

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” – CAMPUS DE BOTUCATU
Instituto de Biociências

LECIO LEONARDO LUVEZUTI

SÍNTESE DE MICROESFERAS DE QUITOSANA PARA
APLICAÇÃO EM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS PELO
MÉTODO DE ATOMIZAÇÃO E COAGULAÇÃO

Monografia de conclusão de
Curso apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Física Médica

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Margarida Juri Saeki
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA –IBB-UNESP

Botucatu, Novembro de 2010

RESUMO

A quitosana é um polímero natural biodegradável com grande potencial para aplicações farmacêuticas devido à sua biocompatibilidade, alta densidade de carga, não-toxicidade e adesão ao muco. A formação de gel pode ser obtida pela interação da quitosana com contra-íons de baixo peso molecular como polifosfatos, sulfatos, e reticulação com glutaraldeído. Essa propriedade de formar gel da quitosana dá origem a uma vasta gama de aplicações como o encapsulamento de fármacos e produtos alimentícios, imobilização de agentes bioquímicos, células, microorganismos e algas. Uma de suas principais aplicações está na síntese de microesferas, com o objetivo de encapsular fármacos, partículas magnéticas, e outras substâncias de modo a construir sistemas de liberação controlada de drogas em locais específicos de sistemas biológicos ("targeted drug delivery"). Neste trabalho, foi empregado um método de síntese das microesferas citadas. Em particular, aplicamos o método de atomização e coagulação. As microesferas assim sintetizadas foram caracterizadas por microscopia óptica de varredura.

Palavras-Chave: Quitosana, microesferas, atomização.

ABSTRACT

Chitosan is a natural biodegradable polymer with great potential for pharmaceutical applications due to its biocompatibility, high charge density, non-toxicity and mucoadhesion. Gel formation can be obtained by the interactions of chitosans with low molecular counterions such as polyphosphates, sulphates and crosslinking with glutaraldehyde. This gelling property of chitosan allows a wide range of applications such as coating of pharmaceuticals and food products, gel entrapment of biochemicals, whole cells, microorganisms and algae. One of its main applications is the synthesis of microspheres for coating of pharmaceuticals, magnetic particles and other substances. In such a way, we can build targeted drug delivery systems. In the present work, we applied the method of spraying and coagulation. The resulting microspheres, then, were characterized by optical microscopy.

Keywords: chitosan, microspheres, atomization.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	1
1.2 Preparação das micro-partículas de quitosana.....	7
2. Objetivos	8
3. Procedimento Experimental	9
4. Resultados e Discussão	10
5. Conclusão	13
6. Referências Bibliográficas	14

1.INTRODUÇÃO

A quitosana, um biopoliaminosacarídeo linear, é obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, a qual é o segundo polissacarídeo mais abundante depois da celulose (MUZZARELLI, 1977, ROBERTS, 1992). A quitina é o principal componente das cutículas protetoras de crustáceos como caranguejos, camarões e lagostas e paredes celulares de alguns fungos tais como *aspergillus* e *mucor*. A quitina é um polímero constituído pela cadeia linear β -(1,4)-N-acetil-glucosamina, ao passo que a quitosana, por copolímeros de glucosamina e N-acetil-glucosamina (KAS, 1997, SINGLA, CHAWLA, 2001, KATO et al, 2003). A quitosana tem um grupo amina primário e dois grupos hidroxila livres para cada unidade da cadeia, como mostra a figura a seguir:

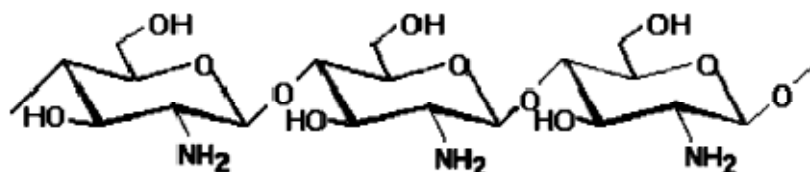


Figura 1. Estrutura da quitosana. Adaptado do trabalho de (SINHA et al, 2004)

Devido à fácil disponibilidade de grupos amino livres na quitosana, ela adquire carga positiva em pH neutro ou ácido, pela protonação da unidade de glucosamina e conversão na forma solúvel de $R-NH_3^+$, que reage com superfícies, polímeros ou espécies carregadas negativamente. O grupo amino também interage com íons metálicos como cobalto e outros metais (ONSOYEN, SKAUGRUD, 1990), quando esta na forma não protonada, formando quelatos (composto de coordenação) pela ligação covalente do par de elétrons do grupo amino e metais de transição (FUKUDA, 1980). É uma base fraca, insolúvel em água e solventes orgânicos, mas é solúvel em soluções aquosas ácidas diluídas ($pH < 6.5$) pelo motivo já exposto. Ela se precipita em soluções alcalinas ou com poliânions e formam gel a pH intermediário. Tem um peso molecular médio que varia entre 3800 e 2000000 e o grau de desacetilação varia de 66 a 95% (KAS, 1997). O processo de desacetilação envolve a retirada de grupos acetil (CH_3-CO-) da cadeia molecular da quitina, com a conseqüente formação de grupos amina livres ($-NH_2$). O grau de desacetilação determina, portanto, a percentagem de grupos amina livres na cadeia polimérica. Trata-se de um parâmetro relevante, pois tem influência na versatilidade da quitosana em muitas de suas aplicações e principalmente, em sistemas de liberação controlada baseados em microesferas. Ao serem protonados em soluções aquosas ácidas, conforme supramencionado, os grupos amino livres determinam o caráter catiônico da quitosana. E essa propriedade é importante, entre outros motivos, por permitir reações de reticulação iônica com ânions multivalentes e porque determina a

a capacidade de adesão ao muco (AGNIHOTRI et al, 2004). Esses dois últimos aspectos serão explicados melhor mais adiante.

Propriedades como biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade tornam a quitosana adequada para aplicações biomédicas e farmacêuticas (CHANDY, SHARMA, 1990, ILLUM et al., 2001). Algumas dessas aplicações podem ser citadas: tratamento de úlceras e efeito antiácido (ITO et al., 1997), cicatrização de feridas e queimaduras (TACHIHARA et al., 1997), imobilização de enzimas e células vivas em oftalmologia (FELT et al., 1999). Entre as aplicações farmacêuticas, ela tem sido usada como veículo para comprimidos (KRISTMUNDSDOTTIR et al., 1995, SABNIS et al., 1997, ILLUM, 1998), como diluente para melhorar a taxa de dissolução e biodisponibilidade de drogas insolúveis em água, e como carreador de droga para sistemas de liberação controlada (KAWASHIMA et al., 1985^a, MIYAZAKI et al., 1990, AKBUGA, 1993, KRISTL et al., 1993).

Uma outra propriedade é a mucoadesividade (LEHR et al., 1992, NEEDLEMAN, SMALES, 1995, RILLOSI, BUCKTON, 1995; HE et al., 1988, SHIMODA et al., 2001, KOCKISCH et al., 2003) devido às forças eletrostáticas atrativas existentes entre as cargas positivas em suas moléculas e as negativas disponíveis nas superfícies mucosas. A adesividade às superfícies mucosas é desejável, pois o tempo de residência maior no sítio de absorção de droga acentua o gradiente de concentração a favor da difusão da droga. Deve-se ressaltar ainda a capacidade de se aderir a locais específicos, de modo a aumentar a biodisponibilidade da droga.

A quitosana é biocompatível com tecidos vivos pois não causa reações alérgicas ou rejeição. Ela se decompõe lentamente em produtos não tóxicos (amino açúcares), que são completamente absorvidos pelo corpo humano (NICOL, 1991) Ela se degrada sob a ação de fermentos, sendo assim facilmente removida do organismo sem causar efeitos colaterais. Possui atividade anti- microbiana, absorve metais tóxicos como mercúrio, cádmio e chumbo e, além disso, tem boa adesão, atua na imunoestimulação e tem capacidade de coagulação (AGNIHOTRI et al, 2004). Conforme foi constatado por (WANG et al, 2008), micro-esferas de quitosana podem diminuir o tempo de coagulação e induzir a adesão e ativação de plaquetas.

Pelo exposto, a quitosana apresenta muitas vantagens para o desenvolvimento de micro e nanopartículas. Tais vantagens incluem: habilidade para controlar a liberação de fármacos, evita o uso de solventes orgânicos tóxicos durante o processo de síntese (já que ela é solúvel em soluções aquosas ácidas), ser uma cadeia linear rica em grupos amina disponíveis para reações de reticulação e boa capacidade de adesão ao muco.

Revestimentos de superfície são um componente integrante das plataformas de nano-partículas magnéticas para aplicações biomédicas. Nano - partículas

magnéticas tem uma significativa tendência a aglomerar como resultado de sua alta energia de superfície. A estabilização eletrostática coloidal que advém da repulsão de cargas de superfície nas nano - partículas não é adequada para prevenir agregação em soluções biológicas devido à presença de sais e outros eletrólitos que podem neutralizar essa carga. Ademais, quando injetadas na corrente sanguínea, as superfícies das nano - partículas magnéticas estão sujeitas a adsorção de proteínas plasmáticas, ou opsonização (ataque de células de defesa), como primeiro passo na sua metabolização pelo RES (sistema retículo endotelial). Evitar a captação pelo RES e manter uma longa meia-vida no plasma é um imperativo para muitas aplicações de nano - partículas magnéticas em medicina (BERRY, CURTIS, 2003). O desenvolvimento de revestimentos de superfície é, dessa forma, essencial. Dentre as aplicações biomédicas, uma das principais é o tratamento de locais específicos de um sistema biológico, usando carreadores magnéticos (WIDDER, SENYEI, SCARPELLI, 1978). As principais vantagens são a redução da dosagem de droga requerida para o tratamento e, ao mesmo tempo, dos efeitos colaterais associados a tal dosagem devido a utilização mais localizada da droga, não atingindo células saudáveis. Nesse tipo de terapia, uma droga citotóxica é ligada a um carreador magnético biocompatível. Esse conjunto carreador/droga é, então, injetado no sistema circulatório do paciente. Ao atingirem a corrente sanguínea, campos magnéticos externos são usados para concentrar o conjunto em um sítio específico no organismo, tal como mostra a figura 2:

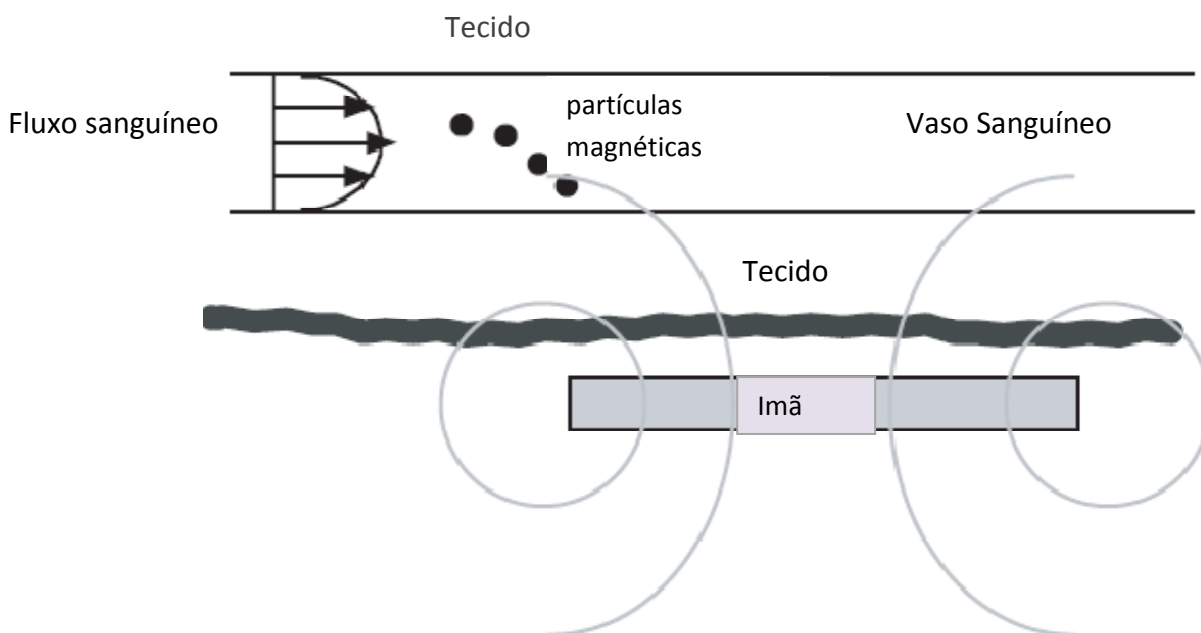


Figura 2: Representação teórica de um sistema magnético de entrega de droga (“drug delivery”). Adaptado do trabalho de PANKHURST et al, (2003).

A quitosana é um polímero catiônico, hidrofílico e também não tóxico, biocompatível e bioabsorvível, o que a tornou um material bastante utilizado em aplicações de drug delivery recentemente (CALVO, ALONSO, 2001).

Esse fato se deve principalmente à sua grande abundância na natureza, biocompatibilidade e facilidade de funcionalização. A funcionalização compreende aumentar a especificidade do carreador de droga, conjugando a este grupos funcionais que se ligam a receptores específicos presentes na membrana plasmática de células – alvo (VEISEH, GUNN, ZHANG, 2009). Recobrimentos poliméricos produzem uma barreira estéril para prevenir a aglomeração de nano - partículas e evitar a opsonização. Além disso, esses recobrimentos promovem um meio de adequar as propriedades de superfície das nano – partículas como carga de superfície e funcionalização química.

Micro - esferas grandes ($> 100\mu\text{m}$) de quitosana preparadas pelo método de emulsão foram usadas para entregar, por diferentes rotas, o anti-inflamatório diclofenaco de sódio (ACIKGOZ et al., 1996), o agente anti-neoplásico mitoxantrona (JAMEELA, JAYAKRISHNAN., 1995) e outros agentes ativos, tais como furosemida (AKBUGA, DURMAZ, 1994), teofilina, griseofulvina e aspirina (THANOO et al., 1992). Para todas as drogas, um perfil de liberação controlada foi detectado. Micro esferas pequenas de quitosana ($<10\mu\text{m}$) foram também desenvolvidas para entrega específica de drogas anti - câncer, tais como oxantrozol (HASSAN et al., 1992).

1.2. Preparação de micro partículas de quitosana

Ao reagir quitosana com quantidades controladas de ânions multivalentes, ocorre a reação de reticulação (“crosslinking”) entre as moléculas do polímero. A reticulação pode ser alcançada em meio ácido, neutro ou básico dependendo do método utilizado. Esse tipo de reação tem sido muito utilizada para a preparação de microesferas de quitosana. Ela consiste na reação de ligação, covalente ou iônica, entre uma cadeia polimérica e outra. A reação de reticulação da quitosana tratada com glutaraldeído pode ser visualizada na figura 3. Preocupações a respeito da desintegração de micropartículas de quitosana tem levado pesquisadores a modificarem-nas quimicamente pela reação de

reticulação. Dessa forma, elas tornam-se estruturas mais rígidas e, assim, é possível a sua aplicação como material de recobrimento em sistemas de liberação controlada (GONÇALVES, LARANJEIRA, FÁVERE, 2005). Existem diversos processos para esta síntese: gelatinização ionotrópica (SAWAYANAGI et al, 1983), inversão da fase úmida (MI et al, 1999), emulsificação e gelificação ionotrópica (LIM et al.,1997), coacervação (BERTHOLD et al.,1996^a), entre outros. Dentre estes, temos o método de atomização e coagulação (TORRES et al., 2007), utilizado no presente trabalho.

2. Objetivo

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi sintetizar micro – partículas de quitosana pelo método de atomização e coagulação, visando a obtenção de micro – esferas com boa morfologia e, assim, o aperfeiçoamento do método.

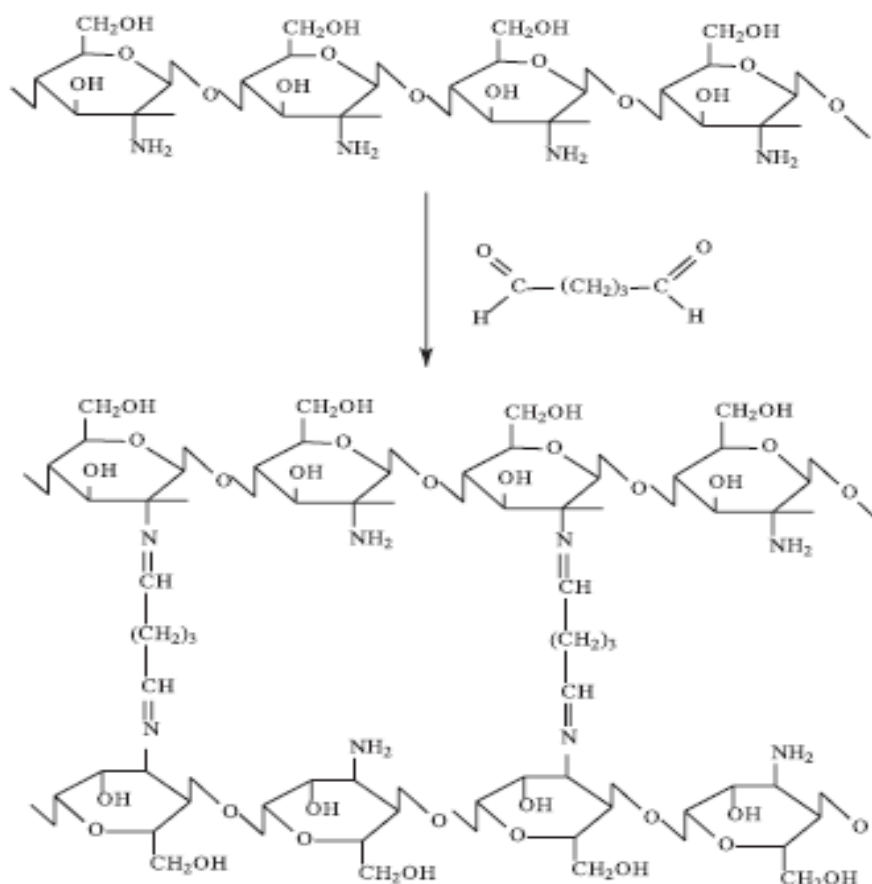


Figura 3: Processo de reticulação da quitosana tratada com glutaraldeído. Adaptado do trabalho de (GONÇALVES, LARANJEIRA, FÁVERE, 2005).

3. Materiais e métodos

A quitosana grau técnico com, no mínimo 85% de desacetilação, foi adquirida da Sigma-Aldrich (E.U.A, número de produto 068K0075). A solução de quitosana foi preparada dissolvendo-se uma massa suficiente para obter uma solução a 2,5%, em solução acética a 5% em massa. OS flocos hidratados nesse meio foram dissolvidos mantendo-se sob agitação por 48h a temperatura ambiente até a completa solubilização. A solução resultante foi filtrada sob vácuo a 60°C, utilizando um filtro de placa sinterizada G3, para remoção de traços de material insolúvel, obtendo-se, assim, um filtrado viscoso, claro e homogêneo. O filtrado foi pulverizado por um bico (“spray”) sobre solução coagulante com a seguinte concentração: 0.1M (figura 3) para a produção de microglóbulos. Os microglóbulos permaneceram em contato com a solução coagulante de NaOH por 12 horas para completar a coagulação e produzir uma estrutura capaz de manter a sua integridade. O processo de coagulação produziu uma rede tridimensional (“network”) que dá porosidade diferente à partícula de acordo com a concentração de NaOH na solução coagulante. As partículas, após a completa coagulação, possuem água permeada nos seus retículos e um aspecto branco opalescente, devido ao espalhamento de luz pelos poros microscópicos existentes. A solução coagulante foi drenada usando malhas de aço inoxidável com abertura de 90 a 150µm.

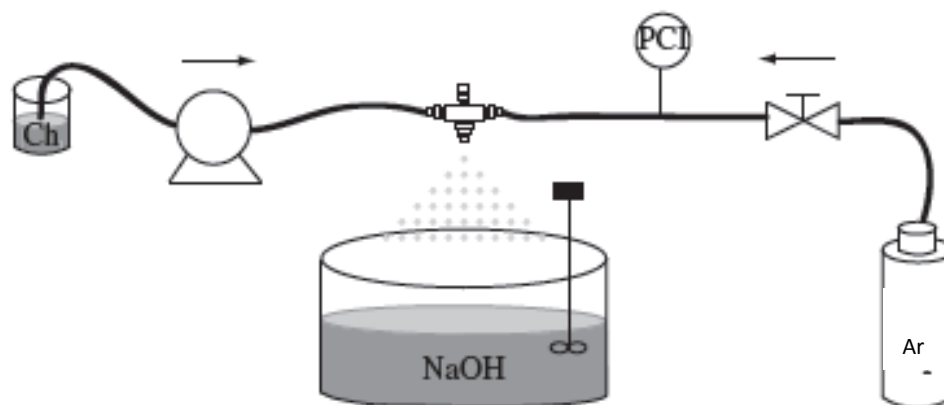


Figura 3: Representação esquemática do método de atomização e coagulação. Adaptado do trabalho de TORRES et al. (2007)

As partículas foram então coletadas e lavadas com água deionizada ($0,14 \text{ K}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). Os seguintes parâmetros podem influenciar na preparação das microesferas e em suas características: temperatura da solução de quitosana, viscosidade desta, pressão do atomizador, altura em relação à solução coagulante, abertura do bico de atomização (TORRES et al., 2007). Nos experimentos deste trabalho, os seguintes valores foram usados: temperatura ambiente para a solução de quitosana (25°C), concentração de $0,025\text{g/mL}$ (influencia na viscosidade), pressão de $4,57 \text{ kgf/cm}^2$, altura de 50cm , abertura de 0.5mm .

4. Resultados e Discussão

As micro – esferas obtidas são não – magnéticas, porém existem muitos trabalhos em que foram sintetizadas micro – esferas magnéticas, como mostram (DENKBAS et al., 2002), (HASSAN, PARISH, GALLO, 1992) e outros estudos. As micrografias foram obtidas por microscopia óptica e podem ser vistas a seguir:

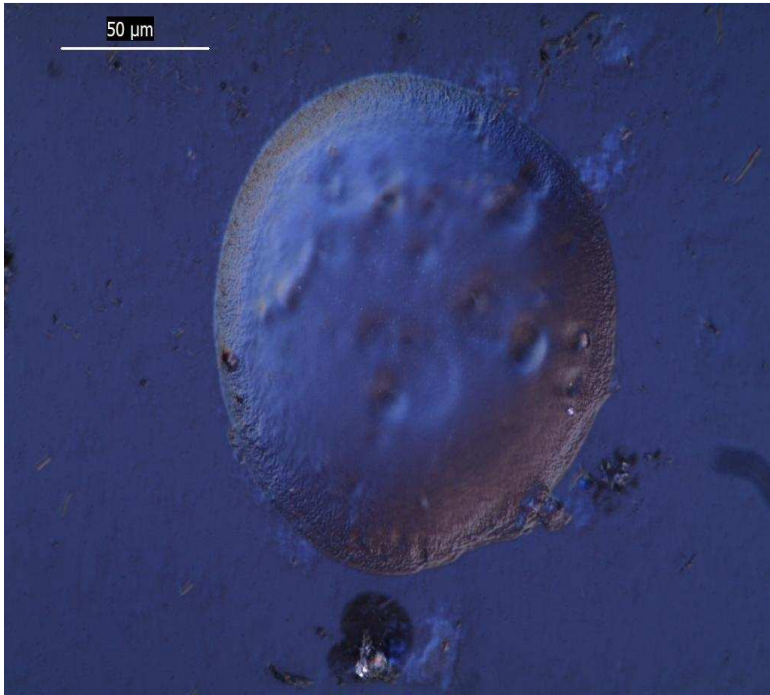


Figura 4: Micrografia mostrando as microesferas sintetizadas



Figura 5: Micrografia mostrando as micro – esferas sintetizadas

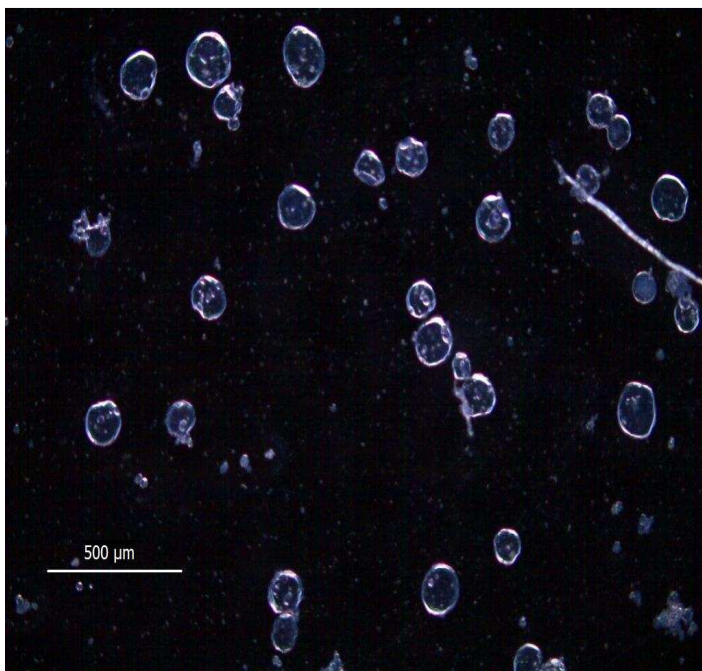


Figura 6: Micrografias mostrando as micro - esferas sintetizadas.

A esfericidade das micro – esferas assim obtidas são boas, se comparadas a resultados a outros estudos realizados com este método de síntese. A reação de reticulação não foi empregada, o que poderia resultar em um grau de esfericidade melhor. Comparando-se com os resultados obtidos por (TORRES et al, 2007), a altura do bico de atomização em relação à solução coagulante foi maior, parâmetro esse que pode ter dado origem a partículas mais esféricas sem a necessidade de reticulação. Agentes de reticulação podem induzir reações químicas com medicamentos que possam ser carregados pelas micro - esferas (SUNIL, MALLIKARJUNA, AMINABHAVI, 2004). Além disso, estes podem ser tóxicos , como o glutaraldeído, o que tem causado muitas restrições no meio farmacêutico com relação ao uso de micro – esferas de quitosana submetidas a reações de reticulação (OLIVEIRA, SANTANA, RÉ, 2005). Sendo assim, o presente trabalho foi bem sucedido, já que não foram utilizados agentes de reticulação e foram produzidas micro – esferas com boa morfologia e tamanho, em comparação ao trabalho de (KUMBAR, AMINABHAVI, KULKAMI, 2002). Uma outra desvantagem na utilização de reticulação é que ela diminui o potencial zeta das microesferas (HE, DAVIS, ILLUM 1999), conseqüentemente afetando a capacidade destas de aderirem ao muco (mucoadesividade) (DHAWAN, SINGLA, SINHA, 2004) que, como já foi citado, é uma importante característica de sistemas de liberação controlada.

Segundo (TORRES et al., 2007), os valores ótimos dos parâmetros aqui considerados do método de atomização e coagulação para a obtenção das micro – esferas são os seguintes:

Parâmetros	Valores
Concentração da solução de quitosana	0,025 g.mL ⁻¹

Temperatura da solução de quitosana	25 °C
Abertura do bico de atomização	1 mm
Altura (bico – solução de NaOH)	30 cm
Pressão do gás atomizador	2,5 kgf.cm ⁻²

Tabela 1: Condições otimizadas para a produção de micro – partículas de quitosana. (TORRES et al., 2007)

Neste trabalho, os valores utilizados foram os seguintes :

Parâmetros	Valores
Concentração da solução de quitosana	0,025 g.mL ⁻¹
Temperatura da solução de quitosana	25 °C
Abertura do bico de atomização	0,5 mm
Altura (bico – solução de NaOH)	50 cm
Pressão do gás atomizador	4,57 kgf.cm ²

Tabela 2: Parâmetros e valores utilizados no procedimento de atomização e coagulação.

Como se pode notar, os três últimos parâmetros foram modificados. No trabalho de (TORRES et al., 2007), o tamanho médio das micro –esferas obtidas foi entre 140 e 281µm. Neste estudo, observando-se as micrografias mostradas, o tamanho obtido foi menor. Tal fato deve-se, principalmente, à pressão utilizada para o gás atomizador ter sido maior, quase o dobro, no caso. No estudo acima mencionado, foi construída uma superfície relacionando a variação do fluxo da solução de quitosana (mL/min), pressão do gás atomizador (kgf/cm²) ao diâmetro das microesferas (µm). Ao observar tal superfície, pode-se notar que, fixando-se um valor para o fluxo, o aumento da pressão acarreta uma diminuição no diâmetro. Temos assim que os resultados aqui apresentados estão em concordância com este comportamento.

Embora as micro – esferas aqui sintetizadas não tenham tamanho nanométrico, é possível inferir, pela análise da superfície acima mencionada, que os parâmetros operacionais tais como pressão do gás atomizador e fluxo da solução de quitosana sejam aumentados até a obtenção de partículas na escala do nanômetro. Neste trabalho, as limitações dos equipamentos utilizados não permitiram o aumento dos parâmetros a tais níveis.

5. Conclusão

O método de atomização e coagulação se mostrou bastante eficiente neste trabalho. Foram produzidas micro – esferas com boa esfericidade, distribuição de tamanho relativamente uniforme e superfície levemente rugosa. A modificação dos parâmetros de otimização usados em (TORRES et al, 2007), particularmente a altura do bico de atomização em relação à solução coagulante, abertura deste e a pressão do gás de atomização foram bem sucedidos, o que permitiu a síntese de micro – partículas com melhor morfologia sem a necessidade do uso de agentes de reticulação.

Referências bibliográficas

PANKHURST, Q.A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics.**, v.36, p. 167-181, junho 2003. Disponível em: <http://stacks.iop.org/JPhysD/36/R167>. Acesso em: 15 abr. 2010.

HE, P. et al, Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics.**, v.187, p. 53-65, junho 1998. Disponível em: <http://w.w.w.elsevier.com/locate/promis>. Acesso em: 17 mar. 2010.

SINHA, V.R. et al, Chitosan microspheres as a potential Carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics.**, v.274, p. 1-33, dezembro 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.12.026> Acesso em: 11 mar. 2010

VEISEH, O. et al, Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v.62, p.284-304, outubro 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.002> Acesso em: 14 fev. 2010

SUN, C. et al, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v.60, p.1252-1265, março 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.018> Acesso em: 25 mar. 2010

<http://en.wikipedia.org/wiki/cross-link> Acesso em 02 dez. 2010

GONÇALVES, L. et al, Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of dilofenac sodium. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n^o1, p.6-12, 2005.

AGNIHOTRI, A.S. et al, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.100, p.5-28, agosto 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010> Acesso em: 23 mar. 2010.

DHAWAN, D. et al, Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan prepared by different methods. **AAPS PharmSciTech**, v.5, n^o67, p.1-7, Júlio 2004. Disponível em: <http://www.aapspharmstech.org.br> Acesso em: 28 abr. 2010.

TORRES, A.M. et al, Production of chemically modified chitosan microspheres by a spraying and coagulation method. **Materials Research**, v.10, n^o4, p.347-352, setembro 2007.

KALUT, A.S. **Enhancement of degree of deacetylation of chitin in chitosan production**. 2008. 37f. Tese (Monografia) – Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources, University Malaysia Pahang, 2008.

WANG, Z.Q. et al, Preparation and blood coagulation evaluation of chitosan microspheres. **J Mater Sci: Mater Med**, v.19, p.1371-1377, outubro 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-007-3243-y> Acesso em: 2 dez. 2010.