MAX JORGE CARLOS SALAZAR

**Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina
e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para a obtenção do título de
mestre em ciências.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2015

Este trabalho está dedicado a meus queridos pais e família,
obrigado pela paciência e carinho durante o tempo de estudos

AGRADECIMENTOS

Durante o tempo desta experiência e trabalho muitas pessoas têm contribuído em minha formação e às quais quero expressar meu mais sincero agradecimento.

Quero agradecer a minha orientadora à Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pelos conhecimentos, paciência, ajuda e tempo dedicado. Também quero agradecer pela oportunidade de poder trabalhar em seu laboratório, o incentivo e a orientação científica ao longo deste trabalho.

Também quero agradecer à Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins por seu apoio, conhecimento, conselhos, paciência (muita paciência) e amizade, sem quem teria sido difícil ter concluído este trabalho.

O tempo de estadia em São Carlos foi muito rápido. Quero mostrar meu mais sincero agradecimento à Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos, assim como também ao Grupo de Bioquímica e Biomateriais e as pessoas e amigos que trabalham lá, Rebeka, Livia, Crisiane, Lucas, Caio, Eduardo, Claudio, Fernando, Murilo, também quero agradecer ao Prof. Dr. Sergio Akinobu Yoshioka pelos conselhos, sugestões e amizade e a minha amiga a Dra. Marília Marta Horn pelos conselhos, amizade e momentos gratos durante o trabalho.

Quero agradecer ao grupo de Biofísica molecular e ao Prof. Dr. Marcel Tabak assim como também ao Dr. Francisco Adriano O. Carvalho por permitir-me trabalhar e fazer algumas análises no seu laboratório. Também quero expressar meu agradecimento aos funcionários Aldimar T. J. Constante, Ezer Biazin, Fabiana Tessari Rodriguez, Márcio de Paula, sem os quais teria sido difícil fazer as análises deste trabalho.

Também quero expressar meu agradecimento aos professores Dr. Eder Tadeu Gomez Cavalheiro e Dr. Sergio Paulo Campana Filho, pelos conselhos e amizade.

Durante o tempo desta experiência em São Carlos, tive a graça de compartilhar novos momentos fraternos com meus amigos compatriotas peruanos. Muito obrigado a meus parceiros Edson, Carlos, Charlie, Dante, Miguel, Wilner, Claudia, Elisa, Irene, Renato, Rudy.

O maior agradecimento de todos é para minha família, para meu pai, minha mãe e minha irmã. Obrigado pela paciência e apoio durante o tempo desta etapa e trabalho.

Quero agradecer também a Denisse pelo carinho, paciência e apoio durante o tempo do trabalho.

Muito obrigado a todos, de coração.

“No permitas que nadie diga que eres incapaz de hacer algo, ni si quiera yo.
Si tienes un sueño, debes conservarlo. Si quieres algo sal a buscarlo y punto.
¿Sabes?, la gente que no logra conseguir sus sueños suele decirle a los
demás que tampoco cumplirán los suyos”

Will Smith (En busca de la felicidad)

RESUMO

CARLOS-SALAZAR, Max Jorge. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos**. 1015. 114f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

As nanopartículas poliméricas apresentam grande potencial como nanotransportadores de fármacos, o que torna o estudo de novas composições essencial para seu desenvolvimento. No presente trabalho foram preparadas nanopartículas poliméricas, usando biopolímeros como a quitosana, o colágeno e a gelatina. A metodologia de preparação foi baseada na reticulação iônica da quitosana com tripolifosfato de sódio. Com a finalidade de obter nanopartículas de menores tamanhos foi usada quitosana de baixa massa molar, polímero obtido pela metodologia da degradação oxidativa. A quitina foi extraída do gladio de lula (*Loligo sp*) que posteriormente foi desacetilada e despolimerizada, obtendo quitosana de 50,4 kDa de massa molar e 81,04 % de grau de desacetilação. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas pelas técnicas FTIR, MEV, DLS e potencial Zeta. Foram obtidas nanopartículas das misturas quitosana/gelatina/tripolifosfato com tamanhos de até $236,9 \pm 1,6$ nm e índice de polidispersividade de $0,13 \pm 0,02$. Também foram obtidas nanopartículas de quitosana/colágeno/tripolifosfato com tamanhos de até $251,9 \pm 2,9$ nm e índice de polidispersividade de $0,20 \pm 0,02$. Foi encontrado aumento do tamanho das nanopartículas quando é aumentado a quantidade de proteína na nanopartícula. Também foi avaliado o potencial das nanopartículas como nanotransportadores mediante a incorporação de uma molécula de prova como o ácido pícrico, composto escolhido pelo baixo valor da constante de dissociação ácida, que facilitaria a incorporação devido a uma possível interação com a quitosana. Foi encontrada uma quantidade incorporada de $7,39 \pm 0,13$ % e $6,44 \pm 0,23$ % para nanopartículas de quitosana/gelatina/tripolifosfato e quitosana/colágeno/tripolifosfato, respectivamente. Os estudos de liberação mostraram que a saída do ácido pícrico é rápida quando são usadas nanopartículas preparadas com gelatina comparando-se com partículas com colágeno que originam uma liberação mais lenta do ácido pícrico. Estudos da cinética de liberação usando modelos matemáticos revelaram que as curvas de liberação seguem o mecanismo de difusão.

Palavras-chave: quitosana, colágeno, gelatina, nanopartículas, liberação de fármacos.

ABSTRACT

CARLOS-SALAZAR, Max Jorge. **Development of chitosan-gelatin and chitosan-collagen nanoparticles aiming at drug release**. 1015. 114f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Polymeric nanoparticles present big potential as drug nanocarrier, therefore the study of new compositions is essential for their development. In this study was prepared polymeric nanoparticles using biopolymers such as chitosan, collagen and gelatin. The preparation methodologies were based on the ionic reticulation of chitosan with sodium tripolyphosphate. In order to obtain small size nanoparticles it was used chitosan of low molecular weight; this polymer was obtained by oxidative depolymerization. Chitin was extracted from squid pens (*Loligo sp*) and subsequently it was deacetylated and depolymerized, getting a chitosan with 50.4 kDa of molecular weight and 81.04 % of deacetylation degree. The nanoparticles were characterized by FTIR, SEM, DLS and Z potential. From the chitosan/gelatin/tripolyphosphate mixtures it was obtained nanoparticles with size up to 236.9 ± 1.6 nm and 0.13 ± 0.02 of polydispersity index. Also, were obtained nanoparticles of chitosan/collagen/tripolyphosphate with size up to 251.9 ± 2.9 nm and 0.20 ± 0.02 of polydispersity index. Was found an increase in nanoparticles size when increasing the protein quantity in the nanoparticle. The potential of nanoparticles as nanocarrier was evaluated with one test molecule, the picric acid. This compound was selected for the low value of acid dissociation constant facilitating the incorporation due to a possible interaction with chitosan. The content loading was of 7.39 ± 0.13 % and 6.44 ± 0.23 % for chitosan/gelatin/tripolyphosphate nanoparticles and chitosan/collagen/tripolyphosphate nanoparticles respectively. The release studies showed that the picric acid delivery is quick when nanoparticles prepared with gelatin were used. The nanoparticles prepared with collagen originate backwardness in the picric acid delivery. Release kinetic studies using mathematic models showed that the release curve have a diffusion mechanism.

Keywords: chitosan, collagen, gelatin, nanoparticles, drug delivery

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Flutuações da concentração de um fármaco no estado de equilíbrio dinâmico em dependência da frequência das doses.....	16
Figura 2 – Curva típica de ação do fármaco resultante do uso de: (a) administração convencional, (b) sistema de liberação prolongada, (c) sistema de liberação controlada.....	18
Figura 3 - Mecanismo de liberação de matrizes inertes ou hidrofóbicas	20
Figura 4 – Mecanismo de liberação em matrizes hidrofílicas que sofrem erosão	22
Figura 5 - Curvas teóricas dos modelos cinéticos dependentes.....	26
Figura 6 - Curvas teóricas do modelo de Korsmeyer-Peppas	27
Figura 7 - Eficiência da dissolução de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica (área sobre a curva)	30
Figura 8 - Escala de tamanho macro, micro e nanoscópico de alguns sistemas	31
Figura 9 - Nanotransportadores usados em liberação de fármacos	33
Figura 10 - Nanopartículas poliméricas: (a) Nanoesfera, (b) nanocápsula contendo água e (c) nanocápsula contendo óleo.	34
Figura 11 - Materiais de estudo para a liberação controlada a partir de nanopartículas poliméricas	35
Figura 12 - Estrutura da hélice tripla do colágeno formado por (ProHypGly) ₄ -(ProHypAla)-(ProHypGly) ₅ , (b) imagem dos três fios da hélice tripla, (c) ligações de hidrogênio de cada segmento das cadeias	36
Figura 13 - Desnaturação do colágeno	37
Figura 14 - Estrutura da quitina (a) e da quitosana (b)	39
Figura 15 - Estrutura do Tripolifosfato de sódio.....	40
Figura 16 - Interação da quitosana como o tripolifosfato, (a) desprotonação, (b) reticulação iônica.....	41
Figura 17 - Estrutura do ácido pícrico.....	42
Figura 18 - Fotografia digital do gladio de lula (a) e a quitina (b).....	54
Figura 19 - Fotografia da quitosana CS (a) e a quitosana despolimerizada CSD (b)	55

Figura 20 - Espectros FTIR de Quitosana (a) e Quitosana despolimerizada (b)	56
Figura 21 - Titulação condutimétrica representativa da quitosana (7) (a) e quitosana despolimerizada (5) (b)	58
Figura 22 - Despolimerização da quitosana pelo ácido nítrico	60
Figura 23 - Concentração de soluções de CS a) e CSD b) vs viscosidade reduzida e inerente	62
Figura 24 - Fotografias digitais do tendão bovino (a) e gel do colágeno (b)	63
Figura 25 - Espectros FTIR do colágeno CL (a) e da gelatina G (b)	64
Figura 26 - Curva DSC do colágeno	65
Figura 27 - Fotomicrografias de matrizes obtidas pela metodologia I, CSD/G 1, aumento de 20,00k x (a), CSD/G 2 (b), CSD/G 3 (c), CSD/G 4 (d), CSD/G 5 (e), aumentos de 70,00k x.	72
Figura 28 - Fotomicrografias das matrizes obtidas pela metodologia I CSD/CL 1 (a), CSD/CL 2 (b), aumentos de 70,00k x e CSD/CL 3 (c) aumento de 50,00k x	73
Figura 29 - Fotografias digitais das suspensões CSD/G 6 (a) e CSD/CL 4 (b) mostrando o efeito Tyndall	74
Figura 30 - Fotomicrografias das matrizes CSD/G 6 (a), CSD/G 7 (b), CSD/G 8 (c) aumentos de 20,00k x, CSD/CL 4 aumento de 50,00k x (d), CSD/CL 5 (e) e CSD/CL 6 (f) aumentos de 20,00k x.	75
Figura 31 - Espectros FTIR de TPP (a), CSD/G 6 (b), CSD/G 7 (c), CSD/G 8 (d), CSD/CL 4 (e), CSD/CL 5 (f), CSD/CL 6 (g).	78
Figura 32 - Distribuição média do tamanho de partículas na dispersão de nanopartículas de CSD e G em água. Intensidade de partículas em função do diâmetro hidrodinâmico (a) e Número de partículas em função do diâmetro hidrodinâmico (b).	80
Figura 33 - Distribuição média do tamanho de partículas na dispersão de nanopartículas de CSD e CL em água. Intensidade de partículas em função do diâmetro hidrodinâmico (a) e Número de partículas em função diâmetro hidrodinâmico (b).	82
Figura 34 - Esquema da formação das nanopartículas CSD/G VI (a) e CSD/CL IV (b)	86

Figura 35 - Varredura espectral UV-Vis do ácido pícrico em água, concentração 0,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 0,585 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 1,170 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 2,340 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 7,020 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 11,700 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 23,400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—)	89
Figura 36 - Curva de calibração do AP em água.....	89
Figura 37 - Varredura espectral do ácido pícrico em água, concentração 0,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 0,584 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 1,168 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 2,336 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 7,008 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 11,680 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—), 23,360 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (—)	90
Figura 38 - Curva de calibração do AP em PBS pH 7,4.	91
Figura 39 - Esquema do sistema de liberação de nanopartículas	92
Figura 40 - Espectro infravermelho do AP (a) e as matrizes CSD/G 6 – AP (b) e CSD/CL 4 – AP (c).	96
Figura 41 - Fotomicrografias por MEV das amostras liofilizadas CSD/G 6, aumento de 10,00k x (A), CSD/G 6, aumento de 58,05k x (B) e CSD/CL 4, aumento de 10,00k x (C)	98
Figura 42 - Fotomicrografias das amostras CSD/G 6 (A) e CSD/CL 4 (B) com AP. Aumento de 80,00k x	99
Figura 43 - Perfil de liberação de ácido pícrico em CSD/G 6 e CSD/CL 4.	100
Figura 44 - Aplicação do Modelo de primeira ordem para a liberação do AP em CSD/G 6 e CSD/CL 4	101
Figura 45 - Aplicação do Modelo de Higuchi para a liberação do AP em CSD/G 6 e CSD/CL 4	102
Figura 46 - Aplicação do Modelo de Hixson-Crowell para a liberação do AP em CSD/G 6 e CSD/CL 4.	103
Figura 47 - Aplicação do Modelo de Korsmeyer-Peppas para a liberação do AP em CSD/G 6 e CSD/CL 4	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre o valor de n e o mecanismo de liberação.	27
Tabela 2 - Resultados das titulações conductimétricas das amostras de quitosana	59
Tabela 3 - Resultados das titulações conductimétricas das amostras de quitosana despolimerizada	59
Tabela 4 - Valores da concentração, tempo, viscosidade inerente e viscosidade reduzida de CS.....	61
Tabela 5 - Valores da concentração, tempo, viscosidade inerente e viscosidade reduzida de CSD	61
Tabela 6 - Condições de preparação pela Metodologia I.....	68
Tabela 7 - Condições de preparação pela Metodologia II.....	69
Tabela 8 - Rendimento e concentrações das nanopartículas obtidas.....	76
Tabela 9 - Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade (PDI) das nanopartículas de quitosana e gelatina.....	81
Tabela 10 - Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade (PDI) das nanopartículas de quitosana e colágeno.....	83
Tabela 11 - Potencial Z médio de nanopartículas CSD/G 6 e CSD/CL 4	84
Tabela 12 - Parâmetros usados na incorporação de ácido pícrico em CSD/G 6 e CSD/CL 4	87
Tabela 13 - Eficiência da incorporação e Conteúdo Incorporado em CSD/G 6.	94
Tabela 14 - Eficiência da incorporação e conteúdo incorporado em CSD/CL 4.	95
Tabela 15 - Valores de $t_{20\%}$, $t_{50\%}$ e $t_{90\%}$ das curvas de liberação do AP.	100

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala – Alanina

AP – Ácido pícrico

Asn – Asparagina

CL – Colágeno

CS – Quitosana

CSD – Quitosana despolimerizada

Da – Dalton

DD – Grau de desacetilação

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

EDTA – Etilenodiaminotetraacetato de sódio

G – Gelatina

Glu – Glutamina

Gly – Glicina

Hyp – Hidroxiprolina

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PBS – Tampão de fosfato salino

PDI – Índice de Polidispersividade

Pro – Prolina

RMN¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Td – Temperatura de desnaturação do colágeno

TPP – Tripolifosfato de sódio

UV-Vis – Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	16
1.1.1 Peroral	17
1.1.2 Via Transdérmica.....	17
1.1.3 Via Parenteral	17
1.1.4 Outras vias.....	18
1.2 BIOMATERIAIS.....	19
1.3 POLÍMEROS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA	20
1.4 MODELOS MATEMÁTICOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	22
1.4.1 MÉTODO MODELO-DEPENDENTE	23
1.4.1.1 Modelo de ordem Zero.	23
1.4.1.2 Modelo de primeira ordem.....	24
1.4.1.3 Modelo de Higuchi.....	24
1.4.1.4 Modelo de Hixson-Crowell.....	25
1.4.1.5 Modelo de Korsmeyer-Peppas	26
1.4.2 MÉTODO MODELO-INDEPENDENTE	28
1.4.3 OUTROS PARÂMETROS DE LIBERAÇÃO	29
1.5 NANOTECNOLOGIA.	30
1.6 NANOTRANSPORTADORES.....	32
1.7 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	33
1.8 COLÁGENO E GELATINA.....	35
1.9 QUITINA E QUITOSANA	38
1.10 TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO.....	40
1.11 ÁCIDO PÍCRICO.....	41
1.12 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA:	42
2 JUSTIFICATIVA	45
3 OBJETIVOS	47

4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS DE PARTIDA	48
4.1 METODOLOGIA	48
4.1.1 OBTENÇÃO DA QUITOSANA (Horn, 2009).....	48
4.1.1.1 Desmineralização:	48
4.1.1.2 Desproteínização	49
4.1.1.3 Desacetilação	49
4.1.2 DESPOLIMERIZAÇÃO DE QUITOSANA (Mao, et al., 2004)	49
4.1.3 OBTENÇÃO DE COLÁGENO	50
4.1.4 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS.....	50
4.1.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	50
4.1.4.2 Determinação de grau de acetilação da quitosana (Torres, et al., 2005)	51
4.1.4.3 Determinação de massa molar viscosimétrica média da quitosana	51
4.1.4.4 Determinação da temperatura de desnaturação do colágeno (Td)	53
4.2 DISCUSSÃO	53
4.2.1 OBTENÇÃO DA QUITOSANA.....	53
4.2.2 DESPOLIMERIZAÇÃO DE QUITOSANA	54
4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	55
4.2.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	55
4.2.3.2 Determinação de grau de acetilação da quitosana (Torres, et al., 2005)	57
4.2.3.3 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana	60
4.2.4 OBTENÇÃO DO COLÁGENO	63
4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO	63
4.2.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	63
4.2.5.2 Determinação da temperatura de desnaturação do colágeno	65
5 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	67
5.1 METODOLOGIA	67
5.1.1 METODOLOGIA I	67
5.1.2 METODOLOGIA II	68
5.1.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS PREPARAÇÕES	69
5.1.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	69
5.1.4.1 Microscopia electronica de varredura (MEV)	69
5.1.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho.....	70
5.1.4.3 Determinação do tamanho das nanopartículas	70

5.1.4.4 Determinação do potencial Z.....	70
5.2 DISCUSSÃO	71
5.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	71
5.2.2 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS PREPARAÇÕES	76
5.2.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRVERMELHO.....	77
5.2.4 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS - ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)	79
5.2.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA (Z).....	83
6 INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	87
6.1 METODOLOGIA	87
6.1.1 INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO PÍCRICO	87
6.1.2 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO PÍCRICO.....	88
6.1.2.1 Metodologia I	88
6.1.2.2 Metodologia II	90
6.1.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM ÁCIDO PÍCRICO ..	91
6.1.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	91
6.1.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	91
6.1.4 LIBERAÇÃO <i>in vitro</i> DE ÁCIDO PÍCRICO.....	91
6.1.5 ESTUDO CINÉTICO DAS CURVAS DE LIBERAÇÃO	93
6.2 DISCUSSÃO.....	93
6.2.1 INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO PÍCRICO	93
6.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO PÍCRICO.....	96
6.2.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	96
6.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	97
6.2.3 LIBERAÇÃO DO ÁCIDO PÍCRICO.....	99
6.2.4 ESTUDO CINÉTICO DAS CURVAS DE LIBERAÇÃO	101
7 CONCLUSÕES	107
8 REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

Um dos temas de pesquisa fortemente estudados na área da biomedicina é o desenvolvimento de novas tecnologias de administração de fármacos. O principal problema na posologia dos medicamentos é a biodisponibilidade obtida pelas diferentes vias de administração. Devido a que o fármaco apresenta dificuldades para atingir seu órgão alvo, a quantidade deste geralmente irá diminuindo.

A farmacocinética descreve os processos de adsorção das drogas no corpo e sua distribuição em diversos tecidos, até sua eventual eliminação que compreende processos de metabolização e excreção (JAMBHEKAR; BREEN, 2009). Devido a estes fatos a dosagem terapêutica de um fármaco deve manter a concentração plasmática máxima abaixo da concentração tóxica e acima de seu nível minimamente efetivo. Para conseguir estes valores, a posologia leva em conta estes fatores pelo qual têm sido desenvolvidas algumas formas de administração usadas atualmente, como a liberação contínua do fármaco por via intravenosa, subcutânea, oral, entre outras. Podem-se administrar doses pequenas e frequentes, porém essa estratégia está sujeita à inconveniência do paciente a uma administração frequente. Também se poderia usar uma administração menos frequente, mas ela exige o uso de doses mais altas que resulta em maiores flutuações nos níveis máximo e mínimo do fármaco. Esse esquema pode ser mais conveniente para o paciente, mas também tem maior tendência a causar problemas, devido a níveis excessivos (tóxicos) ou insuficientes (subterapêuticos) do fármaco (LAMATTINA; GOLAN, 2014). A Figura 1 mostra as flutuações da concentração de um fármaco no estado de equilíbrio dinâmico em dependência da frequência das doses.

Uma das soluções para este problema é o uso de dispositivos de liberação modificada. Entre estes dispositivos encontramos os sistemas de liberação prolongada. Um dispositivo de liberação prolongada, lenta ou sustentada é um sistema que libera o fármaco gradualmente, mantendo a saída por um período prolongado de tempo. Se o sistema mantém a concentração plasmática em níveis terapêuticos ou níveis constantes no tecido alvo será considerado como dispositivo de liberação controlada (ISHA, et al., 2012; PEZZINI, 2007).

Figura 1 – Flutuações da concentração de um fármaco no estado de equilíbrio dinâmico em dependência da frequência das doses.

Fonte: LAMATTINA, J. C., 2014, p. 43.

1.1 LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Os dispositivos de liberação modificada têm como finalidade melhorar a disponibilidade dos fármacos. Neste contexto uma liberação controlada trata de reduzir os efeitos secundários e produzir uma concentração estável no organismo dentro da faixa terapêutica. Este tipo de liberação tenta obter a cinética de liberação de ordem zero. Entre outros tipos de administração encontramos o uso de dispositivos sitio dirigidos. Este tipo de liberação tenta garantir que o fármaco seja liberado num lugar estabelecido e, ao mesmo tempo se encontre inativo em qualquer outro lugar do organismo (SÁEZ; HERNÁEZ; LÓPEZ, 2003).

Existem diversos sistemas de liberação para uso em distintas vias de administração, entre elas temos:

1.1.1 Via Peroral

A administração peroral é uma das vias mais usadas que possibilitam o efeito sistêmico, como resultado da absorção em diversas localizações do trato digestivo. Esta tecnologia é uma das mais simples, convenientes e seguras para administração de drogas. Entre as desvantagens encontradas nestes sistemas de liberação temos a resposta lenta do efeito terapêutico do fármaco, possibilidade de absorção irregular e probabilidade da destruição pelos ácidos e enzimas do estômago (HACKER; BACHMAM; MESSER, 2009).

1.1.2 Via Transdérmica

Este é um sistema de liberação onde o dispositivo é aderido externamente na pele, tornando possível obter uma ação prolongada além de ter maior comodidade para o paciente e de fácil eliminação do sistema de liberação. Também é importante mencionar que mediante este tipo de dispositivos é possível obter efeitos sistêmicos, evitando a metabolização do sistema hepático. Algumas das desvantagens nestes sistemas são o número reduzido de fármacos que podem atravessar a pele e alguns dispositivos precisam ser compatíveis para evitar efeitos adversos como a irritação (SÁEZ; HERNÁEZ; LÓPEZ, 2003).

1.1.3 Via Parenteral

Um fármaco administrado parenteralmente consiste em injetá-lo através de um orifício ao interior do corpo em diferentes profundidades, podendo ser subcutânea, intramuscular ou intravenosa. Este método exige uma esterilização prévia e um treinamento das pessoas que executam a administração. Esta via de administração é muito conveniente para fármacos que sofrem inativação no trato intestinal ou baixa solubilidade (HACKER; BACHMAM; MESSER, 2009).

1.1.4 Outras vias

Existem outros métodos de administração como a via retal, tópica, aerossol, inalação, entre outras. Em princípio os mecanismos de liberação são similares e são baseadas em dissolução e difusão de fármacos. Devem ser levados em conta aspectos fisiológicos e anatômicos para cada via de administração (HACKER; BACHMAM; MESSER, 2009).

Na Figura 2 é mostrada a diferença entre a liberação do fármaco em sistemas de administração oral, como no caso de comprimidos convencionais, sistemas de liberação prolongada e sistemas de administração controlada.

Figura 2 – Curva típica de ação do fármaco resultante do uso de: (a) administração convencional, (b) sistema de liberação prolongada, (c) sistema de liberação controlada.

Fonte: Adaptação de SÁEZ, V., 2003, p.111.

Entre as possíveis alternativas para a obtenção de dispositivos de liberação modificados se encontram os biomateriais. Estes materiais são estudados pelo potencial de desempenhar certos tipos de funções biológicas quando são incorporados ao nosso corpo.

1.2 BIOMATERIAIS

Desde décadas passadas um biomaterial é conhecido como qualquer substância ou combinação de substâncias, farmacologicamente inertes, de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada ou incorporada por qualquer período de tempo, como parte ou o todo de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função (WILLIAM, 1987).

Algumas macromoléculas são frequentemente usadas como biomaterial. Elas podem ser de origem natural, como a celulose, proteínas, borracha natural, colágeno ou produzidas sinteticamente, como o polietileno, o nylon e os silicones. As macromoléculas são moléculas que apresentam elevada massa molar, formadas por cadeias longas de átomos. Uma unidade constitucional de repetição descreve uma macromolécula e no caso dos polímeros esta é chamada *monômero*. Em alguns casos a cadeia é linear, em outros casos as cadeias são ramificadas ou interconectadas formando retículos tridimensionais (HANS-GEORGE, 1984, p. 3).

No campo dos biomateriais são bastante utilizados os polímeros para aplicações biomédicas, no entanto, para poder escolher um polímero ou macromolécula para certa aplicação é necessário que os materiais tenham certas propriedades. Entre os parâmetros críticos que são necessários estudar para considerar um material para aplicação como possível biomaterial, encontram-se as propriedades mecânicas, a pureza, a metodologia de fabricação, a estabilidade do material, a tolerabilidade do organismo ao material, a caracterização físico-química, entre outras (LYMAN; ROWLAND, 1989, p. 55).

A liberação controlada de fármacos na área médica, além das áreas agroquímica e veterinária, têm sido uma das aplicações dos materiais poliméricos. Alguns dos tipos de sistemas de liberação bastante explorados atualmente constituem em uma matriz que sofre biodegradação total no período de liberação do ingrediente ativo, evitando etapas posteriores de remoção do dispositivo, quando é implantado no corpo humano (INNOCENTINI, 2012, p. 183).

1.3 POLÍMEROS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

Num sistema de liberação controlada um agente bioativo como um fármaco é incorporado no interior de um transportador que geralmente é um polímero ou uma mistura deles. A velocidade de liberação da substância está determinada pelas propriedades dos polímeros assim como também de sua dependência com o meio ambiente (pH em fluidos corpóreos). Os materiais que podem ser usadas como dispositivos de liberação são divididos em materiais insolúveis ou hidrofóbicos e hidrofílicos.

Matrizes hidrofóbicas são constituídas por polímeros insolúveis em água, entre estas matrizes encontramos a cera de abelha, parafina, cloreto de polivinila, copolímeros de metacrilato de amônio, entre outros.

A Figura 3 mostra o esquema de mecanismos de dissolução de sistemas hidrofóbicos. Estas matrizes apresentam o fármaco disperso nas estruturas porosas. Após a administração o meio de liberação penetra nos poros da matriz e dissolve o fármaco. Posteriormente são formados canalículos como consequência do processo de dissolução, seguido da etapa de difusão gradual do fármaco. Nestes sistemas também é possível encontrar um mecanismo de erosão da matriz. A prevalência de um ou outro mecanismo depende das propriedades do fármaco e da natureza da matriz usada na liberação. (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007)

Figura 3 - Mecanismo de liberação de matrizes inertes ou hidrofóbicas

Fonte: Adaptado de LÓPES, C. M., 2005, p.144.

Entre as matrizes hidrofílicas encontramos a hidroxipropilmetilcelulose, alginato de sódio, quitosana, copolímeros de ácido acrílico, entre outros.

De acordo com Peppas, *et al.*, (2000), certos tipos de polímeros hidrofílicos apresentam capacidade de intumescimento até dissolução, pelo que devem ser nomeados de hidrodispersíveis ou hidrosolúveis. Os polímeros que formam redes tridimensionais com capacidade de absorver grandes quantidades de água ou meio fisiológico sem se dissolver são chamados de hidrogeis.

O mecanismo de liberação de fármacos a partir de polímeros hidrofílicos envolve basicamente quatro etapas: transporte do meio de dissolução até a matriz polimérica, intumescimento do polímero com formação da camada de gel, difusão do fármaco através do polímero intumescido, e erosão (RANGA; PADMALATHA, 1988).

O mecanismo geral de liberação de fármaco em uma matriz polimérica é mostrado na Figura 4. Após a administração (1), o meio de liberação (solução aquosa) penetra no polímero, a água atravessa os poros da matriz e é localizada nos espaços livres das cadeias macromoleculares. A água funciona como agente plastificante, inserindo-se nas ligações de hidrogênio existentes. As interações água-polímero aumentam, diminuindo as interações poliméricas, consequentemente as cadeias ganham liberdade rotacional e ganham mais espaço. O aumento do raio de giro das cadeias poliméricas é manifestado macroscopicamente como o intumescimento. Como consequência da hidratação o fármaco existente na superfície da matriz é liberado imediatamente. O processo de intumescimento/relaxação acontece formando uma camada gelatinosa de polímero ao redor do núcleo seco da matriz (2). A camada gelificada continua com o intumescimento e vai aumentando de espessura uma vez que a água penetra até a parte seca. Posteriormente (3 e 4), o núcleo seco vai se hidratando, aumentando a espessura da camada gelificada. Simultaneamente a parte mais exterior sofre erosão, como consequência o sistema matricial mantém o volume aproximadamente constante.

Se a água que penetra a matriz continua aumentando, as cadeias poliméricas começam a separar-se cada vez mais aumentando o espaço onde acontece a difusão do fármaco. Neste ponto a velocidade de hidratação da matriz diminuirá e chegará a ser menor que a velocidade de erosão do polímero (5). Como consequência as cadeias poliméricas mais externas da camada gelificada se dispersam no meio de liberação, e a velocidade de erosão aumentará. As interações poliméricas diminuem

e as interações polímero-solvente aumentam de intensidade, chegando a desintegrar o sistema de liberação (6).

Figura 4 – Mecanismo de liberação em matrizes hidrofílicas que sofrem erosão

Fonte: Adaptado de LÓPEZ, C. M., 2005, p.147.

A liberação da substância ativa a partir da matriz polimérica resulta da interação complexa com o solvente. Existem tratamentos matemáticos que tentam explicar estes fenômenos.

1.4 MODELOS MATEMÁTICOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.

Um dos objetivos fundamentais no desenvolvimento de novos sistemas de liberação é a predição das concentrações plasmáticas que alcançará o fármaco quando for administrado. Deste modo pode-se formular os dispositivos de liberação acelerando ou atrasando sua cinética convenientemente. Por este motivo tem-se desenvolvido distintos modelos matemáticos para poder prever a cinética de liberação dos fármacos em suas matrizes e meios de liberação e assim poder prever sua biodisponibilidade *in vivo*. Os métodos de aproximação para conhecer e comparar

a cinética de liberação de fármacos de dispositivos de liberação podem ser classificados em:

- Método modelo-dependentes (modelo de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixon Crowell, entre outros)
- Método modelo-independentes

1.4.1 MÉTODO MODELO-DEPENDENTE

Estes métodos estão baseados em diferentes funções matemáticas, as quais tentam descrever os perfis de liberação do fármaco. Uma adequada função tem sido escolhida para cada tipo de perfil de liberação com o objetivo de determinar o modelo adequado que consiga descrever a cinética de liberação.

1.4.1.1 *Modelo de ordem Zero.*

Este modelo é aplicável a dispositivos com fármacos que não sofram decomposição. Ocorre geralmente de forma lenta e é aplicável a dispositivos de liberação controlada. Neste modelo é possível representar graficamente a fração do fármaco dissolvido em função do tempo, expressa pela seguinte equação:

$$W_0 - W_t = K_0 t \dots\dots\dots (1)$$

sendo W_t a quantidade do fármaco restante na forma farmacêutica no tempo t , W_0 a quantidade inicial do fármaco na forma farmacêutica e K_0 a constante de proporcionalidade. Dividindo por W_0 e simplificando obtemos:

$$f_t = K_0 t \dots\dots\dots (2)$$

sendo $f_t = 1 - (W_t / W_0)$, onde f_t representa a fração do fármaco liberado no tempo t , e K_0 é a constante de liberação de ordem zero. Esta relação pode ser encontrada em alguns dispositivos transdérmicos, comprimidos com baixa solubilidade da forma farmacêutica, forma revestidas e sistemas osmóticos (DASH et al., 2010).

1.4.1.2 Modelo de primeira ordem

Este modelo é usado para descrever processos de absorção e eliminação de alguns fármacos. A velocidade da dissolução das partículas em um meio líquido depende da relação entre a quantidade dissolvida do fármaco e a quantidade remanescente deste na matriz. Em outras palavras, as formas farmacêuticas que seguem este perfil, liberam uma quantidade do fármaco proporcional à quantidade do fármaco restante em seu interior, por unidade de tempo, sendo que a quantidade de fármaco liberado vai diminuindo. Apesar de sua difícil conceitualização ela tem uma base teórica, que pode ser descrita pela equação de Noyes-Whitney (RODRIGUES; SEGATTO, 2005):

$$\frac{dW_t}{dt} = kW_t \dots\dots\dots (3)$$

sendo W_t a concentração do fármaco restante na forma farmacêutica no tempo t e k a constante de proporcionalidade de primeira ordem. A equação de Noyes-Whitney depois de algumas transformações e a consideração de que a forma farmacêutica é de área constante (condição de *sink*), pode ser descrita como:

$$\log W_t = \log W_0 + (K_1 t / 2,303) \dots\dots\dots (4)$$

sendo W_0 a quantidade remanescente inicial do fármaco, K_1 a constante de liberação de primeira ordem. Portanto, pode-se obter um gráfico de $\log W_t$ em função do tempo, obtendo um coeficiente angular de $K_1 / 2,303$ e coeficiente linear $\log W_0$. Alguns dispositivos que seguem este modelo são aqueles que contém fármacos hidrofílicos em matrizes porosas.

1.4.1.3 Modelo de Higuchi

Este modelo foi inicialmente proposto por Higuchi (1963), para explicar o perfil de liberação de fármacos hidrossolúveis ou pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e sólidas. Inicialmente foram obtidas relações matemáticas para partículas do fármaco homogeneamente dispersas na matriz, que se comporta como meio de difusão. Posteriormente foram desenvolvidos outros modelos, como para sistemas matriciais, esféricos homogêneos, sistemas granulados planos e sistemas granulados esféricos. A expressão geral do modelo de Higuchi é:

$$f_t = K_H t^{1/2} \dots\dots\dots (5)$$

sendo f_t a quantidade de fármaco liberado no tempo t e K_H a constante de difusão de Higuchi. Os sistemas são descritos como um processo de difusão baseado na lei de Fick. Este modelo pode ser aplicado para descrever o comportamento de liberação de alguns dispositivos de dosagem como os sistemas transdérmicos e comprimidos com drogas hidrossolúveis.

1.4.1.4 Modelo de Hixson-Crowell

Estabelecido por Hixson e Crowell (1931), a área de uma partícula regular é proporcional a raiz cúbica de seu volume, podendo ser descrita por:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t \dots\dots\dots (6)$$

sendo W_0 a quantidade inicial do fármaco na forma farmacêutica, W_t a quantidade restante do fármaco na forma farmacêutica no tempo t , K_s a constante da relação superfície/volume. Dividindo a relação entre $W_0^{1/3}$ e simplificando obtemos:

$$(1 - f_t)^{1/3} = 1 - K_\beta t \dots\dots\dots (7)$$

sendo $f_t = 1 - (W_t / W_0)$, onde f_t representa a fração do fármaco liberado ao fim do tempo t e K_β a constante de liberação. Esta relação é aplicável a comprimidos onde a dissolução do fármaco acontece em planos paralelos à superfície de exposição e as dimensões do sistema diminuem proporcionalmente, de modo que a geometria inicial é mantida ao longo do tempo. Se as condições são cumpridas, um gráfico raiz cúbica de fração liberada vs tempo será linear. Quando é usado este tipo de modelo a velocidade de saída está limitado pela velocidade de dissolução das partículas e não pela difusão através da matriz polimérica.

Na Figura 5 são mostrados os perfis de liberação típicos dos modelos mostrados anteriormente. Neste gráfico é considerado uma quantidade inicial do fármaco na solução como f_0 , que geralmente é zero.

Figura 5 - Curvas teóricas dos modelos cinéticos dependentes

Fonte: Autoria própria

1.4.1.5 Modelo de Korsmeyer-Peppas

Modelo desenvolvido por Korsmeyer e Peppas (1983), pode ser representado pela seguinte equação:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n \dots\dots\dots (8)$$

sendo a uma constante cinética, M_t/M_∞ a fração do fármaco ao longo do tempo t , n é chamado expoente de liberação. Na Tabela 1 mostra-se o tipo de difusão atribuído a cada valor de n encontrado. Este modelo é geralmente usado para analisar a liberação de formas farmacêuticas poliméricas, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando possa estar envolvido mais de um tipo de liberação.

Em alguns casos o valor de n pode ser menor que 0,5. Nestes casos a velocidade de penetração da água é muito menor que a velocidade de relaxação das cadeias poliméricas. Esta situação ainda é considerada uma difusão Fickiana, mas é nomeada de quase-fickiana (*less Fickian*), (Ganji, 2010; Wang, 2008).

Tabela 1 - Relação entre o valor de n e o mecanismo de liberação.

Expoente de liberação	Mecanismo de Transporte do fármaco	Velocidade em função do tempo
0,5	Difusão Fickiana	$t^{-0,5}$
$0,5 < n < 1,0$	Difusão Anômala (não-Fickiana)	t^{n-1}
1,0	Transporte caso II	Liberação de ordem zero
$n > 1,0$	Transporte super-caso II	t^{n-1}

Fonte: KORSMEYER, 1983, p. 28.

Uma equação modificada tem sido utilizada (FORD et al., 1987) de modo a incorporar o tempo de latência (l) no início da liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica:

$$\frac{M_{(t-l)}}{M_{\infty}} = a(t-l)^n \dots\dots\dots (9)$$

Que pode ser expressa como:

$$\log \left(\frac{M_{(t-l)}}{M_{\infty}} \right) = \log a + n \log(t-l) \dots\dots\dots (10)$$

Quando há a possibilidade de uma liberação inicial rápida, esta equação é transformada em:

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = at^n + b \dots\dots\dots (11)$$

Na ausência de tempo de latência ou uma liberação inicial rápida, os valores l e b são considerados como zero e apenas at^n , na parte direita da equação 11, é usada. Para poder usar estas equações deve-se utilizar a porção da curva onde a fração do fármaco liberado seja menor que 0,6. Na Figura 6 são mostradas as curvas típicas do modelo de Korsmeyer-Peppas, considerando novamente uma quantidade inicial do fármaco f_0 . Este modelo inclui o modelo de Higuchi quando o $n = 0,5$ e o modelo de primeira ordem quando o $n = 1$.

Figura 6 - Curvas teóricas do modelo de Korsmeyer-Peppas

Fonte: Autoria própria

1.4.2 MÉTODO MODELO-INDEPENDENTE

Os métodos independentes estão baseados no estudo da dissolução do fármaco a partir do tratamento matemático dos dados da dissolução. Este método estuda a dissolução do fármaco mediante a comparação do material de estudo com um material de referência nas mesmas condições e tempo da medida. Alguns parâmetros ajudam a entender e descrever o perfil da dissolução. O fator de diferenciação (f_1) calcula a diferença porcentual entre duas curvas a cada tempo de leitura e uma média do erro relativo entre duas curvas.

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 10 \dots\dots\dots (12)$$

sendo n o número de tempos considerados, R_j a quantidade dissolvida no sistema de referência no tempo j , e T_j a quantidade dissolvida do produto de estudo no mesmo tempo.

O fator de semelhança (f_2) está definido como o logaritmo do recíproco da raiz quadrada de um mais o quadrado médio da diferença da porcentagem do fármaco dissolvido entre os produtos teste e referência.

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (R_j - T_j)^2}} \right] \times 100 \right\} \dots\dots\dots (13)$$

Para considerar os perfis de dissolução como similares, o valor de f_1 deve ser próximo de zero, de modo geral, valores entre 0 e 15 mostram semelhança entre os perfis de dissolução; de modo similar o valor do f_2 deve ser próximo de 100, valores maiores que 50 (50-100) mostram similaridade entre os perfis de liberação. Valores de f_1 maiores que 15 e de f_2 menores que 50, apresentam diferença entre os perfis de liberação que tem que ser considerados nos testes (CARDOSO, 2002, p. 147).

1.4.3 OUTROS PARÂMETROS DE LIBERAÇÃO

Outros parâmetros usados para caracterizar os perfis de liberação são o $t_{x\%}$, tempo de amostragem e a eficiência da dissolução. O $t_{x\%}$ corresponde ao tempo necessário para liberar determinada porcentagem do fármaco (ex. $t_{20\%}$, $t_{50\%}$, $t_{90\%}$), o tempo de amostragem corresponde ao conteúdo do fármaco liberado em um determinado tempo (Q_{20min} , Q_{50min} , Q_{90min}). A Eficiência da Dissolução (ED) está definido como a área sobre a curva (ASC) do perfil da dissolução, está descrita pela seguinte equação:

$$ED(\%) = \frac{\int_0^T Q dt}{Q_{100} T} \times 100 \dots\dots\dots (14)$$

sendo Q a porcentagem do fármaco liberado em função do tempo, T o tempo total do ensaio e Q_{100} a quantidade total de fármaco (Figura 7). Neste tipo de cálculo é necessário ser considerado o tempo inicial que demora para dissolver, sendo assim o cálculo não começa com o tempo zero.

Figura 7 - Eficiência da dissolução de um fármaco a partir de uma forma farmacêutica (área sobre a curva)

Fonte: Autoria própria

Estes parâmetros frequentemente são apresentados como complemento dos modelos anteriormente mencionados.

Os dispositivos de liberação podem ser preparados em sistemas macroscópicos, microscópicos ou nanoscópicos. Os sistemas nanoscópicos se encontram desenvolvidos na área da nanotecnologia, oferecendo diversas vantagens frente aos dispositivos macromoleculares.

1.5 NANOTECNOLOGIA.

Etimologicamente a nanotecnologia deriva do prefixo “*nano*”, que vem do latim “*nanus*” que em grego significa anão ou “pequeno homem velho”, e o prefixo grego “*techno*”, que significa arte, habilidade, método. Podemos definir a tecnologia como “a aplicação prática do conhecimento (ciência)”, em termos científicos a nanotecnologia é a tecnologia em escala nanométrica. Um nanometro é a bilionésima parte de um metro (10^{-9} m). A nanotecnologia é a progressão natural de miniaturização tecnológica do mundo macroscópico (HORNYAK et al., 2009).

Este tipo de tecnologia envolve uma quantidade grande de aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento (medicina, eletrônica, ciência da computação, física, química, biologia e engenharia dos materiais).

A nanobiotecnologia é uma nova tecnologia que envolve as áreas da biotecnologia e a nanotecnologia. A biotecnologia é a manipulação das moléculas e dos processos nos sistemas biológicos para ganhar melhora em suas aplicações, como por exemplo, no desenvolvimento de indicadores e sensores baseados na interação de anticorpos e substratos. A nanobiotecnologia usa os efeitos das propriedades mecânicas, elétricas, óticas e magnéticas em sistemas biológicos na nanoescala com a finalidade de criar novos tipos de dispositivos e aplicações na área biológica (HORNYAK et al., 2009).

Nos últimos anos tem sido demonstrado que as nanopartículas têm um alto potencial como dispositivos carreadores de fármacos. Devido a seu pequeno tamanho, as nanoestruturas oferecem propriedades biológicas e físico-químicas únicas. Entre as principais vantagens encontramos a melhora na área de ação, como o alvo, assim como também a capacidade de atravessar algumas células e barreiras de tecidos. Estas características fazem que estes sejam materiais muito favoráveis para aplicações biomédicas. Na Figura 8, se mostra a escala na qual se encontram os sistemas nanoparticulados, comparados com alguns sistemas macroscópicos.

Figura 8 - Escala de tamanho macro, micro e nanoscópico de alguns sistemas

Fonte: Autoria própria

1.6 NANOTRANSPORTADORES

Uma nanopartícula é uma estrutura de um tamanho que varia entre 1 e 100 nm, mas o prefixo “nano” é usado comumente em alguns trabalhos para partículas de até centenas de nanômetros de diâmetro (WILCZEWSKA et al., 2012). Nanopartículas que têm sido otimizadas com adequadas propriedades físico-químicas e biológicas podem atravessar mais facilmente pelas paredes celulares do que as grandes moléculas. Entre os principais tipos de nanotransportadores desenvolvidos nos últimos anos temos os lipossomas, nanopartículas de lipídeos sólidos, dendrímeros, materiais baseados em polímeros, sílica, carbono, nanopartículas magnéticas (WILCZEWSKA et al., 2012), mostrados na Figura 9.

As nanopartículas poliméricas são obtidas a partir de polímeros sintéticos como a poli- ϵ -caprolactona, poliacrilamida, poliacrilato ou macromoléculas e polímeros naturais como a albumina, ADN, quitosana, gelatina. Baseadas em seu comportamento *in vivo* muitos destes sistemas apresentam biodegradabilidade. O fármaco pode ser imobilizado sobre a superfície da nanopartícula após a reação de polimerização ou encapsulada durante o processo de polimerização. Alguns fármacos podem ser liberados por desorção, difusão ou erosão da nanopartícula conseguindo atravessar a barreira tecidual.

O desenvolvimento destes nanossistemas podem contribuir enormemente no tratamento de doenças, melhorando a biodisponibilidade do fármaco na solução plasmática. O objeto de estudo do presente trabalho se encontra centralizado nos sistemas nanoparticulados de origem poliméricos.

Figura 9 - Nanotransportadores usados em liberação de fármacos

Fonte: Autoria própria

1.7 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas podem ser definidas como partículas sólidas preparadas a partir de macromoléculas como os polímeros e as proteínas com tamanhos entre 10-1000 nm. Estas são classificadas em nanoesferas e nanocápsulas. As nanoesferas são matrizes poliméricas que contêm uma massa sólida e moléculas que podem ser incorporadas sobre a superfície da esfera ou encapsuladas nas partículas. As nanocápsulas são sistemas vesiculares que se comportam como um reservatório, aprisionando e confinando as substâncias numa cavidade no interior desta, a qual está formada por um núcleo central (solução aquosa ou oleosa) rodeado pelo material sólido polimérico. O esquema é mostrado na Figura 10.

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros previamente formados ou por polimerização direta de monômeros. Quando o material de partida é o polímero já formado pode-se usar métodos clássicos de preparação como: evaporação do solvente, nanoprecipitação, *salting-out*, diálise, tecnologia de fluido supercrítico (SCF). As nanopartículas poliméricas também podem ser

preparadas na formação direta dos polímeros a partir de seus monômeros. Neste caso podemos usar a polimerização por micro-emulsificação, mini-emulsão, emulsão, interfacial e radicalar (RAO; GECKELER, 2011).

Figura 10 - Nanopartículas poliméricas: (a) Nanoesfera, (b) nanocápsula contendo água e (c) nanocápsula contendo óleo.

Fonte: Autoria própria.

Neste trabalho foram abordados os sistemas nanoparticulados poliméricos, no entanto, nosso foco de estudo foi centralizado nos biopolímeros ou polímeros de origem natural.

Entre os componentes de nossas formulações temos materiais macromoleculares poliméricos e proteicos. A matriz base usada para a preparação das nanopartículas foi quitosana, além do colágeno e gelatina. O poliânion, tripolifosfato de sódio foi usado como reticulante aniônico do sistema polimérico.

Foi usado o 2,4,6-trinitrofenol ou ácido pícrico como molécula de prova para o sistema de liberação, esta formulação está resumida na Figura 11 nos seguintes itens descreveremos cada um destes componentes, sua importância e papel no mundo dos sistemas de liberação de fármacos.

Figura 11 - Materiais de estudo para a liberação controlada a partir de nanopartículas poliméricas

Fonte: Autoria própria

1.8 COLÁGENO E GELATINA

O colágeno é uma proteína fibrosa, encontrada no tecido conectivo do corpo humano e uma das mais abundantes em todos os animais. Em seres humanos compreende aproximadamente três quartas partes do peso da pele e o componente que prevalece na estrutura extracelular. O colágeno pode ser extraído de distintas fontes animais como a pele, o couro, o tendão, a cartilagem, ou matrizes orgânicas do osso, sendo também encontrada na córnea.

Até agora, têm sido identificados 29 tipos de colágeno compostos de até 46 distintos tipos de cadeias de polipeptídeos, caracterizado em todos os casos por uma estrutura de hélice tripla. Os colágenos tipo I, II, III, V e XI são conhecidos por formar estruturas fibrilares sendo o tipo I o mais comum deles. A molécula de colágeno está formada por três cadeias polipeptídicas denominadas α (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

Uma propriedade bem característica do colágeno é sua rigidez devido à estrutura de hélice tripla. As três cadeias α do colágeno (cada uma com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos), enroladas em forma de hélice tripla, de 300 nm de extensão e 1,5 nm de diâmetro aproximadamente. Cada hélice de colágeno está composta por uma sequência da forma XaaYaaGly, que é mantida em todos os tipos de colágeno, estes aminoácidos frequentemente são 2S-prolina (Pro 28%) e 2S,4R-hidroxiprolina (Hyp 38%), sendo que a sequência encontrada mais comumente é ProHypGly, cada uma destas hélices triplas é conhecida como tropocolágeno. Essa hélice tripla é mantida pelas ligações de hidrogênio entre $\text{N-H}_{(\text{Gly})} \cdots \text{O}=\text{C}_{(\text{Xaa})}$ e a $\text{C}^{\alpha}\text{-H}_{(\text{Gly/Yaa})} \cdots \text{O}=\text{C}_{(\text{Xaa/Gly})}$ que estabilizam a estrutura (SHOULDERS; RAINES, 2009), como mostrada na Figura 12.

Figura 12 - Estrutura da hélice tripla do colágeno formado por $(\text{ProHypGly})_4$ - (ProHypAla) - $(\text{ProHypGly})_5$, (b) imagem dos três fios da hélice tripla, (c) ligações de hidrogênio de cada segmento das cadeias

Fonte: Adaptado de Shoulders, M. D., 2009, p 931.

Estas macroestruturas moleculares arranjam-se formando fibrilas do colágeno, as quais são delgadas, de 10 a 300 nm de diâmetro. As fibrilas do colágeno se agregam formando grandes conjuntos, de vários micras de diâmetro, chamadas fibras do colágeno. Tipicamente o colágeno contém aproximadamente 35% de glicina, 11% de alanina, 21% de prolina e pequenas quantidades de aminoácidos aromáticos. É a única proteína que contém hidroxiprolina, quase 14%, sendo nestas zonas do

colágeno que se tem as ligações que são atacadas pela collagenase (NELSON; COX, 2005).

A desnaturação do colágeno pode ser obtida por tratamento térmico ou químico. Este fenómeno tem como finalidade quebrar as ligações de hidrogênio das cadeias polipeptídicas do colágeno ao ponto de desorganizar a estrutura proteica.

Assim é produzido intumescimento e solubilização, o aquecimento subsequente quebra totalmente as ligações de hidrogênio desestabilizando a hélice tripla e obtendo como resultado a transição ou conversão de colágeno em gelatina (Figura 13). O grau de conversão do colágeno em gelatina depende do tratamento como também da extração com água morna, geralmente acima de 45°C.

Figura 13 - Desnaturação do colágeno

Fonte: HANSEN, E. F.; 1992, p 328.

O colágeno também pode ser hidrolisado quimicamente para a obtenção de colágeno aniônico. A hidrólise seletiva dos grupos carboxamida dos resíduos dos aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) fornecem cargas negativas ao colágeno, propriedade que podem ser usada na obtenção de novos compósitos com potencial de biomaterial (CHAUDRY, et al., 1997). O número de grupos carboxilato originados apresenta incremento com o tempo de hidrólise do colágeno, conseguindo seu máximo valor depois das 96 h de tratamento alcalino. Assim é possível obter um aumento de até 106 grupos carboxílicos. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram ausência de citotoxicidade e alto grau de biocompatibilidade de materiais preparados com este tipo de colágeno. (BET, 2000).

As propriedades do colágeno e gelatina estão divididas em dois grupos principais: as propriedades baseadas em seu comportamento gelificante e as propriedades baseadas em seu comportamento superficial (baseadas na presença de grupos carregados, seções hidrofílicas ou hidrofóbicas da cadeia proteica) conseguindo assim ter aplicações na indústria de alimentos, cosméticos e

farmacêutica. Assim estes materiais conseguem facilmente formar películas, microencapsular compostos, estabilizar emulsões, e apresentam as propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, que fazem deles materiais promissores para a preparação de biomateriais (GÓMEZ-GUILLÉN, et al., 2011).

1.9 QUITINA E QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da quitina, um dos polímeros naturais mais abundantes da natureza. Podemos encontra-la nas microfibrilas cristalinas que formam os componentes estruturais do exoesqueleto dos artrópodes como os insetos e crustáceos, em alguns moluscos ou nas paredes estruturais dos fungos e leveduras. A quitina é o polímero de unidades 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopirranose unidos por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) ou simplificadaamente o poli(β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil- β -D-glucosamina). A quitosana é um derivado da N-desacetilação da quitina, este processo raramente é completado pelo que o polímero apresenta sempre uma percentagem ou grau de acetilação. Quando o grau de acetilação cai abaixo de 50% a quitina passa a ser chamada de quitosana. Devido a estes fatores a quitosana é o copolímero destas duas unidades, poli(D-glucosamina-co-N-acetil- β -D-glucosamina). A estrutura destes polímeros é mostrada na Figura 14.

O método e a fonte de obtenção da quitina determinam a composição e o tamanho das cadeias. Por este motivo a massa molar e o grau de desacetilação da quitosana são propriedades de vital importância na caracterização do polímero. A porcentagem de grupos amina livre é denominado de grau de desacetilação e está fortemente vinculado com a solubilidade do polímero. Como resultado da hidrólise do grupo N-acetil a capacidade hidrofílica da quitosana aumenta passando a ser solúvel em soluções ácidas diluídas. A protonação dos grupos amina confere uma característica catiônica à quitosana, sendo aproveitada para diversas aplicações.

Figura 14 - Estrutura da quitina (a) e da quitosana (b)

Fonte: Autoria própria

Entre as principais aplicações da quitosana podemos mencionar que na área de agricultura é usada como antivírus em algumas plantas, recobrimento de sementes, entre outras. Na área de cosméticos é usada para manter a umidade da pele e tratamento de acne. Também é usado para remover íons metálicos e como agente floculante e clarificante em tratamento de águas residuais. Na indústria alimentícia a quitosana é usada como ingrediente funcional ou fibra alimentar. Na área da biomedicina tem sido fortemente utilizada pela sua atividade imunológica, antitumoral, hemostática, anticoagulante, bacteriostática. Adicionalmente se pode mencionar que a quitosana possui propriedades farmacêuticas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade que fazem deste polímero um material potencial para a preparação de biomateriais (RINAUDO, 2006; KUMAR, 2000).

Devido a sua natureza catiônica e a capacidade de formar ligações de hidrogênio entre suas cadeias a quitosana apresenta propriedades filmogênicas, gelificantes e mucoadesivas, sendo possível a preparação de dispositivos de liberação de fármacos para administração oral, ocular, nasal, vaginal, bucal, parenteral, entre outras (BERNKOP-SCHNÜRCH, DÜNNHAUPT, 2012).

1.10 TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO

O tripolifosfato de sódio (TPP) é um agente reticulante não tóxico, reconhecido como GRAS (Generally recognized as safe) pela FDA (U. S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION., 2014), capaz de formar géis quando é ligado com a quitosana por interação iônica. A formulação de micro e nanopartículas da quitosana e tripolifosfato de sódio é muito comum porque implica na mistura de duas fases aquosas à temperatura ambiente sem o uso de solventes orgânicos. Na Figura 15 se mostra a estrutura do tripolifosfato de sódio.

Figura 15 - Estrutura do Tripolifosfato de sódio

Fonte: Autoria própria

O mecanismo de interação da quitosana com o TPP pela desprotonação ou interação iônica é mostrado na Figura 16.

O ácido tripolifosfórico ($\text{H}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) é um ácido poliprótico débil. O K_a do ácido tripolifosfórico varia em forma descendente desde o K_{a1} até K_{a5} . Devido a este motivo o tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) dissolvido na água é dissociado em hidroxila e íons tripolifosfóricos. O K_{b1} do ácido tripolifosfórico se encontra perto de $7,45 \times 10^{-4}$ e o $K_{b3} < K_{b2} < 10^{-7} < K_{b1}$, ou seja que $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$, $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$, $\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}^{3-}$ podem coexistir em solução aquosa. Em uma solução de aquosa de TPP a concentração de $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ são as mais altas comparadas com as outras bases conjugadas, no entanto o OH^- também está presente. A hidroxila e os íons tripolifosfóricos ($\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$) neste meio podem reagir iônica e competitivamente com o sítio de ligação $-\text{NH}_3^+$ da quitosana produzindo desprotonação ou reticulação iônica (MI, et al., 1999).

Figura 16 - Interação da quitosana como o tripolifosfato, (a) desprotonação, (b) reticulação iônica

Fonte: Adaptação de BHUMKAR, D. R.; POKHARHAR, V. B., 2006, p. E140.

1.11 ÁCIDO PÍCRICO

O ácido pícrico ou 2,4,6-trinitrofenol é um cristal sólido amarelo encontrado frequentemente em laboratórios forenses por seu uso na visualização microscópica de espermatozoides em agressões sexuais. Também é usado em histologia como componente de uma solução fixadora do tecido conectivo e citoplasma. Medicinalmente o ácido pícrico foi usado para o tratamento da malária, triquinose, herpes, varíola e como antisséptico, sendo também usado em soluções para o tratamento de queimaduras (Patty's Toxicology, 2000).

O ácido pícrico foi descoberto em 1771 e alguns anos depois foram descobertas suas propriedades explosivas. Atualmente ele é usado em munições e explosivos. Devido a estas propriedades o ácido pícrico seco é relativamente sensível aos choques e ao atrito, por isso os laboratórios frequentemente o armazenam como reagente hidratado ou em solução. O ácido pícrico apresenta estas propriedades por

seu caráter fortemente ácido devido a que em sua estrutura (Figura 17), apresenta três grupos nitro retiradores de densidade eletrônica, assim o hidrogênio do grupo hidroxila fica desprotegido, convertendo a esta molécula num ácido forte, com pKa 0,38 (TENNEY, 1984).

Figura 17 - Estrutura do ácido pícrico

Fonte: Autoria própria

Os materiais mencionados acima mostram potencial para preparações de nanopartículas que possam ser aplicadas em liberação de fármacos, como será descrito abaixo.

1.12 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

Os dispositivos de liberação preparados a partir da quitosana também podem ser de tamanho nanométrico, conseguindo-se preparar nanopartículas de quitosana pelas metodologias de gelificação ionotrópica, microemulsão, emulsificação-difusão do solvente e formação de complexos polieletrólíticos. Entre as metodologias mais desenvolvidas para a preparação de nanopartículas encontramos a gelificação ionotrópica e o auto agregação polieletrólítica, estes métodos oferecem a vantagem de sua relativa simplicidade de preparação e a ausência da necessidade de usar solventes orgânicos (TIYABOONCHAI, 2003).

O mecanismo de formação das nanopartículas por gelificação ionotrópica ou gelificação iônica está baseado na interação eletrostática dos grupos amina protonados da quitosana com a carga negativa de algum poliânion como o tripolifosfato. Este processo é denominado de reticulação iônica. Quando a densidade de carga do poliânion aumenta, o número de interações também aumenta, sendo

dependente do pH do sistema (SHU; ZHU, 2002). Uma das vantagens da reticulação iônica é o fato de não ter a necessidade de usar agentes que reagem covalentemente com o polímero, evitando assim a possível indução de citotoxicidade ou efeitos indesejáveis por parte do agente reticulante. A gelificação ionotrópica permite a obtenção de matrizes para liberação de fármacos desde formas macroscópicas como as esferas e filmes, até as nanométricas como as nanopartículas. A primeira preparação de nanopartículas de quitosana pela técnica de gelificação ionotrópica foi descrita por Calvo et. al. (1997). Neste estudo foi evidenciado a importância do uso das concentrações baixas, em torno de 2 mg mL^{-1} para quitosana e $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para o tripolifosfato para a obtenção de sistemas nanoparticulados.

Segundo alguns estudos, a despolimerização da quitosana por degradação oxidativa com NaNO_2 leva a redução da massa molar, sem alterar a estrutura básica da quitosana nem seu comportamento em ensaios de citotoxicidade (MAO, SHUAI, *et al.*, 2004). Alguns autores usam este tipo de quitosana de baixa massa molar para a formação de nanopartículas para uso como dispositivos de liberação de fármacos. Assim têm sido descritas preparações de nanopartículas de quitosana/ácido hialurônico com diâmetros entre 100-200 nm (NAZERI, *et al.*, 2013), sistemas quitosana/tripolifosfato com tamanhos de até 138 nm (FAN, YAN, *et al.*, 2012).

Estudos da influência da massa molar no tamanho de nanopartículas também têm sido observados. Nanopartículas de quitosana/alginato preparadas por gelificação ionotrópica apresentam tamanhos médios de 284 nm quando usada quitosana de 42 kDa em comparação com os 852 nm obtidos quando usada quitosana de 106 kDa (BISWAS, *et al.*, 2015). Sistemas de quitosana/tripolifosfato marcados com isotiocianato de fluoresceína (FTIC) também apresentaram comportamento similar. Foram encontrados tamanhos compreendidos entre 109-215 nm quando usada quitosana de 17 kDa, tamanhos entre 135-233 nm quando usada quitosana de 98 kDa e tamanhos entre 163-249 nm quando usaram quitosana de 213 kDa (HUANG; KHOR; LIM, 2004), todas elas obtidas por despolimerização oxidativa com nitrito de sódio. Mediante estes estudos é mostrada que a menor massa molar da quitosana influencia na obtenção de nanopartículas de menor tamanho em comparação as preparadas com quitosana de alta massa molar, motivo principal do uso deste tipo de quitosana na preparação de nanopartículas neste trabalho.

O colágeno também tem sido encontrado em algumas misturas com a quitosana devido a sua boa compatibilidade, apresentando interação entre os grupos amina protonados e os grupos carboxílicos do colágeno aniônico. Esta interação faz possível a preparação de compósitos formados por estas duas macromoléculas (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009). Entre as matrizes reportadas que usaram quitosana e colágeno encontramos alguns trabalhos com *scaffolds* e filmes (BARROSO, et al., 2014; RAMASAMY, 2015). No campo da nanotecnologia encontramos nanofibras usadas na cicatrização de feridas (HUANG, et al., 2015) e microcápsulas preparadas por coacervação (OCAK, 2012).

O colágeno também tem sido encontrado como material para preparação de nanopartículas. Colágeno obtido de esponja marinha foi usado para obtenção de nanopartículas por hidrólise com NaOH. Foram obtidos nanopartículas com populações parciais de 123 nm (NICKLAS, et al., 2009). No entanto, o colágeno tem sido raramente reportado como material para a preparação de nanopartículas em misturas com quitosana.

Por outro lado, a gelatina tem demonstrado também seu uso em misturas com quitosana. Tem sido preparadas micropartículas quitosana/gelatina por coacervação (SILVA, ANDRADE, 2009), assim como também tem sido encontrado seu uso para encapsulação de limoneno (PRATA; GROSSO, 2015).

Também tem sido encontradas matrizes nanopartículas baseadas em gelatina, usadas para incorporação de resveratrol (KARTHIKEYAN, et al., 2013) e nanopartículas de gelatina usadas para incorporação de cisplatina (DIXIT, et al., 2015). Em misturas com quitosana encontramos nanopartículas com gelatina para encapsulação de procianidina, com tamanhos de até 307 nm (ZOU, et al., 2012).

Estes antecedentes indicam o alto potencial como nanotransportador que teria uma mistura de quitosana despolimerizada com colágeno ou gelatina, formadas pela metodologia de gelificação iônica com tripolifosfato de sódio.

2 JUSTIFICATIVA

A necessidade de encontrar novos sistemas de administração de fármacos que possam suprir as deficiências dos sistemas de administração convencional implica na utilização de nanotransportadores como sistemas de liberação modificada, com a expectativa de controlar a liberação de determinados fármacos e ao mesmo tempo conhecer o mecanismo de liberação do sistema polimérico.

As nanopartículas poliméricas são um tipo de nanotransportador que têm sido bastante estudadas nos últimos anos (WILCZEWSKA, et al., 2012; SHAIK, 2012), pois além do tamanho reduzido delas entre 100-1000 nm (SOPPIMATH, et al., 2001), as nanopartículas oferecem algumas vantagens como o fato de não manifestar resposta do sistema imunológico e a capacidade de atravessar barreiras teciduais para conseguir chegar até um alvo determinado. Por conseguinte podem ser formuladas em diferentes composições de modo a minimizar a degradação enzimática e conseguir a cinética de liberação adequada.

Dois polímeros com possibilidade para o uso no desenvolvimento de nanopartículas para liberação controlada são a quitosana (CS) e o colágeno (CL), ambos considerados para a elaboração de diferentes tipos de biomateriais, por sua boa biocompatibilidade, biodegradabilidade, efeito antimicrobiano, não toxicidade, além das propriedades farmacológicas de cada um deles (JIANG, et al., 2014, PARENTEAU-BAREIL 2010). A gelatina (G) é uma proteína obtida pela desnaturação do colágeno que têm propriedades farmacológicas muito similares, mediante as quais também é considerada para a preparação de biomateriais.

O tripolifosfato de sódio (TPP) é um poliânion utilizado como agente reticulante, que serve como base para a formação de diferentes dispositivos de liberação de fármacos pela técnica de gelificação iônica com a quitosana (BHUMKAR; POKHARHAR, 2006; VIMAL, *et al.*, 2013).

Devido a estes antecedentes um nanotransportador formado pela mistura quitosana e colágeno ou quitosana gelatina poderia oferecer alto potencial para preparar nanopartículas. Estes sistemas poderiam ser usados como biomateriais com aplicação em sistemas de liberação de fármacos contendo as propriedades características de cada material. Por conseguinte, a proposta do presente trabalho é preparar e caracterizar nanopartículas baseadas em quitosana despolimerizada

(CSD), que tem sido demonstrado sua influência no menor diâmetro das nanopartículas devido a sua baixa massa molar (BISWAS, *et al.*, 2015).

Também serão usados colágeno aniônico e gelatina para formar misturas com quitosana capazes de formar sistemas nanométricos (ZOU, PERCIVAL, *et al.*, 2012) usando a reticulação iônotropica com tripolifosfato de sódio.

Serão preparados os complexos de (CSD/G/TPP) e (CSD/CL/TPP) e posteriormente será avaliado seu potencial como nanotransportador mediante de incorporação de uma molécula de prova, fenômeno baseado na hipótese de uma possível interação eletrostática das partículas poliméricas baseadas em quitosana (carga positiva) e uma molécula carregada negativamente como o ácido pícrico (AP) (HE, *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi a preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana/gelatina/tripolifosfato e quitosana/colágeno/tripolifosfato e sua avaliação como sistema de liberação de fármacos.

Para poder atingir o objetivo foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Obter e caracterizar quitosana despolimerizada e colágeno a partir de suas fontes de extração, nestes casos gládio de lula e tendão bovino.
- Preparar e caracterizar nanopartículas de quitosana despolimerizada /gelatina e quitosana despolimerizada/colágeno usando a reticulação com tripolifosfato de sódio.
- Estudar a incorporação e liberação do ácido pícrico como molécula de prova nas nanopartículas obtidas e conhecer sua cinética de liberação.

4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS DE PARTIDA

4.1 METODOLOGIA

A gelatina foi adquirida da Sigma-Aldrich, sendo especificada como do Tipo A extraída de pele porcina. Esta gelatina possui uma massa molar compreendida entre 50 e 100 kDa.

O tripolifosfato de sódio foi adquirido de LABSYNTH Produtos para Laboratório AS, de grau analítico.

A quitosana e o colágeno foram obtidos no laboratório a partir de suas fontes naturais, como os procedimentos detalhados a seguir.

4.1.1 OBTENÇÃO DA QUITOSANA (Horn, 2009).

Foi desenvolvida a extração da β -quitina a partir dos gládios de lula da espécie *Loligo sp* (cedidos por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda, Cananéia - SP). O processo de obtenção de quitosana despolimerizada consiste em três etapas bem diferenciadas: desmineralização, desproteinização e desacetilação da matéria prima, neste caso gládio de lula, que foi previamente lavado, secado, triturado e separado numa peneira de malha 60 mesh (0,250 mm).

4.1.1.1 Desmineralização:

A uma amostra de 40 g, foi adicionado HCl 0,55M, mantendo-se a proporção de 1g de gládio de lula para 15 mL de ácido clorídrico a uma temperatura de 25°C. Posteriormente foi mantida em agitação mecânica durante 2 h. O produto obtido foi filtrado e lavado com água e a reação foi repetida mais uma vez para garantir a maior eficiência da desmineralização. O gládio desmineralizado foi lavado durante 2 horas com água e filtrado, repetindo-se o procedimento até conseguir um pH neutro. O sólido obtido foi secado em estufa a 40°C até peso constante.

4.1.1.2 Desproteíntização

O gládio de lula desmineralizado foi tratado com uma solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹, mantendo proporção de 1 g de gládio de lula desmineralizado para 10 mL de solução de NaOH, a uma temperatura de 80°C com agitação mecânica durante o tempo de uma hora. O produto (β -quitina) foi filtrado e lavado com água e o procedimento foi repetido mais uma vez. A quitina foi lavada e filtrada até conseguir um pH neutro. O sólido obtido foi seco em estufa a 40°C até peso constante.

4.1.1.3 Desacetilação

A β -quitina obtida, foi tratada com solução de NaOH 40%, mantendo a proporção de 1 g de β -quitina para 20 mL de NaOH 40%, com temperatura de 80°C sobre agitação mecânica durante 3h em uma atmosfera de nitrogênio gasoso. O produto (quitosana) foi filtrado e lavado com água e o procedimento foi repetido mais uma vez para garantir a maior eficiência de desacetilação. A quitosana foi lavada com água durante 2 h e filtrada até conseguir um pH neutro e posteriormente seca em estufa a 40°C até peso constante.

4.1.2 DESPOLIMERIZAÇÃO DE QUITOSANA (Mao, et al., 2004)

A quitosana de baixo peso molecular foi preparada por degradação oxidativa com NaNO₂. Primeiramente foi preparada uma solução de 800 mL de quitosana 1% (massa/v) em ácido acético 1%. Adicionou-se 26,73 mL de solução de NaNO₂ 0,1 mol L⁻¹, mantendo uma agitação mecânica durante 3 horas. Posteriormente neutralizou-se a mistura de reação com 1 mol L⁻¹ de NaOH até conseguir-se pH 8, sendo precipitado toda a quitosana em solução. O polímero foi recuperado por centrifugação a 8000 rpm durante 10 min, a 20°C. Posteriormente foi lavado e centrifugado novamente até pH neutro. Finalmente a amostra foi liofilizada para seu armazenamento.

4.1.3 OBTENÇÃO DE COLÁGENO

O colágeno foi extraído a partir de tendão bovino, fornecido pela Casa de Carnes Santa Paula, São Carlos, SP. Para tanto, foi lavado, desfiado e tratado com uma solução de NaCl 0,9% e dimetilsulfóxido DMSO 6%, posteriormente foi tratado com solução alcalina contendo hidróxidos de K^+ e Na^+ e sais (cloretos e sulfatos) de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , durante 120 horas de hidrólise. Posteriormente, esta solução alcalina foi substituída por solução aquosa dos mesmos cloretos e sulfatos de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Os sais restantes foram removidos por lavagens com H_3BO_3 3%, água desionizada e EDTA 0,3% até condutividade constante. O colágeno foi extraído utilizando uma solução de ácido acético pH 3,5, homogeneizando-se e desaerando-se o gel formado (VULCANI, *et al.*, 2013).

Para a determinação da concentração do gel obtido, uma amostra de 1,0 g foi liofilizada até peso constante e pesada para seu posterior cálculo, o processo foi feito em duplicata.

4.1.4 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

4.1.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Foi utilizado um espectrofotômetro FTIR Shimadzu IR Affinity-1. O intervalo de varredura foi de $400-4000\text{ cm}^{-1}$, resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$ e 32 varreduras acumuladas.

Para as amostras de quitosana, preparou-se uma solução de 0,1% de quitosana em solução de ácido acético 1% e adicionou-se 6 gotas dela sobre uma pastilha de silício, deixou-se secar a temperatura ambiente e foi guardada num dessecador até momento da medida. Outra pastilha de silício foi utilizada como referência para as medidas.

Para as amostras de colágeno, gelatina e tripolifosfato de sódio foram preparadas pastilhas de KBr.

4.1.4.2 Determinação de grau de acetilação da quitosana (Torres, et al., 2005)

a) Determinação do grau de acetilação por titulação condutimétrica

Este tipo de análise determina a quantidade de grupos amino protonáveis para cada amostra de quitosana. As medidas foram feitas em um condutivímetro Digimed modelo DM-32. Uma massa de 0,2500 g de quitosana previamente seca foi misturada com 50 mL de solução de HCl 0,05 mol L⁻¹, mantida sobre agitação magnética por 18 h. A solução foi diluída para 250 mL com água deionizada. Foram retiradas 4 alíquotas de 50 mL da solução resultante e estas foram tituladas com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (padronizada com oxalato de sódio) até o ponto de viragem. O grau de desacetilação foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \overline{NH_2} = \left(\frac{161 \cdot (v_2 - v_1) \cdot [NaOH]}{m} \right) * 100 \dots\dots\dots (15)$$

$\% \overline{NH_2}$ representa o número de grupos amino ou grau médio de desacetilação (DD) em porcentagem, 161 representa a massa molecular da unidade monomérica da quitosana (g mol⁻¹), $v_2 - v_1$ é o volume de solução de hidróxido de sódio consumido na neutralização da quitosana (L), [NaOH] é a concentração de hidróxido de sódio usado (mol L⁻¹) e m é a massa da quitosana contida na alíquota titulada (g). Foram feitas repetições de cada medida condutimétrica.

4.1.4.3 Determinação de massa molar viscosimétrica média da quitosana

Foi usada uma quantidade de 20 mg da quitosana seca, dissolvida em 25 mL de solução de ácido acético (HAc) 0,6 mol L⁻¹. Foram adicionados 25 mL de acetato de sódio (NaAc) 0,4 mol L⁻¹ sob agitação constante. Foi preparado o tampão 0,3 mol L⁻¹ HAc/0,2 mol L⁻¹ NaAc a pH 4,5 sob agitação constante durante 1h. O tampão foi usado para as posteriores diluições e também como padrão das medidas do tempo, assegurando que a força iônica das soluções fosse mantida constante. Foram preparadas amostras de 10 mL da quitosana em tampão com as seguintes concentrações 1,5; 1,8; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 x 10⁻⁴ g mL⁻¹.

Para o caso da quitosana despolimerizada foram pesadas 200 mg de amostra seca e dissolvidas em 25 mL de solução de ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Foram adicionados 25 mL de cloreto de sódio (NaCl) $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação constante. Foi preparado o tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HAc/ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl a pH 2,8 sob agitação constante durante 1h. O tampão foi usado para as posteriores diluições e também como padrão das medidas do tempo. Foram preparadas amostras de 10 mL da quitosana em tampão com as seguintes concentrações 1,5; 1,8; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e $4,0 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$.

Todas as soluções foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro tipo Ubbelohde (Cannon 25, K646) num banho de termostático a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e o tempo de escoamento foi medido com cronômetro digital. Cada medida foi repetida 10 vezes.

A viscosidade intrínseca foi determinada pelos interceptos da curva de Huggins ($\eta_{sp}/C \sim C$) e Kraemer ($\eta_{inh} \sim C$) e a ordenada a $C = 0$ (MAO, et al., 2004), onde a viscosidade reduzida (η_{sp}) é definida como

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = \frac{t-t_0}{t_0 C} \dots\dots\dots (16)$$

E a viscosidade inerente (η_{inh}) é definida como:

$$\eta_{inh} = \frac{\ln(t/t_0)}{C} \dots\dots\dots (17)$$

sendo t_0 o tempo de escoamento do solvente é t o tempo de escoamento das soluções testadas. Ambos os parâmetros η_{sp}/C e η_{inh} são graficados em função da concentração C , com o intercepto no eixo das ordenadas:

$$[\eta] = \left(\frac{\eta_{sp}}{C}\right)_{C=0} = (\eta_{inh})_{C=0} \dots\dots\dots (18)$$

A massa molar viscosimétrica é calculada a partir da equação clássica de Mark-Houwink.

$$[\eta] = K(M_V)^\alpha \dots\dots\dots (19)$$

sendo $[\eta]$ a viscosidade intrínseca da amostra, K e α são constantes dependentes das condições do trabalho (KASAAI, 2007).

4.1.4.4 Determinação da temperatura de desnaturação do colágeno (Td)

Para a determinação da temperatura de desnaturação do colágeno foi feita uma curva DSC em um equipamento DSC-2010 (Instrumento TA) com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, faixa de temperatura de 25 a 120°C .

Uma pequena quantidade de solução de colágeno obtido nos itens anteriores foi liofilizada até peso constante. Uma massa de 15 mg foi pesada e colocada em cadinho de alumínio hermético e aquecida sob atmosfera de N_2 .

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta parte do trabalho será discutida a preparação e caracterização da quitosana e do colágeno, fazendo-se a comparação entre os resultados obtidos da quitosana e a quitosana despolimerizada para os posteriores estudos.

4.2.1 OBTENÇÃO DA QUITOSANA

O principal objetivo nesta parte foi da obtenção de quitosana de baixa massa molar, pelo que primeiramente foi feita a extração da quitina de sua fonte natural, neste caso, gládio de lula da espécie *Loligo sp.*

O procedimento de extração da quitina passou pelos processos de desmineralização e desproteínização. O rendimento da primeira etapa foi de 82,92%, eliminando 17,08% do material contido nos gládios. Segundo alguns autores (LAVALL, 2007) o conteúdo de minerais Ca, Mg, Mn, Fe da β -quitina extraída desta fonte é bastante baixo, na ordem de partes por milhão (ppm). A quantidade aproximada de quitina descrita para esta fonte é de 20-40%, o restante é considerado como proteínas (KURITA, 2006). Portanto, os 17,08% de massa eliminada nesta etapa pode ser considerada como a eliminação dos poucos minerais contidos no material mais a perda de algumas proteínas por hidrólise ácida.

Na etapa de desproteinização, foi obtido um rendimento de 37,07% (em relação à massa inicial de gládio), o que indica a perda de 45,85% de massa de material correspondente à hidrólise básica das proteínas. Devido as condições experimentais é favorecida a clivagem da ligação peptídica das cadeias proteicas pela ação do hidróxido de sódio em solução, conseguindo degradá-las até chegar aos aminoácidos livres que conformam sua estrutura. Portanto o conteúdo de quitina representa 37,07% da massa inicial de gládio e é concordante com o descrito anteriormente. O produto obtido é mostrado na Figura 18.

A terceira etapa foi a obtenção da quitosana mediante a desacetilação da quitina. Esta reação consiste na hidrólise básica dos grupos acetamida da cadeia da quitina pela ação do hidróxido de sódio. O rendimento obtido nesta etapa foi de 29,65% em relação a massa inicial de gládio e 79,98% em relação a massa de quitina, sendo concordante com o descrito por outros autores, em torno de 80% para duas desacetilações consecutivas (KURITA, 2006).

Figura 18 - Fotografia digital do gladio de lula (a) e a quitina (b)

4.2.2 DESPOLIMERIZAÇÃO DE QUITOSANA

Segundo Biswas, et al. (2015) a massa molar da quitosana pode influenciar no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas. Têm sido encontradas menores tamanhos de partículas para quitosanas com menores massas molares. Este é o principal motivo para o processo de despolimerização, tendo como expectativa a redução da massa molar da quitosana com a finalidade de conseguir nanopartículas menores nos sistemas propostos. O rendimento desta última etapa foi de 88% em relação a massa de quitosana usada. A quitosana de maior massa molar foi

denominada de CS e a quitosana despolimerizada de CSD. Os produtos são mostrados na Figura 19.

Figura 19 - Fotografia da quitosana CS (a) e a quitosana despolimerizada CSD (b)

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

Foram caracterizados os produtos obtidos mediante as seguintes análises.

4.2.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Na Figura 20 são mostrados os espectros na região do infravermelho das amostras CS e CSD fazendo-se uma comparação dos picos dos grupos principais encontrados.

Figura 20 - Espectros FTIR de Quitosana (a) e Quitosana despolimerizada (b)

Entre os picos principais que caracterizam a quitosana encontramos o pico em torno de 1635 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento da ligação do grupo amida $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}$ da quitosana, também chamada banda da amida I. Esta banda é representativa da quitosana e é um indicador do grau de desacetilação do polímero no processo de extração. Como pode observar-se no espectro da Figura 20 amostra CS não tem o pico 1635 cm^{-1} muito pronunciado. Este fato pode ser explicado pela sobreposição com o pico a 1558 cm^{-1} correspondente à vibração de deformação do grupo amina $-\text{N}-\text{H}$.

A amostra CSD tem o pico de 1635 cm^{-1} muito mais pronunciado, explicado pela diminuição da intensidade do pico em 1558 cm^{-1} representativo do grupo amina devido à perda dos grupos amina da quitosana pelo processo de despolimerização (CHA, et al., 2000). O pico em torno de 1413 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento da ligação $-\text{C}-\text{CH}_3$ do grupo acetato, o pico em 1154 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico da ligação $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$. Pode-se observar o pico em 1095 cm^{-1} e o pico em 1031 cm^{-1} que correspondem as vibrações da estrutura piranosídica, evidenciando que os principais grupos funcionais são os mesmos e por consequência as estruturas são similares.

4.2.3.2 Determinação de grau de acetilação da quitosana (Torres, et al., 2005)

Determinação do grau de acetilação por titulação condutimétrica

A titulação condutimétrica fornece valores de grau de desacetilação muito próximas aos valores obtidos pela técnica de RMN¹H, mostrando algumas vantagens como a simplicidade do método e baixo custo (ALVARENGA; OLIVEIRA; BELLATO, 2010). A figura 21 mostra a curva de titulação condutimétrica das amostras CS e CSD, com dados mostrados nas tabelas 2 e 3. Nas curvas pode-se diferenciar três partes principais. A primeira parte corresponde a titulação de um excesso do ácido clorídrico com hidróxido de sódio, reação de um ácido forte com uma base forte mediante a seguinte equação:

A condutividade inicial do sistema é grande devido à grande quantidade de íons hidroxônio (H₃O⁺) em solução, conforme é conduzida a titulação os íons hidroxônio reagem com os íons hidroxila (OH⁻) e formam moléculas de água. O íon hidroxônio é substituído por um íon sódio (Na⁺), que tem menor mobilidade e provoca uma diminuição quase linear na condutividade do sistema. Quando o ponto mínimo da curva é alcançado, significa que o HCl foi consumido em sua totalidade, começando então a titulação dos grupos amina protonados segundo a reação:

Um aumento da condutividade ocorre devido à neutralização dos grupos amina protonados, sendo substituídos por um íon sódio de maior mobilidade. Quando a neutralização está completada acontece um aumento na condutividade devido à incorporação dos íons hidroxila e sódio ao sistema. A porcentagem de grupos amina na amostra de quitosana é determinada pela posição das intersecções de cada parte da curva. A diferença entre os pontos de intersecção corresponde ao volume de NaOH necessário para neutralizar os grupos amina protonados da quitosana, o que permite determinar o grau de acetilação da amostra.

Figura 21 - Titulação condutimétrica representativa da quitosana (7) (a) e quitosana despolimerizada (5) (b)

Foi calculada a média de 9 medidas da amostra de quitosana e 10 medidas no caso de amostra de quitosana despolimerizada mostradas as Tabelas 2 e 3.

Um resultado interessante nesta determinação é a diferença do grau de desacetilação das amostras, se observamos os resultados, antes de despolimerizar a amostra tinha um DD de $87,8 \pm 2,5\%$, depois do processo a nova amostra tem um DD de $81,0 \pm 1,5\%$, que indica uma diminuição do número de grupos amina da amostra original. Este fato pode ser explicado na reação de despolimerização sugerido por alguns autores (LEE, et al., 2013; SUITCHARIT, et al., 2011) e que é mostrada na Figura 22.

Tabela 2 - Resultados das titulações condutimétricas das amostras de quitosana

Medida	C _{NaOH} (g mol ⁻¹)	Massa da quitosana (g)	ΔV (L)	DD(%)
1	0,0982	0,0500	2,72	86,01
2	0,0982	0,0500	2,90	91,83
3	0,1124	0,0500	2,39	86,44
4	0,1124	0,0500	2,51	90,82
5	0,1124	0,0500	2,50	90,47
6	0,1124	0,0500	2,39	86,62
7	0,0997	0,0500	2,70	86,91
8	0,0997	0,0500	2,67	85,83
9	0,0997	0,0500	2,67	85,69
CS	DD Total (%)		Desvio padrão	
	87,85		2,45	

Tabela 3 - Resultados das titulações condutimétricas das amostras de quitosana despolimerizada

Medida	C _{NaOH} (g mol ⁻¹)	Massa da quitosana (g)	ΔV (L)	DD(%)
1	0,1013	0,0501	2,47	80,44
2	0,1013	0,0501	2,41	78,56
3	0,1013	0,0501	2,54	82,68
4	0,1013	0,0501	2,54	82,63
5	0,0984	0,0500	2,55	80,86
6	0,0984	0,0500	2,58	81,74
7	0,0984	0,0500	2,62	83,08
8	0,0997	0,0502	2,48	79,28
9	0,0997	0,0502	2,52	80,37
10	0,0997	0,0502	2,53	80,80
CSD	DD Total (%)		Desvio padrão	
	81,04		1,53	

Estes trabalhos propõem uma quebra da cadeia da quitosana na posição da ligação glicosídica e outra quebra do anel piranosídico da quitosana formando-se um anel de cinco átomos sem a amina em sua estrutura. O nitrogênio da amina reagiu com o nitrito para produzir nitrogênio molecular (N₂). Esta diminuição dos grupos

amina pela reação de despolimerização tem como consequência a diminuição do grau de desacetilação.

Figura 22 - Despolimerização da quitosana pelo ácido nitroso

Fonte: Adaptado de SUITCHARIT, C.; et al., 2011, p. 479.

4.2.3.3 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana

As medidas de massas molares feitas por viscosimetria dependem das condições usadas para as determinações dos tempos de escoamento. As condições usadas para as duas amostras foram distintas devido ao fato de as constantes necessárias para o cálculo não poderem ser usadas adequadamente fora dos parâmetros estabelecidos por seus autores.

Foi usado o tampão de $0,3 \text{ mol L}^{-1} \text{ HAc}/0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaAc}$ a 25°C e pH 4,6 com o qual podem ser usadas as constantes $K = 76,0 \times 10^{-6} \text{ L g}^{-1}$ e $\alpha = 0,76$ para uma massa molar compreendida entre 100 e 600 kDa (RINAUDO, MILAS, DUNG, 1993), com a qual foram determinadas as medidas da quitosana.

Foi usado o tampão de $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HAc}/0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ a 25°C e pH 2,8 com o qual podem ser usadas as constantes $K = 1,81 \times 10^{-6} \text{ L g}^{-1}$ e $\alpha = 0,93$ para uma massa molar compreendida entre 48 e 630 kDa (ROBERTS, DOMSZY, 1982), com a qual foram determinadas as medidas da quitosana despolimerizada.

Foram obtidos os dados mostrados nas Tabelas 4 e 5 do tempo de escoamento de soluções de CS e CSD de diferentes concentrações.

Tabela 4 - Valores da concentração, tempo, viscosidade inerente e viscosidade reduzida de CS

Medida	Concentração (g L ⁻¹)	Tempo (s)	η_{inh} (L g ⁻¹)	η_{red} (L g ⁻¹)
1	1,52 x 10 ⁻¹	607,30	1,081	1,175
2	1,80 x 10 ⁻¹	625,22	1,074	1,185
3	2,00 x 10 ⁻¹	638,93	1,075	1,200
4	3,52 x 10 ⁻¹	749,57	1,065	1,292
5	4,00 x 10 ⁻¹	786,68	1,058	1,317

Tabela 5 - Valores da concentração, tempo, viscosidade inerente e viscosidade reduzida de CSD

Amostra	Concentração (g L ⁻¹)	Tempo (s)	η_{inh} (L g ⁻¹)	η_{red} (L g ⁻¹)
1	1,80 x 10 ⁻³	521,81	0,04568	0,04761
2	2,00 x 10 ⁻³	526,50	0,04559	0,04773
3	2,52 x 10 ⁻³	539,63	0,04596	0,04873
4	3,01 x 10 ⁻³	553,34	0,04681	0,05027
5	3,52 x 10 ⁻³	569,07	0,04799	0,05228
6	4,00 x 10 ⁻³	582,66	0,04813	0,05308

Com estes dados foram feitas as curvas de viscosidade reduzida/viscosidade inerente vs concentração com a finalidade de determinar a média de cada curva e o intercepto em C=0 mostrado na Figura 23.

Figura 23 - Concentração de soluções de CS a) e CSD b) vs viscosidade reduzida e inerente

Da Figura 23-a foi extrapolado o valor da viscosidade para a amostra CS:

$$[\eta] = \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)_{C=0} = (\eta_{inh})_{C=0} = 1,0870 \text{ L g}^{-1}$$

Usando a equação 18, para $K = 76,0 \times 10^{-6} \text{ L g}^{-1}$ e $\alpha = 0,76$

$$[\eta] = K(M_v)^\alpha$$

$$1,0870 \text{ L g}^{-1} = 76,0 \times 10^{-6} (M_v)^{0.76}$$

$$M_v = 293,3 \text{ kDa}$$

Da Figura 23-b extrapolamos o valor da viscosidade para a amostra CSD

$$[\eta] = \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)_{C=0} = (\eta_{inh})_{C=0} = 0,04276 \text{ L g}^{-1}$$

Usando a equação 18, para $K = 1,81 \times 10^{-6} \text{ L g}^{-1}$ e $\alpha = 0,93$, como o mesmo cálculo.

$$M_v = 50,4 \text{ kDa}$$

Como se pode ver nos cálculos, a massa molar da quitosana é de 293,3 k Da, similar ao valor obtido por outros autores com o mesmo método é fonte (SANTOS,

2014; DENARI, 2014). A massa molar da quitosana despolimerizada foi de 50,4 kDa, o que confirma a despolimerização da quitosana.

4.2.4 OBTENÇÃO DO COLÁGENO

O colágeno obtido foi de tipo I, a massa molar teórica para este tipo de colágeno é de 300 kDa aproximadamente, formada estruturalmente por duas hélices $\alpha 1$ e uma hélice $\alpha 2$ (PEDROSO, 2009) e é mostrado na Figura 24. A concentração determinada por liofilização do gel formado foi de $0,92 \pm 0,04\%$, o qual foi usado em posteriores diluições com HAc pH 3,5.

Figura 24 - Fotografias digitais do tendão bovino (a) e gel do colágeno (b)

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO

4.2.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Na Figura 25 é mostrado o espectro FTIR do colágeno (CL) conjuntamente com a gelatina comercial (G), mostrando os principais picos de cada um deles. Pode-se observar o pico em 3329 cm^{-1} , atribuído à vibração de estiramento do grupo O-H, no caso do espectro da gelatina, este pico aparece como uma banda larga devido ao acoplamento com o grupo N-H. Um dos picos principais no espectro do colágeno aparece em 1653 cm^{-1} , que é denominado de banda da amida I, atribuído a vibração de estiramento dos grupos carbonila, C=O da cadeia proteica. No caso do espectro da gelatina, este pico aparece em 1649 cm^{-1} . O pico a 1559 cm^{-1} para o colágeno ou 1541 cm^{-1} para a gelatina e denominado de banda da amida II e é atribuído as vibrações da amida N-H acopladas com as vibrações de estiramento da ligação C-N (contribuições de 60% e 40% respectivamente). O pico da amida III aparece em 1240

cm^{-1} em ambos os espectros, sendo atribuída à vibração de estiramento de ligação C-N acoplado com a deformação no plano da ligação da amida N-H e com as vibrações do grupo CH_2 da glicina. O pico em torno de 1455 cm^{-1} é originado pela vibração estereoquímica dos anéis pirrolidínicos dos resíduos de aminoácido da prolina e hidroxiprolina (SIONKOWSKA, et al., 2004).

Figura 25 - Espectros FTIR do colágeno CL (a) e da gelatina G (b)

Um fator indicativo da obtenção do colágeno é a relação da absorbância entre o pico em 1450 cm^{-1} e o pico da amida III, que indica a integridade da hélice tripla do colágeno quando o valor desta relação é igual ou maior a um. Valores menores indicam a desnaturação do colágeno. Em nosso caso o valor encontrado para a relação A_{1240}/A_{1450} para o colágeno é de 1,20 o que assegura a integridade da tripla hélice, e no caso da gelatina esta relação deu 0,88 como era de esperar-se para a gelatina de pele porcina (NIKOO, et al., 2014).

4.2.5.2 Determinação da temperatura de desnaturação do colágeno

A Figura 26 mostra a curva DSC do colágeno, Na faixa de temperatura estudada observou-se o um evento térmico, a desnaturação do colágeno, que acontece a 42,1°C, indicando que nessa temperatura acontece a quebra das ligações de hidrogênio da hélice tripla do colágeno. A inflexão da curva determina o ponto representativo do fenómeno de desnaturação. Este resultado e concordante com outras medidas da temperatura de desnaturação de colágeno do tendão bovino obtidas em torno de 42,9 °C para 24 horas de hidrólise e 46,5 °C para 48 horas de hidrólise e 44,3 °C para 72 h de hidrólise (HORN, 2008; CHAUNDRY, et al., 1997; BET, 2001).

Figura 26 - Curva DSC do colágeno

Com estas análises asseguramos a eficiente extração de colágeno de 120 horas de hidrólise, mantendo sua estrutura característica. Também asseguramos que o aumento de carga negativa do colágeno chegue a seu nível máximo, devido a que o número de grupos carboxila se estabiliza passado as 100 horas de hidrólise (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001). Estes grupos poderão interagir com a amina protonada da quitosana (HORN, 2009).

Nesta primeira parte do trabalho foram obtidos os materiais de partida que serão usados no próximo item. Pode-se ver então que a despolimerização da

quitosana provocou diminuição da massa molar e do grau de desacetilação. A quitosana despolimerizada apresentou os picos característicos principais no espectro FTIR, que nos indica que sua estrutura não variou consideravelmente. O colágeno aniônico também foi eficientemente extraído e caracterizado, observando os picos característicos no espectro FTIR e a temperatura de desnaturação no DSC.

5 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.1 METODOLOGIA

Foram propostas algumas metodologias baseadas na gelificação iônica para a obtenção de nanopartículas em suspensão.

5.1.1 METODOLOGIA I

Esta metodologia foi uma adaptação do processo descrito por Bao H. (2008). Foram preparadas soluções de:

- Quitosana despolimerizada 2 mg mL⁻¹ em HAc pH 3,5.
- Colágeno de 2 mg mL⁻¹ em HAc pH 3,5
- Gelatina de 2 mg mL⁻¹ em água

Para a preparação das nanopartículas as soluções foram misturadas nas quantidades descritas na Tabela 6. A mistura polimérica foi aquecida a 60°C por 10 min e colocada em um banho de gelo com agitação constante. Foi adicionado solução de TPP 5 mg mL⁻¹ em água de acordo a Tabela 6 e se continuou com a agitação por 30 min. O sistema foi centrifugado a 9000 rpm, por 10 min, a 25°C e posteriormente foi lavado com água.

Tabela 6 - Condições de preparação pela Metodologia I

Código	Massa CSD (mg)	Massa G (mg)	Massa CL (mg)	Massa de TPP (mg)
CSD/G 1	20,00	20,00	-	30,00
CSD/G 2	10,00	10,00	-	5,00
CSD/G 3	3,00	3,00	-	40,00
CSD/G 4	5,00	5,00	-	40,00
CSD/G 5	8,00	8,00	-	40,00
CSD/CL 1	3,00	-	3	40,00
CSD/CL 2	5,00	-	5	40,00
CSD/CL 3	8,00	-	8	40,00

5.1.2 METODOLOGIA II

Esta metodologia é uma adaptação do processo descrito por Fan W. et. al. (2012). Foram preparadas soluções de:

- Quitosana despolimerizada 0,5 mg mL⁻¹ em HAc pH 3,5,
- Colágeno de 0,5 mg mL⁻¹ em HAc pH 3,5
- Gelatina de 0,5 mg mL⁻¹ em água,

As quais foram misturadas nas proporções mostradas na tabela 7. A mistura foi ajustada até pH 4,8 com NaOH e posteriormente aquecida a 60°C por 10 min e colocada num banho de gelo com agitação constante. Foi adicionado TPP 0,5 mg mL⁻¹ de acordo a Tabela 7 e se continuou com a agitação por 10 min. O sistema foi centrifugado a 16000 rpm, 50 min, 25°C, lavado com água e ressuspenso em 40 mL de água. Posteriormente foi sonificado a 42 kHz por 30 min.

Tabela 7 - Condições de preparação pela Metodologia II

Código	Massa CSD (mg)	Massa G (mg)	Massa CL (mg)	Massa de TPP (mg)
CSD/G 6	6,00	1,50	-	2,25
CSD/G 7	5,00	2,50	-	2,25
CSD/G 8	3,75	3,75	-	2,25
CSD/CL 4	6,00	-	1,50	2,25
CSD/CL 5	5,00	-	2,50	2,25
CSD/CL 6	3,75	-	3,75	2,25

5.1.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS PREPARAÇÕES

As suspensões preparadas foram liofilizadas e pesadas para a determinação do rendimento e concentração das suspensões obtidas. As medidas foram feitas em triplicata.

5.1.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas foram caracterizadas pelas seguintes metodologias:

5.1.4.1 *Microscopia electronica de varredura (MEV)*

Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV.

As suspensões foram diluídas com água (1:5), centrifugadas por 15 min a 3500 rpm, gotejadas sobre o porta-amostra e secadas a 40°C durante 4 h.

As fotomicrografias foram obtidas em *stubs* com placas de silício coladas com fita condutora de carbono. As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de $0,60 \text{ nm s}^{-1}$, possibilitando a análise de suas estruturas.

5.1.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Foi utilizado um espectrofotômetro FTIR Shimadzu IR Affinity-1. O intervalo de varredura foi de 400-4000 cm^{-1} , resolução de 4,0 cm^{-1} e 32 varreduras acumuladas.

Para a preparação das amostras para medidas no equipamento as nanopartículas em suspensão foram liofilizadas até peso constante. Estas amostras foram prensadas junto com KBr para a obtenção de uma pastilha para a medição.

5.1.4.3 Determinação do tamanho das nanopartículas

A distribuição de tamanho das partículas assim como seu índice de polidispersividade (PDI) foram obtidos a 25°C com ângulo de espalhamento de 173° num equipamento de espalhamento dinâmico de luz (DLS), Malvern Zetasizer Nano ZS. Cada medida foi repetida 10 vezes.

As suspensões de nanopartículas foram diluídas (1:5) em água (pH 5,60), sonificadas por 30 min a 42 kHz e centrifugadas por 15 min a 3500 rpm antes das medidas. As medidas foram feitas em uma cubeta de poliestireno (modelo DTS1060)

5.1.4.4 Determinação do potencial Zeta

O potencial Zeta das nanopartículas usadas para a liberação foram obtidas em um equipamento de espalhamento dinâmico de luz (DLS) Malvern Zetasizer Nano ZS.

As suspensões de nanopartículas foram diluídas (1:5) em água (pH 5,60), sonificadas por 30 min a 42 kHz e centrifugadas por 15 min a 3500 rpm antes das medidas. As medidas foram feitas em celas capilares (modelo DTS1060C).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das fotomicrografias obtidas por MEV permitiram avaliar se os procedimentos de obtenção de nanopartículas foram eficientes.

5.2.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Como pode ser observado na Figura 27, existem distintos comportamentos nos sistemas trabalhados. A metodologia I usa concentrações mais altas de macromoléculas que a metodologia II, tem maior possibilidade de não formar nanopartículas devido à alta probabilidade de formar aglomerados.

Um indicativo da formação de nanopartículas é a observação do efeito tyndall em sistemas coloidais, fato que não foi observado em nenhum dos sistemas obtidos por esta metodologia devido a ausência da formação de suspensão. Apesar destas observações e os precipitados obtidos, estes sistemas apresentaram comportamentos interessantes. As figuras 27-a e 27-b mostram sistemas preparados com CSD e G que correspondem às formulações CSD/G 1 e 2 respectivamente. Estas matrizes não formaram nanopartícula nenhuma, pois a quantidade de quitosana e gelatina usados nestas formulações foi grande comparada com a do TPP. Em contraposição com estes comportamentos os precipitados das formulações de CSD/G 3, 4, e 5 (Figuras 27-c, 27-d e 27-e) formaram aglomerados de nanopartículas, obtendo-se a melhor fotomicrografia delas na formulação CSD/G 4.

Outra observação importante que temos que ressaltar é que estes aglomerados são formados por partículas em torno de 100 nm nos três casos, fato que pode ser observado na escala das fotomicrografias. Estes resultados indicam que este método precisaria uma otimização.

Figura 27 - Fotomicrografias de matrizes obtidas pela metodologia I, CSD/G 1, aumento de 20k x (a), CSD/G 2 (b), CSD/G 3 (c), CSD/G 4 (d), CSD/G 5 (e), aumentos de 70k x.

Um fenômeno parecido acontece com as partículas obtidas a partir das misturas com quitosana despolimerizada e o colágeno como se pode observar nas Figuras 28-a e 28-b. Nestes casos foram usadas formulações com maior quantidade de TPP e foram formadas novamente aglomerados de nanopartículas nos precipitados dos sistemas. Se observamos a escala das fotomicrografias as partículas são maiores que 100 nm, fato que poderia indicar a influência da maior massa molar do colágeno, em comparação com as partículas de gelatina que foram preparadas nas

mesmas condições. A Figura 28-c mostra que maior quantidade de macromoléculas nos sistemas poliméricos leva a formação de partículas fora da escala nanométrica, fato que também foi observado nas formulações CSD/G 1 e 2.

Figura 28 - Fotomicrografias das matrizes obtidas pela metodologia I CSD/CL 1 (a), CSD/CL 2 (b), aumentos de 70k x e CSD/CL 3 (c) aumento de 50k x

Um fenômeno similar foi reportado em uma das primeiras preparações de nanopartículas de quitosana (CALVO, et al., 1997), onde as altas concentrações de quitosana e TPP ($< 4 \text{ mg mL}^{-1}$ e $< 1 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente) forneciam agregados nas matrizes poliméricas.

Devido a estes resultados foi proposto a metodologia II, baseado na preparação de nanopartículas monodispersas usando quitosana de baixa massa molar (FAN, et al., 2012). As concentrações usadas nestes casos foram menores, $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para todas as soluções, que minimizam até certo grau a aglomeração.

Nos casos das partículas preparadas pela metodologia II, foi observado o efeito tyndall em todas as amostras. Na Figura 29 se mostram dois exemplos deste efeito com as amostras, CSD/G 6 e CSD/CL 4, fato que indica a alta possibilidade de formação de nanopartículas.

Figura 29 - Fotografias digitais das suspensões CSD/G 6 (a) e CSD/CL 4 (b) mostrando o efeito Tyndall

A Figura 30 mostra as fotomicrografias das nanopartículas preparadas pela metodologia II, as Figuras 30-a, 30-b e 30-c correspondem às nanopartículas preparadas com quitosana e gelatina. Como pode ser observada nas escalas delas, todas as partículas foram obtidas com um tamanho menor que 200 nm , com pouca aglomeração nos três casos, comparadas com as preparações anteriores.

As Figuras 30-d, 30-e e 30-f, mostram as nanopartículas preparadas com quitosana despolimerizada e colágeno. As formulações com menor quantidade de colágeno, ou seja CSD/CL 4 e CSD/CL 5, correspondem as proporções 4:1 e 2:1 de CSD e CL respectivamente, podendo-se observar nas fotomicrografias pouca aglomeração das nanopartículas.

Figura 30 - Fotomicrografias das matrizes CSD/G 6 (a), CSD/G 7 (b), CSD/G 8 (c) aumentos de 20k x, CSD/CL 4 aumento de 50k x (d), CSD/CL 5 (e) e CSD/CL 6 (f) aumentos de 20k x.

No caso da amostra CSD/CL 6, esta apresenta certo grau de aglomeração, fenômeno que pode ser explicado pelo fato desta amostra ter sido preparada com uma proporção de 1:1 de quitosana e colágeno. Como podemos perceber a quantidade de colágeno desta última amostra é maior, indicando uma maior quantidade de macromoléculas de 300 kDa que permitem a obtenção de maior tamanho das

partículas e a maior tendência à aglomeração. Todas estas amostras também apresentaram tamanhos menores que 200 nm.

Com estes resultados podemos ter como conclusão parcial que aparentemente, a menor concentração de macromoléculas nos sistemas de preparação, que correspondem à metodologia II, influenciam na formação de nanopartículas em suspensão. Um fator que também pode contribuir na obtenção de nanopartículas pela metodologia II é o fato de ter usado ultrassom no processo de preparação. Este parâmetro influencia na aglomeração das nanopartículas. Por estes fatos, as partículas escolhidas para o trabalho foram as formulações CSD/G 6, CSD/G 7, CSD/G 8, CSD/CL 4, CSD/CL 5, CSD/CL 6.

5.2.2 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS PREPARAÇÕES

As medidas de rendimento das preparações foram obtidas de acordo à seguinte equação, com resultados mostrados na Tabela 8

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{Massa total de reagentes usado}}{\text{Massa das nanopartículas}} \times 100\% \dots\dots\dots (20)$$

Tabela 8 - Rendimento e concentrações das nanopartículas obtidas

Amostra	Rendimento (%)	Concentração (mg/mL)
CSD/G 6	35,48	0,169
CSD/G 7	46,46	0,221
CSD/G 8	44,82	0,213
CSD/CL 4	86,46	0,361
CSD/CL 5	89,23	0,424
CSD/CL 6	86,46	0,411

De acordo a estes resultados podemos perceber que as partículas preparadas com gelatina apresentam menor rendimento que as partículas preparadas com colágeno, provavelmente pela menor quantidade de massa de gelatina que forma parte das nanopartículas em comparação com as da quitosana. Caso contrário poderia acontecer com as nanopartículas de colágeno.

O colágeno usado é de caráter aniônico, pelo que tem maior afinidade com a quitosana que é de caráter catiônico. Assim, é de esperar uma forte interação do colágeno e quitosana que levariam a um maior rendimento de nanopartículas.

5.2.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

As seis formulações escolhidas para o estudo foram caracterizadas pela espectroscopia na região do infravermelho, com a finalidade de verificar a presença dos componentes nas formulações. As Figuras 20 e 23 mostraram os espectros da quitosana, colágeno e gelatina, e os picos principais das vibrações dos grupos funcionais de suas estruturas. A Figura 31 mostra o espectro do tripolifosfato de sódio, na qual pode-se observar as vibrações de estiramento do grupo -P=O a 1213 cm^{-1} , a vibração de estiramento do grupo R-O-P-O a 1160 cm^{-1} e a vibração do estiramento do grupo P-O a 895 cm^{-1} .

Também se mostram os espectros FTIR das nanopartículas preparadas pelo método II. Como estas amostras são formadas pelas misturas de três componentes, se espera observar as vibrações principais de cada componente. Pode-se observar que as nanopartículas apresentam o mesmo perfil para as seis amostras, podendo reconhecer em cada uma delas a vibração de estiramento da amida I do colágeno ou gelatina que aparece em torno de 1650 cm^{-1} . Também observamos o pico em torno de 1540 cm^{-1} que corresponde a vibração de flexão da amina protonada da quitosana. Este pico sofreu um deslocamento com respeito à vibração da amina da quitosana CSD que apareceu na figura 20 a 1558 cm^{-1} , fato que evidencia a ligação de hidrogênio deste grupo funcional com o oxigênio do tripolifosfato principalmente. Os picos que aparecem à 1220 e 1152 cm^{-1} , são atribuídos à vibração de estiramento do grupo -P=O e R-O-P-O do TPP, que estão ligeiramente deslocados com respeito ao do TPP puro, fator que indica a ligação de hidrogênio com a amina protonada da quitosana.

Estes dois últimos picos estão sobrepostos com o pico forte que aparece em torno de 1093 cm^{-1} correspondente a vibração da estrutura piranosídica da quitosana. Um último pico que indica a presença do TPP nas nanopartículas é o de 895 cm^{-1} que corresponde à vibração de estiramento do grupo -P-O .

Estes espectros indicam que todas as nanopartículas foram formadas pelos três componentes usados em suas formulações, quitosana, gelatina ou colágeno e tripolisfosfato.

Figura 31 - Espectros FTIR de TPP (a), CSD/G 6 (b), CSD/G 7 (c), CSD/G 8 (d), CSD/CL 4 (e), CSD/CL 5 (f), CSD/CL 6 (g).

5.2.4 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS - ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)

Uma vez que sabemos a natureza da composição das partículas, pode-se calcular o tamanho médio das nanopartículas em suspensão através de medidas de espalhamento de luz dinâmica (DLS).

A Figura 32 mostra a distribuição média das 10 medidas de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas obtidas de CSD e G. Como pode ser observado na Figura 32-a, estas amostras apresentam distribuições parecidas, encontrando nos três casos, um pico de maior sinal em torno de 255 nm aproximadamente.

Na Figura 32-b, a curva número de partículas vs diâmetro hidrodinâmico mostra para os três casos que o pico de maior sinal correspondente a 142 nm aproximadamente. Também é observada uma pequena população perto de 59 nm referente à amostra CSD/G 7.

Estes novos valores dos picos de maior sinal podem ser facilmente explicada pelo espalhamento das partículas. As partículas maiores espalham mais fortemente a luz que as menores, pelo que a intensidade do sinal aparecerá a maiores diâmetros para os gráficos relativos à intensidade. Pode-se inclusive verificar esta afirmação pela ausência da pequena população de 59 nm no gráfico da Figura 32-a.

Figura 32 - Distribuição média do tamanho de partículas na dispersão de nanopartículas de CSD e G em água. Intensidade de partículas em função do diâmetro hidrodinâmico (a) e Número de partículas em função do diâmetro hidrodinâmico (b).

O diâmetro hidrodinâmico médio das partículas pode ser observado na Tabela 9. Nesta análise podemos verificar que a quantidade de gelatina tem baixa

influência nos diâmetros médios das partículas, no entanto estes valores aumentam proporcionalmente ao aumento de quantidade de gelatina usado em sua preparação.

Tabela 9 - Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade (PDI) das nanopartículas de quitosana e gelatina.

Amostra	Relação CSD:G	Diâmetro(nm)	PDI
CSD/G 6	4:1	236,9 ± 1,6	0,13 ± 0,02
CSD/G 7	2:1	240,6 ± 3,5	0,14 ± 0,01
CSD/G 8	1:1	265,7 ± 2,1	0,19 ± 0,02

O índice de polidispersividade das amostras foi baixo, encontrando-se valores menores que 0,2 de PDI nos três casos. Estes resultados indicam a formação de somente uma população para as nanopartículas preparadas com gelatina.

Na Figura 33 são apresentados os resultados correspondentes às partículas feitas com colágeno e quitosana. A formulação CSD/CL 4 apresentou duas populações no gráfico da Figura 33-a. A primeira com um pico de maior intensidade em 255 nm e a segunda com um pico de menor intensidade em 5560 nm aproximadamente. Na Figura 33-b, observam-se dois picos, o primeiro de menor número de partículas em 59 nm e o segundo de maior número de partículas em 142 nm. Estas duas populações aparecem como um pico de maior intensidade na Figura 33-a. Como pode-se observar na Figura 33-b, a população em 5560nm, não aparece, mostrando que sua população não é significativa, fato explicado pelo maior espalhamento originado por partículas de maior tamanho.

A formulação CSD/CL 5 tem um comportamento similar, encontrando-se na Figura 33-a um pico de maior intensidade em 396 nm e um segundo de menor intensidade em 5560 nm aproximadamente. Na Figura 33-b observa-se um pico de maior número de partículas em torno de 200 nm e a população em 5560 não aparece mostrando que sua população não é significativa.

A formulação CSD/CL 6 mostrada na Figura 33-a tem três picos. O primeiro de pequena intensidade em torno de 200 nm, um segundo pico de maior intensidade em 825 nm e um último de menor intensidade em 5560 nm. Na Figura 33-b, foram observadas duas populações, sendo a primeira em 190 nm e a de maior número de partículas em torno de 650 nm. A população em 5560 nm não aparece pelo que se infere que não é significativa.

Figura 33 - Distribuição média do tamanho de partículas na dispersão de nanopartículas de CSD e CL em água. Intensidade de partículas em função do diâmetro hidrodinâmico (a) e Número de partículas em função diâmetro hidrodinâmico (b).

Os valores dos diâmetros médios são mostrados na Tabela 10. Pode se observar a tendência de aumentar o tamanho com o aumento da quantidade de proteína, neste caso, colágeno. O efeito neste tipo partículas é maior pois o colágeno

tem a estrutura da hélice tripla e a massa de 300 kDa que influenciam enormemente no diâmetro, chegando a ter partículas maiores, quando o colágeno se encontra na proporção 1:1 com respeito à quitosana usada.

Tabela 10 - Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersividade (PDI) das nanopartículas de quitosana e colágeno.

Amostra	Relação CSD:CL	Diâmetro(nm)	PDI
CSD/CL 4	4:1	251,9 ± 2,9	0,20 ± 0,02
CSD/CL 5	2:1	367,1 ± 4,3	0,25 ± 0,01
CSD/CL 6I	1:1	858,6 ± 12,1	0,39 ± 0,03

O índice de polidispersividade destas partículas não foi menor que o caso anterior, encontrando valores entre 0,2 e 0,4, que indicam um comportamento monodisperso para a formulação CSD/CL 4 e polidisperso para CSD/CL 5 e 6.

As partículas podem ser consideradas como nanopartículas poliméricas de comportamento monodisperso, devido a seu valor de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade em comparação com outras matrizes reportadas na literatura, também baseadas em quitosana. (HUANG, 2012; PAULA, et al., 2010)

5.2.5 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA (Z)

Com os resultados obtidos até agora escolhemos duas amostras para continuar o estudo, devido ao menor tamanho obtido nas análises por DLS e as imagens do MEV que mostraram menor aglomeração. Foram usadas as formulações CSD/G 6 e CSD/CL 4 para as medidas do potencial Z. Também foram usadas para o estudo de incorporação e liberação de ácido pícrico que serão mostrados em itens posteriores.

Na Tabela 11 se mostram os resultados obtidos das medidas de potencial Z. As nanopartículas de quitosana/gelatina apresentaram um valor de 15,7 mV, o que significa que elas apresentam certo tipo de acumulação superficial de carga positiva, decorrente da maior quantidade de quitosana presente nas nanopartículas. No caso das nanopartículas de quitosana/colágeno, elas apresentaram o valor de -3,80 mV, o que significa que a acumulação de cargas neste caso tem um desequilíbrio que favorece as cargas negativas, mas que não é tão grande como o caso anterior. Este

resultado indica também que estas nanopartículas apresentam maior quantidade de colágeno do que quitosana na superfície.

Tabela 11 - Potencial Zeta médio de nanopartículas CSD/G 6 e CSD/CL 4 em água (pH 5,60)

Amostra	Potencial Z (mV)	Desvio padrão
CSD/G 6	15,70	1,05
CSD/CL 4	-3,80	0,51

Devido ao fato de que a preparação das nanopartículas (metodologia II) parte de uma mistura compatível de polímeros, podemos dizer que esta mistura inicial é homogênea, pelo que contém proporções similares de cada mistura macromolecular em cada sistema de estudo. Depois de adicionar a quantidade necessária de TPP, começa a formação das nanopartículas por gelificação iônica, principalmente pela interação do oxigênio do tripolifosfato de sódio com a amina protonada da quitosana (MI, et al., 1999), interação principal usada para preparação de nanopartículas em outros sistemas já reportados (VIMAL, et al., 2013, BAO; LI; ZHANG, 2008).

Neste trabalho, os dois sistemas estudados são ternários, pelo que as proteínas (seja colágeno ou gelatina correspondente a cada caso) influenciam na formação das nanopartículas. Segundo alguns autores a gelatina e a quitosana podem ser compatíveis ao ponto de serem usadas para a formação de blends para aplicações biomédicas (Y., ONYERI, et al., 2005, CHIONO, et al., 2008).

O colágeno aniônico também tem demonstrado interação com a quitosana, especificamente entre os grupos amina protonada da quitosana e os grupos carboxilatos dos resíduos de aminoácido do colágeno aniônico (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009).

Em consequência, provavelmente quando são formadas as nanopartículas CSD/G 6, o grupo amina protonada da quitosana terá afinidade pelos grupos carboxilatos da gelatina, representados pelos resíduos dos aminoácidos ácido aspártico e ácido glutâmico em sua cadeia, 29 e 48 resíduos de aminoácidos respectivamente por cada 1000 resíduos de aminoácidos (77 grupos carboxilatos no total) (MARK, 2009). O grupo amina protonado entrará em competição com o tripolifosfato e os carboxilatos da gelatina, para a formação da nanopartícula.

Devido a maior quantidade de quitosana na formulação esta nanopartícula apresentou menor tamanho, comparado com as outras formulações, fornecendo carga positiva no potencial Z e estabilizando a nanopartícula e, como consequência a aglomeração desta nanopartícula foi menor.

No caso das nanopartículas CSD/CL 4, o grupo amina protonado da quitosana interagiu com os grupos carboxilatos do colágeno. Em uma cadeia de colágeno aniônico após de 144h de hidrólise encontramos 369 grupos carboxilatos para uma cadeia de 3139 resíduos de aminoácidos (BET, 2000).

O grupo amina protonado entra em competição com o TPP e os carboxilatos do colágeno para a formação das nanopartículas. Devido a maior quantidade de grupos carboxilatos do colágeno e a estrutura da tripla hélice, a quantidade incorporada de colágeno nas nanopartículas neste caso foi maior.

Esta hipótese pode ser confirmada pelos resultados obtidos nesta parte do trabalho. As nanopartículas de colágeno apresentaram maior tamanho, em comparação com suas homólogas de gelatina, além da maior aglomeração observada no MEV e a carga negativa observada na superfície destas nanopartículas.

Na Figura 34 se mostra uma proposta do esquema da formação das nanopartículas de quitosana/gelatina e quitosana/colágeno. Estas serão usadas para estudar a incorporação e liberação de uma molécula de prova. Neste caso será testado o ácido pícrico.

Figura 34 - Esquema da formação das nanopartículas CSD/G 6 (a) e CSD/CL 4 (b)

6 INCORPORAÇÃO E LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

Para avaliar o comportamento de nanotransportador das nanopartículas obtidas, se optou por usar uma molécula de prova como modelo de fármaco. Devido a que a matriz está baseada em um polímero catiônico como a quitosana, foi escolhida um ácido de baixo pK_a como o ácido pícrico (pK_a 0,38). Se esperou encontrar uma possível interação entre a amina protonada da quitosana com o oxigênio do ácido pícrico (AP).

6.1 METODOLOGIA

6.1.1 INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO PÍCRICO

As suspensões de nanopartículas CSD/G 6 e CSD/CL 4 foram liofilizadas antes de fazer a incorporação.

A incorporação foi realizada variando os parâmetros mostrados na Tabela 12. Foi misturada a massa de amostra correspondente ao número de medida com o volume correspondente de AP.

Tabela 12 - Parâmetros usados na incorporação de ácido pícrico em CSD/G 6 e CSD/CL 4

Medida	Concentração de AP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de AP (mL)	Massa de amostra (mg)
1	50	10	10
2	100	10	10
3	150	10	10
4	150	10	15
5	150	10	20

O sistema foi sonificado a 42 kHz por 60 min e mantido em agitação por 23 h. O sistema foi centrifugado a 16000 rpm durante 50 min. Foi determinada a quantidade de ácido pícrico do sobrenadante por espectroscopia UV-Vis em 355,8 nm de acordo a metodologia descrita no item 6.1.2.1.

Finalmente foram calculadas a eficiência da incorporação (EI) e o conteúdo incorporado (CI) de AP pelas seguintes equações:

$$EI(\%) = \frac{M_o - M_s}{M_o} \times 100\% \dots\dots\dots (21)$$

$$CI(\%) = \frac{M_o - M_s}{M_{nps}} \times 100\% \dots\dots\dots (22)$$

sendo M_o a quantidade total de AP no sistema (μg), M_s a quantidade de AP no sobrenadante (μg) e M_{nps} a massa de nanopartículas (μg).

6.1.2 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO PÍCRICO

6.1.2.1 Metodologia I

Foi pesado 58,5 mg de ácido pícrico e dissolvido com 200 mL de água. Foram preparadas soluções de 0,000; 0,585; 1,170; 2,340; 7,020; 11,700 e 23,400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foi feito a varredura espectral UV-Vis mostrado na Figura 35, e determinado o pico de maior absorbância em 355,8 nm.

Foi feito o gráfico concentração vs absorbância medida em 355,8 nm. Na curva de calibração mostrada na Figura 36, a reta que melhor se ajusta aos resultados experimentais é dada pela equação 22. O índice de correlação foi de 0,9999.

$$Abs(u.a.) = 0,0609 \times \text{Concentração } (\mu\text{g mL}^{-1}) - (5,0472 \times 10^{-4}) \dots\dots\dots (23)$$

Figura 35 - Varredura espectral UV-Vis do ácido pícrico em água, concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$: 0,000 (—), 0,585 (—), 1,170 (—), 2,340 (—), 7,020¹ (—), 11,700 (—), 23,400 (—)

Figura 36 - Curva de calibração do AP em água

6.1.2.2 Metodologia II

Foi pesado 58,4 mg de ácido pícrico e dissolvido com 200 mL de PBS pH 7,4. Foram preparadas soluções de 0,000; 0,584; 1,168; 2,336; 7,008; 11,680 e 23,360 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foi feita a varredura espectral mostrada na Figura 37, e determinado o pico de maior absorbância em 355,6 nm.

Figura 37 - Varredura espectral do ácido pícrico em água, concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$: 0,000 (—), 0,584 (—), 1,168 (—), 2,336 (—), 7,008 (—), 11,680 (—), 23,360 (—)

Foi feito o gráfico concentração vs absorbância medida em 355,6 nm. Na curva de calibração mostrado na Figura 38, a reta que melhor se ajusta aos resultados experimentais e dada pela equação 23. O índice de correlação foi de 0,9999.

$$Abs(u.a.) = 0,0602 \times Concentração (\mu\text{g mL}^{-1}) - (2,6336 \times 10^{-4}) \dots\dots\dots (24)$$

Figura 38 - Curva de calibração do AP em PBS pH 7,4.

6.1.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM ÁCIDO PÍCRICO

6.1.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Foi seguida a metodologia do item 5.1.4.1 para à obtenção dos espectros FTIR.

6.1.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foi seguida a metodologia do item 5.1.4.1 para à obtenção das fotomicrografias MEV.

6.1.4 LIBERAÇÃO *in vitro* DE ÁCIDO PÍCRICO

Para os estudos de liberação foram tomadas 20 mg da matriz previamente incorporadas com AP e adicionado 10 mL de tampão de fosfato salino (PBS) pH 7,4

agitado e rapidamente colocados em um saco de diálise, membrana de celulose para diálise D-9777, previamente lavada. O sistema foi sumergido em um frasco com 90 mL de PBS e colocado em um banho de temperatura controlada (Banho Dubnoff TECNA) a 37°C, com agitação de 50 rpm.

O sistema se encontra representado na Figura 39. A intervalos determinados de tempo foi retirada uma alíquota de 2 mL de solução e medido no espectrometro UV-Vis a 355,6 nm (item 6.1.2.2). Depois da medida a solução foi devolvida ao sistema. As medidas continuaram até encontrar valores constantes que indicam o final da liberação.

Figura 39 - Esquema do sistema de liberação de nanopartículas

Devido a utilização de uma membrana para diálise, esta também influencia a saída do AP do sistema, portanto foi usada uma curva de referência para estudar o comportamento das nanopartículas. Este sistema de referência (R) foi realizado colocando 10 mL de AP $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ dentro de uma membrana de diálise e foi medido o tempo de liberação do AP seguindo a metodologia descrita anteriormente.

6.1.5 ESTUDO CINÉTICO DAS CURVAS DE LIBERAÇÃO

As curvas de liberação obtidas foram usadas para estudar a cinética de liberação do AP. Foi calculado cada parâmetro necessário em cada modelo a partir dos dados encontrados nas curvas de liberação.

Entre os modelos cinéticos de liberação dependentes foram usadas:

Modelo de primeira ordem, foi feito o gráfico tempo(h) vs $\text{Log}W_t$ e calculadas as constantes cinéticas K_1 usando a equação (4)

Modelo de Higuchi, foi feito o gráfico tempo^{1/2} ($h^{1/2}$) vs f_t e calculadas as constantes cinéticas K_H usando a equação (5)

Modelo de Hixson-Crowell, foi feito o gráfico tempo (h) vs $(1-f_t)^{1/3}$ e calculadas as constantes cinéticas K_β usando a equação (7).

Modelo de Korsmeyer-Peppas, foi feito o gráfico $\log T$ vs $\log(M_t/M_\infty)$, e calculadas as constantes cinéticas a e o expoente de liberação n de acordo a equação (10).

Entre os modelos cinéticos de liberação independentes foram usadas:

O fator de diferenciação (f_1) usando como referência a curva do sistema de referência R descrita anteriormente. Foi usada a equação (12) para cada medida do tempo e feito o gráfico tempo(h) vs f_1 .

Foi calculado o fator de semelhança (f_2) usando como referência a curva R. Foi usada a equação (13) para cada medida do tempo e feito o gráfico tempo(h) vs f_2 .

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO PÍCRICO

Foi estudado a incorporação de ácido pícrico, variando a massa de nanopartículas usada e a concentração do AP. A Tabela 13 mostra os resultados das medidas de incorporação para o CSD/G 6. Como pode-se observar quando é aumentada a concentração do AP (medidas 1, 2 e 3) mantendo constante a massa de

CSD/G 6, obtém-se um aumento dos valores de EI e CI. Este resultado indica uma dependência proporcional, aumentando a incorporação conforme aumenta a concentração do AP nas partículas. No entanto, este aumento terá um limite devido a que a partícula pode apresentar um ponto de saturação na incorporação. Quando aumentamos a massa de partículas (medidas 3, 4 e 5) mantendo constante a concentração do AP encontramos uma dependência diretamente proporcional com o EI, que indica uma maior eficiência da incorporação. No caso do CI, este apresenta uma dependência inversamente proporcional com o aumento da massa de partículas. Estes fatos indicam que o aumento do número de partículas, origina aumento da superfície de contato da matriz com o AP e por tanto maior incorporação, mas menor quantidade individual.

Tabela 13 - Eficiência da incorporação e Conteúdo Incorporado em CSD/G 6.

Medida	Concentração de AP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Massa de CSD/G 6 (mg)	EI (%)	CI (%)
1	50	10	31,5	1,52
2	100	10	46,3	4,65
3	150	10	49,3	7,16
4	150	15	60,9	5,78
5	150	20	66,1	4,70

Com estes dados determinamos que a medida com maior conteúdo incorporado foi a número 3, pelo que foi feita três repetições desta medida para determinar a EI e CI médio no ensaio de incorporação para o sistema CSD/G 6.

$$\text{EI}(\text{medida 3}) = 48,62 \pm 0,42\%$$

$$\text{CI}(\text{medida 3}) = 7,39 \pm 0,13 \%$$

Seguindo a mesma metodologia foi estudado a incorporação do AP em CSD/CL 4. Na Tabela 14 pode-se observar os resultados do ensaio. As medidas 1, 2 e 3 mostram a influência da concentração do AP, mantendo constante a massa de partículas. Encontramos uma dependência proporcional da concentração com o EI e CI, a quantidade incorporada aumentou com o aumento da concentração do AP.

Tabela 14 - Eficiência da incorporação e conteúdo incorporado em CSD/CL 4.

Medida	Concentração de AP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Massa de CSD/CL 4 (mg)	EI (%)	CI (%)
1	50	10	29,0	1,45
2	100	10	38,3	3,77
3	150	10	42,6	6,45
4	150	15	47,5	4,70
5	150	20	50,7	3,76

Nas medidas 3, 4 e 5 é observada a influência do aumento da massa de partículas no sistema quando a concentração é mantida constante. Encontramos uma dependência diretamente proporcional com o EI e inversamente proporcional com o CI. O aumento da massa de partículas origina aumento da eficiência da incorporação, mas diminuição do conteúdo incorporado em cada partícula.

Com este ensaio foi determinado que a medida com maior conteúdo incorporado é a número 3, pelo que foram feitas três repetições desta medida para determinar a EI e CI médio no ensaio de incorporação em CSD/CL 4.

$$\text{EI}(\text{medida 3}) = 42,85 \pm 1,87\%$$

$$\text{CI}(\text{medida 3}) = 6,44 \pm 0,23 \%$$

Se comparamos os valores obtidos para as duas matrizes encontramos que o valor do EI e CI do CSD/G 6 é ligeiramente maior que do CSD/CL 4. Este fato se deve à presença das cargas positiva da partícula CSD/G 6 que influencia na maior incorporação do AP. No entanto as partículas CSD/CL 4 apresentaram valores comparáveis de incorporação apesar de ter carga negativa em sua superfície. Estes resultados indicam que a influência da carga eletroestática na incorporação é baixa.

6.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO ÁCIDO PÍCRICO

6.2.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Na Figura 40 é mostrado o espectro infravermelho do AP e das matrizes de CSD/G 6 e CSD/CL 4 contendo o AP. No espectro do ácido pícrico são observados os picos em 1633, 1609 e 1528 cm^{-1} que são atribuídas as vibrações de estiramento do grupo C=C do anel aromático do AP. Os picos em 1432 e 1343 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento assimétrico da ligação C-N do grupo NO_2 . O pico em 1153 é atribuído à vibração de estiramento C-O. O modo de deformação do C-O e o C-C são observados em 1088 cm^{-1} . Outro pico importante é o observado em 783 cm^{-1} que é atribuído a vibração da ligação de flexão fora do plano da ligação C-H.

Figura 40 - Espectro infravermelho do AP (a) e as matrizes CSD/G 6 – AP (b) e CSD/CL 4 – AP (c).

Nos espectros CSD/G 6 – AP e CSD/CL 4 – AP da Figura 40 são observados os picos principais destas matrizes já mostrado na figura 31. A presença do AP é avaliada pela observação do pico menos intenso em torno de 1434 cm^{-1} . O pico em 1330 cm^{-1} é 1339 cm^{-1} atribuído à vibração de estiramento simétrico do grupo C-N do grupo (NO_2), que no espectro do AP são bastante intensos. No entanto, o pico em torno do 1330 cm^{-1} se encontra deslocado a frequências baixas, o que indica uma provável interação de hidrogênio com a amina protonada da quitosana. Outro pico pequeno de menor intensidade aparece em 789 cm^{-1} , que é atribuído a vibração fora do plano da ligação C-H. Qualquer outro pico do ácido pícrico tem sido sobreposto com os picos anteriormente descritos da quitosana, colágeno, gelatina ou tripolifosfato. Estes resultados indicam que a incorporação de AP acontece eficientemente, encontrando possíveis interações entre os grupos altamente eletronegativos do ácido pícrico e amina protonada da quitosana, interação que foi usado por outros autores para elaborar filmes poliméricos baseados em quitosana usadas como sensor seletivo de ácido pícrico (HE, PENG, *et al.*, 2009).

6.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 41 são mostradas as fotomicrografias por MEV das amostras após a liofilização descrita no item 6.1.1. Como pode ser observado na Figura 41-a, a amostra CSD/G 6 apresentou aglomeração. Se lembrarmos o potencial Zeta mostrado na Tabela 11, este valor positivo deveria ajudar a manter o sistema nanoparticulado por repulsão eletrostática de cargas. No entanto, apesar deste ter esta vantagem a amostra apresentou grande aglomeração de nanopartículas, indicando que esta carga não foi suficientemente alta para originar este efeito.

Por outro lado, na Figura 41-b observamos que a amostra CSD/CL 4 apresentou aglomeração suficientemente forte para que o sistema nanoparticulado seja perdido, encontrando-se neste caso, regiões grandes com partículas na ordem de micrômetros. Este comportamento pode ser explicado pela baixa carga encontrada no potencial Z (Tabela 11) da CSD/CL 4. Por conseguinte, as partículas chegam a formar aglomerados macroscópicos pela ausência da estabilização por repulsão de cargas.

Figura 41 - Fotomicrografias por MEV das amostras liofilizadas CSD/G 6, aumento de 10k x (A), CSD/G 6, aumento de 58k x (B) e CSD/CL 4, aumento de 10k x (C)

Após ter incorporado o AP, foi analisada a morfologia das amostras. Como pode ser observado na Figura 42-a, o sistema CSD/G 6 – AP, apresentou novamente aglomeração. A Figura 42-b mostra a aglomeração do CSD/CL 4 - AP, não se conseguindo recuperar o sistema nanoparticulado pela sonicado e agitação usada na incorporação.

Figura 42 - Fotomicrografias das amostras CSD/G 6 (a) e CSD/CL 4 (b) com AP. Aumento de 80k x

Apesar de ter encontrado este comportamento, foi estudada a liberação do AP com a finalidade de conhecer as diferenças da liberação quando temos partículas de diferentes tamanhos baseadas em quitosana com diferentes componentes, neste caso colágeno e gelatina.

6.2.3 LIBERAÇÃO DO ÁCIDO PÍCRICO

O perfil de liberação do ácido pícrico é mostrado na Figura 43. O sistema de referência para os sistemas foi o AP sem as nanopartículas, sistema R descrito no item 6.1.4. A curva do sistema de referência R descreve a saída do ácido pícrico da membrana de diálise, a qual não teve nenhuma influência das matrizes estudadas.

Figura 43 - Perfil de liberação de ácido pícrico em CSD/G 6 e CSD/CL 4.

A incorporação de partículas ao sistema pode influenciar na cinética de saída do AP desta membrana. Como é observado na Figura 43, a liberação inicial é rápida, atingindo o equilíbrio após de 4 horas no caso da CSD/G 6 e 8h no caso da CSD/CL 4. As matrizes feitas com gelatina (CSD/G 6) não influenciam significativamente a saída do AP, entanto que as matrizes feitas com colágeno atrasam a saída desta. Este comportamento também pode ser observado na Tabela 15, na qual foram extrapolados os valores do $t_{20\%}$, $t_{50\%}$ e o $t_{90\%}$ a partir dos gráficos obtidos (ver item 1.4.3).

Tabela 15 - Valores de $t_{20\%}$, $t_{50\%}$ e $t_{90\%}$ das curvas de liberação do AP.

Amostra	$t_{20\%}$ (h)	$t_{50\%}$ (h)	$t_{90\%}$ (h)
AP	0,17	0,59	2,12
CSD/G 6 – AP	0,19	0,69	2,42
CSD/CL 4 - AP	0,25	1,01	4,19

Estes dados, assim como o comportamento geral das curvas de liberação indicam que o AP incorporado interage debilmente com o CSD/G 6, não sendo influenciada pela a superfície carregada positivamente da partícula no processo de liberação do AP. Este fato leva a ideia de que esta incorporação esteja mais influenciada por outros fatores que pela carga eletrostática que o AP encontra na partícula.

No processo de liberação, o caminho percorrido pelo AP para sair do sistema e ser liberado seria maior no caso do CSD/CL 4, pois esta matriz apresentou maior tamanho de partícula. Este comportamento originaria um atraso na saída do AP que macroscopicamente é observado como um maior tempo de liberação.

Além disso, também temos que considerar a possibilidade de ter uma influência da estrutura do colágeno na incorporação do AP. Sendo este o caso, o maior ordenamento da estrutura da tripla hélice do colágeno poderia chegar a reter por algum tempo o AP incorporado, atrasando assim a liberação. No entanto este parâmetro não foi suficientemente estudado para poder assegurar esta suposição.

6.2.4 ESTUDO CINÉTICO DAS CURVAS DE LIBERAÇÃO

Com a finalidade de conhecer o mecanismo de liberação dos sistemas estudados, foi feito o estudo das curvas nos modelos dependentes

A Figura 44 mostra a aplicação do modelo de *primeira ordem*, mediante o gráfico tempo (h) vs $\log W_t$ obtido a partir da equação (4), encontrando um comportamento linear nos parâmetros calculados.

Figura 44 - Aplicação do Modelo de primeira ordem para a liberação do AP em CSD/G 6 e CSD/CL 4

O índice de correlação das retas obtidas antes de 80% de liberação foram de 0,9987 para a curva CSD/G 6 e 0,9942 para a curva CSD/CL 4, que indica uma boa aproximação deste modelo. Assim poderíamos sustentar que a velocidade de dissolução do AP no PBS pH 7,4 depende da quantidade restante no interior do sistema de liberação.

O conhecimento das constantes de proporcionalidade é indicativo da velocidade de liberação do AP. Neste caso o valor encontrado do K_1 calculado a partir da equação 4 para a CSD/G 6 foi de -0,1784, menor que o -0,1041 encontrado para o colágeno, que indica a maior velocidade de liberação para o CSD/G 6.

A Figura 45 mostra a aplicação do modelo de *Higuchi*, mediante o gráfico tempo^{1/2} (h^{1/2}) vs F_t obtido a partir da equação (5), encontrando um comportamento linear nos parâmetros avaliados neste modelo. O índice de correlação das retas obtidas antes do 50% de liberação foram 0,9964 para a curva CSD/G 6 e 0,9992 para a curva CSD/CL 4, que indica uma boa aproximação deste modelo. Podemos concluir então que o sistema segue um mecanismo de difusão baseado na lei de Fick.

Figura 45 - Aplicação do Modelo de Higuchi para a liberação do AP em CSD/G 6 e CSD/CL 4

A quantidade liberada é proporcional a raiz quadrada do tempo. O conhecimento das constantes de proporcionalidade neste modelo é indicativo da velocidade de liberação do AP. O valor encontrado para a constante de difusão K_H

calculada a partir da equação 5, para a CSD/G 6 foi de 0,7537, maior que o valor de 0,5656 encontrado para CSD/CL 4, que indica a maior velocidade de liberação para o CSD/G 6.

A Figura 46 mostra a aplicação do modelo de *Hixson-Crowell*, mediante o gráfico tempo (h) vs $(1-f_t)^{1/3}$ obtido a partir da equação (7), encontrando um comportamento linear nos parâmetros calculados. O índice de correlação das retas obtidas antes de 75% de liberação foram de 0,9678 para a curva CSD/G 6 e 0,9740 para a curva CSD/CL 4, Estes valores não são suficientemente altos como para considerar uma boa aproximação do modelo.

Figura 46 - Aplicação do Modelo de Hixson-Crowell para a liberação do AP em CSD/G 6 e CSD/CL 4.

A Figura 47 mostra a aplicação do modelo de *Korsmeyer-Peppas*, mediante o gráfico $\log(t-l)$ vs $\log(M_{(t-l)}/M_\infty)$ obtido a partir da equação (4), onde o tempo de latência (l) no início da liberação é considerado igual a zero. O gráfico mostra um comportamento linear nos parâmetros avaliados. O índice de correlação das retas obtidas antes de 60% de liberação foram 0,9983 para a curva CSD/G 6 e 0,9981 para a curva CSD/CL 4, que indica uma boa aproximação deste modelo. O conhecimento do valor do expoente de difusão determinou o mecanismo de liberação, neste caso os valores encontrados foram 0,7301 e 0,6523 para CSD/G 6 e CSD/CL 4 respectivamente, valores compreendidos entre 0,5 e 1,0. Podemos concluir mediante

este modelo que o sistema segue um mecanismo de difusão anômala ou não-Fickiana. O conhecimento das constantes de proporcionalidade neste modelo é indicativo da velocidade de liberação do AP. O valor encontrado para a constante cinética “ α ” a partir da equação 10 do CSD/G 6 foi de 0,6531, maior que os 0,4890 encontrado para CSD/CL 4, que indica a maior velocidade de liberação para o CSD/G 6.

Figura 47 - Aplicação do Modelo de Korsemeyer-Peppas para a liberação do AP em CSD/G 6 e CSD/CL 4

Foi usado o modelo dependente para estudar a cinética de liberação. Foram calculados os valores dos fatores de diferenciação (f_1) e de semelhança (f_2) para a CSD/G 6 e CSD/CL 4 mediante a equação 12 e 13 com respeito ao sistema de referência R. Na Figura 48 é mostrado a dependência destes valores com o tempo.

Como pode ser observado no gráfico 48-a, os valores de f_1 da curva de liberação do CSD/CL 4 estão todos acima de 15, o que quer dizer que efetivamente esta curva tem um comportamento diferente da referência. No caso do CSD/G 6, todos os fatores de diferenciação foram menores que 15. Este resultado indica que o comportamento desta curva é igual ao da referência.

O gráfico 48-b mostra os valores de f_2 das curvas de liberação. Mediante este parâmetro é observado que ambas curvas apresentam valores semelhantes até as

0,25 horas aproximadamente, depois desse tempo, os valores do fator de semelhança foram menores que 50, indicando diferença com respeito à curva do sistema de referência R.

Figura 48 - Fatores de diferenciação (f_1) (a) e de semelhança (f_2) (b) para a liberação do AP a partir das matrizes nanoparticuladas.

Estes valores avaliam mais uma vez a influência das partículas no sistema de liberação. Como pode ser observado nestes sistemas o colágeno gera um retardo na saída do ácido pícrico, apesar de ter maior tamanho de partícula e gerar aglomeração nos sistemas liofilizados. Por outro lado, as nanopartículas preparadas com gelatina não retêm suficiente o ácido pícrico. No entanto apresentam menores tamanhos de partícula e menor aglomeração. Portanto fica como sugestão para trabalhos futuros a otimização destes sistemas para conseguir incorporação e estabilização usando metodologias diferentes para obter rendimentos maiores. Também poderiam ser consideradas o uso de novas alternativas de incorporação ou estabilização de nanopartículas para evitar aglomeração. Uma sugestão para futuros trabalhos poderia ser a incorporação do fármaco antes da formação da nanopartícula. Evitar o uso da liofilização. Assim como também o uso de surfactantes que possam aumentar o potencial Z da nanopartícula com a finalidade de diminuir a aglomeração.

7 CONCLUSÕES

- Foram preparadas distintas formulações de nanopartículas de quitosana despolimerizada com colágeno e quitosana despolimerizada com gelatina por gelificação iônica com tripolifosfato de sódio. A metodologia de preparação II mostrou populações monodispersas para as nanopartículas com maior quantidade de quitosana.
- A caracterização por espectroscopia FTIR sugeriu a presença de quitosana, gelatina, colágeno e tripolifosfato nas nanopartículas obtidas.
- Foi encontrando dependência da quantidade de gelatina ou colágeno usado na preparação das nanopartículas com o diâmetro hidrodinâmico. As formulações CSD/G 6 e CSD/CL 4 foram usadas para incorporação e liberação do ácido pícrico por ter o menor tamanho e as melhores fotomicrografias MEV.
- A superfície das nanopartículas mostrou comportamentos diferentes nas medidas de potencial Zeta. A nanopartícula CSD/G 6 foi formada principalmente por CSD na superfície. A nanopartícula CSD/CL 4 foi formada por maior quantidade de colágeno em relação a quitosana em sua superfície.
- As nanopartículas apresentaram uma forte aglomeração após de terem sido liofilizadas, sendo perdido o sistema nanoparticulado no caso do CSD/CL 4, no entanto foram usadas para a liberação de ácido pícrico. Foi encontrado conteúdo incorporado de $7,39 \pm 0,13\%$ e $6,44 \pm 0,23\%$ para CSD/G 6 e CSD/CL respectivamente.
- A liberação mostrou um retardo no caso do CSD/CL 4, o que sugeriu maior caminho percorrido pelo ácido pícrico para sair da partícula, o que possibilita seu uso como transportador de fármacos.
- O estudo cinético por modelos dependentes mostrou que a saída de ácido pícrico acontece por mecanismo de difusão não fickiana. Os modelos independentes mostraram que a saída do AP do sistema com CSD/G 6 é igual ao de referência, não se encontrando influência das nanopartículas. A saída do AP do sistema CSD/CL 4 apresentou diferença, encontrando-se influência das partículas usadas.

8 REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, E. S.; OLIVEIRA, C. P.; BELLATO, C. R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 4, p. 1155–1160, 2010.
- BAO, H.; LI, L.; ZHANG, H. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan–TPP nanoparticles in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 328, p. 270-277, 2008.
- BARROSO, T.; VIVEIROS, R.; CASIMIRO, T.; AGUIAR-RICARDO, A. Development of dual-responsive chitosan–collagen scaffolds for pulsatile release of bioactive molecules. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 102-112, 2014.
- BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, p. 463-469, 2012.
- BET, Marcos. **Colágeno aniônico: propriedades físico-químicas, estruturais e comportamento biológico**. 2000. 107f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1074-1079, 2001.
- BHUMKAR, D. R.; POKHARHAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripoliphosphate: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E1-E6, 2006.
- BISWAS, S.; CHATTOPADHYAY, M.; SEN, K. K.; SAHA, M. K. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 403-410, 2015.
- CALVO, P.; REMUÑAM-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO M. J. Novel hydrophilic chitosan - polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p. 125-132, 1997.
- CARDOSO, P. J. Avaliação in vitro da lio equivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2002.
- CHA, S. Y.; LEE, J. K.; LIM, B. S.; LEE, T. S.; PARK, W. H. Conjugated vinyl derivatives of chitooligosaccharide: synthesis and characterization. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 39, p. 880-887, 2000.

- CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M.; GOISSIS, M. R. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 7, n. 2, p. 40-46, 1997.
- CHIONO, V.; PULIERI, E.; VOZZI, G.; CIARDELLI, G.; AHLUWALIA, A.; GIUSTI, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. **Journal of Materials Science**, v. 19, p. 889–898, 2008.
- DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Reserch**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.
- DENARI, Nízia. **Biomateriais binários de quitosano/amido e quitosano/gelatina em L-ácido láctico**. 2014. 134f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.
- DIXIT, N.; VAIBHAV, K.; PANDEY, R. S.; JAIN, U. K.; KATARE, O. P.; KATYAL, A.; MADAN, J. Improved cisplatin delivery in cervical cancer cells by utilizing folate-grafted non-aggregated gelatin nanoparticles. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 69, p. 1-10, 2015.
- FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21-27, 2012.
- FORD, J. L.; MITCHELL, K.; ROWE, P.; ARMSTRONG, D. J.; ELLIOTT, P. N. C.; ROSTRON, C.; HOGAN, J. E. Mathematical modelling of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices: effect of temperature. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 71, n. 1-2, p. 95-104, 1991.
- FORD, J. M.; RUBISTEIN, M. H.; MCCAUL, F.; HOGAN, J. E.; EDGAR, P. J. Importance of drug type, tablet shape and added diluents on drug release kinetics from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 40, n. 3, p. 223-234, 1987.
- GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. **Iranian Polymer Journal**, v. 19, n. 5, p. 375-398, 2010.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Funtional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.
- HACKER, M.; BACHMAM, K.; MESSER, W. **Pharmacology: principles and practice**. Boca Raton: Academic Press. 2009. 608 p.
- HANSEN, E. F.; LEE, S. N.; SOBEL, H. The effects of relative humidity on some physical properties of modern vellum. **Journal of the American Institute for Conservation**, v. 31, n. 3, p. 325-342, 1992.

HANS-GEORGE, E. **Macromolecules**. 2nd. ed. New York: Plenum, 1984. v. 1.

HE, G. PENG, H.; LIU, T. YANG, M.; ZHANG, Y.; FANG, Y. A novel picric acid film sensor via combination of the surface enrichment effect of chitosan films and the aggregation-induced emission effect of siloles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 7347-7353, 2009.

HIGUCHI, T. Theoretical analise of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

HIXSON, A. W.; CROWELL, J. H. Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 923-931, 1931.

HORN, Marília. **Obtenção de caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico**. 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

HORN, M. M.; MARTINS, V. C.; PLEPIS, A. M. Interaction of anionic collagem with chitosam. Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 239-243, 2009.

HORNYAK, G. L.; TIBBALS, H. F.; DUTTA, J.; MOORE, J. J. **Introduction to Nanoscience & Nanotechnology**. New York: CRC, 2009. 1593 p.

HUANG, I.; LIU, T. Mobilization of mesenchymal stem cells by stromal cell-derived factor-1 released from chitosan/tripolyphosphate/fucoidan nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 1048-1056, 2012.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 344-353, 2004.

HUANG, R.; LI, W.; LV, X.; LEI, Z.; BIAN, Y.; DENG, H.; WANG, H.; LI, J.; LI, X. Biomimetic LBL structured nanofibrous matrices assembled by chitosan/collagen for promoting wound healing. **Biomaterials**, v. 53, p. 58-75, 2015.

HUANG, Y.; ONYERI S.; SIEWE, M.; MOSHFEGHIAN, A.; MADIHALLY, S. V. In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 7616-7627, 2005.

INNOCENTINI, L. H. Polímeros biodegradáveis. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2012. v. 1, cap. 6, p. 183.

ISHA, C.; NIMRATA, S.; RANA, A. C.; SURBHI, G. Oral sustained release drug delivery system: an overview. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 57-62, 2012.

JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. J. **Basic pharmacokinetics**. London: Softcover, 2009. 416 p.

- JIANG, T.; JAMES, R.; KUMBAR, S. G.; LAURENCIN, C. T. Chitosan as a biomaterial: structure, properties, and application in tissue engineering and drug delivery. In: KUMBAR, S.; LAURENCIN, C.; DENG, M. **Natural and synthetic biomedical polymers**. New York: Elsevier, 2014. p. 91-113.
- KARTHIKEYAN, S.; PRASAD, N. R.; GANAMI, A.; BALAMURUGAN, E. Anticancer activity of resveratrol-loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 64-73, 2013.
- KASAAI, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 68, p. 477-488, 2007.
- KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.
- KUMAR, R. N. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
- KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 203-226, 2006.
- LAMATTINA, J. C.; GOLAN, D. E. Farmacocinética. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMOSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia - a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3rd. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 28-45.
- LAVALL, R. L.; ASSIS, O. B.; CAMPANA-FILHO, S. P. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: extraction and characterization. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2465–2472, 2007.
- LEE, R. J.; TAMM, T.; TEMMER, R.; AABLOO, A.; KIEFER, R. Two formation mechanisms and renewable antioxidant properties of suspensible chitosan–PPy and chitosan–PPy–BTDA composites. **Synthetic Metals**, v. 164, p. 6-11, 2013.
- LOPES, C. M.; SOUSA, J. M.; COSTA, P. Formas Farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.
- LYMAN, D. J.; ROWLAND, S. M. Biomaterials. In: KROSCWITZ, J. I. **Polymers: biomaterials and medical applications**. New York: John Wiley, 1989. v. 1, p. 52-71.
- MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; SIMON, M.; BI, D.; KISSEL, T. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International and Journal of Pharmaceutics**, v. 281, p. 45-54, 2004.
- MARK, J. E. (Ed.). **Polymer data handbook**. 2nd. ed. New York: Oxford University, 2009. p. 178.

- MI, F.L.; SHYU, S. S.; LEE, S. T.; WONG, T. B. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel bead prepared by in-liquid curing method. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 37, p. 1551-1564, 1999.
- NAZERI, N.; AVADI, M. R.; FARAMARZI, M. A.; SAFARIAN, S.; TAVOOSIDANA, G.; KHOSHAYAND, M. R.; AMANI, A. Effect of preparation parameters on ultra low molecular weight chitosan/hyaluronic acid nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 642-646, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger-principles of biochemistry**. 4th. ed. New York: W. H. Freeman, 2005. 1119 p.
- NICKLAS, M.; SCHATTON, W.; HEINEMANN, S.; HANKE, T.; KREUTER, J. Preparation and characterization of marine sponge collagen nanoparticles and employment for the transdermal delivery of 17 β -estradiol-hemihydrate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 9, p. 1035-1042, 2009.
- NIKOO, M.; BENJAKUL, S.; BASHARI, M.; ALEKHORSHIED, M.; CISSOUMA, A. I.; YANG, A.; XU, X. Physicochemical properties of skin gelatin from farmed Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) as influenced by acid pretreatment. **Food Bioscience**, v. 5, p. 19-26, 2014.
- OCAK, B. Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes and chitosan for controlled release of lavender oil. **Journal of Environmental Management**, v. 100, p. 22-28, 2012.
- PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, p. 1863-1887, 2010.
- PATTY'S toxicology. New York: John Wiley, 2000. v. IIB.
- PAULA, H. C.; SOMBRA, F. M.; ABREU, F. O.; PAULA, R. C. Lippia sidoides essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 12, p. 2359-2366, 2010.
- PEDROSO, Maitê. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journals of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 27-46, 2000.
- PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.
- PRATA, A. S.; GROSSO, C. R. Production of microparticles with gelatin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 292-299, 2015.

RAMASAMY, P.; SHANMUGAM, A. Characterization and wound healing property of collagen–chitosan film from *Sepia kobsi* (Hoyle, 1885). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 93-102, 2015.

RANGA, K. V.; PADMALATHA, K. Swelling controlled release systems: recent developments and application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 48, n. 1, p. 1-13, 1988.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 281-285, 1993.

ROBERTS, G. A.; DOMSZY, J. G. Determination of the viscometric constants for chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 4, n. 6, p. 374-377, 1982.

RODRIGUES, P. O.; SEGATTO, M. A. Avaliação in vitro de medicamentos de liberação prolongada: aplicação de métodos estatísticos, modelos dependentes e independentes de análise. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 34, n. 1, p. 13-23, 2005.

SÁEZ, V.; HERNÁNDEZ, E.; LÓPEZ, L. Liberación controlada de fármacos. aplicaciones biomédicas. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 4, n. 2, p. 111-122, 2003.

SANTOS, Carla. **Mineralização biomimética de hidrogéis quitosana/gelatina**. 2014. 97f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

SHAIK, M. R.; KORSAPATI, M.; PANATI, D. Polymers in drug delivery systems. **International Journal of Pharma Science**, v. 2, n. 4, p. 112-116, 2012.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagem structure and stability. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 929-958, 2009.

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**, v. 54, p. 235-243, 2002.

SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T. Evaluating conditions for the formation of chitosan/gelatin microparticles. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 133-137, 2009.

- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C. J.; WESS, T. J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p. 795-801, 2004.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.
- SUITCHARIT, C.; AWAE, F.; SENGMAHA, W.; SRIKULKIT, K. Preparation of depolymerized chitosan and its effect on dyeability of mangosteen dye. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 38, n. 3, p. 473-484, 2011.
- TENNEY, D. **The chemistry and powder and explosives**. [S.l.]: Angriff Press, 1984. 490 p.
- TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2003.
- TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.
- U. S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. **CFR, Code of Federal Regulation. Title 21. Sodium Tripolyphosphate**. Silver Spring, 2014. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.1810>>. Acesso em: 18 fev. 2015.
- VIMAL, S.; ABDUL, S.; TAJU, G.; NAMBI, K. S.; SUNDAR, N.; MADAN, N.; FAROOK, M. A.; RAJKUMAR, T.; GOPINATH, D.; SAHUL, A. S. Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. **Acta Tropica**, v. 128, p. 486-493, 2013.
- VULCANI, V. A.; MACORIS, D. G.; PLEPIS, A. M.; MARTINS, V. C.; FRANZO, V. S.; RABELO, R. G.; SANT'ANA, F. J. Implantação de biomembrana de colágeno tratada em solução alcalina ou conservada em glicerina a 98% na parede abdominal de equinos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 43, n. 8, p. 1422-1428, 2013.
- WANG, J.; WU, W.; LIN, Z. Kinetics and thermodynamic of the water sorption of 2-hydroxyethyl metacrylate/styrene copolymer hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 3018-3023, 2008.
- WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 1020-1037, 2012.
- WILLIAM, D. F. **Definitions in biomaterials**. New York: Elsevier, 1987. p. 9-29.
- ZOU, T.; PERCIVAL, S. S.; CHENG, Q.; LI, Z.; ROWE, C. A.; GU, L. Preparation, characterization, and induction of cell apoptosis of cocoa procyanidins–gelatin–chitosan nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, p. 36-42, 2012.