

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

*Síntese e caracterização de bionanocompósitos
magnéticos para liberação controlada de fármacos*

LÍGIA NUNES DE MORAIS RIBEIRO
SÃO CARLOS-SP
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

*Síntese e caracterização de bionanocompósitos
magnéticos para liberação controlada de fármacos*

Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

Tese de doutorado apresentada no programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos à obtenção do título de doutor em Biotecnologia, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento.

Orientadores: Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira
Dr. Paulo Sérgio de Paula Hermann Jr.

São Carlos-SP
2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R484sc

Ribeiro, Lígia Nunes de Moraes.

Síntese e caracterização de bionanocompósitos magnéticos para liberação controlada de fármacos / Lígia Nunes de Moraes Ribeiro. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 120 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biotecnologia. 2. Nanotecnologia. 3. Microesferas. 4. Biomateriais. 5. Biopolímeros. 6. Argila. I. Título.

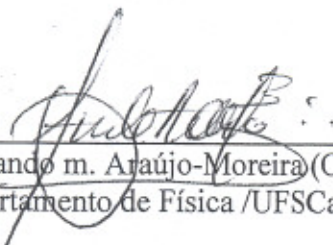
CDD: 660.6 (20^a)

Lígia Nunes de Moraes Ribeiro

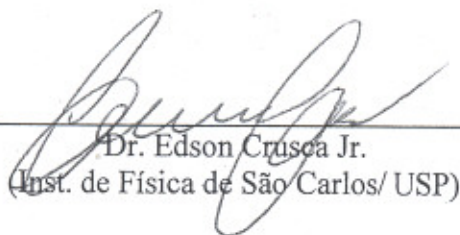
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 08/02/2013

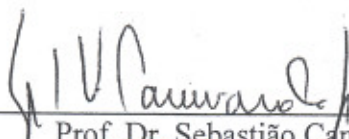
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fernando m. Araújo-Moreira (Orientador)
(Departamento de Física /UFSCar)



Dr. Edson Crusca Jr.
(Inst. de Física de São Carlos/ USP)



Prof. Dr. Sebastião Canevarolo Jr.
(DeMA/ UFSCar)



Prof.ª Dr.ª Ana Maria Minarelli Gaspar
(UNESP/ Araraquara)



Dr.ª Juliana Sposto Avaca Crusca
(Inst. de Física de São Carlos/ USP)

“... Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso ser nada.
À parte isso,
tenho em mim todos os sonhos do mundo ...”

Álvaro de Campos (F.P.)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira e Dr. Paulo Sérgio de Paula Hermann Jr., pelo apoio, confiança e amizade, além de ensinamento constante que possibilitou a realização deste trabalho.

A todo grupo do Instituto de Ciencias de Materiales de Madrid, sob supervisão do Dr. Eduardo Ruiz-Hitzky, que me receberam de braços abertos, propiciando meu amadurecimento científico. A pesquisadora Margarita Darder, que sempre esteve disposta a me ensinar e ajudar durante minha estada em Madri. E, em especial, a minha grande amiga e cientista “brasinholá” Ana Alcântara, que compartilhou incansavelmente comigo sua experiência e enorme conhecimento científico, além de ter sido a pessoa mais especial que conheci durante meu estágio, jamais me esquecerei desta amiga maravilhosa.

Aos amigos do ICMM que de alguma forma me auxiliaram em minha pesquisa, além da amizade e momentos felizes que compartilhamos.

A Rafaella Takehara pela prestatividade constante, no auxílio das práticas laboratoriais e pela amizade.

A Renamed/CAPES e PDSE/CAPES pelo auxílio financeiro disponibilizado durante meu doutorado.

Ao grupo GMD pela síntese do grafite magnético e a Embrapa Instrumentação pela possibilidade de utilização de sua infraestrutura, e a todas as técnicas que sempre gentilmente me auxiliaram e ensinaram.

A minha mãe Vera Nunes e madrinha Maria Alice Nunes Mazzi, que nunca mediram esforços para que eu realizasse este sonho, além de todo amor, carinho e apoio constantes em minha caminhada. Aos meus irmãos, que acreditaram e confiaram em mim.

Ao meu companheiro Vinícius Dantas, pela sua doce companhia, apoio e paciência em meus momentos difíceis, além de compartilhar constantemente seu elevado conhecimento, e, sobretudo, amor à ciência.

Aos meus companheirinhos Pagu e B.B. King (†) por alegrarem a minha vida.

A todos que contribuíram com sugestões, metodologia, análises, equipamentos, críticas e sugestões.

A todos, o meu profundo muito obrigada.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
I-INTRODUÇÃO	1
I-1. Liberação controlada de fármacos.....	2
I-2 Materiais como matrizes para encapsulamento de fármacos.....	5
I-2.1. Polímeros.....	6
I-2.1.1. Quitosana.....	7
I-2.1.2 Pectina.....	11
I-2.1.3 Alginato.....	14
I-2.2 Materiais Orgânico-Inorgânicos e Magnéticos.....	15
I-2.2.1 Hidróxidos Duplos Lamelares.....	17
I-2.2.2 Grafite Magnético.....	19
I-3. Justificativas.....	21
II- OBJETIVOS	21
III-PARTE EXPERIMENTAL	23
III-1. Reagentes de partida.....	23
III-2. Preparação dos materiais.....	24
III-2.1. Síntese de hidróxidos duplos lamelares de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e $AlCl_3 \cdot 6H_2O$	24
III-2.2. Curva analítica do 5-ASA.....	25
III-2.3. Curva analítica do IBU	25
III-2.4. Intercalação de 5-ASA e IBU em HDL.....	25

III-2.5. Método de coprecipitação.....	26
III-2.6. Preparação dos biopolímeros: quitosana, pectina e alginato.....	27
III-2.7. Preparação do grafite magnético pré-sintetizado.....	28
III-3. Ensaio <i>in vitro</i> de mucoadesão de quitosanas por mucina.....	28
III-4. Preparação das microesferas.....	29
III-4.1. Preparação das microesferas à base de quitosana/pectina- HDL e 5-ASA.....	29
III-4.2. Preparação das microesferas à base de alginato/grafite magnético HDL-IBU...30	
III-4.3. Preparação de películas à base de alginato/grafite magnético – HDL-IBU.....	30
III-5. Técnicas de caracterização composicional, morfológica e estrutural.....	31
III-5.1. Difração de raios-X (DRx).....	31
III-5.2. Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	31
III-5.3. Análises térmicas: diferencial e termogravimétrica (DTA/TGA).....	31
III-5.4. Análise química elementar.....	32
III-5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo.....	32
III-6. Estudos das propriedades dos materiais bio-híbridos.....	33
III-6.1. Determinação da quantidade de 5-ASA e IBU intercalado e da eficiência de encapsulação dos complexos formados.....	33
III-6.2. Ensaio <i>in vitro</i> de liberação de 5-ASA e IBU.....	34
III-6.3. Estudos <i>in vitro</i> da capacidade de absorção de água.....	35
III-6.4. Estudo das propriedades mecânicas de resistência à tração e deformação específica das películas à base de alginato/grafite magnético.....	36
III-6.5. Estudo da variação da espessura de película dos materiais à base de alginato/grafite magnético em função do tempo.....	37
CAPÍTULO 1. Síntese de hidróxidos duplos lamelares.....	38
CAPÍTULO 2. Preparação de microesferas à base de quitosana/pectina para liberação controlada de 5-ASA.....	45

CAPÍTULO 3. Preparação de microesferas à base de alginato/grafite magnético para a liberação controlada de IBU.....	68
CAPÍTULO 4. Preparação de películas a base de alginato/grafite magnético para a liberação controlada de IBU.....	91
III-CONCLUSÕES GERAIS.....	105
IV-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico ilustrativo da variação da concentração plasmática do fármaco quando administrado pelo sistema tradicional (a) e pelo sistema de liberação controlada (b), onde A são as multidosagens.....	3
Figura 2. Esquema ilustrativo das principais fontes de quitosana, sua estrutura linear e as principais aplicações nos setores biomédico e alimentício	9
Figura 3. A) Fórmula química geral da cadeia polimérica da pectina; e B) Esquema representativo do complexo formado do tipo “ <i>egg box</i> ” na presença de íons cálcio	13
Figura 4. A e B) Estrutura homopolimérica M e G do alginato; logo abaixo, a estrutura geral do heteropolímero em uma sequência M-G-M.....	14
Figura 5. Representação esquemática do HDL, sua composição interlaminar e suas lâminas octaédricas, onde os átomos metálicos se encontram no centro, e nos vértices estão os átomos de oxigênio.....	18
Figura 6. A) Curvas de magnetização mostrando o efeito do tratamento químico sobre o grafite e B) detalhe da curva de magnetização vs. temperatura para a amostra tratada, mostrando a temperatura Curie em $T \approx 203$ K.....	20
Figura 7. Sistema de síntese de HDL/5-ASA por co-ppt no equipamento Dosino.....	27
Figura 8. Microanálise semiquantitativa por EDS, ilustrando a proporção de Mg-Al do HDL sintetizado através de um difratograma (a) e da porcentagem aproximada dos metais presentes na amostra, além de sua morfologia superficial (b)	39
Figura 9. Difratograma de raios-x do HDL MgAl-Cl ⁻	40
Figura 10. Curvas de TGA e DTA do híbrido sintetizado HDL MgAl-Cl ⁻	43
Figura 11. Espectro da região de $4000-500$ cm ⁻¹ do infravermelho correspondente ao HDL.....	44
Figura 13. Curva analítica do 5-ASA em solução tampão pH 1,2 e 6,8	47
Figura 14. DRX do HDL de partida e do HDL/5-ASA obtido por coprecipitação	48
Figura 15. Esquema de uma possível orientação do 5-ASA em sua forma aniônica por entre as lâminas de HDL formando uma bicamada	49
Figura 16. Espectros da região $4000-500$ cm ⁻¹ do FTIR correspondentes ao HDL, HDL/5-ASA e 5-ASA	51

Figura 17. Curvas de TGA e DTA obtida em atmosfera de ar (fluxo 100mL/min) para o HDL intercalado com 5-ASA, para o 5-ASA e HDL puros, vistos de cima para baixo	52
Figura 18. Absorção de mucina por quitosana em três massas molares distintas.....	53
Figura 19. Espectro FTIR da região 4000-500 cm^{-1} correspondentes a quitosana (A), quitosana/HDL/5-ASA (B), quitosana/HDL/5-ASA/pectina (C) e pectina (D).....	56
Figura 20. Curvas de TGA e DTA obtidas para as microesferas de quitosana/pectina: quitosana (A), quitosana/HDL/5-ASA (B), pectina (C) e quitosana/HDL/5-ASA/pectina (D).....	58
Figura 21. Imagens de FE-SEM das microesferas: quitosana/HDL/5-ASA (a) e quitosana/HDL/5-ASA/pectina (b,c,d).....	59
Figura 22. Curvas de absorção de água em função do tempo de contato das microesferas baseados nos biopolímeros quitosana/pectina, formando complexos binários ou ternários em pH 1,2 e 6,8.....	63
Figura 23. Perfis de liberação de 5-ASA dos diferentes complexos binários (A) e dos diferentes complexos ternários (B) sintetizados, simulando a passagem do fármaco pelo trato gastrointestinal (em função do pH e do tempo) a 37°C.....	66
Figura 24. Curva analítica do IBU utilizando como solvente água pH 5,5.....	69
Figura 25. Curva analítica do ibuprofeno utilizando como solvente solução tampão fosfato pH 6,8.....	70
Figura 26. DRx do HDL de partida e do HDL/IBU obtido por coprecipitação.....	71
Figura 27. Esquema de uma possível orientação do ibuprofeno por entre as lâminas de HDL formando uma bicamada	72
Figura 28. Espectro FTIR da região 4000-500 cm^{-1} correspondentes ao HDL e IBU puro e ao híbrido HDL/IBU, visualizados de baixo para cima	73
Figura 29. Curvas de TGA e DTA obtidas para os seguintes materiais de baixo para cima: HDL, IBU e HDL/IBU	74
Figura 30. Grafite magnético disperso em água ultrapura em específica concentração, acompanhado de resposta positiva ao campo magnético externo aplicado	75
Figura 31. Filmes obtidos pelos complexos sintetizados: a) HDL-IBU/ALG e b) HDL-IBU/ALG/GM	76
Figura 32. Aspecto das microesferas à base de alginato/GM recém-sintetizadas.....	76

Figura 33. Espectro FTIR da região 4000-500 cm ⁻¹ onde: a) alginato, b) grafite magnético, c) microesfera de alginato e grafite magnético e d) microesfera de HDL-IBU/ALG/GM.....	77
Figura 34. Curvas de TGA e DTA realizadas em ar sintético obtidas para os seguintes materiais: a) alginato, b) grafite magnético, c) alginato/grafite magnético e d) HDL-IBU/ALG/GM.....	80
Figura 35. Imagens de MEV em dois diferentes aumentos das microesferas: a) HDL-IBU/ALG e b) HDL-IBU/ALG/GM.....	81
Figura 36. Curva de absorção de água em função do tempo de contato das microesferas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.....	83
Figura 37. Imagens dos diferentes grupos de microesferas antes e após 6 horas do ensaio da capacidade de absorção de água em função do tempo, em meio de solução tampão fosfato (pH 7,4).....	84
Figura 38. Perfil de liberação de IBU em função do tempo pelas microesferas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.....	86
Figura 39. Representação esquemática da liberação das moléculas de IBU nas microesferas a base de alginato (esq) e de HDL-IBU/Alginato/grafite magnético (dir).....	87
Figura 40. Perfil de liberação de IBU em função do tempo pelas microesferas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4, com a aplicação de um campo magnético externo (1T).....	88
Figura 41. Imagens de MEV em dois diferentes aumentos das películas: a) IBU/ALG e b) IBU/ALG/GM.....	92
Figura 42. Curva de absorção de água em função do tempo de contato das películas compostas por alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.....	93
Figura 43. Curva da alteração da espessura de película em função do tempo de contato das películas compostas por alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.....	97
Figura 44. Perfil de liberação de ibuprofeno em função do tempo pelas películas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.....	101
Figura 45. Perfil de liberação de ibuprofeno em função do tempo pelas películas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.....	102

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados na pesquisa.....	23
Tabela 2. Indexação dos sinais de DRx das distâncias interlaminares para o HDL	40
Tabela 3. Parâmetros de rede do HDL MgAl-Cl ⁻ sintetizado, obtidos a partir de DRx	41
Tabela 4. Valores de espaçamento basal para diferentes ânions intercalados em HDL	42
Tabela 5. Valores das absorbâncias de soluções de 5-ASA obtidas por espectrofotometria	46
Tabela 6. Quantidade de 5-ASA incorporado em HDL a partir da análise elementar	50
Tabela 7. Diferentes concentrações (m/v) de quitosana (Cht) e pectina (Pec) empregadas na preparação das microesferas	55
Tabela 8. Quantidade de 5-ASA incorporado no sistema quitosana/pectina e a eficiência de encapsulação das microesferas formadas.....	61
Tabela 9. Valores das absorbâncias de soluções do ibuprofeno.....	69
Tabela 10. Quantidade de IBU incorporado em HDL a partir da análise elementar	72
Tabela 11: Quantidade de ibuprofeno incorporado no sistema alginato/grafite magnético e a eficiência de encapsulação das microesferas	82
Tabela 12. Dados comparativos das microesferas e películas à base de alginato/grafite magnético com relação à sua capacidade total de absorção de água	95
Tabela 13: Dados comparativos dos bionanocompósitos que se desintegraram durante o ensaio da capacidade de absorção de água	96
Tabela 14: Propriedades mecânicas das diferentes películas em função do tempo	99

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Å	Angstrom
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de alumínio hexahidratado
ALG	Alginato
CHN	Análise elementar química
$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Ácido acético
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Etanol absoluto
$\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_3$	5-Aminisalicilato (5-ASA)
$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NaO}_2$	Ibuprofeno sódico (IBU)
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CHT	Quitosana
DTA	Análise térmica diferencial
DRX	Difração de Raios-x
EDS	Energia dispersiva
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GM	Grafite magnético
H_5IO_6	Ácido periódico
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Hidróxido duplo lamelar
HVLP	Filtro em membrana de celulose
ICMM	Instituto de Ciências de Materiais de Madri
kDa	Kilodalton
KBr	Brometo de potássio
kV	Kilovolt
MΩ	Megaohm
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de magnésio hexahidratado
Min	Minutos
mL	Mililitro
MPa	Megapascal
N_2	Nitrogênio líquido
NaCl	Cloreto de sódio

Na_2CO_3	Carbonato sódico
$\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$	Alginato de sódio
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato monobásico sódico
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	Metabissulfito de sódio
Nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogênio iônico
PLA	poliácido láctico
PLGA	poliácido láctico glicólico
PVA	poliálcool vinílico
PEC	Pectina
RPM	rotações por minuto
TGA	Análise termogravimétrica
u.a.	Unidade arbitrária
UV- <i>vis</i>	Espectroscopia da região do UV-visível
%	Porcentagem

RESUMO

Os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam uma série de vantagens em relação aos sistemas de liberação tradicionais, como permitir o uso da droga em menores concentrações plasmáticas, maior eficiência e a minimização de efeitos colaterais. A melhora no desenvolvimento de liberação controlada de fármacos depende estritamente da escolha de um suporte adequado capaz de controlar a liberação da droga de forma eficaz. Todas as formulações de sistemas de liberação controlada utilizam uma "barreira" física ou química, que controla a velocidade de liberação e assegura a dose desejada. Neste sentido, a utilização de biopolímeros e de certos materiais híbridos inorgânicos, tal como os hidróxidos duplos lamelares (HDL) como um suporte sólido, são de grande interesse devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Neste trabalho foram desenvolvidos uma série de diferentes bionanocompósitos e seu potencial para a liberação controlada de fármacos foi explorado, através de uma nova abordagem, criando sistemas com elevada aplicabilidade. Foram sintetizadas microesferas à base de quitosana/pectina gastrorresistentes e mucoadesivas para liberação de 5-Aminosalicilato em sua forma pura ou em compostos de intercalação com HDL, visando uma liberação *in vitro* que simulasse as condições *in vivo*. Outros bionanocompósitos foram sintetizados, através da associação entre o polissacarídeo alginato e nanopartículas de grafite magnético, estudo pioneiro da matriz biohíbrida magnética, a fim de ser utilizada como carreadora de fármaco em dois novos sistemas: de microesferas e de películas. Este estudo avaliou a eficácia dessas novas matrizes quando se associam fármacos previamente imobilizados em HDL. As caracterizações composicionais e estruturais de todos os novos bionanocompósitos sintetizados permitiram inferir que os fármacos foram intercalados satisfatoriamente por entre as lâminas do HDL, e ainda, que os sistemas eram compatíveis entre si. As propriedades físicas das microesferas e películas tais como absorção de água, eficiência de encapsulação e de liberação controlada, juntamente com as propriedades mecânicas, foram melhoradas quando compostas por matrizes híbridas. Tais resultados apontam que os bionanocompósitos sintetizados são promissores como futuros sistemas de liberação controlada de fármacos e outras substâncias, podendo ter elevada aplicabilidade em diversos setores, desde a área biomédica até a agricultura, por exemplo, na liberação controlada de fertilizantes e herbicidas.

ABSTRACT

The drug delivery systems (DDS) shows several advantages when compared with traditional release systems, such as allowing the employment of lower plasmatic concentrations of drug, having greater efficiency, and minimizing side effects. The improvement of drug delivery depends strictly on the choice of an adequate support allowing to effectively controlling the drug release. All systems use a physical or chemical barrier that control the speedy of release and ensure the desired doses. In this sense, the use of biopolymers and some inorganic hybrid materials as a solid support, such as layered doubles hydroxides (LDH), is of great interest, due to biocompatibility and biodegradability. In this study a series of distinct bionanocomposites were developed and their properties and potential to be used as drug delivery systems explored, creating complexes with high applicability. Gastroresistant and mucoadhesive chitosan-pectin beads for mesalazine release were synthesized in pure form or intercalated LDH compounds, aiming to simulate the *in vivo* conditions. Another bionanocomposite was also synthesized to be used as a drug carrier consisting of a blend of alginate polysaccharide and magnetic and graphite nanoparticles, in two different pharmaceutical forms: beads and films. This work evaluated the efficacy of these new matrices when the associate drug is previously immobilized on a LDH-based inorganic solid. The compositional and structural characterizations of all these bionanocomposites allowed to conclude that there was an intercalation of the drugs between the LDH layers were satisfactorily, suggesting a compatibility of the system. The physical properties of the beads and films, such as water uptake, encapsulation efficiency, control release, and mechanical properties, were improved when hybridized with the nanoparticles. These results indicate that the bionanocomposites synthesized are promising to further use in drug delivery systems and other substances, exhibiting high applicability in several areas, from biomedicine to agriculture, for example, in the control of fertilizer or herbicides release.

I-INTRODUÇÃO

Através de uma sinergia entre as áreas de nanotecnologia e biotecnologia, a nanobiotecnologia é a aplicação da nanotecnologia nas ciências da vida. A atração das nanociências pode ser explicada por duas razões principais. Por um lado, a nanotecnologia tem mostrado ser a base dos processos de miniaturização, que é atualmente de interesse industrial. Além disto, é possível que muitas aplicações inovadoras possam ser exploradas, já que tem sido provado que materiais têm propriedades completamente diferentes quando as dimensões são menores que 100 nm. Assim, a nanobiotecnologia deverá permitir a obtenção de meios e métodos para diagnósticos prematuros de doenças, otimizando os tratamentos, objetivando a cura de doenças até hoje consideradas incuráveis. Será possível o desenvolvimento de materiais e métodos que viabilizem a obtenção de equipamentos em escala nano e micro, permitindo o entendimento e a manipulação de sistemas biológicos em nível molecular. Atualmente, já é realidade aplicações nas áreas médicas, como na liberação controlada de fármacos, engenharia tecidual, imobilização enzimática, entre outras.

O dito trabalho conta com o fomento e atua dentro do escopo das atividades da ReN²AMeD, *Rede Nacional de Nanobiotecnologia Aplicada a Medicina e a Defesa/CAPES*. Centra-se no desenvolvimento de inovadores sistemas bio-híbridos baseados na encapsulação de diferentes moléculas pra o emprego como sistemas carreadores em processos de liberação controlada de fármacos.

A tese organiza-se primeiramente no detalhamento de toda a metodologia empregada nos ensaios, assim como as fórmulas e materiais utilizados, trazendo posteriormente dentro de cada capítulo os resultados obtidos para os diferentes sistemas, simultaneamente com a discussão necessária para tal entendimento, apresentando ainda conclusões parciais a cada segmento estudado, sendo finalizada por conclusões gerais inerentes a toda tese de doutorado.

I-1. *Liberação controlada de fármacos*

Estudos pioneiros no início do século XX realizados por Paul Ehrlich, bacteriólogo alemão, pai da quimioterapia, desenvolveram a “bala mágica”, que objetivava o tratamento contra a sífilis a partir de um preparado à base de arsênico, conhecido como neosalvarsan. Ideias primordiais sobre a possibilidade da ligação de um fármaco a um transportador que exibisse sua atividade terapêutica principalmente no tecido-alvo (EHRlich, 1906), e desde então, este assunto nunca mais foi esquecido e é um tema atual mesmo passado mais de um século. Assunto de extrema importância, já que a liberação tradicional de fármacos por administração oral ainda é a preferida, uma vez que oferece aos pacientes menos dor, melhor conveniência, maiores probabilidades da colaboração dele com o tratamento. Porém, está associada a uma série de desvantagens, relacionada à sua distribuição por todo o organismo de acordo com suas propriedades físicas, como a solubilidade e coeficiente de partição e carga, podendo ocasionar uma atividade indesejada do mesmo, possibilitando que o fármaco possa alcançar zonas que se encontrem fora de seu intervalo terapêutico, que o mesmo seja inativado, ou mesmo que sua ação seja indesejada ou nociva; resultando em efeitos colaterais sistêmicos que podem ser desastrosos. Como o que acontece no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide, colites intestinais, síndrome de Crohn, onde o sistema gástrico sofre severas consequências da administração continuada de anti-inflamatórios, sem ser atingido o efeito terapêutico esperado no tecido-alvo, as últimas zonas intestinais correspondentes ao cólon (SÁEZ, 2003).

Todos estes fatores delinearão a ciência no sentido de desenvolver sistemas de liberação controlada de fármacos, sofisticando seu sistema de transporte, contando com diferentes sínteses e processos matriciais que fossem capazes de permitir uma liberação de um ou mais princípios ativos em velocidades predeterminadas durante um intervalo de tempo pré-estabelecido, sendo seu comportamento dependente do meio circulante onde ele é administrado (GARCÍA, 2002). Tais formas farmacêuticas que apresentam a liberação de forma prolongada necessitam de menores administrações apresentando uma concentração plasmática constante da droga, diminuindo os níveis de toxicidade que são comuns aos sistemas tradicionais, os quais apresentam um pico máximo do

fármaco na corrente sanguínea acompanhado de seu declínio (THACHARODI, 1996). Assim, cada fármaco possui uma faixa terapêutica onde acima dela é tóxico, e abaixo ineficaz (figura 1), tendo sua atividade terapêutica dependência da frequência de administração do mesmo, o que pode ser crítico quando sua dose efetiva tiver adjacência à sua dose tóxica (DURÁN, 2002). Entre outros objetivos, os sistemas de liberação controlada almejam através de uma única administração, a manutenção de uma concentração terapêutica efetiva do fármaco no sistema circulatório por um extenso período de tempo (AZEVEDO, 2002).

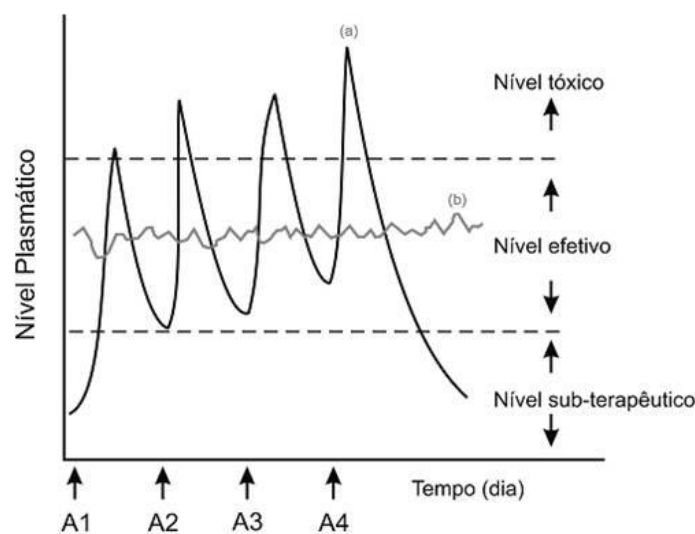


Figura 1: Gráfico ilustrativo da variação da concentração plasmática do fármaco quando administrado pelo sistema tradicional (a) e pelo sistema de liberação controlada (b), onde A são as multidosagens. Adaptado de Lyra, 2007.

Além desta função essencial aos novos sistemas de liberação, outros objetivos também são de elevada importância aos complexos, como um perfil de liberação continuado a partir da degradação de uma matriz e outras muitas vantagens farmacológicas: a redução da acumulação do fármaco no caso de tratamentos prolongados pela utilização de quantidades menores dos princípios ativos, a administração de menor número de doses com menor concentração da mesma, o que ocasiona maior conforto ao paciente facilitando a adesão do mesmo ao tratamento; minimização dos efeitos colaterais sistêmicos, maior segurança na utilização de

fármacos com elevada potência, podendo ser capaz de se mediar sabores, odores e formas que sejam desagradáveis (VENDRUSCOLO, 2005; CHAVANPATIL, 2006).

Apesar das inúmeras vantagens associadas a estes sistemas, algumas limitações ainda devem ser sanadas como: restrições de aplicações em fármacos que apresentam baixo tempo de meia-vida, dificuldade de absorção no trato gastrointestinal, a impossibilidade de interrupção da administração em casos de intolerância e risco de acúmulo do mesmo em casos de excreção lenta. Até onde se tem relatos, os fármacos candidatos a serem submetidos a sistemas como esses devem apresentar propriedades como: velocidades médias de absorção e excreção; absorção uniforme no trato gastrointestinal; margem de segurança relativamente alta, utilização no tratamento de doenças crônicas ao invés de agudas (DAS, 2003). Porém, atualmente esforços têm sido direcionados a fim de ampliar a faixa de fármacos a serem incluídos em sistemas desse porte, como, por exemplo, através da síntese de matrizes poliméricas que contam com propriedades mucoadesivas de seus constituintes, que visam aumentar a eficiência terapêutica de fármacos que apresentem pobre absorção gastrointestinal (ARANDA, 2012; VASIR, 2003).

Para que os sistemas de liberação controlada de fármacos sejam sintetizados eficientemente e tenham o comportamento esperado através de suas propriedades melhoradas, atualmente é necessário o emprego dos biomateriais. A diversidade das aplicações dos biomateriais, assim como o amplo espectro de sua composição química e a necessidade de formas e morfologias apropriadas para sua utilização, faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente interdisciplinar, envolvendo fatores que definem o sucesso de suas aplicações, tais como: tratamento de superfície, rotas de sínteses, técnica de processamento (em formas variadas), degradabilidade e biocompatibilidade local e sistêmica (BUDDY, 2004). Partindo-se do essencial comportamento mecânico até as funções biológicas em nível molecular nos tecidos, os sistemas inovadores apresentam propriedades direcionadas a determinadas aplicações no organismo. A evolução atual dos biomateriais relaciona-se, portanto, com os avanços das diversas áreas, interagindo de forma intrínseca com biotecnologia e da ciência dos materiais. Ele apresenta uma série de definições, entre elas e a mais aceita na área biomédica, como uma substância ou combinação delas (sintética ou natural), que compreende o todo ou uma parte de uma estrutura viva

utilizada para avaliar, tratar, melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente, qualquer tecido, órgão ou função. Outra definição importante compreende os biomateriais como sendo materiais utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos. Desta forma, a composição dos biomateriais varia de acordo com sua especificidade. De acordo com a sua natureza, podem ser classificados como: metálicos, cerâmicos, poliméricos (sintéticos ou naturais), compósitos ou biorecobrimentos. Sua extensão pode abranger tanto a macro quanto a micro e nanoescala, uma vez que os materiais apresentam propriedades diferentes quando em nanoescala, o que apresenta uma grande aplicabilidade no mundo macro. Por isso que seu planejamento e síntese contam com conhecimentos multidisciplinares, entre eles a biologia, química, física, engenharia, medicina e muitos outros, fator essencial para o êxito no desenvolvimento e aplicação desta nova classe de materiais (HELMUS & TWEDEN, 1995).

I-2 Materiais como matrizes para encapsulamento de fármacos

Os esforços na tentativa de minimizar as limitações que os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam caminham no sentido da eleição de materiais apropriados que sirvam como carreadores das drogas, sendo capazes de modular a velocidade de sua liberação, e que a mesma seja realizada apenas nos tecidos-alvos em um intervalo de tempo apropriado (COLOMBO, 1996). Avanços têm sido reportados no que se refere a matrizes híbridas, contando com as propriedades que diferentes materiais possam conferir a um mesmo sistema (CUNLIFFE, 2005). Entre as muitas possibilidades da inclusão das drogas nas matrizes, ela pode encontrar-se dispersa de forma homogênea, no interior de um reservatório, ou adsorvida em uma superfície (REGO, 2003). Sua liberação pode ocorrer através de uma série de processos físicos e químicos, e por uma combinação deles, como a difusão de água no interior da matriz, pela sua degradação ou pela difusão de fármaco pelos poros do interior da matriz (MEHUYS, 2005).

Os materiais que servirão como futuras matrizes devem valer-se de algumas propriedades fundamentais para tal emprego, como a versatilidade, biocompatibilidade,

biodegradabilidade, alta capacidade de retenção pelo fármaco, baixo custo, elevada disponibilidade e reprodutibilidade. Entre as diversas matrizes desenvolvidas encontram-se lipossomas (ALLISON, 2007), micelas (KATAOKA, 2012), emulsões (POUTON, 1997), materiais híbridos (ALCÂNTARA, 2010; ARANDA, 2012) e poliméricos (WANG, 2006). Dentre todos os exemplos citados, os materiais poliméricos e híbridos parecem ser os mais utilizados para a liberação controlada de fármacos, por permitirem uma liberação de fato lenta e gradual de substâncias, podendo inclusive tornar possível o transporte guiado a tecidos específicos do organismo, como áreas inflamadas e tumorais (AZEVEDO, 2002), e seguindo esta linha de raciocínio, os materiais híbridos magnéticos que estão sendo desenvolvidos recentemente, parecem ser inovadores em suas aplicações como sistemas carreadores de fármacos modulados por resposta positiva frente à aplicação de campo magnético externo (BURGOS-ASPERILLA, 2007, ZHANG, 2009; CARJA, 2007, GIANI 2012).

I-2.1. *Polímeros*

Palavra de origem grega, formada por *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição), os polímeros são macromoléculas compostas por dezenas de milhares de unidades repetidas unidas por ligações covalentes. Sua unidade fundamental são os monômeros, que devem ligar-se ao menos a outros dois monômeros a fim de que se origine uma cadeia polimérica. Os monômeros podem apresentar-se em diferentes tipos e combinações, responsáveis por determinar o comprimento da molécula e sua massa molar. Os polímeros costumam exibir uma ampla variedade de massas molares, e assim, diversas funções podem ser conferidas a estes materiais, como, por exemplo, diferenças significativas em suas propriedades físicas quando uma cadeia polimérica é encurtada (CANEVAROLO JR, 2006).

As aplicações e desenvolvimentos na área biomédica têm contado com a participação de materiais poliméricos há mais de cinco décadas (GRIFFITH, 2000). Esta popularidade se dá graças à sua flexibilidade na interação com outros materiais e a grande variedade existente, que proporciona uma ampla gama de aplicações (LANGER, 2003). No que se refere às áreas de liberação controlada de fármacos, engenharia tecidual e imobilização enzimática, o emprego de polímeros como biomateriais apresenta elevado êxito em suas publicações, por proporcionar vantagens importantes

frente a outros materiais, como uma gama variada de composições, estruturas e propriedades ótimas que conferem aos sistemas (RAMAKRISHNA, 2001; CHUNG, 2005; ANGELOVA, 1999).

Os materiais poliméricos empregados como matrizes na incorporação de sistemas de liberação controlada de fármacos são muitos, sendo de natureza sintética, natural, ou muitas vezes, uma combinação delas. Entre os polímeros de origem sintética os mais empregados são: os poliésteres alifáticos de hidroxiácidos como o poliláctico (PLA), o poliláctico glicólico (PLGA) e o poliálcool vinílico (PVA). Entre os polímeros de origem natural estão: a albumina, colágeno, fibrinogênio, gelatina, compostos por polipeptídeos e proteínas; o alginato, quitosana, ácido hialurônico, pectina, compostos por polissacarídeos; e até mesmo algumas células vivas, como os eritrócitos (CHEN, 2005; SASHIWA, 2004; SIONKOWSKA, 2004; WU, 2001).

Independentemente da natureza química do polímero, uma propriedade essencial para sua aplicação nos setores biomédicos é a biocompatibilidade, o que determina que quando em contato com tecidos vivos não seja responsável por provocar qualquer resposta inflamatória, alérgica ou causar qualquer tipo de dano aos tecidos biológicos ou fluidos orgânicos (SHU, 2007; CORTÉS, 2008), fator limitante no emprego dos muitos polímeros existentes. Outra propriedade importante destes polímeros quando aplicados como matrizes receptoras de fármacos para liberação controlada é a biodegradabilidade, e quando aliadas estas duas propriedades, a biocompatibilidade e biodegradabilidade, abre-se um caminho inovador e extremamente interessante, uma vez que será permitida uma liberação de substâncias através da degradação de uma matriz, sendo excretadas pelo organismo de acordo com os processos metabólicos habituais sem ocasionar consequências desastrosas aos tecidos biológicos (LYRA, 2007).

I-2.1.1. *Quitosana*

Aplicações diversas de polímeros de origens naturais tem acentuada importância no avanço da ciência, pois são de fácil obtenção, elevada disponibilidade, inclusive no Brasil. A quitosana é um polímero catiônico, sendo o segundo biopolímero mais

abundante na natureza depois da celulose. A quitina é seu componente estrutural primário, presente nos exoesqueletos de crustáceos e de algumas espécies de moluscos, podendo ainda ser encontrada em insetos e fungos, cujas propriedades vêm sendo exploradas pela indústria alimentícia e farmacêutica há quase 70 anos (ROBERTS, 1992). A forma mais comum de obtenção de quitosana é a α -quitosana, extraída de carapaças de caranguejos e moluscos (SHEPHERD, 1997), que são resíduos inutilizados pela indústria pesqueira, sendo inclusive muitas vezes considerados como poluentes (GOOSEN, 1996). Vantagem adicional na sua exploração através do exercício de um papel de caráter ambiental em sua reutilização.

As carapaças dos caranguejos e camarões são desproteïnadas e desmineralizadas por um tratamento sequencial com álcali e ácido fazendo com que a quitina seja separada dos outros componentes. A quitina obtida que é um biopolímero que contém grupos acetil (NHCOCH_3), é então desacetilada através da utilização de soluções concentradas de NaOH, originando a quitosana, que é um produto natural obtido da quitina das carapaças de crustáceos (figura 2), através de processos simples e de baixo custo (RHAZI, 2000; WUOLIJOKI, 1999). Nos últimos anos, devido à elevada demanda em sua produção, sua extração a partir de fungos através de métodos fermentativos tem sido muito explorada (NWE, 2002).

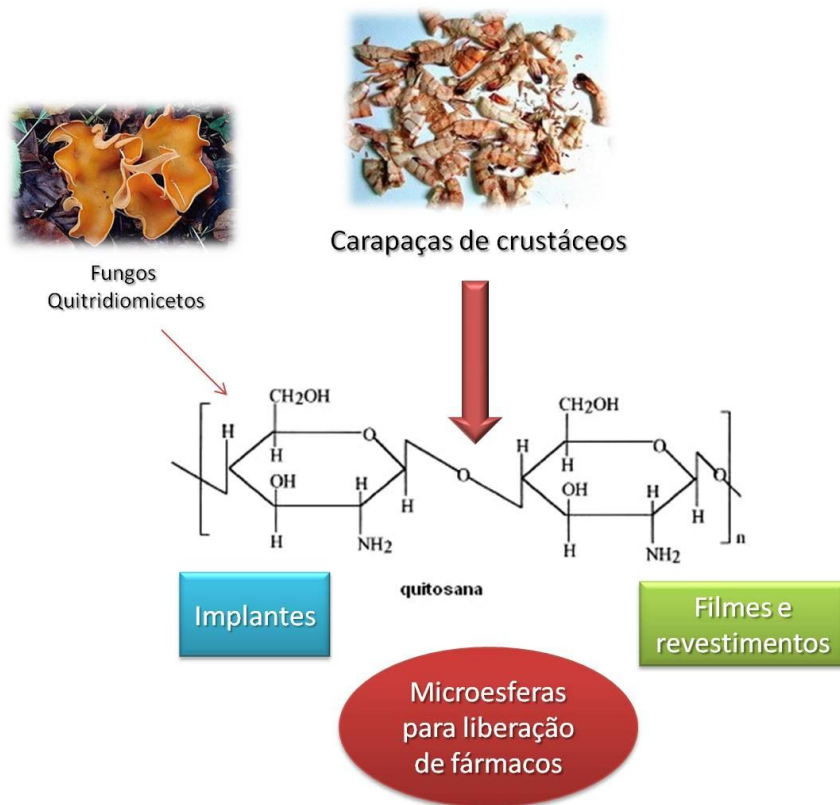


Figura 2: Esquema ilustrativo das principais fontes de quitosana, sua estrutura linear e as principais aplicações nos setores biomédico e alimentício. Adaptado de Nwe, 2002, figuras alibaba.com.

A quitosana é um polissacarídeo composto por um co-polímero linear (figura 2) através de Ligações β 1-4, sendo formado predominantemente por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoose, solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos (MATHUR, 1990). O termo quitosana é utilizado para descrever uma série de polímeros com diferentes graus de desacetilação, definidos através da porcentagem de grupamentos amino presentes em sua estrutura polimérica que também é responsável por definir seu peso molecular; propriedades como biodegradabilidade e bioadesividade são frequentemente dependentes das proporções relativas de resíduos *N*-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina presentes no material (GEORGE, 2006). Por isso é muito comum estudos de bioadesão e degradação em diferentes pesos moleculares de quitosana para a eleição de uma que apresente condições ótimas para determinada aplicação.

São amplamente empregadas nos mais diversos setores, no tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos e redução de odores), na agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), na indústria alimentícia (fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas), indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental) e biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante) (RINAUDO, 1989). Porém, sua aplicação mais importante se dá na área biomédica, como suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de fármacos em animais e humanos, e mais recentemente, em encapsulamento de materiais (AZEVEDO, 2007).

Não obstante, a quitosana ainda apresenta uma série de propriedades além da biocompatibilidade que a torna muito interessante do ponto de vista da administração de fármacos por via oral, como a biodegradabilidade, uma vez que ela é metabolizada por certas enzimas humanas, especialmente a lisozima (MUZZARELLI, 1997). Outra propriedade muito interessante é a sua capacidade mucoadesiva, que vem demonstrando que os tempos de absorção e de residência de fármacos em regiões específicas do trato gastrointestinal, como no estômago (LÓPEZ, 2000), intestino (HE, 1998) e mucosa bucal (LÓPEZ, 1998), foram prolongados quando a quitosana foi utilizada como matriz para encapsulamento de fármacos. A propriedade adesiva da quitosana pode ser explicada por vários mecanismos além da adesão por hidratação (LEHR, 1992), como provavelmente pelo envolvimento de interações de hidrogênio e iônicas. Foi sugerido um importante mecanismo de ação eletrostático através da interação do biopolímero com os tecidos mucosos (FIEBRIG, 1995), através dos grupamentos amino da quitosana carregados positivamente com as cargas negativas das glicoproteínas presentes nas mucosas, como a mucina (GENTA, 1999).

A sua extrema solubilidade em meios ácidos se contrapõe à sua elevada resistência que exhibe em meios básicos. O seu mecanismo de sensibilidade a pHs baixos pode ser explicado através da protonação dos grupamentos amino da quitosana, o que ocasiona a repulsão de suas cadeias, difusão de prótons e dissociação de interações secundárias (YAO, 1994); propriedade esta muito estudada no que se refere à utilização como matrizes para liberação controlada de fármacos no estômago. Quando se objetiva uma liberação de fármacos destinados a tratamentos de doenças intestinais, a quitosana

por si só não é interessante, pois não suportaria a passagem pelo sistema gástrico apesar de sua mucoadesividade. Por isso, ela vem sendo estudada como um complexo polieletrólito com outros polímeros resistentes às condições ácidas, como o alginato sódico e pectina (ARANDA, 2012), ou através de modificações de sua estrutura a fim de melhorar sua estabilidade em pHs ácidos.

A preparação de microesferas de quitosana é uma estratégia que visa otimizar a cinética de absorção, manuseio e operação, sendo utilizadas para diferentes propósitos. O que é possível através de sua capacidade de ser reticulada, ou seja, sua solução quando em contato com soluções reticulantes de diferentes naturezas, como tripolifosfatos, glutaraldeído, a tornam um hidrogel rapidamente, através de forças eletrostáticas que formam cadeias reticuladas iônicas ou covalentes, dependendo da natureza do reagente utilizado, reforçando química e mecanicamente a estrutura do biopolímero (KIM, 2003).

I-2.1.2 *Pectina*

É um polissacarídeo altamente hidrofílico devido à presença de grupos polares, capaz de produzir soluções viscosas (CRISTENSEN, 1986), presente abundantemente nas polpas de maçãs e em cascas de frutas cítricas. Algumas outras fontes de pectina passaram nos últimos anos a serem exploradas, como o girassol, polpas de beterraba e batata (WICSENBORN 1999; TURQUOIS, 1999). Apresenta grande aplicação na indústria alimentícia, entre outros motivos, pela sua capacidade de geleificação, utilizada na elaboração de geleias, doces, sucos e confeitos; também empregada como espessantes, texturizantes, emulsificantes e estabilizantes, e mais recentemente, atua na retirada de metais tóxicos e como agente floculante no tratamento de efluentes (CAMPBELL, 1979; BOWERS, 1992; YOKOI 2002). A indústria farmacêutica vem dando atenção quanto à sua utilização, estudos reportam que ela poderá ser promissora na redução dos níveis de colesterol no sangue, como excipientes em formulações farmacêuticas (LIU, 2003), e como sistemas carreadores de fármacos para liberação controlada (ARANDA, 2012).

A pectina apresenta uma estrutura ramificada de caráter heterogêneo no que se refere à sua estrutura química e peso molecular (YALPANI, 1988; BEMILLER, 1986). De uma forma geral, apresenta grande quantidade de ácido galacturônico e pode conter também ramnose, arabinose e galactose, sendo considerada de maneira sucinta como um ácido poligalacturônico parcialmente esterificado com grupos metoxila (figura 3). Os graus de esterificação são dependentes da fonte de pectina e da atividade enzimática, alguns de seus grupamentos carboxil podem ser convertidos em carboxamidas, quando a amônia é utilizada no processo de desesterificação, originando a pectina amidada. Os graus de esterificação e amidação determinam a quantidade de ácidos carboxílicos presentes em suas cadeias (VAUQUELIN, 1970).

A propriedade mais interessante do ponto de vista industrial que a pectina apresenta é a sua capacidade de geleificação, sendo dependente de múltiplos fatores como os graus de esterificação, amidação, pH, temperatura e a presença de cátions bivalentes (CHRISTENSEN, 1984). A ciência tem buscado o desenvolvimento de pectina e derivados com maior resistência à absorção de água, sem que interfira em sua capacidade em ser degradada enzimaticamente. Costuma apresentar um comportamento similar ao do alginato quando em contato com íons de cálcio, esses íons ligam-se às moléculas poligalacturônicas, sendo responsáveis por um acoplamento das cadeias originando um complexo do tipo “*egg-box*” (figura 3), reduzindo sua solubilidade e induzindo a associações não covalentes das cadeias polissacarídicas (POWELL, 1982). Adicionalmente, a incorporação de sais de cálcios em matrizes pectínicas parece aumentar a susceptibilidade a enzimas das colônias bacterianas presentes naturalmente nos tecidos intestinais, e ainda, pectinases parecem necessitar exclusivamente da presença de íons cálcio para sua atividade, por isso a reticulação da pectina com soluções como cloreto de cálcio tem importância relevante como agente reticulante de polissacarídeos para liberação controlada de fármacos (SANDENBERG, 1983).

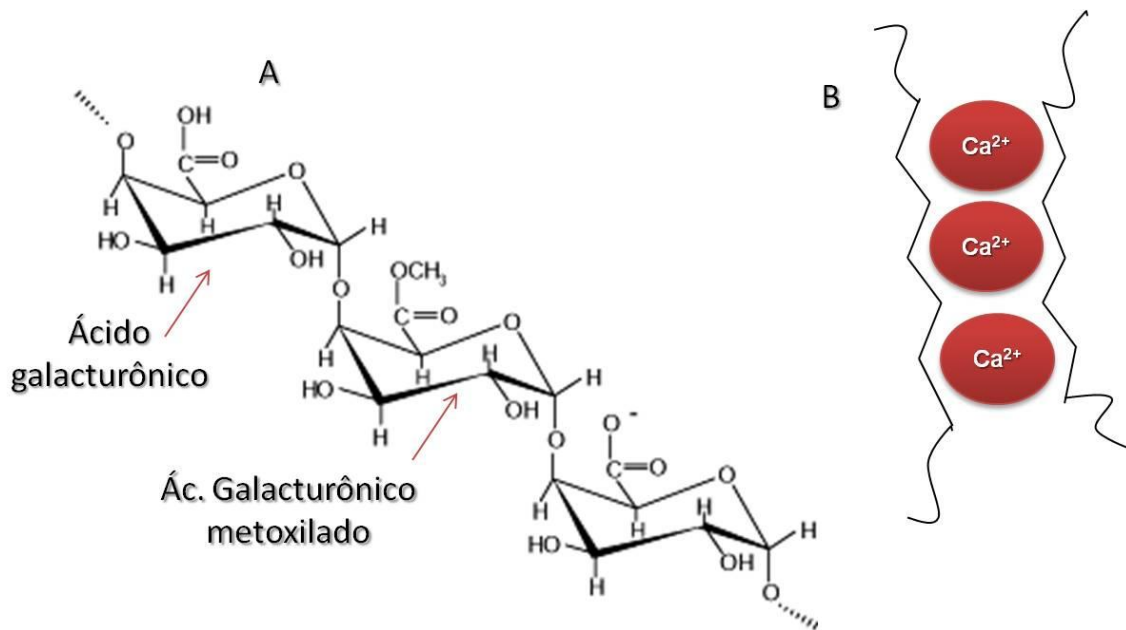


Figura 3: A) Fórmula química geral da cadeia polimérica da pectina; e B) Esquema representativo do complexo formado do tipo “egg box” na presença de íons cálcio, adaptado de VAUQUELIN, 1970.

A pectina suporta ambientes acídicos, e também exibe resistência frente à atividade de amilases e proteases presentes no trato gastrointestinal superior, sendo digerida por um número considerável de enzimas presentes no cólon intestinal, e quando em contato com soluções básicas, sua estrutura tende a se dissociar e expandir. Devido a estas propriedades, torna-se claramente possível sua aplicação como um veículo no transporte de substâncias até as últimas zonas intestinais, sendo responsável por retardar os níveis de liberação (SINHA, 2001; VANDAMME, 2002; RINAUDO, 1996). Outra aplicação interessante é a possibilidade de formação de complexos polieletrólitos com outros polímeros, como a quitosana, onde através da forte interação eletrostática entre as cargas positivas do grupamento amino C-2 da quitosana com as cargas negativas do grupamento carboxílico C-4 da pectina, pode-se obter um novo material com propriedades otimizadas (RASHIDOVA, 2004). Sendo ainda atóxicos e biodegradáveis, exibindo atividade adesiva em contato com os tecidos biológicos, além de uma resposta anti-inflamatória (LIU, 2000), muito interessante do ponto de vista biológico.

I-2.1.3 Alginato

O alginato é um dos biopolímeros mais empregados como matriz para liberação controlada de fármacos, provavelmente pela sua abundância, fácil manipulação, baixo custo e propriedades físico-químicas desejáveis (GIUNCHEDI, 2000; LIEW, 2006).

O ácido algínico é um polissacarídeo natural obtido das algas marinhas pardas, as mais importantes do ponto de vista comercial são as espécies: *Macrocystis pyryfera*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum*, sendo abundantes em todo o planeta. O alginato é constituído por duas subunidades monoméricas, o ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G), que se agrupam sequencialmente em blocos unidos por ligações glicosídicas α -(1-4) (figura 4). Pode ser encontrado na forma sódica, potássica ou magnésica, solúveis em água, estáveis a pHs superiores a 3,5 (DONG, 2006).

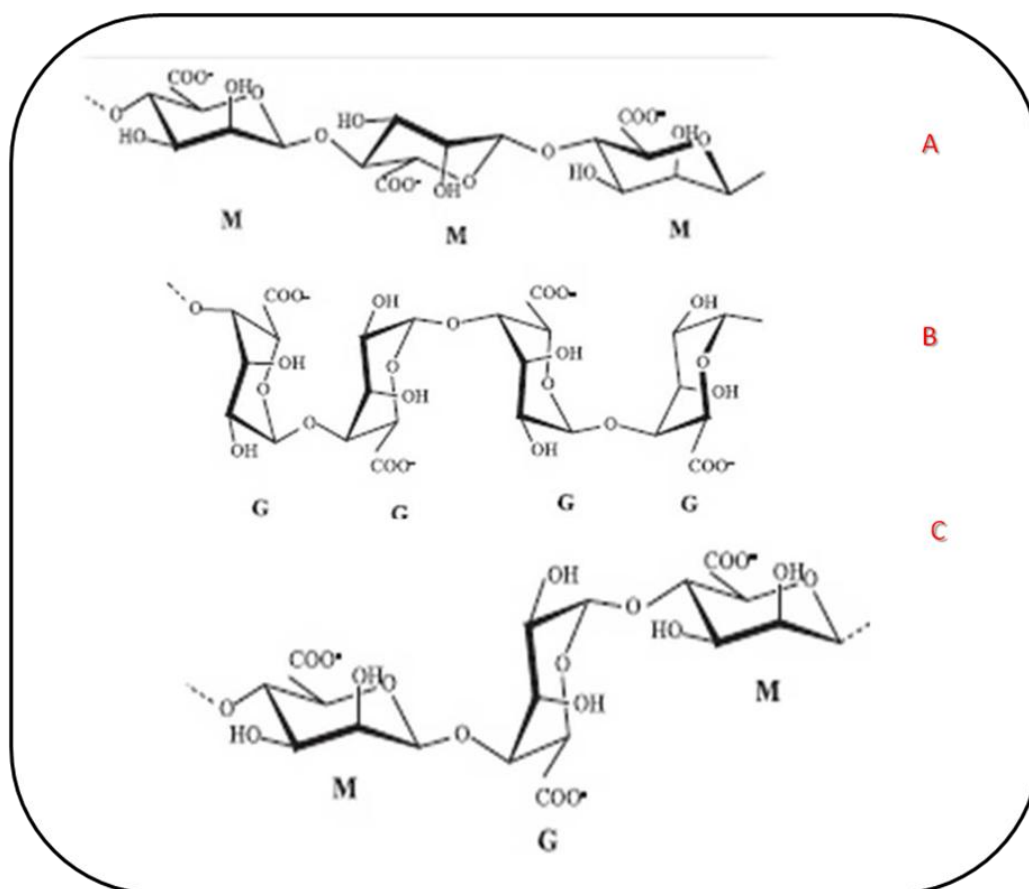


Figura 4: A) e B) Estrutura homopolimérica M e G do alginato; C) a estrutura geral do heteropolímero em uma sequência M-G-M, Adaptado de Sabra, 2001.

Uma de suas propriedades muito chamativas para o uso farmacêutico é sua capacidade de sofrer variações físicas mediante um processo do tipo sol-gel, o que permite entre outras formas farmacêuticas, a preparação de microesferas que são estabilizadas por reticulação com íons bivalentes como Ca^{2+} e Zn^{2+} presentes nas soluções (PONGJANYAKUL, 2009). O cálcio é o íon mais utilizado como agente reticulante, por não ser tóxico, ser barato e de elevada disponibilidade, sendo utilizado como cloretos, carbonatos, sulfatos e fosfatos. A reticulação ocorre com os íons bivalentes agindo como pontes entre os grupos de carga negativa das unidades de ácido gulurônico, favorecendo a formação de um gel rígido, com uma estrutura semelhante à da pectina reticulada, do tipo “*egg-box*”. Cada um desses íons participa de reações de coordenação com átomos de oxigênio, resultando em uma rede tridimensional de alginato de cálcio, por exemplo. Fenômenos como este que ocorrem com o alginato e pectina são amplamente utilizados na preparação de microesferas para liberação controlada de fármacos (COVIELLO, 2007), tornando-as mais eficientes e estáveis para a administração por via oral.

I-2.2 *Materiais Orgânicos-Inorgânicos e Magnéticos*

O constante e importante crescimento da Nanotecnologia já permite o planejamento e almeja poder controlar todas as variáveis e propriedades de síntese, a fim de otimizar suas aplicações, objetivo principal do desenvolvimento de materiais nanoestruturados (DARDER, 2007). Novas propriedades físicas, químicas e mecânicas podem ser conferidas aos materiais pertencentes à escala nanométrica, quando em comparação com os mesmos em escala macrométrica, como resultado de interações quânticas, as quais são melhores visualizadas e compreendidas em escala nanométrica.

Dentro destas perspectivas, os nanomateriais híbridos, orgânico-inorgânicos, estão sendo explorados de forma crescente nos setores científico e industrial. Como alternativas criativas que objetivam a síntese de nanomateriais versáteis e com um leque de possibilidades e aplicações (RUIZ-HITZKY, 2004). O emprego destes materiais orgânico-inorgânicos determina efeitos sinérgicos conduzindo a novas características e propriedades estruturais (mecânicas) e funcionais (elétricas e eletrônicas, ópticas e magnéticas). Entre estes materiais estão os nanocompósitos, formados por duas fases,

uma dispersa e outra contínua, onde ao menos uma delas pertença à escala nanométrica (RUIZ-HITZKY, 2005).

O primeiro material orgânico-inorgânico a ser sintetizado foi a partir da intercalação de espécies de alquilamônio por entre as lâminas de sólidos laminares à base de argilas esmectíticas, as montmorillonitas. Estas intercalações de espécies orgânicas em sólidos laminares são geralmente conduzidas por um aumento da distância interlaminar da matriz anfitriã (componente inorgânico), permitindo que a molécula hospedeira (componente orgânico) possa ser acomodada perfeitamente no espaço interlaminar do material híbrido orgânico-inorgânico resultante (RUIZ-HITZKY, 2007).

Uma grande variedade de moléculas ou polímeros pode servir como hospedeiras, sendo neutros ou carregados, com distintas funcionalidades, como alcoóis, aminoácidos, aminas e carbonilas; sendo dependente da composição do sólido inorgânico anfitrião. Por isso, muitas são as interações nos sistemas *host-guest* passíveis de se ocorrer: como interações de hidrogênio, eletrostáticas, forças Van der Waals, íon-dipolo, coordenação e transferência de prótons e elétrons (CARDOSO, 2006). Os sólidos inorgânicos que apresentam estrutura laminar 2:1, como por exemplo, os filossilicatos, podem formar híbridos orgânico-inorgânicos através de processos de troca iônica. Dessa forma, os cátions compensadores de carga existentes por entre as suas lâminas são deslocados por diferentes cátions orgânicos, como espécies de alquilamônio, colorantes e polímeros, adotando distintas formas geométricas (RUIZ-HITZKY, 2003).

Quando são empregadas espécies biológicas, são denominados materiais bio-híbridos, sendo a área mais inovadora aquela que se preocupa com a síntese de bionanocompósitos, combinando biopolímeros com sólidos inorgânicos, conferindo propriedades aos sistemas como a biodegradabilidade e biocompatibilidade, que são de grande interesse nas áreas biomédicas, farmacêuticas e ambientais (RUIZ-HITZKY, 2008).

Por outro lado, materiais carbonosos nanoestruturados tem atraído elevado interesse na comunidade científica, devido às suas propriedades físicas e sua elevada aplicabilidade nos mais diversos setores, desde as áreas eletroeletrônicas, computacionais, até as áreas farmacêuticas e médicas (ALEXIOUL, 2001; LÜBBE, 2001). Vantagens adicionais são fornecidas por estes sistemas quando estes materiais respondem positivamente à aplicação de um campo magnético externo, sendo empregados como nanotubos de carbono magnético associados a anticorpos

monoclonais para tratamentos de tumores por hipertermia, como carreadores na liberação controlada de fármacos, como imobilizadores enzimáticos ou como biossensores; temas atualmente promissores que tem apresentado êxito em suas aplicações (GUEDES, 2004; BUSHAN, 2004). A grande promessa para um futuro nada distante é o desenvolvimento de bionanocompósitos carbonosos magnéticos que possam conduzir a síntese de sistemas controlados em níveis moleculares, possibilitando o seu emprego em diferentes setores.

I-2.2.1 *Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs)*

Desde o início do século passado já se tem relatos de mineralogistas sobre a existência de minerais da família das argilas aniônicas. O primeiro deles ocorreu na Suécia em 1842, através da descoberta de um mineral branco, facilmente macerável, denominado hidrotalcita. Um século mais tarde, Feitknecht realizou sínteses seriadas de compostos do tipo hidrotalcita, o qual nomeou como estruturas de dupla camada, compostos por uma camada de hidróxido de um tipo de cátion, intercalados em uma camada de hidróxidos de outro tipo de cátion (FEITKNECHT, 1942).

Os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) também conhecidos como compostos do tipo hidrotalcita e argila aniônica apresentam estruturas organizadas bidimensionalmente (figura 5), e capacidade de troca iônica interlamelar, sendo amplamente empregados como o componente inorgânico na síntese de bio-híbridos. Estão presentes na natureza, porém sua síntese laboratorial é simples e de baixo custo, existindo em diferentes formulações, permitindo o isolamento de sólidos de alta pureza, correspondendo à fórmula geral: $[M^{2+}_{(1-x)} M'^{3+}_x(OH)_2 (An^-)_{x/n} \cdot zH_2O]$, onde M e M' são íons metálicos e An^- é o íon interlamelar, sua estrutura é muito semelhante à da brucita $Mg(OH)_2$ (CAVANI, 1991).

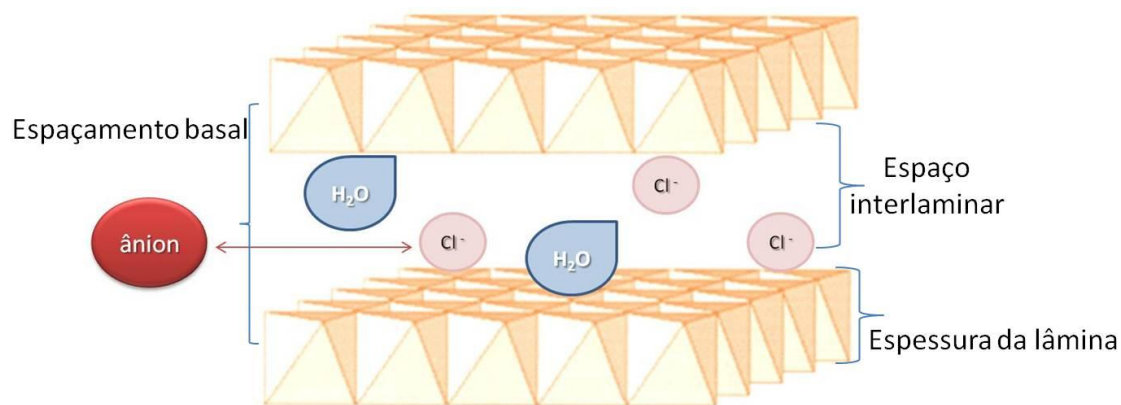


Figura 5: Representação esquemática do HDL, sua composição interlamelar e suas lâminas octaédricas, onde os átomos metálicos se encontram no centro, e nos vértices estão os átomos de oxigênio, adaptado de Alcântara, 2010.

Diversos tipos de nanocompósitos foram desenvolvidos por associação de HDL com polímeros, proteínas, fármacos e DNA (LEROUX, 2005; DARDER, 2005; CHOY, 2004, ALCÂNTARA, 2010; ARANDA, 2012), sendo utilizados como catalisadores, precursores ou suporte em catálises, adsorventes, intermediários na síntese de materiais cerâmicos avançados, em eletrodos modificados e em aplicações medicinais como antiácido (FORANO, 2007; SELS, 2001; RIVES, 1999; BALLARIN, 1998). As aplicações de cunho farmacêutico foram pioneiras em 2001, e desde então, as publicações e patentes na área tem apresentado um crescimento exponencial, sendo lideradas pelos grupos de O'Hare no Reino Unido, Choy na Coreia e Constantino na Itália. Pelo caráter antiácido que alguns HDLs exibem, pode ser combinado com a intercalação de fármacos, conferindo aos híbridos resultantes propriedades como estabilidade química, térmica e/ou fotoquímica; induzindo melhoras a respeito de fármaco livre, além da possibilidade de controle na liberação dele no organismo, relacionadas à dissolução da matriz anfitriã em função de um ataque ácido (DEL HOYO, 2007; CHOY, 2007). Propriedades como estas permitem que os HDLs, principalmente os compostos por magnésio e alumínio, que exibem toxicidade nula, estejam entre os sólidos mais promissores no uso como suporte, armazenamento e liberação gradual e controlada de fármacos, entre eles, anti-inflamatórios não esteroidais, antitumorais, reguladores de crescimento vegetal, porfirinas para terapia fotodinâmica, aminoácidos, herbicidas e até mesmo fragmentos de DNA para terapia genética (AMBROGI 2003; GORDIJO, 2005; TYNER, 2004; HUSSEIN, 2002; KATONIS, 2007; NAKAMAYA, 2004; KWAK, 2002).

Inovações em bio-híbridos magnéticos baseados em HDL têm sido desenvolvidas para liberação controlada de fármacos antibióticos, anti-inflamatórios e quimioterápicos. Através do método de síntese de HDL conhecido por reconstrução e calcinação, nanopartículas magnéticas à base de ferritas e magnetitas podem ser introduzidas na estrutura das lâminas, apresentando seus níveis de liberação de fármaco modulados também pela resposta positiva à aplicação de campo magnético externo, eliminando efeitos colaterais e otimizando a biodisponibilidade do fármaco. Algumas variáveis de síntese ainda estão sendo estudadas, a fim de que se tenha maior controle dos nanocompósitos magnéticos, principalmente no que se refere aos meios de dispersão, que podem trazer questionamentos quanto à sua biocompatibilidade (ZHANG, 2009; ZHANG, 2005; WANG, 2009).

I-2.2.2 Grafite Magnético

O grafite magnético é uma inovação patenteada pelo grupo GMD/*Grupo de Materiais e Dispositivos Magnéticos*, liderado pelo Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira da UFSCar, em conjunto com o grupo liderado pelo Prof. Dr. Álvaro Mombrú, da Faculdade de Química, da Universidade da República do Uruguai. Trata-se da síntese de um grafite que apresenta imperfeições em sua superfície, conferindo propriedades ferromagnéticas ao material (PARDO, 2004), como pode ser observado em sua curva de magnetização que corrobora tal propriedade (figura 6). Outros trabalhos relatam a possibilidade de magnetização pelo grafite, como descreveram Esquinazi e colaboradores, através da indução de ordem magnética por meio de irradiação de prótons em amostras de grafite, e ainda, Kopelevich e colaboradores publicaram a existência de *loops* de magnetização associados ao ferromagnetismo fraco em amostras de grafite pirolítica. Muitos são os mecanismos propostos pelo aparecimento de um comportamento ferromagnético espontâneo, entre eles, átomos com hibridização sp^1-sp^2 alternados, magnetismo induzido e magnetismo em escala atômica induzido por imperfeições estruturais.

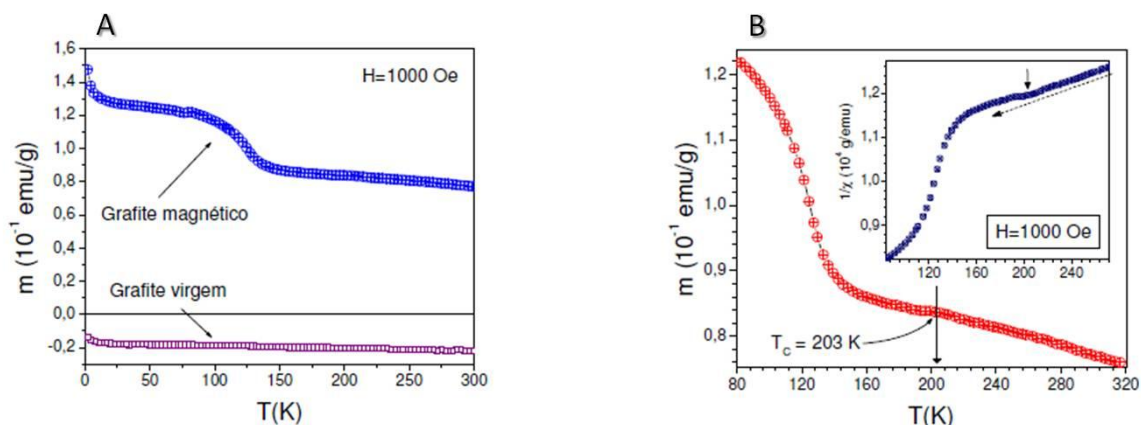


Figura 6: A) Curvas de magnetização mostrando o efeito do tratamento químico sobre o grafite e B) detalhe da curva de magnetização vs. temperatura para a amostra tratada, mostrando a temperatura Curie em $T \approx 203$ K. Adaptado de Pardo, 2006.

Muitas são as aplicações biomédicas de dispositivos magnéticos, sendo atualmente constituintes de matrizes híbridas carreadoras de fármacos, nas mais diversas formas farmacêuticas e composições, como hidrogéis magnéticos à base de nanopartículas de CoFe_2O_4 (GIANI, 2012), microesferas magnéticas baseadas em magnetitas liberadoras de doxorubicina (BRULÉ, 2011), hidrogéis compostos por óxido ferroso magnético para liberação de diferentes substâncias (LIU, 2009), buscando níveis de liberação otimizada frente ao estímulo magnético de seus nanocompósitos sintetizados.

O emprego das nanopartículas de grafite magnético dirigidas para aplicações biológicas apresenta vantagens adicionais únicas quando comparadas com materiais magnéticos de outra natureza, como a composição essencialmente carbonosa do grafite comprovadamente biocompatível aos tecidos biológicos; a possibilidade de dispersá-lo em água ultrapura sem a necessidade de adicionar surfactantes, solventes orgânicos ou ácidos fracos; e a grande compatibilidade e estabilidade no preparo de blendas com biopolímeros, que acaba de ser descoberta, fazem do grafite magnético no cenário científico atual, uma opção inovadora e extremamente interessante nas múltiplas áreas da nanomedicina, principalmente no que se refere à composição de matrizes híbridas carreadoras de fármacos em diferentes formas farmacêuticas.

I-3 *Justificativas*

A partir de todo o conteúdo supracitado, o presente trabalho foi planejado através da necessidade do desenvolvimento de sistemas inovadores de liberação de fármacos que sejam mais eficientes que os sistemas de liberação tradicionais e que os sistemas de liberação controlada já reportados, além da minimização dos efeitos colaterais sistêmicos, principalmente na administração de anti-inflamatórios. Fármacos estes utilizados muitas vezes para o tratamento de enfermidades crônicas, que não levam à cura das desordens a que são empregados, e ainda, ocasionam graves efeitos colaterais nos sistemas digestório, urinário e nervoso.

O trabalho de doutorado conta com a utilização de hidróxidos duplos lamelares, biopolímeros como a quitosana, pectina e alginato, e, de maneira inédita, das nanopartículas de grafite magnético, no desenvolvimento de sistemas bio-híbridos responsáveis por manter e otimizar as propriedades físicas, químicas, mecânicas, terapêuticas e toxicológicas dos fármacos estudados, tanto intercalados quanto em sua forma pura, através da proteção dos mesmos por matrizes bio-híbridas responsáveis por uma liberação controlada em distintos meios que simulam diferentes tecidos-alvos do organismo, aliados a resposta positiva frente à aplicação de campo magnético externo, que se supõe ser capaz de modular os níveis de liberação do fármaco.

II- OBJETIVOS

II-1 Objetivos gerais

O trabalho planeja alcançar múltiplos objetivos almejando finalmente o desenvolvimento de bionanocompósitos baseados em diferentes formas farmacêuticas para a liberação controlada de fármacos *in vitro*. Conta com isso através da síntese de uma argila aniônica à base de hidróxido duplo lamelar Mg-Al como hospedeiro para a intercalação de dois fármacos: 5-aminosalicilato (5-ASA) e ibuprofeno (IBU), e

objetiva ainda a comparação das propriedades físicas e do comportamento dos sistemas que levam a incorporação do fármaco puro ou intercalado em HDL.

II-2 Objetivos específicos

A fim de simular as condições que ocorrem no interior do organismo pela administração de fármacos por via oral, os bionanocompósitos serão submetidos a variações de pHs partindo de um pH muito ácido (1,2) simulando o ambiente gástrico, chegando a pHs básicos (6,8-7,4) como são os ambientes intestinais, e para que se possa atingir uma liberação eficiente e controlada durante todo os ensaios *in vitro*, serão sintetizadas matrizes biopoliméricas híbridas que suportem as variações de pHs em função do tempo com temperatura (37°C).

Biopolímeros como a quitosana e pectina serão utilizados como matriz polimérica e recobrimento, respectivamente, para compostos de intercalação à base de HDL/5-ASA e 5-ASA puro, na tentativa de se alcançar uma liberação controlada nas condições de tempo e pH que simulem a última zona intestinal (pH7,4), referente ao cólon, objetivo do emprego deste fármaco que por administração por via oral não consegue uma absorção efetiva nessas áreas, trazendo ainda uma série de efeitos colaterais sistêmicos relacionados a seu uso continuado.

Através da reconhecida estabilidade entre o biopolímero alginato e o composto de intercalação à base de ibuprofeno por entre as lâminas do sólido inorgânico HDL, uma matriz bio-híbrida inovadora será sintetizada para ser empregada em diferentes formas farmacêuticas, contando com a presença inédita de nanopartículas de grafite magnético pré-sintetizadas, esperando valer-se das propriedades que o grafite magnético possa conferir aos sistemas, como proteção física contra a absorção de água, melhora da resistência mecânica e resposta positiva frente à aplicação de campo magnético externo, almejando o desenvolvimento de um sistema modelo inovador de transporte de fármacos e substâncias.

III-PARTE EXPERIMENTAL

III-1. Reagentes de partida

Na Tabela 1 apresentam-se os reagentes utilizados nesta pesquisa, assim como sua fórmula, procedência e pureza. A água ultrapura (resistividade 18,2MΩ cm) foi obtida a partir do equipamento *Maxima Ultrapure Water-Elga*, ICMM, Madri.

Tabela 1: Reagentes utilizados na pesquisa.

<i>Reagentes</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Procedência</i>	<i>Pureza (%)</i>
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	Panreac	P.A
Ácido clorídrico 37%	HCl	Carlos Erba	P.A
Ácido periódico	H ₅ IO ₆	Sigma-Aldrich	P.A
5-aminosalicilato (5-ASA)	C ₇ H ₇ NO ₃	Sigma-Aldrich	> 98
Alginato de sódio	NaC ₆ H ₇ O ₆	Sigma-Aldrich	-----
Cloreto de Alumínio hexahidratado	AlCl ₃ .6H ₂ O	Fluka	> 99
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂	Sigma-Aldrich	> 99
Cloreto de Magnésio hexahidratado	MgCl ₂ .6H ₂ O	Panreac	> 99
Cloreto de Sódio	NaCl	Sigma-Aldrich	> 99
Carbonato sódico	Na ₂ CO ₃	Merck	> 99
Etanol absoluto	C ₂ H ₅ OH	Panreac	P.A
Fosfato monobásico sódico	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sigma-Aldrich	> 99
Grafite em pó	C	Sigma-Aldrich	> 99
Hidróxido de sódio	NaOH	Fluka	> 98
ibuprofeno sódico	C ₁₃ H ₁₇ NaO ₂	Sigma-Aldrich	> 98
Metabissulfito de sódio	Na ₂ S ₂ O ₅	Sigma-Aldrich	> 98
Mucina de estômago de porco	-----	Sigma-Aldrich	-----

Pectina de frutas cítricas	$(C_6H_4O_6)_n$	Sigma-Aldrich	-----
Quitossana	$(C_6H_{11}O_4N)_n$	Sigma-Aldrich	-----
Reagente Schiff's	$C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$	Sigma-Aldrich	-----

III-2. Preparação dos materiais

III-2.1. Síntese de hidróxidos duplos lamelares de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e $AlCl_3 \cdot 6H_2O$

A síntese destes hidróxidos duplos lamelares (HDL) à base de magnésio e alumínio, foi realizada na proporção Mg-Al 2:1 (DE ROY, 1991). Para a síntese do HDL ($[Mg_{0,67}Al_{0,33}(OH)_2]Cl_{0,33} \cdot nH_2O$), onde nH_2O é um número variável de moléculas de água de hidratação dos íons intercalados na amostra, foram utilizados 18mmol de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e 9mmol de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ dissolvidos em 400mL de água ultrapura decarbonatada, mantida sob um fluxo de nitrogênio para minimizar a contaminação com gás carbônico atmosférico, para que não ocorresse a intercalação do ânion carbonato com o sólido sintetizado. Esta solução de sais foi então gotejada lentamente (velocidade de 2mL/min) através de uma das bombas peristálticas que compõem o sistema do equipamento Dosino® (ICMM-Madri), em 100mL de água ultrapura, previamente decarbonatada sob um fluxo de nitrogênio de baixa intensidade. O sistema foi mantido em baixa agitação magnética, sob um fluxo de nitrogênio e o pH de $9 \pm 0,2$ foi mantido constante através do gotejamento automático e controlado de NaOH 1M do gotejador automático do sistema que compõe o Dosino®. Finalizada a etapa de síntese, o sistema foi mantido em agitação constante, em baixo fluxo de nitrogênio, a $60^\circ C$, por 24-48 horas, com o objetivo de permitir o crescimento dos cristais de HDL. O sólido formado foi então recuperado por centrifugação (3600rpm/25 minutos) e lavado cinco vezes com água ultrapura. O HDL depositado foi seco em estufa a $60^\circ C$ e moído para caracterizações posteriores, e o sobrenadante foi descartado.

III-2.2. Curva analítica do 5-ASA

A elaboração das curvas de calibração do 5-ASA em diferentes pHs de tampão fosfato (pH 1,2 e pH 6,8) foi preparada a partir de uma solução-mãe com uma concentração de aproximadamente 2mmol/L. A partir desta solução, foram realizadas diluições para se obter soluções de concentrações de 1, 0,5, 0,2, 0,1, 0,06 e 0,03mmol/L. Foram colocados 3mL de cada solução em uma cubeta de quartzo e a leitura das absorvâncias foi realizada por um espectrofotômetro UV-vis (*Shimadzu UV1201 spectrophotometer* ICMM-Madri) em um comprimento de onda de 303nm. Elaborou-se dois gráficos relacionando as concentrações com os valores das absorvâncias do 5-ASA em diferentes pHs. Com os valores experimentais, por regressão linear, foram obtidas as equações da reta.

III-2.3. Curva analítica do IBU

A elaboração das curvas analíticas do IBU em água (pH 5,5) e em solução tampão fosfato (pH 7,4) foi preparada a partir de uma solução mãe com uma concentração de aproximadamente $9,68 \cdot 10^{-4}$ g/L. Diluições seriadas a partir da solução-mãe foram realizadas para se obter soluções de concentrações de $4,81 \cdot 10^{-4}$, $2,64 \cdot 10^{-4}$, $1,21 \cdot 10^{-4}$, $5,83 \cdot 10^{-5}$ e $2,9 \cdot 10^{-5}$ g/L. Foram colocados 3mL de cada solução em uma cubeta de quartzo e a leitura das absorvâncias foi realizada por um espectrofotômetro UV-vis (*Shimadzu UV1201 spectrophotometer* ICMM-Madri) em um comprimento de onda de 260nm. Elaborou-se dois gráficos relacionando as concentrações com os valores das absorvâncias do IBU em diferentes pHs. Com os valores experimentais, por regressão linear, foram obtidas as equações da reta.

III-2.4. Intercalação de 5-ASA e IBU em HDL

Os métodos de intercalação de moléculas aniônicas em HDL podem ser realizados através de troca iônica, coprecipitação e reconstrução (DARDER et al., 2005), sendo dependentes de certas propriedades das moléculas intercaladas, como suas dimensões, solubilidade, entre outras. Neste estudo, a intercalação de 5-ASA em HDL (HDL/5-ASA) deu-se pelo método de coprecipitação, único dos métodos onde a

intercalação com 5-ASA obteve sucesso (ZHANG, 2005), já que este fármaco apresenta baixa solubilidade em água. Por outro lado, a intercalação de ibuprofeno em HDL (HDL-IBU) também ocorreu pelo método de coprecipitação, todos os outros métodos supracitados também obtiveram sucesso, porém, o método de coprecipitação foi o que apresentou maior quantidade de droga intercalada quando comparado com os métodos de troca iônica e reconstrução, e por isso, foi o eleito.

III-2.5. Método de coprecipitação

O procedimento para a síntese do híbrido HDL/5-ASA foi semelhante àquele previamente descrito (II-2.1.), com exceção no que diz respeito à adição da mistura aquosa de sais, que neste caso foi gotejada lentamente sobre 100mL de uma solução hidroalcoólica (50% v/v) que continha 8mmol de 5-ASA, o sistema de síntese no equipamento Dosino Metrohm (ICMM-Madrid) pode ser observado na figura abaixo. Quanto à síntese do híbrido HDL-IBU, foi realizada praticamente de igual maneira que para HDL/5-ASA, com exceção de que o ibuprofeno ($\approx 0,5\text{g}$) foi diluído diretamente em 100mL de água ultrapura. Finalizada esta etapa da reação, ambos os sistemas foram colocados em agitação magnética constante e em baixo fluxo de nitrogênio por 48 horas. Os sólidos formados foram centrifugados (3600rpm/ 25 minutos) e então lavados em água ultrapura por cinco vezes. Os sólidos recuperados foram secos em estufa a 60°C para posterior caracterização e na preparação das microesferas.

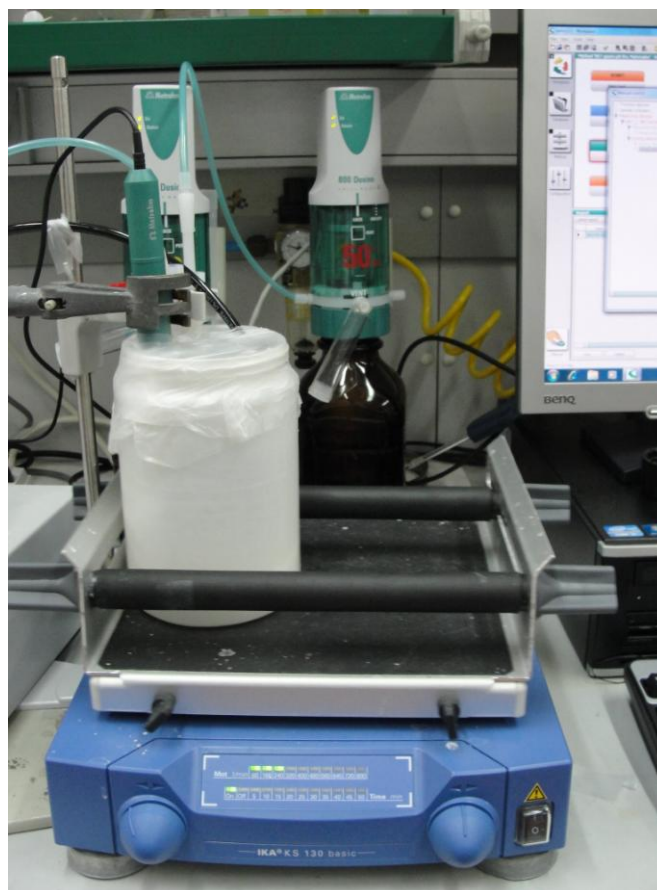


Figura 7: Sistema de síntese de HDL/5-ASA por coprecipitação no equipamento Dosino (ICMM-Madri).

III-2.6. Preparação dos biopolímeros: quitosana, pectina e alginato

Foram preparadas soluções de ambos os polímeros para utilização posterior. Alíquotas de 1g de diferentes massas molares (MM) de quitosana (Cht) foram dispersas em 50mL de água ultrapura mantidas em agitação magnética constante, foram adicionados 10mL de HCl 0,1mol e 40mL de água ultrapura (Cht 1%- massa/volume). O pH foi então ajustado ($\pm 6,5$) gotejando-se lentamente uma solução de NaOH 0,1mol para cada tipo de quitosana, dando origem a três grupos: Cht de baixa MM (50-190kDa), Cht de média MM (190-310kDa) e Cht de alta MM (310-375kDa). Com relação à pectina (Pec), foram preparadas duas diferentes soluções em água ultrapura mantidas sob agitação magnética constante até total solubilização do polímero, originando três grupos distintos em relação a proporção massa/volume da solução: Pec0,5%, Pec1% e Pec1,5%. O biopolímero alginato foi preparado de maneira a

alcançar uma concentração de 2% (massa/volume), mantido em agitação magnética até tornar-se uma solução viscosa e homogênea.

III-2.7. Preparação do grafite magnético pré-sintetizado

O grafite magnético foi pré-sintetizado de acordo com parâmetros pré-estabelecidos (PARDO, 2004), e então uma alíquota do material foi dispersa em água ultrapura alcançando a concentração final de 0,2µg/L, sendo sonicado até tornar-se uma dispersão acinzentada e estável, sendo utilizada logo após este procedimento.

III-3. Ensaio *in vitro* de mucoadesão de quitosanas por mucina

Este ensaio foi realizado a partir do método colorimétrico *Periodic Acid Schiff* (MANTLE & ALEN, 1978). Uma solução do reagente de *Schiff* foi preparada a partir da mistura de 30mL de *Schiff* reagente com 6mL de uma solução aquosa de HCl 1M. Foi então adicionado 0,1g de metabissulfito de sódio a cada 6mL da solução acima mencionada, e o resultante foi incubado em estufa a 37°C, até tornar-se sem coloração ou amarelo pálido. A solução do reagente de ácido periódico foi preparada pela mistura de 10µL de solução de ácido periódico 50% com 7mL de solução de ácido acético 7% (HE,1998). Através da análise dos valores de absorbâncias correspondentes às concentrações conhecidas de mucina em água ultrapura, foi construída sua curva analítica em 555nm que corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção da mucina na região do UV (*Shimadzu UV1201 spectrophotometer*, ICMM-Madri). Para isso, foram preparadas soluções de mucina com diferentes concentrações: 0,25; 0,5; 0,75 e 1mg/mL, e então foram adicionados 0,2mL do reagente de ácido periódico em cada uma das soluções. Estas amostras foram incubadas a 37°C por 2 horas em banho-maria termostaticado. Após este período, 0,2mL do reagente de Schiff foram adicionados a cada uma das soluções em temperatura ambiente, e 30 minutos após, a leitura em UV foi realizada. O ensaio de mucoadesão das diferentes amostras de quitosana foi determinado pelo mesmo procedimento, 10mg de cada tipo de quitosana foram dispersas nas soluções de mucina em agitação magnética, e após a adição dos reagentes e do período de incubação acima descrito, as amostras foram centrifugadas

(4000rpm/5min) e o sobrenadante foi utilizado para a mensuração do conteúdo de mucina livre estimado a partir da curva analítica de calibração da mucina. A amostra de quitosana com seu determinado peso molecular que apresentou a maior porcentagem de mucoadesão *in vitro* foi escolhida para a posterior preparação das microesferas.

III-4. Preparação das microesferas

III-4.1. Preparação das microesferas à base de quitosana/pectina

Uma solução aquosa de quitosana de média massa molar 1% (massa/volume) já descrita anteriormente (II-3), foi colocada em agitação magnética com 0,2g de 5-ASA, até sua completa homogeneização. O gel resultante foi introduzido em uma bureta, deixando-se gotejar lentamente em forma de gotas de pequeno volume sobre 200mL de uma solução de NaOH 2M. Torna-se visível ao cair das gotas, sua transformação em gel que vai se consolidando até estruturar-se no formato de microesferas, graças ao efeito de coagulação da quitosana quando em contato com uma solução de hidróxido de sódio, que atua neutralizando as cargas positivas dos grupamentos amino da quitosana, que se encontravam anteriormente protonados. Em poucos minutos, as microesferas resultantes foram delicadamente filtradas e lavadas abundantemente com água ultrapura para remover os íons residuais de Na⁺ e 5-ASA. Uma alíquota deste material foi congelada com N₂ líquido e liofilizada (Lyophilization Telstar Cryodos ICM-Madri), para uso posterior. Outra alíquota destas microesferas foram divididas em duas partes e imersas em soluções de pectina em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 1,5% massa/volume), foram então filtradas e imersas em 200mL de uma solução aquosa de CaCl₂ 5%. Após 15 minutos de reticulação pela solução de CaCl₂, as microesferas foram lavadas várias vezes com água ultrapura para garantir a retirada de íons Ca²⁺ residuais, então congeladas e liofilizadas sob as mesmas condições descritas, e armazenadas para os próximos estudos. Para a preparação das microesferas baseadas em quitosana/pectina com os compostos de intercalação a base de HDL/5-ASA, foi pesada uma quantidade deste material híbrido que continha o equivalente a 0,2g de 5-ASA (0,548g), calculado a partir dos resultados de análise química (CHN). As microesferas foram preparadas de maneira análoga ao descrito acima.

III-4.2. Preparação das microesferas à base de alginato/grafite magnético

Uma solução aquosa de alginato 2% (massa/volume), foi colocada em um banho de ultrassom com uma dispersão de grafite magnético em água destilada (0,2µg/mL), juntamente com uma solução aquosa de 0,2g de IBU ou com uma solução hidroalcoólica (50%/50%) de 0,5g de HDL-IBU, até sua completa homogeneização. O gel resultante foi introduzido em uma bureta, deixando-se gotejar lentamente em forma de gotas de pequeno volume sobre 200mL de uma solução de CaCl₂ 15% por 3 horas, devido a pouca viscosidade da solução, a fim de se assegurar um processo de reticulação eficiente. As microesferas resultantes foram filtradas e lavadas abundantemente com água ultrapura para remover os íons e partículas residuais. Uma alíquota deste material foi congelada com N₂ líquido e liofilizada (Lyophilization Telstar Cryodos), para uso posterior.

III-4.3. Preparação de películas à base de alginato/grafite magnético

Uma solução aquosa de alginato 2% (massa/volume), foi sonicada com uma dispersão de grafite magnético em água destilada (0,2µg/mL), juntamente com uma solução aquosa de 0,2g de ibuprofeno ou com uma solução hidroalcoólica (50/50%) de 0,5g de HDL-IBU, até sua completa homogeneização. O gel resultante foi distribuído em placas de Petri em iguais volumes (20mL por placa), e foi seco em ar por 72 horas para a completa evaporação do solvente. Após este período, as películas formadas foram delicadamente removidas das placas de Petri com o auxílio de uma espátula, e então foram imersas em uma solução de CaCl₂ 5% por 15 minutos, para que fossem reticuladas. As películas resultantes foram lavadas em abundância com água ultrapura para remover os íons e partículas residuais, sendo novamente secas em ar e armazenadas protegidas de umidade para uso posterior.

III-5. Técnicas de caracterização composicional, morfológica e estrutural

III-5.1. Difração de raios-x (DRx)

Os difratogramas de raios-x foram obtidos a partir de amostras preparadas em pó não orientado num equipamento da marca *BRUKER* modelo *D8-ADVANCE* (ICMM-Madri), utilizando radiação $K\alpha$ de cobre, com tensão de 40kV e intensidade da fonte de 30mA. Os difratogramas foram registrados com uma velocidade de $2^\circ/\text{min}$ entre 2 e 70 graus (2θ). A comprovação da síntese do hidróxido duplo lamelar e a possível intercalação com 5-ASA e IBU são possíveis de se obter através do cálculo das distâncias interplanares basais através da equação de Bragg:

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (1)$$

onde: n é a ordem de reflexão do pico, um número inteiro, λ é o comprimento de onda da radiação de raios-x (0,15418 nm), d é a distância basal em Ângstroms e θ é o ângulo de Bragg.

III-5.2. Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos a partir da utilização de dois equipamentos, um da marca *NICOLET* modelo *20SXC* (ICMM-Madri), e outro da marca *BRUKER ISS 66V-SI* (Emprapa - São Carlos), os quais operam mediante a técnica de transformada de Fourier. Os espectros foram registrados na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} sobre pastilhas das amostras a serem analisadas dispersas em KBr (2%), conformadas sob uma pressão de 10ton.

III-5.3. Análises térmicas: diferencial e termogravimétrica (DTA/TGA)

As análises térmicas: diferencial e termogravimétrica foram obtidas no equipamento da marca *SEIKO* (modelo *SSC/5200*- ICMM-Madri), sendo realizada simultaneamente a análise termogravimétrica (TGA), sua derivada (DTG) e a análise

térmica diferencial (DTA) em função da temperatura. A partir do aquecimento de aproximadamente 10mg de amostra desde a temperatura ambiente até alcançar 900°C, em uma velocidade de aquecimento de 10°C/min em uma atmosfera dinâmica de ar sintético (100mL/min).

III-5.4. Análise química elementar

A quantidade de 5-ASA dos compostos de intercalação HDL-5-ASA e de IBU dos compostos de intercalação HDL-IBU foi determinada mediante análise química elementar CHN, a partir de um analisador elementar da marca LECO modelo CHNS-932 (ICMM-Madri). A amostra sólida foi seca e moída (aproximadamente 2mg), sendo depositada em um crisol de platina que foi introduzido em um forno a 950°C, e os gases de combustão foram analisados automaticamente. A determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram obtidas a partir da comparação com as curvas padrão estabelecidas antes de cada série de medidas. Para a calibração foi utilizada uma amostra padrão de acetanilida com elevado grau de pureza.

III-5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo

As amostras foram visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo da marca FEI modelo NOVA NANOSEM 230 (ICMM-Madri). Este equipamento permite a visualização da morfologia de amostras trabalhando sob diferentes voltagens e com detectores distintos, sob pressão variável (desde 10 a 100Pa). Esta técnica utiliza um detector conhecido como vCD que permite a modificação da voltagem que atinge a amostra. O equipamento possui acoplado um sistema de microanálise por dispersão de energia de raios-x da marca EDAX modelo AMETEK (ICMM-Madri), o qual permite a realização de uma análise semiquantitativa das amostras escolhidas para tal. A preparação das amostras compreende a adesão de suas partículas em uma fita adesiva a base de carbono.

III-6. Estudos das propriedades dos materiais bio-híbridos

III-6.1. Determinação da quantidade de 5-ASA e IBU intercalado e da eficiência de encapsulação dos complexos formados

Para estimar a quantidade de fármaco intercalado e a eficiência de encapsulação da droga nas microesferas, 0,1g de 5-ASA foram imersas e dispersas em 50mL de solução tampão fosfato com pH 6,8 (0,035g de NaOH, 0,4g de NaH₂PO₄.H₂O e 0,62g de NaCl) durante 12 horas, e então em pH 1.2 (através de um gotejamento de HCl 0,1M na solução anterior) por mais 12 horas, em agitação magnética durante todo o período. A solução foi então filtrada em um sistema Milipore, usando uma membrana de acetato de celulose do tipo HVLP com tamanho de poro de 0,45µm. O conteúdo de 5-aminosalicilato liberado foi determinado por um espectrofotômetro UV-*vis* (Shimadzu UV1201 ICM-Madri), medido pela absorbância a $\lambda=303\text{nm}$ (Moharana,2011) e aplicando a lei de Lambert-Beer, valendo-se da equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica do 5-ASA. A eficiência de encapsulação foi determinada a partir da razão entre o conteúdo de 5-ASA presente nas microesferas e do conteúdo de intercalação teórico máximo. Com relação ao ibuprofeno, o procedimento foi praticamente o mesmo, com exceção de que 0,1g das microesferas foram mantidas em uma solução de tampão fosfato pH 7,4 por 12 horas, e analisada em UV-*vis* e $\lambda=260\text{nm}$ (BABU, 2006). Os resultados em porcentagem de intercalação dos fármacos e da eficiência de encapsulação foram calculados a partir das equações (2) e (3) (AMBROGI, 2008).

$$\% \text{ Droga intercalada} = \frac{\text{massa da droga na microesfera}}{\text{massa da microesfera}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{massa da droga intercalada}}{\text{massa teórica da droga intercalada}} \times 100 \quad (3)$$

III-6.2. Ensaios *in vitro* de liberação de 5-ASA e IBU

Para os estudos *in vitro* da liberação de 5-ASA encapsulado nos distintos materiais híbridos formados à base de quitosana/5-ASA/ pectina e quitosana/HDL-5-ASA/pectina, foram dispersos 0,1g de cada grupo em 50mL de um meio de liberação (descrito a seguir) sendo colocados em banho-maria termostatizado a 37°C. Em intervalos de tempo predeterminados, foram retiradas alíquotas (3mL) a fim de se quantificar o 5-ASA liberado no meio. Para isso, se utiliza o espectrofotômetro UV-*vis* Shimadzu, ICM, Madri) analisando a absorvância em $\lambda=303\text{nm}$, calculando-se a quantidade de fármaco liberado através da lei de Lambert Beer (equação 4), e equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica de calibração do 5-ASA.

$$A = \epsilon bc \quad (4)$$

onde: A é a absorvância, ϵ é a absorvância molar, b é o caminho ótico e c é a concentração. Uma vez analisada, a alíquota retirada é novamente incorporada ao experimento a fim de se manter o volume da solução constante. As soluções que foram utilizadas no estudo de liberação objetivaram as mudanças sequenciais de pH que ocorrem durante o processo *in vivo*, detalhadas a seguir:

- i) pH 1,2, simulando o fluido estomacal: solução de 0,1g NaCl, 0,7mL HCl em 50mL de água ultrapura
- ii) pH 6,8, simulando a primeira porção do fluido intestinal: ajuste da solução 0,03g de NaOH, 0,4g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,62g NaCl
- iii) pH 7,4, simulando a segunda porção do fluido intestinal através do ajuste da solução de pH 6,8 adicionando NaOH 1M até alcançar o pH almejado (ALCÂNTARA, 2010).

O estudo de liberação foi executado de maneira sequencial, em um único experimento, simulando as condições que ocorrem no trato gastrointestinal, com o

intuito de se aproximar das variações das condições que ocorrem *in vivo*, levando-se em consideração a administração de um fármaco por via oral. Assim, as microesferas foram inicialmente submetidas a um meio ácido, sendo colocadas em contato com a solução de pH 1,2 durante 2 horas. Após este período, foram incorporados ao sistema os sais descritos na etapa (ii) anterior para se alcançar o pH 6,8, sendo necessário o gotejamento de NaOH 1M no sistema, permanecendo sob estas condições 2 horas mais. Finalizada esta etapa, o pH foi ajustado a 7,4, adicionando-se novamente NaOH 1M, sendo mantido desta forma por mais 4 horas. A temperatura foi estabilizada a 37°C durante todo o experimento, e o estudo da quantidade de 5-ASA liberado em diferentes e predeterminados intervalos de tempo ocorreu da mesma maneira supracitada.

Este estudo quando realizado para a liberação *in vitro* de IBU encapsulado nos distintos materiais híbridos formados à base de alginato/IBU/grafite magnético e alginato/HDL-IBU/grafite magnético, foi realizado de maneira similar ao supracitado, porém, o experimento foi executado em um único pH (7,4) durante as oito horas de duração, uma vez que o sistema HDL-IBU já é conhecido e comprovado sua eficiência (ALCÂNTARA, 2010), dessa forma, este pH foi escolhido por ser a condição mais hostil tanto para o alginato quanto para o ibuprofeno, onde apresentam a maior solubilidade (GARCÍA, 2003), dessa forma, proporcionando condições ideais para a avaliação da função que o grafite magnético possa desempenhar no sistema.

De modo similar, o estudo de liberação *in vitro* de ibuprofeno foi realizado com as películas baseadas em alginato/grafite magnético, incorporado diretamente na matriz híbrida, ou sob a forma de compostos de intercalação com as lâminas de HDL. Porém, as amostras foram confeccionadas em formatos quadrangulares com a área de 1x1cm² imersos em 15mL de solução tampão fosfato (pH7,4).

III-6.3. Estudos *in vitro* da capacidade de absorção de água

O estudo das propriedades de absorção de água das microesferas foi realizado a partir da submersão de 0,05g de cada grupo em diferentes meios: i) uma solução de pH 1,2 que simula o fluido estomacal e iii) uma solução de pH 6,8 que simula o fluido

intestinal, em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), sendo ocasionalmente agitado. Em intervalos de tempo predeterminados as microesferas submersas foram extraídas, o excesso de água foi removido delicadamente com o auxílio de um papel absorvente, e então foram imediatamente pesadas em uma balança analítica de alta precisão. O ensaio quando realizado para os compostos de intercalação a base de HDL-IBU e IBU à base de alginato/grafite magnético, tanto sob a morfologia de microesferas quanto películas (1cm²), foram realizados em um único pH (7,4), pelos mesmos motivos que levaram a utilização deste meio no estudo *in vitro* de liberação. Os dados referentes à quantidade de absorção de água por cada grupo foram determinados pela equação (5) descrita por Remuñan-López & Bodmeier.

$$\text{Absorção de água (mg / mg)} = \frac{P_2 - P_1}{P_1} \quad (5)$$

Onde P₁ e P₂ referem-se respectivamente a massa das microesferas hidratado e inicial.

III-6.4. Estudo das propriedades mecânicas de resistência à tração e deformação específica das películas à base de alginato/grafite magnético

Com o objetivo de avaliar o comportamento das películas compostas por ibuprofeno/alginato e ibuprofeno/alginato/grafite magnético secas e úmidas em testes de resistência à tração (MPa) e de deformação específica do material até sua ruptura (%), foi realizado o ensaio mecânico através do equipamento de ensaio universal EMIC (Modelo DL-3000 Embrapa São Carlos), através da aplicação de uma carga de 50kgF em uma velocidade de 50mm/min até sua ruptura. Os corpos de prova retangulares (100mmx5mm) foram pré-condicionados a uma temperatura de 20°C, em uma umidade relativa de 65%, e aqueles que foram analisados úmidos foram imersos em água ultrapura por 2 horas anteriores ao ensaio. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística *t* (*Student*) através da utilização do *software* R. Este estudo permitiu ainda inferir a influência que as nanopartículas de grafite magnético exerciam nas propriedades mecânicas dos bionanocompósitos testados.

III-6.5. Estudo da variação da espessura de película dos materiais à base de alginato/grafite magnético em função do tempo

Estudos adicionais àqueles de resistência à tração e das propriedades físicas, como o de espessura de película foram realizados, a fim de se interpretar e inter-relacionar os resultados obtidos, uma vez estas propriedades podem afetar diretamente o sucesso dos futuros sistemas de liberação controlada de fármacos.

Amostras quadrangulares (1cm^2) dos diferentes bionanocompósitos sintetizados sob a morfologia de películas tiveram suas espessuras iniciais (película seca) aferidas com o auxílio de um paquímetro digital (CD-15CX Mitutoyo Embrapa São Carlos) e então foram imersas em solução tampão fosfato (pH7,4), e em intervalos de tempo predeterminados, as aferições das espessuras de películas foram realizadas até o momento em que a película começou a romper danificando a estrutura do material.

CAPÍTULO 1. Síntese de hidróxidos duplos lamelares

O presente capítulo elucida os resultados obtidos na síntese e na caracterização físico-química dos novos materiais à base de hidróxidos duplos lamelares, que serviram de partida para a síntese de diferentes bionanocompósitos. Esta parte do trabalho de doutorado foi realizada no *Instituto de Ciencias dos Materiales de Madrid*, Espanha, sob a supervisão de Dr. Eduardo Ruiz-Hitzky. Foram sintetizados materiais baseados em HDL, para posteriormente ser intercalado com os fármacos e então serem recobertos e/ou mesclado com polímeros ou grafite magnético.

Resultados e discussão

1.1 Estudos estruturais e composicionais do sólido sintetizado

Os metais anfitriões escolhidos foram Mg-Al, pois apresentam a propriedade de biocompatibilidade, tornando-se o material hospedeiro eleito para utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos (CONSTANTINO, 2008). O sólido sintetizado possuía em suas interlâminas íons Cl^- , de acordo com a metodologia de coprecipitação já descrita anteriormente, sendo formado através de uma reação de troca iônica entre as soluções de sais. O HDL Mg-Al foi analisado por EDS em diversas zonas da mesma amostra, e a proporção esperada entre Mg:Al que era de 2:1, foi encontrada aproximada, conforme ilustra a figura 8 (a e b), e apresenta a seguinte fórmula teórica: $[\text{Mg}_{0.67}\text{Al}_{0.33}(\text{OH})_2\text{Cl}_{0.67.n}\text{H}_2\text{O}]$, e torna-se possível ainda pela mesma técnica evidenciar a morfologia das estruturas que compõem o HDL, orientando-se em formato de pequenos flocos, assim como observado por Ahmed em 1967 (FE-SEM).

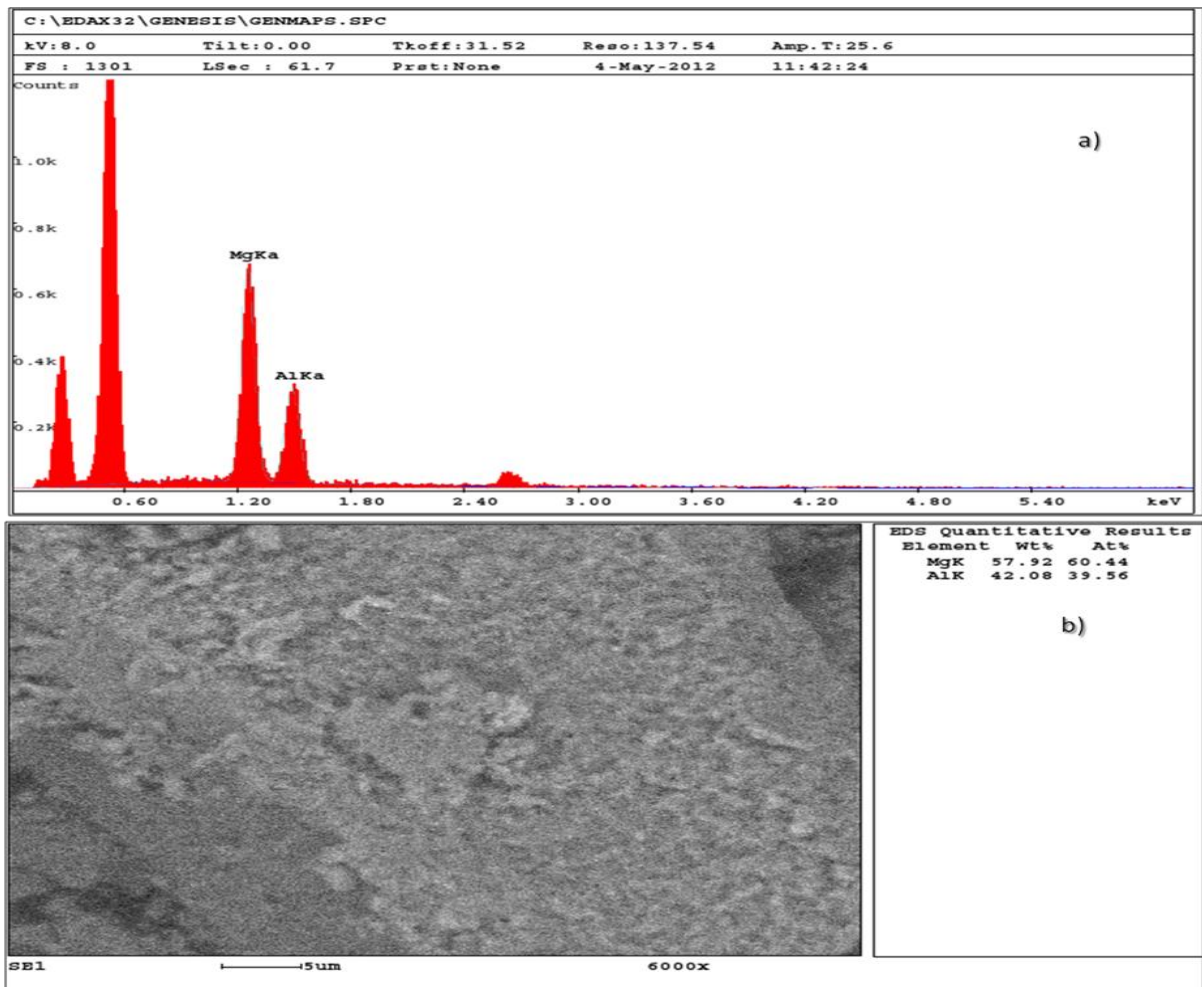


Figura 8: Microanálise semiquantitativa por EDAX/EDS, ilustrando a proporção de Mg-Al do HDL (a) e da porcentagem aproximada dos metais presentes na amostra, além de sua morfologia superficial (b).

Os resultados obtidos pela técnica de difração de raios-x (DRx) contribuem para a confirmação da síntese da argila aniônica HDL, através da correspondência dos difratogramas (figura 9) ao perfil esperado do material (YUN, 1996) e pela congruência entre as distâncias interplanares obtidas pela equação de Bragg e àquelas encontradas na literatura (CARJA, 2007). As fases obtidas são claramente puras e com cristalinidade bidimensional (TYNER, 2004). Os índices de *Miller* (hkl) são utilizados para notificar orientações e planos cristalinos e que conta com uma simetria hexagonal. (CAVANI, 1991). Suas respectivas distâncias interplanares (d_{hkl}) estão explícitas na tabela 2. O espaçamento basal é deduzido a partir da distância interplanar da região (003), medida

conhecida para os hidróxidos duplos lamelares Mg-Al com os íons Cl^- de 0,77nm (LOPEZ, 1996).

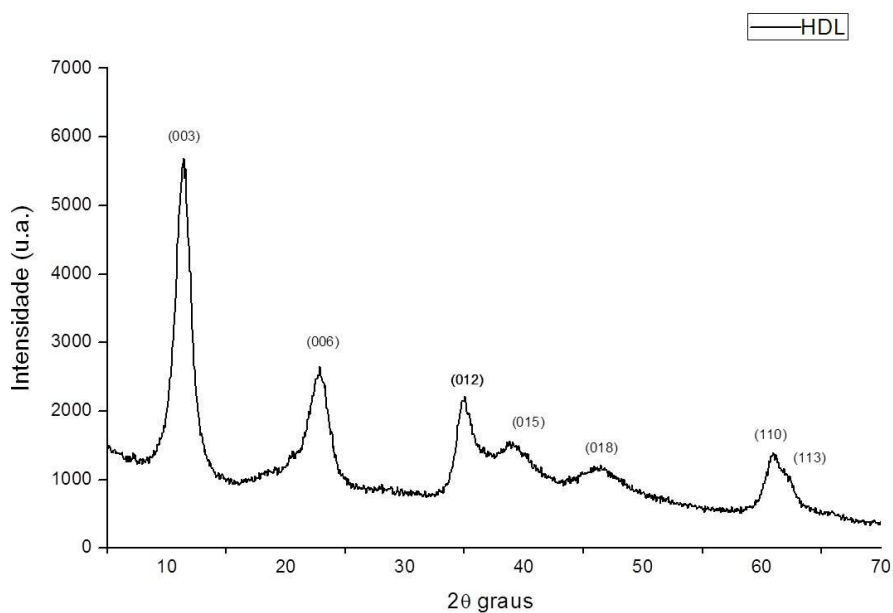


Figura 9: Difratograma de raios-x do HDL MgAl-Cl.

Tabela 2: Indexação dos sinais de DRx das distâncias interlaminares para o HDL.

<i>hkl</i>	2 θ	d (nm)
(003)	11,4	0,77
(006)	22,9	0,39
(012)	34,9	0,27
(015)	39,0	0,24
(018)	46,3	0,21
(110)	60,9	0,17
(113)	62,4	0,17

Aminoff e colaboradores reconheceram através de estudos em DRx a existência de dois politipos de hidrotalcita, pois as lamelas inorgânicas do HDL podem organizar-se de acordo com duas simetrias diferentes, originando células unitárias romboédricas ou hexagonais. A grande maioria dos HDLs sintéticos apresenta célula unitária hexagonal. Para este tipo de simetria, a dimensão da célula unitária a é em função da distância entre dois centros metálicos adjacentes em uma lâmina (duas vezes o valor d_{110}), e a dimensão da célula unitária c coincide com três vezes a distância entre duas lâminas adjacentes (d_{003}). Os parâmetros de rede a e c foram calculados a partir da posição dos picos da DRx, o valor obtido correspondente ao parâmetro c (2,31nm) assume que o material sintetizado trata-se de um politipo 3R, o que corresponde a uma célula unitária hexagonal (VACCARI,1998) A tabela 3 evidencia os parâmetros de rede para o HDL sintetizado.

Tabela 3: Parâmetros de rede do HDL MgAl-Cl⁻ sintetizado, obtidos a partir de DRx.

a (nm)	c (nm)
0,35	2,31

A partir da espessura conhecida da lâmina de brucita que é de aproximadamente 0,48nm (MYATA, 1980), torna-se possível o cálculo do espaçamento basal para o HDL sintetizado, que pode variar, dependendo da natureza dos íons que estão na interlâmina. Desta forma, foi calculado o valor de 0,29nm para o espaçamento basal do HDL MgAl-Cl⁻, que é compatível com o tamanho do íon cloro, comprovando a sua existência na interlâmina (KIELLAND,1937). A tabela 4 detalha os possíveis ânions que podem estar presentes na interlâmina das hidrotalcitas e seu respectivo valor de espaçamento basal.

Tabela 4: Valores de espaçamento basal para diferentes ânions intercalados em HDL, adaptado de Cavani, 1991.

Ânions interlamelares	Espaçamento basal (nm)
OH^-	0,755
CO_3^{2-}	0,765
F^-	0,766
Cl^-	0,776
I^-	0,795
Br^-	0,816
NO_3^-	0,879
SO_4^{2-}	0,858
ClO_4^-	0,920

A estabilidade térmica do material sintetizado foi caracterizada pelas técnicas termogravimétricas (TGA) e pela análise térmica diferencial (DTA), que podem ser evidenciadas a seguir (figura 10) obtidas em atmosfera de ar sintético (100mL/min). Neste perfil térmico pode-se distinguir as perdas de massa em determinadas faixas de temperaturas que são típicas para HDLs à base de MgAl-Cl (CONSTANTINO, 1995).

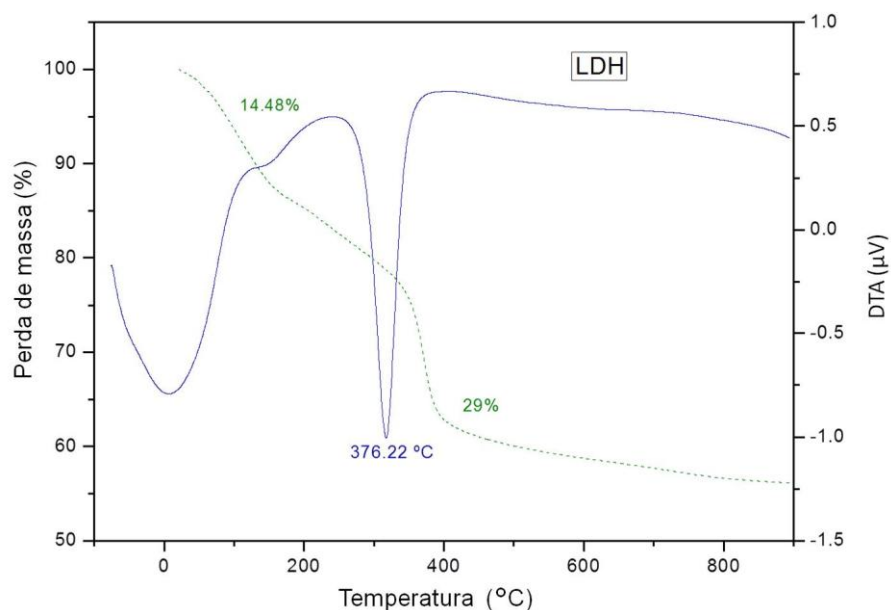


Figura 10: Curvas de TGA e DTA do híbrido sintetizado HDL MgAl-Cl.

A análise dos termogramas permitiu observar duas perdas de massa mais proeminentes, a primeira de 14,5% que ocorreu desde a temperatura ambiente até cerca de 270°C, que corresponde a um processo endotérmico de eliminação das moléculas de água adsorvidas pela superfície externa e pela interlâmina. Através deste processo de perda de água, pode-se supor a quantidade de água que o material sintetizado possui e descrever sua fórmula teórica como $[Mg_{0,67}Al_{0,33}(OH)_2]Cl_{0,33} \cdot 0,3H_2O$. A segunda perda de massa corresponde a 29%, que também corresponde a um processo endotérmico relacionado com a desidroxilação das camadas octaédricas do tipo brucita e posterior liberação dos íons cloro, que ocorreu em temperaturas superiores a 300°C. A literatura aponta ainda perdas de massa em temperaturas superiores a 500°C, correspondentes a completa desidroxilação do material originando a espinela ($MgAl_2O_4$) e o óxido de magnésio (MgO) (CONSTANTINO, 1995).

A figura 11 mostra o espectro de FTIR da região entre 4000-500 cm^{-1} do material sintetizado, onde foram observadas bandas características dos hidróxidos duplos lamelares, como as bandas entre 600-400 cm^{-1} que são atribuídas às vibrações de deformação de metal-oxigênio (M-O e M-O-M) das lâminas do sólido, as bandas entre 3600-3200 cm^{-1} centrada em 3390 cm^{-1} , correspondem às hidroxilas presentes na

superfície do HDL, comprovando a estrutura esperada do material. A banda centrada em 1366 cm^{-1} corresponde à presença do íon carbonato presente no material, o que não é interessante, pois mostra que houve contaminação com o gás carbônico do ambiente, este valores devem ser os mínimos possíveis. Dessa forma ficou evidente a necessidade de uma reavaliação do modo como deve ser empregada a corrente de nitrogênio no sistema, para que a presença dos íons carbonatos seja minimizada.

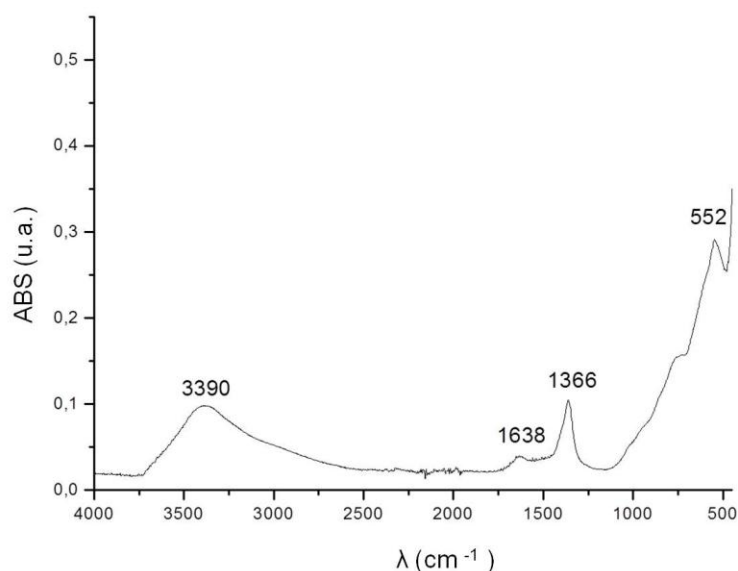


Figura 11: Espectro da região de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ do infravermelho correspondente ao HDL.

1.2. Conclusões parciais

Os hidróxidos duplos lamelares foram sintetizados com sucesso através da confirmação das técnicas de caracterização apresentadas. Estes materiais estão aptos a serem utilizados como um sólido inorgânico anfitrião para serem intercalados pelas moléculas de fármacos.

Estes perfis obtidos são de suma importância para serem comparados com os perfis dos híbridos sintetizados, a fim de entender se as futuras intercalações foram realizadas, e ainda, se a estrutura do sólido foi mantida após os processos de intercalação.

CAPÍTULO 2. Preparação de microesferas à base de quitosana/pectina para liberação controlada de 5-ASA

Este capítulo também aborda parte do trabalho de doutorado que foi realizado no *Instituto de Ciencias dos Materiales de Madrid*, Espanha, sob a supervisão de Dr. Eduardo Ruiz-Hitzky. Apresenta a preparação de microesferas baseadas em matrizes bio-híbridas que incorporam 5-ASA em sua forma pura ou em compostos de intercalação em argilas aniônicas à base de HDL, destinadas à liberação gradual e controlada em condições que simulam o cólon intestinal. A presente pesquisa foi aceita para publicação no *International Journal of Pharmaceutics*, sob o título: “*Pectin-coated chitosan-LDH bionanocomposite beads as potential systems for colon-targeted drug delivery*”, 2013.

Fármaco pouco hidrossolúvel, indicado como tratamento para doenças de origens colônicas, como colites intestinais, Síndrome de Chron, entre outras, sua administração tradicional é majoritariamente por via oral, o que acarreta uma série de consequências aos pacientes, uma vez que grande parte do 5-ASA é rapidamente degradado pelo sistema gástrico superior, sendo responsável por pouca eficiência de absorção no cólon intestinal, e, por isso, é necessário seu uso continuado. Adicionalmente, sua absorção sistêmica ocasiona uma série de efeitos colaterais como úlceras gástricas, pancreatite e toxicidade renal (DHANESHWAR, 2007; SCHELLEKENSA, 2007). Por isso que o desenvolvimento de sistemas inovadores no transporte e liberação colônicas são tão interessantes, uma vez que não foram descobertas até agora a cura para tais desordens, mesmo sendo extensivamente estudado há pelo menos duas décadas (SINHA, 2001).

Resultados e Discussão

2.1. Curva analítica do 5-ASA

Foram realizadas as curvas analíticas de calibração do 5-ASA em diferentes soluções de tampões fosfato (pH 1,2 e pH 6,8). Preparadas a partir de uma solução-mãe com uma concentração de 2mmol/L. A partir desta solução, foram realizadas diluições para se obter soluções de concentrações de 1, 0,5 0,2, 0,1, 0,06, 0,03mmol/L, os valores de absorvância correspondentes a cada concentração podem ser evidenciados na tabela 5, realizadas por um espectrofotômetro UV-vis em um comprimento de onda fixo de 303nm, os perfis obtidos podem ser analisados nos gráficos das figuras 12 e 13.

Tabela 5: Valores das absorvâncias de soluções de 5-ASA obtidas por espectrofotometria $\lambda=303$ nm, utilizando como solventes diferentes soluções de tampão fosfato (pH 1,2 e pH 6,8), DP da média (n=3).

[mmol/L]	pH 1,2	pH 6,8
	ABS	ABS
1	2,230 ± 0,002	1,498 ± 0,002
0,5	1,127 ± 0,020	0,795 ± 0,004
0,2	0,577 ± 0,002	0,366 ± 0,002
0,1	0,290 ± 0,004	0,184 ± 0,002
0,06	0,116 ± 0,001	0,094 ± 0,002
0,03	0,044 ± 0,020	0,047 ± 0,002

As curvas formadas pelos pontos obtidos foram calculadas por regressão linear, originando as equações de reta no formato $y = a + bx$, os coeficientes de correlação linear foram obtidos, evidenciando que ambos podem ser utilizados na quantificação do fármaco presente no sobrenadante das reações de intercalação entre HDL e 5-ASA, já que foi observado linearidade entre as concentrações dos fármacos e os valores da absorvância lidos, como está ilustrado nas figuras a seguir:

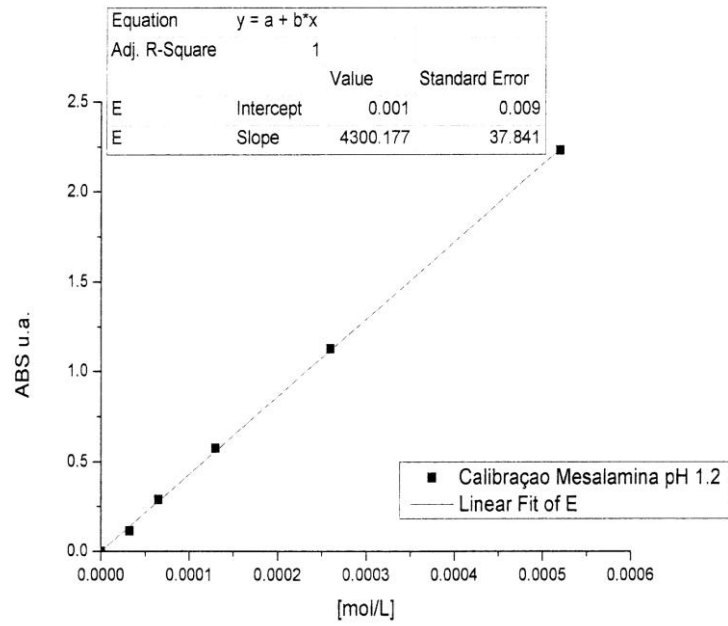


Figura 12: Curva analítica do 5-ASA utilizando como solvente solução tampão fosfato pH 1,2.

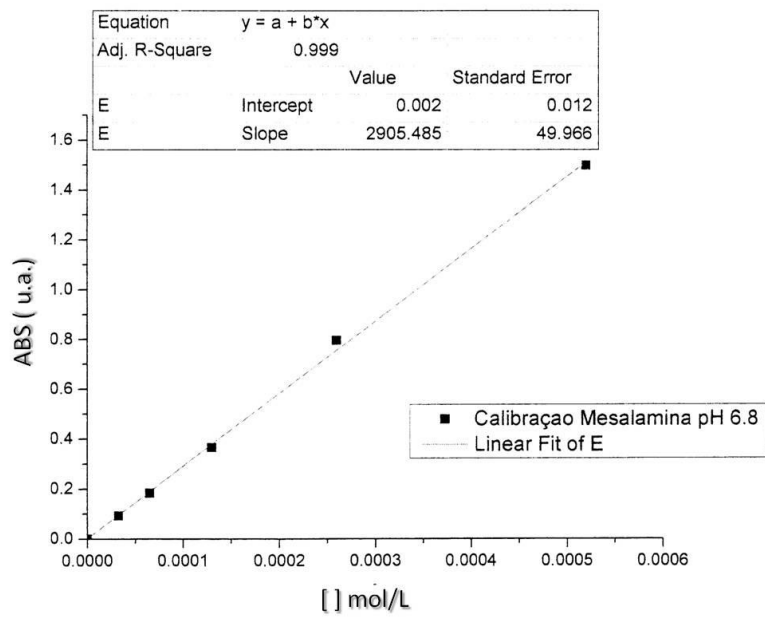


Figura 13: Curva analítica do 5-ASA utilizando como solvente solução tampão fosfato pH 6,8.

2.2. Intercalação de 5-ASA em HDL MgAl-Cl pelo método de coprecipitação

Esta técnica possibilitou a síntese de HDL na presença de uma solução hidroalcoólica (50%/50%) de 5-ASA, através da adição de uma solução aquosa com íons Mg^{2+} e Al^{3+} sob pH constante a 9 como já descrito anteriormente. Através da comparação dos difratogramas do HDL puro e intercalado com 5-ASA (figura 14), foi observado que as reflexões típicas do HDL mantiveram-se presentes, apesar de apresentar menor cristalinidade quando comparada com o difratograma do HDL puro, comprovando que a estrutura do HDL foi mantida mesmo após intercalação com 5-ASA. Adicionalmente, a intercalação do 5-ASA com a hidrotalcita foi corroborada através da reflexão (003) do difratograma HDL/5-ASA, ao sofrer um deslocamento para menores ângulos quando comparada com o difratograma do HDL de partida, o que indica que ocorreu um aumento do espaçamento basal devido à troca dos íons cloro pelas moléculas do fármaco.

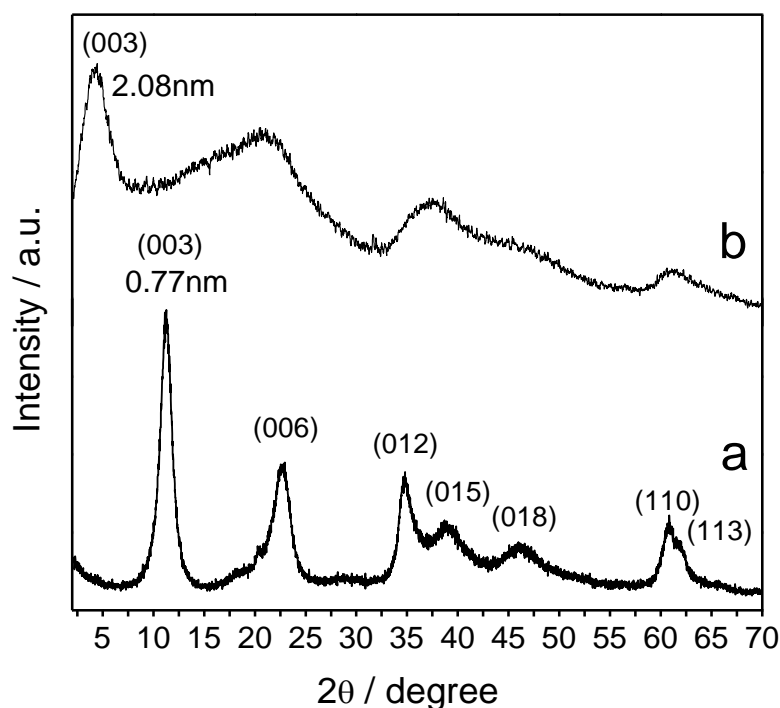


Figura 14: DRx do HDL de partida e do HDL/5-ASA obtido por coprecipitação.

Através da equação de Bragg, a nova distância interlaminar da reflexão (003) do composto HDL/5-ASA foi calculada ($d_{003}= 2,08\text{nm}$), considerando a espessura conhecida da lâmina de brucita ($0,48\text{nm}$), foi permitido inferir o espaçamento interlaminar ocupado pela molécula 5-ASA, de $1,60\text{nm}$, ligeiramente maior do que o encontrado por Zhang ($d_{003}=1,580\text{nm}$). As dimensões da molécula de 5-ASA foram estimadas em $0,72\text{nm}\times 0,57\text{nm}\times 0,67\text{nm}$ (Software Viewer Klite), com estas dimensões foi possível supor a organização em que o fármaco foi intercalado, já que d_{003} calculada foi maior que as dimensões de 5-ASA, foi sugerido que a molécula de 5-ASA organizou-se verticalmente em forma de bicamada por entre as lâminas de HDL, com seus ânions carboxila orientados em direção as lâminas que são carregadas positivamente, apesar de provavelmente haver ainda uma quantidade reduzida de íons Cl^- presentes na interlâmina do material HDL/5-ASA sintetizado. A figura 15 ilustra em esquema de uma possível orientação da molécula de 5-ASA intercalada por entre as lâminas do HDL MgAl-Cl^- .

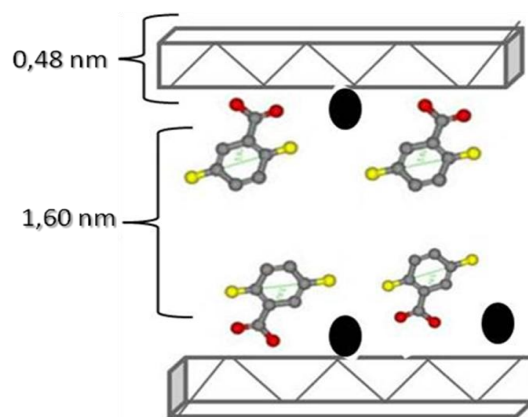


Figura 15: Esquema de uma possível orientação do 5-ASA em sua forma aniônica por entre as lâminas de HDL formando uma bicamada.

A análise elementar do híbrido sintetizado HDL/5-ASA corrobora a ideia de incorporação do fármaco entre as lâminas de hidrotalcita, através da porcentagem de carbono existente no material, como evidencia a tabela 6, apesar de que provavelmente a relação de troca entre os íons cloro presentes na interlâmina do HDL e das moléculas de 5-ASA não foi completa, uma vez que a capacidade de troca iônica do HDL é em torno de $330\text{ mEq}/100\text{g}$ (DARDER, 2005). Outra relação importante que pode ser feita a partir desta técnica, foi à verificação da proporção existente entre as porcentagens do

carbono e do nitrogênio presentes no material HDL/5-ASA, que pode comprovar que neste híbrido sintetizado, a proporção encontrada foi muito próxima àquela esperada, o que mostra que não houve ou que foi minimizada a contaminação com íons carbonatos, diferentemente com o que ocorreu na síntese do HDL de partida (capítulo 1), resultado essencial para um sistema que objetiva uma futura aplicação biológica.

Tabela 6: Quantidade de 5-ASA ($C_7H_7NO_2$) incorporado em HDL a partir da análise elementar.

Amostra	C (%)	N (%)	Quantidade de material
HDL/5-ASA	20,105	2,91	190 mEq/100g HDL

A caracterização por espectroscopia da região do infravermelho ($4000-500\text{ cm}^{-1}$), é uma técnica amplamente utilizada para a detecção das interações que existem entre o 5-ASA e o HDL. A figura 16 mostra os espectros do HDL de partida, do 5-ASA puro e do híbrido formado por coprecipitação HDL/5-ASA. A combinação de bandas de baixa intensidade comuns a ácidos próximas 2700 cm^{-1} desaparecem após a intercalação com HDL. Outra observação que corrobora a ideia de intercalação do 5-ASA é o deslocamento e redução de intensidade da banda 1654 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$) do espectro do 5-ASA puro em comparação com a banda 1628 cm^{-1} do híbrido formado, que corresponde a um *stretching* de CO^{2-} , que mostra que o fármaco apresenta-se em sua forma aniônica, permanecendo a carboxila do 5-ASA intercalada com o HDL. As bandas 1580 cm^{-1} e 1449 cm^{-1} são bandas típicas de interações N-H, referentes a um *bending* N-H e um *stretching* N-H respectivamente (ZHANG, 2005). As absorções típicas de brucita são indicadas pela região entre $600-400\text{ cm}^{-1}$, atribuídas às vibrações δ_{M-O-M} das lâminas do sólido inorgânico anfitrião, muito próximas daquelas encontradas no HDL de partida, comprovando que a estrutura do HDL foi mantida mesmo após intercalação com 5-ASA (VELU, 1999).

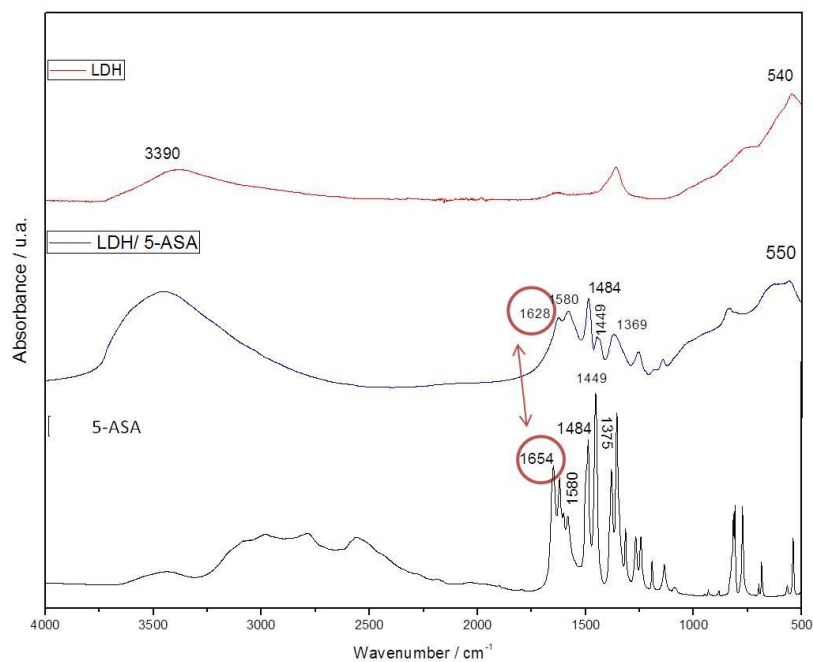


Figura 16: Espectros da região 4000-500 cm^{-1} do FTIR correspondentes ao HDL, HDL/5-ASA e 5-ASA.

A estabilidade térmica do composto HDL após intercalação com 5-ASA pôde ser analisada a partir dos estudos de DTA e TGA num intervalo entre 25-900°C, o comportamento do fármaco 5-ASA pode ser evidenciado na figura 17.

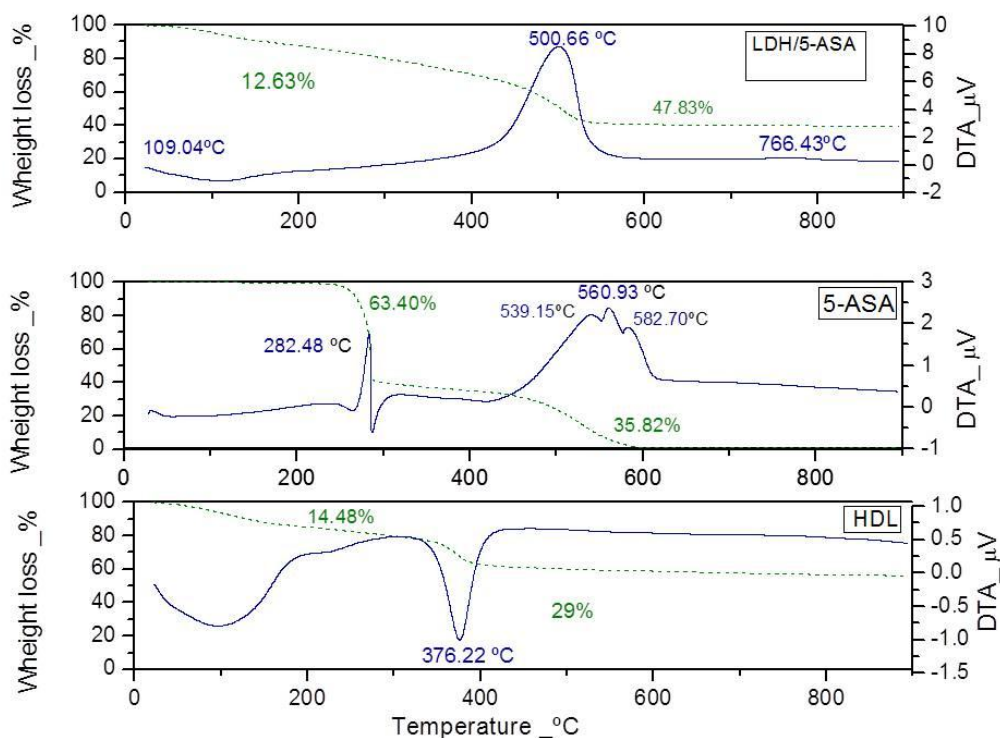


Figura 17: Curvas de TGA e DTA obtida em atmosfera de ar (fluxo 100mL/min) para o HDL intercalado com 5-ASA, para o 5-ASA e HDL puros, vistos de cima para baixo.

As curvas de análise térmica comprovaram mudanças consideráveis no comportamento do fármaco após sua intercalação. Ele se manteve mais estável quando em contato com as lâminas de HDL, uma vez que em seu estado puro, 5-ASA apresenta seu ponto de fusão em 282,5°C, o que acarreta numa perda de aproximadamente 40% de sua massa, o que não foi observado na forma do bio-híbrido HDL/5-ASA (MURA, 2011). Na curva do composto HDL/5-ASA foram observadas duas perdas de massa. A primeira centrada em 109°C (110-210°C) corresponde à eliminação de moléculas de água adsorvidas. A segunda é referente a um forte pico exotérmico em 500,7°C que corresponde a uma perda de massa de 47,8%, que indica a combustão total do fármaco (ZHANG, 2005), acompanhada de um pico muito suave em 766,4°C que corresponde à decomposição das espécies derivadas da condensação dos anéis aromáticos das moléculas de 5-ASA.

2.3. Estudo *in vitro* de mucoadesão de quitosanas por mucina

Este estudo foi baseado na simulação das condições que ocorrem nos tecidos intestinais *in vivo*, através do uso da mucina, principal glicoproteína presente nos tecidos intestinais, respiratórios, urogenitais (FEREZ-VILAR, 1999). Foi realizado através do método colorimétrico PAS (ácido periódico/ reagente Schiff), utilizado na determinação da quantidade de mucina livre calculada a partir de sua curva de calibração, uma vez que o polímero que apresente a maior capacidade de absorver mucina em *in vitro*, numa situação *in vivo*, apresentaria a maior capacidade de mucoadesão. Propriedade esta responsável por prolongar a atuação dos fármacos nos tecidos intestinais, essencial para uma liberação eficiente, já que a zona intestinal apresenta anatomicamente uma pequena área de absorção de drogas.

O biopolímero quitosana em três diferentes massas molares foram testados quanto a sua capacidade de mucoadesão em diferentes concentrações de mucina, como pode ser evidenciado na figura 18.

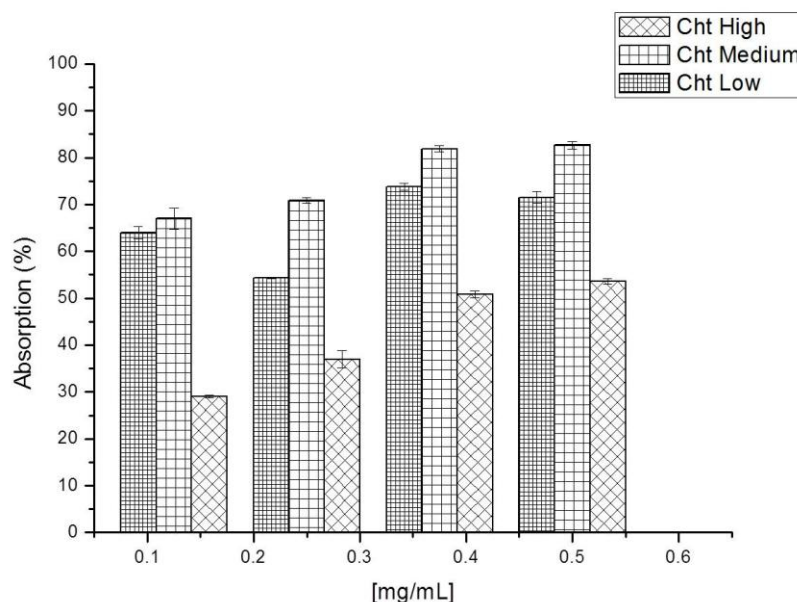


Figura 18: Absorção de mucina por quitosana em três massas molares distintas.

O grupo correspondente a quitosana de médio peso molecular apresentou a maior absorção de mucina em todas as suas diferentes concentrações, semelhante ao encontrado por Talaei e colaboradores, na faixa de 65-80%, e adicionalmente, os altos índices de absorção de mucina por quitosana de um modo geral sugerem a forte interação existente entre as cargas positivas da quitosana com as cargas negativas da mucina (HE, 1998) aumentando a mucoadesividade (MISHRA, 2008), propriedade dependente dos diferentes graus de desacetilação que podem compor as quitosanas, onde os menores pesos moleculares costumam apresentar as melhores propriedades adesivas. O grupo da quitosana de médio peso molecular foi escolhido para ser utilizado na síntese das diferentes microesferas.

2.4. Preparação de microesferas à base de quitosana/pectina

Os polímeros quitosana e pectina possuem ampla aplicação no setor de alimentos, e mais atualmente nas áreas biomédicas, atuando nas áreas de catálises, engenharia tecidual e na liberação controlada de fármacos (KIM, 2003; SOUZA, 2009; FEITOSA, 2009; SHAHIDI, 1999; YU, 2009). No que concerne à liberação de fármacos, a capacidade de reticulação destes polímeros torna possível a preparação de microesferas que em contato com os fluidos que simulam as condições corporais, permite que ocorra uma maior resistência à sua decomposição ou erosão, e, conseqüentemente, a liberação do fármaco. Com o intuito de reduzir a velocidade e aumentar a seletividade de liberação, foi abordada neste trabalho a viabilidade de um novo sistema de liberação de fármacos baseado na combinação de quitosana com diferentes concentrações de pectina. As microesferas foram preparadas através da incorporação dos compostos de intercalação à base de HDL/5-ASA ou 5-ASA puro (equivalente à massa de 5-ASA intercalada por entre as lâminas do HDL) e uma matriz de quitosana de médio peso molecular, utilizando como agente coagulador o hidróxido de sódio. O material bio-híbrido resultante foi recoberto com pectina em diferentes concentrações, utilizando como agente reticulante, uma solução de cloreto de cálcio 5%, originando grupos distintos que variavam desde a concentração de pectina, até a ausência de um dos polímeros. Dessa forma complexos binários e ternários foram

formados (tabela 7), e suas propriedades para atuarem como futuros sistemas de Liberação controlada de fármacos foram estudadas.

Tabela 7: Diferentes concentrações (m/v) de quitosana (Cht) e pectina (Pec) empregadas na preparação das microesferas.

Amostra	% Cht	% Pec
Cht/5-ASA	1	0
Cht/HDL-5-ASA	1	0
Pec/5-ASA	0	1
Pec/HDL-5-ASA	0	1
Cht/5-ASA/Pec	1	1
Cht/HDL-5-ASA/Pec0,5%	1	0,5
Cht/HDL-5-ASA/Pec1%	1	1
Cht/HDL-5-ASA/Pec1.5%	1	1,5

2.5. Técnicas de caracterização composicional, morfológica e estrutural dos bionanocompósitos preparados

A técnica de espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier foi utilizada por permitir o estudo das possíveis interações entre os biopolímeros e sólidos utilizados, proporcionando valiosas informações acerca da nova estrutura sintetizada (figura 19). No espectro que corresponde a quitosana pura (figura 19 A) podem ser evidenciadas bandas característica do polissacarídeo, como em 1654 cm^{-1} correspondente a $\nu_{\text{C=O}}$ (amida I), a banda em 1563 cm^{-1} é referente à δ_{NH_2} da amina e δ_{NH} (amida II) (Souza, 2009). As bandas em 1425 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} e 602 cm^{-1} podem ser atribuídas a δ_{SCH_2} , δ_{SCH_3} e a deformação *ring bending*, respectivamente. As bandas observadas em 1157 cm^{-1} e 1079 cm^{-1} correspondem a $\nu_{\text{C-O-C}}$ (LAWRIE, 2007). O

espectro do composto Cht/HDL/5-ASA sugere que além das bandas características correspondentes a quitosana supramencionadas, outras bandas podem ser utilizadas para corroborar a ideia de 5-ASA intercalado por entre as lâminas de HDL e a preservação das estruturas da hidrotalcita no material. O espectro pertencente à pectina pura (figura 19 D), apresenta bandas em 3460 cm^{-1} , 1745 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} , 1431 cm^{-1} e 1099 cm^{-1} , que podem ser atribuídas a ν_{OH} , $\nu_{\text{C=O}}$ dos grupamentos ester, ao *stretching* assimétrico de COO^- , e ao *stretching* simétrico de COO^- e $\nu_{\text{C-O}}$ de álcool primário. O espectro que corresponde ao complexo ternário obtido através da incorporação do HDL/5-ASA pela quitosana e pelo recobrimento da pectina a partir da reticulação com íons Ca^{2+} (figura 19 C) mostram as bandas em 552 cm^{-1} , que confirmam a preservação da estrutura do HDL. Adicionalmente, bandas típicas em 3442 cm^{-1} e em regiões $1600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$, podem ser assumidas como alcoóis alifáticos e possíveis interações entre os grupamentos amino e carboxílico dos biopolímeros (SHARMA, 2011). As bandas em 920 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} e 1105 cm^{-1} , podem ser interpretadas como sendo deformações aromáticas, vibrações C-C e C-O e vibrações C-N, respectivamente (SOUZA, 2009). As bandas correspondentes a quitosana em 1563 cm^{-1} provavelmente não puderam ser observadas devido à sobreposição com as bandas da pectina (KIM, 2003).

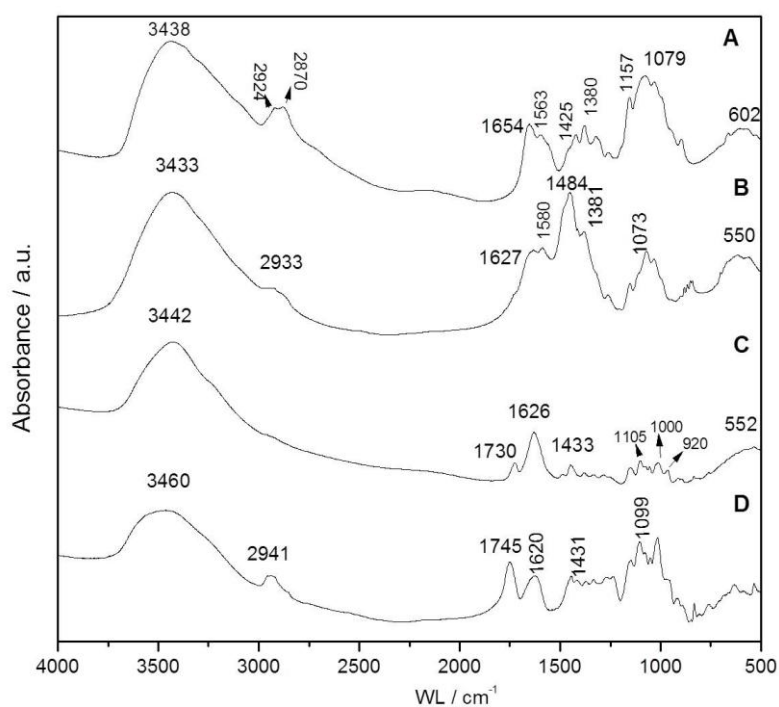


Figura 19: Espectro FTIR da região $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ correspondentes a quitosana (A), quitosana/HDL/5-ASA (B), quitosana/HDL/5-ASA/pectina (C) e pectina (D).

A figura 20 exibe as curvas de TGA e DTA. A figura 20 A correspondente à quitosana pura, e mostra uma perda de massa associada à eliminação de moléculas de água adsorvidas ($\approx 9\%$) até cerca de 100°C . A curva referente ao grupo Cht/HDL/5-ASA apresenta uma perda de massa de $14,4\%$, também correspondente à perda de moléculas de água, acompanhadas por uma perda de $29,2\%$ seguida de uma perda de $4,6\%$ (entre $220\text{-}530^{\circ}\text{C}$), que refletem a decomposição do 5-ASA simultaneamente com a degradação das cadeias poliméricas da quitosana; a curva de DTA da quitosana (figura 20 A) apresenta dois picos exotérmicos (entre $308\text{-}592,5^{\circ}\text{C}$) que corroboram esta ideia (PIYAKULAWAT, 2007); a última perda de massa de $11,6\%$ refere-se à decomposição dos compostos aromáticos do 5-ASA.

A curva de TGA da pectina pura (figura 20 C) mostra uma perda de massa de 9% associada com a eliminação das moléculas de água adsorvidas. Uma degradação polimérica sucessiva pode ser observada após os 200°C (KAUR, 2012). O comportamento térmico do complexo ternário (figura 20 D) sugere uma boa estabilidade térmica do composto. A existência de um único pico exotérmico observado acima dos 550°C pode sugerir uma consequência de uma elevada compatibilidade dos materiais que compõem o bionanocompósito formado, assim como os picos exotérmicos da pectina e quitosana, em $789,8^{\circ}\text{C}$ e $592,5^{\circ}\text{C}$, respectivamente, fusionaram-se, tornando um único pico em 558°C , sugerindo possíveis interações interpoliméricas.

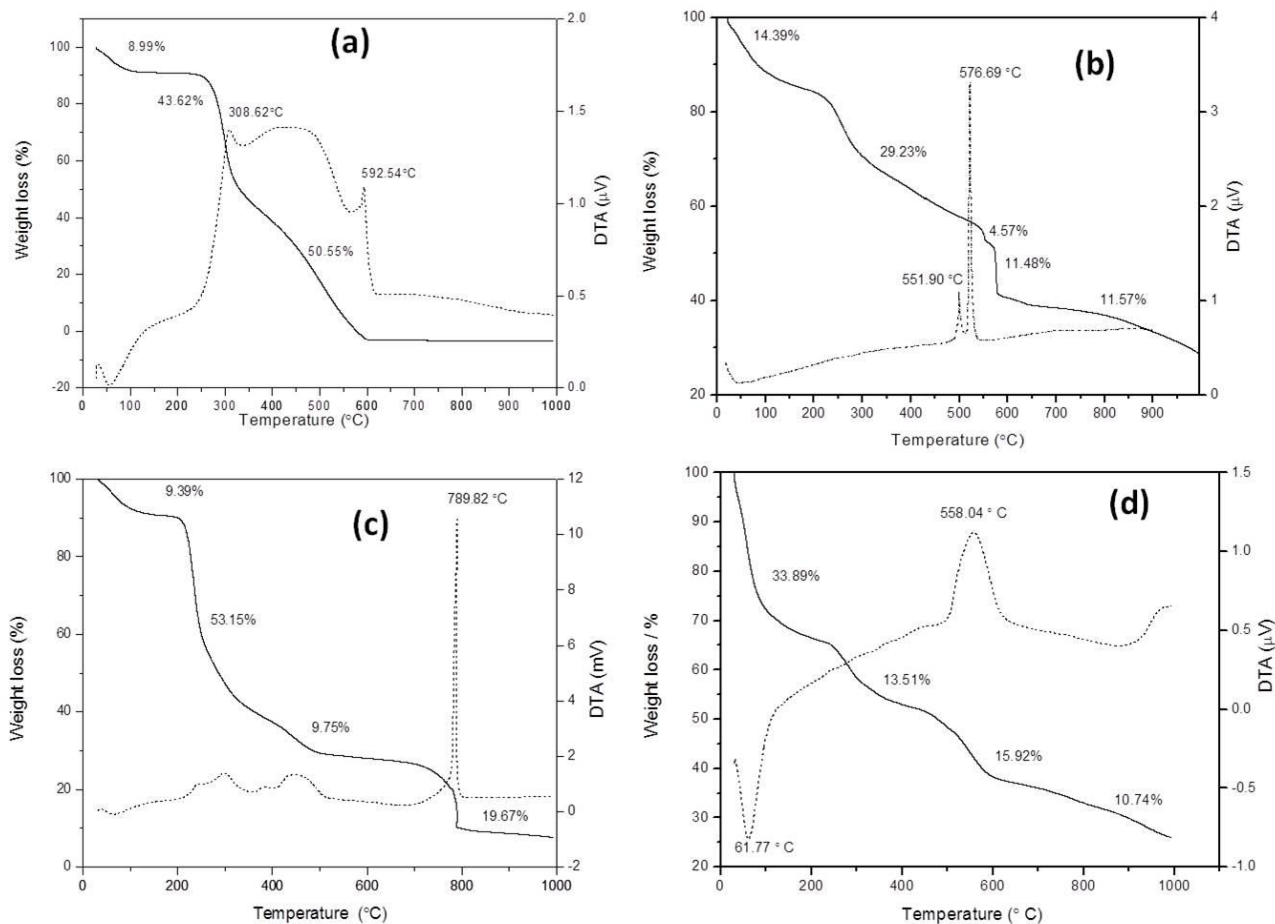


Figura 20: Curvas de TGA e DTA obtidas para as microesferas de quitosana/pectina: quitosana (A), quitosana/HDL/5-ASA (B), pectina (C) e quitosana/HDL/5-ASA/pectina (D).

A superfície das diferentes microesferas dos sistemas à base de quitosana/pectina foi analisada mediante a utilização do microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FE-SEM). Tal técnica foi eleita por permitir a visualização direta das amostras, sem a necessidade de um recobrimento metálico para tornarem-se condutoras, possibilitando o emprego da microscopia e evitando a destruição do material orgânico que compõe as amostras. A figura 21 permite a visualização das microesferas que não foram recobertas por pectina (figura 21 A), enquanto pode ser claramente observada o recobrimento por pectina (figura 21 B). Adicionalmente, pode ser evidenciado (figura 21 C) não só a espessura da camada de pectina que recobre as microesferas à base de Cht/HDL/5-ASA, como também revela a independência deste recobrimento no complexo (figura 21 D), o que reforça seu

emprego, que além de exercer uma função de barreira gastrorresistente, podendo relacionar-se com os diferentes perfis de liberação exibido pelos complexos.

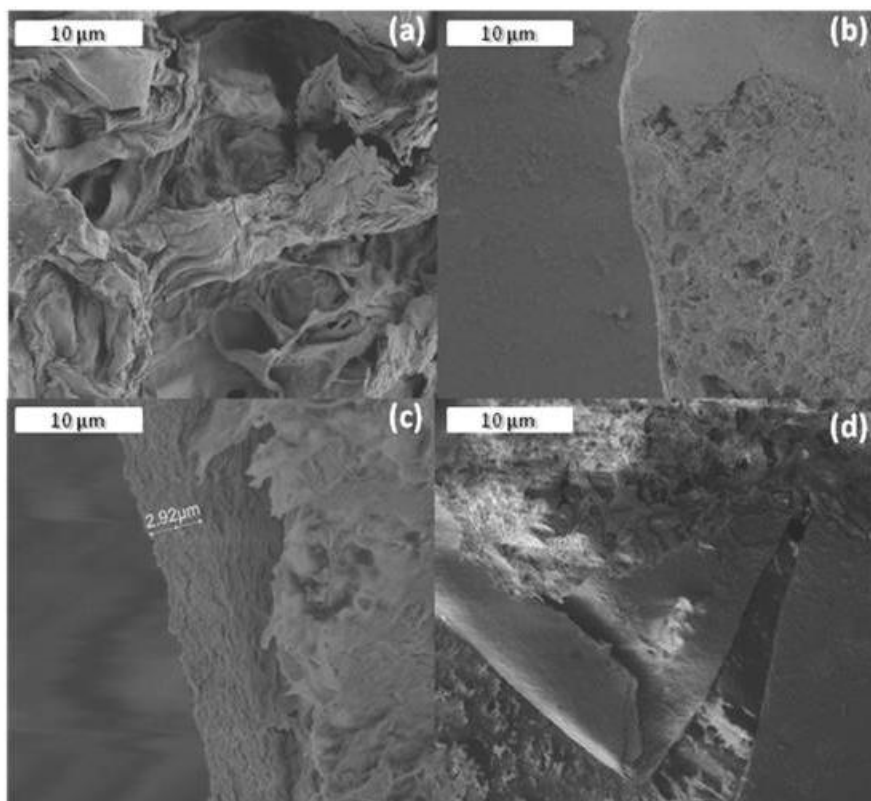


Figura 21: Imagens de FE-SEM das microsferas: quitosana/HDL/5-ASA (a) e quitosana/HDL/5-ASA/pectina (b,c,d).

2.6. Determinação da quantidade de 5-ASA intercalado e da eficiência de encapsulação dos complexos formados

Apesar da utilização da hidrotalcita como suporte para liberação de fármacos ser uma técnica amplamente difundida (GUNAWAN, 2007; CARJA, 2007; KAUR, 2012), a ineficiência do sistema com relação à administração oral ainda necessita ser otimizada, uma vez que o pH ácido do sistema gástrico é responsável pela rápida e completa dissolução do HDL, liberando o fármaco intercalado, já que somente as lâminas de brucita não suportam este ambiente, impossibilitando a utilização deste suporte para liberação de drogas no sistema intestinal. Dessa forma, o estudo da

eficiência de encapsulação de 5-ASA intercalado em HDL com a presença de um sistema polimérico torna-se interessante, uma vez que pode permitir um melhor entendimento e, conseqüentemente, controle da liberação do mesmo. Por isso que diferentes concentrações de pectina que atuam como um recobrimento gastrorresistente do sistema foi testado. Como observado anteriormente, apesar da grande quantidade de 5-ASA intercalado em HDL, restaram ainda alguns íons cloretos sem ser substituídos por entre as lâminas de HDL, porém, já foi constatado que isto não representa um impedimento para a utilização do sistema em aplicações farmacêuticas (GORDIJO, 2005).

Através deste estudo foram determinadas as quantidades de 5-ASA intercalados nos distintos sistemas formados, assim como a eficiência de encapsulação das matrizes poliméricas destas microesferas, a partir da utilização da metodologia já descrita. Os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 8, mostrando que os sistemas que apresentavam 5-ASA em sua forma pura, possuíam uma menor quantidade de fármaco incorporado na matriz polimérica quando comparados com os sistemas HDL/5-ASA, o que sugere que as lâminas de HDL apresentam uma maior afinidade para serem encapsuladas (ALCÂNTARA, 2010).

O elevado valor de 5-ASA incorporado pelo grupo PEC/HDL-5-ASA quando comparado com o grupo CHT/HDL-5ASA, pode ser explicado pelo pH alcalino da solução de partida de pectina, o que deve ter reduzido a perda de 5-ASA pelas lamelas do HDL durante a preparação das microesferas.

Outra análise permite inferir que os complexos ternários que contavam com a presença de HDL em sua formulação possuíam porcentagens maiores de encapsulação e droga incorporada do que os complexos binários, aumentando conforme aumentava a concentração de pectina. O grupo formado por CHT/HDL-5-ASA/PEC1% apresentou resultados similares ao grupo composto por CHT/HDL-5-ASA, o que sugere a eficiência e estabilidade do processo de formação das microesferas, onde a quantidade de droga encapsulada foi mantida mesmo após o processo de recobrimento. Com a vantagem adicional de não necessitar a adição de outros aditivos no sistema, como tensoativos (BABU, 1999), além de ser muito pertinente para a utilização de fármacos

com baixa hidrofiliçidade, como é o caso do 5-ASA, muito atrativos para a utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Tabela 8: Quantidade de 5-ASA incorporado no sistema quitosana/pectina e a eficiência de encapsulação das microesferas formadas, ^a =desvio padrão da média (n=3).

Formulação	5-ASA incorporado ^a (%)	Eficiência encapsulação ^a (%)
CHT / HDL	4,86 ± 0,17	24,4 ± 1,10
CHT/ 5-ASA	3,80 ± 0,11	19,0 ± 0,54
PEC/HDL	7,26 ± 0,13	36,3 ± 0,63
PEC/5-ASA	1,49 ± 0,09	7,46 ± 0,47
CHT/5-ASA/PEC	2,49 ± 0,05	12,5 ± 0,22
CHT/HDL/PEC0,5%	2,58 ± 0,03	12,9 ± 0,14
CHT/HDL/PEC1%	4,98 ± 0,12	25,0 ± 1,04
CHT/HDL/PEC1.5%	4,72 ± 0,26	23,7 ± 1,32

2.7. Estudos propriedades físicas dos microesferas à base de quitosana/pectina

Os resultados do comportamento das diferentes microesferas preparadas como materiais capazes de liberar 5-ASA de forma seletiva e controlada podem ser observados nesta seção. As propriedades de absorção de água foram estudadas, a fim de se entender a influência da capacidade de absorção de água em função do tempo pelos diferentes sistemas, com relação à pectina, ou de sua ausência, como recobrimento da matriz de quitosana com HDL/5-ASA incorporado, ou do 5-ASA incorporado diretamente na matriz polimérica. Para a análise do processo de liberação de 5-ASA *in vitro*, foi avaliada a cinética de liberação de maneira similar ao que ocorre *in vivo*, ou seja, de maneira sequencial, sofrendo em determinados momentos, variação do pH do

meio em função do tempo, como ocorre ao longo de todo o sistema gastrointestinal, como já descrito anteriormente.

2.7.1. Propriedades de absorção de água das microesferas à base de quitosana/pectina que incorporam 5-ASA

As propriedades físicas relacionadas com a absorção de água pelas microesferas à base de quitosana/pectina com 5-ASA intercalada em HDL ou incorporada diretamente na matriz polimérica foram avaliadas em dois sistemas: em solução tampão fosfato com pH 1,2 simulando o pH gástrico, e em tampão fosfato com pH 6,8, simulando o pH intestinal (figura 22). As curvas obtidas mostram a variação de quantidade de água absorvida pelas diferentes microesferas em função do tempo em contato com os diferentes meios.

Para todos os sistemas avaliados, independentemente na composição das microesferas, a quantidade de água absorvida aumentou em função do tempo, e os sistemas que não erodiram até se desintegrar alcançaram estabilidade após aproximadamente 6 horas, o que sugere que as alterações de pH estão relacionadas com os diferentes comportamentos das microesferas frente a absorção de água.

Nas condições acídicas, tanto o grupo CHT/5-ASA quanto CHT/HDL-5ASA exibiram uma elevada absorção de água. Este comportamento pode ser explicado pela presença dos grupamentos amino da quitosana, os quais são ionizados em baixos pHs, causando sua hidratação e a formação de uma matriz de hidrogel até ocasionar a completa dissolução do material. Por outro lado, no caso das microesferas à base de CHT/HDL-5-ASA protegidas pelo polissacarídeo pectina, não foram observadas desintegração em condições acídicas, indicando uma boa estabilidade das microesferas nestas condições, como resultado do efeito protetor exercido pela pectina. Entretanto, a extensa absorção de água por esses bionanocompósitos é dependente da concentração de pectina empregada nos recobrimentos, onde o grupo CHT/HDL-5ASA/PCT 0.5%, apresentou 3 vezes mais absorção de água do que o grupo CHT/HDL-5ASA/PCT 1%. O efeito dos sais também foi avaliado em condições básicas (pH 6,8). Nesse caso, as

microesferas compostas por quitosana exibiram uma resistência considerável nesse meio, onde os grupos CHT/5-ASA e CHT/HDL-5ASA exibiram perfis de absorção de água muito similares. Contudo, o efeito dos íons fosfato foi mais claramente observado nos sistemas protegidos pela pectina, apresentando maiores valores de absorção de água quando comparada com as condições ácidas. Este comportamento ocorre pela presença dos íons fosfato que favorecem a liberação dos íons Ca^{2+} reticulados nas cadeias pectínicas, elevando a absorção de água por estes complexos. Este estudo revelou o papel que o recobrimento de pectina, sendo mais relevante nas condições que simulam os fluidos gástricos. A pectina foi responsável por aumentar a estabilidade das microesferas de quitosana nestas condições, além de preservar a estrutura das microesferas mesmo após 6 horas de estudo.

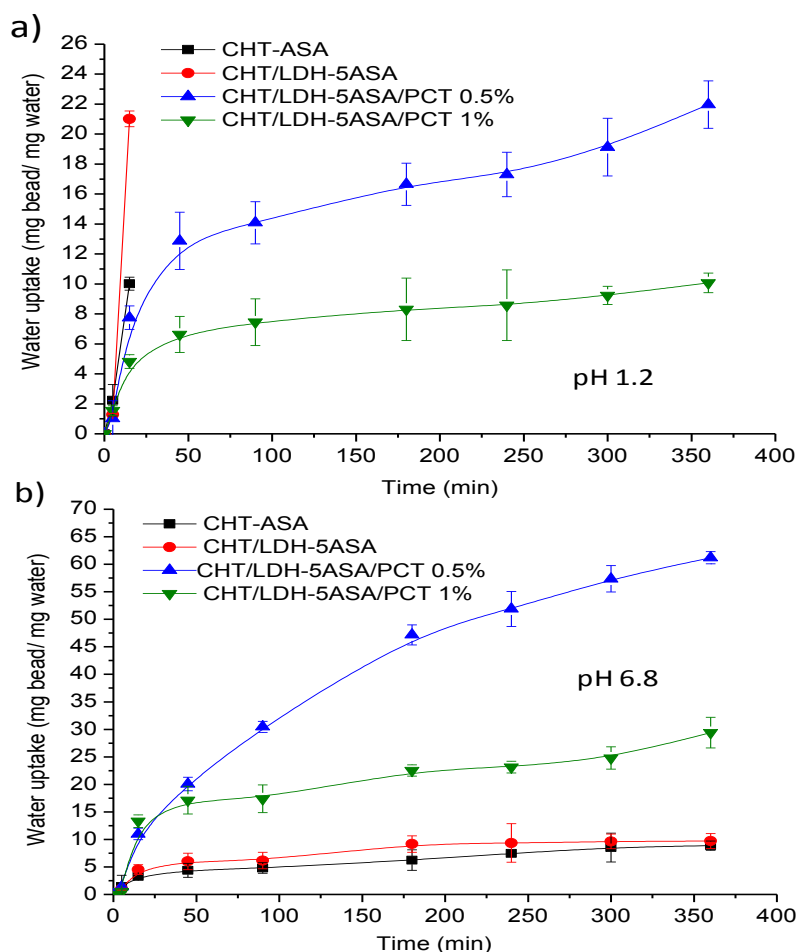


Figura 22: Curvas de absorção de água em função do tempo de contato das microesferas baseadas nos biopolímeros quitosana/pectina, formando complexos binários ou ternários em pH 1,2 e pH 6,8.

2.7.2. Estudos *in vitro* de liberação de 5-ASA encapsulado em microesferas de quitosana/pectina

Com o intuito de avaliar se os sistemas exibiam uma liberação controlada de 5-ASA encapsulado em matrizes de quitosana/pectina, foi realizado o experimento *in vitro* da liberação de 5-ASA (figura 23) a partir de matrizes poliméricas, sob variações de pH que simulam a passagem sequencial do fármaco no corpo humano, por isso o pH 1,2 era o inicial e foi mantido por 2 horas, depois o pH sofreu uma variação alcançando 6,8 e foi mantido por mais 2 horas, e finalmente o meio apresentou pH de 7,4 sendo mantido por 4 horas.

As microesferas compostas por quitosana liberaram quase 100% de 5-ASA nas primeiras 2 horas de ensaio, sob condições ácidas (pH1,2), independentemente do modo em que o fármaco foi incorporado no interior da matriz de quitosana, exibindo cerca de 95 e 90% de 5-ASA liberado os grupos CHT/5-ASA e CHT/HDL-5-ASA, respectivamente. Este comportamento é esperado por sistemas que apresentem uma elevada solubilidade e absorção de água nesta condição, corroborando com os estudos de capacidade de absorção de água. Esses resultados indicam que em condições *in vivo* tais complexos não resistiriam ao ambiente estomacal, liberando praticamente todo o fármaco encapsulado nas primeiras regiões do trato gastrointestinal. Por outro lado, as microesferas que continham pectina em sua formulação liberaram menos que 10% nessas mesmas condições. Entretanto, uma liberação elevada foi alcançada quando o pH sofreu uma variação de 1,2 para 6,8, sendo ainda maior quando o pH chegou aos 7,4. Outro aspecto observado foi que as microesferas que possuíam a estrutura do HDL apresentaram uma liberação de 5-ASA menor, provavelmente porque o fármaco encapsulado requer um tempo adicional de difusão. De qualquer maneira, as microesferas de pectina pura (PEC/5-ASA e PEC/HDL-5ASA) não são desejáveis como sistemas de liberação controlada no cólon intestinal, pois apesar dos níveis de liberação ser baixo nas condições acídicas, não se mostra com caráter controlado nas áreas que simulavam as diferentes áreas das regiões intestinais.

A liberação acumulada de 5-ASA pelos complexos de quitosana recobertos com pectina (ternários) está representada na figura 23b. Ambos os sistemas exibiram uma

elevada estabilidade no pH 1,2, o que sugere que o recobrimento com a pectina tem um papel de reforço para estas microesferas submetidas a condições acídicas. Os grupos de quitosana que incorporaram 5-ASA puro mostraram uma menor liberação e resistência durante a simulação da passagem pelo sistema gástrico, porém quando o pH aumentou, ocorreu uma rápida liberação nas condições que simulavam as áreas intestinais, alcançando uma liberação virtual cerca de 100% de 5-ASA. Contudo, nos complexos de quitosana que incorporaram os compostos de intercalação HDL-5-ASA, houve um aumento do caráter controlado de liberação de 5-ASA proporcional ao aumento da concentração de pectina no recobrimento das microesferas. Nesse sentido, as microesferas recobertas apresentaram uma cinética de liberação mais controlada nos meios com pH 1,2 e 6,8, porém as microesferas preparadas com pectina a 0,5% mostraram maiores valores de liberação que os recobrimentos de pectina a 1% e 1,5% , e em pH 7,4, os níveis máximos de liberação alcançados foram cerca de 90, 55 e 50%, respectivamente. Este comportamento pode ser explicado devido à elevada solubilidade deste polissacarídeo nas condições simuladas, aumentando a difusão de água e dos íons fosfato do meio para o interior das microesferas.

A partir destes resultados, pode ser concluído que este novo sistema de liberação controlada de 5-ASA baseado em microesferas de quitosana recobertas com pectina é muito promissor para conseguir um excelente controle na liberação de drogas indicadas para enfermidades colônicas, uma vez que a pectina está apta a proteger as microesferas das condições acídicas, permitindo que a microesfera mantenha sua integridade no ambiente estomacal. Adicionalmente, a quitosana que é resistente aos meios básicos, como o encontrado nas áreas intestinais, apresenta propriedades mucoadesivas de extrema importância para sistemas de liberação colônica. Portanto, os biopolímeros quando empregados conjuntamente e com os compostos de intercalação originam um sistema ideal biocompatível e biodegradável para doenças intestinais, onde um controle satisfatório da liberação de 5-ASA com propriedades mucoadesivas pode ser alcançado durante a passagem do fármaco pelo trato gastrointestinal.

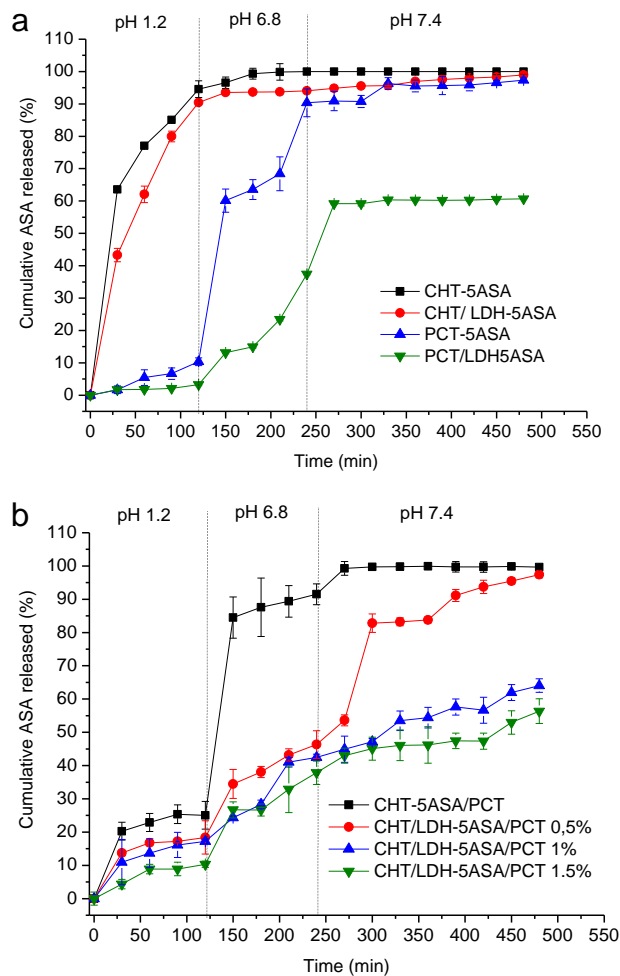


Figura 23: Perfis de liberação de 5-ASA dos diferentes complexos binários (a) e dos diferentes complexos ternários (b) sintetizados, simulando a passagem do fármaco pelo trato gastrointestinal (em função do pH e do tempo) a 37°C.

Outra vantagem adicional deste sistema em comparação com outros sistemas poliméricos já publicados, como aqueles que utilizaram o polímero metilmetacrilato (TALEI, 2011), hidroxipropilmetilcelulose (TURKOGLU, 2002), e Eudragit ® (AMBROGI, 2008), é que tanto a quitosana quanto a pectina, são polímeros naturais, obtidos a partir do exoesqueleto de crustáceos e da casca de frutas cítricas, respectivamente, já amplamente utilizados dos setores alimentícios (BEMILLER, 1986, GEORGE, 2006), e são totalmente biocompatíveis para aplicações biomédicas (MUZZARELLI 1988; VANDAMME, 2002), o que os torna largamente utilizáveis, além de economicamente viáveis, impulsionando a economia local, um dos muitos objetivos da utilização da Biotecnologia nos dias de hoje.

2.8. Conclusões parciais

Sistemas de liberação controlada de fármacos inovadores foram sintetizados a partir da utilização dos biopolímeros quitosana e pectina em diferentes concentrações, resultando em cinéticas de liberação distintas, tornando possível a encapsulação do bio-híbrido HDL/5-ASA ou mesmo do 5-ASA puro. Este sistema biopolimérico mostrou ser compatível com o sólido à base de HDL, sendo útil para o uso em sistemas de liberação controlada de fármacos ao permitir o retardamento da liberação do fármaco em condições que simulam a variação de pH que ocorre ao longo do trato intestinal.

Os complexos ternários sintetizados foram os grupos que apresentaram melhores comportamentos nos estudos de cinética de liberação de fármacos, a partir das variações de pH em função do tempo no sentido de simular a passagem sequencial que ocorre *in vivo* a partir da administração oral de 5-ASA até o cólon intestinal. A velocidade e a liberação de forma controlada foram mais desejáveis nos grupos de microesferas onde havia ambos, quitosana e pectina, provavelmente devido à compatibilidade polimérica, a solubilidade em diferentes meios, e pelos eficientes processos de reticulação.

Devido à instabilidade dos HDLs em meios ácidos, os resultados obtidos para os sistemas à base de quitosana/pectina, indicaram que podem ser muito úteis como matrizes e como recobrimentos de fármacos comumente intercalados por entre as suas lâminas. Foram sintetizados eficientes sistemas gastrorresistentes graças à ação da pectina, e mucoadesivos, a partir da eleição da quitosana de médio PM, que apresentou as melhores propriedades de adesão por mucina *in vitro*, sendo evidenciada uma eficiente liberação na zona que simulava o cólon intestinal, o objetivo da utilização do 5-ASA neste trabalho.

A pesquisa elucida ainda a possibilidade de usos futuros dos sistemas à base de quitosana/pectina em outras combinações e concentrações, permitindo sua utilização para sistemas que objetivem o tratamento de outras desordens, que acometam outros órgãos, através de diferentes cinéticas de liberação. Outras vantagens são a disponibilidade, biocompatibilidade e baixo preço dos polímeros, os quais se mostram muito promissores como futuros sistemas de liberação controlada de fármacos.

CAPÍTULO 3. Preparação de microesferas à base de alginato/grafite magnético para a liberação controlada de ibuprofeno

A partir deste capítulo todos os estudos apresentados foram realizados na Embrapa Instrumentação, São Carlos-SP, Brasil, sob a supervisão do Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira e Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Jr. Este capítulo trata da utilização inédita de nanopartículas de grafite magnético como constituinte de uma matriz bio-híbrida utilizada para a síntese de diferentes formas farmacêuticas para liberação controlada de fármacos, valendo-se de todas as propriedades que o grafite magnético pode conferir aos sistemas, através da utilização do ibuprofeno como uma molécula-modelo a ser incorporada pela matriz e liberada de forma controlada. Tal investigação foi patenteada junto ao INPI com o título: “Processo de obtenção de microesferas bio-híbridas magnéticas e microesferas bio-híbridas magnéticas”.

Resultados e Discussão

3.1. Curva analítica do ibuprofeno

Foram realizadas as curvas analíticas de calibração do ibuprofeno em água (pH 5,5) e em solução tampão fosfato (pH 6,8). Preparadas a partir de uma solução mãe com uma concentração de aproximadamente $9,68 \cdot 10^{-4}$ g/L. Os valores de absorvância correspondentes a cada concentração podem ser evidenciados na tabela 9, realizadas por um espectrofotômetro UV-vis em um comprimento de onda fixo de 260nm, os perfis obtidos podem ser analisados nos gráficos das figuras 24 e 25:

Tabela 9: Valores das absorvâncias de soluções do Ibuprofeno obtidas por espectrofotometria $\lambda=260$ nm, utilizando como solventes diferentes soluções de tampão fosfato (pH 5,5 e pH 6,8). DP da média (n=3).

	pH 5,5	pH 6,8
[g/L]	ABS	ABS
$4,81 \cdot 10^{-4}$	$3,061 \pm 0,010$	$2,253 \pm 0,003$
$2,64 \cdot 10^{-4}$	$2,293 \pm 0,020$	$1,250 \pm 0,002$
$1,21 \cdot 10^{-4}$	$1,625 \pm 0,004$	$0,680 \pm 0,005$
$5,83 \cdot 10^{-5}$	$1,041 \pm 0,001$	$0,360 \pm 0,003$
$2,9 \cdot 10^{-5}$	$0,512 \pm 0,001$	$0,178 \pm 0,002$

As curvas formadas pelos pontos obtidos foram calculadas por regressão linear, baseando-se nas equações de reta no formato $y = a + bx$, os coeficientes de correlação linear foram obtidos, evidenciando que ambos podem ser utilizados na quantificação do fármaco presente no sobrenadante das reações de intercalação entre HDL e ibuprofeno, já que foi observado linearidade entre as concentrações dos fármacos e os valores da absorvância lidos, como está ilustrado nas figuras a seguir:

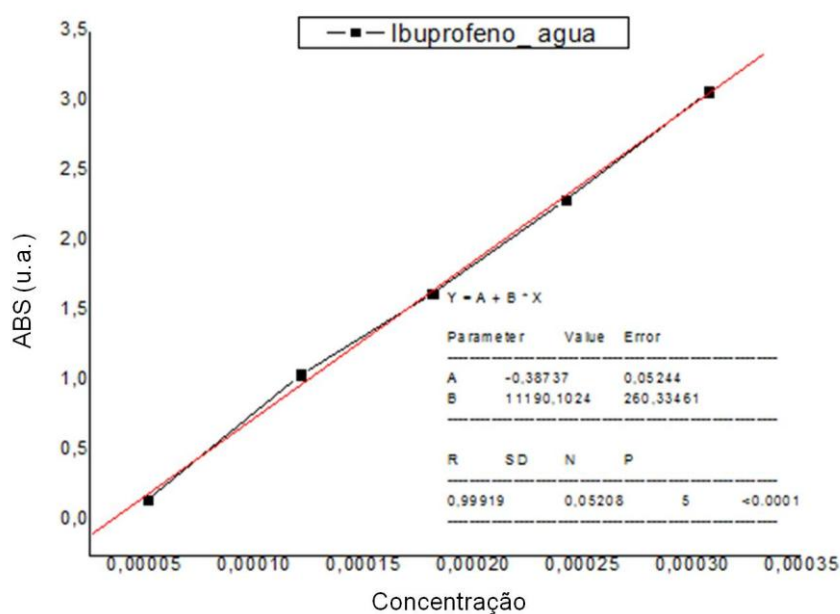


Figura 24 : Curva analítica do ibuprofeno utilizando como solvente água pH 5,5.

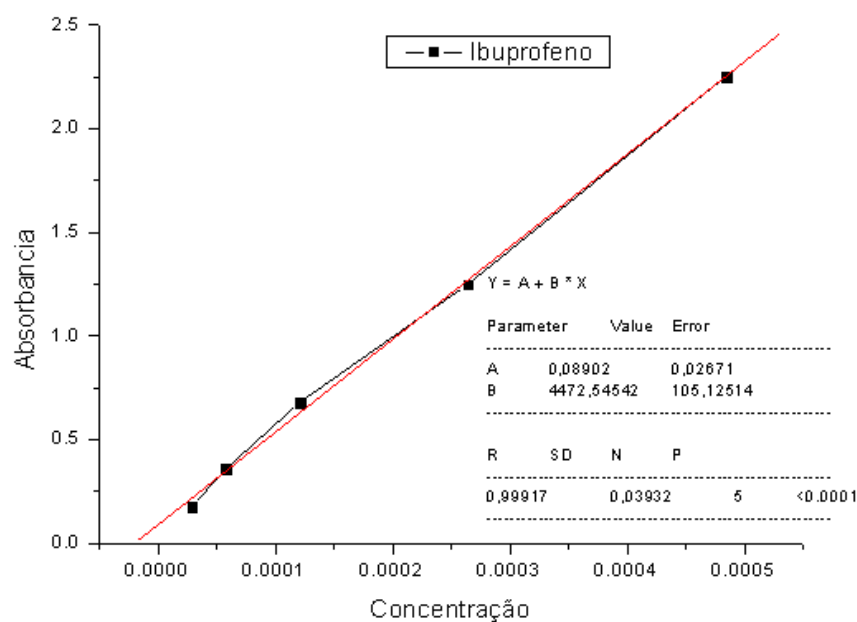


Figura 25: Curva analítica do ibuprofeno utilizando como solvente solução tampão fosfato pH 6,8.

3.2. Intercalação de ibuprofeno em HDL MgAl-Cl pelo método de coprecipitação

Esta técnica foi responsável pela síntese de HDL na presença de uma solução aquosa de ibuprofeno, através da adição de uma solução aquosa com íons Mg^{2+} e Al^{3+} sob pH constante a 9 como já descrito anteriormente. Através da comparação dos difratogramas do HDL puro e intercalado com ibuprofeno (figura 26), foi observado que as reflexões típicas do HDL mantiveram-se presentes, com elevada cristalinidade quando comparada com o difratograma do HDL/5-ASA, comprovando que a estrutura do HDL foi mantida mesmo após intercalação com o fármaco. Não obstante, a ideia de intercalação do ibuprofeno com a hidrotalcita foi corroborada através da reflexão (003) do difratograma HDL-IBU ao sofrer um deslocamento para menores ângulos e um aumento de intensidade do pico, quando comparada com o difratograma do HDL de partida, o que indica que ocorreu um aumento do espaçamento basal devido à troca dos íons cloro pelas moléculas do fármaco.

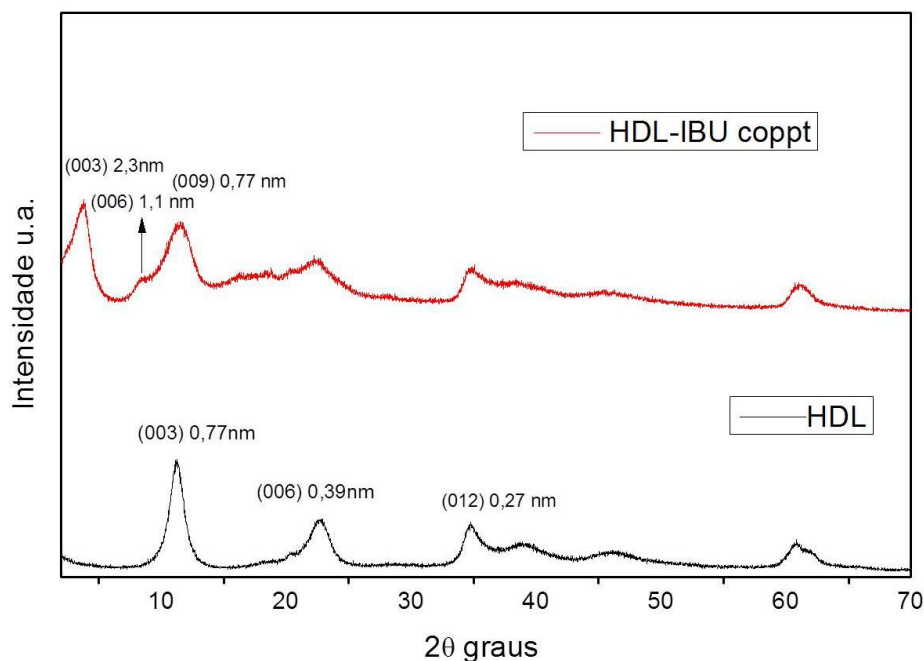


Figura 26: DRx do HDL de partida e do HDL/IBU obtido por coprecipitação.

Aplicando a equação de Bragg, a nova distância interlamilar da reflexão (003) do composto HDL-IBU foi calculada ($d_{003}=2,3\text{nm}$), considerando a espessura conhecida da lâmina de brucita ($0,48\text{nm}$), foi permitido inferir o espaçamento interlamilar ocupado pela molécula do IBU, que foi de $1,82\text{nm}$, muito próximo ao encontrado por ALCÂNTARA ($d_{003}=1,95\text{nm}$) e ligeiramente menor dos resultados encontrados ($d_{003}=2,85\text{nm}$) por Gordijo. Além da simetria entre d_{003} ($2,2\text{nm}$) e d_{006} ($1,1\text{nm}$) responder à relação esperada ($d_{006}=2d_{003}$). As dimensões da molécula de ibuprofeno foram estimadas em $0,9\text{nm}\times 0,65\text{nm}\times 0,28\text{nm}$ (*Software Viewer KLite*), com estas dimensões foi possível supor a organização em que o fármaco foi intercalado, já que d_{003} calculada foi maior que as dimensões do ibuprofeno, sugerindo que a molécula de IBU organizou-se em forma de bicamada por entre as lâminas de HDL, com seus ânions carboxila orientados em direção as lâminas que são carregadas positivamente, apesar de provavelmente haver ainda um excipiente de íons Cl^- presentes na interlâmina do material HDL-IBU sintetizado, como indica a análise química elementar. A figura 27 ilustra em esquema de uma possível orientação da molécula de ibuprofeno presente por entre as lâminas do HDL MgAl-Cl^- .

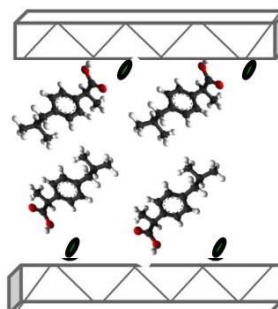


Figura 27: Esquema de uma possível orientação do ibuprofeno por entre as lâminas de HDL formando uma bicamada.

A análise elementar do novo sistema sintetizado a base de HDL-IBU quantifica a incorporação do fármaco entre as lâminas de hidrotalcita, através da porcentagem de carbono existente no material (tabela 10), aproximadamente 31g de ibuprofeno presente em 100g de material. A relação entre estes valores com a quantidade de ibuprofeno intercalado comprova a ideia de que a troca iônica entre os cloretos presentes na interlâmina do HDL e das moléculas de ibuprofeno não foi completa, já que a capacidade de troca iônica do HDL é em torno de 330mEq/100g.

Tabela 10: Quantidade de ibuprofeno ($C_{13}H_7NaO_2$) incorporado em HDL a partir da análise elementar.

Amostra	C (%)	N (%)	Quantidade de material
HDL/IBU	21,165	0	200 mEq/100g HDL

Os espectros de FTIR da região entre $4000-500\text{ cm}^{-1}$ do híbrido HDL-IBU (figura 28) apresentam bandas características do sólido anfitrião, como as bandas entre $600-400\text{ cm}^{-1}$, inerente às vibrações das ligações metal-oxigênio das lâminas de HDL (DARDER, 2005), assim como a região entre $3340-3350\text{ cm}^{-1}$ que é típica de um *stretching* de OH das camadas de brucita e água adsorvida, o que mostra que mesmo após a intercalação com as moléculas de ibuprofeno, a estrutura do sólido a base de HDL foi mantida (VELU, 1999). As bandas 1545 e 1389 cm^{-1} correspondentes a ν (COO) assimétrico e simétrico respectivamente, indicam a presença de moléculas de ibuprofeno intercaladas em sua forma aniônica. Evidenciam-se também algumas bandas

como 2951, 2924, 2864 cm^{-1} , que são vibrações comuns ν_{CH} assim como as bandas 1504 e 1457 cm^{-1} , típicas do composto aromático do fármaco (GUNAWAN,2008).

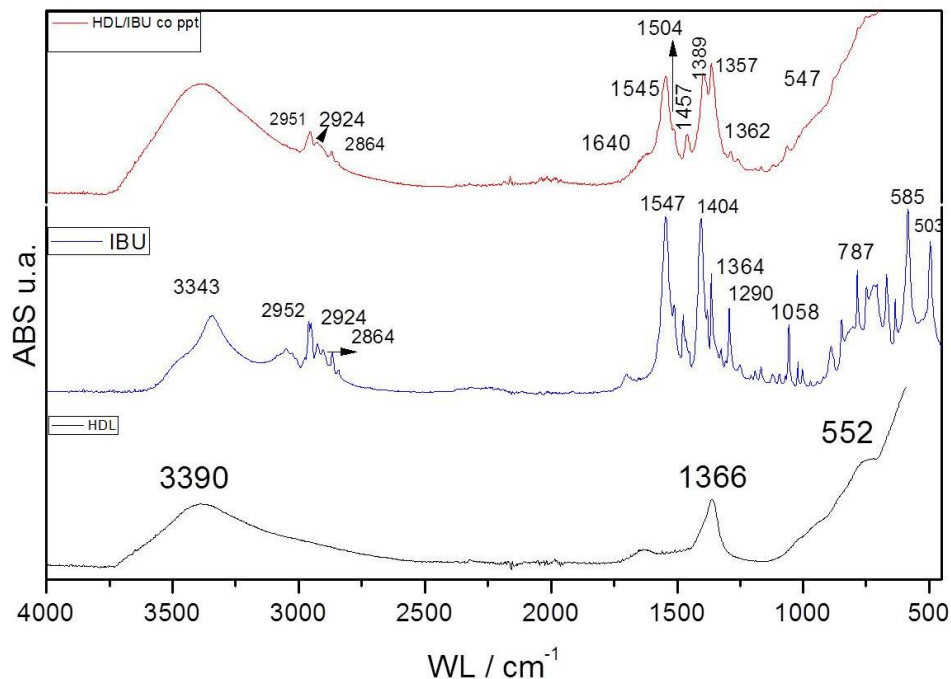


Figura 28: Espectro FTIR da região 4000-500 cm^{-1} correspondentes ao HDL e IBU puro e ao híbrido HDL-IBU, visualizados de baixo para cima.

Através da análise das curvas térmicas do material HDL e IBU puros e do novo híbrido sintetizado à base de HDL-IBU (figura 29), pode-se notar uma mudança considerável no comportamento do fármaco após sua intercalação, mantendo-se mais estável quando intercalado por entre as lâminas de HDL. A curva correspondente ao HDL-IBU apresenta três perdas de massa, a primeira de 14,6% próxima aos 150°C refere-se à eliminação das moléculas de água. A segunda perda de massa de 26,3% ocorre pela eliminação das moléculas de ibuprofeno, associada a um processo exotérmico centrada em 317,7°C. A última perda de massa, acompanhada por um pico exotérmico em 567,9°C é correspondente a decomposição das espécies derivadas da condensação dos anéis aromáticos das moléculas de ibuprofeno, juntamente com a desidroxilação do HDL e possível eliminação dos cloretos residuais ainda presentes por entre as lamelas de HDL (GORDIJO, 2005).

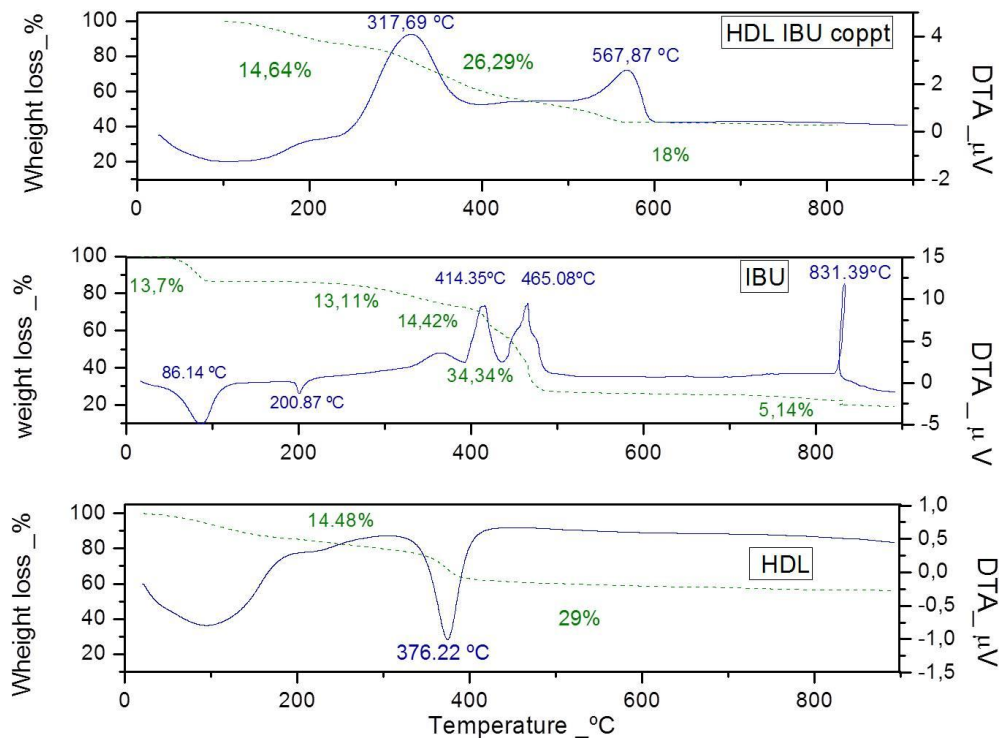


Figura 29: Curvas de TGA e DTA obtidas para os seguintes materiais de baixo para cima: HDL, IBU e HDL/IBU.

3.3. Preparação de microesferas à base de alginato/grafite magnético

O polímero alginato (ALG) já é amplamente conhecido por suas diferentes aplicações nas áreas biomédicas, entre elas como sistemas de liberação controlada de fármacos, sendo observadas propriedades desejáveis quando recoberto e/ou em blendas com outros polímeros (REMUÑAN-LÓPEZ, 1997; PONGJANYAKUL, 2007; COVIELLO, 2007), além de uma propriedade relevante deste material à sua aplicação, a sua capacidade de geleificação quando em contato com íons de Ca^{+2} , responsável pela reticulação das cadeias de alginato (ALCÂNTARA, 2010).

Com o intuito de se reduzir a velocidade e aumentar a seletividade de liberação, juntamente com o objetivo inovador da pesquisa, o grafite magnético (GM) previamente sintetizado e caracterizado foi utilizado. Valendo-se da viabilidade tecnológica da obtenção de carbono magnético a temperatura ambiente, em quantidades

macroscópicas, porém, pertencentes à escala nanométrica (MOMBRÚ, 2005); sua resposta positiva à aplicação de campo magnético externo (figura 30), além da sua capacidade de se dispersar em água destilada sob sonicação; serão abertas, sem nenhuma dúvida, novas e enormes possibilidades tecnológicas em engenharia, medicina e biologia, como sendo o único material magnético biocompatível, já que o carbono é o principal elemento em todos os organismos vivos conhecidos. Adicionalmente, não é necessária a utilização de ácidos fracos, solventes orgânicos ou surfactantes para sua manipulação, sendo inclusive mais vantajoso que os nanotubos de carbono, reconhecidamente tóxico (KAWAGUCHI, 2006; ZHAO, 2008; ZHANG, 2009) para sua potencial aplicação em tecidos biológicos. Estudos complementares relacionados à permeabilidade de membrana e toxicidade em tecidos vivos foram realizados paralelamente por outros colaboradores do grupo, a fim de comprovar a tamanha importância que o material apresenta para futuras aplicações biomédicas.

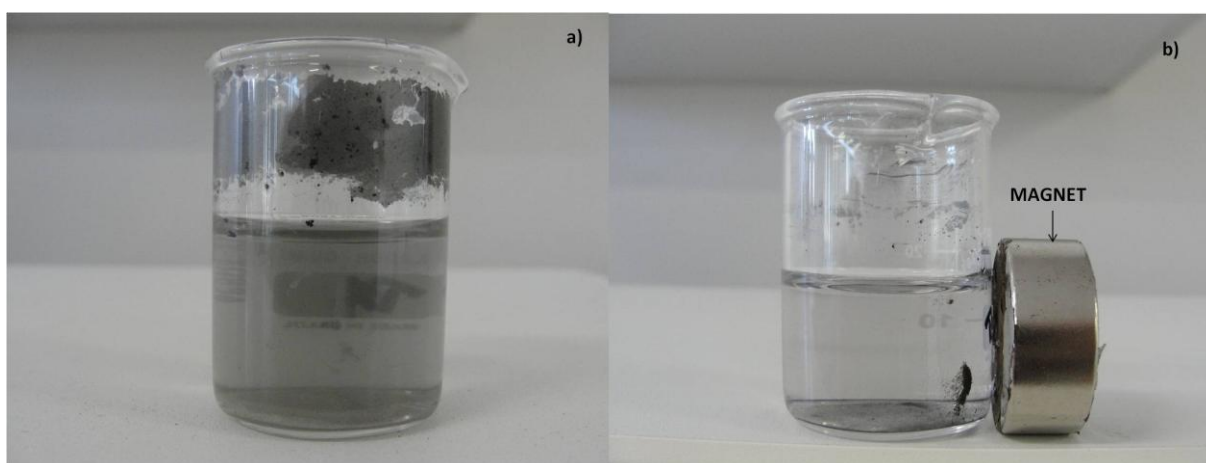


Figura 30: a) Grafite magnético disperso em água ultrapura em específica concentração e b) acompanhado de resposta positiva ao campo magnético externo aplicado.

Um novo sistema de liberação de fármacos baseado na combinação do polímero alginato com grafite magnético foi testado, onde pôde ser observado que o complexo formado por HDL-IBU/ALG/GM permitiu uma maior homogeneidade do sistema quando comparado com o grupo que não levava GM, através da preparação de filmes e secagem ao ar livre para uma eficiente constatação (figura 31), surgindo novas ideias para sínteses futuras de outras formas farmacêuticas para liberação controlada de fármacos, como, por exemplo, sob a morfologia de películas.

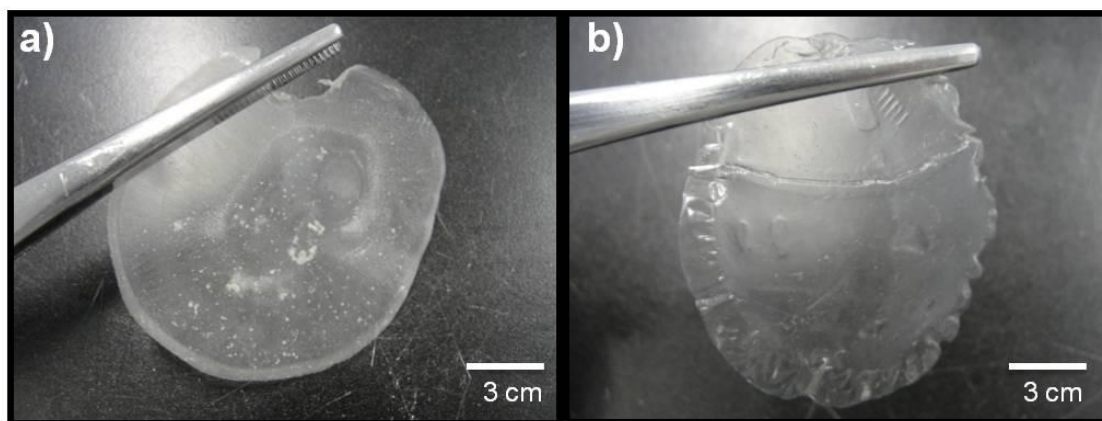


Figura 31: Filmes obtidos pelos complexos sintetizados: a) HDL-IBU/ALG e b) HDL-IBU/ALG/GM.

As microesferas foram sintetizadas (figura 32) através de uma blenda entre uma dispersão em água destilada de grafite magnético com os compostos de intercalação a base de HDL-IBU ou IBU puro (equivalente à massa de IBU intercalada por entre as lâminas do HDL) e uma solução aquosa de alginato, utilizando como agente reticulante o CaCl_2 15% por 3 horas, a fim de se assegurar um eficiente enrijecimento do material. Dessa forma, os diferentes bionanocompósitos sintetizados e suas propriedades para atuarem como futuros liberadores de fármacos de maneira controlada foram analisados.



Figura 32: Aspecto das microesferas à base de alginato/grafite magnético recém-sintetizadas.

3.4. Técnicas de caracterização composicional, morfológica e estrutural dos bionanocompósitos sintetizados

A técnica de espectroscopia de infravermelho permitiu estudar as possíveis interações entre o alginato e o grafite magnético, revelando informações sobre a estrutura da microesfera obtida. A análise dos espectros de FTIR inferidos entre as regiões 4000-500 cm^{-1} dos materiais de partida, assim como dos bionanocompósitos sintetizados na presença do grafite magnético pode ser observado na figura 35.

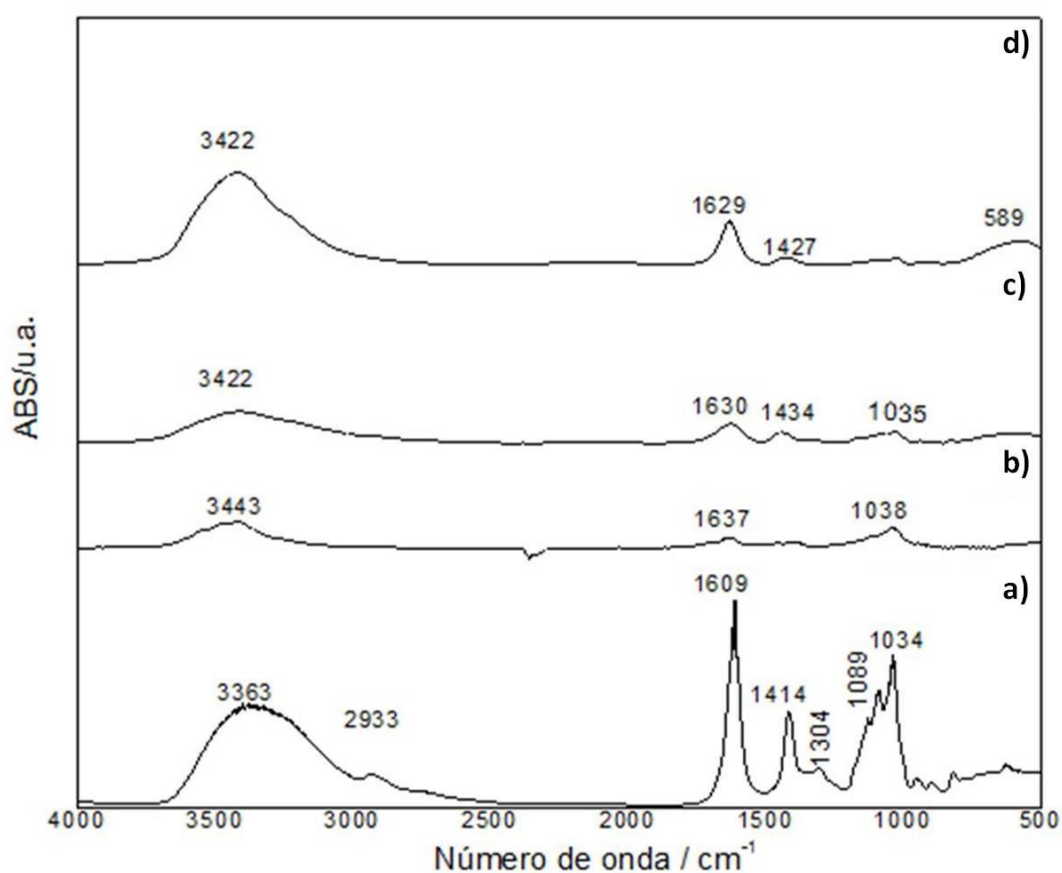


Figura 33: Espectro FTIR da região 4000-500 cm^{-1} onde: a) alginato, b) grafite magnético, c) microesfera de alginato e grafite magnético e d) microesfera de HDL-IBU/ALG/GM.

O espectro do alginato de partida (figura 33 a) revelam bandas em 3363, 1609, 1414 e 1034 cm^{-1} , que são atribuídas a vibrações do tipo *stretching* de O-H (H_2O e OH), *stretching* assimétrico de C-O (COO^-), *stretching* simétrico de C-O (COO^-) e

stretching assimétrico de C-O (C-O-C), respectivamente (ALCÂNTARA, 2010). O espectro do grafite magnético puro (figura 33b) apresenta uma banda característica de interações do tipo δ_{C-H} e $\nu_{C=C}$, a 1038 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} , respectivamente. (FUKS, 2006). Também neste mesmo espectro é possível evidenciar a presença de grupos hidroxilas (ν_{OH}) a 3443 cm^{-1} e dióxido de carbono (ν_{CO_2}) a 2357 cm^{-1} . A presença deste último é provavelmente devido à contaminação com o ambiente (REGE, 2000).

No espectro das microesferas compostas somente de alginato e grafite magnético apresentado na figura 33 c, pode ser evidenciado que uma banda simétrica característica do grupo carboxila do alginato em 1414 cm^{-1} é deslocada a maiores valores de número de onda, aparecendo no material reticulado a 1434 cm^{-1} . Por outro lado, a banda designada à vibração assimétrica do polissacarídeo em 1609 cm^{-1} parece estar sobreposta com a banda de 1637 cm^{-1} do grafite magnético, aparecendo uma só banda a 1630 cm^{-1} . De acordo com estudos prévios, estas observações confirmam a formação de uma interação iônica entre os íons cálcio e os grupos carboxila presente na estrutura do alginato (PONGJANYAKUL, 2007). Ainda que grupos carboxila do alginato estejam envolvidos no processo de reticulação, uma possível interação desses grupos com o grafite magnético não deve ser descartada, de maneira similar ao reportado por outros autores em estudos sobre nanotubos de carbono e alginato de sódio (ZHAO, 2009).

Entretanto, a incorporação do composto híbrido HDL-IBU no sistema de microesferas baseadas em alginato e grafite magnético (figura 33 d), mostra uma banda larga em aproximadamente 589 cm^{-1} atribuída às interações M-O-M das lâminas de brucita. Tais observações comprovam a manutenção da estrutura do HDL no interior das microesferas. Ainda neste espectro pode ser facilmente detectada uma banda intensa e larga em 3422 cm^{-1} , devido provavelmente a sobreposição de todas as bandas dos materiais de partida nesta região, referente a interações do tipo O-H, ou seja, a presença de hidroxilas do grafite magnético, do alginato e do HDL, assim como a presença de moléculas de água adsorvida nos materiais.

O comportamento térmico do alginato e grafite magnético, assim como seus respectivos sistemas processados como microesferas foram analisados mediante TGA-DTA são mostrados na figura 34. A curva correspondente ao alginato puro (figura 34 a)

mostra uma perda de massa associada à eliminação de moléculas de água adsorvidas (~9%) através de um pico endotérmico em 102,7°C, seguido de decomposição parcial do biopolímero e combustão apresentando um pico exotérmico centrado em 311°C e 594°C, respectivamente (SOARES, 2004). A curva correspondente ao comportamento térmico do grafite magnético (figura 34 b) mostra um pico exotérmico centrado em aproximadamente 352°C, referente à remoção dos grupos funcionais presente no material (SHENGTAO, 2011), correspondendo a uma perda de massa de cerca de 4%. Este resultado é análogo ao encontrado por Shengtao e colaboradores (2011) ao analisarem o grafite esfoliado por termogravimetria. Ainda neste termograma é possível evidenciar em maiores temperaturas dois picos exotérmicos consecutivos em aproximadamente 589,5°C e em 628°C, os quais são responsáveis por uma perda de massa de 25,5% evidenciada pela curva de TG. Tais eventos estão relacionados à decomposição parcial do grafite e a pirólise dos compostos aromáticos carbonosos, respectivamente (SUN, 2011).

O material alginato/grafite magnético (figura 34 c) apresenta um pico endotérmico inicial em 64°C correspondendo a uma perda de massa de 16,7%, no qual é atribuída à evaporação de moléculas de água adsorvidas. Em temperaturas superiores a 200°C são observados três eventos exotérmicos em aproximadamente 417°C, 437,5°C e 739°C, os quais são associados à decomposição parcial e combustão do alginato e pirólise do grafite magnético, respectivamente. Nesta curva, a temperatura que promove a decomposição do alginato é superior ao do material puro, o que sugere que são ocasionados por interações entre ambos os componentes (TRAVLOU, 2012). Um perfil térmico similar foi encontrado para o sistema de alginato/grafite magnético que incorpora o composto híbrido HDL-IBU (figura 34 d). Foi observado neste termograma em até 200°C duas perdas de massa de aproximadamente 17,6% e 14%, referentes à perda de moléculas de água fisioadsorvida e a liberação das moléculas de ibuprofeno confinadas na matriz inorgânica. Em temperatura mais elevadas podem ser evidenciados alguns eventos térmicos, sendo o primeiro a 395°C correspondente a liberação das moléculas de ibuprofeno e demais eventos em temperaturas superiores a 450°C estão relacionado à decomposição e combustão do biopolímero alginato, acompanhado de decomposição das estruturas aromáticas do grafite magnético e ibuprofeno. Cabe ressaltar que todos os sistemas baseados em grafite magnético apresentam uma

excelente estabilidade térmica, melhorando significativamente a estabilidade do polissacarídeo alginato e do híbrido HDL-IBU.

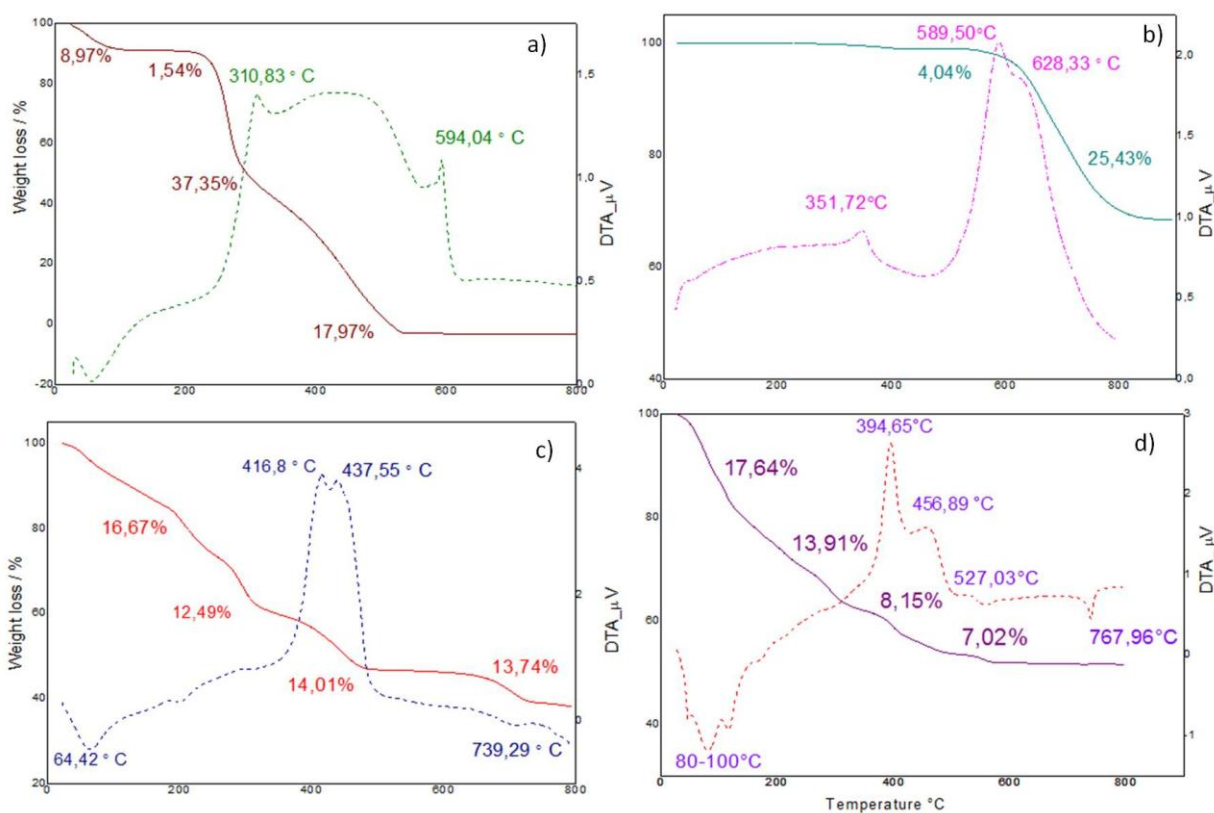


Figura 34:Curvas de TGA e DTA obtidas para os seguintes materiais: a) alginato, b) grafite magnético, c) alginato/grafite magnético e d) HDL-IBU/ALG/GM.

A superfície das diferentes microesferas sintetizadas foi revelada utilizando a microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM). Este estudo objetivou a visualização do efeito que as nanopartículas de grafite magnético desempenham na morfologia dos sistemas de microesferas. A figura 35 mostra um sistema de microesfera baseado somente em alginato e HDL-IBU, sem a presença do material magnético (figura 35 a), no qual revela um aspecto homogêneo com certa rugosidade superficial. Entretanto, e ainda que apresente maior rugosidade, o sistema de microesfera composto de alginato carregado com o grafite magnético (figura 35 b), apresenta uma morfologia homogênea muito parecida ao sistema anterior, indicando uma boa distribuição das nanopartículas de grafite magnético na matriz biopolimérica. Tais imagens mostram também que a presença do grafite magnético na composição da microesfera induz a uma estrutura esfoliada, com uma área superficial mais elevada, de

maneira similar ao reportado por Yildirim ao analisar sistemas de alginato puro e alginato/nanotubos de carbono. Estes resultados texturais, tais como homogeneidade, boa distribuição e rugosidade podem representar os diferentes comportamentos dos sistemas como materiais dispensadores na liberação controlada de fármacos.

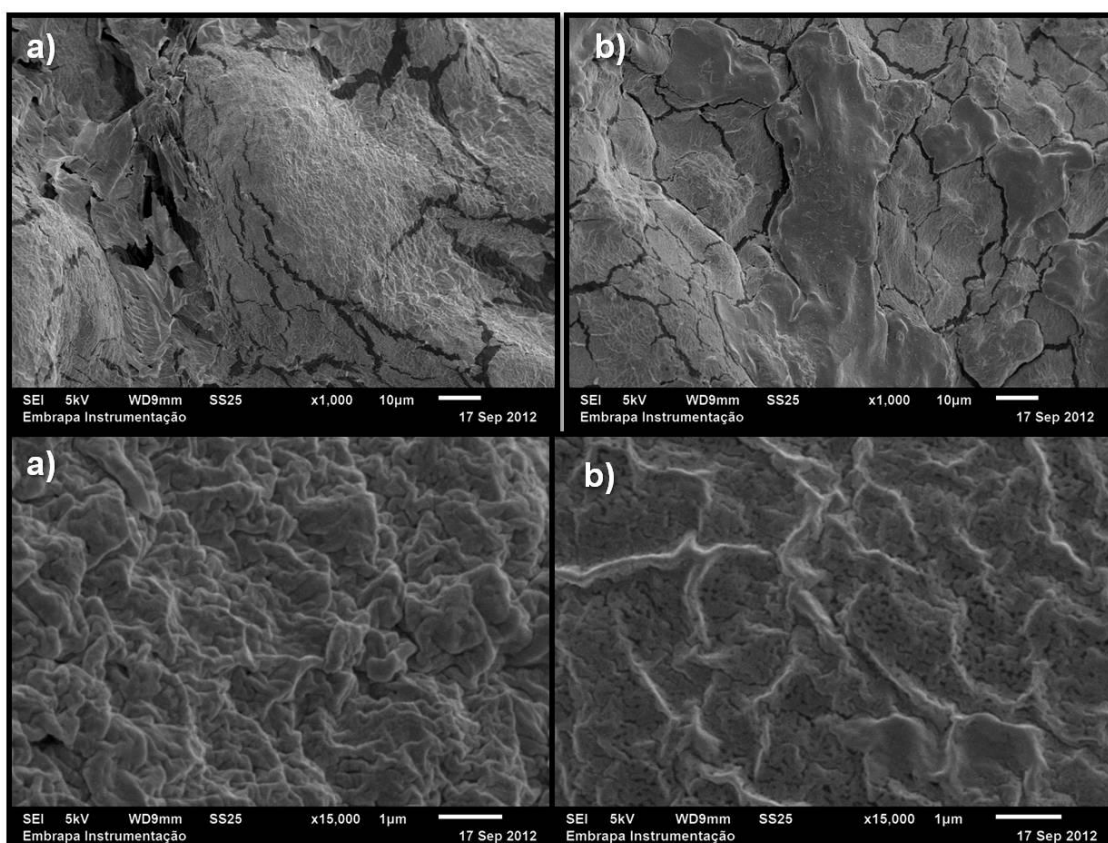


Figura 35: Imagens de MEV em dois diferentes aumentos das microesferas: a) HDL-IBU/ALG e b) HDL-IBU/ALG/GM.

3.5. Determinação da quantidade de ibuprofeno intercalado e da eficiência de encapsulação dos complexos formados

O estudo da eficiência de encapsulação de IBU intercalado por uma matriz bio-híbrida baseada em alginato/grafite magnético é essencial, uma vez que pode elucidar as interações entre os materiais no sentido de compreender seu comportamento nos estudos de liberação do fármaco, principalmente no que se refere ao papel que o grafite magnético possa exercer no sistema. Foram determinadas as quantidades de IBU

intercalado e a eficiência de encapsulação das matrizes à base de alginato/grafite magnético nos diferentes complexos sintetizados (tabela 11).

Tabela 11: Quantidade de ibuprofeno incorporado no sistema alginato/grafite magnético e a eficiência de encapsulação das microesferas formadas, ^a =desvio padrão da média (n=3).

Formulação	IBU incorporado (%) ^a	Eficiência de encapsulação (%) ^a
IBU/ALG	4,54 ± 0,26	22,28 ± 1,28
HDL-IBU/ALG	5,28 ± 0,25	26,42 ± 1,25
IBU/ALG/GM	8,84 ± 0,22	44,22 ± 1,10
HDL-IBU/ALG/GM	9,40 ± 0,35	47,01 ± 1,72

Os resultados apontam que os complexos formados por alginato/grafite magnético possuem maior afinidade para encapsular tanto o híbrido sintetizado (HDL/IBU), quanto o fármaco em sua forma pura (IBU), apresentando uma eficiência de encapsulação mais elevada quando comparada com os grupos que não contam com a presença do grafite, sugerindo uma síntese eficiente de novos sistemas de bionanocompósitos, com potencial elevado para a liberação seletiva de fármacos. Outros compostos carbonosos como nanotubos de carbono mesclado com biopolímeros já foram estudados, parecendo atuar como agentes otimizadores das propriedades físicas das matrizes poliméricas (KHARISOV, 2009). Outra vantagem adicional destes bionanocompósitos é a ausência de necessidade de utilização de excipientes farmacêuticos sintéticos como *Tween-80*, tensoativos não iônicos utilizados no sentido de aumentar a compatibilidade dos sistemas (REMUÑAN-LOPEZ, 1997).

3.6. Propriedades de absorção de água dos microesferas à base de alginato/grafite magnético que incorporam IBU

As propriedades físicas relacionadas com a absorção de água pelas microesferas à base de alginato/grafite magnético com IBU intercalado em HDL ou incorporado diretamente na matriz polimérica foram avaliadas em um único sistema em solução

tampão fosfato com pH 7,4, meio este capaz de degradar rapidamente a matriz algínica e altamente solúvel para o ibuprofeno (LEROUX, 2001). Dessa forma, pôde ser analisado o efeito que a presença ou ausência das nanopartículas de GM podem conferir nas propriedades físicas dos bionanocompósitos. As curvas obtidas mostram a variação de quantidade de água absorvida pelas diferentes microesferas em função do tempo em contato com a solução tampão (figura 36).

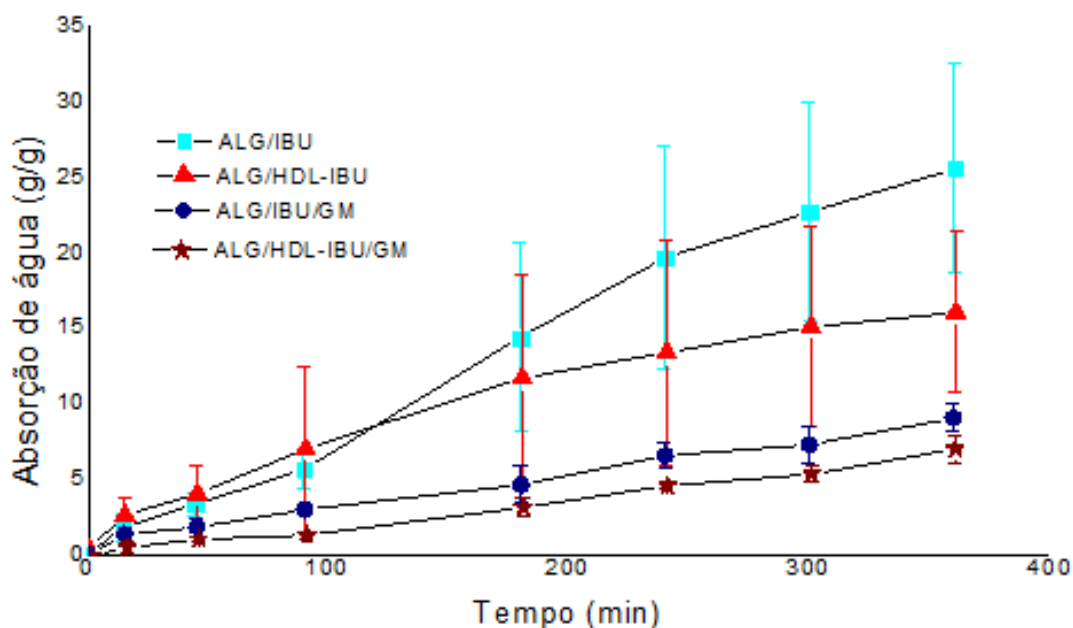


Figura 36: Curva de absorção de água em função do tempo de contato das microesferas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.

Para todos os grupos sintetizados, a quantidade de água absorvida aumenta em função do tempo de exposição ao meio aquoso, sem se desintegrar mesmo após seis horas de experimento, que de uma forma geral, já representa uma síntese eficiente dos diferentes complexos. Fica claro que o grupo composto por IBU/ALG apresenta uma maior absorção de água quando comparado com o grupo HDL-IBU/ALG, o que sugere que a presença das lâminas de HDL intercaladas com ibuprofeno desempenha um papel não só de proteção de solubilização do fármaco, mas também como uma barreira física, sendo mais estáveis em meio aquoso do que o grupo que não apresenta o sólido inorgânico.

A presença do grafite magnético nos grupos imprime uma elevada diferença de comportamento das microesferas em contato com a solução tampão em função do tempo, tanto com o IBU incorporado diretamente na matriz ALG/GM, ou como forma de compostos de intercalação (HDL-IBU). Eles apresentaram uma absorção de água menor que os grupos que não continham grafite magnético, mesmo na ausência do HDL, o grupo IBU/ALG/GM apresentou um ganho de massa de 9g enquanto que o grupo IBU/ALG passou a ter seu ganho de massa totalizado em 25,5g. Isso se deve provavelmente à estabilidade que o grafite magnético proporciona ao sistema, assim como o seu caráter hidrofóbico, atuando ainda como uma barreira entre a interface das microesferas e o meio. A figura 37 mostra o aspecto e tamanho que as microesferas à base de HDL-IBU/ALG e HDL-IBU/ALG/GM exibiram após as seis horas de estudo. O que mostra que o grupo que continha grafite magnético, apresentou uma menor variação de tamanho, assim como uma maior integridade, corroborando a ideias obtidas pelos estudos de absorção de água e eficiência de encapsulação, muito interessante para uma potencial aplicação como um sistema de liberação controlada de fármacos.

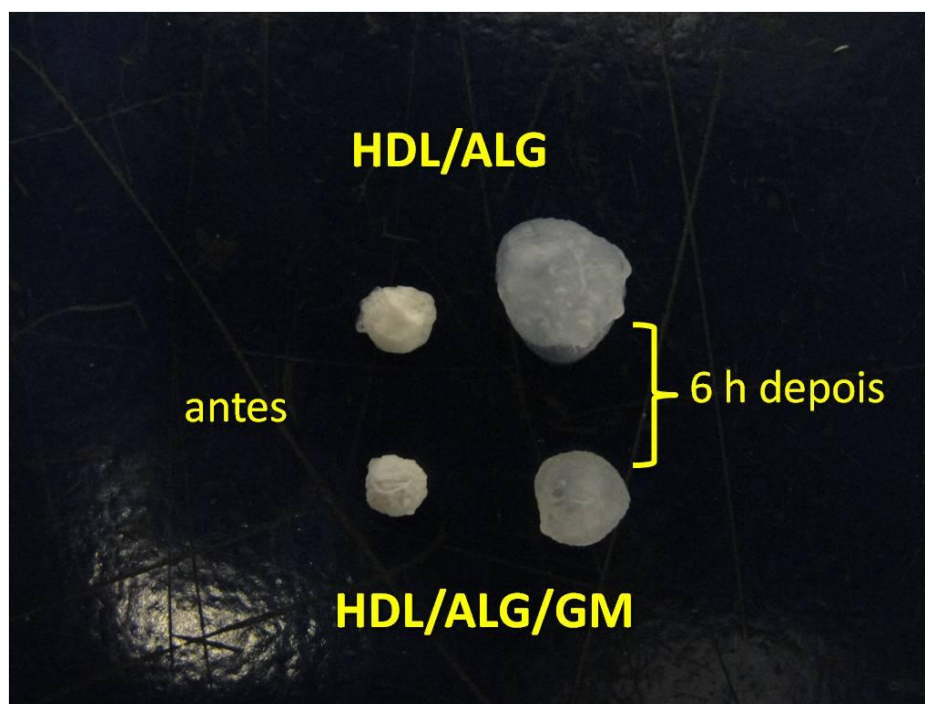


Figura 37: Imagens dos diferentes grupos de microesferas antes e após seis horas do ensaio da capacidade de absorção de água em função do tempo, em meio de solução tampão fosfato (pH 7,4).

3.9. Estudos *in vitro* de liberação de ibuprofeno encapsulado em microesferas de alginato/grafite magnético

O comportamento das microesferas à base de alginato/grafite magnético como potencial sistema de liberação controlada de ibuprofeno foi estudado. O processo cumulativo de liberação de ibuprofeno sob a forma de microesferas intercalado ou não em HDL, já foi desenvolvido com sucesso, e suas propriedades avaliadas (ALCÂNTARA, 2010; GORDIJO, 2008), sendo utilizado como uma molécula-modelo para utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos, onde nos ensaios sequenciais que simulam as condições que ocorrem no interior do organismo, foi observado que a completa liberação do fármaco só é alcançada em meio a uma solução tampão fosfato com pH 7-7,4 (GUNAWAN, 2007).

Assim, os estudos da cinética de liberação foram realizados em um meio de solução tampão fosfato com pH 7,4, durante oito horas, meio este escolhido por ser capaz de degradar a matriz algínica e solubilizar o fármaco mais rapidamente, possibilitando o entendimento da influência que as nanopartículas de grafite magnético desempenham nos diferentes sistemas sintetizados, e ainda, os efeitos que a resposta positiva frente aplicação de um campo magnético externo de aproximadamente 1T possa exercer durante todo o ensaio de liberação em determinados grupos. O comportamento das diferentes microesferas em função do tempo pode ser observado abaixo (figura 38):

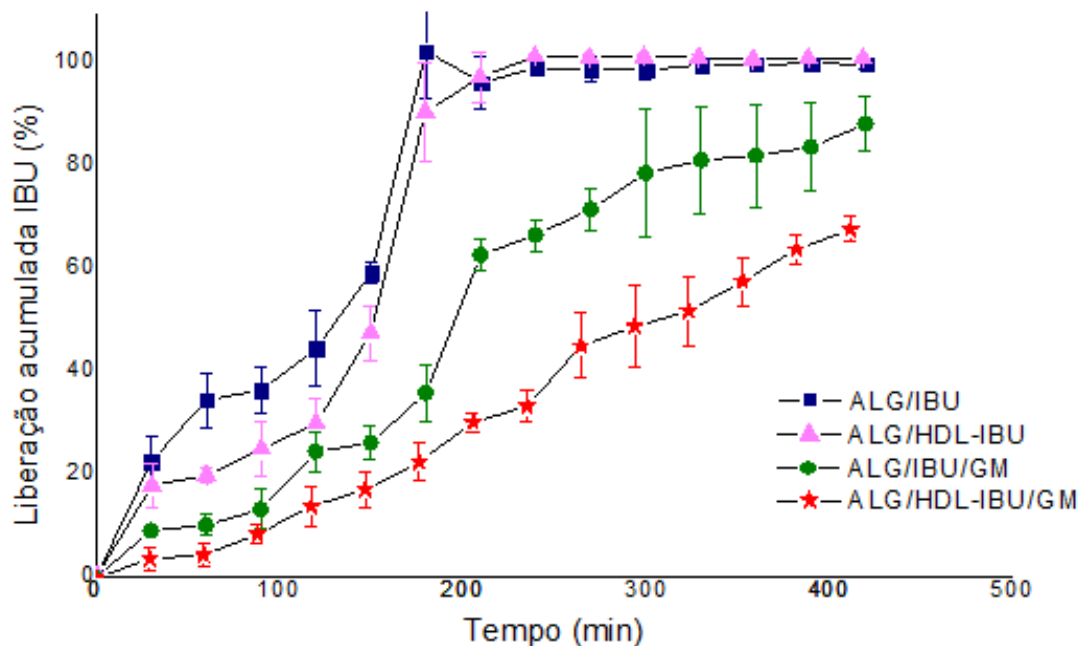


Figura 38: Perfil de liberação de ibuprofeno em função do tempo pelas microesferas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.

A partir da análise dos perfis de liberação de ibuprofeno pelos diferentes grupos, torna-se evidente que a presença de grafite magnético é responsável por retardar a liberação do anti-inflamatório, além de proporcionar uma liberação mais controlada. Os grupos formados por IBU/ALG e HDL-IBU/ALG apresentam as maiores taxas de liberação, na terceira e quarta hora de estudo, respectivamente, através de uma liberação acentuada nestes momentos, como o observado pelo grupo IBU/ALG. Ainda assim, torna possível verificar que o sólido HDL também desempenha um papel no sistema no sentido de permitir uma liberação menos pronunciada, já que é necessário que primeiro ocorra uma difusão de água e dos íons do meio no interior das microesferas até alcançar o HDL, e então conseguir a dissolução de suas lâminas para a liberação do ibuprofeno intercalado. Por outro lado, os grupos formados por IBU/ALG/GM e HDL-IBU/IBU/ALG/GM alcançaram sua liberação máxima apenas na última hora de estudo, sendo observado um caráter controlado de liberação por quase todo o ensaio. O grupo composto por IBU/ALG/GM (88,9%) exibiu uma liberação cerca de 20% maior que o grupo HDL-IBU/ALG/GM (68,2%), como o esperado, pois o fármaco foi incorporado diretamente na matriz, não se apresentando na forma de compostos de intercalação.

A partir dos resultados obtidos, o grupo eleito com as melhores propriedades com relação à capacidade de absorção de água e de liberação controlada de IBU foi o grupo composto por HDL-IBU/ALG/GM. A figura a seguir ilustra as barreiras físicas que devem ser vencidas no interior das microesferas compostas por IBU/ALG e HDL-IBU/ALG/GM para que o fármaco atinja o meio, na tentativa de ilustrar o porquê da diferença nos níveis e caráter de liberação exibido por estes grupos.

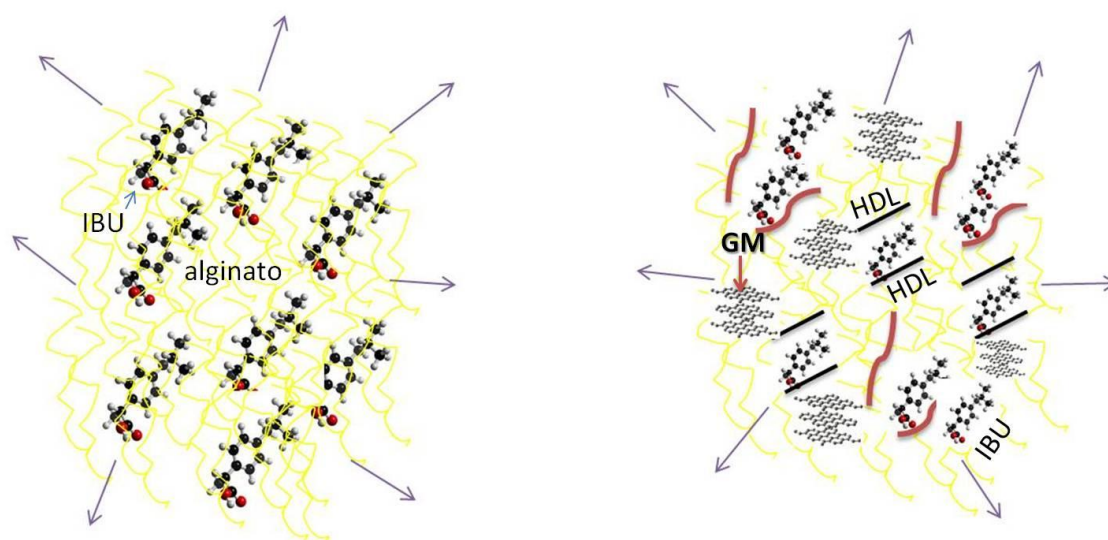


Figura 39: Representação esquemática da liberação das moléculas de ibuprofeno nas microesferas à base de IBU/alginato (esq) e de HDL-IBU/alginato/grafite magnético (dir). Tanto o HDL quanto o GM pertencem à escala nanométrica.

Foi realizado um estudo adicional da cinética de liberação de ibuprofeno sob as mesmas condições que o anterior, porém através da aplicação ou não de um campo magnético externo de aproximadamente 1T, e o comportamento das microesferas pôde ser analisado a seguir:

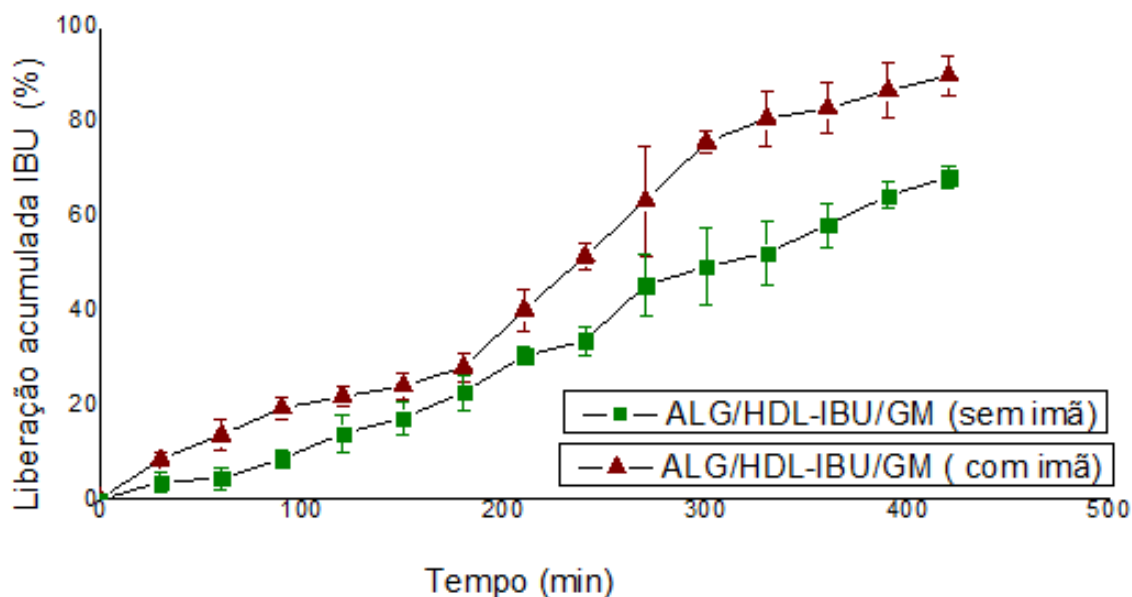


Figura 40: Perfil de liberação de ibuprofeno em função do tempo pelas microesferas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4, com a aplicação de um campo magnético externo $\approx 1T$.

O grupo que recebeu a aplicação do campo magnético externo ($\approx 1T$) respondeu positivamente frente a estimulação, exibindo uma liberação mais pronunciada desde o início do ensaio, totalizando cerca de 20% a mais de ibuprofeno liberado em comparação ao grupo que não recebeu o estímulo magnético. Apesar de não aparentar um caráter controlado de liberação, este sistema pode ser promissor quanto a uma futura aplicação em hipertermia, liberação tópica ou *in situ* de fármacos, valendo-se ainda das propriedades intrínsecas do grafite como lubrificante. Em um determinado momento, a aplicação de um campo magnético externo seria responsável por um aumento da liberação de maneira localizada, acompanhada da proteção física que as matrizes bio-híbridas exercem retardando os níveis de liberação ao longo do trato gastrointestinal quando a administração se der por via oral; interessante também quando a via for intravenosa, uma vez que as partículas que compõem os novos sistemas pertencem à escala nanométrica além de serem biocompatíveis.

Este ensaio mostra ainda que outra variável, a estimulação magnética, além do tempo, pH e temperatura (BARBUCCI, 2011), tem a capacidade de modular os níveis de Liberação pelos sistemas, assim como descrito por Giani e colaboradores (2012),

esforços múltiplos são necessários para um completo entendimento do mecanismo que eleva os níveis de liberação dos bionanocompósitos quando excitados.

3.9.1. Conclusões parciais

Foi desenvolvida uma matriz bio-híbrida inovadora à base de alginato e grafite magnético, para ser utilizada em futuros sistemas de liberação controlada de fármacos. Através do estudo da liberação *in vitro* de ibuprofeno, utilizado como fármaco modelo, através da morfologia de microesferas. O ibuprofeno foi analisado tanto incorporado diretamente na matriz, quanto sob a forma de compostos de intercalação com os hidróxidos duplos lamelares.

O bionanocompósito sintetizado mostrou elevada compatibilidade entre o biopolímero alginato e o grafite magnético, assim como com o sólido à base de HDL, além de permitir uma reticulação eficiente pela solução de CaCl_2 , fatores imprescindíveis para a aplicação como sistemas de liberação controlada de fármaco.

Foi possível ainda elucidar o papel que a utilização inédita do grafite magnético para este tipo de aplicação exerce no sistema, uma vez que ele foi provavelmente o responsável por uma maior resistência à absorção de água, assim como por uma eficiência de encapsulação maior acompanhada de uma liberação controlada ao longo das 8 horas de estudo da cinética de liberação do ibuprofeno, mesmo através de um meio altamente solúvel para a matriz algínica (pH7,4).

Outra propriedade adicional com elevada importância neste âmbito, é a resposta positiva frente à aplicação de um campo magnético externo, no qual foi responsável por uma taxa de liberação cerca de 20% superior que os grupos que não receberam tal estímulo, apresentando elevada viabilidade para futuros estudos como sistemas inovadores no que tange à área de hipertermia tumoral e liberação controlada de fármacos *in situ*, além da vantagem adicional que as nanopartículas de grafite magnético apresentam em comparação a outras nanopartículas magnéticas utilizadas para estes fins, como a biocompatibilidade e a ausência de necessidade da utilização de solventes

orgânicos ou ácidos, uma vez que o grafite magnético se dispersa em água destilada, propriedade essencial para a aplicação biomédica.

CAPÍTULO 4. Preparação de películas à base de alginato/grafite magnético para a liberação controlada de ibuprofeno

Este capítulo trata da preparação de uma nova forma farmacêutica para liberação controlada de fármacos, através do desenvolvimento de bionanocompósitos sob a morfologia de película, e objetiva ainda avaliar e compreender a influência que as nanopartículas de grafite magnético pré-sintetizadas podem desempenhar nos sistemas. Tal inovação foi patenteada junto ao INPI com o título: “Processo de obtenção de películas bio-híbridas magnéticas e películas bio-híbridas magnéticas”. A preparação dos novos bionanocompósitos à base de alginato/grafite magnético apresenta a mesma formulação dos sistemas desenvolvidos no capítulo 3, utilizando ainda o ibuprofeno como fármaco modelo, a partir de sua reconhecida estabilidade como composto de intercalação com os hidróxidos duplos laminares. A preparação de películas para a liberação controlada de fármacos é atualmente muito atrativa para tal emprego, podendo ser promissora em futuras aplicações como bandagens, emplastros, para a liberação *in situ* de fármacos. Tal arquitetura nos permite ainda inferir outras propriedades dos bionanocompósitos ainda não estudadas até o momento, como a espessura de película e as propriedades mecânicas que são fundamentais para a utilização futura destes compostos.

Outro fator importante além da morfologia que diferencia a preparação de películas com a das microesferas à base de alginato/grafite magnético, é a concentração e tempo de imersão dos materiais nas soluções reticulantes de CaCl_2 , que são amplamente utilizadas para otimizar as propriedades mecânicas, assim como na liberação controlada de fármacos. A concentração e tempo de utilização da solução de CaCl_2 nas películas, foi menor e mais breve (5% m/v por 15 minutos) do que na síntese das microesferas (15% m/v por 3 horas), a fim de se obter um material maleável tal qual uma película, e que possa ter suas propriedades mecânicas influenciadas de fato pela presença ou ausência das nanopartículas de grafite magnético.

Por se tratar de um desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica, porém com a mesma composição e concentrações utilizadas na síntese das microesferas à base de alginato/grafite magnético, os estudos composicionais e estruturais foram os mesmos, sendo abordados neste capítulo os estudos da superfície por microscopia

eletrônica de varredura, das propriedades físicas, mecânicas e de liberação *in vitro* controlada de ibuprofeno pelos distintos grupos de películas.

Resultados e Discussão

4.1. Estudo da morfologia das películas

A morfologia da superfície das diferentes películas dos sistemas à base de alginato/grafite magnético foi analisada mediante a utilização do microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo, como pode ser observado na figura que segue abaixo:

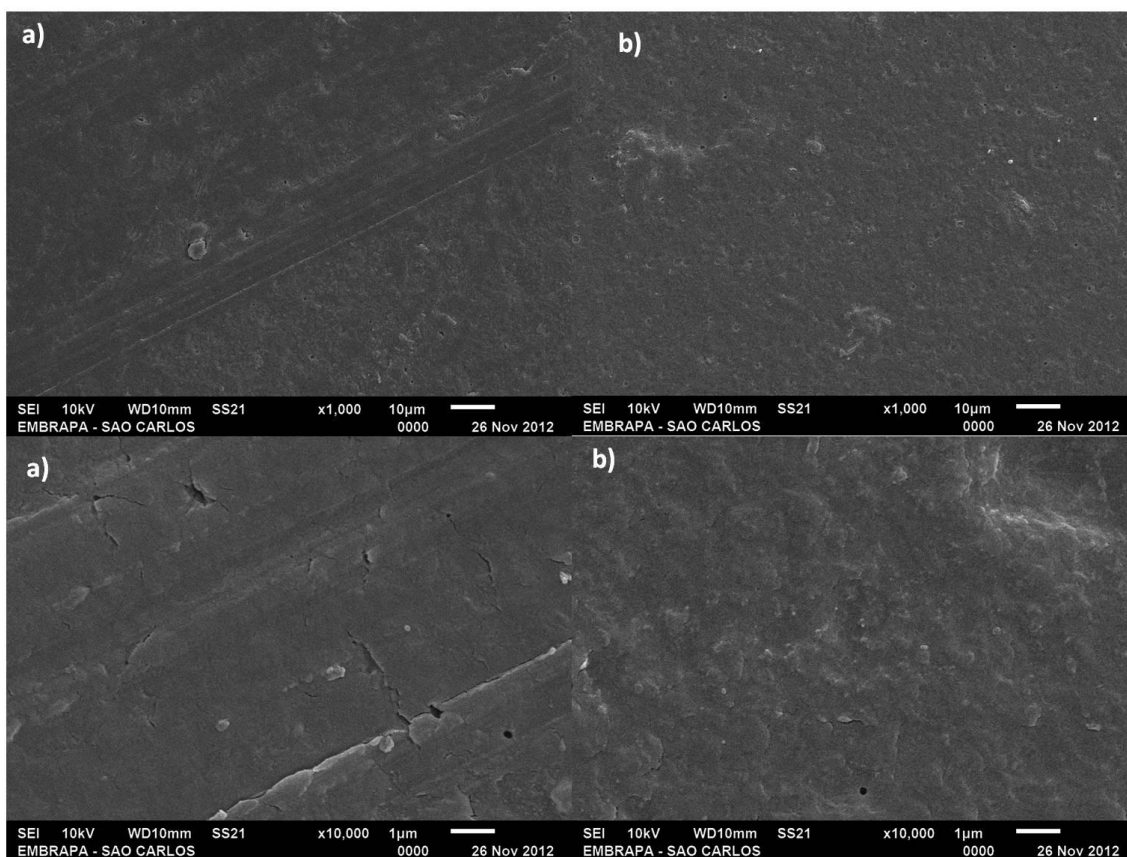


Figura 41: Imagens de MEV em dois diferentes aumentos das películas: a) IBU/ALG e b) IBU/ALG/GM.

As imagens de MEV possibilitam inferir a compatibilidade das nanopartículas de grafite magnético com o biopolímero alginato (figura 41 b), e ainda o aumento da rugosidade na superfície e densidade (TRAVLOU, 2012), semelhante ao encontrado por Shengtao ao analisar o grafite esfoliado e o observado pelo MEV das microesferas já comentado anteriormente.

4.2. Propriedades de absorção de água das películas à base de alginato/grafite magnético que incorporam IBU

As propriedades físicas de absorção de água pelas películas compostas por alginato/grafite magnético com ibuprofeno intercalado em HDL ou incorporado diretamente na matriz polimérica foram avaliadas em pH único (7,4) através de solução tampão fosfato, meio este capaz de degradar rapidamente a matriz algínica (LEROUX, 2001). A análise do comportamento dos diferentes grupos de bionanocompósitos sintetizados pode ser observado na figura 42:

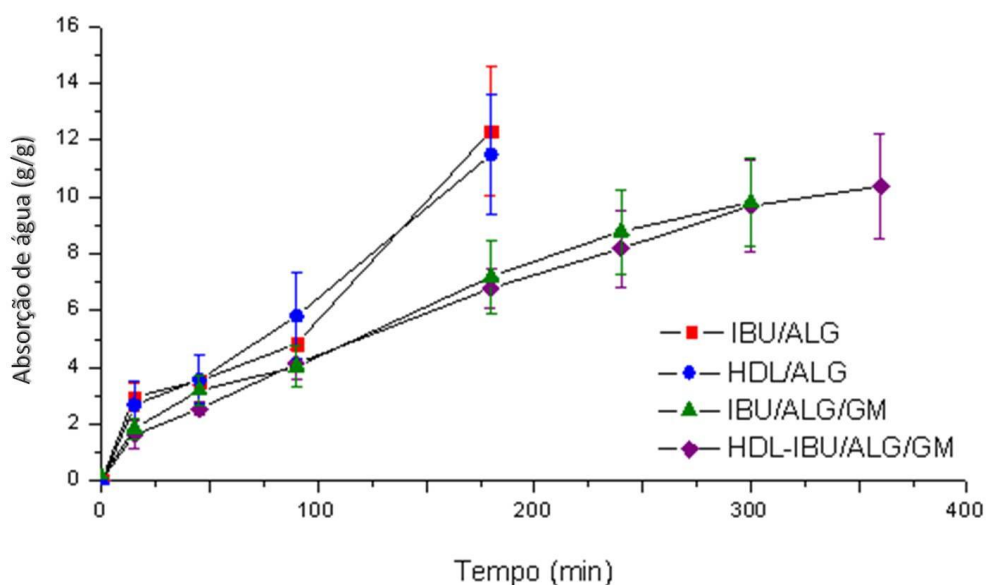


Figura 42: Curva de absorção de água em função do tempo de contato das películas compostas por alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.

A quantidade de água absorvida aumenta em função do tempo em todos os bionanocompósitos estudados durante certo período. Os grupos que não apresentam grafite magnético em sua formulação (IBU/ALG e HDL/ALG) são os grupos que mais absorveram água em função do tempo, alcançando um ganho de massa entre aproximadamente 11 e 12 gramas prontamente na terceira hora de estudo, acompanhado de sua desintegração. Devido provavelmente ao elevado pH do meio, que foi responsável pela degradação da matriz híbrida através da incorporação dos íons fosfatos do meio que substituem os íons cálcio das cadeias reticuladas do alginato, favorecendo a desintegração da estrutura da matriz, acompanhada da solubilização do ibuprofeno, além da reticulação ter sido muito menos concentrada e por breve tempo, facilitando a ação dos íons do meio. Logo na segunda hora de ensaio, os grupos compostos por IBU/ALG e HDL-IBU/ALG já apresentavam um aspecto de hidrogel, o que dificultava a acurácia das medidas no estudo.

Por outro lado, os grupos que apresentavam grafite magnético em sua composição, foram os grupos que menos absorveram água, alcançando um ganho de massa de aproximadamente 9g, porém persistindo por mais tempo íntegros nos sistemas. O grupo composto por IBU/ALG/GM desintegrou-se na quinta hora de ensaio, enquanto que o grupo formado por HDL-IBU/ALG/GM persistiu por todo o estudo, ou seja, mesmo após a duração total do experimento, permaneceu com a morfologia de uma película. O grupo que se desintegrou na quinta hora de estudo, não apresentava o ibuprofeno intercalado em HDL, por isso a solubilização da matriz algínica e fármaco acompanhada de sua desintegração ocorreram enquanto o grupo composto por HDL-IBU/ALG/GM não apresentou tal resultado, o que mostra que assim como o sucedido com o mesmo ensaio das microesferas de mesma composição (capítulo 3), o sólido inorgânico à base de HDL desempenha um papel de proteção não só do fármaco, mas também de todo o sistema, uma vez que ele é resistente a pHs mais básicos (DARDER, 2005). Porém, quando comparamos o comportamento dos grupos IBU/ALG e IBU/ALG/GM podemos observar que apesar de ambos terem se desintegrado, o grupo que continha as nanopartículas de grafite magnético em sua formulação suportou o ensaio por duas horas a mais que o grupo IBU/ALG.

A análise da influência que a presença do grafite magnético efetua nos grupos pôde ser claramente observada também nos bionanocompósitos sintetizados em películas, pois quando são comparados os grupos de mesmas formulações que só diferenciam-se no que se refere à presença ou ausência das nanopartículas magnéticas, observou-se que a presença de GM conferiu além de uma maior estabilidade ao sistema por manter-se em película por mais tempo ou pelas 6 horas de ensaio, um menor ganho de massa através de uma menor absorção de água, fatores estes essenciais para a utilização destes sistemas como futuros liberadores de fármacos de maneira controlada. Estas análises foram possíveis de serem realizadas também pela utilização da solução reticulante de CaCl₂ a 5% por apenas 15 minutos, já que se fosse utilizada em maiores concentrações e por mais tempo, provavelmente a diminuição da absorção de água pelos grupos estariam atreladas também a ela.

As tabelas 12 e 13 descrevem comparativamente o comportamento dos bionanocompósitos em microesferas e películas, sintetizados com mesma formulação, frente ao ganho de massa por absorção de água em função do tempo (tabela 12), pelos grupos que não sofreram desintegração; e pelos grupos de películas que sofreram desintegração (tabela 13), o tempo de duração máximo do ensaio; evidenciando de forma global as tendências que estes bionanocompósitos apresentam para serem futuramente aplicados como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Tabela 12: Dados comparativos dos grupos das microesferas e películas à base de alginato/grafite magnético com relação à sua capacidade total de absorção de água.

Grupos	Morfologia	Absorção de água (g/g)	Duração do ensaio (min)
IBU/ALG	Microesferas	25,5±6,9	360
IBU/ALG/GM	Microesferas	9,1±0,9	360
HDL-IBU/ALG	Microesferas	15,8±5,3	360
HDL-IBU/ALG/GM	Microesferas	7,0±0,9	360
HDL-IBU/ALG/GM	Película	10,3±1,8	360

A tabela acima demonstra que apesar de todos os grupos citados terem suportado às seis horas de ensaio, os grupos que apresentavam nanopartículas de grafite magnético obtiveram um ganho de massa claramente menor do que o grupo correspondente ausente de tais nanopartículas, com a presença ou ausência das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares na formulação, devido provavelmente à elevada compatibilidade do grafite com o sistema, aliado a sua hidrofobicidade que faz destes sistemas promissores quanto ao uso como dispensadores de fármacos.

Outra característica interessante que a tabela nos traz é que a única formulação que permaneceu com a morfologia de película após todo o experimento foi a do grupo HDL-IBU/ALG/GM, apesar de ter apresentado um ganho de massa de quase 3g a mais que a mesma formulação em microesferas, que pode ser explicado pela morfologia em si, uma vez que a película apresenta uma maior superfície de contato com o meio altamente solúvel para a matriz algínica, e outro fator essencial para esta diferença quanto à capacidade de absorção de água por estes sistemas é a concentração e tempo de exposição à solução reticulante de CaCl_2 , que nos sistemas de microesferas foi utilizada uma solução de CaCl_2 a 15% (m/v) por 3 horas, enquanto que para as películas a mesma solução foi utilizada numa concentração de 5% (m/v) por 15 minutos. A otimização das propriedades de absorção de água, mecânica e de liberação *in vitro* dos sistemas pela utilização de soluções reticulantes já são reconhecidas, como o fato de que quanto maior o tempo de exposição dos sistemas pelas soluções, menor é a absorção de água pelos materiais, assim ocorre conforme a concentração das soluções aumenta, corroborando com os resultados aqui obtidos (DONG, 2006; SHU, 2000; REMUÑAN-LOPEZ, 1997).

Tabela 13: Dados comparativos dos bionanocompósitos que se desintegraram durante o ensaio da capacidade de absorção de água com duração teórica de 360 minutos.

Grupos	Morfologia	Duração do ensaio (min)
IBU/ALG	Película	180
IBU/ALG/GM	Película	300
HDL-IBU/ALG	Película	180

Dentre os grupos que não suportaram os 360 minutos totais do experimento da capacidade de absorção de água em meio a solução tampão fosfato pH 7,4, observou-se que a presença de nanopartículas de grafite magnético, mesmo na ausência dos hidróxidos duplos lamelares na formulação (IBU/ALG/GM), foi o responsável por permitir que o sistema suportasse o meio altamente solúvel tanto para a matriz híbrida quanto para o ibuprofeno, duas horas a mais que os outros grupos ausente do grafite, o que mostra mais uma vez o quão promissor a utilização deste biomaterial magnético pode ser quando aplicado para esta utilização.

4.3. Estudo da variação da espessura de película pelos bionanocompósitos à base de alginato/grafite magnético que incorporam IBU

Este estudo traz elucidacões importantes quanto ao comportamento das películas em função da alteracão da espessura dos bionanocompósitos em função do tempo, quando imersos em solucão tampão fosfato pH7,4, podendo ser inter-relacionado com os estudos da capacidade de absorção de água supracitados e de propriedades mecânicas ainda não descritos, uma vez que espera-se que os materiais sigam uma regularidade quanto às propriedades analisadas. O perfil de alteracão da espessura pelas diferentes películas sintetizadas pode ser observado na figura a seguir:

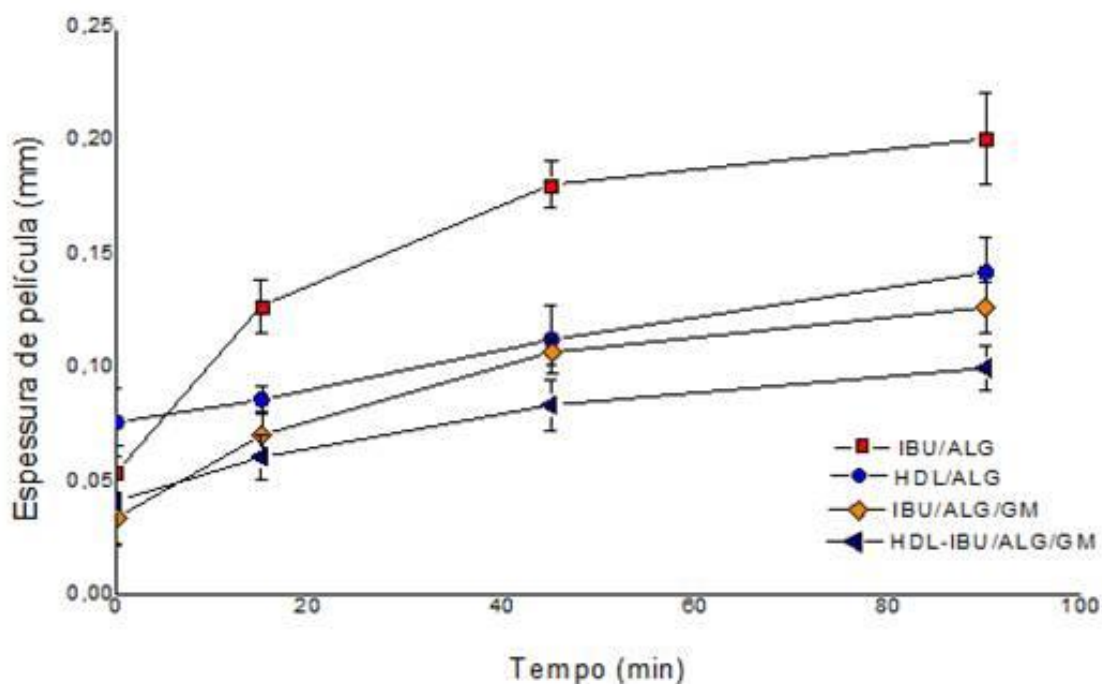


Figura 43: Curva da alteração da espessura de película em função do tempo de contato das películas compostas por alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.

De uma forma geral, todos os sistemas apresentaram uma espessura inicial delgada (0,04-0,08mm) menos espessa que as películas com diferentes formulações sintetizadas por Akhgare (2006) e Mandaogade (2002) e colaboradores. Acompanhados de uma pequena variação de sua espessura ao longo dos 90 minutos de ensaio, o que mostra uma estabilidade satisfatória, uma vez que se encontrava em um meio bastante hostil tanto para a matriz bio-híbrida quanto para o ibuprofeno. Conforme o esperado, os grupos que apresentavam as nanopartículas de grafite magnético sofreram uma variação de espessura menor do que àqueles que não continham tais nanopartículas em sua formulação, e ainda, foi possível inferir que a presença das nanopartículas de hidróxidos duplos lamelares também conferiu estabilidade no sistema, e quando também presentes na formulação, foram responsáveis por uma menor alteração da espessura, como o observado no grupo HDL-IBU/ALG/GM, que foi o que menos apresentou variações ao longo do ensaio, partindo de uma espessura inicial de 0,04mm alcançando a espessura final de 0,1mm após uma hora e meia. O tempo de estudo foi reduzido quando comparado com o estudo da capacidade de absorção de água, pois após os noventa minutos totais de ensaio de espessura de película, o material começou a

romper, devido à estrutura pontiaguda do paquímetro responsável pelas medidas, uma vez que a película já sofria nitidamente os efeitos da solução tampão fosfato. Outro caminho viável seria ter realizado o mesmo ensaio com um micrômetro, porém não havia nenhum disponível na época de realização dos estudos.

4.4. Estudo das propriedades mecânicas dos bionanocompósitos à base de alginato/grafite magnético que incorporam IBU

O comportamento das películas compostas por ibuprofeno/alginato e ibuprofeno/alginato/grafite magnético foram testados. As películas secas e úmidas foram submetidas a testes de resistência à tração (MPa) e de deformação específica do material até sua ruptura (%), através da aplicação de uma carga de 50kgF em uma velocidade de 50mm/min até sua ruptura pelo equipamento EMIC. Os corpos de prova retangulares (100mmx5mm) foram pré-condicionados a uma temperatura de 20°C, em uma umidade relativa de 65%, e os que foram avaliados úmidos, foram submetidos à uma imersão em água ultrapura pH5,5 por duas horas anteriormente ao ensaio. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística *t* (*Student*) pelo *software* R, a fim de verificar se os resultados eram estatisticamente significantes, obtendo-se $P < 0,05$ para todos os ensaios (tabela14).

As propriedades mecânicas foram avaliadas também nas películas úmidas, pois ao simular condições que ocorrem *in vivo* no organismo, como por exemplo, durante a dissolução do fármaco, os resultados devem ser completamente diferentes do que quando avaliados no estado seco (REMUÑAN-LOPEZ, 1997). Dessa forma, torna-se muito importante entender como a presença de água no material pode afetar suas propriedades mecânicas, uma vez que películas de alginato sofrem influências do efeito plastificador que a água em si já exerce no sistema (KIM, 1990), diminuindo drasticamente a resistência à tração do material quando comparado na ausência de umidade.

Tabela 14: Propriedades mecânicas das diferentes películas em função do tempo; desvio-padrão em parênteses; a = película seca e b = película úmida em solução tampão fosfato pH7,4.

Grupos	Esp.película ^a (mm)	Esp.película ^b (mm)	Tensão ^a (MPa)	Tensão ^b (MPa)	Def. ^a (%)	Def. ^b (%)
IBU/ALG	0,05 (0,01)	0,2 (0,02)	7,99 (1,46)	2,03 (0,33)	4,77 (1,43)	4,77 (0,65)
IBU/ALG/GM	0,035 (0,01)	0,12 (0,01)	63,26 (9,25)	8,61 (2,30)	6,63 (1,76)	18,75 (5,69)

De acordo com os dados obtidos explícitos na tabela acima, fica evidente que mesmo quando as películas estão úmidas, o que de fato já ocasiona uma diminuição da qualidade de suas propriedades mecânicas, o grupo IBU/ALG/GM mostrou melhores condições de resistência à tração, assim como uma capacidade maior de deformar-se até sua ruptura, mesmo apresentando uma espessura de película menor que o grupo IBU/ALG. Com relação às películas secas, o grupo que apresentava as nanopartículas de grafite magnético exibiu uma resistência máxima à tração cerca de 10 vezes maior que o outro grupo testado. A porcentagem máxima de deformação que o grupo IBU/ALG apresentou foi praticamente a mesma tanto no estado seco quanto no estado úmido, sendo menor que todas as apresentadas pelo grupo IBU/ALG/GM. Estes grupos foram escolhidos para os testes, por não apresentarem o hidróxido duplo lamelar em sua composição, tornando mais claro o entendimento da influência que o grafite magnético exerce nas películas.

Resultados ligeiramente inferiores com relação à resistência mecânica foram encontrados por Remuñan-Lopez e colaboradores, quando testaram diferentes concentrações da solução reticulante de CaCl_2 em função do tempo em películas de alginato de cálcio. Encontraram a maior resistência à tração e maior capacidade de deformação no grupo que foi reticulado com a maior concentração de cloreto de cálcio (20%) e por mais tempo, como o esperado, uma vez que quanto maior a concentração e tempo de exposição dos materiais nas soluções reticulantes, melhores são as propriedades mecânicas. Ainda assim o grupo que exibiu a maior resistência à tração não foi superior que a média obtida em nosso estudo pelo grupo IBU/ALG/GM. Considerando ainda que neste ensaio a solução reticulante (CaCl_2) foi utilizada em pequena concentração (5% m/v) e por breve tempo (15 minutos). O que torna evidente o papel que as nanopartículas de grafite magnético efetuam nos sistemas, além de

otimizar as propriedades mecânicas, não necessitam de uma solução tão concentrada de cloreto de cálcio e nem de uma exposição tão continuada. Acompanhada de todas as vantagens adicionais que as nanopartículas de grafite magnético podem contribuir nos sistemas, como, por exemplo, a resposta positiva frente à aplicação de um campo magnético e externo e a propriedade lubrificante intrínseca do grafite, que pode ser interessante quando aplicadas para liberação controlada de fármacos para doenças articulares crônicas, onde ele iria atuar diretamente nas articulações diminuindo o atrito e minimizando os sintomas dolorosos que os pacientes apresentam.

4.5. Estudos *in vitro* de liberação de ibuprofeno incorporado em películas de alginato/grafite magnético

Com o intuito de avaliar se os sistemas que exibiram estabilidade suficiente enquanto microesferas para a liberação controlada de ibuprofeno também pudessem ser eficientes em outras formas farmacêuticas, como sob a forma de películas, foi realizado o experimento *in vitro* da liberação ibuprofeno (figura 44), sob as mesmas condições realizadas para o experimento com as microesferas. Além de diferirem quanto à morfologia, também se diferenciavam com relação à concentração e tempo de exposição à solução reticulante de CaCl_2 , como já mencionado anteriormente. Amostras quadrangulares $1 \times 1 \text{cm}^2$ foram mantidas em 37°C , em baixa agitação e em solução tampão fosfato com pH de 7,4 sendo mantidas por 8 horas, e alíquotas foram analisadas em UV-*vis* em intervalos de tempo pré-determinados.

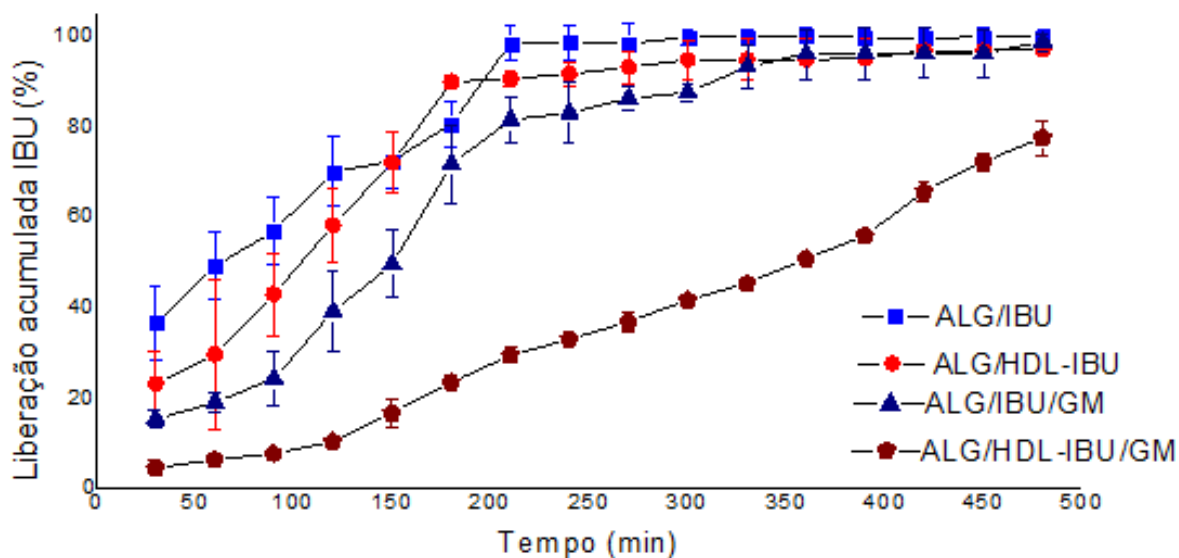


Figura 44: Perfil de liberação de ibuprofeno em função do tempo pelas películas baseadas em alginato/grafite magnético em solução tampão fosfato pH 7,4.

De acordo com o perfil de liberação das diferentes películas, ficou evidente que os grupos compostos por IBU/ALG e HDL/ALG alcançaram o ápice de liberação muito rapidamente, logo nas primeiras horas de um ensaio com duração teórica de 8 horas. O grupo IBU/ALG liberou cerca 99% em 210 minutos de experimento, e a película composta por HDL-IBU/ALG alcançou seu máximo de liberação (95%) nos 300 minutos de ensaio, provavelmente pela presença do hidróxido duplo lamelar que foi responsável por retardar em 50 minutos o nível máximo de liberação, já que o ibuprofeno neste caso encontrava-se intercalado, e por isso, protegido pelas lâminas de HDL. Outro fator preponderante que ocasionou tamanha liberação foi o meio em que as películas se encontravam (pH7,4), capaz de solubilizar a matriz algínica prontamente (GUNAWAN, 2007).

Os grupos que apresentavam as nanopartículas de grafite magnético exibiram um comportamento que possibilitou a liberação máxima mais tardia, como o ocorrido com o grupo de películas à base de IBU/ALG/GM, que exibiu uma liberação cerca de 97% em 360 minutos de análise, chegando aos 99% no final do experimento, diferentemente do ocorrido com a película à base de HDL-IBU/ALG/GM que somente liberou seu máximo de ibuprofeno, em média 61% nos 480 minutos de experimento. Estes resultados sugerem tanto o papel que a brucita e o grafite magnético desempenham retardando os níveis de liberação pelos sistemas. Porém, mesmo na

ausência das lâminas de HDL protegendo o fármaco, a diferença ocorrida entre os grupos IBU/ALG e IBU/ALG/GM foi considerável, uma vez que a liberação máxima de ibuprofeno para ambos alcançou os 99%, porém, foram nos 210 e 480 minutos de ensaio, respectivamente. Tais resultados corroboram as ideias delineadas pelos estudos de absorção de água em função do tempo, e com as análises das propriedades mecânicas, mostrando que as nanopartículas de grafite magnético conferem ao sistema além de elevada compatibilidade e estabilidade, proteção mecânica e física contra a solubilização da matriz por incorporação de água e ação do pH, tornando tais sistemas promissores para futuramente atuarem como liberadores de fármacos e substâncias.

Outro fator analisado foi a propriedade de resposta positiva frente à aplicação de campo magnético externo pelos sistemas possuidores de grafite magnético, como pode ser evidenciado na figura a seguir:

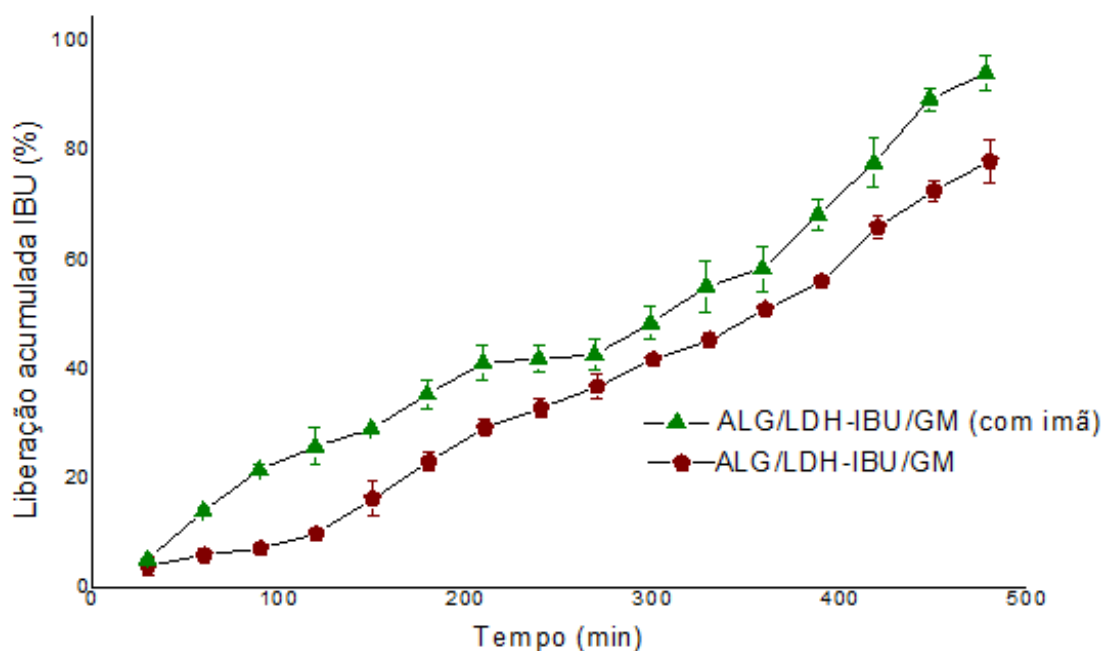


Figura 45: Perfil de liberação de IBU em função do tempo pelas películas de alginato/grafite magnético, com e sem estimulação magnética em solução tampão fosfato pH 7,4.

A aplicação de um campo magnético externo de aproximadamente 1T ocasionou um aumento na liberação de ibuprofeno pelo sistema, que no final do ensaio alcançou a liberação máxima de 77%, aproximadamente 11% superior à película de mesma formulação que não recebeu a excitação magnética, apresentando ainda o caráter controlado, aumentando pontualmente conforme o tempo avançava. Resultados

similares foram relatados por Giani e colaboradores, que observaram em suas matrizes híbridas níveis de liberação comprovadamente maiores em amostras magnéticas estimuladas por campo externo, daquelas que não sofreram tais estímulos. Tais resultados sugerem que ocorra no interior das matrizes híbridas ao ser estimuladas, um alinhamento dos momentos magnéticos das nanopartículas, que ocasiona alterações contínuas, devido provavelmente à expansão da matriz que permite que maiores concentrações de fármaco sejam difundidas para o meio (GIANI, 2012).

Uma vantagem de elevada importância da síntese de nanopartículas de grafite magnético para aplicações biomédicas em relação a outros sistemas que utilizam nanopartículas à base de outras nanopartículas magnéticas, é que tanto na síntese ou na dispersão de maneira estável, não são necessárias utilização de surfactantes, ácidos fracos ou solventes orgânicos, como descrevem os grupos liderados por Zhang, Wang, Carja e colaboradores, que apresentam a biocompatibilidade aos tecidos biológicos bastante afetada.

4.6. Conclusões parciais

Foi sintetizada uma morfologia inovadora através de uma matriz à base de alginato e grafite magnético para ser utilizado como sistemas de liberação controlada de fármacos, através do estudo da liberação de ibuprofeno, já que foram obtidos resultados consideráveis com relação ao comportamento dos bionanocompósitos sob a morfologia de microesferas, partindo-se de uma mesma formulação, mas que contasse com menor influência da solução reticuladora à base de CaCl_2 , utilizada, portanto, em menor concentração por mais breve período de tempo.

Tais resultados mostram que os sistemas sintetizados são compatíveis e estáveis como liberadores de fármacos, e que o profundo conhecimento das funções e interações das diversas variáveis que compõem os bionanocompósitos, permite sua utilização para diversas aplicações, buscando uma eficiência na liberação controlada de fármacos para o tratamento desde enfermidades dérmicas, crônicas, até mesmo na busca da cura do câncer, podendo ser extrapolada para outras áreas, como na liberação controlada de Herbicidas e fertilizantes. O modelo de interação entre os materiais e transporte de

substâncias foi proposto, estudado e confirmado; sendo digno de ser patenteado por ser inédito e promissor, abrindo novos caminhos para uma série de adaptações conforme objetive suas futuras aplicações.

III-CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho de doutorado foram desenvolvidos diferentes sistemas de liberação controlada de fármacos baseados em distintos biomateriais originando bionanocompósitos estáveis e eficientes para diversas funções, objetivando o tratamento desde doenças gástricas, colônicas até mesmo as articulares crônicas; mas, principalmente, objetivando o entendimento em nível molecular das interações entre os materiais em escala nanométrica que apresentam propriedades diferentes dos materiais em escala macrométrica, com elevada relevância do ponto de vista biomédico.

A síntese dos hidróxidos duplos lamelares como anfitrião para a intercalação de fármacos provou ser estável, importante também no que se refere aos fármacos pouco hidrofílicos, e atuar como proteção física, apresentando em todos os sistemas uma eficiência de encapsulação maior, tendo uma parcela de responsabilidade por retardar a liberação do fármaco em condições que simulam sua passagem no interior do trato gastrointestinal. A limitação da utilização da argila aniônica por si só é sua extrema sensibilidade aos pHs ácidos como o do estômago, por isso a tentativa de utilizá-la incorporada em matrizes poliméricas ou bio-híbridas que a protejam sendo eficientes para que o fármaco atinja regiões posteriores que as do estômago.

Os bionanocompósitos preparados em microesferas à base de quitosana/pectina apresentaram-se como sistemas promissores para a liberação de 5-ASA, alcançando uma liberação ótima em condições que simulam o cólon intestinal, objetivo do emprego de tal fármaco. Foram efetivos na proteção contra o pH ácido que simula o ambiente gástrico, através do emprego da pectina que é resistente. Adicionalmente, ao sofrer a variação de pH alcançando as condições que simulam a passagem do fármaco pelas zonas intestinais, a pectina se degradou, fazendo com que a quitosana de peso molecular ótimo determinado pelo ensaio de mucoadesão, exercesse seu papel mucoadesivo e resistente a pHs mais básicos, possibilitando a liberação controlada nesse ambiente.

Os complexos preparados abriram caminho ainda para novas utilizações, como, por exemplo, em futuras aplicações para desordens gástricas, na utilização de microesferas compostas por maiores concentrações de quitosana que serão lentamente degradadas enquanto liberam o fármaco.

Os complexos inovadores sintetizados à base de alginato e nanopartículas de grafite magnético atuando como matrizes bio-híbridas passíveis de incorporação de

fármacos mostraram-se estáveis mesmo em diferentes morfologias. Foram sintetizadas microesferas e películas que exibiram um comportamento de liberação controlada de ibuprofeno, utilizado como uma molécula modelo, a fim de entender o papel que o grafite magnético exercia no meio. O mesmo mostrou-se responsável por conferir uma série de propriedades aos sistemas quando presente, como maior resistência à absorção de água pelo meio, uma eficiência de encapsulação mais elevada em comparação com aqueles que não contavam com sua presença, uma melhora significativa das propriedades mecânicas enquanto película, elevada estabilidade e compatibilidade com a matriz polimérica, argila aniônica e fármaco. Além da vantagem adicional de resposta positiva frente à aplicação de um campo magnético externo, aumentando os níveis de liberação quando excitados, e, conseqüentemente, proporcionando uma liberdade maior na modulação desta resposta quando for de interesse.

O sistema composto por uma blenda entre biopolímero e grafite magnético exibiu propriedades inovadoras mesmo em diferentes formas farmacêuticas que a torna passível de ser patenteada, pois quando comparado a outros sistemas que sintetizam nanopartículas magnéticas como carreadoras de fármacos, apresentam além da biocompatibilidade pela composição do grafite ser fundamentalmente à base de carbono, e, portanto, compatível com os tecidos biológicos, diferentemente da biocompatibilidade questionável das nanopartículas à base de ferritas, magnetitas e cobalto reportadas na literatura; pode ser dispersa em água destilada sob sonicação, mantendo-se estável por mais de 72 horas, essencial para aplicações biomédicas. Por outro lado, outros sistemas necessitam essencialmente da utilização de surfactantes, ácidos fracos ou solventes orgânicos, e, muitas vezes, da união destes para a síntese de nanopartículas ou para uma dispersão estável, que não é interessante quando se pensa em uma aplicação futura em tecidos biológicos. Os bionanocompósitos à base de grafite magnético necessitam de uma concentração ínfima do material que proporciona melhoria significativa das propriedades físicas, biológicas e mecânicas das formas farmacêuticas sintetizadas, respondendo ainda a estímulos da ordem magnética.

Todos os bionanocompósitos desenvolvidos neste trabalho de doutorado mostraram-se estáveis em relação a diversas variáveis exploradas, como o tempo, pH, temperatura, e provou ainda que a liberação do fármaco também pode ser modulada por uma aplicação de um campo magnético externo.

A pesquisa fortaleceu o desenvolvimento de tecnologia que conte com a utilização de materiais de origem biológica, com grande abundância no Brasil, a fim de intensificar a economia local e futuramente não necessitar essencialmente de materiais importados, um dos grandes esforços atuais que contempla a Biotecnologia.

IV-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCÂNTARA, A. C. S.; ARANDA, P.; DARDER, M.; RUIZ-HITZKY, E. *J.Mater. Chem.*, v.20, p.9495-9504, 2010.
2. ALISSON, S. *Journal of Infusion Nursing*, v.30, p.89-95, 2007.
3. AHMED, S. J.; & TAYLOR, H. F. W. *Nature*, v.215, p.622-623, 1967.
4. AKHGARI, A.; FARAHMAND, F.; AFRASIABI GAREKANI, H.; SADEGHI, F.; VANDAMME, T. F. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.28, p.307–314, 2006.
5. ALEXIOUL, A. P. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.225, p.187-193, 2001.
6. AMBROGI, V.; FARDELLA, G.; GRANDOLINI, G.; NOCHETTI, M.; PERIOLIO, L. *J. Pharm. Sci.*, v.93, p.1407-1418, 2003.
7. AMBROGI, V.; PERIOLI, L.; RICCI, M.; PULCINI, L.; NOCCHETTI, M.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C. *Microporous and Mesoporous Materials*, v.115, p.405-415, 2008.
8. AMINOFF, D. *J. Biochem.*, v.81, p.384-392, 1961.
9. ANGELOVA, N. & HUNKELER, D. *Elsevier Science*, v.17, p.409-421, 1999.
10. ARANDA, P.; ALCÂNTARA, A. C. S.; RIBEIRO, L. N. M.; DARDER, M.; RUIZ-HITZKY, E. *SPIE Proceedings*, v.8548, p.85486D-85486D-8, 2012.
11. AZEVEDO, V. V. C. ; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F.M. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2, p.27-34, 2007.
12. AZEVEDO, M. M. M. *Nanoesferas e a Liberação controlada de fármacos. Monografia*, <http://lqes.iqm.unicamp.br>. Acessado em 15/11/2012.
13. BABU, V. R.; RAO, K. S. V. K.; SAIRAM, M.; NAIDU, B. V. K.; HOSAMANI, K. M.; AMINABHAVI, T. M. *J. Appl. Polym.*, v.99, p.2671-2678, 1999.

14. BABU, V. R.; RAO, K. S. V. K.; SAIRAM, M.; NAIDU, B. V. K.; HOSAMANI, K. M.; AMINABHAVI, T.M. *J. Appl. Polym. Sci.*, v.99, p.2671-2678, 2006.
15. BALLARIN, B.; GAZZANO, M.; SEEBER, R.; TONELLI, D.; VACCARI, A. *J. Eletroanal.Chem.*, v.445, p.27-37, 1998.
16. BECHGARD, H.; NIELSON, G. H. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v.4, p.53, 1978.
17. BEMILLER, J. N. in *Na Introduction to Pectins: Structure and Properties*, v.310, ch.1, p.2-12, 1986.
18. BOWERS, J. *Food Theory and Applications, 2nd Edition. New York: Macmillan Publishing Company*, 1992.
19. BUDDY, B. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2004.
20. BRULÉ, S.; LEVY, M.; WILHLEM, C.; LETOURNEUR, D.; GAZEAU, F.; MÉNAGER, C.; LE VISAGE, C. *Advanced Materials*, v.23, p.787-790, 2011.
21. BURGOS-ASPERILLA, L.; DARDER, M.; ARANDA, P.; VÁZQUEZ, L.; VÁZQUEZ, M.; RUIZ-HITZKY, E. *J.Mater.Chem.*, v.17, p.4233-4238, 2007.
22. BUSHAN, B. *Springer Handbook of Nanotechnology*, 2004.
23. CAMPBELL, A .M.; PENFIELD, M. P.; GRISWOLD, R. M. *The Experimental Study of Food. 2 nd Edition. Boston: Houghton Mifflin Company*, 1979.
24. CANEVAROLO, S. V. *Ciências dos Polímeros- um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, 2ed, p.21-29, 2006.
25. CARDOSO, L. P.; CELIS, R.; J. CORNEJO, VALIM, J. B. *J.Agric. Food Chem.*, v.54, p.5968-75, 2006.
26. CARJA, G.; CHIRIAC, H.; LUPU, N. *J. of Magnetism and Magnetic Materials*, v.311, p.26-30, 2007.
27. CAVANI, F.; TRIFIRO, F.; VACCARI, A. *Catal. Today*, v.11, p.173-301, 1991.
28. CAVANI, F.; TRIFIRO, F.; VACCARI, A. *Langmuir*, v.12, p.189, 1996.

29. CHAVANPATIL, M. D.; JAIN, P.; CHAUDHARI, S.; SHEAR, R.; VAVIA, P. *R. Int.J.Pharm.*, v.316, p.86-92, 2006.
30. CHEN, X.; LIU, C.; MENG, X.; LEE, C.; PARK, H. *Biochem. Eng. J.*, v.27, p.269-274, 2005.
31. CHRISTENSEN, S. H. *Food Hydrocolloids*, v.3, p.205-232, 1984.
32. CHOY, J. H.; KWAK, S.Y.; JEONG, Y. J.; PARK, J. S. *Angew.Chem.Int.*, v.39, p.4042, 2000.
33. CHOY, J. H.; JUNG, J. S.; OH, J. M.; PARK, J. S.; JEONG, Y. J.; KANG, Y. K.; HAN, O. J. *Biomaterials*, v.25, p.3059-3064, 2004.
34. CHOY, J. H.; PARK, T.; KIM, S. T.; SOM, Y. H. *Pharmaceutical composition for the treatment of câncer comprising LMH-RA complex*, WO 20006091009, 2006.
35. CHOY, J. H.; CHOI, S. J.; OH, J. M.; APRK, J. S. *Appl.Clay Sci.*, v.36, p.122-132, 2007.
36. CHUNG, H. J.; GO, D. H.; BAE, J. W.; JUNG, I. K.; LEE, J. W.; PANK, K. D. *Curr. Appl. Phys.*, v.5, p.485-488, 2005.
37. COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; PEPPAS, N. A. *J. Control. Release*, v.39, p.231-237, 1996.
38. CONSTANTINO, U.; AMBROGI, V.; NOCHETTI, M.; PERIOLI, L. *Microporous and Mesoporous Materials*, v.107, p.149-60, 2008.
39. CONSTANTINO, V.R.L.; PINNAVIA, T.J. *Inor. Chem.*, v.4, p.883-892, 1995.
40. CORTÉS, M. G. R.; DÍAZ, B. M. V. *Revista Ingeniería y Investigación*, v.28, p.57-71, 2008.
41. COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. J. *Controlled Release*, v.119, p.5-24, 2007.
42. CRISTENSEN, S. H. *Food Hydrocolloids*, v.3, p.205-230, 1986.
43. CUNLIFFE, D.; KIRBY, A.; ALEXANDER, C. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v.57, p.1836-53, 2005.

44. DARDER, M.; LOPEZ-BLANCO, M.; ARANDA, P.; LEROUX, F.; RUIZ-HITZKY, E. *Chem Mater.*, v.8, p.1969-1977, 2005.
45. DARDER, M.; ARANDA, P.; RUIZ-HITZKY, E. *Adv. Mater.*, v.19, p.1309-1319, 2007.
46. DAS, N. G. & DAS, S. K. *Pharm. Technol.*, v.27, p.10-16, 2003.
47. DHANESHWAR, S. S.; GAIROLA, N.; KANDPAL, M.; BATT, L.; VADNERKARA, G.; KADAM, S. S. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, v.17, p.1897-1902, 2007.
48. DEL HOYO, C. *Appl. Clay Sci.*, v.36, p.102-121, 2007.
49. DONG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. *Journal of Membrane Science*, v.280, p.37-44, 2006.
50. DURÁN, N. & AZEVEDO, M. M. *Nanociência & Nanotecnologia*. Disponível em: <http://www.comciencia.br>. Acesso em 1/12/2012.
51. EHRLICH, P. *Collected Studies on Immunology*, John Wiley & Sons, Londres, 1906.
52. FEITOSA, J. P. A. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.2278-86, 2009.
53. FEITKNECHT, H. *Elv. Chim Acta.*, v.25, p.555-560, 1942.
54. FEREZ-VILAR, J.; HILL, R. L. *J Biol Chem*, v.274, p.31751-31754, 1999.
55. FIEBRIG, I.; HARDING, S. E.; ROWE, A. J.; HYMAN, S. C.; DAVIS, S. S. *Carbohydr. Polym.*, v.28, p.239-244, 1995.
56. FORANO, C.; PREVOT, V. *Bio-Inorganic Hybrid Materials*, Cap15, 2007.
57. GARCÍA, J. *Nuevos sistemas orales de liberación modificada.*, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Complutense de Madrid, 2002.
58. GARCÍA, E. I. G.; ALEGRE, M. E. G.; SANCHEZ, M. A. C.; SUAREZ, A. I. T. *Proceedings os the VI Congreso SEFIG and 3 ° Jornadas TF.*, p.161-164, 2003.
59. GENTA, I.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F.; MODENA, T.; CONTI, B.; MUZZARELLI, R.A. *EXS*, v.87, p.305-313, 1999.

60. GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. *J. Control Release*, v.114, p.1, 2006.
61. GHEBRE-SELLASSIE, A. in: *Multiparticulate Oral Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York, 1994.
62. GIANI, G.; FEDI, S.; BARBUCCI, R. *Polymers*, v.4, p.1157-1169, 2012.
63. GOOSEN, M. E. A. *Technomic Publishing Company*, Lancaster, 1996.
64. GORDIJO, C. R.; BARBOSA, C. A. S.; FERREIRA, A. M. C.; CONSTANTINO, V. R. L.; SILVA, D. O. *J.Pharm.Sci.*, v.94, p.1135-1148, 2005.
65. GRIFFIN, R. A. *Ground Water*, v.29, p.671-77, 1991.
66. GRIFFITH, L. G. *Acta Materialia*, v.48, p.263-277, 2000.
67. GUEDES, M. H. A.; GUEDES, M. E. A.; MORAIS, P. C.; SILVA, M. S.; SANTOS, T. S.; ALVES, J. P.; BERTELLI, C. E.; AZEVEDO, R. B.; LACAVAL, Z. G. M. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.276, p.2406-2407, 2004.
68. GUNAWAN, P.; XU, R. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.10, p.4367-4377, 2007.
69. HE, P.; DAVIS, S. S; ILLUM, L. *Int. J. Pharm.*, v.66, p.75-68, 1998.
70. HELMUS, M. N. & TWEDEN, K. *Materials Selection*, In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A*, v.1, p.27-59, 1995.
71. HUSSEIN, M. Z.; ZAINAL, Z.; YAHAYA, A. H.; FOO, D. W. V. *J.Control.Release*, v.82, p.417-427, 2002.
72. KAKATO, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.64, p.37-48, 2012.
73. KATONIS, G.; TRIKERIOTIS, M.; GHANOTAKIS, D. F. *J.Photochem.Photobiol.A.*, v.185, p.62-66, 2007.
74. KAUR, I. & KAUR, G. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v.20, p.21-27, 2012.
75. KAWAGUCHI, M.; FUKUSHIMA, T.; HAYAKAWA, T.; NAKASHIMA, N.; INOUE, Y.; TAKEDA, S.; OKAMURA, K.; TANIGUCHI, K. *Dental Materials Journal*, v.25, p.719–725, 2006.

76. KWAK, S.Y.; JEONG, Y.J.; PARK, J.S.; CHOY, J.H. *Solid State Ionic*, v.151, p.229-234, 2002.
77. KIELLAND, J. *J. Am. Chem. Soc.*, v.59, p.1675-78, 1937.
78. KIM, C. J. & LEE, P. I. *Release Bioact. Mater.*, v.17, p.118–119, 1990.
79. KIM, T. H.; PARK, Y. H.; KIM, K. J.; CHO, C. S. *International Journal of Pharmaceutics*, v.250, p.371-83, 2003.
80. LANGER, R. & PEPPAS, N. A. *Aiche Journal*, v.49, p.2990-3006, 2003.
81. LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. *Biomacromolecules*, v.8, p.2533-2541, 2007.
82. LEHR, C. M.; BOUWSTRA, J. A.; SCHACHT, E. H.; JUNGINGER, H. E. *Int. J. Pharm.*, v.78, p.43-48, 1992.
83. LEROUX, F. & TAVIOT-GUEHO, C. *J. Mater. Chem.*, v.15, p.3628-3642, 2005.
84. LI, B.; HE, J.; EVANS, D. G.; DUAN, X. *Int.J.Pharm.*, v.287, p.89-95, 2004.
85. LIU, L. S.; KOST, J. *Interpharm Press*, p.203-240, 2000.
86. LIU, L. S.; FISHMAN, M. L.; KOST, J.; HICKS, K. B. *Biomaterials*, v.24, p.3333-3343, 2003.
87. LIU, H.; WANG, C.; GAO, Q.; CHEN, J.; REN, B.; LIU, X.; TONG, Z. *Int.J.Pharm.*, v.376, p.92-98, 2009.
88. LOPEZ, T. *J. Cont. Release*, v.95, p.501, 2004.
89. LÜBE, A. S.; ALEXIOU, C.; BERGEMANN, C. *Journal of Cirurgical Reserach*, v.95, p.200-206, 2001.
90. LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. S.; ROLIM-NETO, P. J. *Lat. Am.J.Pharm*, v.26, p.784-93, 2007.
91. MANDAOGADE, P. M.; SATTURWAR, P. M.; FULZELE, S. V.; GOGTE, B. B.; DORLE, A. K. *Reactive & Functional Polymers*, v.50, p.233–242, 2002.

92. MANTLE, M. & ALLEN, A. *Biochem.Soc.Trans.*, v.6, p.607-609, 1978.
93. MATHUR, N. K. & NARANG, C. K. *J. Chem.Educ.*, v.67, p.938, 1990.
94. MEHUYS, E.; REMON, J. P.; KORST, A.; BORTEL, L. V.; MOLLS, R.; AUGUSTINS, A.; PORTER, C.; VERVAET, C. *J. Control. Release*, v.107, p.523-36, 2005.
95. MOHARANA, A. K.; BANERJEE, M.; PANDA, S.; MUDULI, J. N. *Int J Pharm Pharm Sci*, v.3, p.19-21, 2011.
96. MAWHINNEY, D.; NAUMENKO, V.; KUZNETSOVA, A.; YATES, J.; LIU, J.; SMALLEY, R. E. *J. Am. Chem. Soc.*, v.122, p.2383 –2384, 2005.
97. MISHRA, D. N. *DARU*, v.16, p.1-8, 2008.
98. MOMBRÚ, A. W.; PARDO, H.; FACCIO, R.; LIMA, O. F.; LANFREDI, A. J. C.; CARDOSO, C. A.; LEITE, E.R.; ZANELATTO, G.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M. *Phys. Rev.*, v.10, p.404, 2005.
99. MURA, C.; MANCONI, M.; VALENTI, D.; MANCA, M. L.; DÍEZ-SALES, O.; LOY, G.; FADDA, A. M. *Carbohydrate Polymers*, v.85, p.578-583, 2011.
100. MUZZARELLI, R.; BALDASSARE, V.; CONTI, F.; FERRARA, P.; BIAGINI, G.; GAZZANELLI, G.; VASI, V. *Biomaterials*, v.9, p.247-252, 1988.
101. MUZZARELLI, R. A. A. *Cell.Mol.Life Sci.*, v.53, p.131-140, 1997.
102. MYATA, S. *Clays Clay Miner.*, v.28, p.50-55, 1980.
103. NAKAMAYA, H.; WADA, N.; TSUHAKO, M. *Int.J.Oharm.*, v.269, p.469-478, 2004.
104. NWE, N.; CHANDRKRACHANG, W.; STEVENS, W.; MAW, T.; TAN, T.; KHOR, E.; WONH, S. *Carbohydr. Polym.*, v.49, p.235-237, 2002.
105. O'HARE, D. M. *Drug delivery system comprising a drug intercalated between a layered double hydroxide*, WO 0247729, 2002.
106. O'HARE, D. M. *Drug delivery system*, US Pat. 20040052849, 2004.
107. PARDO, H.; MOMBRÚ, A. W.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M. INPI003025, 2004.

108. PARDO, H.; FACCIIO, R.; MOMBRÚ, A. W.; LIMA, O. F.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M. *Carbon*, p.565-569, 2006.
109. PIYAKULAWAT, P.; PRAPHAIRAKSIT, N.; CHANTARASIRI, N.; MUANGSIN, N. *AAPS PharmSciTech.*, v.4, p.E1-E11, 2007.
110. PONGJANYAKUL, T.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. *Int. J. Pharm.*, , v.3331, p.61-71, 2007.
111. POUTON, C. W. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.25, p.47-58, 1997.
112. POWELL, D. A.; MORRIS E. R.; MGIDLEY, M. J.; REES, D. A. *J Mol Biol*, v.155, p.517-531, 1982.
113. RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K. W. *Compos.Sci.Technol.*, v.61, p.1189-1224, 2001.
114. RASHIDOVA, S.S.; MILUSHEVA, R.Y.; SEMENOVA, L. N.; MUKHAMEDJANOVA, M. Y.; VOROPAEVA, N. L.; VASILYEVA, S.; RUBAN, I. N. *Chromatographia*, v.59, p.779-782, 2004.
115. REGE, S. U. & YANG, R. T. *Chem. Eng. Sci.*, v.56, p.3781-3796, 2000.
116. REMUÑAN-LÓPEZ, C. & BODMEIER, R. *J. Control. Release*, v.44, p.2215-2225, 1997.
117. REGO, M. G. B.; LIGÓRIO, S. F.; CARDILHO, J. A.; SIQUEIRA, R. C.; JORGE, R.; CUNHA, A. S. J. *Arq. Bras. Oftamol.*, v.66, p.891-6, 2003.
118. RHAZI, M.; DESBRIÉRES, J.; TOLAMAITE, A.; ALAGUI, A.; VOTTERO, P. *Polym. Int.*, v.49, p.337-344, 2000.
119. RINAUDO, M. & DOMARD, A. *London and NewYork: Elsevier*, p.71–86, 1989.
120. RINAUDO, M. *Elsevier Sciences*, p.21-35, 1996.
121. RIVES, V. & ULIBARRI, M. A. *Coor.Chem.Rev.*, v.181, p.61-120, 1999.
122. ROBERTS, G. A. F. *The Macmillan Press*, v.110, p.274-315, 1992.

123. ROY, W. R.; SEYLER, B.; STEELE, J. D.; MRAVICK, S. C.; MOORE, D. M.; KRAPAC, I. G.; PEDEN, J. M.; GRIFFIN, R. A. *Ground Water*, v.29, p.671-677, 1991.
124. RUIZ-HITZKY, E. *Functional Hybrid Materials*, Cap.2, Weinheim, 2004.
125. RUIZ-HITZKY, E.; ARANDA, P.; SERRATOSA, J. M. *Handbook of Layered Materials*, Auerbach. 2004.
126. RUIZ-HITZKY, R.; DARDER, M.; ARANDA, P. *J.Mater.Chem.*, v.15, p.3650-3662, 2005.
127. RUIZ-HITZKY, R. & DARDER, M.; *Trends in Bio-Hybrid Nanostructured Materials*, Special Issue in *Curr. Nanosci.*, v.2, p.153-294, 2006.
128. RUIZ-HITZKY, R.; DARDER, M.; ARANDA, P. *Bio-Inorganic Hybrid Materials*, Weinheim, 2007.
129. RUIZ-HITZKY, R.; DARDER, M.; ARANDA, P. *Bionanocomposites, The Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2008.
130. SABRA, W.; ZENG, A.; DECKWER, W. D. *Microbiol. Biotechnol.*, v.56, p.315, 2001.
131. SÁEZ, V.; HERNÁEZ E.; ANGULO, L.S.; KATIME, I. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.4, p.111-122, 2003.
132. SANDENBERG, A. S.; ANDERINNE, R.; ANDERSON, G. H.; HALLGREN, B.; HULTEN, L. *Hum Nutr Clin Nutr*, v.37, p.171-173, 1983.
133. SASHIWA, H. & AIBA, S. *Prog.Polym.Sci.*, v.29, p.887-908, 2004.
134. SELS, B. F.; DE VOS, D. E.; JACOBS, P. A. *Cat. Ver.*, v.43, p.443-448, 2001.
135. SCHELLEKENSA, R. C. A.; STUURMANB, F. E.; VAN DER WEERT, F. H.J; KOSTERINKA, J. G.W.; FRIJLINK, W. H. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.30, p.15-20, 2007.

136. SHAHIDI, F.; ARACHINI, J. K. V.; JEON, Y. J. *Trends Food Sci. Technol.* v.10, p.37-51, 1999.
137. SHARMA, R. & AHUJA, M. *Carbohydrate Polymers*, v.85, p.658-663, 2011.
138. SHENGTAO, Z.; ANYAN, G.; HUANFANG, G.; XIANGQIAN, C. *Int.J.Ind.Chem.*, v.2, p.123-130, 2011.
139. SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. *Glycoconj. J.*, v.14, p.535-542, 1997.
140. SHU, X. Z. & ZHU, K. J. *International Journal of Pharmaceutics*, v.201, p.51-58, 2000.
141. SINHA, V. R. & KUMRIA, R. *Int.J.Pharm.*, v.224, p.19-38, 2001.
142. SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C. J. *Biomaterials*, v.25, p.795-801, 2004.
143. SOARES, J. P.; CHIERICE, G. O.; CAVALHEIRO, E. T. G. *Eclética Química*, v.29, p.53-56, 2004.
144. SOUZA, J. R. R.; CARVALHO, J. I. X.; TREVISAN, M. T. S.; PAULA, R. C. M.; RICARDO, N. M. P. S.; FEITOSA, J. P. A. *Food Hydrocolloids*, v.23, p.2278-2286, 2009.
145. SUN, H.; CAO, L.; LUN, L. *Nano Res.*, v.4, p.550-562, 2011.
146. TALAEI, F.; AZHDARZADEH, M.; HASHEMI, H. N.; MOOSAVI, M.; FOROUMADI, A.; DINARVAND, R.; ZHANG, H.; ZOU, K.; SUN, H.; DUAN, X. *J. Solid State Chem.*, v.178, p.3485-3493, 2005.
147. THACHARODI, D & RAO, K. P. *Biomaterials*, v.17, p.1307-11, 1996.
148. TRAVLOU, N. E.; KYAZ, G. Z.; LAZARIDIS, N. K.; DELIYANNI, E. *A. Chemical Engineering*, 2012, accepted manuscript.
149. TURQUOIS, T.; RINAUDO, M.; TARAVEL, F. R.; HEYRAUD, A. *Food Hydrocolloids*, v.13, p.255-262, 1999.
150. TYNER, M. K.; SCHIFFMAN, R. S.; GIANNELIS, P. E. *Catal. Today*, v.11, p.173, 1991.

151. TYNER, M. K.; SCHIFFMAN, R. S.; GIANNELIS, E. O. *J.Control.Release*, v.95, p.501-514, 2004.
152. VACCARI, I. *Catal. Today*, v.41, p.53-71, 1998.
153. VANDAMME, T. F.; LENOURRY, A.; CHARRUEAU, C.; CHAUMEIL, J. C. *Carbohydrate Polymers*, v.48, p.219-231, 2002.
154. VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. *Int. J. of Pharm.*, v.255, p.13-32, 2003.
155. VAUQUELIM, M. *Ann Chim*, v.5, p.92, 1790.
156. VELU, S.; SUZUKI, K.; OKAKI, T.; TOMURA, S.; OHASHI, F. *Chem. Mater.*, v.11, p.2163-2172, 1999.
157. VENDRUSCOLO, C. W., ANDREAZZ, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, M. B. *Int.J.Pharm.*, v.296, p.1-11, 2005.
158. XU, Y.; ZAN, C.; FAN, L.; WANG, L.; ZHENG, H. *Int.J.Pharm.*, v.336, p.329-337, 2007.
159. JWANG, J.; LIU, Q.; ZHANG, G.; LI, Z.; YANG, P.; JING, X.; ZHANG, M.; LIU, T.; JIANG, Z. *Solid State Science*, v.11, p.1597-1601, 2009.
160. WICSENBORN, D. P.; WANG, J.; CHANG, K. C.; SCHWARZ, J. G. *Industrial crops and Products*, v.19, p.171-181, 1999.
161. WU, F.; TSENG, R.; JUANG, R. J. *J.Hazard.Mater.*, v.81, p.167-177, 2001.
162. WUOLIJOKI, E.; HIRVELÄ, T.; YLITALO, P. *Methods Find. Exp.Clin.Pharmacol.*, v.10, p.37-51, 1999.
163. YALPANI, M. *Elsevier Science Publishers*, p.34-35, 1988.
164. YAO, K. D.; PENG, T.; FENG, H. B.; HE, Y. Y. *J. Polym. Chem.*, v.32, p.1213-1223, 1994.
165. YILDIRIM, E. D.; NAIR, K.; SUN, W. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, p.406-414, 2008.
166. YOKOI, H.; OBITA, T.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. *Bioresource Technology*, v.84, p.287-290, 2002.

167. YU, C.; YIN, B.; ZHANG, W.; CHENG, S.; ZHANG, X.; ZHUO, R. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.68, p. 245-49, 2009.
168. YUN, S. K. & PINNAVAIA, T. J. *Inorg. Chem.*, v.35, p.6853, 1996.
169. ZHANG, H.; ZOU, K.; SUN, H.; DUAN, X. *Journal of Solid State Chemistry*, v.178, p.3485-3493, 2005.
170. ZHANG, H.; PAN, D.; ZOU, K.; HE, J.; DUAN, X. *J. Mat. Chem.*, v.19, p.3069-3077, 2009.
171. ZHANG, X.; MENG, L.; LU, Q.; FEI, Z.; DYSON, P. J. *Biomaterials*, v.30, p.6041-6047, 2009.
172. ZHAO, H. Y.; ZHENG, W.; MENG, Z. X.; ZHOU, H. M.; XU, X. X.; LI, Z.; ZHENG, Y. F. *Biosensors and Bioelectronics*, v.24, p.2352-2357, 2009.
173. ZAMBITO, Y. & DI COLO, G. *J Pharm Pharmaceut Sci.*, v.2, p.274-281, 2003.