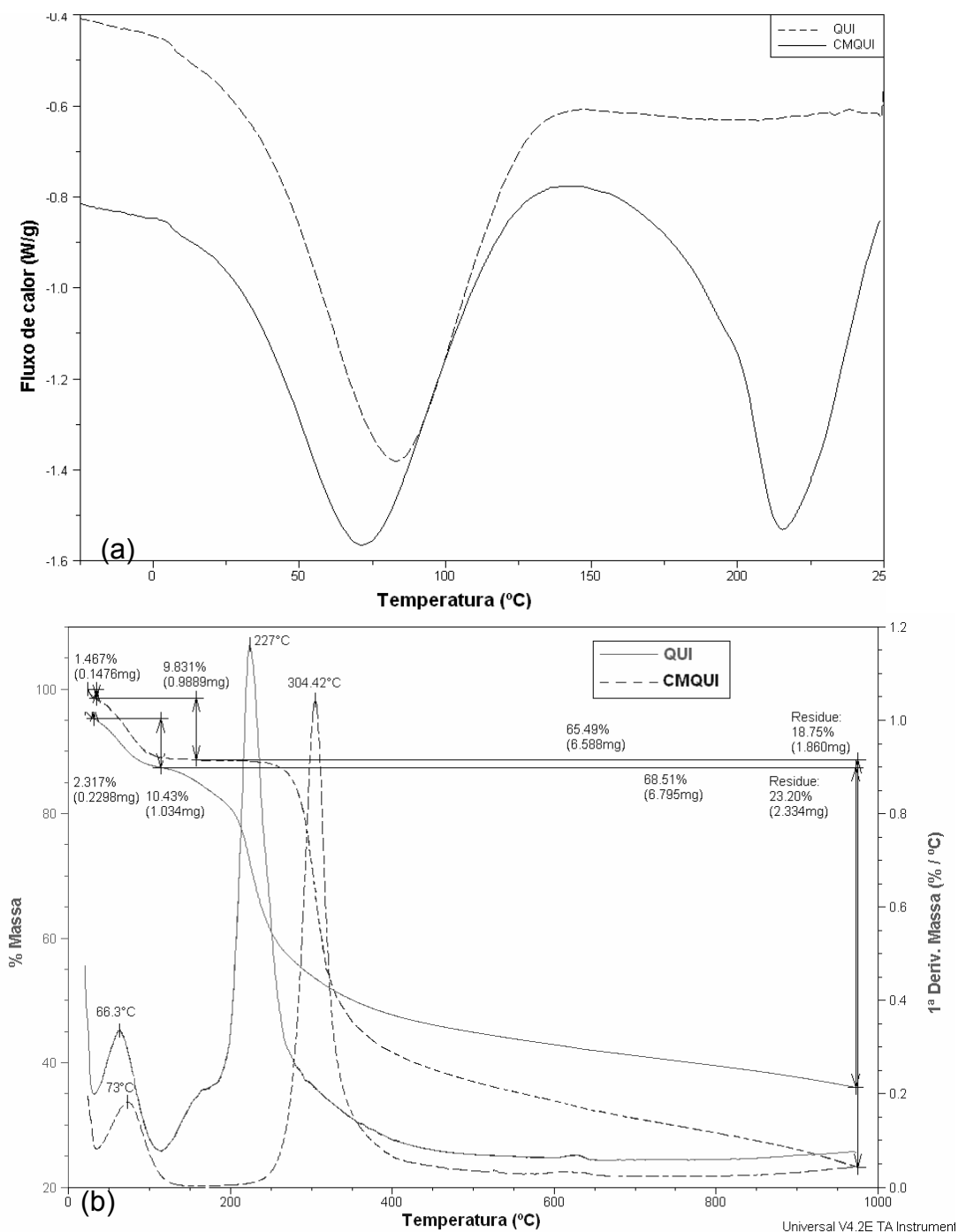


Figura 52: Termogramas das amostras quitosana (QUI) e carboximetilquitosana (CMQUI): (a) calorimetria diferencial de temperatura e (b) análise termogravimétrica.

A viscosidade e a transmitância da CMQUI e da QUI em soluções 0,2% em peso foram investigadas, conforme consta na Figura 53. A solubilidade do polímero está relacionada com a transmitância em solução, onde um polímero com maior solubilidade apresenta menor turbidez, que, por conseguinte apresenta maior transmitância. A quitosana em solução apresentou menor valor de transmitância do que a CMQUI para todas as condições de pH avaliadas. De fato, é sabido que a QUI

tem solubilidade restrita em pH abaixo do seu pKa de 6,5, quando os grupos amino se encontram protonados (NH_3^+). Com o aumento do pH, ocorre a redução da densidade de cargas dos grupos amino das cadeias da QUI, o que leva à diminuição da solubilidade, causando precipitação do polímero, observado pela redução dos valores de transmitância de 40% para 20% com o aumento do pH de 4 para 7,4. A CMQUI tem maior solubilidade em todo o intervalo de pH estudado. Em pH 4, a proximidade do pH ao valor de pKa dos segmentos carboxílicos permite a ionização parcial, que contribui para o um aumento significativo na transmitância (80%). Com o aumento do pH para 7,4, ocorre uma diminuição na transmitância para 75%, o que pode ser uma consequência da desprotonação da quitosana. Desta forma, somente os segmentos carboxílicos são responsáveis pela solubilidade da CMQUI neste pH.

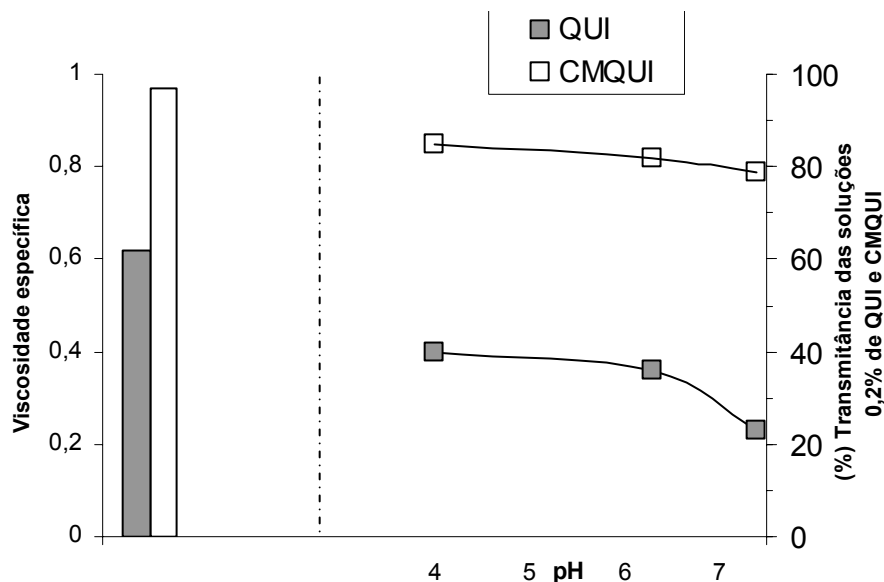


Figura 53: Viscosidade específica das soluções 0,2% de QUI e CMQUI em pH 6 e Transmitância das soluções 0,2% de QUI e CMQUI em função do pH.

A viscosidade específica das amostras em solução 0,2% em pH 6 da CMQUI é maior do que a da QUI, apresentando valores de 0,97 e 0,62, respectivamente, devido à presença de cargas positivas e negativas na estrutura da CMQUI, que podem formar segmentos levemente agregados, oferecendo maior resistência ao fluxo do que a QUI. A maior viscosidade da CMQUI pode afetar a formação dos hidrogéis, uma vez que a viscosidade das soluções afeta o coeficiente de difusão. Desta forma, o efeito de complexação iônica entre as cargas aniônicas dos grupos carboxílicos e as cargas catiônicas dos grupos amino podem ser afetados, podendo afetar a morfologia e demais propriedades dos hidrogéis. [29].

Em suma, a caracterização da carboximetilquitosana foi discutida em função do grau de carboximetilação, onde a inserção dos grupos carboximetílicos em sítios hidroxílicos e amino aprimorou a estabilidade térmica, o grau de retenção de água e a solubilidade da quitosana.

5.5 Efeito da carboximetilação nas propriedades dos hidrogéis com ALG

A influência da modificação química da quitosana na formação de hidrogéis com ALG em pH 4 e 6 foi estudada de forma comparativa, visando a obtenção de um hidrogel com propriedades otimizadas. Valeu-se de um planejamento fatorial 2³, usando estatística ANOVA para identificar modificações na morfologia, no grau de inchamento em meio gástrico e intestinal e na estabilidade térmica dos hidrogéis, para utilização em sistemas de liberação prolongada de fármacos. Trabalhou-se com duas novas faixas de teor relativo de ALG, 40 e 80%p/p, em meio reacional de pH 4 e 6. A obtenção dos hidrogéis foi feita pelo método indireto visando a maximização do rendimento. Hidrogéis de ALG/BQUI foram produzidos nas mesmas condições, para comparação dos resultados. A Tabela 16 mostra as condições de reação para produção de cada hidrogel e o respectivo rendimento de cada reação.

Tabela 16: Condições de reação para cada hidrogel produzido e seu respectivo rendimento.

	Condições de Reação*	Rendimento (%)
1	40A,pH4,QUI	55
2	80A,pH4,QUI	52
3	40A,pH6,QUI	102
4	80A,pH6,QUI	92
	Media	75%
5	40A,pH4,CMQUI	61
6	80A,pH4,CMQUI	43
7	40A,pH6,CMQUI	27
8	80A,pH6,CMQUI	36
	Media	42%

* 40A or 80A = 40 ou 80% de teor de ALG;

Pode-se observar que o rendimento dos hidrogéis carboximetílicos foi inferior aos hidrogéis convencionais. Provavelmente pela existência das cargas negativas

no derivativo da quitosana pode haver uma repulsão iônica com os grupos carboxílicos do ALG. A interação entre CMQUI e ALG se efetuou através de dois mecanismos. O primeiro estabelecido foi através dos grupos amino protonados com os grupos carboxílicos do ALG, igual ao estabelecido para a QUI. No entanto, a presença de cargas negativas na CMQUI pode fazer com que se estabeleça um segundo mecanismo de interação com os grupos carboxílicos do ALG, onde os íons cálcio atuam como agente de reticulação iônico entre as duas cadeias. A diminuição do pH aumenta a quantidade de grupos amino protonados, aumentando o número de interações entre os grupos amino e os carboxílicos, fortalecendo as ligações do hidrogel, aumentando o rendimento da reação. Esta consideração está de acordo com o descrito por Lin e colaboradores [40] no estudo de hidrogéis de CMQUI com ALG reticulados com cálcio.

Foi discutido o efeito da carboximetilação na morfologia, grau de inchamento e estabilidade térmica dos hidrogéis. A metodologia de estudo identificou as variáveis independentes que afetam as variáveis dependentes. Os efeitos de cada fator foram avaliados em dois níveis e a estatística ANOVA aplicada evidenciou a relevância de cada fator nas propriedades relacionadas. Variáveis significativas com 93% de confiabilidade estatística apresentam um valor de referência F superior a 4,0.

5.5.1 Morfologia dos hidrogéis ALG-CMQUI

A carboximetilação da quitosana produziu hidrogéis com ALG de morfologia semelhante aos hidrogéis convencionais de QUI-ALG. No entanto, o tamanho médio das partículas variou conforme a modificação química da quitosana. Na Figura 54, o tamanho médio dos hidrogéis está mostrado em função das condições de reação. Os hidrogéis de quitosana QUI têm maior tamanho de partícula do que os produzidos com CMQUI, onde os hidrogéis de CMQUI apresentaram uma menor dispersão de tamanho, independentemente das condições de reação. Baseados no tamanho de partícula e no desvio padrão, a significância do teor de alginato (A), pH (B) e tipo de quitosana (C), e interações entre as variáveis foram avaliados estatisticamente.

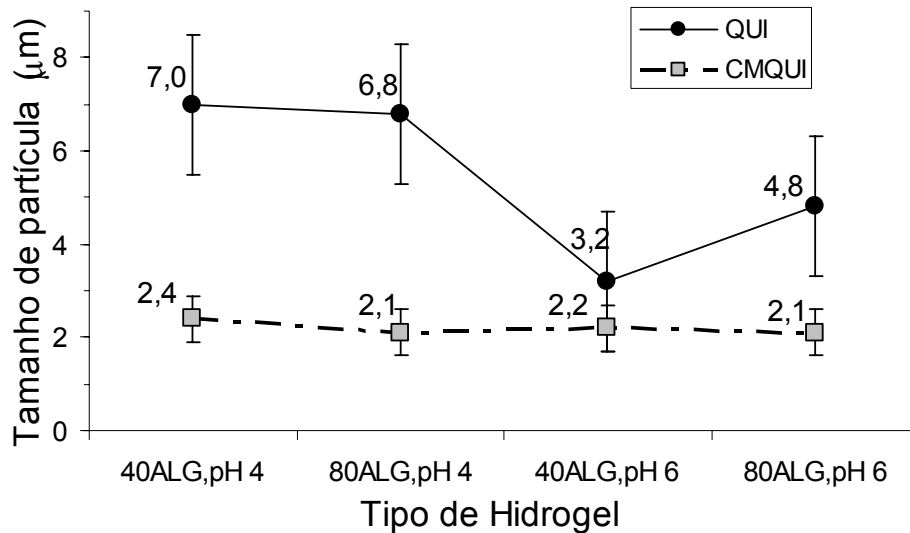


Figura 54: Tamanho de partícula em função do tipo de hidrogel produzido.

A Tabela 17 apresenta os resultados da análise ANOVA no tamanho de partícula, incluindo a soma dos quadrados (SQ), grau de liberdade (gl), média quadrada (MQ) e o teste F para todas as variáveis e suas interações.

Tabela 17: Resultados da estatística ANOVA para o tamanho de partícula, com a soma dos quadrados, (SQ), grau de liberdade (gl), media quadrada (MQ) e teste F para todas as variáveis e suas interações

Efeito	SQ	gl	MQ	F	Teste F
A (ALG)	0,5		0,5	0,3	4,0
B (pH)	9,0	1,00	9,0	4,8	4,0
AB (ALG/pH)	0,6		0,6	0,3	4,0
C (QUI)	42,3	1,00	42,3	22,5	4,0
AC (ALG/QUI)	1,2		1,2	0,6	4,0
BC (pH/QUI)	7,8	1,00	7,8	4,2	4,0
ABC(ALG/pH/QUI)	0,4		0,4	0,2	4,0
Error	22,6	12,00	1,9		
Total	84,4	15,00			

Observando os valores do fator F na Tabela 17, constatou-se que os efeitos significantes que afetam o tamanho de partícula foram B e C, ou seja, o pH e a natureza da quitosana. Devido ao maior valor do fator F (22,5), pode-se dizer que a modificação química da quitosana é o mais significativo. Desta forma, hidrogéis

produzidos com CMQUI tem menor tamanho de partícula e menor desvio padrão ($2,3\mu\text{m} \pm 0,5$) do que os produzidos com QUI ($5,5\mu\text{m} \pm 1,5$). O pH da solução (B) apresentou um efeito com fator F de 4,8, indicando que os hidrogéis produzidos em pH 4 foram maiores do que os produzidos em pH 6. E ainda, a combinação dos fatores pH e tipo de quitosana teve um efeito sinérgico e causou um efeito de interação BC, com valor F de 4,2. Desta forma, os hidrogéis produzidos com QUI em pH 4 apresentaram o maior tamanho de partícula ($7,0 \mu\text{m}$). A CMQUI apresenta menor tamanho de partícula do que a QUI devido à diminuição de grupos amino na superfície do hidrogel, que restringe a habilidade deste em expandir no meio reacional. Quanto ao efeito do pH, com o aumento da acidez do meio reacional, os hidrogéis apresentam as redes poliméricas mais expandidas devido à protonação dos grupamentos amino. Uma vez que a CMQUI tem substituição parcial dos grupos amino, o aumento do tamanho de partícula destes hidrogéis com a diminuição do pH é menor do que nos hidrogéis de QUI, fazendo que exista uma interação sinérgica que favorece um significativo aumento de tamanho de partícula para os hidrogéis de QUI.

A Figura 55 ilustra micrografias de MEV de hidrogéis com 80% de ALG produzidos em pH 4 e pH 6. Os hidrogéis produzidos em pH 4 (Fig. 58 (a), (c)), apresentaram partículas de maior tamanho do que as produzidas em pH 6 (Fig. 58 (b), (d)), ilustrando o efeito BC. Em geral, para liberação de fármacos, é desejável trabalhar com partículas com menor dispersão de tamanho de forma a obter encapsulamento homogêneo e liberação controlada. As condições que geraram hidrogéis com melhores propriedades foram com menor teor de ALG (40% p/p) em pH 6, tanto para a QUI ($3,2 \mu\text{m} \pm 1,5$) quanto para CMQUI ($2,2 \mu\text{m} \pm 0,5$).

5.5.2 Grau de inchamento dos hidrogéis ALG-CMQUI

Avaliou-se o aumento do tamanho dos hidrogéis conforme o meio de exposição em função do tempo, através da obtenção do grau de inchamento. Partindo-se do diâmetro médio dos hidrogéis medido em meio gástrico e intestinal simulado (SGF e SIF, respectivamente), calculou-se o grau de inchamento usando a Eq. 7. A influência das variáveis foi avaliada estatisticamente por ANOVA. O grau de inchamento dos hidrogéis em SGF e SIF foi discutido separadamente, conforme disposto a seguir:

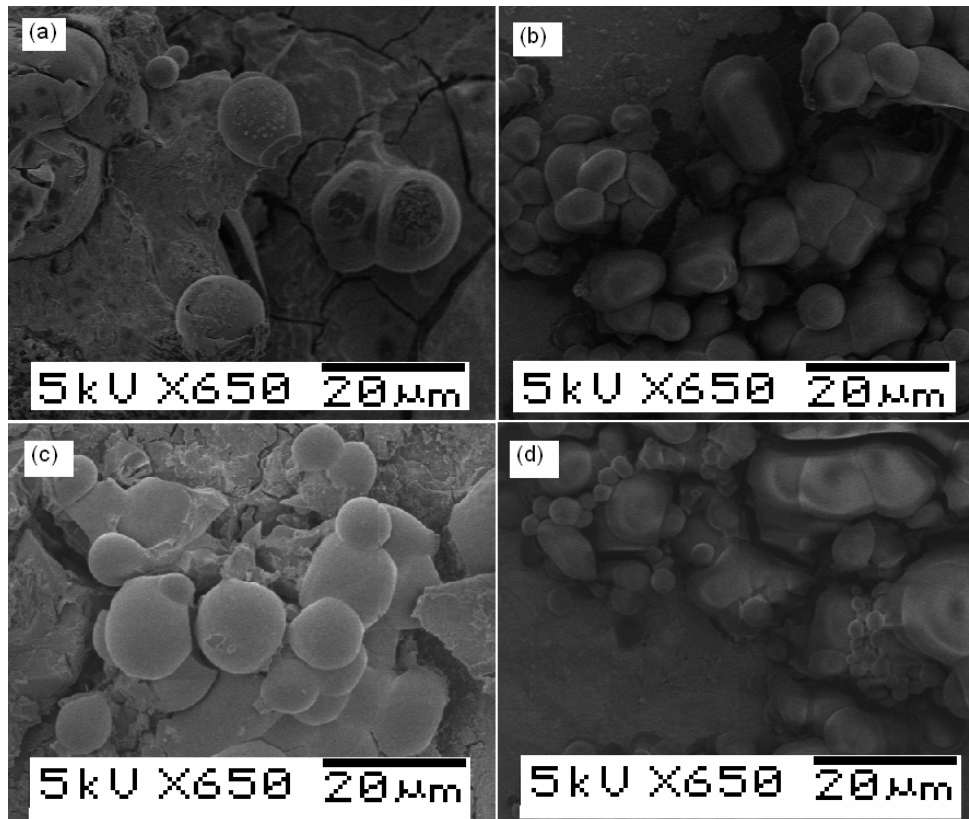


Figura 55: Micrografias MEV dos hidrogéis com 80%ALG produzidos com QUI em pH 4 (a), QUI em pH 6 (b), CMQUI em pH 4 (c) CMQUI em pH 6 (d).

5.5.2.1 Grau de inchamento em SGF

Na Tabela 18 constam os valores da soma dos quadrados, (SQ), grau de liberdade (gl), media quadrada (MQ) e teste F para todas as variáveis e suas interações no grau de inchamento dos hidrogéis ALG-QUI e ALG-CMQUI em meio gástrico simulado após 24h.

Tabela 18: Resultados da estatística ANOVA para o grau de inchamento em SGF (pH 1,2), com a soma dos quadrados, (SQ), grau de liberdade (gl), media quadrada (MQ) e teste F para todas as variáveis e suas interações

Efeito	SQ	gl	MQ	F	F teste
A (ALG)	861,402	1.0	861,402	3.1	4.0
B (pH)	196,169		196,169	0.7	4.0
AB (ALG/pH)	1,154,293	1.0	1,154,293	4.2	4.0
C (QUI)	1,152,293	1.0	1,152,293	4.2	4.0
AC (ALG/QUI)	56,864		56,864	0.2	4.0
BC (pH/QUI)	888,612	1.0	888,612	3.2	4.0
ABC(ALG/pH/QUI)	611,444		611,444	2.2	4.0
Erro	3,100,916	11.0	281,901		
Total	7,157,516	15.0			

Os efeitos significantes no grau de inchamento em meio gástrico foram C e AB, ou seja, tipo de QUI e a interação entre o teor de ALG e pH da solução, ambos com valor F de 4,2.

A Figura 56 apresenta o grau de inchamento em SGF e em SIF em função do tipo de hidrogel. O efeito da natureza da QUI (C) no grau de inchamento em SGF pode ser observado na Fig. 56 (a), de forma que os hidrogéis ALG-QUI tem um maior grau de inchamento do que os ALG-CMQUI. A quitosana apresenta grupamentos positivos que em meio ácido contribuem para a expansão da rede, aumentando o grau de inchamento. O menor GI dos hidrogéis ALG-CMQUI pode ser atribuído à formação da camada protetora de CMQUI ao redor do hidrogel ALG-Ca pelos grupamentos amino; logo, na superfície do hidrogel, predominam os segmentos carboxílicos da CMQUI, que, por sua vez, não tendem a expandir em meio ácido.

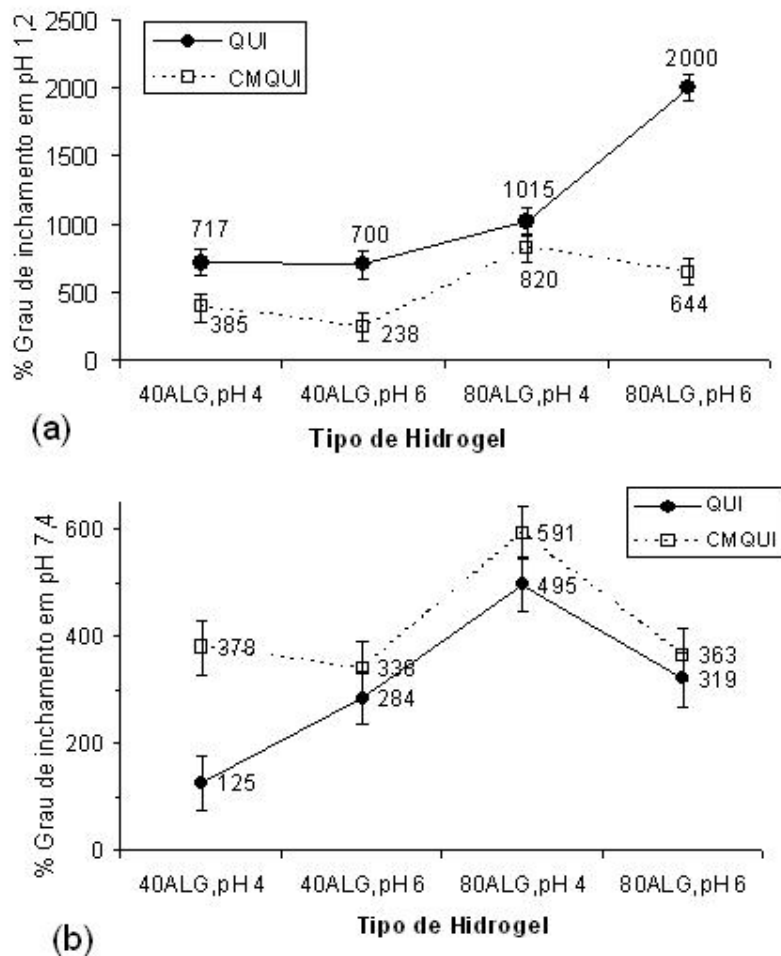


Figura 56: Variação no grau de inchamento em função do tipo de hidrogel: a) em fluido gástrico simulado (SGF), pH 1,2 e b) em fluido intestinal simulado (SIF) pH 7,4.

Entretanto, os hidrogéis de QUI e CMQUI produzidos com 40%ALG mostraram menor grau de inchamento em SGF do que os produzidos com 80%ALG, independentemente do pH da solução em que foi produzido. Este resultado contraria os obtidos por Lin e colaboradores [40], onde o grau de inchamento de hidrogéis de ALG com CMQUI foi proporcional ao aumento da quantidade de CMQUI no hidrogel. Este efeito pode ser atribuído à presença de uma quantidade mínima de QUI para que seus grupamentos amino contribuam para a formação da camada de revestimento, onde pelo entrelaçamento das cadeias de ALG e QUI, ocorra um aumento da estabilidade das micropartículas. Desta forma, um maior teor de QUI no hidrogel favorece a estabilidade das partículas, pois oferece maior resistência ao inchamento. Hidrogéis com maior teor de ALG não apresentam a quantidade mínima de cadeias de QUI necessária para que a formação da camada superficial tenha efeito protetor. A contribuição do teor de ALG no grau de inchamento em SGF foi observado no item 5.3.3.1, onde foi estabelecido uma equação linear correlacionando o aumento de ALG no hidrogel com aumento do GI. O efeito de interação (AB) é observado em 80% de ALG e pH 6, cuja combinação levou aos maiores valores de grau de inchamento. Uma vez que a QUI tem uma maior quantidade de grupos amino protonados emaranhados com as cadeias poliméricas, em meio ácido as forças repulsivas causam o inchamento do hidrogel [214].

Sumarizando, os hidrogéis que apresentaram um menor GI em SGF foram com 40%ALG em pH 6, onde a substituição de QUI por CMQUI reduz significativamente o grau de inchamento, conforme já discutido, o que é desejável para liberação prolongada no trato gastrintestinal, pois pode prevenir a liberação instantânea no estômago, antes que chegue no intestino.

5.5.2.2 *Grau de inchamento em SIF*

O grau de inchamento em fluido intestinal simulado (SIF) após 24h foi avaliado para os hidrogéis. A Figura 57 mostra as micrografias de microscopia ótica dos hidrogéis hidratados com 40%ALG em pH 7,4. Pode-se observar que os hidrogéis apresentaram diferença no tamanho de acordo com as condições de reação, onde os hidrogéis produzidos com QUI em pH 4 e 6 (Fig. 5(c) e (d), respectivamente) têm maior diâmetro ($8,5 \pm 2,9\mu\text{m}$) do que aqueles produzidos com CMQUI ($4,2 \pm 1,0\mu\text{m}$), (Fig. 57 (a) e (b)).

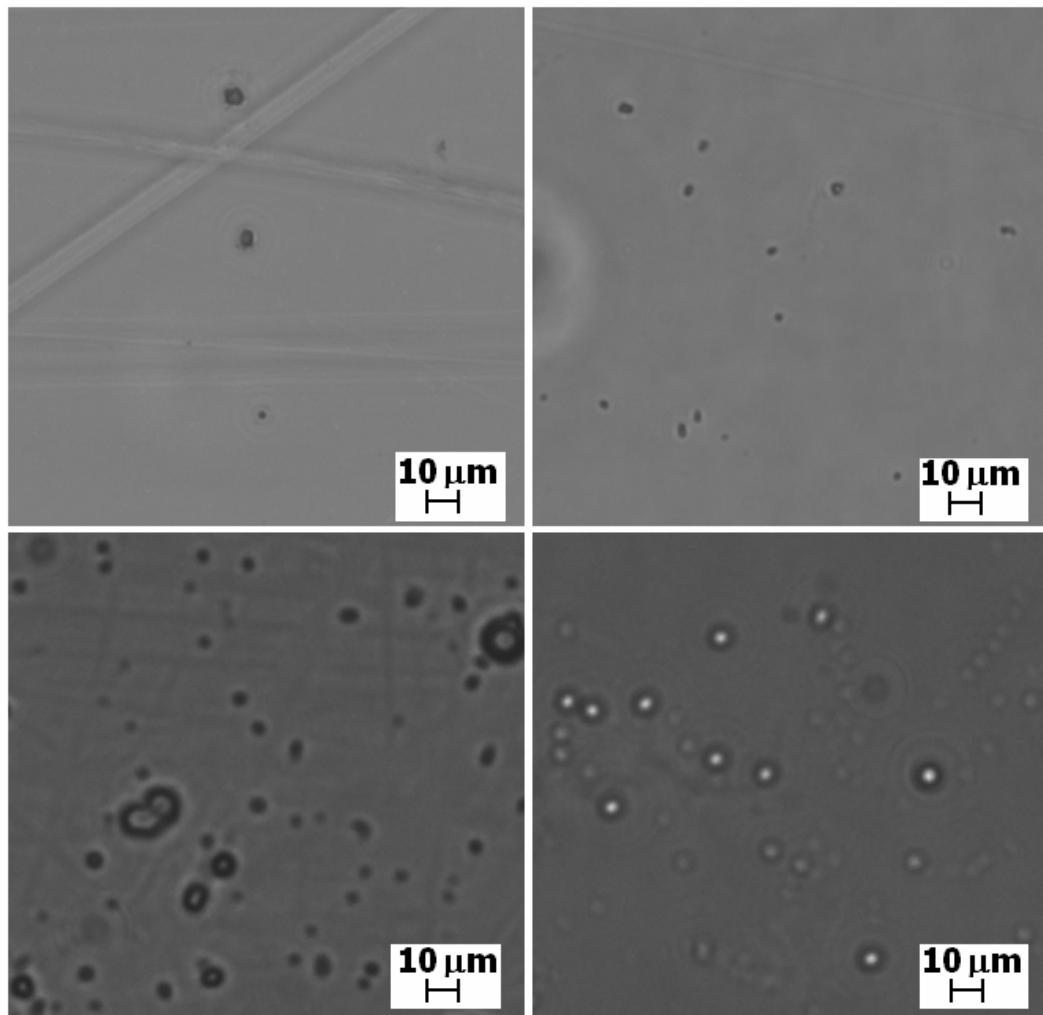


Figura 57: Micrografias de microscopia ótica de hidrogéis produzidos com 40%ALG hidratados em pH 7,4 por 24h e produzidos em diferentes condições de reação: com CMQUI em pH 4 (a) e pH 6 (b), e com QUI em pH 4 (c) e pH 6 (d).

A Figura 56 (b) apresenta o grau de inchamento em função das condições de reação. Os hidrogéis com 80% de ALG e pH 4 apresentaram um grau de inchamento superior às demais condições de reação. Em meio intestinal simulado, a maior quantidade de QUI leva a uma maior quantidade de grupos amino, que mesmo com baixo grau de protonação neste pH, formam interações lábeis com ALG e inibem o inchamento do núcleo de ALG-Ca [214]. Os hidrogéis de QUI têm menor grau de inchamento do que aqueles com CMQUI, devido à presença de grupos carboxílicos que tendem a expandir em meio levemente alcalino. Com maior teor de ALG e menor pH, a quantidade de grupos amino se torna insuficiente para formar a membrana protetora tanto para os hidrogéis contendo QUI quanto os hidrogéis contendo CMQUI, aumentando similarmente o grau de inchamento. A análise

estatística por ANOVA, no entanto, usando 93% de intervalo de confiança, não confirmou a influencia do teor de ALG e do pH no grau de inchamento em SIF, como mostrado na Tabela 19 pela não significância do Fator F para todas as variáveis e suas interações. Entretanto, os efeitos que apresentaram maior Fator F são o tipo de QUI (3,4) e o efeito de interação do ALG com pH (3,3). No entanto, se o intervalo de confiança for reduzido para 89%, estes efeitos passam a ser significativos, onde os hidrogéis de CMQUI podem apresentar um leve aumento em SIF. Desta forma, a modificação química da quitosana reduz significativamente o grau de inchamento em SGF, mantendo o grau de inchamento em SIF. Este é um indicativo confiável que o uso de CMQUI no lugar de QUI na composição do hidrogel pode reduzir a liberação instantânea de fármaco no meio gástrico, mantendo a habilidade do inchamento requerida em meio intestinal para uma liberação controlada promissora.

Tabela 19: Resultados da estatística ANOVA para o grau de inchamento em SIF (pH 7.4) , com a soma dos quadrados, (SQ), grau de liberdade (gl), media quadrada (MQ) e teste F para todas as variáveis e suas interações.

Efeito	SQ	gl	MQ	F	F teste
A (ALG)	998,856	1,0	998,856	2.7	4.0
B (pH)	195,916	1,0	195,916	0.5	4.0
AB (ALG/pH)	1,198,689	1,0	1,198,689	3.3	4.0
C (QUI)	1,237,401	1,0	1,237,401	3.4	4.0
AC (ALG/QUI)	65,868	1,0	65,868	0.2	4.0
BC (pH/QUI)	790,766	1,0	790,766	2.2	4.0
ABC(ALG/pH/QUI)	561,434	1,0	561,434	1.5	4.0
Erro	3,293,768	9,0	365,974		
Total	8,276,829	15,0			

5.5.3 Grau de degradação em função do tempo

Os hidrogéis de QUI e CMQUI produzidos em pH 6 com 40% ALG apresentaram um melhor balanço de propriedades, com menor tamanho de partícula e menor grau de inchamento em SGF, de forma que se avaliou a estabilidade térmica destes hidrogéis a fim de observar a estabilidade térmica dos hidrogéis em função da temperatura. Conforme discutido no item 5.4.2, a CMQUI apresenta superior estabilidade térmica do que a QUI, onde ambas apresentaram 10% de perda de massa em $\sim 70^{\circ}\text{C}$, devido à evaporação de água, e à perda de massa, referente ao processo de degradação do polímero, foi deslocada em 80°C em direção a maior temperatura para a CMQUI [211]. A Figura 58 mostra a perda de

massa em função da temperatura para os hidrogéis ALG/QUI e ALG/CMQUI. Os hidrogéis de QUI/ALG apresentaram uma perda de massa em 71°C correspondente a evaporação de água, e duas perdas de massa em 228°C e 296°C, que corresponde à degradação do hidrogel. Entretanto, os hidrogéis ALG/CMQUI apresentaram um deslocamento na temperatura de evaporação da água para 109°C, e as perdas de massa correspondente à degradação do hidrogel se deslocaram para 360°C e 447°C, evidenciando o aumento da estabilidade térmica do hidrogel devido à inserção de grupamentos carboximéticos. Os hidrogéis podem ter apresentado maior estabilidade térmica devido ao aumento de interações intermoleculares por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila e amino da CMQUI com os grupos carboxílicos do ALG, conforme reportado em Zhou [213].

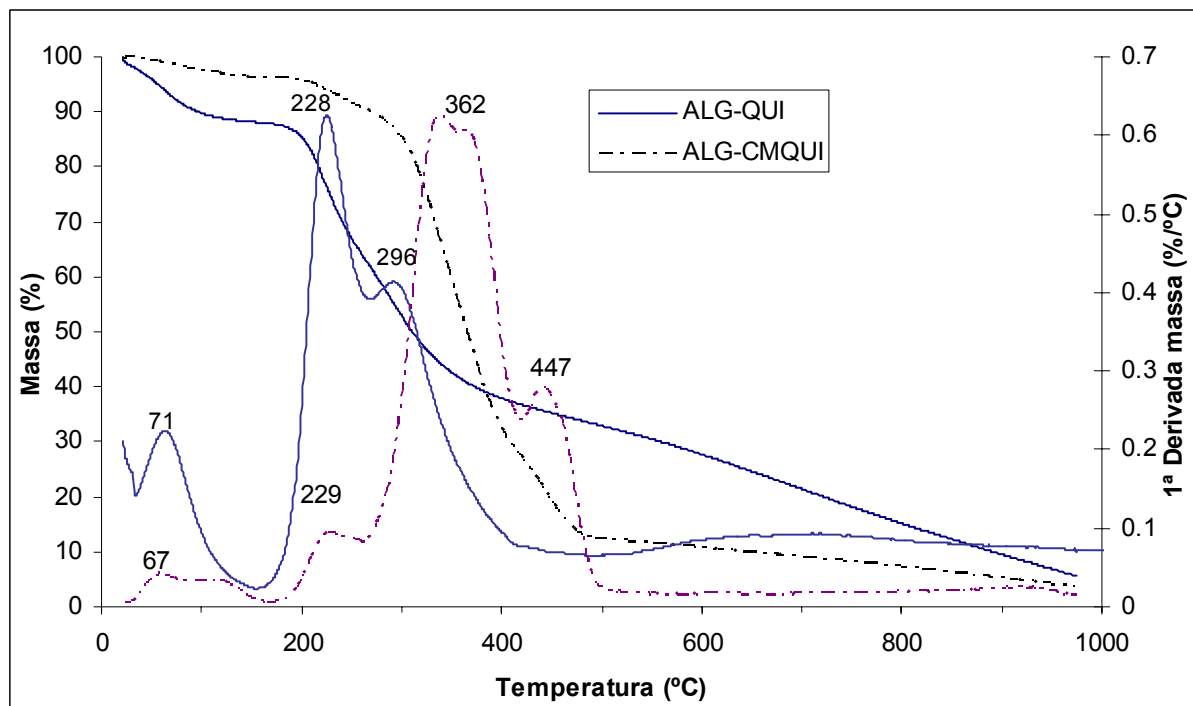


Figura 58: Análise termogravimétrica contendo a variação de massa com a temperatura (eixo Y principal) e a primeira derivada da perda de massa (eixo Y secundário) dos hidrogéis com 40% de ALG.

5.5.4 Potencial Zeta

A carga relativa dos hidrogéis com 40% de ALG em pH 6 foi determinada por medida de potencial zeta, que apresentou mudanças significativas na carga global dos hidrogéis em função do pH, como mostrado na Figura 59. Os hidrogéis de QUI e CMQUI mostraram uma diminuição do potencial com o aumento do pH, onde o

hidrogel ALG-QUI apresentou um maior valor positivo devido a maior densidade de cargas dos grupos amino protonados na superfície em meio ácido. Em pH próximo da neutralidade, a quitosana se torna desprotonada e os grupos carboxílicos negativos do ALG são responsáveis pela inversão dos valores de potencial. A CMQUI, entretanto, apresenta um potencial positivo de menor módulo em meio ácido, devido a uma menor quantidade de grupos amino por cadeia polimérica devido à modificação química, de forma que em pH 4,5 todos os grupos carboxílicos presentes no hidrogel ALG-CMQUI se tornam negativamente carregados, mudando os seus valores positivos para negativos.

O ponto isoelétrico é o pH no qual o hidrogel apresenta um balanço entre as cargas positivas e negativas, estimado pelo ponto onde o potencial zeta é zero. O pH do ponto isoelétrico para os hidrogéis ALG-QUI e ALG-CMQUI situou-se em torno de 7,5 e 4,2, respectivamente, mostrando que a inserção dos grupos carboxílicos causou a equivalência dos cargas positivas e negativas em um pH mais baixo. Desta forma, o hidrogel ALG-CMQUI teria maior eficiência na interação com moléculas de carga positivas e os hidrogel de ALG-QUI com moléculas de carga negativa, que pode influenciar na eficiência do encapsulamento de fármacos e peptídeos e conseqüentemente, no perfil de liberação destes.

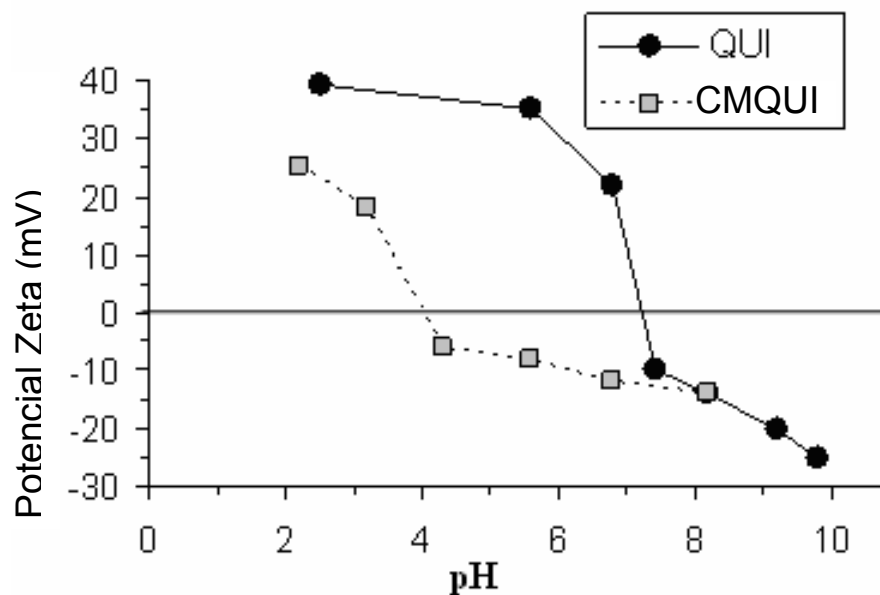


Figura 59: Variação do potencial zeta em função do pH para os hidrogéis produzidos com 40% de ALG em pH 6 com QUI e CMQUI.

5.5.5 Eficiência do encapsulamento e perfis de liberação dos hidrogéis ALG-QUI e ALG-CMQUI

Os hidrogéis de QUI e CMQUI selecionados (produzidos em pH 6 com 40% ALG) apresentaram em pH 6 potencial positivo e negativo, respectivamente. Estes hidrogéis foram encapsulados com dois peptídeos modelo Tirosina-fenilalanina (TYR-PHE) e aspartato-fenilalanina (ASP-PHE). Estes peptídeos foram escolhidos por serem altamente hidrofílicos e de rápida dissolução em água, representando uma classe de fármacos cujo encapsulamento e liberação ainda representam um desafio na área. A Tabela 20 ilustra a estrutura química, massa molar e solubilidade dos peptídeos modelo. Pode-se observar que os peptídeos têm massa molar aproximada, e que no pH de produção dos hidrogéis (pH 6), a estrutura do TYR-PHE apresenta carga global neutra, pois apresenta um grupamento amino e um grupamento carboxílico ionizados por molécula. Já o peptídeo ASP-PHE apresenta carga global negativa, devido a protonação dos grupos amino e a ionização dos grupos carboxílicos.

As curvas de dissolução dos peptídeos em pH 1,2 e pH 6,8 encontram-se na Figura 60. Pode-se observar que após 15 minutos, o fármaco se encontra 100% dissolvido em pH 1,2 e em pH 6,8.

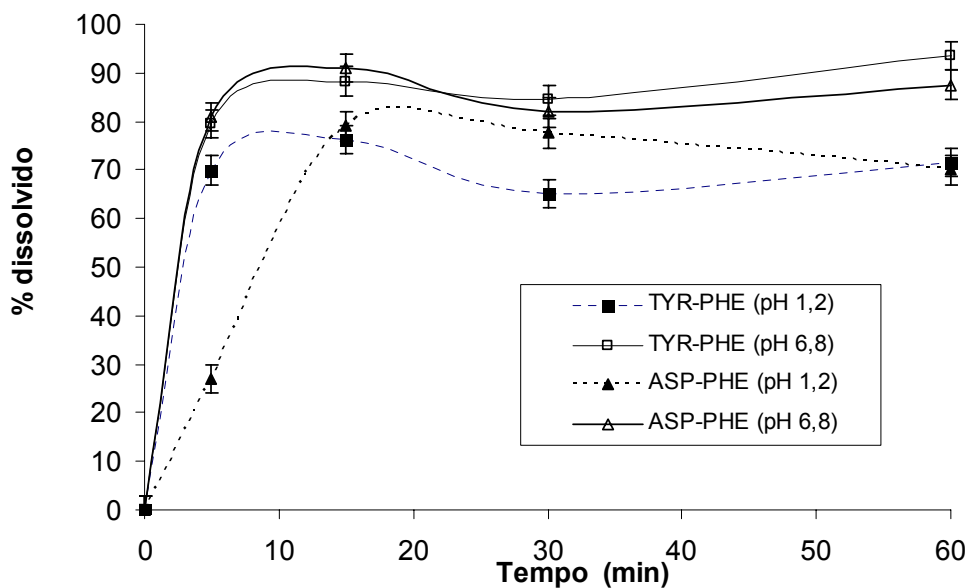
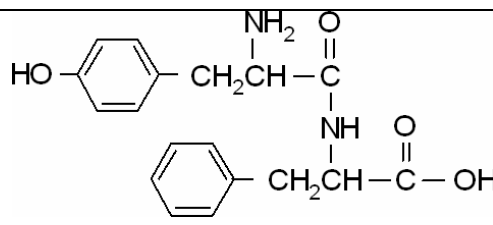
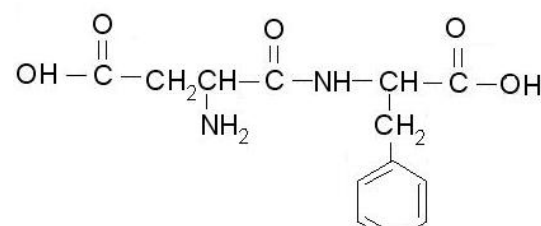


Figura 60: Curvas de dissolução dos peptídeos em pH 1,2 e pH 6,8.

Tabela 20: Nomenclatura, estrutura, massa molar e limite de solubilidade dos fármacos modelo

Nome	Estrutura	Massa molar (g/mol) _r	Limite de Solubilidade
TYR-PHE		328,4	1,9 mg/ml
ASP-PHE		280,3	3,1 mg/mL

Avaliou-se o grau de encapsulamento conforme o tipo de hidrogel para os dois peptídeos. Na Tabela 21 consta a eficiência do encapsulamento de acordo com o tipo de hidrogel e o tipo de fármaco. Observa-se que ambos os peptídeos apresentaram baixo grau de encapsulamento independentemente do tipo de hidrogel, com um valor médio de 24%. Este é um indicativo de que o alto caráter hidrofílico dos hidrogéis faz com que as interações fármaco modelo e água sejam maiores do que as interações iônicas entre o fármaco e os hidrogéis iônicos.

Tabela 21 : Eficiência do encapsulamento em diferentes sistemas de Hidrogel –Peptídeo

Sistema	Eficiência do encapsulamento (%)
ALG-QUI/TYR-PHE	27 ± 5
ALG-CMQUI/TYR-PHE	24 ± 3
ALG-QUI/ASP-PHE	23 ± 4
ALG-CMQUI/ASP-PHE	25 ± 5

Os perfis de liberação dos peptídeos em meio gástrico constam na Figura 61. Observa-se que após 5 minutos no meio gástrico simulado (pH 1,2), mais de 40% dos peptídeos foram liberados das matrizes ALG-QUI e ALG-CMQUI, e que após 15 min 100% dos peptídeos já se encontravam no meio de liberação. Este é um indicativo de que os peptídeos em grande parte não ficaram retidos na parte interna do hidrogel, onde provavelmente permaneceram adsorvidos na superfície do hidrogel por meio de interações eletrostáticas. Quando imersos em solução, o alto

caráter hidrofílico dos peptídeos levou a sua solubilização, uma vez que as interações entre os peptídeos e a água são mais fortes do que as interações eletrostáticas destes com os hidrogéis.

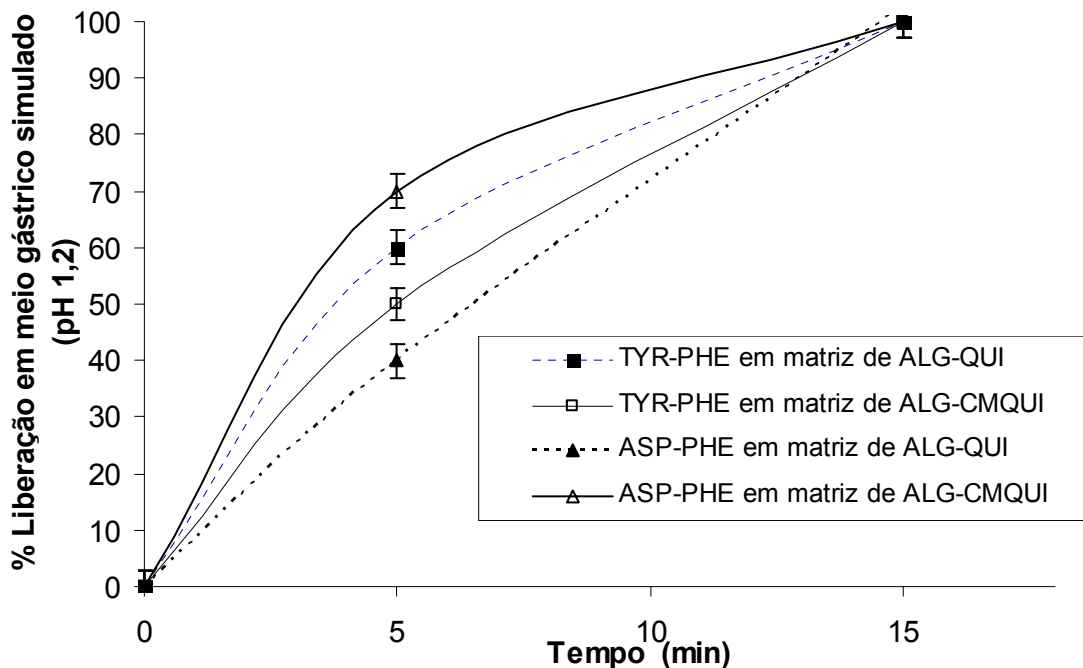


Figura 61: Perfis de liberação dos peptídeos TYR-PHE e ASP-PHE nas matrizes ALG-QUI e ALG-CMQUI em meio gástrico simulado (pH 1,2).

5.5.6 Conclusões

Com este estudo, avaliou-se o efeito da carboximetilação nas propriedades dos hidrogéis. Constatou-se que o tamanho de partícula e o grau de inchamento foi notavelmente modificado em função do tipo de reação, confirmado estatisticamente através de ANOVA. Hidrogéis com menor diâmetro são obtidos com 40% de ALG em pH 6. Nestas condições, os hidrogéis apresentaram menor grau de inchamento em SGF, um bom indicativo na prevenção de liberação instantânea de fármacos em meio gástrico.

A carboximetilação da quitosana proporcionou hidrogéis com ALG com melhores propriedades, com menor tamanho e menor desvio, menor grau de inchamento em SGF e grau de inchamento semelhante em SIF. Este melhor desempenho dos hidrogéis ALG-CMQUI no grau de inchamento é um indicativo de

que estes hidrogéis podem prevenir a liberação de fármacos instantânea em meio gástrico, mantendo a mesma habilidade em meio intestinal do que os de ALG-QUI, sendo promissores para a liberação controlada de fármacos.

No entanto, através da determinação do grau de encapsulamento de peptídeos hidrofílicos, mostrou-se que os hidrogéis nas condições otimizadas apresentaram um grau de encapsulamento inferior a 30%, não se mostrando eficientes para este tipo de fármaco. Os perfis de liberação revelaram liberação rápida, equivalente ao perfil de dissolução dos peptídeos, não se mostrando eficaz em conter os peptídeos dentro da rede polimérica. Estudos posteriores devem ser realizados de forma a avaliar o grau de encapsulamento e os perfis de liberação em fármacos de natureza menos hidrofílica.

5.6 Influência de um agente de reticulação e da inclusão de fase orgânica no meio reacional nas propriedades dos hidrogéis ALG-QUI

O encapsulamento de fármacos peptídicos como modelo em meio aquoso mostrou-se baixo (menor que 30%) devido à natureza hidrofílica dos fármacos, que apresentaram interações entre peptídeo e o meio aquoso maiores do que com o hidrogel. A necessidade de aperfeiçoar o sistema hidrogel-fármaco na obtenção de um grau de encapsulamento mais satisfatório levou ao estudo de novos fatores. Um dos fatores de estudo foi o da adição de um agente de reticulação covalente no sistema ALG-QUI. Escolheu-se a genipina como agente de reticulação devido à sua baixa toxicidade. Conforme mencionado no item 3.2.1, o mecanismo de reticulação da genipina ocorre pela reação com grupos amino de polímeros, sendo ideal para reticular as cadeias de quitosana, formando uma IPN. Os hidrogéis de ALG-CMQUI, que apresentaram semelhante grau de encapsulamento dos peptídeos aos hidrogéis ALG-QUI, devido à menor disponibilidade de grupos amino, não foram incluídos no estudo.

A metodologia de preparação dos hidrogéis foi modificada, na qual se adicionou óleo mineral no meio reacional, formando um sistema em emulsão, conforme descrito no item 4.5. Apesar da existência de diversos métodos de

preparação em emulsão, em sua maioria visam encapsular fármacos não solúveis em meio aquoso [179-181,214-217]. Neste estudo, desenvolveu-se um novo método de produção de micropartículas através de um processo de emulsão água-em-óleo, e avaliaram-se o PVA e o PVP como emulsificantes. O procedimento de preparação foi desenvolvido visando à formação de micelas que podem levar ao aumento do grau de encapsulamento. A Figura 62 representa a formação de nanopartículas no interior das micelas no processo de emulsão óleo-em-água.

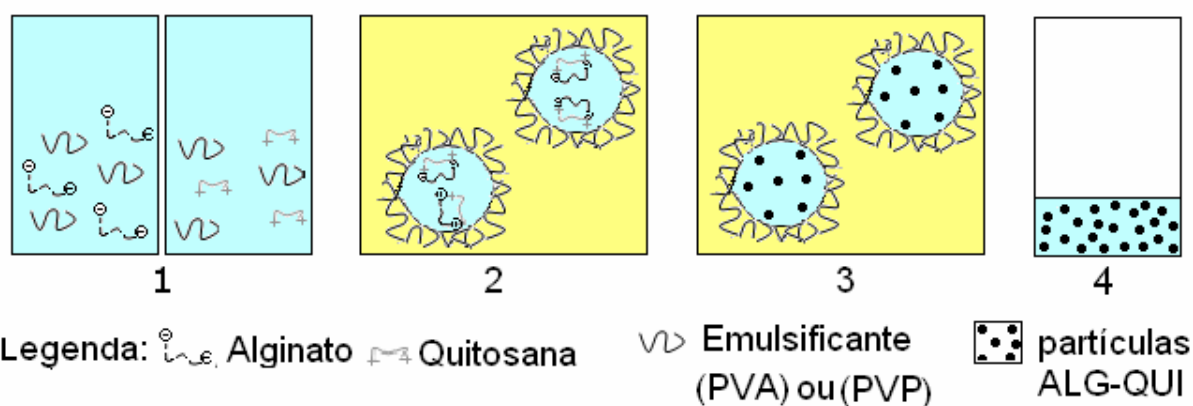


Figura 62: Representação das etapas de formação de nanopartículas em emulsão; 1: dissolução do surfactante na solução; 2: Formação de emulsão estável; 3: formação das partículas ALG-QUI no interior das micelas; 4: fase aquosa contendo as partículas ALG-QUI.

Avaliou-se a morfologia, a distribuição do fármaco no hidrogel e a eficiência do encapsulamento, que constam discutidos separadamente a seguir. O fármaco usado para avaliar o encapsulamento foi o lisinopril, devido à semelhança deste fármaco com os peptídeos modelo ASP-PHE e TYR-PHE, discutidos no item 5.5.5. A fórmula, estrutura química e limite de solubilidade do lisinopril constam na Tabela 22.

Tabela 22 : Fórmula, estrutura química, massa molar e limite de solubilidade do lisinopril.

Formula	Estrutura	Massa molar (g/mol)	Limite de Solubilidade
$C_{21}H_{31}N_3O_5 \cdot 2H_2O$		441,53	100 mg/ml

5.6.1 Morfologia dos hidrogéis ALG-QUI obtidos em emulsão

A alteração do tipo de reticulador e da metodologia de obtenção dos hidrogéis produziu hidrogéis com diferente tamanho médio de partícula conforme as condições de reação. Na Tabela 23, constam as condições de reação de produção dos hidrogéis, bem como o tamanho médio de partícula e a eficiência do encapsulamento.

Tabela 23 : Método de preparação, agente de reticulação, eficiência do encapsulamento e tamanho de partícula dos Hidrogéis ALG-QUI

Método de preparação	Agente de Reticulação ^a	Tamanho de partícula (nm)	Eficiência do encapsulamento (%)
R1 Aquoso	CaCl ₂	1300 ± 800	45,2
R2 Aquoso	Genipina	1600 ± 900	59,7
R3 Emulsão (PVA)	CaCl ₂	500 ± 300	80,0
R4 Emulsão (PVP)	CaCl ₂	700 ± 300	73,6
R5 Emulsão PVA)	Genipina	800 ± 100	85,5
R6 Emulsão (PVP)	Genipina	600 ± 200	36,5

^a concentração de CaCl₂ (0,55 mg/ml); genipina (0,33 mg/ml)

Observa-se que o tamanho médio de partícula variou de acordo com o método de preparação, onde os hidrogéis produzidos em emulsão têm menor tamanho de partícula e menor desvio padrão (R3, R4, R5 e R6) do que os produzidos em meio aquoso. De acordo com a literatura, hidrogéis obtidos por emulsão apresentam larga distribuição do tamanho de partícula [217]. Neste caso, o método desenvolvido em emulsão para formação de hidrogéis melhora o controle sobre o tamanho médio, gerando partículas em escala nanométrica.

A morfologia dos hidrogéis ALG-QUI observada por MEV consta na Figura 63. Os hidrogéis ALG-QUI apresentaram morfologia esférica, e, em geral, houve um aumento na regularidade da morfologia quando a genipina foi usada como agente de reticulação (Fig. 63 (a), (c) e (e)). E ainda, partículas de ALG-QUI produzidas em emulsão usando PVA como emulsificante apresentou maior regularidade na estrutura do que os demais, como observado na (Fig. 64 (c) e (d)).

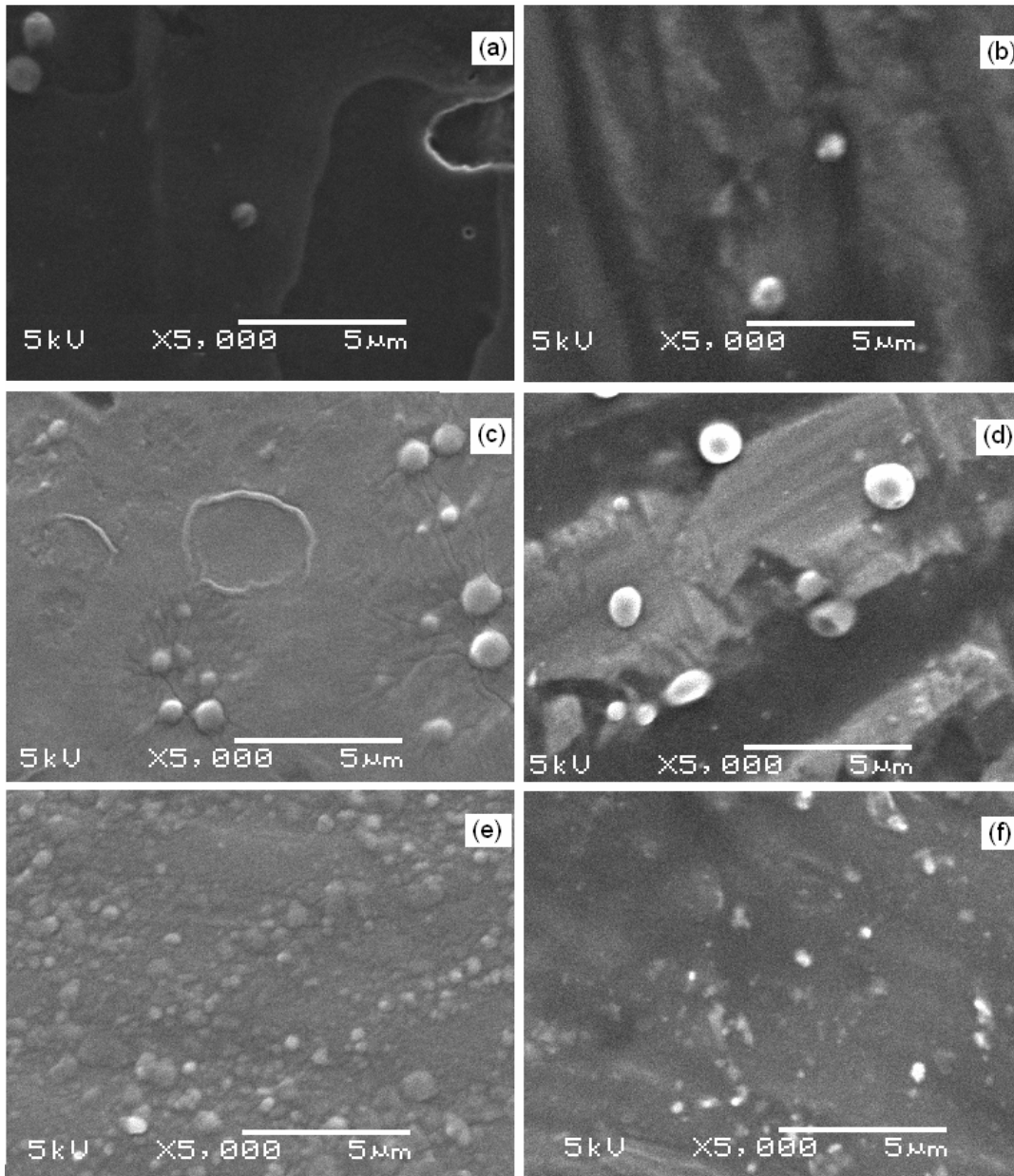


Figura 63: Micrografias de MEV de hidrogéis de ALG-QUI produzidos em meio aquoso com genipina (a) e com CaCl_2 (b), e por emulsão com PVA e genipina (c) e CaCl_2 (d) e com PVP e genipina (e) e CaCl_2 (f).

A Figura 64 ilustra micrografias de MO dos hidrogéis obtidos pelo método aquoso e por emulsão. Hidrogéis produzidos pelo primeiro método apresentaram formato mais irregular, havendo uma tendência de formar aglomerados (Fig. 64 (a) e (b)). No entanto, os hidrogéis preparados por emulsão apresentaram tamanho mais uniforme, com domínios afastados um dos outros, (Fig. 64 (c) e (d)), sendo potencialmente mais adequadas para liberação controlada de fármacos.

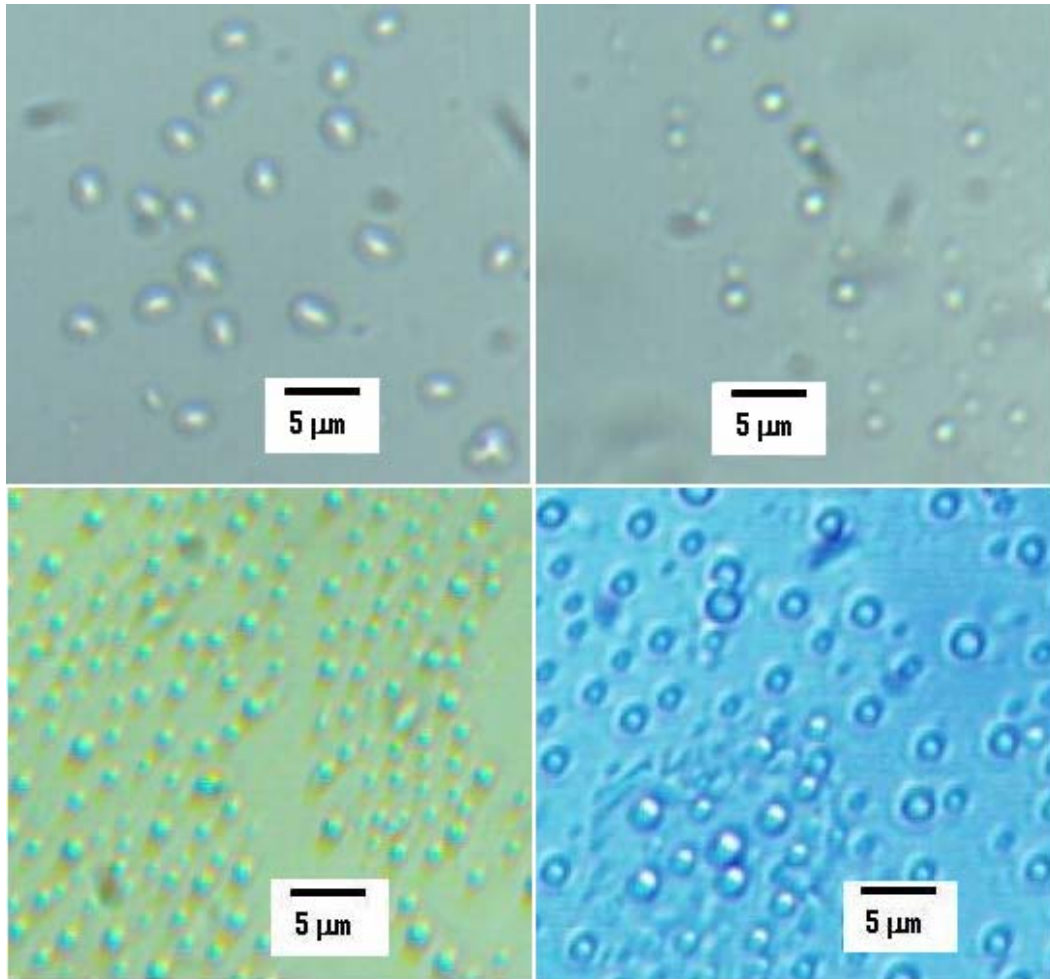


Figura 64: Micrografias de MO de hidrogéis ALG-QUI obtidos em meio aquoso com genipina (a) em com CaCl_2 (b), e em emulsão com PVA e genipina (c) e PVP e CaCl_2 (d).

5.6.2 Distribuição do fármaco no hidrogel e eficiência do encapsulamento

O grau de encapsulamento e a distribuição de lisinopril-FITC nas partículas de ALG-QUI foram investigados por microscopia ótica com fluorescência (FOM), conforme ilustrado pela Figura 65. Os hidrogéis ALG-QUI encapsulados com lisinopril-FITC apresentaram um padrão de distribuição variado de acordo com o tipo de reticulador e o método de preparação. Em meio aquoso, a dispersão do lisinopril nos hidrogéis foi favorecida pela substituição de CaCl_2 por genipina (Figura 65 (a) e (b), respectivamente), também confirmado pelo aumento da eficiência do encapsulamento.

De acordo com a Tabela 23, ocorreu um aumento de 30% no encapsulamento de lisinopril e 45 para 60% pela substituição de íons cálcio por genipina pelo método

aquoso. Desta forma, podemos afirmar que a adição de um reticulador covalente levou a formação de um hidrogel com estrutura menos porosa e, portanto menos suscetível a perda do fármaco. É reportado o aumento do encapsulamento e a liberação controlada de indometacina de partículas ALG-QUI pelo aumento do teor de genipina no hidrogel devido a maior densidade de reticulação [171], onde o teor de genipina pode ser manipulado de forma a controlar a densidade de reticulação da quitosana [81].

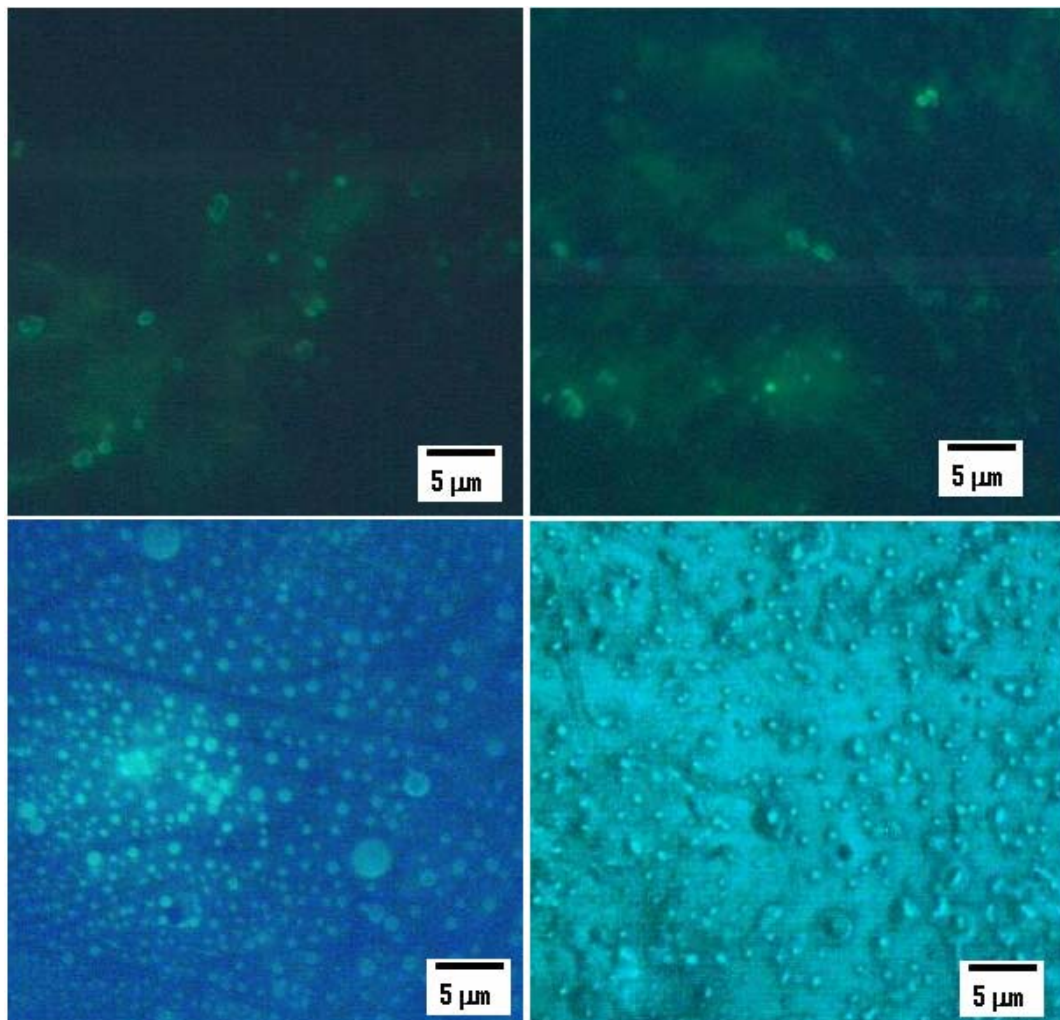


Figura 65: Micrografias de FOM dos hidrogéis ALG-QUI ilustrando o padrão de distribuição do fármaco em meio aquoso com CaCl_2 (a) e com genipina (b), e por emulsão com PVA e CaCl_2 (c) e com PVP e genipina (d).

Através da comparação dos valores de eficiência do encapsulamento na Tabela 23, observa-se que os hidrogéis produzidos em meio aquoso apresentaram um valor relativamente baixo em comparação com a maioria dos valores obtidos em emulsão, que encapsularam mais de 70% de lisinopril. As micrografias de FOM da

Figura 65 (c) e (d) ilustram a dispersão homogênea de lisinopril-FITC apresentada dentro das partículas ALG-QUI produzidas pelo método em emulsão.

O surfactante usado no processo de obtenção parece afetar a eficiência de encapsulamento dos hidrogéis ALG-QUI reticulados com genipina. O mecanismo proposto para a reticulação das cadeias de quitosana ocorre através do ataque nucleofílico dos grupos amino da quitosana no anel dihidropirano da genipina [81]. A migração de íons hidrogênio dos grupos amino protonados até os grupos carboxílicos do ALG favorece o ataque nucleofílico dos grupos amino, o que por sua vez aumenta a densidade de reticulação da quitosana [81]. Na produção dos hidrogéis pelo método proposto, os grupos carboxílicos residuais do PVA (grau de hidrólise de 88%) favorecem a desprotonação dos grupos amino da quitosana e, por conseguinte o ataque nucleofílico. Desta forma, a densidade de reticulação do hidrogel é aumentada, ocasionando um aumento da eficiência do encapsulamento (85% para a reação R5). Entretanto, quando utilizado o reticulador iônico, (CaCl_2), tanto o PVP quanto o PVA mostraram-se bons surfactantes para o sistema em emulsão, que apresentaram valores de eficiência do encapsulamento de cerca de 75%.

5.6.3 Conclusões

Os hidrogéis ALG-QUI produzidos em emulsão com PVA como surfactante apresentaram partículas esféricas com maior regularidade e menor distribuição de tamanho de partícula comparado ao sistema de produção em meio aquoso. E ainda, hidrogéis formados em emulsão mostraram domínios não agregados, com maior eficiência de encapsulamento, com valor superior a 80% independente do tipo de reticulador utilizado. Desta forma, o método de emulsão desenvolvido mostrou-se eficaz no encapsulamento de fármacos hidrofílicos.

5.7 Perspectivas de melhoria no desempenho de complexos iônicos de quitosana através do controle de sua síntese

Os hidrogéis ALG-QUI e ALG-CMQUI produzidos por meio de emulsão podem aumentar ainda mais a eficiência de encapsulamento se produzidos com os dois tipos de agente de reticulação combinados.

Os hidrogéis ALG-QUI e ALG-CMQUI produzidos em meio aquoso podem aumentar o grau de encapsulamento de fármacos de natureza hidrofílica através do aumento do teor de genipina e do aumento do tempo de reação da formação de hidrogéis, visando aumentar a densidade de reticulação dos hidrogéis.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, as propriedades dos hidrogéis ALG com morfologia controlada produzidos por complexação polieletrólítica foram avaliadas em função da composição, tipo de quitosana, pH da solução e método de produção, avaliando a morfologia, grau de inchamento em meio gástrico e intestinal simulado e a eficiência de encapsulamento de fármacos modelo.

Devido às diferenças encontradas nos procedimentos descritos na literatura que levam à obtenção de hidrogéis com características bastantes distintas, foi feita uma investigação preliminar para seleção de fatores com eventual influência na morfologia dos hidrogéis. A maior regularidade na morfologia foram obtidos quando produzidos com Hidrogéis de menor teor de íons cálcio. Desta forma, este estudo permitiu o ajuste da concentração de íons cálcio em função da quantidade de alginato em solução, mantendo-se uma proporção de 1:10, e as soluções de ALG e QUI foram diluídas 0,2% p/p para diminuir a viscosidade das mesmas.

Realizou-se um estudo fatorial 2^4 de forma a avaliar quais variáveis influenciavam nas propriedades dos hidrogéis, onde as formulações também foram avaliadas quanto ao grau de encapsulamento e a taxa fluoresceína liberada pelos hidrogéis. Os resultados do estudo indicaram que o tamanho de partícula poderia variar com a alteração do teor de ALG e obter-se maior grau de encapsulamento de fluoresceína quando o hidrogel é revestido pela quitosana de baixa massa molar. Os perfis de liberação mostraram-se em geral satisfatórios quando os hidrogéis foram produzidos pelo método indireto.

Uma segunda análise fatorial 2^4 foi realizada com o objetivo de fornecer a significância de cada variável independente nas propriedades dos hidrogéis. Este estudo estatístico demonstrou que as variáveis independentes testadas (teor de ALG, pH da solução, massa molar da QUI e método de preparação) têm influência nas variáveis dependentes (Rendimento, tamanho de partícula, grau de inchamento em meio gástrico e intestinal e ponto isoelétrico do hidrogel). Os resultados

mostraram que apesar do tamanho médio de partícula dos hidrogéis permanecerem inalterados com a mudança das condições de reação, os hidrogéis produzidos com BQUI, através do método direto, apresentaram um tamanho de partícula mais homogêneo. Equações lineares foram geradas em função das variáveis dependentes estudadas. Estimando o rendimento otimizado da produção dos hidrogéis, a carga superficial do hidrogel em função do pH e o grau de inchamento em meio simulado gástrico e intestinal de acordo com as variáveis estudadas. Hidrogéis produzidos com BQUI em pH pelo método indireto geraram a maximização do rendimento. O grau de inchamento do hidrogel e o potencial de carga da superfície mostraram-se dependentes do teor de ALG as quais podem ser alteradas para produzir hidrogéis adequados para liberação em locais específicos do organismo. Em particular, hidrogéis produzidos com BQUI, em pH 6 com 35% de ALG apresentaram maior rendimento, menor grau de inchamento em meio gástrico e moderado grau de inchamento em meio intestinal, com carga superficial positiva.

Após a otimização das condições de reação, realizou-se síntese da carboximetilquitosana e sua caracterização foi discutida em função do grau de carboximetilação, onde o polissacarídeo modificado apresentou maior estabilidade térmica, maior grau de retenção de água e solubilidade do que a quitosana. Hidrogéis de carboximetilquitosana (CMQUI) com alginato foram produzidos, onde se avaliou o efeito da carboximetilação da quitosana nas propriedades dos hidrogéis. Constatou-se que o tamanho de partícula e o grau de inchamento foram notavelmente modificados em função do tipo de reação, confirmado estatisticamente através de ANOVA. Hidrogéis com menor diâmetro e menor grau de inchamento SGF são obtidos com 40% de ALG em pH 6. Este melhor desempenho dos hidrogéis ALG-CMQUI no grau de inchamento é um indicativo de que estes hidrogéis podem prevenir a liberação de fármacos de forma instantânea em meio gástrico, com semelhante grau de inchamento em meio intestinal do que os de ALG-QUI, sendo potencialmente promissores para a liberação controlada de fármacos. No entanto, o grau de encapsulamento de peptídeos hidrofílicos foi inferior a 30% independentemente do tipo de hidrogel produzido, indicando que hidrogéis produzidos pelo método aquoso não são eficientes para encapsular este tipo de fármaco, devido à natureza altamente hidrofílica dos peptídeos. Os perfis de

liberação revelaram liberação rápida, equivalente ao perfil de dissolução dos peptídeos.

Enfim, buscando aumentar o grau de encapsulamento de fármacos hidrofílicos nos hidrogéis de Alginato e quitosana, um novo método de produção de hidrogéis em emulsão foi desenvolvido, onde a reação de complexação polieletrólítica ocorre dentro de micelas formadas pela adição de surfactante. Avaliou-se a morfologia, a distribuição do fármaco no hidrogel e a eficiência do encapsulamento, variou-se o tipo de surfactante (PVA e PVP) e o tipo de reticulador (CaCl_2 e genipina). Os resultados mostraram que hidrogéis ALG-QUI produzidos em emulsão com PVA como surfactante apresentaram partículas esféricas com maior regularidade e menor distribuição de tamanho quando comparados ao sistema de produção em meio aquoso. E ainda, hidrogéis formados em emulsão mostraram domínios não agregados, com maior eficiência de encapsulamento, com valor superior a 80% independente do tipo de reticulador utilizado. Desta forma, o método de emulsão desenvolvido mostrou-se eficaz no encapsulamento de fármacos hidrofílicos.

7 CONCLUSÕES FINAIS

As propriedades dos hidrogéis ALG-QUI mostraram-se altamente dependentes das condições de reação e das propriedades intrínsecas dos polissacarídeos. O controle da morfologia é essencialmente determinado pelo teor de íons cálcio no meio reacional, que é o agente de reticulação iônico, e que define a formação de grandes complexos inter-agregados de morfologia irregular ou de complexos intra-agregados, com morfologia esférica.

Através de um estudo fatorial 2⁴, observou-se que o grau de encapsulamento de Fluoresceína é favorecido quando o hidrogel é revestido pela quitosana de baixa massa molar, que através da maior mobilidade difusional de suas cadeias, forma uma camada de revestimento protetora mais eficiente do que a quitosana de maior massa molar. Os perfis de liberação de fluoresceína mostraram-se satisfatórios quando os hidrogéis foram produzidos pelo método indireto.

Mostrou-se a significância estatística dos parâmetros de reação em função de cada variável dependente. A maximização do rendimento dos hidrogéis foi obtida pelo favorecimento do aumento da taxa difusional da quitosana causada pela diminuição do tamanho de cadeia (BQUI), o pH mais alto (pH 6) causando a desprotonação parcial da quitosana e o método de reação indireto com adição controlada de QUI. O grau de inchamento e o potencial zeta dos hidrogéis mostraram-se dependente da composição relativa do hidrogel. Um maior teor de quitosana favoreceu um aumento de interações com ALG, cujo entrelaçamento das cadeias contribui para o aumento da estabilidade dos hidrogéis e maior resistência ao inchamento. A superfície positiva das micropartículas produzidas nestas condições (35ALG, pH 6, BQUI, IM) pode contribuir na adesão das micropartículas nas paredes do intestino.

A modificação química da QUI produziu um derivativo solúvel da quitosana, que apresentou maior estabilidade térmica devido à inserção dos grupos carboximetílicos aumentou o número de ligações covalentes por unidade repetitiva

da molécula que requerem mais energia para serem rompidas e favoreceu um maior número de interações intermoleculares entre as cadeias, aumentando a viscosidade.

Hidrogéis de CMQUI com ALG apresentaram menor tamanho de partícula e menor grau de inchamento em meio gástrico, devido à diminuição de grupos amino na superfície do hidrogel que restringe a habilidade deste em expandir no meio reacional. A substituição parcial garante que a presença dos grupos amino da CMQUI consegue revestir de maneira satisfatória o hidrogel de forma que, em meio intestinal, a camada protetora resiste ao inchamento, apresentando semelhante grau de inchamento comparadas aos hidrogéis de ALG-QUI.

Os hidrogéis ALG-QUI e ALG-CMQUI não foram eficazes em encapsular peptídeos de natureza hidrofílica pelo método de preparação aquoso, devido à natureza hidrofílica do fármaco escolhido. A adição de um agente de reticulação covalente (genipina) aumentou o grau de encapsulamento dos hidrogéis para cerca de 60%, onde a reação entre os grupamentos amino da QUI resultou em hidrogel com maior densidade de reticulação.

Hidrogéis produzidos em emulsão apresentaram morfologia mais regular e com tamanho nanométrico, cuja eficiência do encapsulamento de fármaco hidrofílico aumentou para cerca de 80%, onde a inclusão da fase orgânica maximizou as interações dentro das micelas, evitando a saída do fármaco da rede polimérica comumente ocorrida durante a preparação do hidrogel.

8 SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar o grau de encapsulamento e os perfis de liberação dos hidrogéis com fármacos de natureza menos hidrofílica.

Realizar os testes de liberação dos hidrogéis ALG-QUI produzidos em emulsão encapsulados com lisinopril.

Encapsular fármacos nos hidrogéis ALG-CMQUI pelo método de emulsão visando comparar o grau de encapsulamento e o perfil de liberação destes hidrogéis com os hidrogéis ALG-QUI produzidos pelo mesmo método.

Estudar a influência do teor de Genipina bem como o tempo de reação na densidade de reticulação dos hidrogéis.

Avaliar o desempenho dos hidrogéis produzidos em emulsão com outros tipos de surfactantes.

Preparar hidrogéis com dois tipos de agentes de reticulação, com íons cálcio para reticular as cadeias de ALG e genipina para reticular as cadeias de quitosana.

Produzir hidrogéis de quitosana por complexação polieletrólítica com outros polímeros naturais, como gelatina e xantana, que com a adição de genipina podem formar redes híbridas pela reticulação entre os grupamentos amino de suas cadeias

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. QIU, Y.; PARK, K. *Environment-sensitive hydrogels for drug delivery*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **53**, 321–339, 2001.
2. GRODZINSKI, J.J. *Biomedical application of functional polymers*. **Reactive & Functional Polymers**, vol. **39**, 99-138, 1999.
3. DRURY, J.L.; MOONEY, D.J. *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications*. **Biomaterials**, vol. **24**, 4337-4351, 2003.
4. KSHISAGAR, N.A. *Drug Delivery Systems*. **Indian Journal of Pharmacology**, vol. **32**, S54-S61, 2000.
5. KUMAR, M.N.V.R. *A review of chitin and chitosan applications*. **Reactive & Functional Polymers**, vol. **46**, 1-27, 2000.
6. PARK, K. et al. *Biodegradable Hidrogels For Drug Delivery*. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, USA, 1999.
7. HOFFMAN, A .S. *Hydrogels for biomedical applications*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **43**, 3-12, 2002.
8. BERGER, J. et al. *Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. **57**, 35–52, 2004.
9. BERGER, J. et al. *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. **57**, 19–34, 2004.
10. KIM, S. J.; PARK, S. J.; KIM, S. I. *Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and poly(isopropylacrylamide)*. **Reactive & Funcional Polymers** vol. **55**, 61–67, 2003.
11. MUNJERI, O.; COLLETT, J.H.; FELL, J.T. *Hydrogels beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release*. **Journal of Controlled Release** vol. **46**, 273-278, 1997.
12. ZHANG, X. Z.; WU, D.Q.; CHU, C.C. *Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN-PNPAAm hydrogels*. **Biomaterials**, vol. **25**, 3793–3805, 2004.

13. MUNIZ E.C.; GEUSKENS G. *Influence of temperature on the permeability of polyacrylamide hydrogels and semi-IPNs with poly(N-isopropylacrylamide)*. **Journal of Membrane Science**, vol. **172**, 287-293, 2000.
14. AGNIHOTRI, S. A. et al. *Electrically modulated transport of diclofenac salts through hydrogels of sodium alginate, carbopol, and their blend polymers*. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. **96** (2): 301-311, 2005.
15. JEEVANANDA T.; SIDDARAMAIAH. *Synthesis and characterization of polyaniline filled PU/PMMA interpenetrating polymer networks*. **European Polymer Journal**, vol. **39**, 569-578, 2003.
16. OSADA, Y.; OKUZAKI, H. *A Polymer Gel with Electrically Driven Motility*. **Nature**, vol. **355**, 242-244, 1992.
17. LU, J. et al. *Study of the role of water in the transport of water and THF through hydrophilic membranes by pervaporation*. **Journal of Membrane Science**, vol. **226**, 135–143, 2003.
18. BAE, Y. H.; KIM, S. W. *Hydrogels delivery systems based on polymer blends, block co-polymers or interpenetrating networks*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **11**, 109-135, 1993.
19. DAI, C., WANG, B. and ZHAO, H. *Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. **41**, 117-120, 2005.
20. ANAL, A.K.; STEVENS, W.F. *Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicilin*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **290**, 45-54, 2005.
21. DE, S.; ROBINSON, D. *Polymer relationships during preparation of chitosan-Alginate and poly-L-lysine- alginate nanospheres*. **Journal of Controlled Release**, vol. **89**, 101–112, 2003.
22. MI, F.L et al. *Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug delivery system: a new delivery system for protein*. **Biomaterials**, vol. **24**, 5023-5036, 2003.
23. LAWRIE, G. et al. *Interactions between alginate and Chitosan Biopolymers characterized using FTIR and XPS*. **Biomacromolecules**, vol. **8**, 2533–2541, 2007.
24. GEORGE M; ABRAHAM T. E. *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review*. **Journal of Controlled Release**, vol. **114**, 1–14, 2006.

25. ALSARRA, I. A. et al. *Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics*. **Biomaterials**, vol. **23**, 3637–3644, 2002.
26. BECHERÁN-MARÓN, C.; PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL W. *Study of interpolyelectrolyte reaction between chitosan and alginate: influence of alginate composition and chitosan molecular weight*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. **34**, 127-133, 2004.
27. BOONTHEEKUL, T., KONG, H. J. e MOONEY, D. J. *Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution*. **Biomaterials**, vol. **26**, 2455–2465, 2005.
28. LIU, X. et al. *Swelling behavior of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technique*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **56**, 459–464, 2004.
29. WANG, K.; HE, Z. *Alginate-konjac glucomannan-chitosan beads as controlled release matrix*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **244**, 117-126, 2002.
30. XU, Y.; DU, Y. *Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **250**, 215-226, 2003.
31. GONZALEZ-RODRIGUEZ M. L et al. *Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **232**, 225-234, 2002
32. WITTAYA-AREEKUL, S.; KRUEENATE, J.; PRAHSARN, E. C. *Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **312**, 113–118, 2006.
33. BORGES, O. et al. *Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **299**, 155-166, 2005.
34. SASHIWA, H.; AIBA, S. *Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials*. **Progress in Polymer Science**, vol. **29**, 887-908, 2004.
35. GUO, Z. et al. *Novel Derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro*. **Carbohydrate Research**, vol. **341**, 351-354, 2006.

36. LIU, T. Y. et al. *Synthesis and Characterization of Amphiphatic carboxymethyl-hexanoyl Chitosan Hydrogel: Water-Retention Ability and Drug Encapsulation*. **Langmuir**, vol. **22**, 9740-9745, 2006.
37. THANOU, M. et al. *N-Sulfonato-N,O-carboxymethylchitosan: A novel polymeric absorption enhancer for the oral delivery of macromolecules*. **Journal of Controlled Release**, vol. **117**, 171-178, 2007.
38. CHEN, L.; DU, Y.; HUANG, R. *Novel pH, ion sensitive polyampholyte gels based on carboxymethyl chitosan and gelatin*. **Polymer International**, vol. **52**, 56-61, 2003.
39. ZHU, A. et al. *O-carboxymethylchitosan-based novel gatifloxacin delivery system* **Carbohydrate Polymers**, vol. **68**, 693–700, 2007.
40. LIN, Y. H. et al. *Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs*. **Biomaterials**, vol. **26**, 2105-2113, 2005.
41. CHEN L., TIAN Z. e DU Y. *Synthesis and pH-sensitivity of carboxymethyl chitosan-based polyampholyte hydrogels for protein carrier matrices*. **Biomaterials**, vol. **25**, 3725–3732, 2004.
42. CHEN, S. C. et al. *A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery*. **Journal of Controlled Release**, vol. **96**, 285– 300, 2004.
43. VINOGRADOV, S. V.; BRONICH, T. K.; KABANOV, A. V. *Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells*. **Advanced Drug Delivery Reviews** vol. **54**, 135-147, 2002.
44. CHEN, C. H et al. *Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. **43**, 37-42, 2008.
45. OTSUKA, H.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. *PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **55**, 403-419, 2003.
46. DANG, J. M.; LEONG, K. W. *Natural Polymers for gene delivery and tissue engineering*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **58**, 487-499, 2006.
47. RUEL-GARIÉPY E., LEROUX J.C. *In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. **58**, 409–426, 2004.

48. GIL, E. S.; HUDSON, S. M. *Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates* **Progress in Polymer Science**, vol. **29**, 1173-1222, 2004.
49. WHITTLESEY, K. J.; SHEA, L. D. *Delivery systems for small molecule drugs, proteins and DNA: the neuroscience/biomaterial interface*. **Experimental Neurology**, vol. **190**, 1-16, 2004.
50. LUDWIG, A. *The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **57**, 1595-1639, 2005.
51. VALENTA, C. *The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **57**, 1692-1712, 2005.
52. JANES, K. A.; CALVO, P. ; ALONSO, M. J. *Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules*. **Advanced Drug Delivery Reviews** vol. **47**, 83–97, 2001.
53. MAHDAVINIA G.R. et al. *Modified chitosan 4. Superabsorbent hydrogels from poly(acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt and pH-responsiveness properties*. **European Polymer Journal**, vol. **40**, 1399–1407, 2004.
54. SAHINER N., PEKEL N., GOVEN O. *Radiation synthesis of n-vinyl 2-pyrrolidone/acrylonitrile interpenetrating polymer networks and their use in uranium recovery from aqueous systems*. **Radiation Physics and Chemistry**, vol. **52**, 271-276, 1998.
55. BAEK S.H., KIM, B.K. *Synthesis of polyacrylamide/polyurethane hydrogels by latex IPN and AB crosslinked polymers*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, vol. **220**, 191-198, 2003.
56. MAOLIN Z. et al. *The swelling behavior of radiation prepared semi-interpenetrating polymer networks composed of polyNIPAAm and hydrophilic polymers*. **Radiation Physics and Chemistry**, vol. **58**, 397-400, 2000.
57. SENEL S. et al. *Chitosan films and hydrogels of clohexidine gluconate for oral mucosal delivery*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **193**, 197–203, 2000.
58. RUEL-GARIEPY, E. et al. *Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **203**, 89–98, 2000.
59. TORRADO, S. et al. *Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention*. **Biomaterials**, vol. **25**, 917–923, 2004.

60. LOPES, C. M.A., FELISBERTI, M. I. *Mechanical behavior and biocompatibility of poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone)-gelatin IPN hydrogels*. **Biomaterials**, vol. **24**, 1279–1284, 2003.
61. NICKERSON, M. T.; et al. *Some physical and microstructural properties of genipin-crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. **38**, 40-44, 2006.
62. NICKERSON, M. T et al. *Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. **39**, 298-302, 2006.
63. BIGI, A. et al. *Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin*. **Biomaterials**, vol. **23**, 4827-4832, 2002.
64. 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** (4): 291-297, 2004.
65. FELDSTEIN, M. M. *Adhesive hydrogels: Structure, properties, and applications (a review)*. **Polymer science. Series A**, vol. **46**, 1165-1191, 2004.
66. KUMAR, N.; RAVIKUMAR M. N. V.; DOMB, A. J. *Biodegradable block copolymers*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **53**, 23–44, 2001.
67. KIM B.; PEPPAS, N.A. *Analysis of molecular interactions in poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels*. **Polymer**, vol. **44**, 3701-3707, 2003.
68. KISSEL, T.; LI, Y.; UNGER, F. *ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A- blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **54**, 99–134, 2002.
69. NAMAZI, H.; ADELI, M. *Dendrimers of citric acid and poly (ethylene glycol) as the new drug-delivery agents*. **Biomaterials**, vol. **26**, 1175–1183, 2005.
70. BROMBERG, L. et al. *Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly(acrylic acid) hydrogels*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **282**, 45–60, 2004.
71. ROOS, A. et al. *Viscoelasticity and tack of poly(vinyl pyrrolidone)-poly (ethylene glycol) blends*. **Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics**, vol. **40**, 2395-2409, 2002.
72. CHALYKH, A. A. et al. *Pressure-sensitive adhesion in the blends of poly(N-vinyl*

- pyrrolidone) and poly(ethylene glycol) of disparate chain lengths. Journal of Adhesion, vol. 78, 667-694, 2002.*
73. FELDSTEIN, M. M. *Adhesive hydrogels: Structure, properties, and application - (A review) Polymer Science Series A, vol.46 (11), 1165-1191, 2004.*
74. BAJPAI, A. K.; SAINI, R. *Preparation and characterization of biocompatible spongy cryogels of poly(vinyl alcohol)-gelatin and study of water sorption behaviour. Polymer International 54, 1233-1242, 2005.*
75. CASCONI, M. G. et al. *Morphological evaluation of bioartificial hydrogels as potential tissue engineering scaffolds. Journal of Materials Science-Materials In Medicine, vol. 15 (12), 1309-1313, 2004.*
76. CASCONI, M. G. et al. *Bioartificial Polymeric material based on polysaccharides Journal of Biomaterials Science- Polymer Edition, vol.12 (3),267-281, 2001.*
77. CASCONI, M. G. et al. *Gellan/poly(vinyl alcohol) hydrogels: characterization and evaluation as delivery systems. Polymer International, vol. 50, 1241-1246, 2001.*
78. CASCONI, M. G. et al. *Release of dexamethasone from PLGA nanoparticles entrapped into dextran/poly(vinyl alcohol) hydrogels. Journal of Materials Science - Materials in Medicine, vol. 13 (3), 265-269, 2002.*
79. CASCONI, M. G. et al. *Poly(vinyl alcohol) hydrogels as hydrophilic matrices for the release of lipophilic drugs loaded in PLGA nanoparticles. Journal of Materials Science - Materials in Medicine, vol. 13 (1): 29-32, 2002.*
80. SANTOS, C. A. et al. *Evaluation of anhydride oligomers within polymer microsphere blends and their impact on bioadhesion and drug delivery in vitro. Biomaterials, vol. 24, 3571-3583, 2003.*
81. MI, F.L.; SUNG, H. W.; SHYU, S.S. *Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring crosslinking agent. Carbohydrate Polymers, vol. 48, 61-72, 2002.*
82. HIRANO, S. et al. *Wet spun chitosan-collagen fibers, their chemical N-modifications, and blood compatibility. Biomaterials, vol. 21, 997-1003, 2000.*
83. ZENG, M.; FANNG, Z.; XU, C. J. *Effect of compatibility on the structure of the microporous membrane prepared by selective dissolution of chitosan/synthetic polymer blend membrane. Journal of Membrane Science, vol. 230, 175-181, 2004.*
84. LAI, H.L. ABU'KHALIL A.; CRAIG D.Q.M. *The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges. International Journal of Pharmaceutics, vol. 251, 175-181, 2003.*

85. RODRIGUEZ-TENREIRO, C. *et al.* *Characterization of cyclodextrin-carbopol interactions by DSC and FTIR.* **J. Thermal Analysis And Calorimetry** vol. **77(2)**, 403-411, 2004.
86. AMINABHAVI, T. M.; AGNIHOTRI, S. A.; NAIDU, B. V .K. *Rheological properties and drug release characteristics of pH-responsive hydrogels.* **Journal of Applied Polymer Science**, vol. **94**, 2057-2064, 2004.
87. TANG, C. *et al.* *New superporous hydrogels composites based on aqueous Carbopol((R)) solution (SPHCcs): synthesis, characterization and in vitro bioadhesive force studies.* **European Polymer Journal**, vol. **41 (3)**: 557-562 MAR 2005
88. POLNOK, A. *et al.* *In vitro evaluation of intestinal absorption of desmopressin using drug-delivery systems based on superporous hydrogels.* **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **269**, 303-310, 2004.
89. DORKOOSH, F. A. *et al.* *Development and characterization of a novel peroral peptide drug delivery system.* **Journal of Controlled Release**, vol. **71**, 307-318, 2001.
90. PARK, S. B. *et al.* *A novel pH-sensitive membrane from chitosan TEOS IPN; preparation and its drug permeation characteristics.* **Biomaterials**, vol. **22**, 323-330, 2001.
91. WRIGHT, E. R.; CONTICELLO, V. P. *Self-assembly of block copolymers derived from elastin-mimetic polypeptide sequences.* **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **54**, 1057–1073, 2002.
92. CHO, K.Y. *et al.* *Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro.* **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **260**, 83–91, 2003.
93. RISBUB, M. V.; BHONDE, R. R. *Polyacrylamide-chitosan hydrogels: in vitro biocompatibility and sustained antibiotic release studies.* **Transplantation Proceedings**, vol. **32**, 824-825, 2000.
94. ZHANG, X. Z.; LEWIS, P. J.; CHU, C. C. *Fabrication and characterization of a smart drug delivery system: microsphere in hydrogel.* **Biomaterials**, vol. **26**, 3299–3309, 2005.
95. ELVIRA, C. *et al.* *Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems.* **Biomaterials**, **23**, 1955–1966, 2002.

96. LAMMERS, T. et al. *Effect of physicochemical modification on the biodistribution and tumor accumulation of HPMA copolymers*. **Journal of Controlled Release**, vol. **110**, 103-118, 2005.
97. CHEN, K. S. et al. *Preparation and characterization of pH sensitive poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/itaconic acid) copolymer hydrogels*. **Materials Chemistry and Physics**, vol. **91**, 484–489, 2005
98. CHUNG, H. J. et al. *Synthesis and characterization of Pluronic grafted chitosan copolymer as a novel injectable biomaterial*. **Current Applied Physics**, vol. **5**, 485–488, 2005.
99. WANG, C.H.; FAN, K. R.; HSIUE, G. H. *Enzymatic degradation of PLLA-PEOZ-PLLA triblock copolymers*. **Biomaterials**, vol. **26**, 2803-2811, 2005.
100. HEDBERG, E. L. et al. *In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds*. **Biomaterials**, vol. **26**, 3215-3225, 2005.
101. MOLINA, I. et al. *Protein release from physically crosslinked hydrogels of the PLA/PEO/PLA triblock copolymer-type*. **Biomaterials**, vol. **22**, 363-369, 2001.
102. PEPPAS, N. A. *Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **277**, 11–17, 2004.
103. BURES, P. et al. *Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications*. **Journal of Controlled Release**, vol. **72**, 25–33, 2001.
104. OTSUKA H.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. *Self-assembly of poly ethylene glycol -based block copolymers for biomedical applications*. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, vol. **6**, 3-10, 2001.
105. QIU, B. et al. *A hydrogel prepared by in situ cross-linking of a thiol-containing poly(ethylene glycol)-based copolymer: a new biomaterial for protein drug delivery*. **Biomaterials**, vol. **24**, 11-18, 2003..
106. VERESTIUC, L. et al. *Dual-stimuli-responsive hydrogels based on poly(N-isopropylacrylamide)/chitosan semi-interpenetrating networks*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **269**, 185-194, 2004.
107. ALVAREZ-LORENZO, C. et al. *Temperature-sensitive chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties*. **Journal of Controlled Release**, vol. **102**, 629-641, 2005.

108. WANG, M.; FANG, Y.; HU, D. *Preparation and properties of chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) full-IPN hydrogels* **Reactive & Functional Polymers**, vol. **48**, 215-221, 2001.
109. PENICHE C. et al. *Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation.* **Biomaterials**, vol. **20**, 1869-1878, 1999.
110. DERGUNOV, S. A. et al. *Swelling behavior of chitosan-polyHEA hydrogels in anionic surfactant solutions and their thermo-sensitivity.* **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, vol. **238**, 13-18, 2004.
111. YAO, K. D.; PENG, M. T.; GOOSEN, M. F. A.; MIN, J.M.; HE, Y.Y. *pH-sensitivity of hydrogels based on complex forming chitosan: polyether interpenetrating polymer network.* **Journal of Applied Polymer Science**, vol. **48** 343-354, 1993.
112. GUAN, Y. L.; SHAO, L.; YAO, K.D. *Study on correlation between water state and swelling kinetics of chitosan-based hydrogels.* **Journal of Applied Polymer Science**, vol. **61**, 2325-2335, 1996.
113. KIM, S. J et al. *Electrical/pH-sensitive swelling behavior of polyelectrolyte hydrogels prepared with hyaluronic acid-poly(vinyl alcohol) interpenetrating polymer networks.* **Reactive & Functional Polymers**, vol. **55**, 291-298, 2003.
114. MARSANO E. et al. *Stimuli responsive gels based on interpenetrating network of chitosan and poly(vinylpyrrolidone).* **Polymer**, vol. **46**, 1595-1600, 2005.
115. SHANTHA, K. L.; HARDING, D. R. K. *Preparation and in-vitro evaluation of poly[N-vinyl-2-pyrrolidone-polyethylene glycol diacrylate]-chitosan interpolymeric pH-responsive hydrogels for oral drug delivery.* **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **207**, 65-70, 2000.
116. RISBUD, M. V, et al. *pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery.* **Journal of Controlled Release**, vol. **68**, 23-30, 2000.
117. CHEN, X.; LI, W.; ZHONG, W; LU, Y.; YU, T. *pH sensitivity and ion sensitivity of hydrogels based on complex-forming chitosan/silk fibroin interpenetrating polymer network.* **Journal of Applied Polymer Science**, vol. **65**, 2257-2262, 1997.
118. MARTINEZ, L et al. *Cross-linking of chitosan and chitosan/poly(ethylene oxide) beads: a theoretical treatment.* **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. **67**, 339-348, 2007.

119. EL-SHERBINY, I. M. et al. *Preparation, characterization, swelling and in vitro drug release behaviour of poly[N-acryloylglicine-chitosan] interpolymeric pH and thermally-responsive hydrogels*. **European Polymer Journal**, vol. **41**, 2584-2591, 2005.
120. BAYRAMOGLU G; ARICA, Y. *Procion Green H-4G immobilized on a new IPN hydrogel membrane composed of poly(2-hydroxyethylmethacrylate)/chitosan: preparation and its application to the adsorption of lysozyme*. **Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. **202**, 41-52, 2002.
121. RODRIGUES, R. et al. *Synthesis and characterization of hybrid polymeric networks (HPN) based on polyvinyl alcohol/chitosan*. **Reactive & Functional Polymers**, vol. **67**, 708–715, 2007.
122. LIN-GIBSON, S. et al. *Reaction kinetics and gel properties of blocked diisocyanate crosslinked chitosan hydrogels*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **54**, 193–199, 2003.
123. ERISKEN C. et al. *Functionally graded electrospun polycaprolactone and β -tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications* **Biomaterials**, vol. **29**, 4065-4073, 2008.
124. PERETZ, S.; CİNTEZA, O. *Removal of some nitrophenol contaminants using alginate gel beads*. **Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. **319**, 165-172, 2008.
125. HAMASAKI, S. et al. *Fabrication of highly porous keratin sponges by freeze-drying in the presence of calcium alginate beads*. **Materials Science and Engineering: C**, vol. **28**, 1250-1254, 2008.
126. YOTSAWIMONWAT, et al. *Effect of pH on complex formation between debranched waxy rice starch and fatty acids*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. **43**, 94-99, 2008,
127. SHU, X. Z.; ZHU, K. J. *The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release* **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. **54**, 235-243, 2002.
128. FERNANDEZ-URRUSUNO, R. et al. *Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles*. **Pharmaceutical Research**, vol. **16**, 1576-1581, 1999
129. GRENHA, A. et al. *Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein*

- delivery*. **European Journal of Pharmaceutical Science**, vol. **25**, 427–437, 2005.
130. SINHA, V. R. et al. *Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **274**, 1–33, 2004
131. PAN, Y. et al. *Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **249**, 139–147, 2002
132. RUEL-GARIEPY, E. et al. *Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules*. **Journal of Controlled Release**, vol. **82**, 373–383, 2002.
133. GANGULY, S.; DASH, A. K. *A novel in situ gel for sustained drug delivery and targeting*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **276**, 83–92, 2004
134. RODRIGUEZ, R.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, *Influence of cationic cellulose structure on its interactions with sodium dodecylsulfate: implications on the properties of the aqueous dispersions and hydrogels*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. **56**, 133–142, 2003.
135. MULLER, M. et al. *Deposition and properties of polyelectrolyte multilayers studied by ATR-FTIR spectroscopy*. **Materials Science and Engineering C**, vol. **8–9**, 163–169, 1999.
136. TOMME S. R. V, et al. *Self-gelling hydrogels based on oppositely charged dextran microspheres*. **Biomaterials**, vol. **26**, 2129–2135, (2005).
137. NAM, K.; WATANABE J.; ISHIHARA K. *Modeling of swelling and drug release behavior of spontaneously forming hydrogels composed of phospholipid polymers*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **275**, 259–269, 2004.
138. KHUTORYANSKIY, V. V. et al. *Polyelectrolyte complexes of soluble poly-2-[(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride and its hydrogels with poly(acrylic acid)*. **European Polymer Journal**, vol. **39**, 761–766, 2003.
139. DE JONG, S.J. et al. *Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted to dextran*. **Journal of Controlled Release**, vol. **72**, 47–56, 2001.
140. TSUJI, H. et al. *Poly(lactide) stereocomplex: formation, structure, properties, degradation, and applications*. **Macromolecular Bioscience**, vol. **5**, 569–597, 2005.
141. LIU, X. NAKAMURA, K.; LOWMAN, A.M. *Composite hydrogels for sustained release of therapeutic agents*. **Soft materials**, vol. **1**, 393–408, 2003.

142. ZHOU, S.; DENG, X.; LI, X. *Investigation on a novel core-coated microspheres protein delivery system*. **Journal of Controlled Release**, vol. **75**, 27–36, 2001.
143. VILA, A. et al. *Design of biodegradable particles for protein delivery*. **Journal of Controlled Release**, vol. **78**, 15–24, 2002.
144. POPA, M.; ALUPEI, I.C. BUCESVSHI, M. D. *Complexes interpolymères à base de xanthane e gelatine*. **European Polymer Journal**, vol. **37**, 1239-1245, 2001.
145. KRAJEWSKA, B. *Application of chitin – and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. **35**, 126-139,2004.
146. MUZZARELLI, *Biochemistry, Histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing*, In: P. Jolles, R.A.A. Muzzarelli. **Chitins and Chitinases**. Birkhauser, Basel, 1999.
147. KHALID, M. N. et al. *Water state characterization, swelling behavior, thermal and mechanical properties of chitosan based networks*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. **15**, 425–432, 2002.
148. WESKA, R. F. et al. *Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology*. **Journal of Food Engineering**, vol. **80**, 749-753, 2007.
149. BERTH, G.; DAUTZENBERG, H.; PETER, M. G. *Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetilation*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **36**, 205-216, 1998
150. SORLIER, P.; VITON, C.; DOMARD, A. *Relation between Solution Properties and degree of acetylation of chitosan: Role of aging*. **Biomacromolecules**, vol. **3** 1336-1342, 2002.
151. MONTEBAULT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. *Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium*. **Biomaterials**, vol. **26**, 933-943, 2005.
152. BRUGNEROTTO, J. et al. *An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization*. **Polymer**, vol. **42**, 3569-3580, 2001.
153. MAO, S. et al. *The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **281**, 45-54, 2004.

154. BANERJEE, T. et al. *Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **243** 93-105, 2002.
155. MI, F. L. et al. *The study of gelation kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde-cross-linked chitosan gel and their effects on microspheres preparation and drug release*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **41**, 389-396, 2000.
156. MOURA, M. J. ; FIGUEIREDO, M. M.; GIL, M. H. *Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels*. **Biomacromolecules**, vol. **8**, 3823-3829, 2007.
157. BUTLER, M. F.; CLARK, A. H.; ADAMS, S. *Swelling and Mechanical properties of biopolymer hydrogels containing chitosan and bovine serum albuminum*. **Biomacromolecules**, vol. **7**, 2961-2970, 2006.
158. MI, F. L. et al. *Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads*. **Polymer**, vol. **44**, 6521-6530, 2003.
159. YUAN, Y. et al. *The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **68**, 561-567, 2007.
160. CHAN, P.; KURISAWA, M.; CHUNG, J. E.; YANG, Y.Y. *Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery*. **Biomaterials**, vol. **28**, 540-549, 2007.
161. BHATTARAI, N. et al. *PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release*. **Journal of Controlled Release**, vol. **103**, 609–624, 2005.
162. MUZZARELLI, C. et al. *Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterization of the microspheres*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **57**, 73-82, 2004.
163. CRESCENZI, V. et al. *Synthesis and Partial characterization of hydrogels obtained via glutaraldehyde crosslinking of acetylated chitosan and of hyaluronan derivatives*. **Biomacromolecules**, vol. **4**, 1045–1054, 2003.
164. DROGOZ, A. et al. *Polyelectrolyte complexes from polysaccharides: formation and stoichiometry monitoring*. **Langmuir**, vol. **23**, 10950-10958, 2007.
165. DROGOZ, A.; et al *Towards biocompatible vaccine delivery systems: interactions of colloidal PECs based on polysaccharides with HIV-1 p24 antigen* **Biomacromolecules**, vol. **9**, 583-591, 2008.

166. ARGIN-SOYSAL, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. M. *Effect of complexation conditions on xantan-chitosan polyelectrolyte complex gels*. **Food hydrocolloids**, vol. **23**, 202-209, 2009.
167. DE LA TORRE, P. M.; TORRADO, S.; TORRADO, S. *Interpolymer complexes of poly(acrylic acid) and chitosan: influence of the ionic hydrogel-forming medium*. **Biomaterials**, vol. **24**, 1459–1468, 2003.
168. DE LA TORRE, P. M et al. *Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic acid): study of polymer/polymer and polymer/drug interactions within the network structure*. **Biomaterials**, vol. **24**, 1499–1506, 2003
169. MAURSTAD, G. et al. *Polyelectrolyte layer interpenetration and swelling of alginate-chitosan multilayers studied by dual wavelength reflection interference contrast microscopy*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **71**, 672-681, 2008.
170. WANG, C. et al. *Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **338**, 165-173, 2007.
171. YE, S et al. *Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films*. **Journal of Controlled Release**, vol. **106**, 319-328, 2005.
172. GASEROD, O.; SMIDSRØD, O.; SKJAK-BRAEK, G. *Microcapsules of alginate-chitosan- I A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan*. **Biomaterials**, vol. **19**, 1815-1825, 1998.
173. ZHENG, C H.; GAO, J. Q.; ZHANG, Y. P.; LIANG, W. Q. *A protein delivery system: biodegradable alginate-chitosan-poly(lactic-co-glycolic acid) composite microspheres*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. **323** 1321-1327, 2004.
174. ZHAO, Q. et al. *Hollow chitosan-alginate multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies*. **Nanomedicine: nanotechnology, Biology and Medicine**, vol. **3**, 63-74, 2007.
175. PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. *Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and alginate-chitosan beads*. **International Journal of pharmaceutics**, vol. **323**, 34-42, 2006.
176. YE, S. et al. *New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly*. **Journal of Controlled Release**, vol. **112**, 79-87, 2006.

177. KAN, Y; SCHUSTER, G. B. *Long-Range Guanine Damage in Single-Stranded DNA: Charge Transport Through a Duplex Bridge and in a Single-Strand Overhang*. **Journal of American Chemical Society**, vol. **121 (47)**, 10857-10864, 1999.
178. SCHAFFAZICK S. R., et al. *Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol.**56** , 501-505, 2003.
179. KIM, H.; CHUNG, I.S.; SHIN, K. L.; YAM, CHUNG, D. *Characterization of calcium alginate and chitosan-treated calcium alginate gel beads entrapping allyl isothiocyanate*. **Carbohydrate Polymers**, vol.**71**, 566-573, 2008.
180. WANG, G.H.; MA, Z. G.; SU, J. *Preparation of uniform sized chitosan microspheres by membrane emulsification technique and application as a carrier of protein drug*. **Journal of Controlled Release**, vol.**106**, 62-75, 2005.
181. KOFUJI, C. J.; QIAN, Y. M.; KAWASHIMA, S. *Preparation of chitosan microparticles by water-in-vegetable oil emulsion coalescence technique*. **Reactive & Functional Polymers**, vol. **62**, 77-83, 2005.
182. JÄGER, E. *Controle da liberação do ester etílico de indometacina a partir de nanocapsulas poliméricas através da variação da concentração do mono estearato de sorbitano*. **Dissertação de mestrado**. UFRGS. Faculdade de Farmácia. 2008.
183. GOMEZ, C. G. et al. *Synthesis and characterization of a β -CD-Alginate conjugate*. **Polymer**, vol. **47**, 8509-8516, 2006.
184. BARRAT, G.M. *Therapeutic applications of colloidal drug carriers*. **Pharmaceutical Science Technology Today, Cambridge**, v.**5**, 163-171, 2000.
185. COUVREUR, P. et al. *Nanocapsule technology: a review*. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, vol. **19**, 99–134, 2002.
186. RAO, G. C.S; KUMAR, M. S.; MATHIVANAN, N.; RAO, M. E. B. *Nanosuspensions as the Most Promising Approach in Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. **Pharmazie**, vol. **59(1)**, 5-9, 2004.
187. PANDEY, R. et al. *Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **301**, 268-276, 2005.
188. SABNIS S.; BLOCK, L. H. *Chitosan as an enabling excipiente for drug delivery I. Molecular modifications*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. **27**, 181–186, 2000.

189. LEONARD, M. et al. *Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties*. **Journal of Controlled Release**, vol. **98**, 395-405, 2004.
190. ZHONG, Z. et al. *Synthesis and antifungal properties of sulfanilamide derivatives of chitosan*. **Carbohydrate Research**, vol. **342**, 2390-2395, 2007.
191. DING, P. et al. *Preparation and properties of modified chitosan as potential matrix materials for drug sustained-release beads*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. **41**, 125-131, 2007.
192. HOLME, K. R.; PERLIN, A. S. *Chitosan N-sulfate. A Water-soluble polyelectrolyte*. **Carbohydrate Research**, vol. **302**, 7-12, 1997.
193. MUZZARELLI, C. et al. *Alkaline chitosan solutions*. **Carbohydrate Research**, vol. **338**, 2247-2255, 2003.
194. SUGIMOTO, M. et al. *Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **36**, 49-59, 1998.
195. ZHU, A.; DAI, S.; LI, L.; ZHAO, F. *Salts effects on aggregation of O-carboxymethylchitosan in aqueous solution*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. **47**, 20-28, 2006.
196. ZHU, A.; CHAN-PARK, M. B.; DAI, S.; LI, L. *The aggregation behavior of O-carboxymethylchitosan in dilute aqueous solution*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. **43**, 143-149, 2005.
197. MIRANDA, M. E. S. et al. *Chitosan and N-carboxymethylchitosan: I. The role of N-carboxymethylation of chitosan in the thermal stability and dynamic mechanical properties of its films*. **Polymer International**, vol. **55**, 961-969, 2006.
198. Di COLO, G. et al. *Effect of chitosan and of N-Carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin*. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. **273**, 37-44, 2004.
199. MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. *Rheological Behaviour of Aqueous Dispersions of Algal Sodium Alginates*. **Journal of Food Engineering**, vol. **28**, 283-295, 1996.
200. GE, H. C.; LUO, D. K. *Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation*. **Carbohydrate Research**, vol. **340**, 1351-1356, 2005.

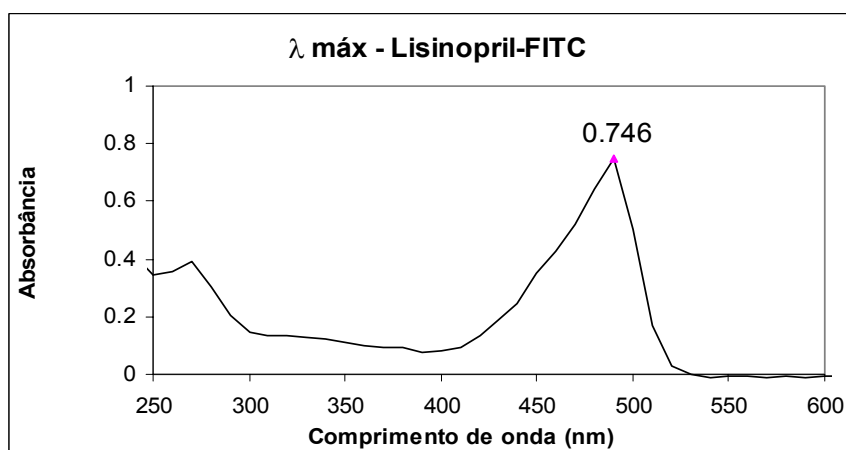
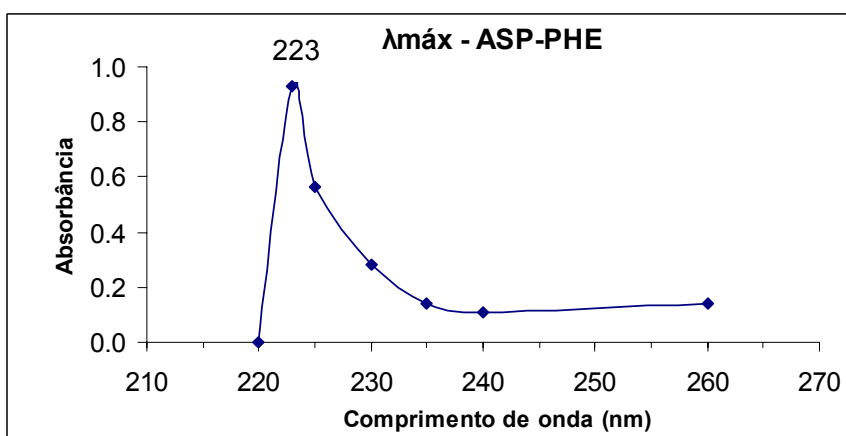
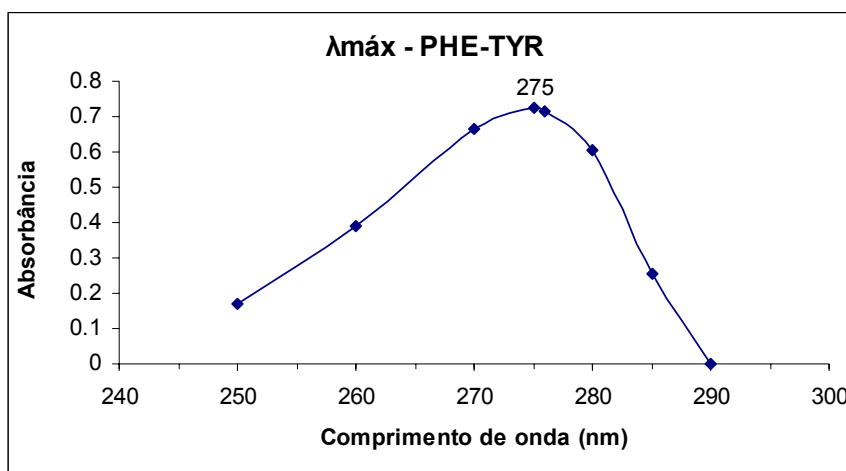
201. MEENA R., PRASAD K., SIDDHANTA A. K. *Development of a stable hydrogel network based on agar–kappa-carrageenan blend cross-linked with genipin.* **Food Hydrocolloids**, vol. **23**, 497-509, 2009.
202. AMADO, F. D. R. *Produção e aplicação de membranas com polímeros convencionais e polianilina para uso em eletrodialise no tratamento de efluentes industriais.* **Tese de doutorado**, UFRGS, 2006.
203. RIBEIRO, J. L. D.; FOGLIATTO, F.; CATEN, C. S. T. Minimizing Manufacturing and Quality Costs in Multiresponse Optimization. *Quality Engineering* 13, 191-201, 2000.
204. RIBEIRO, A. J.; SILVA, C.; FERREIRA, D.; VEIGA. *Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique* **European Journal of Pharmaceutical Science**, vol. **25**, 31-40, 2005.
205. WEN-TAO, Q.; WEI-TING, Y.; YU-BING, X.; XIAOJUN, M. *Optimization of Saccharomyces cerevisiae culture in alginate-chitosan-alginate-microcapsule.* **Biochemical Engineering Journal**, vol. **25**, 151-157, 2005.
206. CUNHA, F. O. V.; MELO, D. H. R.; VERONESE, V. B.; FORTE, M. M. C. *Study of castor oil polyurethane-poly (methylmethacrylate) semi-interpenetrating polymer network (SIPN). Reaction parameters using a 2³ factorial experimental design.* **Materials Research**, vol. **7**, 539-543, 2004.
207. HARI, P. R.; CHANDY, T.; SHARMA, C. P. *Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin.* **Journal of Applied Polymer Science**, vol. **59**, 1795-1801, 1996.
208. CHEN, X. G. ; PARK, H. J. *Chemical characteristics of O-Carboxymethyl chitosan related to the preparation conditions.* **Carbohydrate Polymers**, vol. **53**, 355–359, 2003.
209. HEJAZI, R.; AMIJI, M. *Chitosan-based gastrointestinal delivery systems.* **Journal of Controlled Release**, vol. **89**, 151–165, 2003.
210. SPINKS, G. M. et al. *Behavior of Chitosan Hydrogels. in Ionic Liquid-Water Binary Systems.* **Langmuir**, vol. **22**, 9375-9379, 2006.
211. KITTUR F. S.; PRASHANTH K. V. H.; SANKAR K. U.; THARANATHAN R. N. *Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry.* **Carbohydrate Polymers**, vol. **49**, 185-193, 2002.

212. COVAS, P.; MONAL, A.; RAMÁN, S. *A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan*. **Polymer Degradation and Stability**, vol. **39**, 21–28, 1993.
213. ZHOU, Y. et al. *Semi-interpenetrating polymer network hydrogels based on water-soluble N-carboxylethyl chitosan and photopolymerized poly (2-hydroxyethyl methacrylate)*. **Carbohydrate Polymers**, vol. **75**, 293–298, 2009.
214. WANG, Y. et al. *Preparation and characterization of uniform-sized chitosan microspheres containing insulin by membrane emulsification and a two-step solidification process*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. **50**, 126-135, 2006.
215. ZHI, J, et al. *In situ preparation of magnetic chitosan/Fe₃O₄ composite nanoparticles in tiny pools of water-in-oil microemulsion*. **Reactive and Functional Polymers**, vol. **66**, 1552-1558, 2006.
216. LIU, G.; SHAO, L.; GE, F.; CHEN, J. *Preparation of ultrafine chitosan particles by reverse microemulsion*. **China Particuology**, vol. **5**, 384-390, 2007.
217. HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. *Hydrogel nanoparticles in drug delivery*, **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. **60**, 1638-1649, 2008.

10 ANEXOS

Anexo A1

**Comprimento de onda de máxima absorção (λ max) para os peptídeos
ASP-PHE, TYR-PHE e o complexo lisinopril-FITC**



Anexo A2

Análise CHN para a quitosana de baixa massa molar (BQUI) e a carboximetilquitosana (CMQUI)

A composição relativa de C, N, e H dos polissacarídeos foi determinada através da análise elementar CHN. As amostras foram previamente aquecidas a 370 K, sob vácuo, por 60 min, e posteriormente analisadas em triplicata no equipamento Perkin Elmer M CHNS/O, modelo 2400.

	BQUI	CMQUI
C:	39%	31,57%
H:	7,35%	6,75%
N:	6,78%	4,33%