

Joana Costa Martins

PREPARAÇÃO DE MICROFERAS DE QUITOSANO PARA IMOBILIZAÇÃO DE FÁRMACOS

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, orientada
pela Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil e pela Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo
apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Março de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Costa Martins

PREPARAÇÃO DE MICROSFERAS DE QUITOSANO PARA IMOBILIZAÇÃO DE FÁRMACOS

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, orientada
pela Professora Doutora Maria Helena Mendes Gil e pela Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo
apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Março de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“As ideias são prodigiosas – elas e a maneira como se associam.

Num momento, descobrimos que atravessámos o mundo,
e que transpusemos o infinito entre dois pensamentos.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que contribuíram para o sucesso do meu percurso académico e a quem eu devo os mais sinceros agradecimentos.

Agradeço, em primeiro lugar, à Professora Doutora Maria Helena Gil por todo o apoio prestado, pela disponibilidade demonstrada e por todos os conselhos referentes a este projecto; e à Professora Doutora Maria Margarida Figueiredo pela supervisão e conhecimentos transmitidos.

Muito obrigada à Doutora Patrícia Coimbra pelo apoio incansável, simpatia, sugestões e opiniões sempre que necessário. A sua ajuda foi fundamental para o sucesso desta Dissertação.

Agradeço também à Engenheira Maria José Moura pela preocupação, ajuda, conselhos e correções apesar do pouco tempo de que dispunha, assim como pelas instruções dadas ao longo do trabalho e que tanto auxiliaram o seu desenvolvimento.

Não me posso esquecer de deixar o meu reconhecimento a quem esteve sempre presente durante o meu percurso académico e que me apoiou incondicionalmente, brindando-me com a sua amizade e companheirismo: Catarina, Ana Catarina, Ângela, Susana, Carla, Janice, Manuela e Inês, muito obrigada. Agradeço também à Joana, que me incentivou a ser melhor e que nunca me deixou desistir, e à Teresa por todo o interesse demonstrado por este trabalho, pela troca de ideias e conversas sem fim. Muito obrigada ao Mário pela sua paciência infindável, por estar sempre disponível para me ajudar e, especialmente, pela sua amizade. Agradeço também a todos aqueles que de certa forma fizeram parte da minha vida académica e que contribuíram para o meu crescimento tanto a nível pessoal como profissional.

Muito obrigada à minha irmã, Ana, pela longa amizade, carinho e por toda ajuda prestada, e ao Nick por todas as correções, conselhos e conversas em inglês, sem esquecer a minha sobrinha Beatriz, que ainda veio a tempo de acompanhar a tia enquanto estudante.

Por último, não posso deixar de referir as pessoas que mais me acompanharam durante toda a minha vida, dando-me a educação e os valores de que nunca abdicó: o meu pai e a

minha mãe. A eles agradeço o apoio incondicional, a compreensão, o carinho e todos os sacrifícios que fizeram para que me pudesse tornar a pessoa que sou hoje. Obrigada por tudo o que me deram e transmitiram.

A todos os que referi, e aos que me faltou referir mas que estão sem dúvida incluídos nos meus pensamentos, um grande bem-haja.

RESUMO

Alguns dos fármacos existentes para o tratamento de certas doenças, como o cancro, não conseguem, em muitos casos, alcançar o alvo a que se destinam em quantidades viáveis, sendo distribuídos por diversos tecidos ou órgãos que não fazem parte do caminho patológico, podendo provocar graves efeitos secundários. Para contornar este problema, utilizam-se sistemas de libertação controlada de fármacos, muitas vezes constituídos por microsferas de polímeros naturais, como o quitosano e a gelatina, amplamente utilizados em aplicações farmacêuticas devido às suas propriedades. Estes são biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos.

Nesta Dissertação, pretendeu-se desenvolver microsferas de quitosano e gelatina reticuladas com genipin para incorporação de um fármaco anticancerígeno, o 5-Fluorouracil. O método usado para a produção das partículas foi uma emulsão água-em-óleo com reticulação química, onde se variou a relação entre as concentrações mássicas de quitosano e gelatina. Inicialmente, foram realizados cinco ensaios, onde se destacaram três tipos de microsferas: de quitosano e gelatina em proporções mássicas iguais, de quitosano e gelatina na proporção mássica 3:1, e as de quitosano. Estas foram usadas para avaliação do efeito da razão quitosano/gelatina na morfologia, e nos perfis de libertação de fármaco.

Em termos de morfologia, os três tipos de microsferas foram observados ao microscópio óptico e as suas fotografias analisadas pelo *software* de análise de imagem *Image J*. Este permitiu obter valores para área projectada (de onde se retirou o diâmetro equivalente), circularidade e *roundness*.

Observou-se um diâmetro equivalente médio de 14 μm para as microsferas de quitosano e de quitosano e gelatina na proporção mássica de 1:1, enquanto para as microsferas de quitosano e gelatina na proporção mássica de 3:1 este foi de cerca de 6 μm . A esfericidade das microsferas preparadas nos três ensaios foi confirmada pelos valores de circularidade e *roundness*, que se encontraram próximos de 1.

A libertação de fármaco foi feita com microsferas com o fármaco modelo 5-Fluorouracil incorporado e imersas numa solução de PBS, tendo-se medido a absorvância do sobrenadante em diversos intervalos de tempo, num espectrofotómetro UV/Visível, ao longo de vinte e quatro horas. Observou-se que as microsferas de quitosano possibilitaram uma

maior incorporação de 5-Fluorouracil, cerca de 18% do valor teórico esperado, enquanto as microsferas de quitosano e gelatina na proporção de 1:1 e as de quitosano e gelatina na proporção de 3:1 permitiram a passagem de 13% e 10%, respectivamente, traduzindo a grande perda de fármaco ao longo do processo.

As microsferas de quitosano e gelatina na proporção mássica de 1:1 foram aquelas que demonstraram uma libertação de fármaco mais lenta, tendo libertado 98% do fármaco ao fim de oito horas, enquanto as restantes permitiram a difusão da mesma quantidade em apenas três horas.

ABSTRACT

Some of the existing drugs for the treatment of certain diseases cannot reach their target in effective quantities. When this happens they are instead distributed to other tissues and organs, which don't belong to the pathologic path and can induce serious side effects. Controlled drug release systems, such as microspheres, are being used as a solution for this problem. Microspheres can be made from natural polymers like chitosan and gelatin, which are widely used in pharmaceutical applications due to their biodegradable, biocompatible and nontoxic properties.

This work aimed to develop microspheres of chitosan and gelatin cross-linked with genipin loaded with 5-Fluorouracil, an antitumor drug. A water-in-oil emulsion method was chosen for the creation of these particles. Five sets were made where the weight ratio of chitosan and gelatin varied. Three of them were chosen to evaluate the effect of the different ratios on the size, shape and drug release profile: those made just with chitosan, those with a weight ratio of 1:1 of chitosan and gelatin, and a set with a weight ratio of 3:1 of chitosan and gelatin.

The three types of microsphere were observed in an optical microscope and its images were analysed using Image J software. This provided values for the projected area (from where the equivalent diameter was calculated), circularity and roundness.

The chitosan microspheres and those developed with a chitosan/gelatin ratio of 1:1 exhibited an equivalent diameter of 14 μm , while the microspheres developed with a chitosan/gelatin ratio of 3:1 exhibited a 6 μm equivalent diameter. The values obtained for the circularity and roundness of all the types of microspheres (close to 1) confirmed their spherical shape.

Microspheres loaded with the antitumor drug 5-Fluorouracil and immersed in PBS were used to evaluate the drug release profiles for each type of microspheres developed. The absorbance of the supernatant was measured by a UV/Visible spectrophotometer during twenty four hours, at different time intervals. The chitosan microspheres were able to incorporate about 18% of the drug weight expected, whereas the others showed an inclusion of 13% and 10% for the microspheres developed with a chitosan/gelatin ratio of 1:1 and a

ratio of 3:1, respectively. This demonstrates the drug losses during the process of making the microspheres.

The microspheres developed with a chitosan/gelatin ratio of 1:1 allowed the slowest release of the drug, having released 98% of the drug after eight hours, while the other ones allowed the release of the same amount of drug in only three hours.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
LISTA DE ACRÓNIMOS	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Âmbito e motivação.....	1
1.2 Objectivos	2
1.3 Organização do trabalho	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Métodos de preparação de microsferas.....	3
2.2 Quitosano	4
2.2.1 Derivados do quitosano.....	6
2.3 Gelatina.....	6
2.4 Genipin.....	7
2.4.1 Reacção de reticulação do genipin com os grupos amina do quitosano e da gelatina	8

2.5	Incorporação de fármacos anticancerígenos em microsferas de quitosano	10
2.6	5-Fluorouracil.....	14
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Reagentes.....	15
3.2	Métodos.....	16
3.2.1	Preparação de microsferas de quitosano e gelatina.....	16
3.2.2	Avaliação da morfologia das partículas	17
3.2.3	Preparação de microsferas de quitosano e gelatina com 5-Fluorouracil incorporado	21
3.2.4	Avaliação dos perfis de libertação controlada do fármaco	22
4.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	25
4.1	Determinação da morfologia das microsferas	25
4.1.1	Efeito da razão mássica quitosano/gelatina nas características morfológicas das partículas.....	26
4.1.2	Caracterização das microsferas por análise de imagem	29
4.2	Avaliação dos perfis de libertação do fármaco 5-Fluorouracil	39
5.	CONCLUSÃO	47
	BIBLIOGRAFIA	51
	ANEXO A.....	59
	ANEXO B.....	61
	ANEXO C.....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de derivados do quitosano e suas propriedades (Bodnar et al., 2005; Kumar et al., 2004).....	6
Tabela 2 - Revisão bibliográfica da incorporação de fármacos anticancerígenos em microsferas de quitosano	10
Tabela 2 (cont.) - Revisão bibliográfica da incorporação de fármacos anticancerígenos em microsferas de quitosano	11
Tabela 3 - Lista dos reagentes usados no trabalho experimental	15
Tabela 3 (cont.) - Lista dos reagentes usados no trabalho experimental	16
Tabela 4 - Parâmetros mantidos constantes na preparação das microsferas de quitosano e gelatina	16
Tabela 4 (cont.) - Parâmetros mantidos constantes na preparação das microsferas de quitosano e gelatina	17
Tabela 5 - Ensaio realizados durante a fase de preparação das microsferas.....	17
Tabela 6 - Ensaio realizados para a incorporação de 5-FU	21
Tabela 7 - Resultados obtidos através da análise com o <i>software Image J</i> de imagens das microsferas correspondentes aos diferentes ensaios	30
Tabela 8 - Valores do diâmetro médio equivalente, moda, mediana (d_{50}), d_{10} , e d_{90} para os diferentes ensaios	33
Tabela 9 - Valores médios de Circularidade e <i>Roundness</i> das microsferas obtidos através da análise de imagem pelo <i>software Image J</i>	35

Tabela 10 - Valores de <i>Theoretical Drug Loading</i> (TDL) para cada tipo de microsferas	39
Tabela 11 - Massa de 5-Fluorouracil esperada (mg) no interior das microsferas, tendo em conta os valores de TDL calculados anteriormente	40
Tabela 12 - Comparação dos valores mássicos obtidos ao longo do período de libertação com os esperados, para cada tipo de microsferas	42
Tabela A.1 - Preparação de soluções diluídas para obtenção da curva de calibração	59
Tabela B.1 - Dados de frequência numérica, frequência em % e frequência cumulativa em % para cada intervalo de diâmetro (em μm) – ensaio 1	61
Tabela B.2 - Dados de frequência numérica, frequência em % e frequência cumulativa em % para cada intervalo de diâmetro (em μm) – ensaio 3	62
Tabela B.3 - Dados de frequência numérica, frequência em % e frequência cumulativa em % para cada intervalo de diâmetro (em μm) – ensaio 4	63
Tabela C.1 - Dados determinados a partir dos valores de absorvância obtidos para as microsferas do ensaio I	64
Tabela C.2 - Dados determinados a partir dos valores de absorvância obtidos para as microsferas do ensaio II	65
Tabela C.3 - Dados determinados a partir dos valores de absorvância obtidos para as microsferas do ensaio III	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Unidade estrutural da quitina (Bansal et al., 2011)	5
Figura 2 - Estrutura química do quitosano (Bodnar et al., 2005).....	5
Figura 3 - Estrutura típica da gelatina	7
Figura 4 - Estrutura do genipin (Yoo, Kim, Kim, & Choi, 2011).....	8
Figura 5 - Mecanismo de reticulação dos polímeros por acção do genipin (Solorio et al., 2011).....	9
Figura 6 - Estrutura química do 5-Fluorouracil	14
Figura 7 - Diferentes passos para a manipulação da imagem para análise das partículas: a) Estabelecimento da escala a partir do comando <i>Set scale</i> ; b) Aumento do contraste entre as partículas e o meio; c) Binarização da imagem; d) Preenchimento das partículas com a ferramenta <i>Fill Holes</i> e eliminação da barra de escala; e) Separação das partículas com o comando <i>Watershed</i> ; f) Aplicação dos filtros relativamente à circularidade e à área mínima das partículas, assim como do comando <i>Exclude on edges</i>	20
Figura 8 - Imagem das microsferas que foram efectivamente contabilizadas pelo <i>software Image J</i> , com as suas fronteiras delineadas a vermelho	21
Figura 9 - Aspecto visual da emulsão a) antes de ocorrer a reacção de reticulação (coloração branca), e b) após ocorrência da reacção de reticulação entre a molécula de genipin e os grupos amina de quitosano e de gelatina (coloração azul)	26
Figura 10 - Microsferas de Cs (ensaio 1, Tabela 5) a) suspensas em parafina e b) ressuspensas em água com Tween 20	28
Figura 11 - Microsferas de Cs e Gel (1:1 – ensaio 3, Tabela 5) a) suspensas em parafina e b) suspensas em água com Tween 20	28

Figura 12 - Microsfemas de Cs e Gel (3:1 – ensaio 4, Tabela 5) a) suspensas em parafina e b) ressuspendidas em água com Tween 20	28
Figura 13 - Curva de distribuição de frequência para microsferas de quitosano (ensaio 1) ...	31
Figura 14 - Curva de distribuição de frequência para microsferas de quitosano (ensaio 3)....	31
Figura 15 - Curva de distribuição de frequência para microsferas de quitosano (ensaio 4)....	32
Figura 16 - Curvas de distribuição cumulativa (<i>undersize</i>) para microsferas de quitosano (ensaio 1) de quitosano gelatina 1:1 (ensaio 3) e quitosano e gelatina 3:1 (ensaio 4).....	33
Figura 17 - Curva de distribuição de frequência para a Circularidade de microsferas de quitosano (ensaio 1)	35
Figura 18 - Curva de distribuição de frequência para a Circularidade das microsferas de quitosano e gelatina na proporção 1:1 (ensaio 3).....	36
Figura 19 - Curva de distribuição de frequência para a Circularidade das microsferas de quitosano e gelatina na proporção 3:1 (ensaio 4)	36
Figura 20 - Curva de distribuição de frequência para a <i>Roundness</i> de microsferas de quitosano (ensaio 1)	37
Figura 21 - Curva de distribuição de frequência para a <i>Roundness</i> de microsferas de quitosano e gelatina na proporção 1:1 (ensaio 3)	38
Figura 22 - Curva de distribuição de frequência para a <i>Roundness</i> de microsferas de quitosano e gelatina na proporção 3:1 (ensaio 4).....	38
Figura 23 - Libertação mássica de 5-Fluorouracil nas primeiras 8 horas a partir de microsferas obtidas no ensaio I	41
Figura 24 - Libertação mássica de 5-Fluorouracil nas primeiras 8 horas a partir de microsferas obtidas no ensaio II.....	41
Figura 25 - Libertação mássica de 5-Fluorouracil nas primeiras 8 horas a partir de microsferas obtidas no ensaio III	42

Figura 26 - Liberação em termos percentuais de 5-Fluorouracil ao longo das 24 horas de liberação para os três ensaios efectuados 44

Figura A.1 - Curva de Calibração (Absorvância em função da Concentração da solução, em $\mu\text{g/mL}$) 60

LISTA DE ACRÓNIMOS

5-FU – 5-Fluorouracil

A - Absorvância

A_0 – Área do círculo

c – Concentração da solução analisada em mg/mL

Circ - Circularidade

Cs – Quitosano

D - Diâmetro

$D_{\text{máx}}$ - Diâmetro máximo da partícula

D_{min} - Diâmetro mínimo da partícula

Gel – Gelatina

$m_{\text{fármaco}}$ – Massa de fármaco adicionada em mg

$m_{\text{microsfersas}}$ – Massa das microsferas utilizada para a libertação de fármaco em mg

$m_{\text{polímero}}$ – Massa total de polímero adicionada em mg

MTF – Massa teórica de fármaco incorporada nas microsferas

P – Perímetro do círculo

PBS – *Phosphate buffered saline*

R – Raio do círculo

TDL - *Theoretical Drug Loading*

TMC - *N-Trimethylene Chloride Chitosan*

ϵ – Absorvância molar da substância

l - Distância a que a luz atravessa o corpo

1. INTRODUÇÃO

1.1 Âmbito e motivação

A maioria dos fármacos desenvolvidos, apesar dos longos e dispendiosos processos de investigação que envolvem a sua criação, não consegue alcançar o alvo a que se destina em quantidades viáveis, o que leva a que não produza resultados clínicos tão bons quanto o esperado. Isto acontece porque a maior parte do medicamento é distribuído por diversos tecidos ou órgãos que não fazem parte do caminho patológico, o que se poderá traduzir em efeitos secundários graves (Patel, et al., 2010). Uma das soluções encontradas para evitar este problema prende-se com a libertação do fármaco directamente no local de acção, com velocidade e concentração apropriadas. Para tal, é necessário encontrar um sistema susceptível de “carregar” o fármaco de forma eficaz. Os sistemas de libertação controlada de fármacos mais comuns baseiam-se no uso de microsferas poliméricas biodegradáveis, uma vez que estas não necessitam de cirurgia para a sua remoção do organismo (Peng, et al., 2012). A escolha do polímero a usar em tal situação é de extrema importância, pois vai influenciar a farmacocinética e a farmacodinâmica da substância activa. Entre os materiais mais utilizados nestes casos encontram-se os polímeros naturais, como por exemplo os polissacarídeos, que possuem propriedades físicas e biológicas vantajosas (Patel et al., 2010).

Nos últimos vinte anos tem-se assistido à publicação de vários estudos sobre o quitosano. Devido às suas propriedades favoráveis - tais como a biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade – este biopolímero polissacárido resultante da desacetilação da quitina pode ser usado em diversos sistemas de libertação controlada de fármacos sob a forma de micro ou nanopartículas (Bernkop-Schnürch et al., 2012).

A combinação do quitosano com outros polímeros, pode resultar em materiais com propriedades mais vantajosas para certas aplicações. No entanto, a utilidade destas misturas é sempre afectada pelo tipo de materiais utilizados, bem como pelas suas interações. Um dos polímeros mais adequados para combinar com o quitosano é a gelatina, proteína que resulta da hidrólise do colagénio existente na pele e nos ossos dos animais. Sendo um polímero natural, é também biodegradável e biocompatível (Zhou et al., 2012).

1. INTRODUÇÃO

Se inúmeros artigos têm focado a preparação de microsferas de quitosano ou apenas de gelatina, deve sublinhar-se que a mistura dos dois ainda não foi amplamente estudada devido à elevada viscosidade do quitosano e à sua pouca solubilidade em água (Zhou et al., 2012).

1.2 Objectivos

A presente investigação propõe-se abordar o desenvolvimento de microesferas de quitosano e gelatina reticuladas com genipin para aplicação em sistemas de libertação controlada de um fármaco anticancerígeno, o 5-Fluorouracil. O método utilizado para a sua preparação consiste numa emulsão de água-em-óleo onde se varia a relação entre as concentrações mássicas de quitosano e gelatina. O efeito desta razão quitosano/gelatina na morfologia, no tamanho e nos perfis de libertação de fármaco a partir das microsferas obtidas é igualmente abordado.

1.3 Organização do trabalho

A Dissertação estrutura-se em torno de cinco Capítulos principais. No segundo, é desenvolvida a revisão bibliográfica, na qual são apresentados os fundamentos teóricos mais relevantes e é analisado o estado da arte. Caracterizam-se os polímeros, quitosano e gelatina, explica-se a importância da sua reticulação e do reticulante utilizado (genipin) e enumeram-se os diferentes processos de produção de micropartículas já existentes e experimentados. Para além disso, faz-se referência a algumas tentativas de incorporação de diferentes fármacos em micropartículas de quitosano e gelatina, expondo os resultados obtidos.

No terceiro Capítulo são apresentados os materiais utilizados e o procedimento empregue no desenvolvimento das micropartículas de quitosano e gelatina, assim como na sua posterior caracterização.

O quarto Capítulo compreende a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

No último Capítulo são descritas as principais conclusões e procede-se a uma avaliação dos resultados, articulando-os com os objectivos inicialmente propostos. Tecem-se também algumas considerações no que se refere à continuidade do projecto em desenvolvimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O principal objectivo do presente trabalho é a preparação e caracterização de microsferas com diferentes razões mássicas de quitosano e gelatina e reticuladas com genipin. Nesta secção faz-se a revisão bibliográfica do método utilizado (emulsão água-em-óleo) e dos motivos da sua escolha, das características dos polímeros quitosano e gelatina e das vantagens da utilização do reticulante genipin assim como da reacção da sua molécula com os grupos amina dos polímeros utilizados. De seguida, é também abordado o estado da arte a partir da análise de outros trabalhos já realizados, nomeadamente, aqueles que se debruçam sobre a incorporação de fármacos anticancerígenos em microsferas de quitosano e gelatina recorrendo a métodos de emulsão água-em-óleo. Por último é apresentada a estrutura e as características do fármaco modelo escolhido para ser incorporado nas microsferas preparadas, o 5-Fluourouracil.

2.1 Métodos de preparação de microsferas

A terapia de libertação controlada de fármacos é muitas vezes posta em prática através do uso de microsferas. Estas permitem controlar a libertação do fármaco em condições específicas, adequadas ao local e tipo de tratamento, variando a dose da medicação e a cinética da libertação de acordo com os objectivos desejados. Apesar do seu tamanho pequeno, as microsferas possuem uma relação área de superfície/volume grande, podendo até ser utilizadas para a libertação de fármacos insolúveis e hidrofóbicos. Providenciam um efeito terapêutico constante e prolongado e podem ser administradas por via injectável no organismo devido à sua forma esférica e reduzidas dimensões. Além disso, ao permitirem a melhor utilização do fármaco reduzem a incidência ou a intensidade dos efeitos secundários.

Muitos são os métodos já experimentados para a preparação destas partículas, extensamente revistos por Sinha et al. (2004), Nair et al. (2009), Sahil et al. (2011) e Islam et al. (2012), como por exemplo a gelificação ionotrópica, a coacervação complexa, o método de emulsão, a técnica de *spray-drying*, entre outros.

O método utilizado neste trabalho foi o de emulsão. Este consiste em juntar uma solução de polímero (fase dispersa) a uma fase não solvente (fase contínua) que contem um

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

surfactante e que, após homogeneização por agitação magnética, resulta numa emulsão. O solvente utilizado na fase dispersa deverá ser ligeiramente solúvel na fase contínua. Depois de emulsionado, este solvente passa, por difusão, para a fase contínua. Este fenómeno faz com que as gotas que constituem a fase dispersa se tornem ricas em polímero. Ao longo do tempo, estas “solidificam” dando origem a partículas. As microsferas formadas são, então, filtradas, lavadas com um solvente adequado e secas (Kim & Pack, 2006).

Devido aos polímeros utilizados na presente Dissertação, é necessário associar a este método a reticulação química dos mesmos, utilizando como agente reticulante o genipin, que é adicionado à emulsão após a sua homogeneização. Este procedimento irá permitir a obtenção de partículas com uma boa estabilidade mecânica.

O método de emulsão com reticulação química tem a vantagem de tornar fácil o controlo do tamanho das partículas, de apresentar uma grande eficiência relativamente à incorporação do fármaco, e de promover uma libertação controlada com biodisponibilidade melhorada.

As microsferas utilizadas em libertação controlada de fármacos são usualmente de base polimérica. Os polímeros são macromoléculas constituídas por diversas unidades de repetição, vulgarmente designadas por monómeros. Existem duas categorias principais deste tipo de materiais: os sintéticos e os naturais. Estes últimos, como as proteínas e os carboidratos, têm sido cada vez mais utilizados na indústria farmacêutica devido às suas propriedades. Como notam Bansal et al. (2011) são, na sua generalidade, quimicamente inertes, biodegradáveis, ecológicos, não tóxicos e mais baratos, para além de existirem em grande quantidade. Posto isto, os polímeros escolhidos para integrarem a constituição das microsferas desenvolvidas neste trabalho foram o quitosano e a gelatina, que são descritos nas próximas secções.

2.2 Quitosano

O quitosano é um biopolímero derivado de um polímero natural, a quitina (Figura 1), o mais abundante na natureza a seguir à celulose. A quitina existe no exoesqueleto de crustáceos como o caraquejo, o camarão ou a lagosta, bem como na parede celular de alguns fungos, sendo um homopolímero constituído por unidades de *N*-acetil-glucosamina (Sinha et al., 2004).

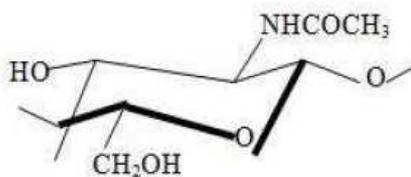


Figura 1 - Unidade estrutural da quitina (Bansal et al., 2011)

O quitosano (Figura 2) resulta da desacetilação alcalina da quitina, sendo constituído por unidades de glucosamina e de *N*-acetil-glucosamina em quantidades variáveis de acordo com o grau de desacetilação. Cada unidade de repetição desacetilada possui um grupo amina primário reactivo. Este biopolímero é biodegradável, biocompatível, não tóxico e com outras propriedades biológicas interessantes e de grande utilidade para a indústria farmacêutica. Num contexto comercial, é possível encontrar o quitosano com peso molecular entre os 38000 e os 200000 Daltons e com grau de desacetilação entre os 66% e os 95%. Tais propriedades, juntamente com a protonação dos grupos amina e o pH, influenciam a sua solubilidade (Bansal et al., 2011). Segundo Bodnar et al. (2005) esta pode ser um factor limitador na aplicação deste biopolímero, uma vez que o quitosano é pouco solúvel em meio aquoso em condições alcalinas e neutras, assim como na maioria dos solventes orgânicos. No entanto, é bastante solúvel em soluções diluídas da maior parte dos ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, o ácido tartárico e o ácido acético (pH < 6,5) e solúvel com algumas limitações em ácidos inorgânicos (Bansal et al., 2011).

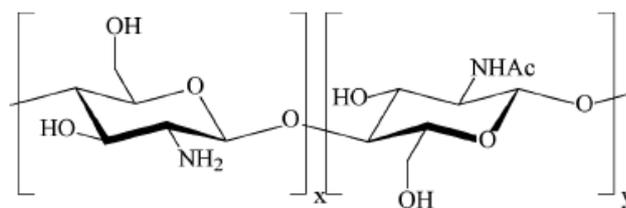


Figura 2 - Estrutura química do quitosano (Bodnar et al., 2005)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 Derivados do quitosano

Algumas das aplicações do quitosano dependem da alteração da sua estrutura básica para obter polímeros com diferentes propriedades. Assim sendo, existem diversos tipos de derivados deste biopolímero, conforme se enuncia na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de derivados do quitosano e suas propriedades (Bodnar et al., 2005; Kumar et al., 2004)

Derivados do quitosano	Descrição/Propriedades
<i>N-Trimethylene Chloride Chitosan</i> (TMC)	<ul style="list-style-type: none">• Derivado quaternário do quitosano;• Maior solubilidade em meio aquoso• Maior permeabilidade intestinal• Maior absorção numa maior gama de valores de pH
Ésteres de quitosano	<ul style="list-style-type: none">• Diferentes perfis de solubilidade• Insolúveis em condições ácidas• Providenciam uma libertação controlada em meio básico
N-Carboximetil quitosano	<ul style="list-style-type: none">• Ingrediente funcional de cremes hidratantes cosméticos• Provoca um efeito duradouro de hidratação na pele• Ajuda a manter a suavidade da pele e protege-a de condições ambientais adversas
Poliuretanos de base quitosano	<ul style="list-style-type: none">• Usados como suporte de enzimas• Materiais opacos e flexíveis• Insolúveis em solventes aquosos e orgânicos• Cristalinos

2.3 Gelatina

A gelatina (Figura 3) resulta da hidrólise do colagénio do tipo I, a proteína mais abundante no organismo dos mamíferos e que pode ser encontrada nos ossos, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos e discos intervertebrais.

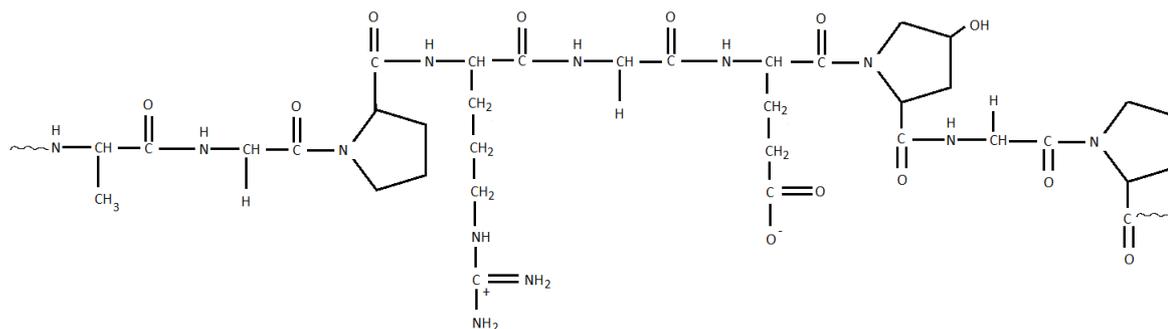


Figura 3 - Estrutura típica da gelatina

A vantagem do seu uso prende-se com o facto de se poder ligar, em determinados locais, a células, para além de poder ser degradada enzimaticamente sem produção de subprodutos tóxicos, isto é, ser biodegradável (Solorio et al., 2011). Apesar de uma das suas principais características ser a solubilidade em água, o facto de esta ocorrer a temperatura fisiológica (37°C) obriga a que a sua estrutura tenha de ser alterada por reticulação para poder ser usada na formulação de microsferas (Lau et al., 2010). Entre as suas inúmeras propriedades encontram-se a biocompatibilidade, o facto de não ser antigénica, a plasticidade e a capacidade de aderência, o que a torna extremamente vantajosa para aplicações biomédicas e farmacêuticas (Zhou et al., 2012).

Neste trabalho, a gelatina foi escolhida para integrar as microsferas de quitosano por possuir grupos carboxílicos na sua constituição, o que faz com que forme pontes de hidrogénio com o quitosano, tornando viável a sua mistura (Zhou et al., 2012), e por apresentar grupos amina primários derivados do aminoácido lisina presente na sua estrutura, o que lhe permite sofrer reticulação por reacção com o genipin (Djagny et al., 2001).

2.4 Genipin

Para que o quitosano e a gelatina incorporem eficazmente o fármaco e apresentem perfis de libertação desejáveis, é necessário promover a sua reticulação. O agente reticulante mais usado até hoje, o glutaraldeído, mostrou-se citotóxico para certas concentrações (Lau et al., 2010), daí que o genipin tenha começado a ser explorado como potencial alternativa. Este é dez mil vezes menos citotóxico que o glutaraldeído. Para além disso, alguns estudos (e.g. Harris et al., 2008; Yuan et al., 2007) demonstram que microsferas de quitosano reticuladas

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

com genipin apresentam maior biocompatibilidade e uma velocidade de degradação menor. A sua aplicação origina estruturas quimicamente reticuladas estáveis.

O genipin (Figura 3) é isolado do geniposide dos frutos da *Gardenia jasminoides Ellis*, um componente importante da medicina tradicional chinesa por possuir actividades bioactivas benignas. Quando reage com aminoácidos e proteínas, esta substância, embora incolor, dá origem a pigmentos azuis que são usados na indústria alimentar. O mesmo acontece ao ligar-se covalentemente ao quitosano e à gelatina, sendo a coloração azul um sinal de que ocorreu uma reacção de reticulação entre a molécula e os grupos amina dos polímeros (Chen et al., 2005).

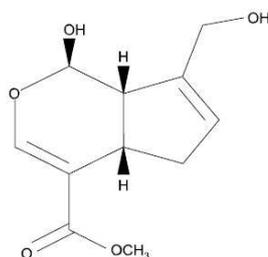


Figura 4 - Estrutura do genipin (Yoo, Kim, Kim, & Choi, 2011)

2.4.1 Reacção de reticulação do genipin com os grupos amina do quitosano e da gelatina

A reacção de reticulação da molécula de genipin com os grupos amina do quitosano e da gelatina ocorre em duas fases. Na primeira, a mais rápida, dá-se o ataque nucleofílico ao átomo de carbono C3 do genipin por um grupo amina primário, levando à formação de um composto heterocíclico de genipin que se liga ao monómero glucosamina do quitosano (o único que possui grupos amina primários) ou aos grupos amina da gelatina (Figura 5, reacção 1). A segunda reacção, mais lenta, compreende a substituição nucleofílica do grupo éster do genipin, havendo a libertação de metanol e a formação de uma ligação amida secundária com o quitosano ou a gelatina (Figura 5, reacção 2) (Butler, Ng, & Pudney, 2003). Trata-se de um processo de reticulação irreversível devido à natureza covalente das ligações formadas.

A cor azul resulta da polimerização, induzida pelo radical oxigénio do genipin, que ocorre assim que o seu composto heterocíclico se liga aos polímeros na presença de ar (Butler et al., 2003).

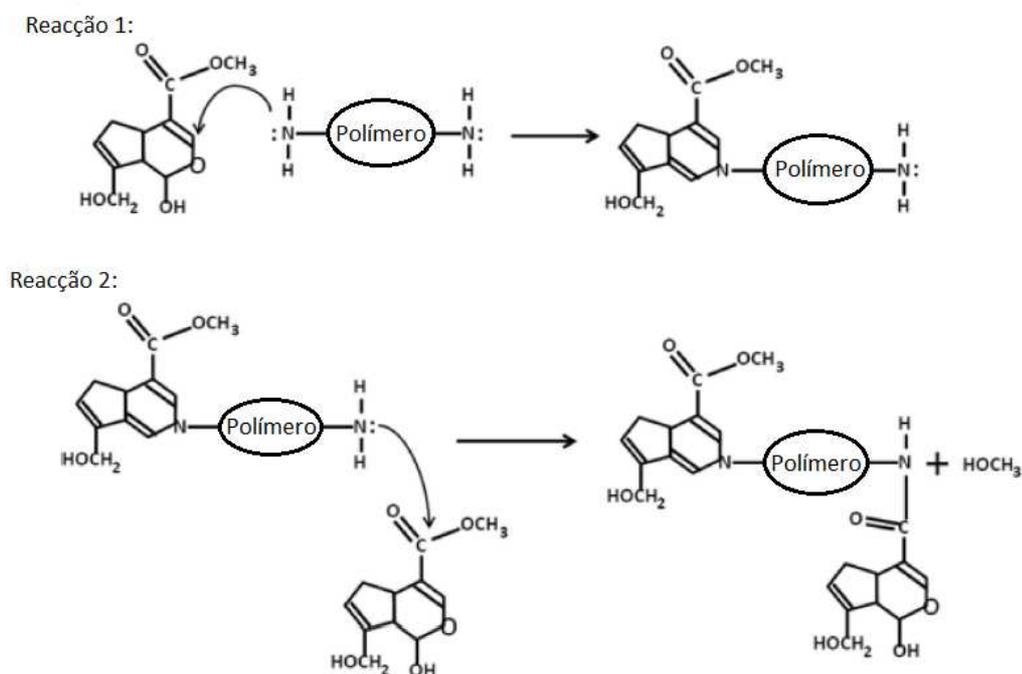


Figura 5 - Mecanismo de reticulação dos polímeros por acção do genipin (Solorio et al., 2011)

A reacção de reticulação é, como já foi referido, bastante importante na formulação das microsferas e influencia a incorporação e a libertação do fármaco escolhido, cuja análise é um dos principais objectivos deste trabalho. Posto isto, na secção seguinte é feita a análise do estado da arte, que visa a avaliação do que já foi realizado nesta área e que é de especial interesse para o desenvolvimento deste projecto.

2.5 Incorporação de fármacos anticancerígenos em microsferas de quitosano

A Tabela 2 sintetiza os principais trabalhos encontrados na literatura sobre a incorporação de fármacos anticancerígenos em microsferas de quitosano, utilizando o método de emulsão água-em-óleo. Convém salientar que não pretende ser uma avaliação exaustiva, mas sim enumerar os estudos mais relevantes, tendo em conta os objectivos da presente Dissertação.

Tabela 2 - Revisão bibliográfica da incorporação de fármacos anticancerígenos em microsferas de quitosano

Ref.	Microsferas	Reticulante	Método	Fármaco incorporado	Observações
(Blanco, Gómez, Olmo, Muñiz, & Teijón, 2000)	Cs (85% desacetilado)	Glutaraldeído	Emulsão com reticulação química	Cytarabine	Eficiência da incorporação do fármaco: 70,6%. Libertação total do fármaco ao fim de 48 horas. Quando embebidas num filme de PLG, formando um sistema de co-matriz, a libertação total do fármaco dá-se em 94,5 horas. A incorporação do filme em ratos demonstrou um processo de degradação lento.
(Dubey & Parikh, 2004)	Cs	Glutaraldeído	Emulsão água em óleo	5-FU e Methoxantrone	Medição do tamanho médio das partículas, da sua morfologia, da distribuição de tamanhos, percentagem de fármaco incorporado, eficiência da sua incorporação e sua libertação.
(Hassan, Parish, & Gallo, 1992)	Microsferas magnéticas de Cs	Glutaraldeído	Reticulação antes da emulsão e evaporação do solvente	Oxantrazole	Estudo de procedimentos de optimização do <i>desing</i> e estatísticos para avaliar os parâmetros necessários à formulação óptima. A percentagem máxima de oxantrazole incorporado conseguida foi de 3% (m/m).

Cs –quitosano; Gel – gelatina; 5-FU – 5-Fluorouracil

Tabela 2 (continuação) - Revisão bibliográfica da incorporação de fármacos anticancerígenos em microsferas de quitosano

Ref.	Microsferas	Reticulante	Método	Fármaco incorporado	Observações
(Jameela, Latha, Subramoni am, & Jayakrishnan, 1996)	Cs (74% desacetilado)	Glutaraldeído	Emulsão com reticulação química	Mitoxantrone	Avaliação da actividade tumoral em ratos, monitorizando o tempo de sobrevivência do animal e a mudança do seu peso corporal ao longo de 60 dias. As microsferas demonstraram potencial para a libertação controlada deste fármaco, minimizando a sua toxicidade e maximizando o seu efeito terapêutico.
(Jameela & Jayakrishnan, 1995)	Cs (74% desacetilado)	Glutaraldeído	Emulsão com reticulação química	Mitoxantrone	Estudo da libertação do fármaco <i>in vitro</i> em tampão fosfato durante 4 semanas a 27°C. Esta é bastante influenciada pelo grau de reticulação das microsferas. Implantação de microsferas placebo em músculo-esquelético de ratos para avaliar a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade.
(Wang, Sato, Adachi, & Horikoshi, 1996)	Cs	Glutaraldeído	Emulsão com reticulação química	Cisplatina	Optimização da formulação de microsferas de quitosano para incorporação da cisplatina através da análise de funções estatísticas. Diâmetro médio das partículas: 78,4 um Quantidade de fármaco no interior das partículas: 20,8% (m/m) Eficiência da incorporação do fármaco: 77,5%
(Zhou et al., 2013)	Cs e Gel (5:1 razão mássica)	Glutaraldeído	Emulsão água em óleo com evaporação do solvente	5-FU	Estudo da influência da concentração de surfactante, agente reticulante e velocidade de agitação no tamanho das partículas e na eficiência de incorporação do fármaco.

Cs –quitosano; Gel – gelatina; 5-FU – 5-Fluorouracil

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos estudos efectuados ao longo dos anos é notória a preocupação de avaliar a influência de diversos parâmetros na morfologia e desempenho das microsferas de quitosano para os objectivos pretendidos. Vários foram os autores que utilizaram como método de produção a emulsão água-em-óleo (com ou sem evaporação de solvente ou outras possíveis alterações), utilizando como reticulante o glutaraldeído. Embora tenha ficado demonstrado nos artigos referenciados na Tabela 2 que se trata de um agente de reticulação eficaz, possibilitando a produção de microsferas, também são vários os autores, como Butler et al. (2003) e Yoo et al. (2011), que referenciam a sua toxicidade e avaliam o genipin, um reticulante natural, como uma alternativa viável.

A maior parte dos estudos efectuados centrados em fármacos anticancerígenos desenvolve uma avaliação de alguns dos parâmetros chave que afectam o desempenho das microsferas. Segundo Hassan et al. (1992), a difícil incorporação de oxantrozole em microsferas biodegradáveis deve-se à pouca solubilidade em água do fármaco e à porosidade das partículas. Este efeito pode ser contornado pela reticulação das microsferas, o que provoca o aumento da sua densidade e limita a expansão da cadeia polimérica por hidratação, minimizando a difusão da água para o interior da matriz e a difusão do fármaco para a superfície da mesma. Resumindo, os autores supracitados afirmam que quanto maior for grau de reticulação das microsferas, maior será a incorporação de fármaco, mas apenas até um certo limite. A concentração de agente reticulante e a concentração de fármaco também influenciam esse parâmetro. Esta ideia é reforçada por Wang et al. (1996) que, recorrendo a ferramentas estatísticas, avaliam factores como a concentração de quitosano, a razão entre o volume de água (fase dispersa) e de óleo (fase contínua), a velocidade de agitação, o tipo de fase de óleo, o tipo de quitosano e o tempo de estabilização. Com o objectivo de encontrar uma formulação óptima para a preparação das microsferas, o estudo conclui que quanto maior for a concentração de quitosano, menor será a distribuição do tamanho das partículas e maior a quantidade de fármaco incorporado, bem como a eficiência dessa mesma incorporação.

Dubey et al. (2004) defendem que o grau de reticulação afecta o tamanho das partículas, assim como a velocidade da agitação a que estas estão sujeitas durante a sua formação. Uma velocidade de agitação mais elevada origina microsferas mais pequenas. Isto porque a agitação produz energia para a dispersão da solução de quitosano em gotas, e maior energia provoca a diminuição do tamanho das partículas.

Quanto mais pequenas forem as microsferas, mais rapidamente se dará a libertação do fármaco retido no seu interior, pois menor é o caminho difusional e maior é a área de superfície em contacto com o meio de dissolução. Jameela et al. (1995) estudam a libertação *in vitro* de microsferas de quitosano carregadas com mitoxantrone, demonstrando também que o grau de reticulação e a quantidade de fármaco incorporado influenciam os perfis de libertação. Observa-se, mais concretamente, a libertação de apenas 25% da massa de fármaco em 36 dias para microsferas com grande densidade de reticulação.

Num estudo mais recente, Zhou et al. (2013) avaliam as propriedades de microsferas de gelatina e quitosano carregadas com 5-Fluorouracil, nomeadamente a influência da concentração de Span-80, bem como da velocidade de agitação e concentração de agente reticulante no tamanho das partículas e na eficiência de encapsulação e de incorporação do fármaco. A investigação confirma que velocidades de agitação elevadas provocam a diminuição do tamanho das partículas, mas conclui que também estão ligadas ao aumento da eficiência de encapsulação e de incorporação do fármaco. No entanto, denota alguma aglomeração das partículas a velocidades de agitação superiores a 600 rpm. Durante o processo de emulsão, o Span-80 é utilizado como surfactante, verificando-se que quanto maior for a sua concentração, menor será o tamanho das partículas formadas devido à diminuição da tensão interfacial entre as gotas aquosas e o meio de suspensão orgânico. A principal função do surfactante é a de estabilização das esferas, formando um filme fino à sua volta e, prevenindo, assim, a sua coalescência. O aumento da concentração de Span-80 até um certo limite provoca o aumento da eficiência da encapsulação e da incorporação de fármaco. Por último, o estudo conclui que até determinada concentração de reticulante, o seu aumento origina uma maior eficiência de encapsulação e de incorporação do fármaco, começando depois a decrescer. Isto porque quanto maior for a densidade de reticulação, menos elásticas serão as cadeias poliméricas, podendo restringir a penetração do fármaco para o interior das microsferas.

Resumindo, os estudos referenciados demonstram o efeito de alguns parâmetros e o modo como estes afectam a eficiência das microsferas de quitosano na libertação de fármacos anticancerígenos, servindo de base para o método de emulsão a utilizar na preparação das micropartículas.

No entanto, este tipo de microsferas não serve apenas para a incorporação destes fármacos. Trabalhos mais recentes investigam a possibilidade de libertação de muitas outras

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

moléculas através deste tipo de partículas de quitosano e gelatina, tais como: proteínas (Yuan et al., 2007 e Karnchanajindanun et al., 2011); factores de crescimento (Solorio et al., 2011 e Skop et al., 2013); analgésicos (Harris et al., 2008); antibióticos (Zhu et al., 2012), entre outros.

2.65-Fluorouracil

Uma das formas de caracterizar as microsferas de quitosano e gelatina desenvolvidas é através da avaliação e comparação dos seus perfis de libertação de um fármaco. Assim sendo, para o presente trabalho, foi escolhido como fármaco modelo o 5-Fluorouracil (Figura 6), que foi incorporado nas micropartículas estudadas. Este é um fármaco anti tumoral utilizado no tratamento clínico de cancros sólidos, tais como o cancro gastrointestinal, pancreático e do fígado. Como é metabolizado rapidamente pelo organismo, é necessário mantê-lo sempre em elevadas concentrações de modo a obter o efeito terapêutico desejado, o que provoca graves efeitos tóxicos (Zhou et al., 2013), potencialmente evitados através da sua incorporação em sistemas de libertação controlada.

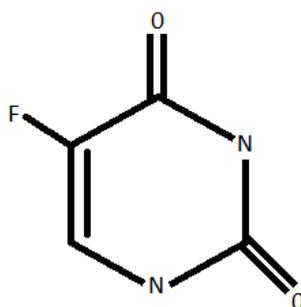


Figura 6 - Estrutura química do 5-Fluorouracil

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Um dos objectivos do presente trabalho é, como foi referido, a preparação das microsferas de quitosano e gelatina reticuladas com genipin através do método de emulsão água-em-óleo. Este processo foi escolhido por se apresentar vantajoso no controlo do tamanho das partículas, por permitir alcançar uma grande eficiência na incorporação do fármaco e por promover uma libertação controlada com biodisponibilidade melhorada (Islam et al., 2012). Para além disso, também se pretende caracterizar as microsferas obtidas, pelo que são utilizadas técnicas para avaliar a sua morfologia e os perfis de libertação do fármaco 5-Fluorouracil. Assim sendo, nesta secção, são listados os reagentes necessários nas diferentes etapas do processo de preparação e caracterização das partículas e, é feita a descrição dos procedimentos efectuados, assim como dos equipamentos utilizados e dos parâmetros avaliados.

3.1 Reagentes

Tabela 3 - Lista dos reagentes usados no trabalho experimental

Categoria	Descrição	CAS	Marca
Polímero	Quitosano proveniente da carapaça de caranguejo, 85% desacetilado	9012-7-4	Aldrich
	Gelatina de pele de porco, tipo A	9000-70-8	Sigma-Aldrich
Surfactante	Span 80	1338-43-8	Sigma
	Tween 20	9005-64-5	Sigma-Aldrich
Solvente	Éter de petróleo 40-60°C	64742-49-0	Fisher Chemical
	Ácido acético glacial, 96%	64-19-7	Sigma-Aldrich
Reticulante	Genipin	-	Challenge Biproducts Co.
Fármaco	5-Fluorouracil, 99%	51-21-8	Aldrich
Outros	Pastilhas de PBS	-	Sigma-Aldrich

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3 (cont.) - Lista dos reagentes usados no trabalho experimental

Categoria	Descrição	CAS	Marca
Outros	Parafina líquida	8012-95-1	Vencilab
	Água destilada	-	-

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de microsferas de quitosano e gelatina

Foram colocados 50 mL de parafina líquida e 500 mg de Span 80 num copo num banho de água a 40°C, com agitação magnética de 600 rpm. Após homogeneização, foram adicionadas gota-a-gota as quantidades definidas das soluções de quitosano em ácido acético e de gelatina em água, previamente misturadas e à mesma temperatura. A mistura foi deixada com a mesma agitação durante 20 minutos. Posteriormente foram adicionados 0,5 mL de solução alcoólica de reticulante, genipin, gota-a-gota. A reação foi deixada prosseguir durante 5 horas.

Ao fim desse tempo a emulsão foi retirada do banho e colocada em gelo durante 20 minutos. Depois desse período, as partículas foram deixadas a sedimentar à temperatura ambiente durante algumas horas. Após terem sedimentado, o excesso de parafina foi retirado por decantação e pela lavagem com éter de petróleo, na *hotte*, a qual se repetiu 3 vezes. Posteriormente, deixou-se evaporar o solvente à temperatura ambiente. Por fim, de modo a obter as partículas bem separadas, estas foram ressuspensas em água com uma gota de Tween 20.

Na Tabela 4 encontra-se a lista de parâmetros que não foram alterados nos diversos ensaios, enquanto a Tabela 5 resume as diferenças entre eles, nomeadamente a razão entre a massa de quitosano e gelatina usadas.

Tabela 4 - Parâmetros mantidos constantes na preparação das microsferas de quitosano e gelatina

Velocidade de agitação (rpm)	600
Temperatura (°C)	40

Tabela 4 (cont.) - Parâmetros mantidos constantes na preparação das microsferas de quitosano e gelatina

Concentração da solução de gelatina	5% (m/v) em água destilada
Concentração da solução de genipin	0,72% (m/v) em álcool a 70%
Duração da reacção (h)	5
Concentração de surfactante na fase orgânica	1% (m/v)
Concentração da solução de quitosano	1% (m/v) em ácido acético

Tabela 5 - Ensaios realizados durante a fase de preparação das microsferas

Ensaio	Razão mássica Cs/Gel (m/m)	Volume de solução de Cs (mL)	Volume de solução de Gel (mL)
1	1:0	5	-
2	0:1	-	5
3	1:1	4,2	0,8
4	3:1	4,7	0,3
5	1:3	3	2

Cs – quitosano; Gel - gelatina

Para uma melhor análise dos resultados, os ensaios 1, 3 e 4 referidos na Tabela 5 foram repetidos.

3.2.2 Avaliação da morfologia das partículas

Para avaliar o tamanho das partículas, estas são observadas ao microscópio óptico *Olympus BH2* com o *software Soft Imaging System GmbH* que permite a captura para computador das imagens observadas.

Foram retirados pequenos volumes de amostras e depositados em lâminas de vidro, para observação ao microscópio óptico, em três fases do processo de preparação das microsferas: no final dos 20 minutos em gelo (ainda suspensas em parafina), depois de lavadas com éter de petróleo, e após a sua suspensão em água com Tween 20. Em todos os

3. MATERIAIS E MÉTODOS

casos foram obtidas fotografias, com as diferentes ampliações utilizadas. No entanto, apenas para as últimas (microsféricas suspensas em água com Tween 20) se realizou uma análise com a ajuda do *software* para computador *ImageJ*.

Os parâmetros avaliados com esta ferramenta foram a área projectada média das partículas, (equação 1), o diâmetro médio equivalente (equação 2), a circularidade (equação 3), e a *roundness* (equação 4). Nestas equações A_O representa a área projectada do círculo, R o raio equivalente, D o diâmetro e P o perímetro.

$$A_O = \pi R^2 \quad (1)$$

$$D = 2 \times R \quad (2)$$

A partir da área projectada da partícula (equação 1), é possível obter o seu diâmetro equivalente (equação 2). Este corresponde ao diâmetro de uma esfera com a mesma área projectada da partícula em análise.

$$Circ = \frac{4\pi A_O}{P^2} \quad (3)$$

A circularidade (equação 3) fornece informação acerca da forma da partícula. Valores próximos de 1 significam que esta se aproxima do círculo, enquanto valores cada vez menores e próximos de 0 são indicativos de formas alongadas.

$$Roundness = \frac{D_{min}}{D_{máx}} \quad (4)$$

A *roundness* (equação 4) avalia o distanciamento da forma de elipse através da razão entre o diâmetro máximo e o diâmetro mínimo da partícula analisada. Valores próximos de 1 são indicativos de forma circular, devido à semelhança dos valores de diâmetro obtidos, enquanto valores próximos de 0 indicam formas cada vez mais próximas da elíptica.

O *software Image J* permite a análise das imagens recorrendo a diversas ferramentas de grande utilidade. Os procedimentos para a análise estão demonstrados na Figura 4 e são descritos em seguida.

Em primeiro lugar, foi definida a escala da imagem. Embora, como é sabido, o *software* analise a imagem em *pixel*, é possível fazer a sua conversão para *mícron*, através da opção *Set Scale* (Figura 4 a)). Isto acontece porque as imagens foram adquiridas com uma barra de escala cujo comprimento corresponde a um certo número de *pixels*. Assim sendo, nas fotografias analisadas, 1 *pixel* equivale a 0,647 μm . Este comando tem a vantagem de permitir a obtenção dos resultados nas unidades pretendidas, neste caso, em *mícron*.

De seguida, foi ajustado o contraste da imagem, permitindo uma melhor distinção entre as partículas e o fundo (Figura 4 b)), e procedeu-se à sua binarização, que consistiu em alterar a sua coloração para preto (partículas) e branco (fundo). Depois, procedeu-se à eliminação da barra de escala através da sua selecção e utilização da ferramenta *Clear* (Figura 4, c)). Devido à transparência e reflectividade das partículas, nem todas apresentaram um preenchimento completo, pelo que foi necessário recorrer à ferramenta *Fill Holes* para eliminar esse defeito (Figura 4 d)).

Depois da binarização, foi possível observar algumas anomalias na imagem, que tiveram de ser eliminadas antes da obtenção dos parâmetros desejados, para evitar a sua contabilização. Uma das mais comuns foi o facto de o *software* não conseguir distinguir duas ou mais partículas por estas se encontrarem juntas. Assim, através da utilização da ferramenta *Watershed*, o *software* permitiu a detecção automática destes casos e efectuou a sua separação (Figura 4 e)).

Através da opção *Exclude on edges* garantiu-se, também, que objectos cuja área total não se encontre no interior da imagem não fossem contabilizados.

Por último foram aplicados dois filtros. Estes permitiram evitar a contagem de partículas de formas e tamanhos não desejados, como se verifica na Figura 5, ao estabelecer o valor mínimo de circularidade pretendido e o valor mínimo de área contabilizado. Neste trabalho, foi imposta uma circularidade superior a 0,8 para todos os tipos de microsferas.

Depois de efectuados alguns estudos preliminares, decidiu-se contabilizar apenas as partículas com uma área superior a $12 \mu\text{m}^2$, para as microsferas 1, que corresponde a um diâmetro de aproximadamente $4 \mu\text{m}$; uma área superior a $25 \mu\text{m}^2$ para as microsferas 3, que corresponde a um diâmetro de aproximadamente, $5 \mu\text{m}$; e uma área superior a $1 \mu\text{m}^2$ para as microsferas 4, que corresponde a um diâmetro de aproximadamente, $1,3 \mu\text{m}$ (Figura 4 f)).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

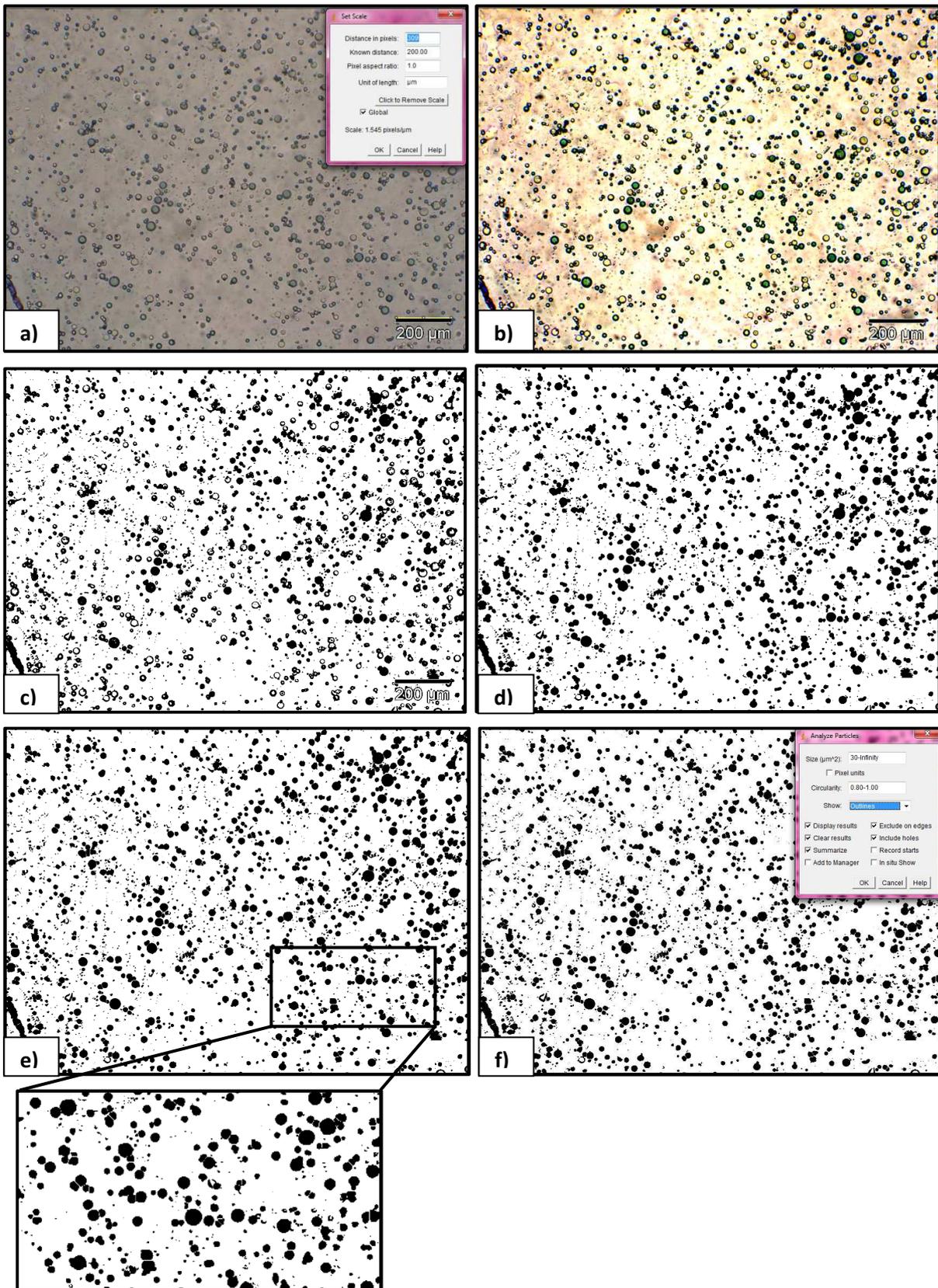


Figura 7 – Diferentes passos para a manipulação da imagem para análise das partículas: a) Estabelecimento da escala a partir do comando *Set scale*; b) Aumento do contraste entre as partículas e o meio; c) Binarização da imagem; d) Preenchimento das partículas com a ferramenta *Fill Holes* e eliminação da barra de escala; e) Separação das partículas com o comando *Watershed*; f) Aplicação dos filtros relativamente à circularidade e à área mínima das partículas, assim como do comando *Exclude on edges*.

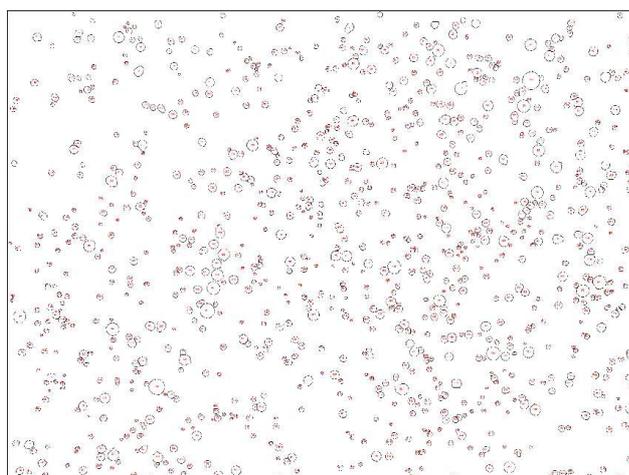


Figura 8 – Imagem das microsferas que foram efectivamente contabilizadas pelo *software Image J*, com as suas fronteiras delineadas a vermelho

A análise efectuada pelo *software* permitiu obter os valores de área, circularidade, *roundness* pretendidos para cada ensaio.

3.2.3 Preparação de microsferas de quitosano e gelatina com 5-Fluorouracil incorporado

O processo de preparação deste tipo de microsferas foi em tudo idêntico ao descrito na secção 3.2.1. A única diferença residiu na adição de 5 mg de fármaco (sempre o mesmo para cada ensaio) à mistura das soluções de quitosano e gelatina, que foi adicionada gota-a-gota à fase orgânica de parafina e Span 80 a 40°C e em agitação magnética (Tabela 6). Os restantes passos mantiveram-se inalterados.

Tabela 6 - Ensaio realizados para a incorporação de 5-FU

Ensaio	Razão mássica Cs/Gel (m/m)	Massa de 5-FU (mg)
I	1:0	5
II	1:1	5
III	3:1	5

Cs – quitosano; Gel – gelatina; 5-FU – 5-Fluorouracil

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.4 Avaliação dos perfis de libertação controlada do fármaco

As partículas provenientes dos ensaios I, II e III referidos na Tabela 6 foram bem secas na estufa a 40°C e pesadas. Depois, cada tipo de microsferas foi colocado num tubo de plástico, que foi cheio com 10 mL de solução tampão de PBS (pH = 7). Os três tubos foram colocados numa incubadora a 37°C e com agitação orbital de 100 rpm, e retirados para remover o meio de libertação a diferentes intervalos de tempo. Sempre que saíram da incubadora foi necessário proceder à sua centrifugação durante 2 minutos a 3000 rpm, para sedimentação das microsferas no fundo do tubo. Isto permitiu retirar facilmente o sobrenadante para armazenamento e análise. Posteriormente, os tubos com as partículas voltaram a ser cheios com 10 mL de PBS e retornaram à agitação na incubadora, durante o tempo estipulado.

Procedeu-se à medição da absorvância dos diferentes sobrenadantes retirados, contendo 5-Fluorouracil libertado pelas microsferas preparadas, no espectrofotómetro de UV/visível. As primeiras quatro amostras foram retiradas de 30 em 30 minutos, as duas seguintes de hora a hora, e as duas últimas de duas em duas horas. Por fim, mediu-se a absorvância do líquido sobrenadante passadas 24 horas desde o início da experiência, considerando-se esse tempo como o final do ensaio de libertação.

Para relacionar os valores de absorvância obtidos no espectrofotómetro com a concentração de 5-Fluorouracil, foi previamente obtida uma curva de calibração (Anexo A), traduzida pela equação 5 (onde A representa a absorvância e c a concentração de 5-Fluorouracil em µg/mL de PBS).

$$c = 17,884 \times A \quad (5)$$

Para fins comparativos, foram calculados alguns parâmetros teóricos: o *Theoretical Drug Loading* (TDL - equação 6), que representa a razão entre a massa de fármaco inicialmente adicionada e a massa teórica das microsferas, caso o seu peso correspondesse à soma entre as massas de fármaco e polímero iniciais; e a massa teórica de fármaco (MTF - equação 7) existente na massa de microsferas efectivamente analisada, isto é, anteriormente pesada. Foi também calculado um parâmetro prático, a percentagem de massa de 5-Fluorouracil efectivamente libertado relativamente ao valor esperado (equação 8).

$$TDL = \frac{m_{\text{fármaco}}}{m_{\text{fármaco}} + m_{\text{polímero}}} \quad (6)$$

$$MTF = TDL \times m_{\text{microsfegas}} \quad (7)$$

$$\% \text{ Massa libertada} = \frac{m_{\text{fármaco libertado}}}{MFT} \times 100 \quad (8)$$

Estes parâmetros permitiram visualizar a diferença entre os valores esperados teoricamente e aqueles que efectivamente se obtiveram na prática.

A avaliação dos perfis de libertação foi feita em termos absolutos e em termos percentuais, tendo em conta a massa de fármaco libertada.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Conforme referido, o principal objectivo do presente trabalho é a preparação de microsferas de quitosano e gelatina, reticuladas com genipin, através do método de emulsão água-em-óleo e a sua posterior caracterização.

O capítulo 4 debruça-se, na primeira secção, sobre a caracterização das partículas obtidas, através da análise dos resultados facultados pelo *software Image J*, que permite a determinação do diâmetro médio equivalente e distribuição de tamanhos das microsferas, assim como da sua morfologia. A segunda secção incide sobre a avaliação dos perfis de libertação do fármaco 5-Fluorouracil ao longo do tempo, obtidos através espectrofotometria de UV/Visível.

4.1 Determinação da morfologia das microsferas

As microsferas foram preparadas a partir do método de emulsão água-em-óleo. Como foi referido na secção 3.3.1, este consistiu na adição de parafina líquida e Span 80 num copo num banho de água a 40°C, com agitação magnética. Após homogeneização, adicionaram-se quantidades definidas das soluções de quitosano em ácido acético e de gelatina em água, previamente misturadas e à mesma temperatura, adicionando-se posteriormente o genipin. Ao fim de 5 horas a emulsão foi retirada do banho e colocada em gelo durante 20 minutos. Depois desse período, as partículas foram deixadas a sedimentar à temperatura ambiente durante algumas horas. Por fim, retirou-se o excesso de parafina e procedeu-se à lavagem com éter de petróleo, que se deixou evaporar à temperatura ambiente. De modo a obter as partículas bem separadas para mais fácil observação ao microscópio, estas foram ressuspensas em água com uma gota de Tween 20.

Os primeiros cinco ensaios realizados, descritos na Tabela 5 da secção 3.3.1, foram obtidos alterando as concentrações relativas de quitosano e gelatina, sendo que os primeiros se basearam em formulações de apenas quitosano (ensaio 1) e de apenas gelatina (ensaio 2). Os restantes foram preparados alterando a proporção mássica entre o quitosano e a gelatina, tendo-se obtido microsferas a partir de quantidades mássicas de quitosano e gelatina iguais (ensaio 3), na proporção de 3:1 (ensaio 4) e na proporção de 1:3 de quitosano e gelatina

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

(ensaio 5). Para cada um deles foi possível verificar a alteração da cor da emulsão com o tempo, de branca para azul, sinalizando a ocorrência da reacção de reticulação entre a molécula de genipin e os grupos amina quer do quitosano, quer da gelatina, como se pode verificar na Figura 9.

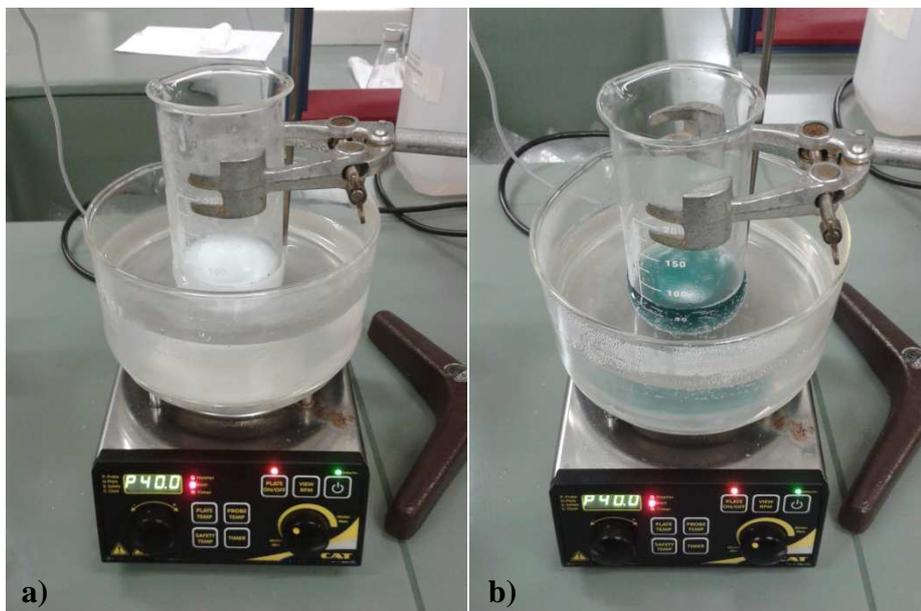


Figura 9 - Aspecto visual da emulsão a) antes de ocorrer a reacção de reticulação (coloração branca), e b) após ocorrência da reacção de reticulação entre a molécula de genipin e os grupos amina de quitosano e de gelatina (coloração azul)

4.1.1 Efeito da razão mássica quitosano/gelatina nas características morfológicas das partículas

As partículas obtidas em cada ensaio (Tabela 5) foram observadas ao microscópio em dois momentos distintos do processo: quando ainda se encontravam suspensas em parafina, e depois de lavadas e ressuspensas em água contendo uma gota de Tween 20. Convém realçar, que a ressuspensão das partículas não pode ser feita após total evaporação do solvente de lavagem, uma vez que estas têm uma forte tendência a agregar quando secas, dificultando a sua separação. Esta foi também a principal razão pela qual não foi levada a cabo a sua observação ao microscópio imediatamente após a lavagem com éter de petróleo e secas.

Para efectuar a observação ao microscópio das microsferas desenvolvidas foram retirados pequenos volumes de amostras e depositados em lâminas de vidro nas duas fases do

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

processo referidas anteriormente (suspensas em parafina, lavadas e ressuspensas em água com Tween 20).

Estes ensaios permitiram observar o tamanho e a morfologia das microsferas obtidas a partir de formulações com diferentes composições mássicas de quitosano e gelatina. Os ensaios 1 e 2, correspondentes às microsferas de 100% quitosano e às microsferas de 100% gelatina, respectivamente, foram realizados para comparação com os restantes, uma vez que alguns autores, como Lau, et al (2010), Solorio, et al (2011) e Karnchanajindanun, et al (2011), já tinham tido sucesso na preparação deste tipo de microsferas através do método de emulsão água-em-óleo.

Após conclusão da reacção nos ensaios 2 e 5 (microsferas de 100% gelatina e microsferas de quitosano e gelatina na proporção de 1:3, respectivamente) as microsferas obtidas apresentaram uma certa dificuldade em sedimentar, verificando-se a opacidade dos sobrenadantes, indicativa da presença de partículas em suspensão. Mesmo depois de submetidas a centrifugação a duas velocidades, 2000 rpm e 4000 rpm e, apesar de se ter observado uma maior sedimentação das partículas, algumas remanesceram em suspensão, denotando a sua baixa densidade. Esta situação poderia ser evitada, muito provavelmente, através da utilização de uma solução de gelatina de concentração mais elevada. A baixa concentração da solução usada e os poucos grupos amina disponíveis podem ter sido responsáveis por uma menor reticulação das partículas, resultando na sua baixa densidade.

Assim sendo, considerou-se pouco viável a preparação de microsferas apenas com gelatina ou com maior quantidade de gelatina do que de quitosano, pelo que estas formulações foram abandonadas.

Apesar das diferenças acima mencionadas, foi possível observar a elevada esfericidade das partículas obtidas em cada ensaio efectuado.

Para uma melhor avaliação das partículas e obtenção de imagens passíveis de serem analisadas pelo *software Image J*, repetiram-se os ensaios 1, 3 e 4 tendo-se voltado a observar as partículas ao microscópio óptico (Figuras 10, 11 e 12).

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

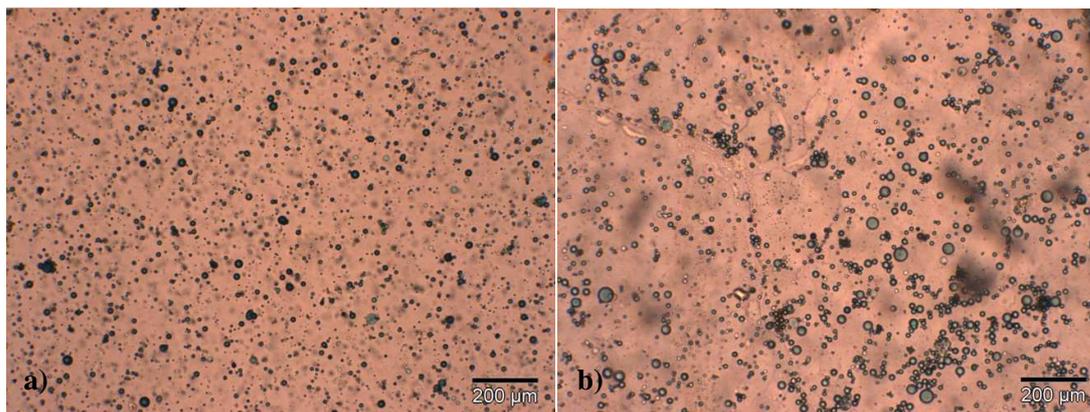


Figura 10 – Microsfemas de Cs (ensaio 1, Tabela 5) a) suspensas em parafina e b) ressuspensas em água com Tween 20

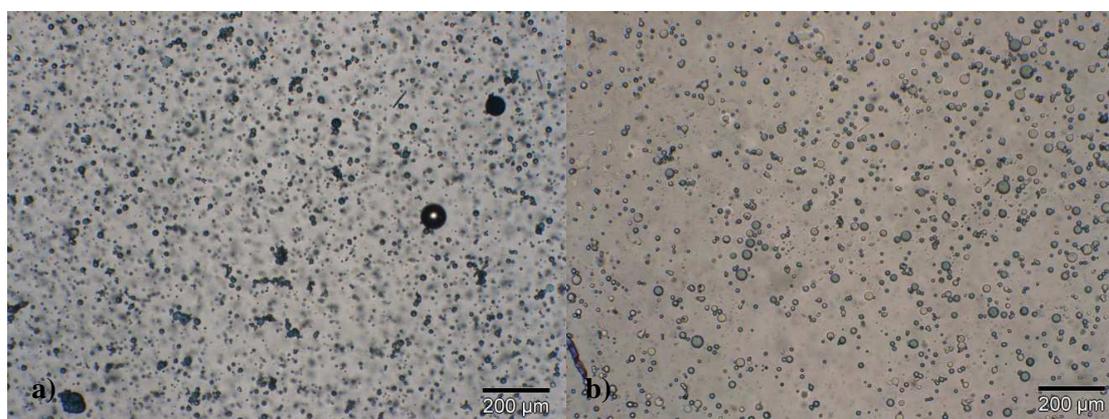


Figura 11 – Microsfemas de Cs e Gel (1:1 – ensaio 3, Tabela 5) a) suspensas em parafina e b) suspensas em água com Tween 20

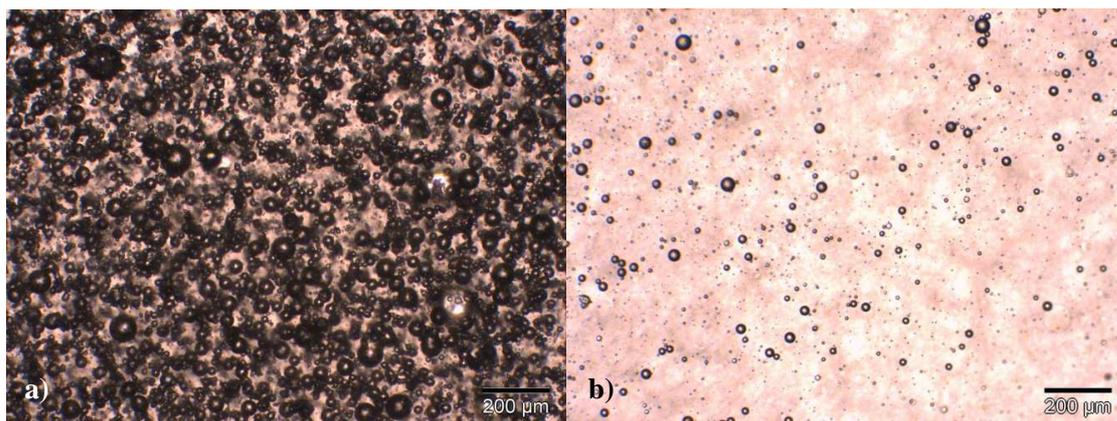


Figura 12 - Microsfemas de Cs e Gel (3:1 – ensaio 4, Tabela 5) a) suspensas em parafina e b) ressuspensas em água com Tween 20

Como já foi referido, para uma melhor análise das partículas obtidas, as imagens captadas através de microscopia óptica foram tratadas com o *software* de análise de imagem *Image J*, com vista à quantificação de parâmetros como a área, o diâmetro equivalente, a

circularidade e a *roundness*. As imagens utilizadas para esse efeito foram as correspondentes às microsferas ressuspensas em água com Tween 20, depois de terem sido separadas da parafina e lavadas com éter de petróleo (Figuras 10, 11 e 12 b)).

4.1.2 Caracterização das microsferas por análise de imagem

Como foi exposto anteriormente, a análise de imagem foi levada a cabo pelo *software Image J*, a partir das imagens obtidas com o microscópio óptico (Figuras 10, 11 e 12 b)).

Para os diferentes ensaios foi realizado um estudo preliminar de modo a determinar o filtro mais adequado a aplicar na medição de cada um dos parâmetros, como referido na secção 3.3.3. De salientar que os filtros aplicados são diferentes de ensaio para ensaio devido ao tamanho das partículas observadas, que também varia. Assim, para o ensaio correspondente a microsferas obtidas com quitosano e gelatina na proporção 1:1 (ensaio 3) foi oportuno utilizar um filtro maior, isto é, que não contabilizasse partículas de diâmetro inferior a cerca de 5 μm , uma vez que pela observação da imagem se concluiu que esses pontos observados constituíam ruído. No entanto, tal não se verificou no ensaio correspondente às microsferas obtidas com quitosano e gelatina na proporção 3:1 (ensaio 4) e foi-lhe aplicado um filtro bem mais reduzido, contabilizando as partículas de diâmetro superior a 1,3 μm , visíveis ao microscópio óptico. Assim sendo, para cada ensaio foi contabilizado um número de partículas diferente. Para o ensaio 1, contaram-se 879 microsferas, para o ensaio 2, contaram-se 1038 e para o ensaio 4 foram contabilizadas 1435 partículas.

Os resultados obtidos relativamente ao tamanho das micropartículas encontram-se expostos na Tabela 7, onde a área média e o diâmetro equivalente médio correspondem à média numérica destes parâmetros.

Tabela 7 – Resultados obtidos através da análise com o *software Image J* de imagens das microsferas correspondentes aos diferentes ensaios

Ensaio	Razão mássica (Cs:Gel)	Área média (μm^2)	Diâmetro equivalente médio (μm)
1	1:0	198,8	14,4
3	1:1	196,2	14,6
4	3:1	64,3	6,6

Cs – quitosano; Gel – gelatina

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Estes resultados permitem verificar que as microsferas dos ensaios 1 e 3 apresentam um diâmetro equivalente médio muito próximo, cerca de 14 μm . No entanto, para o ensaio 4 é observado um diâmetro equivalente médio bastante mais baixo do que os restantes, cerca de 6 μm , o que irá certamente influenciar algumas das propriedades destas microsferas, nomeadamente a eficiência de imobilização do fármaco e o seu perfil de libertação. Este facto vem corroborar a escolha do filtro utilizado durante a análise das partículas para este ensaio, uma vez que estas são muito mais pequenas do que as obtidas com as formulações dos ensaios 1 e 3.

Uma vez que a solução de quitosano utilizada foi de baixa concentração em polímero (1% (m/v) em ácido acético), todas as partículas apresentam um tamanho relativamente pequeno. A diminuição da concentração da solução de quitosano e, por sua vez, da sua viscosidade, leva à formação de gotas menores durante o processo de emulsificação, originando microsferas de pequenas dimensões.

Todavia, a análise da dimensão das microsferas apenas com base no diâmetro equivalente médio é demasiado redutora, pelo que, de seguida são apresentadas e caracterizadas as distribuições granulométricas para os diferentes ensaios realizados.

Assim, nas Figuras 13, 14 e 15 podem observar-se as curvas de distribuição de frequência para cada um dos ensaios realizados, enquanto na Figura 16 se apresentam as respectivas curvas de distribuição cumulativa. Os histogramas (Figuras 13, 14 e 15) foram obtidos através da contabilização do número de partículas com valor de diâmetro equivalente dentro de cada intervalo aberto. Essa contagem foi posteriormente transformada em percentagem, tendo em conta o número total de partículas analisadas (Anexo B).

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

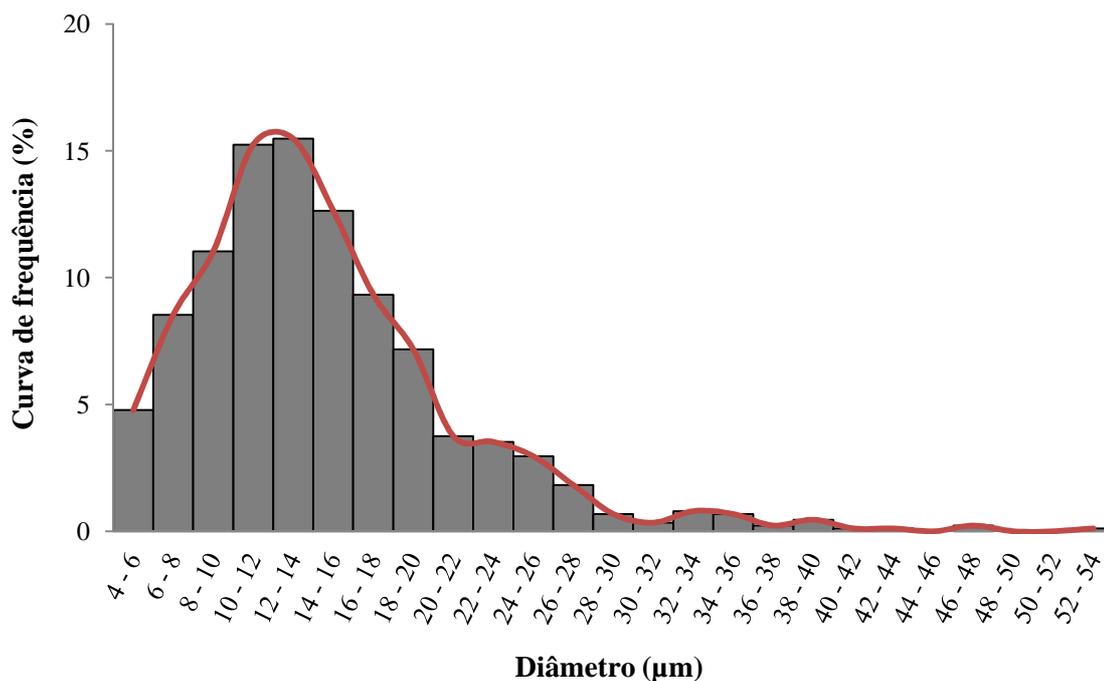


Figura 13 - Curva de distribuição de frequência para microsferas de quitosano (ensaio 1)

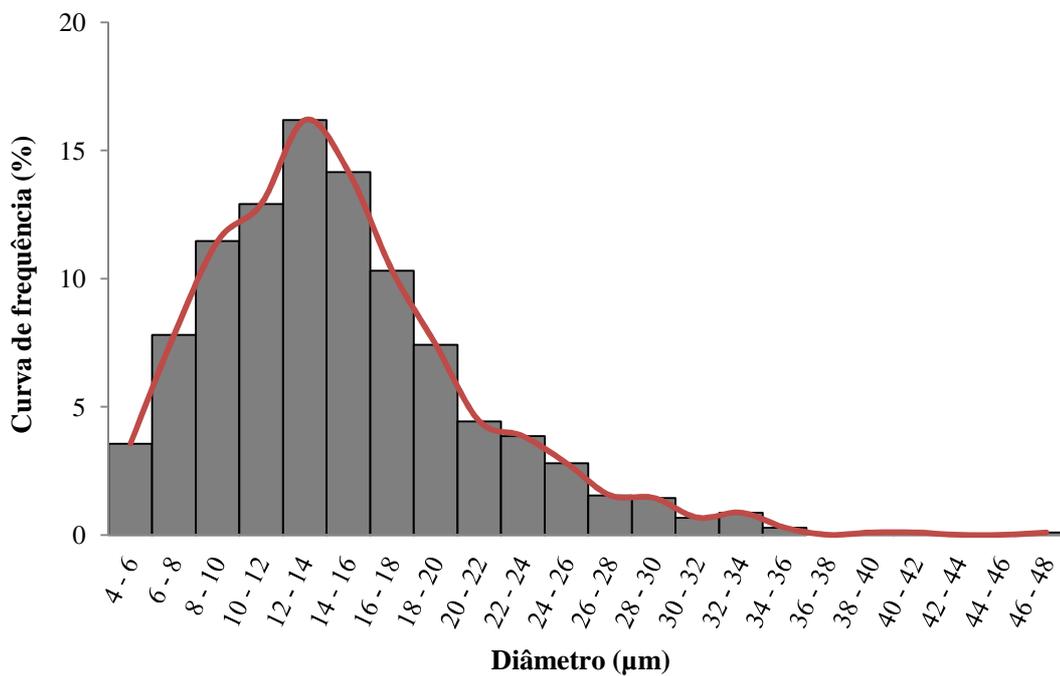


Figura 14 - Curva de distribuição de frequência para microsferas obtidas com quitosano e gelatina na proporção 1:1 (ensaio 3)

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

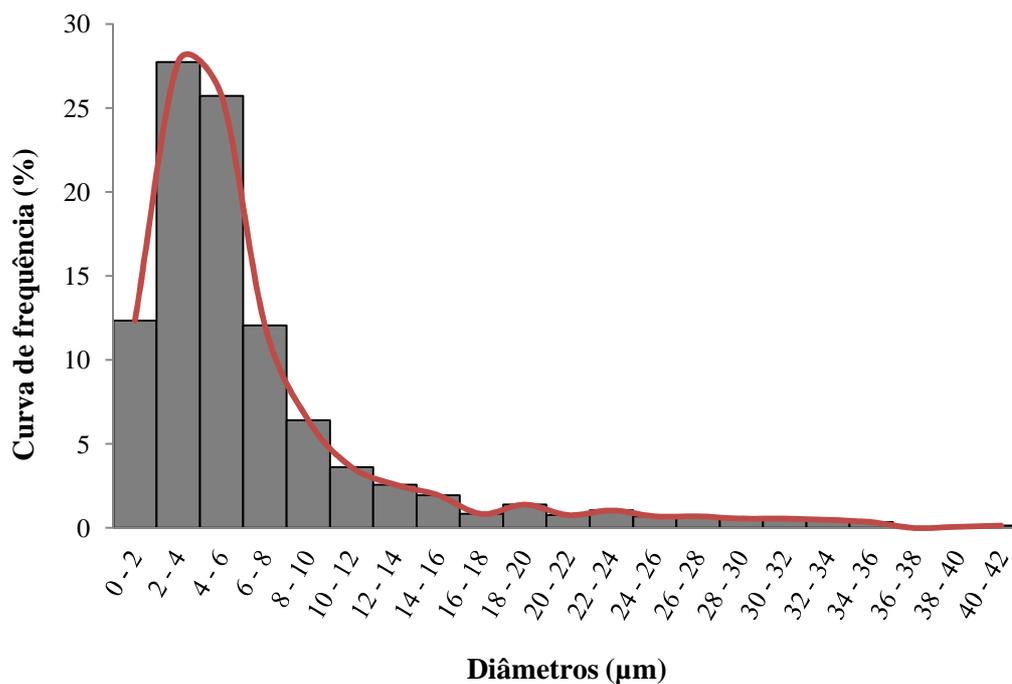


Figura 15- Curva de distribuição de frequência para microsferas obtidas com quitosano e gelatina na proporção 3:1 (ensaio 4)

A observação dos histogramas revela desde logo uma grande semelhança entre as curvas de distribuição de frequência das microsferas de quitosano (ensaios 1) e quitosano e gelatina 1:1 (ensaio 3), sendo a curva de frequência das microsferas de quitosano e gelatina 3:1 (ensaio 4) significativamente diferente das anteriores. Esta situação já era expectável devido ao facto de as microsferas correspondentes a este ensaio apresentarem um diâmetro equivalente médio significativamente inferior ao das microsferas dos ensaios anteriores o que indicaria diferentes distribuições. Como referido anteriormente, a observação ao microscópio das imagens relativas ao ensaio 4 revela a presença de microsferas de tamanho bastante menor.

As curvas de distribuição cumulativa, representadas na Figura 16, podem confirmar estes resultados, ou seja, distribuições muito semelhantes para os ensaios 1 e 3, contudo significativamente diferentes da distribuição exibida pelo ensaio 4.

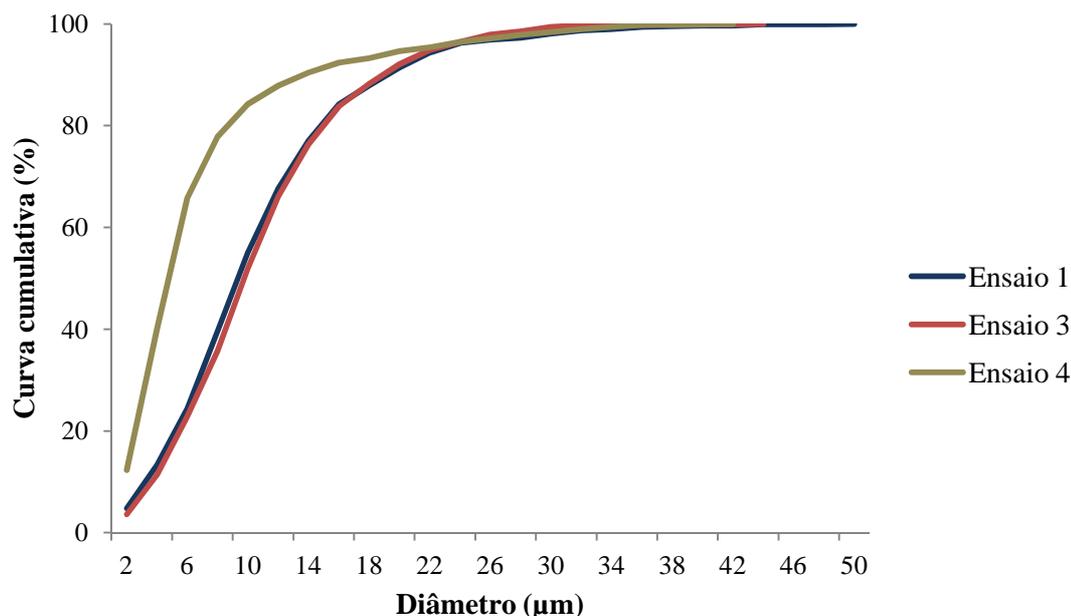


Figura 16 – Curvas de distribuição cumulativa (*undersize*) para microsferas de quitosano (ensaio 1) de quitosano gelatina 1:1 (ensaio 3) e quitosano e gelatina 3:1 (ensaio 4)

As distribuições de tamanhos apresentadas podem ser caracterizadas, para além do diâmetro médio (apresentado na Tabela 7), através de outros parâmetros, como sejam, a moda, a mediana (ou d_{50}), o d_{10} e o d_{90} . Enquanto a moda corresponde ao valor do diâmetro para o qual ocorre a maior frequência de microsferas, os diâmetros d_{50} , d_{10} e d_{90} correspondem, respetivamente, aos diâmetros para os quais 50, 10 e 90% das microsferas têm dimensões inferiores ou iguais àquele valor, para uma distribuição *undersize*. A Tabela 8 resume os valores obtidos para estes diâmetros em cada um dos ensaios realizados.

Tabela 8 - Valores do diâmetro médio equivalente, moda, mediana (d_{50}), d_{10} , e d_{90} para os diferentes ensaios

Ensaio	Razão mássica (Cs:Gel)	Diâmetro equivalente médio (μm)	Moda	Mediana (d_{50}) (μm)	d_{10} (μm)	d_{90} (μm)
1	1:0	14,4	13,1	13,4	7,2	22,9
3	1:1	14,6	13,0	13,8	6,8	23,1
4	3:1	6,6	3,1	4,6	1,5	12,8

Cs – Quitosano; Gel - Gelatina

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como se pode observar na Tabela 8, os valores de todos os diâmetros são praticamente iguais para os ensaios 1 e 3, correspondentes a microsferas de quitosano e quitosano/gelatina na proporção 1:1, respectivamente. Cerca de 90% destas microsferas possuem diâmetros inferiores a 23 μm e 10% inferiores a 7 μm . Já as microsferas de quitosano e gelatina na proporção 3:1 exibem um tamanho consideravelmente inferior. Cerca de 90% das microsferas possuem diâmetros inferiores a 13 μm , enquanto 10% são inferiores a 2 μm .

Segundo Zhou et al. (2012), o tamanho das microsferas pode ser influenciado por diversos factores, tais como a quantidade de quitosano e gelatina utilizada, a velocidade de agitação, a quantidade de surfactante utilizada na emulsão, a concentração de reticulante e o tempo de reticulação. Uma vez que estes parâmetros se mantiveram constantes em cada ensaio, tendo havido apenas a alteração da razão mássica entre a quantidade de quitosano e gelatina utilizada, seria de esperar que as distribuições dos ensaios 1 e 4 (microsferas de quitosano e microsferas preparadas com uma proporção quitosano/gelatina de 3:1, respectivamente) fossem mais semelhantes entre si. No entanto, esta parecença verifica-se entre os ensaios 1 e 3 (microsferas de quitosano e microsferas preparadas com uma proporção quitosano/gelatina de 1:1). Este facto poderá dever-se a erros derivados da baixa resolução das imagens utilizadas para análise das partículas, que nos casos anteriores (ensaios 1 e 3) poderá não ter permitido a contabilização de partículas de tamanho mais pequeno.

Para além disso, a velocidade de agitação escolhida (600 rpm), a quantidade de surfactante utilizado na emulsão (500 mg), a quantidade de reticulante utilizado (0,5 mL) e o tempo de reticulação (5 horas) poderão ter contribuído para o pequeno tamanho das partículas contabilizadas em cada ensaio, uma vez que, segundo os autores referidos anteriormente, um aumento destes parâmetros dá origem, na generalidade, a uma diminuição do tamanho das microsferas obtidas.

No que respeita à caracterização morfológica das microsferas, o *software Image J* permitiu o cálculo de alguns parâmetros de interesse, nomeadamente, a circularidade e a *roundness*, cujos valores médios são apresentados na Tabela 9.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Tabela 9 – Valores médios de Circularidade e Roundness das microsferas obtidos através da análise de imagem pelo software Image J

Ensaio	Razão mássica (Cs:Gel)	Circularidade	Roundness
1	1:0	0,891	0,866
3	1:1	0,888	0,870
4	3:1	0,931	0,785

Cs – Quitosano; Gel – Gelatina

Relativamente à circularidade (equação 3), foi definido previamente que só contariam para avaliação as partículas que apresentassem um valor superior a 0,8, de forma a impedir a contagem de objectos que não correspondam a microsferas poliméricas. Assim sendo, verificou-se que as partículas de quitosano e gelatina com proporção mássica de 3:1 apresentam uma circularidade bastante elevada (0,931), próxima de 1. As microsferas 1 e 3 (partículas de quitosano e partículas de quitosano e gelatina com proporção mássica 1:1, respectivamente), por seu turno, apresentam valores deste parâmetro muito semelhantes, mas também próximos da unidade. Isto vem demonstrar que as partículas analisadas têm uma forma circular bastante bem definida. A distribuição deste parâmetro para os diferentes ensaios pode ser observada nas Figuras 17, 18 e 19.

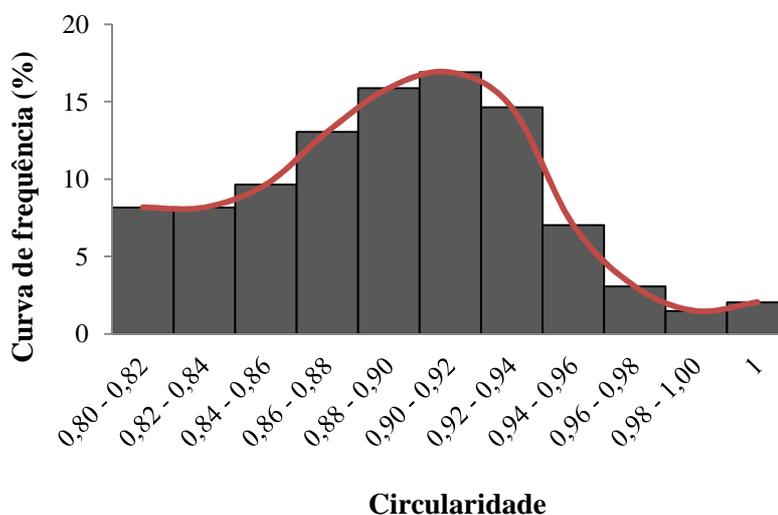


Figura 17 – Curva de distribuição de frequência para a Circularidade de microsferas de quitosano (ensaio1)

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

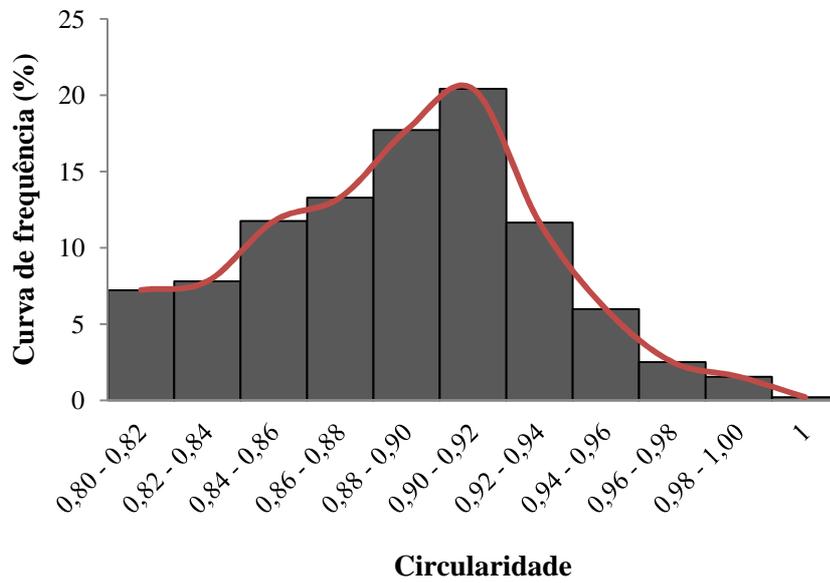


Figura 18 - Curva de distribuição de frequência para a Circularidade das microsferas de quitosano e gelatina na proporção 1:1 (ensaio 3)

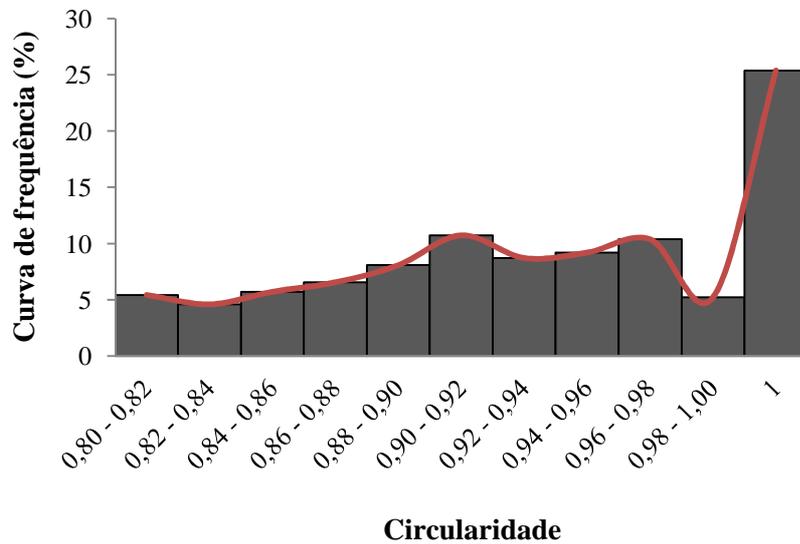


Figura 19 - Curva de distribuição de frequência para a Circularidade de microsferas de quitosano e gelatina na proporção 3:1 (ensaio 4)

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A distribuição dos valores de circularidade volta a ser muito semelhante para os dois primeiros ensaios (ensaio 1 e ensaio 3), demonstrando que a moda das distribuições se situa, em ambos os casos, no intervalo de valores de circularidade compreendido entre 0,90 e 0,92. Para o ensaio 4, a distribuição altera-se, havendo uma tendência mais crescente no valor deste parâmetro. A maior frequência de microsferas (cerca de 25%) possui um valor de circularidade igual a 1, ou seja, cerca de 25% das partículas poliméricas analisadas exibem uma forma perfeitamente circular.

A *roundness* (equação 4) pretende avaliar a proximidade da forma elíptica por parte das micropartículas analisadas, através do cálculo da razão entre o diâmetro mínimo e o diâmetro máximo obtidos para cada objecto analisado. Uma vez que apenas foi utilizado um filtro para a circularidade, a *roundness* foi determinada para todas as partículas de circularidade superior a 0,8. Na Tabela 9, pode observar-se que as partículas obtidas através dos ensaios 1 e 3 apresentam um valor próximo do 0,9 para este parâmetro, o que significa que se aproximam mais de círculos do que de elipses, isto é, que a diferença entre os dois diâmetros não é elevada. No entanto, embora as partículas do ensaio 4 apresentem uma circularidade superior, o valor da sua *roundness* é inferior ao dos restantes ensaios (aproximadamente 0,8), apresentando um maior número de partículas com a forma elíptica. As curvas de distribuição da *roundness* para os vários ensaios encontram-se representadas nas Figuras 20, 21 e 22.

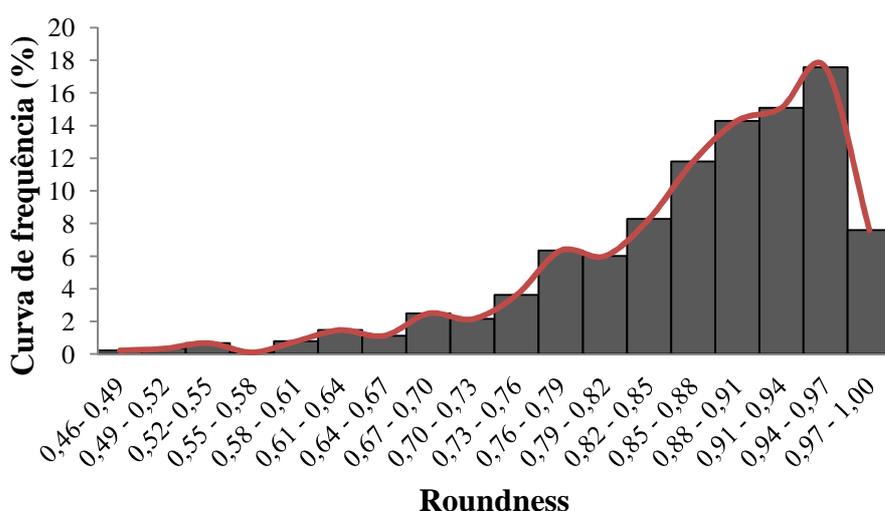


Figura 20 - Curva de distribuição de frequência para a *Roundness* de microsferas de quitosano (ensaio 1)

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

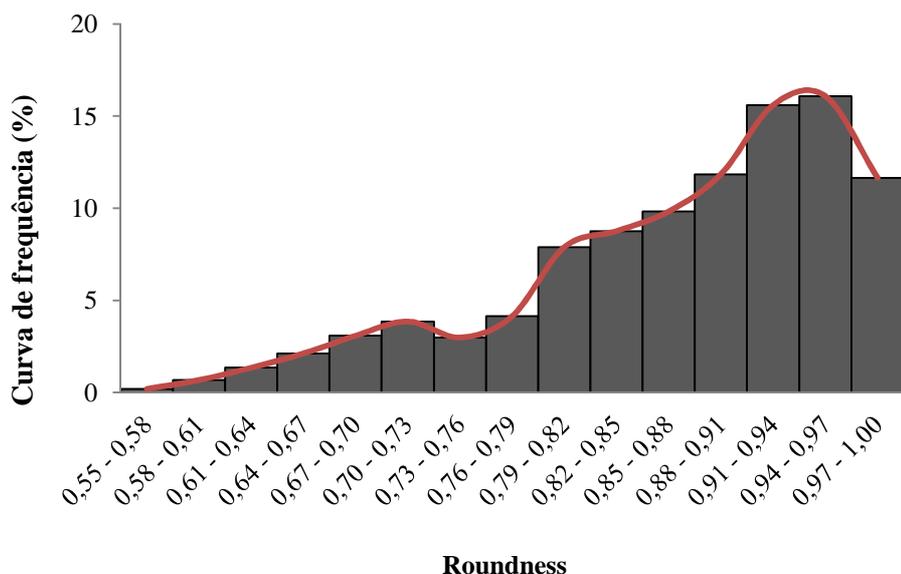


Figura 21 - Curva de distribuição de frequência para a *Roundness* de microsferas de quitosano e gelatina na proporção 1:1 (ensaio 3)

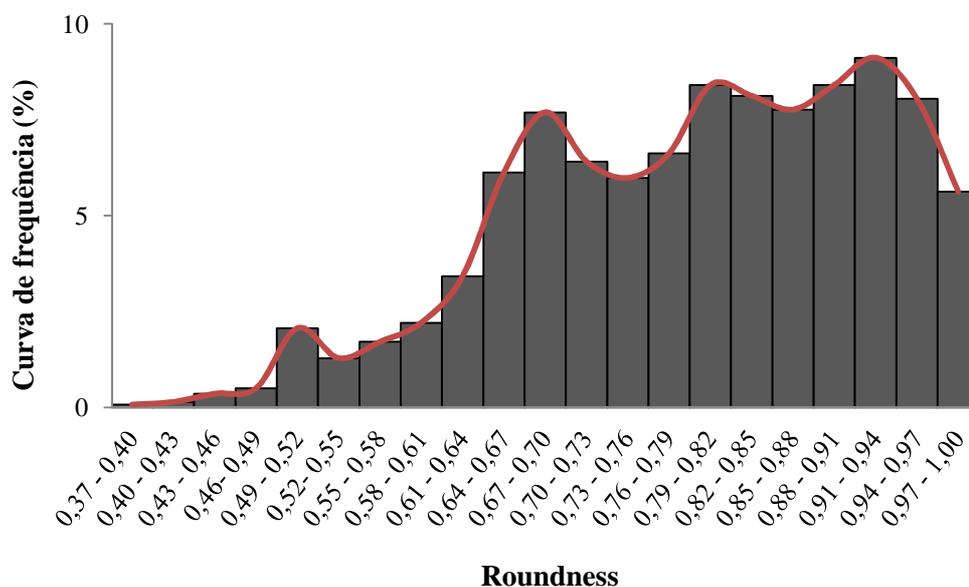


Figura 22 - Curva de distribuição de frequência para a *Roundness* de microsferas de quitosano e gelatina na proporção 3:1 (ensaio 4)

Os valores da *roundness* das distribuições das Figuras 20 e 21 (ensaio 1 e 3) são superiores a 0,5, sendo que a moda das distribuições ocorre para um valor de aproximadamente 0,94. No entanto, é este tipo de distribuição que se pretende, pois é indicativa de frequências maiores para valores cada vez mais próximos da circularidade, e

afastados da forma elíptica. A distribuição de valores da *roundness* para o ensaio 4 (Figura 22) mostra uma grande variabilidade começando em 0,37 até 1. Isto implica a contabilização de valores baixos e bastante afastados da idealidade, razão pela qual o valor médio deste parâmetro para o ensaio 4 é inferior ao valor do mesmo para os restantes ensaios.

Posto isto, poderá dizer-se que as partículas obtidas foram efectivamente microsferas, embora pequenas, com forma circular e esférica. A formulação correspondente ao ensaio 4 produziu microsferas de menor tamanho, maior circularidade e menor *roundness*, comparativamente com os restantes ensaios, que apresentaram resultados bastante semelhantes entre si. Esta diferença poderá dever-se ao facto de ter sido necessário proceder à utilização de um filtro menor para o ensaio 4, o que implicou a contabilização de um maior número de partículas.

4.2 Avaliação dos perfis de libertação do fármaco 5-Fluorouracil

Como já foi explicado na secção 3.3.2., foram utilizados três tipos de microsferas com concentrações relativas de quitosano e gelatina diferentes para este tipo de libertação (Tabela 6). As microsferas do tipo I foram preparadas apenas com quitosano, as microsferas do tipo II com uma razão mássica de 1:1 de quitosano e gelatina, e as microsferas do tipo III com uma razão mássica de 3:1 de quitosano e gelatina. De modo a incorporar o fármaco 5-Fluorouracil nas microsferas preparadas, este foi adicionado na emulsão água-em-óleo ao mesmo tempo que as soluções de quitosano e gelatina. A quantidade de 5-Fluorouracil inicial colocada na emulsão foi igual em todas as microsferas: 5 mg.

Tendo em conta a massa inicial de fármaco e polímeros, a TDL (*Theoretical Drug Loading*, equação 6) foi calculada para cada tipo de micropartículas, como se pode verificar na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de *Theoretical Drug Loading* (TDL) para cada tipo de microsferas

Ensaio	Razão mássica (Cs:Gel)	Massa de 5-FU (mg)	Massa de Cs e Gel (mg)	TDL
I	1:0	5,0	50	0,091
II	1:1	5,0	82	0,057
III	3:1	5,0	62	0,075

5-FU – 5-Fluorouracil; Cs – Quitosano; Gel – Gelatina; TDL – *Theoretical Drug Loading* (equação 6)

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Sendo a massa inicial de fármaco igual para os três tipos de microsferas é de esperar que o valor de TDL seja superior para aquelas que apresentam uma quantidade total de polímero menor (microsferas do tipo I) em comparação com aquelas que apresentam uma massa polimérica maior.

Depois de secas, as micropartículas foram pesadas. Esta operação teve como objectivo registar o peso real das microsferas obtidas. Assim sendo, considerando os valores de TDL calculados anteriormente, foi possível determinar a quantidade (em mg) teórica de 5-Fluorouracil que se deveria encontrar incorporada na massa de microsferas efectivamente preparada. Os valores obtidos encontram-se registados na Tabela 11.

Tabela 11 - Massa de 5-Fluorouracil esperada (mg) no interior das microsferas, tendo em conta os valores de TDL calculados anteriormente

Ensaio	Razão mássica (Cs:Gel)	Massa real das microsferas (mg)	MTF (mg)
I	1:0	43	3,91
II	1:1	49	2,82
III	3:1	42	3,13

MTF – Massa teórica de fármaco (equação 7)

Tendo em conta os valores de TDL obtidos anteriormente, é natural que para aquelas em que este é menor também a massa teórica de fármaco incorporado o seja. A libertação de 5-Fluorouracil em termos mássicos nas primeiras 8 horas encontra-se representada nas Figuras 23, 24 e 25. Embora o período total de libertação tenha sido de 24 horas, durante o tempo que se seguiu às primeiras 8 horas de libertação a quantidade de fármaco contabilizado na solução de PBS foi muito próximo do anteriormente obtido, pelo que, para efeitos gráficos, não será relevante a sua análise. No entanto, esses mesmos valores encontram-se especificados na Tabela 12, onde se pode constatar tal facto.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

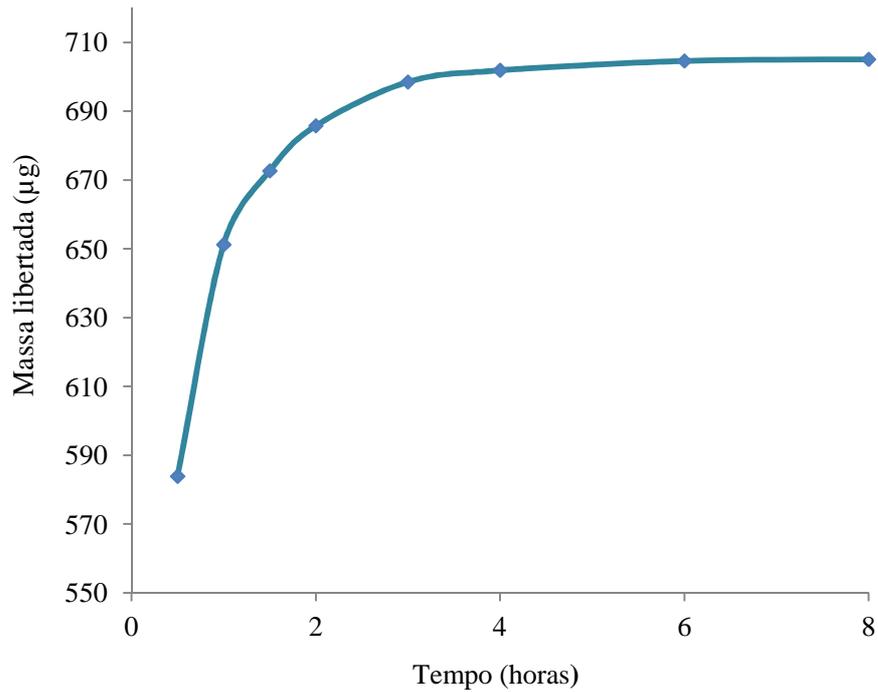


Figura 23 - Libertação mássica de 5-Fluorouracil nas primeiras 8 horas a partir de microsferas obtidas no ensaio I

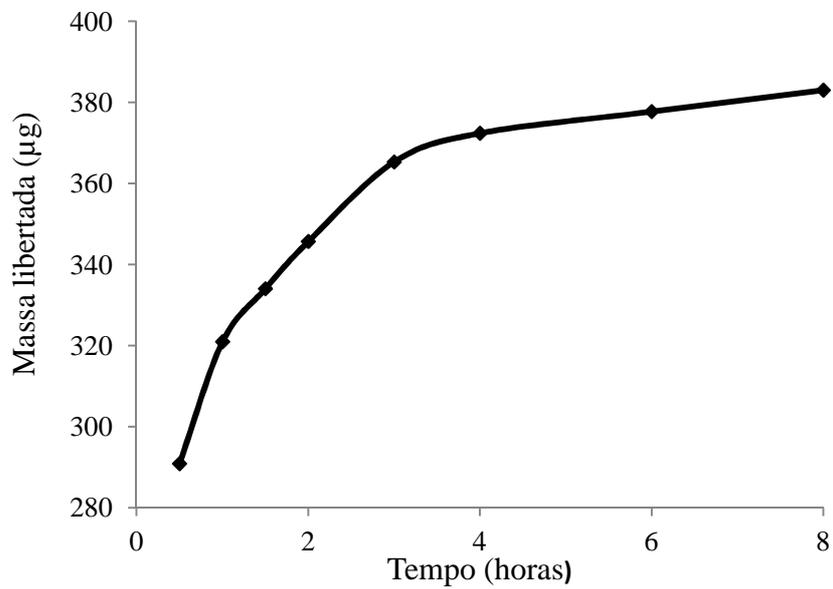


Figura 24 - Libertação mássica de 5-Fluorouracil nas primeiras 8 horas a partir de microsferas obtidas no ensaio II

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

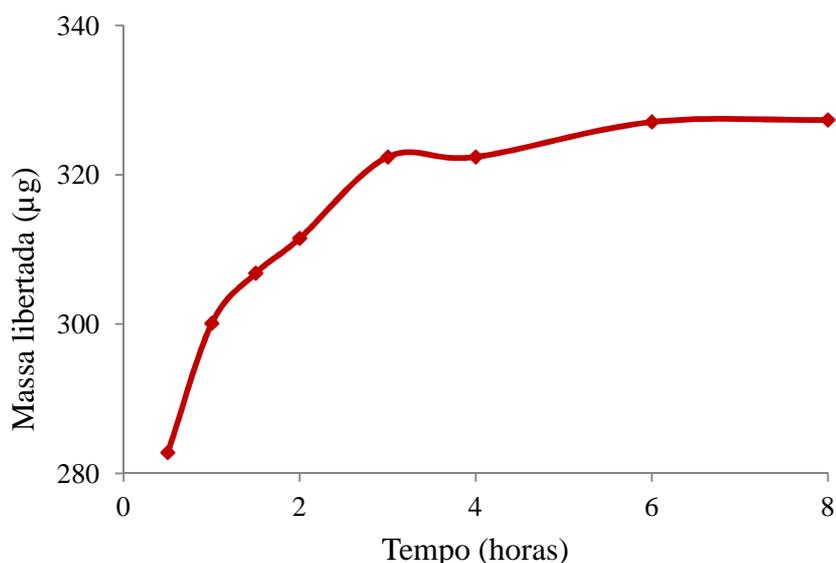


Figura 25 - Libertação mássica de 5-Fluorouracil nas primeiras 8 horas a partir de microsferas obtidas no ensaio III

Tabela 12 - Comparação dos valores mássicos obtidos ao longo do período de libertação com os esperados, para cada tipo de microsferas

Ensaio	Razão mássica (Cs:Gel)	Massa de 5-FU liberta ao fim de 8 horas (mg)	Massa de 5-FU liberta ao fim de 24 horas (mg)	MTF (mg)	% Libertada relativamente ao esperado
I	1:0	0,705	0,708	3,91	18,1
II	1:1	0,383	0,388	2,82	13,7
III	3:1	0,327	0,329	3,13	10,5

Cs – Quitosano; Gel – Gelatina; 5-FU – 5-Fluorouracil; MTF – Massa teórica de fármaco

Da análise da Tabela 12 pode verificar-se a pequena diferença entre a massa de 5-Fluorouracil libertado ao fim das primeiras 8 horas e ao fim de 24 horas, sinal de que a libertação ocorre maioritariamente no primeiro período. No entanto, a percentagem resultante da razão entre a massa de 5-Fluorouracil realmente libertada e a MTF foi calculada tendo em conta o último valor obtido. A diferença verificada entre o MTF e o valor real libertado pode ser explicada por duas hipóteses. A primeira, e mais provável, é o facto de o fármaco não ter sido totalmente incorporado e de, por isso, ter havido perdas ao longo do processo, nomeadamente durante a lavagem com éter de petróleo. A segunda hipótese, que não deverá

ser explicativa desta disparidade, consiste na ligação do restante fármaco às partículas, não permitindo a sua libertação.

Embora um ensaio não seja suficiente para tirar conclusões determinantes, os resultados obtidos podem ser explicados segundo diversas suposições. Ao fazer a comparação entre eles, conclui-se que as microsferas do ensaio I, de apenas quitosano, são aquelas que apresentam uma % de massa de fármaco libertada mais elevada, indicativo de que permitiram uma maior incorporação de fármaco no seu interior, seguindo-se as microsferas dos ensaios II e III, respectivamente. Este resultado poderá significar que a gelatina existente na estrutura das microsferas representará um eventual entrave na incorporação de fármaco. Contudo, o facto de as microsferas do ensaio III, com uma massa total de gelatina inferior à das microsferas II, apresentarem uma incorporação menor faz acreditar que tal não seja o caso.

Outra explicação para o fenómeno pode advir do que foi concluído por Hassan, et al. (1992), Wang, et al. (1996) e Zhou et al. (2013), autores já referenciados na secção 2.5. Estes afirmam que quanto maior for a concentração de reticulante, maior é a incorporação de fármaco. Uma vez que a concentração de massa polimérica é inferior nas microsferas do ensaio I e a quantidade de solução reticulante de genipin foi mantida constante em cada ensaio, o grau de reticulação deste tipo de partículas pode ter sido superior ao dos restantes, permitindo-lhe uma maior incorporação de fármaco. Isto porque o aumento do grau de reticulação até certo limite provoca o aumento da densidade da cadeia polimérica, limitando a sua expansão por hidratação e minimizando a difusão do fármaco para a superfície da mesma. No entanto, o facto de as microsferas do ensaio III, que têm uma menor massa total polimérica que as II, apresentarem uma incorporação de fármaco inferior, não se coaduna com esta hipótese.

A Figura 26 permite comparar directamente os perfis de libertação dos três tipos de microsferas ao longo de 24 horas.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

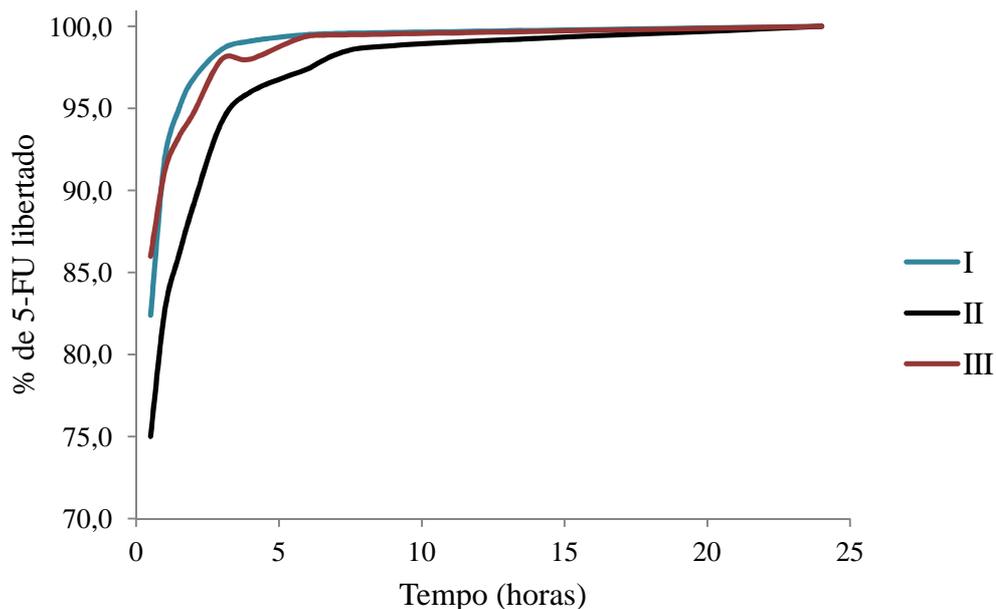


Figura 26 - Libertação em termos percentuais de 5-Fluorouracil ao longo das 24 horas de libertação para os três ensaios efectuados

Ao fim da primeira meia hora de libertação, a quantidade de 5-Fluorouracil passada para a solução de PBS circundante é bastante elevada para todos os tipos de microsferas. Especificando, esta é de 75% para as II, 82,4% para as I e 86% para as III (Anexo C). Embora as do tipo I apresentem uma maior incorporação de fármaco percentual, a sua libertação dá-se de forma mais rápida do que pelas partículas II. Aliás, estas últimas são as que apresentam um perfil de libertação percentual mais lento. Enquanto as microsferas do tipo I e III libertam cerca de 98% do 5-Fluorouracil incorporado ao fim das primeiras 3 horas, as do tipo I só atingem tal valor ao fim de 8 horas. E embora as microsferas do tipo III comecem por libertar percentualmente valores superiores ao das microsferas I, a sua velocidade diminuiu comparativamente ao longo do tempo, voltando a atingir valores semelhantes após as primeiras 3 horas.

Concluindo, aquelas que apresentam um perfil mais favorável, por proporcionarem uma libertação controlada mais lenta, são as partículas do tipo II.

Este facto deve-se à sua constituição, por apresentarem uma quantidade de gelatina superior às restantes, uma vez que, como afirmam Zhou et al. (2012), quanto maior for a quantidade de gelatina na composição das microsferas, mais prolongadamente se efectua a libertação do fármaco. Uma justificação para tal talvez se prenda com a estrutura formada

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

pelo quitosano e a gelatina em quantidades mássicas iguais, que minimiza a difusão de 5-Fluorouracil para o exterior, formando microsferas comparativamente mais estáveis.

A diferença entre os perfis de libertação poderá também ser explicada pela diferença de tamanhos entre as microsferas desenvolvidas. Como foi observado na Tabela 7 da secção 4.1, as partículas com igual percentagem mássica de quitosano e gelatina (ensaio 3), apresentam um maior diâmetro equivalente médio, sendo que, de acordo com Jameela et al. (1995), quanto maiores forem as partículas mais lenta será a libertação do fármaco.

5. CONCLUSÃO

A presente Dissertação teve como principal objectivo a preparação de microsferas de quitosano e gelatina reticuladas com genipin, através da utilização do método de emulsão água em óleo, para a incorporação de um fármaco anticancerígeno, o 5-Fluorouracil. Nesse sentido, foram realizados diversos ensaios onde se desenvolveram partículas com diferentes razões mássicas de gelatina e quitosano, mantendo outros parâmetros constantes, tais como a velocidade de agitação, a quantidade de agente reticulante utilizado, assim como a de parafina e surfactante, a temperatura, e a massa de fármaco a incorporar.

Numa primeira fase, as microsferas obtidas nos diferentes ensaios foram observadas ao microscópio óptico, o que permitiu efectuar uma triagem, relativa aos tipos de microsferas a analisar posteriormente. Esta baseou-se no facto de as micropartículas com maior quantidade de gelatina se apresentarem em suspensão no sobrenadante, indicativo de uma baixa densidade, o que não facilitou a sua separação e lavagem da fase oleosa. Os ensaios foram repetidos na generalidade e as correspondentes microsferas foram analisadas quanto à sua morfologia, incorporação e libertação do fármaco.

A distribuição de tamanhos das microsferas foi levada a cabo pelo *software Image J*, que permitiu a obtenção de parâmetros importantes, nomeadamente, a área projectada das partículas (de onde foi possível retirar o diâmetro equivalente), a circularidade e *roundness*. Observou-se um diâmetro equivalente médio semelhante para os ensaios correspondentes às microsferas de quitosano (ensaio 1) e às microsferas preparadas com quantidades mássicas iguais de quitosano e gelatina (ensaio 3), cerca de 14 μm , enquanto as partículas de quitosano e gelatina na proporção mássica de 3:1 (ensaio 4) apresentaram um diâmetro equivalente médio de cerca de 6 μm . As curvas de distribuição de frequência deste parâmetro também se revelaram semelhantes para os dois primeiros ensaios (ensaios 1 e 3). Essa semelhança foi comprovada pelos valores da moda, mediana, d_{10} e d_{90} , também eles muito próximos. De novo, a curva de distribuição de frequência relativa ao ensaio 4 apresentou-se bem distinta das restantes, apresentando valores de moda, mediana, d_{10} e d_{90} mais pequenos. Este facto poderá dever-se a erros derivados da baixa resolução das imagens utilizadas para análise das

5. CONCLUSÃO

partículas, que nos ensaios 1 e 3 poderá não ter permitido a contabilização de partículas de tamanho mais pequeno, onde terão sido identificadas como ruído.

O *software* utilizado para a análise de imagem permitiu observar ainda os valores médios de circularidade e *roundness*, indicadores importantes da morfologia das partículas. Mais uma vez, as microsferas de quitosano e as preparadas com quitosano e gelatina na proporção mássica de 1:1 apresentaram valores bastante semelhantes para estes dois parâmetros, cerca de 0,90. Para as microsferas obtidas no ensaio 4 (quitosano e gelatina na proporção de 3:1) verificou-se uma circularidade ligeiramente superior à dos restantes, cerca de 0,93, e um valor de *roundness* um pouco inferior, cerca de 0,79. No entanto, na generalidade, todos os ensaios produziram partículas com valores elevados para os dois parâmetros analisados, indicativos da sua esfericidade.

Seguiu-se a observação dos perfis de libertação para os três ensaios realizados, verificando-se que as partículas de quitosano (ensaio I) permitiram uma maior incorporação de fármaco que as restantes. Esta diferença na quantidade de fármaco incorporada poderá dever-se a um maior grau de reticulação destas esferas quando comparadas com as restantes. No entanto, o baixo valor deste parâmetro, cerca de 18%, é um forte indicador das elevadas perdas exibidas ao longo do processo.

Observaram-se, por fim, os perfis percentuais de libertação em função do tempo, tendo-se concluído que as microsferas de quitosano e gelatina na proporção mássica de 1:1 (ensaio II) libertaram o fármaco mais lentamente do que as restantes. Isto é, enquanto as microsferas de quitosano (ensaio I) e as preparadas com quitosano e gelatina na proporção 3:1 (ensaio III) libertaram cerca de 98% de fármaco nas primeiras 3 horas, as microsferas obtidas pelo ensaio II (gelatina e quitosano na proporção mássica de 1:1) só o fizeram ao fim de 8 horas. Este acontecimento pode dever-se à sua constituição (iguais massas de quitosano e gelatina), ou então ao tamanho médio das suas partículas, uma vez que, segundo a literatura, quanto maiores forem as microsferas mais lenta será a libertação de fármaco.

Tendo em conta estes resultados, pode dizer-se que os objectivos do trabalho foram cumpridos, uma vez que se obtiveram microsferas com diferentes formulações de quitosano e gelatina através da utilização do método de emulsão água-em-óleo, capazes de incorporar e libertar o fármaco utilizado, 5-Fluorouracil.

É importante acrescentar, porém, que muito se pode fazer para dar continuidade a este projecto no futuro, como se propõe de seguida:

- Avaliar a influência de outros parâmetros (velocidade de agitação, temperatura, quantidade de parafina, surfactante e agente reticulante) na morfologia e perfis de libertação do fármaco pelos tipos de microsferas estudados;

- Testar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, através da replicação dos ensaios realizados neste trabalho;

- Testar a libertação de outros fármacos pelos mesmos tipos de microsferas;

- Realizar ensaios com outras proporções mássicas de quitosano e gelatina, e analisar as suas diferenças em termos de morfologia e perfis de libertação;

- Utilizar soluções com concentrações de quitosano e gelatina diferentes das que foram utilizadas durante este trabalho para a preparação das microsferas, e avaliar as diferenças obtidas.

BIBLIOGRAFIA

Baimark, Y., & Srisuwan, Y. (2013). Hollow chitosan microspheres prepared by an oil-in-water-in-oil² double emulsion method. *Powder Technology*, 249, 436-442.

Bansal, V., Sharma, P. K., Sharma, N., Pal, O. P., & Malviya, R. (2011). Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery. *Advances in Biological Research*, 5 (1), 28-37.

Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57 (1), 19-34.

Bernkop-Schnürch, A., & Dünnhaupt, S. (2012). Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81 (3), 463-469.

Blanco, M. D., Gómez, C., Olmo, R., Muñiz, E., & Teijón, J. M. (2000). Chitosan microspheres in PLG films as devices for cytarabine release. *International Journal of Pharmaceutics*, 202 (1-2), 29-39.

Bodnar, M., Hartmann, J. F., & Borbely, J. (2005). Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*, 6 (5), 2521-2527.

Butler, M. F., Ng, Y.-F., & Pudney, P. D. A. (2003). Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41 (24), 3941-3953.

Chen, H., Ouyang, W., Lawuyi, B., Martoni, C., & Prakash, S. (2005). Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 75 (4), 917-927.

Djagny, K., Wang, Z., & Xu, S. (2001). Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41 (6), 481-492.

BIBLIOGRAFIA

Dubey, R. R., & Parikh, R. H. (2004). Two-stage optimization process for formulation of chitosan microspheres. *AAPS PharmSciTech*, 5 (1).

Harris, R., Paños, I., Acosta, N., & Heras, A. (2008). Preparation and Characterization of chitosan microspheres for controlled release of tramadol. *Journal of Controlled Release*, 132 (3), e76–e77.

Hassan, E. E., Parish, R. C., & Gallo, J. M. (1992, March). Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anticancer agent, oxantrazole. *Pharmaceutical Research*, 9 (3), 390-397.

Islam, M. A., Firdous, J., Choi, Y.-J., Yun, C.-H., & Cho, C.-S. (2012). Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 6077–6093.

Jameela, S. R., & Jayakrishnan, A. (1995). Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle : studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*, 16 (10), 769–775.

Jameela, S. R., Latha, P. G., Subramoniam, A., & Jayakrishnan, A. (1996). Antitumour activity of mitoxantrone-loaded chitosan microspheres against Ehrlich ascites carcinoma. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48 (7), 685–688.

Karnchanajindanun, J., Srisa-ard, M., & Baimark, Y. (2011). Genipin-cross-linked chitosan microspheres prepared by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery. *Carbohydrate Polymers*, 85 (3), 674–680.

Kim, K., & Pack, D. (2006). Microspheres for drug delivery. *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*, I, 19–50.

Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104 (12), 6017–6084.

- Lau, T. T., Wang, C., & Wang, D.-A. (2010). Cell delivery with genipin crosslinked gelatin microspheres in hydrogel/microcarrier composite. *Composites Science and Technology*, 70 (13), 1909–1914.
- Moura, M. J., Gil, M. H., & Figueiredo, M. M. (2013). Delivery of cisplatin from thermosensitive co-cross-linked chitosan hydrogels. *European Polymer Journal*, 49 (9), 2504–2510.
- Nair, R., Reddy, B. H., Kumar, C. K. A., & Kumar, K. J. (2009). Application of Chitosan microspheres as drug carriers: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1 (2), 1–12.
- Park, J. H., Saravanakumar, G., Kim, K., & Kwon, I. C. (2010). Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (1), 28–41.
- Patel, M. P., Patel, R. R., & Patel, J. K. (2010). Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences*, 13 (4), 536–557.
- Peng, Z., Li, Z., & Shen, Y. (2012). Influence of chemical cross-linking on properties of gelatin/chitosan microspheres. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 51 (4), 381–385.
- Peng, Z., Li, Z., Shen, Y., Zhang, F., & Peng, X. (2012). Fabrication of Gelatin/Chitosan Microspheres with Different Morphologies and Study on Biological Properties. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 51 (7), 739–743.
- Sahil, K., Akanksha, M., Premjeet, S., Bilandi, A., & Kapoor, B. (2011). Microsphere: A review. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 1 (4), 1184–1198.
- Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., & Dhawan, S. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274 (1-2), 1–33.

BIBLIOGRAFIA

Skop, N. B., Calderon, F., Levison, S. W., Gandhi, C. D., & Cho, C. H. (2013). Heparin crosslinked chitosan microspheres for the delivery of neural stem cells and growth factors for central nervous system repair. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6834–6843.

Solorio, L., Zwolinski, C., Lund, A. W., Farrell, M. J., & Jan, P. (2011). Gelatin microspheres crosslinked with genipin for local delivery of growth factors. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 4 (7), 514–523.

Sonia, T. A., & Sharma, C. P. (2011). Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective. *Advances in Polymer Science*, 243, 23-54.

Wang, Y. M., Sato, H., Adachi, I., & Horikoshi, I. (1996). Optimization of the formulation design of chitosan microspheres containing cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85 (11), 1204–1210

Yoo, J. S., Kim, Y. J., Kim, S. H., & Choi, S. H. (2011). Study on genipin: a new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 44 (3), 197–207.

Yuan, Y., Chesnutt, B. M., Utturkar, G., Haggard, W. O., Yang, Y., Ong, J. L., & Bumgardner, J. D. (2007). The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydrate Polymers*, 68 (3), 561–567.

Zhou, Z., Cao, D., Liu, L., Liu, Q., Zhao, Y., Zeng, W., ... Zhou, J. (2013). Fabrication and Properties of Gelatin/Chitosan Microspheres Loaded with 5-Fluorouracil. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 52 (7), 973–983.

Zhou, Z., Liu, L., Liu, Q., Zhao, Y., Xu, G., Tang, A., Zeng, W., Yi, Q., Yang, Z. & Zhou, J. (2012). Study on Controlled Release of 5-Fluorouracil from Gelatin/Chitosan Microspheres. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 49 (12), 1030–1034.

Zhou, Z., Zhou, J., Liu, L., Yi, Q., Liu, Q., Zeng, W., & Yang, Z. (2012). Fabrication and Characterization of Gelatin/Chitosan Microspheres for Drug Release. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 51(4), 777–785.

Zhu, X., Zhou, D., Guan, S., Zhang, P., Zhang, Z., & Huang, Y. (2012). Preparation and characterization of novel multi-core chitosan microspheres for stomach-specific delivery of hydrophilic antibiotics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23 (4), 983–990.

ANEXOS

ANEXO A

Determinação da curva de calibração

Para determinar a curva de calibração utilizada para quantificar a liberação de fármaco ao longo do tempo, foi utilizada uma solução mãe (CM) de concentração 0,114 mg de 5-FU por mL de PBS. Nesse sentido, foram dissolvidos 5,7 mg de 5-FU em 50 mL de PBS.

Fazendo diluições sucessivas em PBS de CM, obtiveram-se cinco soluções (de 10 mL) de concentrações conhecidas como evidencia a Tabela A.1.

Tabela A.1 – Preparação de soluções diluídas para obtenção da curva de calibração

Solução	Quantidade de CM utilizada (mL)	Concentração obtida (µg/mL)
C1	2	22,8
C2	1,5	17,1
C3	1	11,4
C4	0,5	5,70
C5	0,2	2,28

Cada solução foi analisada no espectrofotômetro, tendo-se obtido um valor de absorvância para cada concentração conhecida. A representação gráfica dos valores de absorvância versus a concentração traduziu-se numa curva de calibração como a representada na Figura A.1.

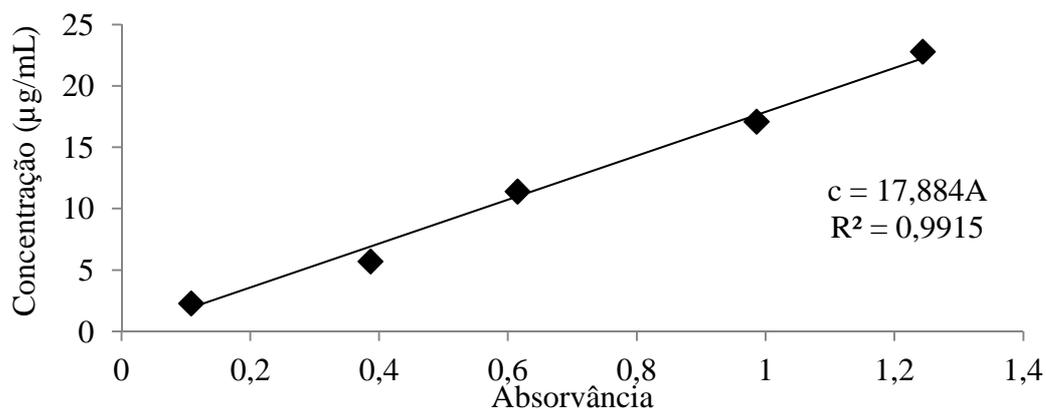


Figura A.1 – Curva de Calibração (Absorvância em função da Concentração da solução, em µg/mL)

A curva obtida passa pela origem, de coordenadas (0,0) uma vez que a lei de Beer-Lambert em que a mesma se baseia estipula uma relação de proporcionalidade directa entre os valores de absorvância e de concentração das soluções. Assim sendo, pela regressão linear realizada, obteve-se uma curva de equação $c = 17,884A$, com um R^2 de 0,9915, bastante próximo de um.

ANEXO B

Dados utilizados para a construção dos histogramas relativos ao diâmetro equivalente das partículas produzidas por cada ensaio efectuado.

Tabela B.1 - Dados de frequência numérica, frequência em % e frequência cumulativa em % para cada intervalo de diâmetro (em μm) – ensaio 1

Diâmetro (μm)	Frequência numérica	Frequência (%)	Frequência cumulativa (%)
4 - 6	42	4,778	4,778
6 - 8	75	8,532	13,311
8 - 10	97	11,035	24,346
10 - 12	134	15,245	39,590
12 - 14	136	15,472	55,063
14 - 16	111	12,628	67,691
16 - 18	82	9,329	77,019
18 - 20	63	7,167	84,187
20 - 22	33	3,754	87,941
22 - 24	31	3,527	91,468
24 - 26	26	2,958	94,425
26 - 28	16	1,820	96,246
28 - 30	6	0,683	96,928
30 - 32	3	0,341	97,270
32 - 34	7	0,796	98,066
34 - 36	6	0,683	98,749
36 - 38	2	0,228	98,976
38 - 40	4	0,455	99,431
40 - 42	1	0,114	99,545
42 - 44	1	0,114	99,659
44 - 46	0	0,000	99,659
46 - 48	2	0,228	99,886
48 - 50	0	0,000	99,886
50 - 52	0	0,000	99,886
52 - 54	1	0,114	100
Total	879	100	-

Tabela B.2 - Dados de frequência numérica, frequência em % e frequência cumulativa em % para cada intervalo de diâmetro (em μm) – ensaio 3

Diâmetro (μm)	Frequência numérica	Frequência (%)	Frequência cumulativa (%)
4 - 6	37	3,565	3,565
6 - 8	81	7,803	11,368
8 - 10	119	11,464	22,832
10 - 12	134	12,909	35,742
12 - 14	168	16,185	51,927
14 - 16	147	14,162	66,089
16 - 18	107	10,308	76,397
18 - 20	77	7,418	83,815
20 - 22	46	4,432	88,247
22 - 24	40	3,854	92,100
24 - 26	29	2,794	94,894
26 - 28	16	1,541	96,435
28 - 30	15	1,445	97,881
30 - 32	7	0,674	98,555
32 - 34	9	0,867	99,422
34 - 36	3	0,289	99,711
36 - 38	0	0,000	99,711
38 - 40	1	0,096	99,807
40 - 42	1	0,096	99,904
42 - 44	0	0,000	99,904
44 - 46	0	0,000	99,904
46 - 48	1	0,096	100
Total	1038	100	-

Tabela B.3 - Dados de frequência numérica, frequência em % e frequência cumulativa em % para cada intervalo de diâmetro (em μm) – ensaio 4

Diâmetro (μm)	Frequência numérica	Frequência (%)	Frequência cumulativa (%)
0 - 2	177	12,334	12,334
2 - 4	398	27,735	40,070
4 - 6	369	25,714	65,784
6 - 8	173	12,056	77,840
8 - 10	92	6,411	84,251
10 - 12	52	3,624	87,875
12 - 14	37	2,578	90,453
14 - 16	28	1,951	92,404
16 - 18	12	0,836	93,240
18 - 20	20	1,394	94,634
20 - 22	11	0,767	95,401
22 - 24	15	1,045	96,446
24 - 26	10	0,697	97,143
26 - 28	10	0,697	97,840
28 - 30	8	0,557	98,397
30 - 32	8	0,557	98,955
32 - 34	7	0,488	99,443
34 - 36	5	0,348	99,791
36 - 38	0	0,000	99,791
38 - 40	1	0,070	99,861
40 - 42	2	0,139	100
Total	1435	100	-

ANEXO C

Dados calculados a partir dos valores de absorvância obtidos pelo espectrofotómetro UV/Visível para cada ensaio efectuado.

Tabela C.1 - Dados determinados a partir dos valores de absorvância obtidos para as microsferas do ensaio I

Tempo (h)	Absorvância	Concentração (µg/mL)	Factor de diluição	Volume (mL)	Massa (µg)	Massa acumulada (µg)	% libertação	% libertação acumulada
0,5	0,653	11,67825	5	10	584	584	82,4	82,4
1	0,3764	6,731538	1	10	67	651	9,5	92,0
1,5	0,1199	2,144292	1	10	21	673	3,0	95,0
2	0,0733	1,310897	1	10	13	686	1,9	96,8
3	0,0713	1,275129	1	10	13	699	1,8	98,6
4	0,0188	0,336219	1	10	3	702	0,5	99,1
6	0,0154	0,275414	1	10	3	705	0,4	99,5
8	0,0026	0,046498	1	10	0	705	0,1	99,6
24	0,0174	0,311182	1	10	3	708	0,4	100,0

Tabela C.2 - Dados determinados a partir dos valores de absorvância obtidos para as microsferas do ensaio II

Tempo (h)	Absorvância	Concentração (µg/mL)	Factor de diluição	Volume (mL)	Massa (µg)	Massa acumulada (µg)	% libertação	% libertação acumulada
0,5	0,8132	14,54327	2	10	291	291	75,0	75,0
1	0,1681	3,0063	1	10	30	321	7,7	82,7
1,5	0,0733	1,310897	1	10	13	334	3,4	86,1
2	0,065	1,16246	1	10	12	346	3,0	89,1
3	0,1099	1,965452	1	10	20	365	5,1	94,2
4	0,0396	0,708206	1	10	7	372	1,8	96,0
6	0,0298	0,532943	1	10	5	378	1,4	97,4
8	0,0296	0,529366	1	10	5	383	1,4	98,7
24	0,0276	0,493598	1	10	5	388	1,3	100,0

Tabela C.3 - Dados determinados a partir dos valores de absorvância obtidos para as microsferas do ensaio III

Tempo (h)	Absorvância	Concentração (µg/mL)	Factor de diluição	Volume (mL)	Massa (µg)	Massa acumulada (µg)	% libertação	% libertação acumulada
0,5	0,7906	14,13909	2	10	283	283	86,0	86,0
1	0,0968	1,731171	1	10	17	300	5,3	91,2
1,5	0,0376	0,672438	1	10	7	307	2,0	93,3
2	0,0262	0,468561	1	10	5	312	1,4	94,7
3	0,0609	1,089136	1	10	11	322	3,3	98,0
4	0	0	1	10	0	322	0,0	98,0
6	0,0262	0,468561	1	10	5	327	1,4	99,4
8	0,0016	0,028614	1	10	0	327	0,1	99,5
24	0,0086	0,153802	1	10	2	329	0,5	100,0

