

Preparação e caracterização de micro/nanopartículas de quitosano para libertação de cisplatina

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Processos Químicos e Biológicos

Autor

Salomé Portelas Martins

Orientador

Doutor Belmiro Pereira Mota Duarte

Mestre Maria José Capelas de Moura

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Coimbra, Dezembro, 2013

*“Aprende com o passado,
Vive o presente,
Tem esperança no futuro.
O importante é nunca parar de questionar.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus orientadores no Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, Doutor Belmiro Pereira Mota Duarte e Engenheira Maria José Capelas de Moura, por se terem disponibilizado para me orientar nesta tese, e por me terem ajudado a superar as dificuldades que foram surgindo no decorrer do trabalho, quer laboratorial, quer de pesquisa.

À Doutora Ana Cristina Araújo Veloso, por me ter permitido utilizar o Laboratório de Tecnologias Biológicas para a realização do trabalho experimental.

Ainda ao Doutor António Luís Pereira do Amaral, por me ter permitido utilizar o gabinete de recolha de imagem, e por me ter encaminhado e ajudado na recolha e análise de imagem, sem a qual este trabalho não poderia ter sido efectuado.

Aos meus colegas, agradeço a disponibilidade para ajudar, dar opiniões, tomar os cafezinhos que nos ajudam a ficar acordados, ou simplesmente rodar o parafuso do microscópio sempre que necessitei de companhia e apoio.

Finalmente, agradeço à família, mãe, Joana, Miguel e pai, todo o entusiasmo e os “Vá, agora é só acabar isso!”, que me deram força para acabar esta etapa, se eventualmente me faltava o ânimo para continuar.

RESUMO

Nos últimos anos, a crescente necessidade de desenvolvimento de novos e inovadores sistemas para a libertação de fármacos, tem levado a comunidade científica à pesquisa de novos materiais, maioritariamente de origem polimérica. O aparecimento destes materiais abre novas possibilidades aos campos de investigação da medicina e farmacologia, uma vez que os polímeros podem ser facilmente modificados (por reticulação física ou química) e processados nas mais diversas formas.

Entre os novos materiais estudados encontra-se o quitosano, um polímero de origem natural extraído das carapaças de animais marinhos. O quitosano tem sido exaustivamente investigado devido a um conjunto de características, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade.

O objectivo do presente trabalho consiste na preparação de microsferas de quitosano pelo método de emulsão água-em-óleo, seguido de reticulação, para utilização como sistemas de libertação de fármacos. Após análise da literatura disponível, verifica-se que existe um hiato de informação sobre o impacto das condições iniciais da preparação de microsferas nas suas características de tamanho e forma, pelo que se considerou importante colmatar a presente falta com este estudo, uma vez que o conhecimento da morfologia das microsferas preparadas é fulcral para estudos de difusão.

Em estudos de libertação de fármacos, o quitosano geralmente apresenta elevadas taxas de difusão e biodegradação, juntamente com reduzidas propriedades mecânicas. Na tentativa de melhorar estas propriedades, as microsferas de quitosano são reticuladas quimicamente com genipin, um reticulante de origem natural.

Para o estudo do impacto das variáveis de entrada no tamanho e na morfologia das microsferas, variou-se a concentração de quitosano, a concentração de genipin e a velocidade de agitação da emulsão água-em-óleo, pois na informação existente na literatura está patente que estas são as variáveis mais relevantes.

Depois de obtidas as microsferas, foram recolhidas imagens com uma câmara de alta resolução acoplada a um microscópio óptico, sendo que a dimensão e a morfologia destas foi analisada por análise de imagem, com recurso ao *software* de imagem ImageJ®. Foram medidos os parâmetros de tamanho, designadamente o diâmetro equivalente, o perímetro e os diâmetros de Feret (máximo e mínimo), e os parâmetros de forma: a circularidade e o factor de forma (AR).

Os resultados obtidos mostram que o diâmetro equivalente das microsferas de quitosano reticuladas com genipin (bem como todas as restantes propriedades de tamanho) diminui com a diminuição quer da concentração de polímero quer da concentração de reticulante. O aumento da velocidade de agitação da emulsão também se reflecte numa diminuição da dimensão das microsferas.

As variáveis de entrada não aparentam ter qualquer tipo de impacto sobre as características de forma, embora os resultados indiquem que as microsferas mais pequenas, de menor diâmetro equivalente são as que, aparentemente, apresentam maior esfericidade. Estes resultados, de natureza qualitativa, foram consolidados por recurso a Análise de Variância (ANOVA).

Palavras-chave: Quitosano, genipin, reticulação, microsferas, análise de imagem.

ABSTRACT

In recent years, the growing need for the development of new and innovative systems for drug delivery, has led the scientific community into a search for new materials, mostly of polymer origin. These materials open up new possibilities for research in the fields of medicine and pharmacology, since the polymers can easily be modified (by physical or chemical cross-linking) and processed in various ways.

Among the new materials studied is chitosan, a polymer of natural origin, extracted from the shells of marine animals. Chitosan has been thoroughly investigated due to a number of features such as biocompatibility, biodegradability and lack of toxicity.

The objective of this work, consists in preparing chitosan microspheres using the water-in-oil method, followed by cross-linking, for use as drug delivery systems. In the available literature, there is a lack of information on the impact of the initial conditions of the microsphere preparation in their size and shape characteristics, therefore, it was considered important to fill the gap of knowledge with this study, since the morphology of the microspheres is central to diffusion studies.

In drug release studies, chitosan usually presents high diffusion rates and biodegradation, along with reduced mechanical properties. In an attempt to improve these properties, the chitosan microspheres are chemically cross-linked with genipin, a naturally occurring cross-linking agent.

To study the impact of the input variables in the size and morphology of the microspheres the concentration of chitosan, concentration of genipin and the stirring speed of the water-in-oil emulsion were varied, for in the existing data in the literature it is clear that these are the most relevant variables.

After the microspheres were obtained, images were collected with a high resolution camera coupled to an optical microscope, and the size and morphology of these was analyzed by image analysis, using the ImageJ® image software. Size parameters were measured, including the equivalent diameter, perimeter and Feret diameters (maximum and minimum), as the shape parameters: circularity and shape factor (AR).

The results show that the equivalent diameter of the genipin cross-linked chitosan microspheres (as well as all other properties in size) decreases with the decreasing of the polymer concentration and the concentration of the cross-linking agent. Increasing the stirring rate of the emulsion is also reflected in a reduction in the size of the microspheres.

The input variables do not appear to have any impact on the shape characteristics, although the results suggest that the smaller microspheres, with smaller diameter are those that apparently have a higher sphericity. These results, of qualitative nature, were consolidated via ANOVA.

Key-words: Chitosan, genipin, crosslinking, microspheres, image analysis.

Índice

1.	INTRODUÇÃO.....	3
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1.	Sistemas de libertação controlada de fármacos.....	7
2.2.	Uso de microesferas como veículos de libertação de fármacos.....	10
2.3.	Polímeros usados como veículos de libertação de fármacos.....	11
2.3.1.	O quitosano.....	12
2.4.	Modificação do quitosano por reticulação química.....	14
2.5.	Métodos de preparação de microesferas.....	17
2.5.1.	Emulsão água-em-óleo (<i>water-in-oil</i> (W/O)).....	17
2.5.2.	Emulsão múltipla.....	19
2.5.3.	Coacervação/Precipitação.....	20
2.5.4.	<i>Spray-drying</i>	21
2.5.5.	Gelificação iónica.....	22
2.5.6.	Peneiração.....	23
2.6.	Métodos analíticos para caracterização de partículas.....	23
2.6.1.	Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR)....	24
2.6.2.	Análise de imagem.....	24
2.6.3.	Análise estatística.....	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.	Materiais.....	31
3.1.1.	Preparação de microesferas de quitosano reticuladas com genipin.....	31
3.2.	Espectroscopia de FTIR.....	34
3.2.1.	Condições experimentais.....	34
3.3.	Análise de imagem.....	34
4.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	41
4.1.	Plano de ensaios para a preparação de microesferas.....	41
4.2.	Caracterização do mecanismo de reticulação por espectroscopia de FTIR.....	42
4.3.	Análise das distribuições das variáveis de tamanho e forma.....	43
4.3.1.	Impacto no diâmetro equivalente.....	44
4.3.2.	Impacto no perímetro.....	46

4.3.3. Impacto nos diâmetros máximo e mínimo de Feret.....	47
4.3.4. Impacto na circularidade	48
.....	49
4.3.5. Impacto no factor de forma AR.....	50
4.4. Efeito dos factores nos momentos das distribuições das propriedades	50
4.5. Análise estatística	52
4.5.1. ANOVA	53
5. CONCLUSÕES.....	59
5.1. Sugestões de trabalho futuro	60
6. BIBLIOGRAFIA.....	63

Índice de Figuras

Figura 2-1: Comparação dos perfis de libertação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de libertação convencional por dose única (—) e várias doses (- - - -) e de um sistema de libertação controlada (— —) (adaptado de (Dash & Cudworth, 1998))	9
Figura 2-2: Estrutura molecular da quitina (adaptado de (Rinaudo, 2007))	13
Figura 2-3: Estrutura molecular do quitosano (adaptado de (Rinaudo, 2007))	14
Figura 2-4: Estrutura química do genipin	15
Figura 2-5: Flor a) e fruto b) da planta <i>Gardenia jasminoides Ellis</i>	15
Figura 2-6: Etapas a) e b) de reticulação entre o quitosano e o genipin (adaptado de (Butler, Pudney, & Ng, 2003))	16
Figura 2-7: Mecanismo de reticulação entre o quitosano e o genipin	17
Figura 2-8: Representação esquemática do processo base de emulsão	18
Figura 2-9: Representação esquemática do processo base de emulsão múltipla	19
Figura 2-10: Representação esquemática do método de produção de microsferas por precipitação/coacervação	20
Figura 2-11: Representação esquemática do método de produção de microsferas por <i>spray-drying</i>	21
Figura 2-12: Representação esquemática do método de preparação de microsferas por gelificação aniónica	22
Figura 2-13: Representação esquemática do método de produção de microsferas por peneiração	23
Figura 3-1: Representação esquemática do método utilizado para a preparação de microsferas	32
Figura 3-2: Exemplo de microsferas obtidas pelo método de emulsão água-em-óleo utilizado	33
Figura 3-3: Exemplo de microsferas “partidas” devido à agitação da emulsão durante a preparação	33
Figura 3-4: Sequência de imagens correspondentes a cada operação utilizada na caracterização das microsferas por análise de imagem. a) imagem adquirida ao microscópio óptico, b) imagem melhorada através do aumento de contraste objecto/meio, c) imagem binarizada, d) imagem obtida após o preenchimento do interior das microsferas, e) imagem obtida após a remoção dos objectos residuais “indesejáveis”, f) imagem obtida após a separação das microsferas juntas, g) imagem das microsferas contabilizadas, exibindo os pixel/fronteira	36
Figura 4-1: Exemplo de microsferas de quitosano reticuladas com genipin, obtidas pelo método de emulsão água-em-óleo	42
Figura 4-2: Espectros de FTIR: (A) do quitosano e (B) das microsferas de quitosano reticuladas com genipin	43
Figura 4-3: Curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) para o diâmetro equivalente de microsferas de quitosano reticuladas com genipin: a1 e a2 – efeito da concentração de quitosano (1 e 2 %); b1 e b2 – efeito da concentração de genipin (1 e 6 %); c1 e c2 – efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm)	45
Figura 4-4: Curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) para o perímetro de microsferas de quitosano reticuladas com genipin: a1 e a2 – efeito da concentração de quitosano (1 e 2 %); b1 e b2 – efeito da concentração de genipin (1 e 6 %); c1 e c2 – efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm)	47
Figura 4-5: Curvas de distribuição de frequência típicas para os diâmetros de Feret (máximo e mínimo) de microsferas obtidas para uma concentração de quitosano de 2% e de genipin de 1%, para duas velocidades de agitação: a1 – 400 rpm e a2 – 800 rpm	48

Figura 4-6: Curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) para a circularidade de microsferas de quitosano reticuladas com genipin: a1 e a2 – efeito da concentração de quitosano (1 e 2 %); b1 e b2 – efeito da concentração de genipin (1 e 6 %); c1 e c2 – efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm)..	49
Figura 4-7: Curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) para o factor de forma (AR) de microsferas de quitosano reticuladas com genipin: efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm) para formulações obtidas a partir de a1 – 1% de quitosano e 1% de genipin e a2 – 2% de quitosano e 6% de genipin.	50
Figura 4-8: Representação esquemática do modelo conceptual do sistema.	53
Figura 4-9: Representação da decomposição do teste de hipóteses para os factores e parametros a) concentração de quitosano e diâmetro equivalente, b) velocidade de agitação e perímetro, c) Velocidade de agitação e diâmetro mínimo de Feret, e d) Concentração de quitosano e Factor de forma AR.	54

Índice de Tabelas

Tabela 4.1: Plano de experiências levado a cabo para análise da influência dos factores: concentração de quitosano, concentração de genipin e velocidade de agitação, no tamanho e na forma das microsferas...	42
Tabela 4.2: Tabela indicativa da terminologia utilizada para a apresentação das distribuições das microsferas preparadas.	44
Tabela 4.3: Factores variados e respectivos valores médios das propriedades avaliadas por análise de imagem para as microsferas de quitosano produzidas pelo método de emulsão água-em-óleo.....	51
Tabela 4.4: Valores p obtidos para os testes de ANOVA.	53
Tabela 4.5: Síntese da variação dos parâmetros face à alteração dos factores.	55

Capítulo 1 - Introdução

1. INTRODUÇÃO

O objectivo deste estudo consiste fundamentalmente no desenvolvimento de um procedimento de preparação de microesferas de quitosano, para uso como agentes de libertação de um fármaco – a cisplatina – em acção terapêutica. A preparação de microesferas de quitosano é levada a cabo através de reacção de reticulação do polímero, usando um agente reticulante de origem natural e biodegradável – o genipin.

A reticulação do quitosano promovida pelo genipin é do tipo químico, pois há a formação de um conjunto de novas ligações covalentes entre as diferentes cadeias do polímero. Estas ligações decorrem do ataque da molécula de genipin aos grupos amina primários do quitosano. A rede tridimensional assim formada tem propriedades físicas e biológicas de elevada importância ao nível da utilização da matriz para fins de transporte de agentes terapêuticos (Ko J. , Park, Hwang, Park, & Lee, 2002). De facto, o quitosano apresenta elevada capacidade de absorção de água, biocompatibilidade, biodegradabilidade, e ausência de toxicidade, bem como propriedades físicas/reológicas que o tornam um candidato de eleição para uso em sistemas de libertação de fármacos. No entanto, estudos levados a cabo demonstram que matrizes de quitosano, quando usadas para libertação de agentes terapêuticos *in situ*, revelam elevadas velocidades de libertação (Dubey & Parikh, 2004). Este aspecto é largamente influenciado pelo tamanho da molécula que constitui o princípio activo. De facto, a proteína BSA (*bovine serum albumin*), uma molécula de grande tamanho, tem velocidades de libertação inferiores à da cisplatina, uma molécula de tamanho reduzido (Das, Jagan, Isiah, Rajesh, Backianathan, & Subhashini, 2011). Com o objectivo de retardar e prolongar a libertação do princípio activo, vislumbram-se vantagens em usar o fármaco imobilizado em microesferas de quitosano reticulado com genipin e, por sua vez, estas dispersas numa matriz polimérica a ser administrada, por exemplo por via injectável, no local de acção terapêutica. O termo microesfera é aqui entendido como uma partícula compacta constituída por uma rede polimérica na qual a substância activa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular.

Esta estratégia está a ser desenvolvida num trabalho de investigação em curso, sob o tema “Preparação de hidrogéis para administração por via injectável”. Foi neste contexto que se decidiu levar a cabo o presente trabalho em que se pretende que as microesferas aqui preparadas sejam usadas para imobilização de cisplatina, e, posteriormente dispersas numa matriz polimérica termo-sensível, capaz de ser produzida *in situ* (Moura, Figueiredo, & Gil, 2007; Moura, Gil, Faneca, Lima, & Figueiredo, 2011). Além do mais, esta estratégia é da maior relevância para adequar a administração de fármacos vulgarmente usados hoje em dia, através de uma técnica minimamente invasiva.

Apesar dos estudos referidos, os procedimentos para a produção de microesferas de quitosano por reticulação química com genipin e subsequente inclusão de agentes

terapêuticos estão ainda pouco consolidados (Moura, 2012), antevendo-se a possibilidade de os otimizar.

O trabalho aqui reportado enquadra-se na unidade curricular de Estágio/Projecto/Tese do Mestrado em Processos Químicos e Biológicos e visa contribuir para a caracterização e optimização do processo de preparação de microesferas de quitosano. Uma vez que este tema se revelou suficientemente vasto do ponto de vista analítico e do tempo necessário para a realização do trabalho experimental, a parte de inclusão do agente terapêutico não foi abordada. No entanto, o trabalho desenvolvido constitui realmente uma pequena contribuição para a clarificação de um vazio de conhecimento detectado ao nível da literatura analisada.

Neste trabalho utilizou-se o método de preparação de microesferas de quitosano reticulado com genipin por emulsão de água-em-óleo (*water-in-oil*) (W/O). A reacção de reticulação entre o quitosano e o genipin foi avaliada por recorrência a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, daqui em diante designada por FTIR, enquanto a morfologia das microsferas foi observada por microscopia óptica. As características dimensionais das microesferas, entre elas a distribuição granulométrica, o diâmetro médio e alguns factores de forma, tais como a circularidade e o factor de forma, foram analisadas recorrendo a análise de imagem a partir de fotografias recolhidas em microscópio óptico e posteriormente tratadas com *software* adequado.

Consideraram-se três factores como determinantes das características dimensionais das partículas: i. a concentração de polímero ii. a concentração de reticulante e iii. a velocidade de agitação durante o processo de emulsão. Para qualquer um dos casos foram considerados apenas dois níveis de variação, tendo-se analisado a adequação de um modelo empírico de características lineares como forma de descrever a resposta das variáveis de saída em resultado do factor em causa. As variáveis de saída consideradas foram o diâmetro médio das partículas, o perímetro, os diâmetros de Feret, a circularidade e o factor de forma (AR). A influência dos factores nas variáveis de saída foi analisada por recorrência a Análise de Variância (vulgarmente designada como ANOVA). Esta estratégia oriunda da área de estatística tem como objectivo detectar efeitos significativos dos factores introduzidos nas variáveis de saída.

Este trabalho envolve mais quatro capítulos. No capítulo 2 faz-se uma revisão bibliográfica, analisando-se aspectos como os métodos de preparação de microesferas de quitosano reticulado e as bases fundamentais dos métodos analíticos utilizados. No capítulo 3 introduzem-se os materiais e os métodos usados e no capítulo 4 apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos. Finalmente, no capítulo 5 apresentam-se as conclusões deste trabalho e analisam-se sugestões de continuidade.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Numerosos estudos demonstram que matrizes reticuladas de base quitosano, quer com agentes de reticulação iónicos como o sal fosfato dissódico de glicerol ou o tripolifosfato de sódio, quer com agentes de reticulação covalentes como o glutaraldeído ou o genipin, tendem a ter um tempo de libertação do agente terapêutico incorporado de apenas algumas horas, quando muitas vezes o desejável seria uma libertação que tivesse a duração de alguns dias, semanas, ou até meses (Rao, Kulkarni, Deshmukh, & Suresh, 2010; Seijo & Remuñán-López, 2005; Ramachandran, Nandhakumar, & DhanaRaju, 2011; Abreu, 2008). Torna-se, portanto, necessário, encontrar novas formulações que permitam obter as características desejadas para o perfil de libertação com uma duração que seja conveniente para o tratamento pretendido em termos farmacêuticos.

Nas próximas secções serão discutidos alguns aspectos do comportamento de redes poliméricas, em particular preparadas sob a forma de microesferas para uso em sistemas de libertação controlada de fármacos.

2.1. Sistemas de libertação controlada de fármacos

Qualquer terapêutica com uma espécie química, independentemente da forma como é administrada (localmente, oralmente, por inalação ou por injeção) (Sailaja, Amareshwar, & Chakravarty, 2010), propaga-se no sistema por recurso a um dado mecanismo de libertação. Este sistema de libertação é tão importante como a substância a libertar (Tripathi, Gupta, & Sharaf, 2010; Sinha, et al., 2004). A libertação do fármaco pode ser definida como o processo pelo qual ele atinge o seu alvo.

Actualmente, em aplicações terapêuticas, utilizam-se várias formas de administração dos agentes activos, nomeadamente a via sistémica e a via local. A grande diferença entre elas reside no facto de a primeira implicar a introdução da substância activa no interior do organismo que vai receber o tratamento e a segunda é uma aplicação tópica localizada, consequentemente muito menos invasiva. Por sua vez, a via de administração sistémica pode ser efectuada de dois modos distintos, como a via enteral e a via parenteral. Na via enteral enquadram-se os meios de administração que passam pelo sistema digestivo, tais como comprimidos e gotas (via oral ou sublingual). Esta via de administração do agente activo tem como principais vantagens a facilidade e conveniência da administração, uma vez que pode ser auto administrado, e a elevada capacidade de absorção da substância activa, uma vez que a absorção desta é feita ao longo de todo o sistema gástrico. Além disso, esta via de administração é de todas a mais económica (Kwan, 1997). Por outro lado, tem como principal desvantagem o facto de poder ocorrer destruição/degradação da substância activa pelo ácido presente no estômago, ou sofrer metabolização pelo fígado, e consequentemente, não chegar a ser absorvida na forma necessária ao tratamento. Pode, ainda, causar irritação nos tecidos do sistema digestivo. Este meio não pode ser utilizado

em casos de inconsciência, podendo, nestes casos, utilizar-se uma administração rectal (Chang, Krammer, Feldman, Ballentine, & Frankel, 1981; Verma, Thakur, Deshmukh, Jha, & Verma, 2010). Para casos em que o princípio activo é facilmente destruído pelo contacto com os fluidos do sistema digestivo, ou sempre que é necessário um efeito imediato, utiliza-se a libertação por via parenteral. Nesta forma de administração encontram-se incluídas as injeções subcutâneas, intravenosas, intramusculares e a inalação. Estes métodos têm como vantagem a rápida acção do agente activo e, caso este seja administrado intramuscularmente, existe ainda uma libertação gradual, mantendo os níveis de acção do agente activo por mais tempo, bem como o facto de poder ser administrado em grandes doses, e a pacientes inconscientes. Como desvantagens apresentam-se o facto de poder ser atingida, muito rapidamente, uma grande concentração da substância activa no organismo, o que pode proporcionar o risco de sobredosagem bem como o risco de embolismo, e ainda a presença de dor na área de aplicação (Verma, Thakur, Deshmukh, Jha, & Verma, 2010).

A administração do agente activo por inalação não apresenta, aparentemente, desvantagens. O aspecto mais relevante da administração de fármacos por inalação reside na rápida absorção do agente activo e na ausência de dor devida à não utilização de injeções.

Os meios de aplicação tópica incluem a aplicação de substâncias em creme, gel ou adesivos na pele ou mucosas, e têm como principais vantagens o facto de o agente activo não entrar em contacto com os fluidos do trato gastrointestinal, não se degradando, bem como o facto de este meio de administração manter os níveis de substância activa no organismo constantes (Verma, Thakur, Deshmukh, Jha, & Verma, 2010).

Resumindo, algumas das características mais importantes a ter em conta na escolha da via de administração de uma substância activa são a facilidade de aplicação e a capacidade de manutenção de uma concentração constante do agente activo no organismo pelo tempo necessário para que o tratamento seja eficazmente levado a cabo. Neste contexto surgem os sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos que têm por objectivo prolongar e melhorar o controlo da administração de fármacos de modo a otimizar a sua acção terapêutica com o mínimo de efeitos colaterais. Entenda-se por “fármaco” todos os compostos bioactivos administrados com intuito terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético.

Como referido anteriormente, as formas de administração convencionais (comprimidos, injeção e inalação) não são totalmente satisfatórias, permitindo uma libertação rápida e indiscriminada da substância activa. Este tipo de libertação resulta num aumento da concentração do fármaco no sangue, a qual atinge rapidamente um máximo, a que se segue uma diminuição exponencial como se encontra representado na Figura 2.1. Cada fármaco possui um intervalo de acção terapêutica acima do qual esta é tóxica e abaixo do qual é ineficaz. Desta forma, a manutenção da concentração dentro do intervalo terapêutico pode ser problemática. Assim, para que a concentração do fármaco seja eficaz

e não tóxica, ou seja, se localize dentro do intervalo terapêutico continuamente, é necessário administrá-lo várias vezes ao dia, resultando numa flutuação significativa dos seus níveis no organismo. O objectivo dos SLC reside em manter a concentração do fármaco no organismo dentro do intervalo terapêutico por tempo prolongado, utilizando-se uma única dosagem. A Figura 2.1 compara os perfis de libertação de um fármaco, administrado através de um sistema convencional (por unidose e várias doses) e de um sistema de libertação controlada, em função do tempo.

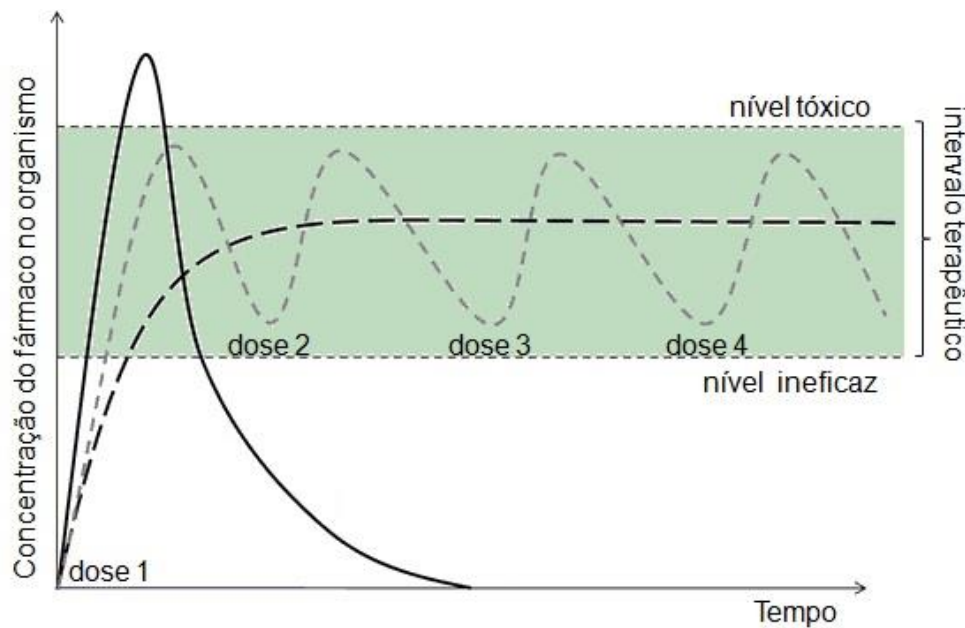


Figura 2-1: Comparação dos perfis de libertação de um fármaco resultantes da administração de um sistema de libertação convencional por dose única (—) e várias doses (----) e de um sistema de libertação controlada (- - -) (adaptado de (Dash & Cudworth, 1998)).

Diversos materiais poliméricos têm sido utilizados na preparação de SLC. Todavia, a biodegradabilidade dos polímeros é um dos requisitos fundamentais na modulação dos SLC, uma vez que é desejável que um material introduzido no organismo seja reabsorvido depois de cumprida a sua função, sem necessidade de recorrer a intervenção cirúrgica para a sua remoção (Moura, 2012).

A velocidade de libertação de agentes terapêuticos a partir de veículos de transporte constituídos por polímeros depende de factores como o tamanho dos poros da rede polimérica, a afinidade da substância activa para com o polímero e a sua solubilidade. Há ainda a ter em conta a temperatura e o pH no local onde ocorre a libertação, bem como o tamanho das moléculas da substância a libertar (Phaechamud, 2008). Outro factor a considerar é a densidade da matriz polimérica, a qual depende do peso molecular médio e da concentração do polímero, do tempo de reticulação e da concentração do agente reticulante (Ko J. , Park, Park, Wang, & Park, 2003). Em suma, a velocidade de libertação depende da complexidade da rede, da sua organização, vulgarmente medida pelo grau de reticulação, que por sua vez tem impacto nas propriedades físicas e reológicas, bem como nas propriedades de transporte de agentes aprisionados na rede (como é caso de agentes

terapêuticos). Dentro das propriedades físicas há a salientar a resistência ao esforço, nas reológicas torna-se necessário ter em conta aspectos como a viscosidade e a viscoelasticidade, e nas propriedades de transporte características como a difusividade dos agentes terapêuticos na rede, a taxa de degradação da mesma, bem como o coeficiente de partição do agente terapêutico considerando o meio que o circunda.

A libertação de fármacos a partir de matrizes poliméricas que constituem veículos de transporte é um factor determinante no seu efeito biológico. Por isso, a avaliação da cinética de libertação é de extrema importância neste campo de estudos (Barzegar-Jalali, et al., 2008). Alguns modelos cinéticos são largamente usados para representar o comportamento dos mecanismos de libertação, podendo, conseqüentemente, ser utilizados como modelo de controlo de libertação de drogas (Barzegar-Jalali, et al., 2008). Note-se que, enquanto modelos, eles servem apenas para prever comportamentos. No entanto, enquanto ferramentas de definição de estratégias de libertação controlada, eles servem para otimizar perfis e formas de administração.

Actualmente, o desenvolvimento de SLC de fármacos de base polimérica, em particular sob a forma de microsferas, constitui uma área de investigação em plena expansão.

2.2. Uso de microsferas como veículos de libertação de fármacos

Muitos são os trabalhos encontrados na literatura referentes ao desenvolvimento de sistemas poliméricos para libertação controlada de fármacos sob a forma de microsferas e vocacionados para as mais diversificadas aplicações (oftalmológicas, periodontal e bucal, gástricas, anticancerígenas, etc) (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011).

As vantagens decorrentes do uso de microsferas como sistemas de libertação de fármacos devem-se a vários factores. Em primeiro lugar, a imobilização do fármaco numa matriz proporciona a protecção deste contra a degradação e/ou inactivação precoce. Desta forma, é possível aumentar a permanência da substância bioactiva na circulação sanguínea reduzindo-se, assim, o número de doses necessárias, a quantidade de fármaco e, conseqüentemente, a toxicidade. Em segundo lugar, a libertação de forma progressiva e controlada do fármaco sustenta a manutenção de uma concentração deste no organismo dentro do intervalo de acção terapêutica. Por outro lado, estes sistemas podem ser administrados pelas vias convencionais de administração de medicamentos.

Os sistemas poliméricos, quando usados como veículos de transporte de agentes terapêuticos, libertam estas moléculas num período de tempo predeterminado, podendo este variar de alguns minutos a algumas horas, ou até mesmo dias (Harris, Lecumberri, & Heras, 2010). Para o caso em estudo, referente à libertação de cisplatina usando como veículo de transporte um sistema injectável capaz de ser produzido *in situ* pretende-se uma libertação do fármaco, controlada e prolongada no tempo. Atendendo a que a cisplatina é um agente citotóxico, indicado no tratamento de primeira linha de vários tipos

de cancro (como por exemplo: pulmão, colo do útero, testículos, ovários, bexiga, garganta, esófago, entre outros), é altamente desejável para o paciente a manutenção de uma concentração no organismo dentro do intervalo terapêutico bem como a redução do número de tomas durante os tratamentos de quimioterapia. O sistema que está a ser desenvolvido envolve uma matriz polimérica injectável, na qual se dispersam microsferas carregadas com cisplatina. De modo a maximizar a compatibilidade da matriz com a estrutura polimérica do material que forma as microsferas, usam-se as mesmas formulações de base.

Não está disponível, ainda, muita informação sobre estudos de difusão em casos de microsferas incluídas em matrizes poliméricas, e da influência desta forma de administração no processo de transferência de massa. No entanto, com a acoplagem das resistências à difusão dos dois veículos de libertação (matriz e microsferas), será expectável que o tempo de libertação seja superior ao de cada um, matriz e microsferas, individualmente, e assim se consiga aumentar a resistência à difusão. Note-se que nesta análise se está a assumir que o processo de libertação da cisplatina é dominado pela difusão. Estudos indicam que tal é uma assunção razoável (Harris, Lecumberri, & Heras, 2010).

É de salientar que o uso de matrizes poliméricas onde se incluem micropartículas dispersas vai aumentar a resistência da rede. Por conseguinte, é expectável que se altere o coeficiente de partição entre a matriz de transporte e o meio circundante, aumentando assim, a resistência à transferência de massa na interface.

2.3. Polímeros usados como veículos de libertação de fármacos

Os polímeros mais vulgarmente utilizados como sistemas de libertação controlada de fármacos podem ser de origem sintética ou natural.

De entre os polímeros de origem sintética destacam-se, por exemplo, o poli(etileno-glicol) (PEG), o poli(ácido acrílico) (PAA), o poli(álcool vinílico) (PVA), o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(óxido de fenileno) (PPO), o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), o poli(metil metacrilato) (PMMA) e a poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm). Estes materiais podem sofrer reticulação por processos químicos, por radicais livres, térmicos, por alteração de pH ou por adição de tipo Michael (Marra & Tan, 2010; Zarzycki, Modrzejewska, Owczarz, & Wojtasz-Pająk, 2008).

A utilização de polímeros de origem sintética tem como principal vantagem o facto de poderem ser produzidos de forma reprodutível e previsível, já que são constituídos por blocos estruturais de peso molecular elevado e ligações que se degradam previsivelmente, possibilitando, assim, um grande controlo sobre a matriz polimérica formada e a sua composição química. A desvantagem do uso destes polímeros passa por apresentarem um défice de actividade biológica relativamente aos polímeros naturais (Marra & Tan, 2010; Yu & Ding, 2008).

Já entre os polímeros de origem natural, os mais comuns são o colagénio, a gelatina, o quitosano, o sulfato de condroitina, alguns alginatos, como o ágar e a fibroína, entre outros (Bansal, Sharma, Sharma, P., & Malviya, 2011). A reticulação destes pode ser feita por processos físicos, iónicos, térmicos, adição de tipo Michael ou reacção-base de Schiff (D'Ayala, Malinconico, & Laurienzo, 2008).

As principais vantagens da utilização destes materiais passam pela sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e pela possibilidade de manipulações químicas e físicas da estrutura, as quais podem promover no polímero novas actividades biológicas. Já a grande desvantagem dos polímeros naturais passa por apresentarem propriedades pouco reprodutíveis, nomeadamente falta de controlo existente a nível de peso molecular e ligações específicas, inerentes à elevada variabilidade das fontes naturais (Marra & Tan, 2010; Zarzycki, Modrzejewska, Owczarz, & Wojtasz-Pająk, 2008). Além disso, estes materiais exibem, também, resistência mecânica insuficiente.

Dada a relevância do polímero natural – quitosano – para o presente trabalho optou-se por uma abordagem mais alargada das suas propriedades, que será apresentada de seguida.

2.3.1. O quitosano

O desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos constitui uma área de investigação onde o quitosano e os seus derivados têm revelado um potencial ilimitado. Entre os factores motivadores deste interesse incluem-se a grande abundância do quitosano, potenciando um recurso natural economicamente atractivo, e a presença de um conjunto invulgar de propriedades químicas e biológicas de elevada utilidade para áreas específicas, nomeadamente para a área farmacêutica e biomédica.

De entre as propriedades químicas e biológicas destaca-se um conjunto de características, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioactividade, ausência de toxicidade, propriedades de absorção, capacidade de formar membranas, bioadesividade, actividade contra fungos, bactérias e vírus e poder hemostático, que muito tem contribuído para o sucesso deste polímero natural.

Apesar das inegáveis vantagens associadas ao quitosano, este polímero natural apresenta algumas limitações, nomeadamente as redes tridimensionais (hidrogéis) obtidas a partir do polímero exibem fracas propriedades mecânicas. No entanto, tal pode ser melhorado por recurso a agentes reticulantes, como o glutaraldeído e o genipin, que promovem a formação de ligações químicas entre as diferentes cadeias do polímero, aumentando a robustez mecânica da rede tridimensional (Desa & Park, 2005).

Ainda assim, outro dos inconvenientes de alguns géis de quitosano obtidos por reticulação química é a elevada taxa de difusão das moléculas de fármaco no meio de libertação, o que condiciona a libertação a tempos curtos (Roy, et al., 2009). Assim, naturalmente que a redução desta velocidade é objectivamente uma meta a perseguir no

âmbito da funcionalização do quitosano como agente de libertação controlada. Uma das formas de aumentar a resistência à difusão, segundo alguns autores, consiste na inclusão do fármaco numa matriz de quitosano sob forma de microsferas (Pregoa, et al., 2010; Bansal, Sharma, Sharma, P., & Malviya, 2011).

Do ponto de vista químico, o quitosano é um polissacarídeo catiónico obtido da desacetilação alcalina da quitina.

A quitina (Figura 2.2), um polímero natural, é o principal constituinte do exosqueleto dos crustáceos e insectos, encontrando-se também na parede celular de certos fungos. Este polímero é uma base fraca, insolúvel em solventes aquosos e na maioria dos solventes orgânicos convencionais, sendo este o principal factor limitante à sua utilização (Sinha, et al., 2004). Ao contrário, o quitosano exhibe solubilidade (para valores de pH inferior a 6,2), nomeadamente em soluções aquosas de ácidos orgânicos. A solubilidade é promovida pela protonação dos grupos NH_2 livres presentes nas unidades desacetiladas, como se encontra representado na Figura 2.3 (Eroglu, Alpar, & Öner, 2008; Ramachandran, Nandhakumar, & DhanaRaju, 2011; Silva, Santos, & Ferreira, 2006). As Figuras 2.2 e 2.3 representam a estrutura química da quitina e o seu derivado quitosano, respectivamente.

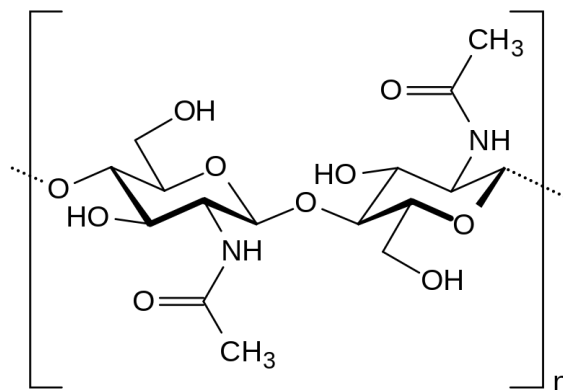


Figura 2-2: Estrutura molecular da quitina (adaptado de (Rinaudo, 2007)).

De realçar na estrutura molecular do quitosano a presença de grupos funcionais, tais como os grupos amina e hidroxilo que, pela sua elevada reactividade, podem ser usados para promover a modificação química do polímero ou a sua ligação a grupos específicos, como se verá de seguida.

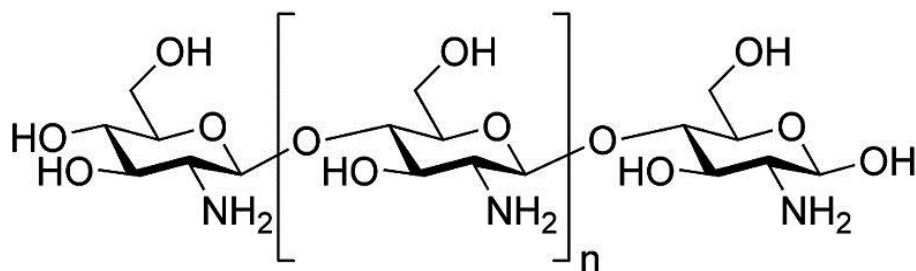


Figura 2-3: Estrutura molecular do quitosano (adaptado de (Rinaudo, 2007)).

2.4. Modificação do quitosano por reticulação química

A preparação de uma rede polimérica tridimensional, insolúvel em água ou em qualquer solvente aquoso, envolve a formação de reticulações (físicas ou químicas) entre as cadeias do polímero em causa. Geralmente, utilizam-se polímeros com grupos funcionais altamente reactivos, como o grupo hidroxilo, amina, amida, carboxilo e éter.

Existem dois métodos que podem induzir reticulações entre as cadeias do polímero: o método de reticulação física e o método de reticulação química.

A reticulação física envolve forças de interação secundárias incluindo forças iónicas, hidrofóbicas e pontes de hidrogénio e ocorre, normalmente, em condições moderadas de temperatura e pH, possibilitando a imobilização de compostos lábeis, tais como proteínas, e a biocompatibilidade celular. Contudo, as redes fisicamente reticuladas têm, em geral, fracas propriedades mecânicas quando comparadas com as reticuladas quimicamente (Ahmadi & Bruijin, 2008; Adekogbe & Ghanem, 2005). Além disso, são extremamente sensíveis a alterações no meio envolvente (tais como de temperatura, pH e força iónica) as quais podem provocar a reversibilidade das ligações e a consequente rotura da rede tridimensional. Pelo contrário, a reticulação química origina a formação de redes permanentes, em resultado das ligações covalentes que se estabelecem entre as cadeias do polímero, redes essas bastante estáveis do ponto de vista mecânico. De salientar que em ambos os métodos há recurso a agentes reticulantes.

Os agentes reticulantes são moléculas de massa molecular muito menor que a massa molecular das cadeias entre duas reticulações consecutivas, com pelo menos dois grupos funcionais reactivos que permitem estabelecer as ligações entre as cadeias poliméricas. Daqui resulta uma estrutura reticulada, mais ou menos rígida, com um grau de entrelaçamento (grau de reticulação) que é regularmente associado à concentração de ligações por unidade polimérica e ao peso molecular médio das cadeias. Esta concentração de ligações tem, naturalmente, impacto nas propriedades físicas e reológicas das matrizes. De facto, à medida que a rede se apresenta mais complexa e desordenada, maior o número de ligações entre cadeias vizinhas e da própria cadeia entre si devido à ocorrência de uma reorganização tridimensional. Ambas as situações levam ao aumento da resistência da rede.

Por outro lado, os agentes de reticulação possuem tamanhos de molécula diferentes que podem ser usados como espaçadores (aumentando ou diminuindo o tamanho do poro das moléculas) da rede reticulada. O aumento de complexidade da matriz polimérica leva a que exista uma menor difusividade de uma qualquer molécula no seu interior. De facto, a resistência à deslocação de moléculas originalmente aprisionadas é tanto maior quanto maior for a rigidez da matriz polimérica e o tamanho da molécula, ou seja, se se pretender um reticulante para libertação de uma molécula de tamanho relativamente pequeno, utiliza-se um reticulante de molécula mais curta, por outro lado, para libertar moléculas de maior tamanho, como proteínas ou até células, pode-se usar um reticulante cujo tamanho da molécula é maior (Swatantra, Awani, & Satyawan, 2010).

No caso particular do quitosano, o sal fosfato dissódico de glicerol e o tripolifosfato de sódio são os agentes mais utilizados na reticulação física (iónica) do polímero enquanto o glutaraldeído é o agente mais utilizado na reticulação química (covalente) do mesmo. O principal inconveniente encontrado na utilização deste último prende-se com o facto de ele ser considerado tóxico.

Actualmente, o genipin, cuja estrutura química se encontra representada na Figura 2.4, tem sido muito utilizado como agente de reticulação para o quitosano.

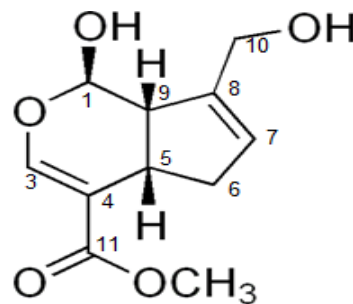


Figura 2-4: Estrutura química do genipin.

O genipin é um produto de origem natural, obtido a partir do Geniposide, extraído dos frutos da planta *Gardenia jasminoides Ellis* (Figura 2.5).

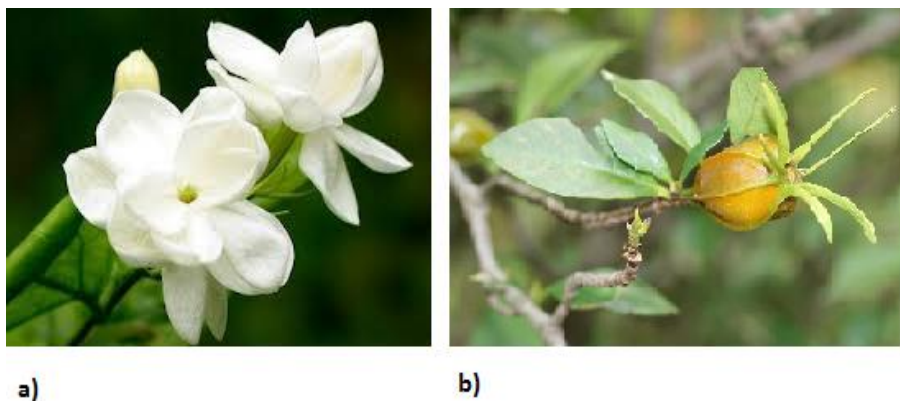


Figura 2-5: Flor a) e fruto b) da planta *Gardenia jasminoides Ellis*.

Estudos realizados com este reticulante revelam que ele é muito menos citotóxico do que o reticulante normalmente utilizado para reticular quimicamente o quitosano, o glutaraldeído, tornando-se assim ideal para uso na área farmacêutica e biomédica (Harris, Lecumberri, & Heras, 2010).

O processo de reticulação do quitosano com o genipin é do tipo químico e envolve um mecanismo reaccional que ocorre em duas etapas distintas, evidenciadas na Figura 2.6 (Butler, Pudney, & Ng, 2003).

Na primeira etapa, denominada a), ocorre uma reacção de substituição nucleófila que envolve a troca do grupo éster da molécula de genipin por uma ligação amida secundária da molécula do quitosano, ocorrendo simultaneamente produção de uma molécula de metanol, por cada ligação genipin-quitosano formada.

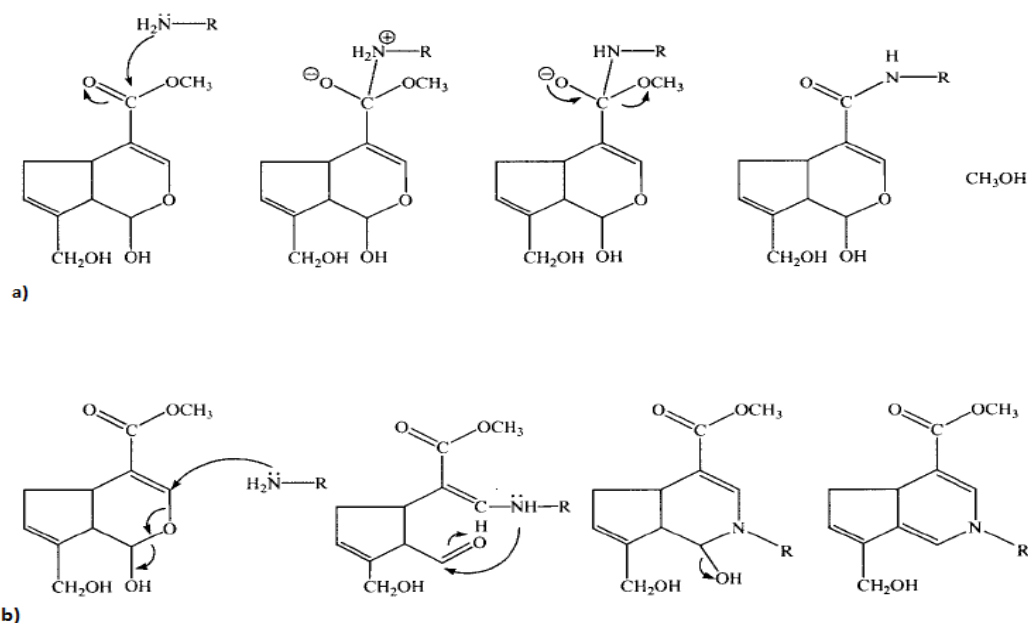


Figura 2-6: Etapas a) e b) de reticulação entre o quitosano e o genipin (adaptado de (Butler, Pudney, & Ng, 2003)).

A segunda etapa, designada por b), inicia-se com um ataque nucleófilo por parte dos grupos amina do quitosano ao carbono C3 do genipin, formando um grupo aldeído intermediário. A abertura do anel de di-hidropirano é seguida de um ataque ao grupo amina secundário formado na reacção inicial, ficando então um átomo de azoto na posição 2 da molécula de genipin.

A Figura 2.7 ilustra o mecanismo de reticulação entre o quitosano e o genipin, descrito anteriormente.

A reticulação covalente do quitosano com o genipin conduz à formação de uma estrutura porosa permanente, com propriedades mecânicas, das redes assim obtidas, melhoradas.

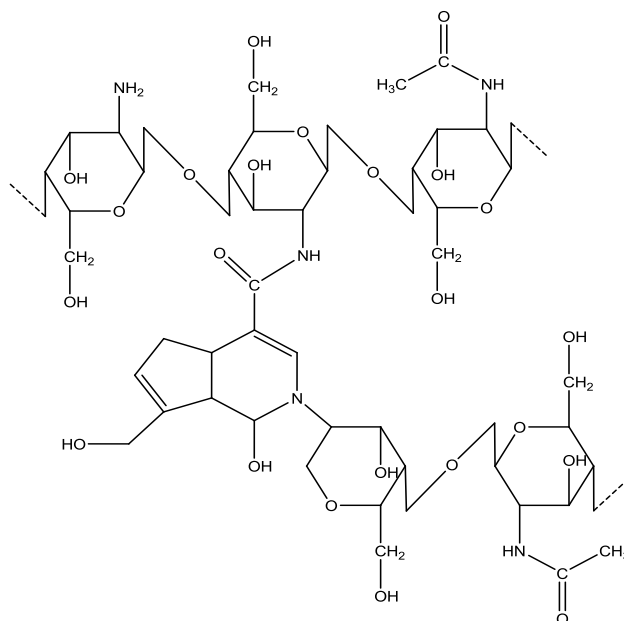


Figura 2-7: Mecanismo de reticulação entre o quitosano e o genipin.

2.5. Métodos de preparação de microsferas

Nas últimas décadas, o processamento do quitosano na forma de microsferas tem sido largamente investigado (Akbuğa & Bergişadi, 1999; Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Berguisadi & Akbuga, 1999; Das, Jagan, Isiah, Rajesh, Backianathan, & Subhashini, 2011; Kawadakar & Chauhan, 2012).

Nesta secção serão apresentados os principais métodos de preparação de microsferas de quitosano (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Sinha, et al., 2004; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011). Esta síntese não pretende ser exaustiva, mas apenas caracterizar sumariamente cada um dos processos.

2.5.1. Emulsão água-em-óleo (*water-in-oil* (W/O))

Por ser considerado um método simples de preparação de microsferas, a emulsão água-em-óleo (*water-in-oil*, W/O) é o método mais usado quando se pretende imobilizar um fármaco. Este método envolve a formação de uma emulsão entre a solução polimérica e uma fase contínua imiscível que, sendo orgânica, forma uma emulsão do tipo água-em-óleo (W/O).

Este método consiste em dissolver o polímero e o fármaco num solvente aquoso e posteriormente emulsificá-lo numa solução orgânica, contendo um estabilizante ou emulsificante, sob agitação. No caso de o polímero e o fármaco não serem solúveis numa solução aquosa terão de ser dissolvidos num solvente orgânico e emulsificados numa solução aquosa. Neste caso, a emulsão obtida é denominada óleo-em-água (O/W) e aplicada apenas nos casos em que o polímero e o fármaco são insolúveis em água.

Geralmente a emulsão é estabilizada com um surfactante que deve estar presente na fase contínua. Este reduz a tensão superficial da fase contínua, evitando assim a coalescência e a aglomeração das gotas da fase dispersa, e a sua presença é absolutamente necessária quando se pretende obter partículas esféricas individuais. Dos surfactantes tipicamente utilizados salientam-se o poli(álcool vinílico) parcialmente hidrolizado (PVA), o Tween20 e o Span80.

O método da emulsão pode ser seguido de reticulação o que resulta na possibilidade de modular as características físico-químicas das microsferas pela escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação. Por outro lado, o método não requer temperaturas elevadas nem agentes que induzam a separação de fases e é possível atingir tamanhos de partícula controlados na faixa nano e micrométrica. Conforme já mencionado, uma das vantagens desta metodologia é a sua simplicidade de execução, porém requer a selecção adequada de solventes, surfactantes e condições de agitação.

Na Figura 2.8 é mostrada uma representação esquemática do processo base de emulsão *water-in-oil*. As características das micropartículas obtidas pelo método de emulsão/reticulação, bem como da libertação de fármacos a partir da matriz polimérica, dependem da concentração, solubilidade, massa molar, entre outras propriedades físico-químicas do polímero, dos solventes usados, do tipo e concentração do reticulante e do surfactante, das características físico-químicas do fármaco, da velocidade de agitação e da temperatura.

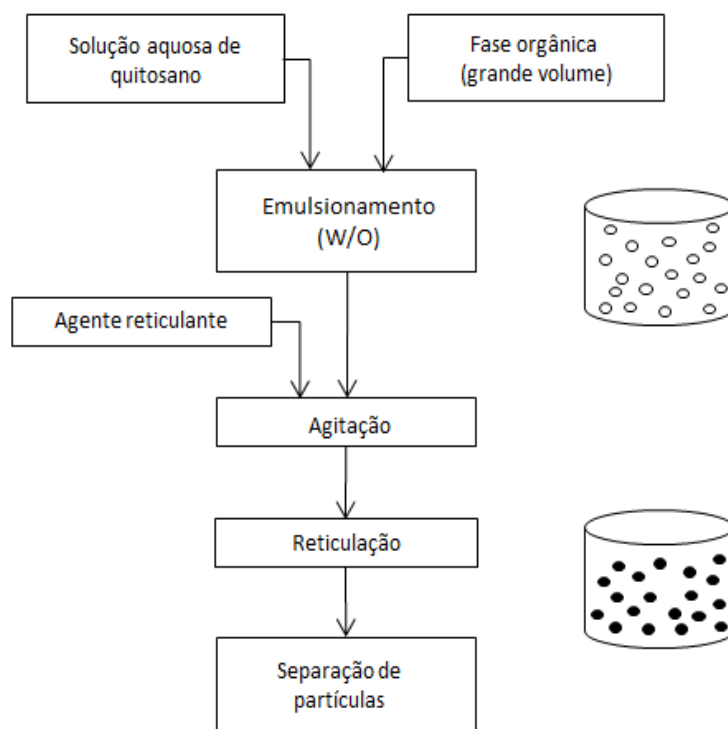


Figura 2-8: Representação esquemática do processo base de emulsão.

Na literatura é possível encontrar vários trabalhos que reportam a preparação de microesferas a partir de diferentes polímeros, tais como celulose e seus derivados, alginatos e quitosano, utilizando o método da emulsão seguido de reticulação (Barzegar-Jalali, et al., 2008; Soppimath, Aminabhavia, Kulkarnia, & Rudzinsky, 2001; Abreu, 2008).

2.5.2. Emulsão múltipla

Este método de preparação de microesferas é semelhante ao anterior e é geralmente utilizado para incorporar fármacos não solúveis em água (Sinha, et al., 2004; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011). O processo de emulsão ocorre em três etapas. O fármaco é dissolvido numa fase orgânica volátil que é adicionada, sob agitação, à solução aquosa do polímero, formando uma emulsão (O/W). A emulsão primária (mistura da fase orgânica com fármaco e solução aquosa de polímero) é posteriormente dispersa, sob agitação, numa fase orgânica oleosa externa para formar uma emulsão *oil-water-oil* (O/W/O), à qual é adicionado o agente de reticulação. O solvente utilizado para promover a dissolução do fármaco, sendo volátil, acaba por evaporar, deixando o fármaco retido nas microesferas formadas (Ko J. , Park, Park, & Hwag, 2003; Soppimath, Aminabhavia, Kulkarnia, & Rudzinsky, 2001; Ringe, Walz, & Sabel, 2004). Na Figura 2.9 encontra-se uma representação esquemática do método da emulsão múltipla.

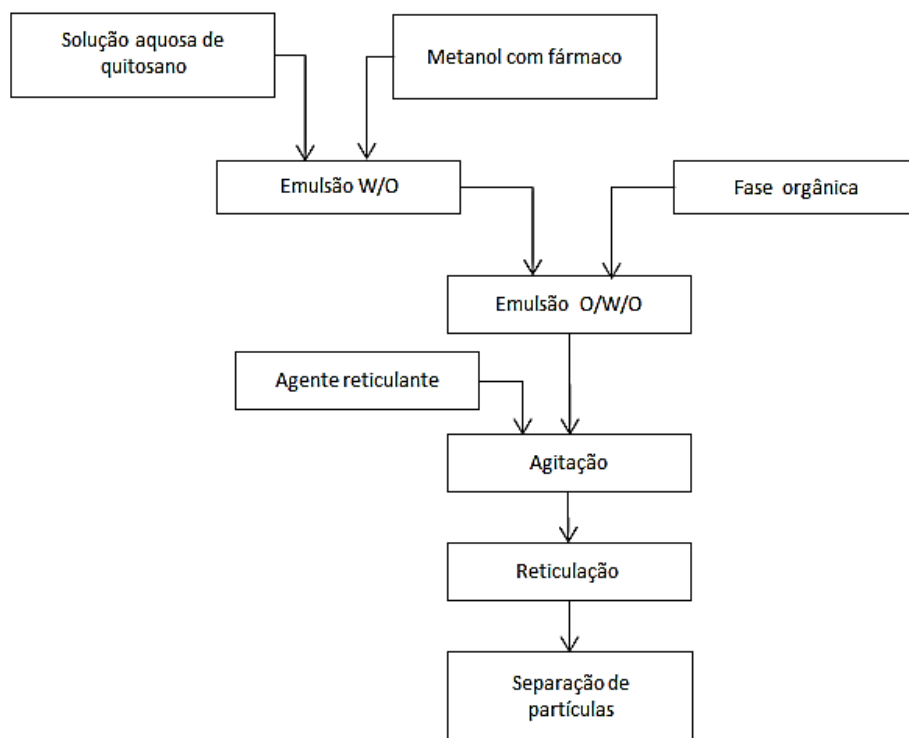


Figura 2-9: Representação esquemática do processo base de emulsão múltipla.

2.5.3. Coacervação/Precipitação

Este método utiliza as propriedades físico-químicas do quitosano, uma vez que este é insolúvel em meios de pH elevado, precipitando (coacervando) quando entra em contacto com soluções alcalinas (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011).

As micropartículas são produzidas por atomização de uma solução aquosa de quitosano (solução com pH ácido) numa solução com pH alcalino, utilizando um bocal de ar comprimido para formar partículas atomizadas que precipitam em contacto com a solução alcalina (Ko J. , Park, Hwang, Park, & Lee, 2002). As microsferas formadas por este método podem ser separadas por lavagem com água (Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011; Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004). O tamanho do bocal do atomizador, bem como a pressão a que a solução de quitosano é atomizada, controlam o tamanho das partículas, o reticulante escolhido controla a velocidade de libertação da substância activa. Na Figura 2.10 encontra-se uma representação esquemática do método de produção de micropartículas de quitosano por coacervação.

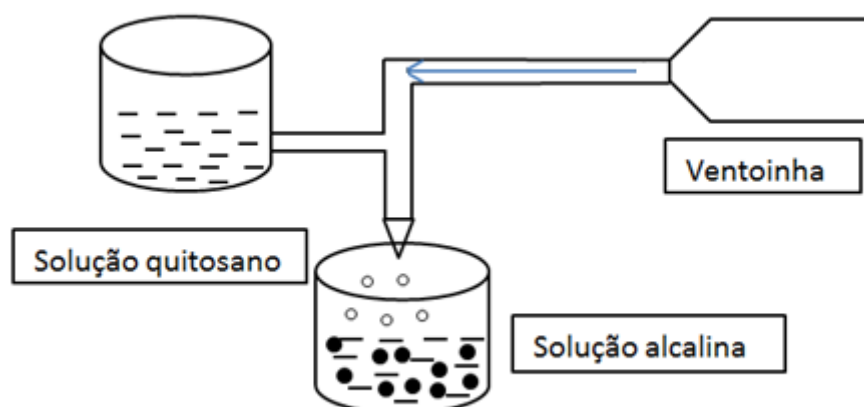


Figura 2-10: Representação esquemática do método de produção de microsferas por precipitação/coacervação.

Num outro método de formação de microsferas por coacervação, uma solução de sulfato de sódio é adicionada gota a gota a uma solução ácida de quitosano contendo surfactante, sob agitação e sujeita a ultra-sons. As microsferas formadas por este método são seguidamente separadas por centrifugação e lavadas em água desionizada (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004). Este método permite formar microsferas sólidas sem a necessidade de usar um agente reticulante ou solventes orgânicos, reduzindo assim a toxicidade do produto final (Sinha, et al., 2004).

2.5.4. *Spray-drying*

O método de *spray-drying*, é uma tecnologia muito utilizada em diversos segmentos industriais incluindo o farmacêutico. Consiste em quatro etapas: a) atomização da alimentação pelo bocal atomizador; b) contacto das gotas de polímero com o gás quente; c) secagem e d) recolha das micropartículas (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004).

Neste método, o quitosano é dissolvido numa solução aquosa de ácido acético, e nesta solução é incorporada a substância activa (quer por dissolução quando se tratam de substâncias solúveis em água, quer por dispersão, no caso de substâncias insolúveis em água). À mistura de quitosano-substância activa é adicionado o agente reticulante. A mistura final é, então, pulverizada sobre uma corrente de ar quente, formando pequenas gotículas das quais o solvente se evapora rapidamente, deixando partículas secas de pequena dimensão (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Sinha, et al., 2004; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011; Desa & Park, 2005). Para separar as microsferas formadas da corrente de ar usada para evaporar o solvente do quitosano é usualmente utilizado um ciclone com a capacidade de reter partículas de tamanho micrométrico (do tamanho das partículas obtidas no método de produção). Este método pretende eliminar a necessidade de utilizar um solvente. Na Figura 2.11, encontra-se representado o método de preparação de microsferas por *spray-drying*.

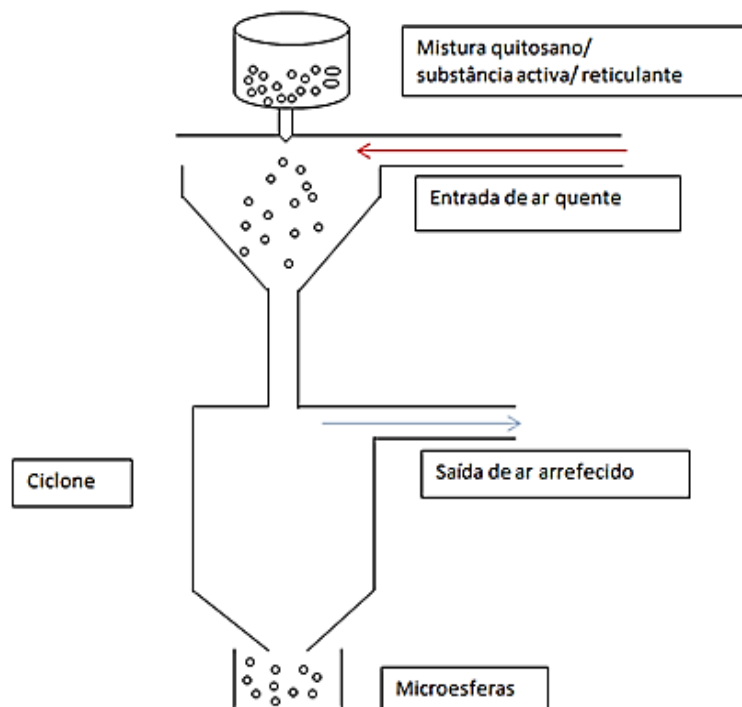


Figura 2-11: Representação esquemática do método de produção de microsferas por *spray-drying*.

As variáveis a ter em conta na produção de microsferas por este método são alguns parâmetros processuais como a pressão de atomização, o tamanho do bocal do atomizador, a temperatura da corrente de ar quente, a sua velocidade, e ainda as propriedades físico-químicas da formulação, como concentração do polímero e do reticulante, tempo de reticulação, entre outras (Ko J. , Park, Park, & Hwag, 2003; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011).

2.5.5. Gelificação iónica

A preparação de microsferas de quitosano por gelificação iónica tem a vantagem de permitir obter microsferas por interação iónica entre moléculas com cargas diferentes, descartando assim a utilização de agentes reticulantes que podem induzir efeitos tóxicos ou outros efeitos indesejáveis (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011).

Este método implica a solubilização do quitosano numa solução aquosa de ácido acético. Nesta fase os grupos amina do quitosano encontram-se protonados, isto é na forma NH_3^+ . Esta solução é então adicionada gota a gota (ou extrudida através de uma agulha), sob agitação constante, a uma solução polianiónica (Pregoa, et al., 2010). Devido à interação entre os grupos amina positivamente carregados (protonados) do quitosano e as moléculas carregadas negativamente, como sejam os iões fosfato, sulfato ou citrato, o quitosano sofre gelificação iónica e precipita, formando micropartículas esféricas (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Sinha, et al., 2004; Ko J. , Park, Hwang, Park, & Lee, 2002). Na Figura 2.12 é apresentado esquematicamente o método de formação de microsferas por gelificação iónica.

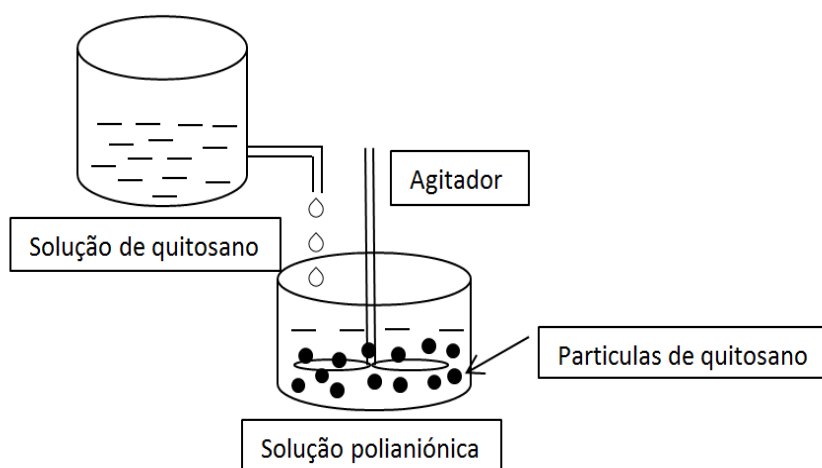


Figura 2-12: Representação esquemática do método de preparação de microsferas por gelificação aniónica.

2.5.6. Peneiração

Trata-se de um método simplificado de produção de micropartículas, que embora não produza partículas de aspecto uniforme, pode ser facilmente aplicado a processos com maior volume de produção (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011).

O quitosano é dissolvido numa solução aquosa de ácido acético até formar um gel espesso, que é reticulado numa massa homogénea até apresentar uma textura sólida. Seguidamente, esta massa reticulada é passada por um peneiro, com uma malha de calibre conveniente para o tamanho pretendido para as partículas (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004; Dasha, Chiellini, Ottenbriteb, & Chiellini, 2011). Na Figura 2.13 é apresentado um esquema da produção de micropartículas pelo método de peneiração.

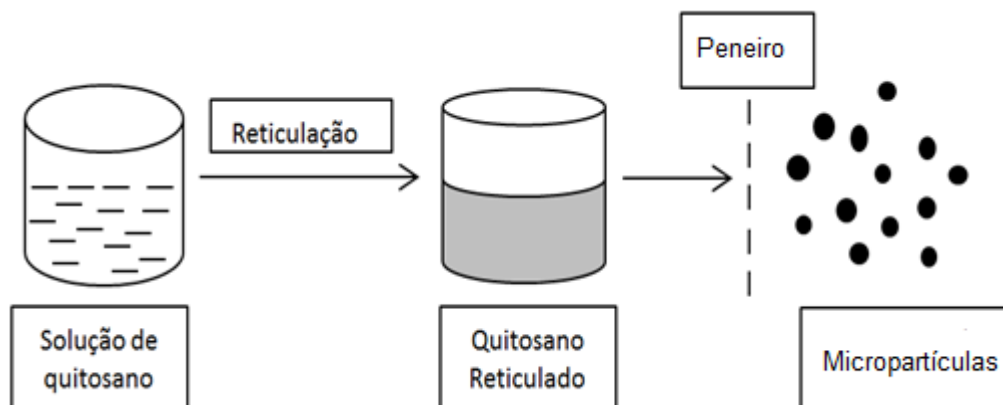


Figura 2-13: Representação esquemática do método de produção de microsferas por peneiração.

2.6. Métodos analíticos para caracterização de partículas

Nesta secção descrevem-se sumariamente os princípios básicos dos Métodos Analíticos usados para a caracterização de variados aspectos, quer da matriz polimérica, quer das microsferas formadas. Uma das características a analisar é a ocorrência de reacção de reticulação entre o quitosano e o genipin. Esta será comprovada por recurso a FTIR. Esta técnica não permite quantificar o grau de reticulação, mas dá indicações sobre a substituição de grupos que ocorre durante a reacção de reticulação.

Relativamente às propriedades das microsferas, as fundamentais neste estudo são as que respeitam à distribuição de tamanhos e as que medem a homogeneidade da forma. Esta análise foi levada a cabo usando microscopia óptica conjugada com uma câmara de alta resolução. Esta conjugação permite a aquisição de um conjunto de imagens, sucessivamente submetidas a procedimentos de análise de imagem, que facilitam a quantificação de aspectos variados das microsferas captados nas imagens obtidas.

2.6.1. Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia por FTIR é uma técnica em que luz do espectro do infravermelho é passada pela amostra em análise. Alguma da radiação é absorvida pela amostra, e a restante é transmitida através da mesma, resultando num espectro. Este espectro representa uma imagem de absorção e transmissão das ligações moleculares da amostra, criando uma assinatura molecular característica (Braun, 1987). A espectroscopia de FTIR é utilizada para identificação de unidades moleculares, por redistribuição de excesso de energia vibracional, e é uma ferramenta indispensável na identificação e investigação de grupos funcionais em polímeros complexos (Braun, 1987; Muller, 2009)

Uma substância é composta por vários átomos ligados entre si por ligações de tamanho e características vibracionais diferentes. Como cada substância tem ligações características, produz uma assinatura única no espectro de infravermelhos quando submetida a um feixe de luz. Assim, é possível identificar (por análise qualitativa) todos e quaisquer materiais sujeitos a análise (Braun, 1987). Cada molécula individual apresenta a sua própria assinatura molecular, pelo que é possível verificar quais as ligações que a constituem. A assinatura formada pelo espectro de FTIR permite fazer vários tipos de análise, desde a análise à pureza de uma amostra, a identificação de substâncias desconhecidas, ou, entre outras, a análise da ocorrência de reticulação em polímeros (Skoog, Holler, & Crouch, 2007). Existem dois modos de aquisição de um espectro FTIR, sendo estes o espectro baseado na transmissão, e o baseado na reflectância total atenuada (ATR) (Petrozzi, 2012). A espectroscopia de FTIR em modo ATR possui capacidades limitadas em relação à penetração na amostra, uma vez que apenas tem um poder de penetração de alguns micron, pelo que a sua análise é mais qualitativa do que quantitativa (Braun, 1987). A ocorrência de picos traduz a existência de grupos funcionais cuja assinatura decorre de reflectirem num comprimento de onda definido. Já a análise espectroscópica por transmissão, tem um grande poder de penetração na amostra, pelo que também pode ser utilizada para análise quantitativa de substâncias (Veres, 2005; Skoog, Holler, & Crouch, 2007). O tamanho dos picos no espectro de infravermelho aponta directamente para a quantidade de cada substância específica presente na amostra.

No caso presente, ao ocorrer a reacção de reticulação entre o quitosano e o genipin, verifica-se a substituição de grupos éster. Portanto, a comparação de espectros do quitosano e das microsferas reticuladas há-de denotar desvios, e/ou diferentes tamanhos de picos, correspondentes aos grupos éster e amina. Embora outros aspectos possam mascarar esta evidência, é comumente aceite que alterações espectrais resultam da ocorrência de uma reacção, neste caso de reticulação.

2.6.2. Análise de imagem

O desenvolvimento das tecnologias de informação, bem como de *software* especializado na análise de imagem com base nas diferenças de gradiente de cor num suporte previamente adquirido, permite automatizar parcialmente a análise de imagens obtidas

por microscopia óptica e daí extrair informação relevante. A imagem posteriormente submetida a tratamento foi adquirida num microscópio óptico ao qual foi acoplada uma câmara de alta resolução. Com este dispositivo, foram adquiridas fotos de lâminas nas quais se encontravam microsferas. A seguir apresentam-se alguns dos conceitos básicos da análise de imagem e do seu uso como método de caracterização de tamanho e forma de partículas.

A análise foi levada a cabo com base em imagens das microsferas obtidas, por processamento com o *software* ImageJ na versão 1.4.3.67 de 1 de Fevereiro de 2006. Este *software* permite contabilizar e analisar as microsferas, em termos de tamanho e de forma. A aquisição da imagem é o passo mais crítico de todo o processo de análise, pois determina a maior ou menor fiabilidade dos resultados finais. Assim, requer uma prévia familiarização do utilizador com as técnicas de microscopia óptica, sendo essencial obter imagens em boas condições de focagem, resolução (compromisso entre a objectiva de maior ampliação, logo melhor resolução, e de menor ampliação, o que implica ter um maior número de objectos por imagem) e com maior nível de contraste objecto/meio (o que requer obrigatoriamente uma iluminação adequada). Depois de adquirida a imagem segue-se a sua binarização, ou seja, a conversão dos níveis de cor numa imagem para um suporte equivalente a preto e branco (imagem binária), a remoção do fundo da imagem para eliminação de qualquer objecto presente na lâmina utilizada para a aquisição, a individualização de cada microsfere, e, no caso de existirem espaços em branco no espaço respeitante a cada microsfere, o preenchimento dos mesmos pelo *software* para eliminar qualquer erro na contagem de microsferas ou na quantificação da área ocupada pelas mesmas.

A binarização faz, em traços largos, a redução de uma imagem em tons de cinza para uma correspondente, a preto e branco. O algoritmo usado para a definição do *threshold* para declarar um *pixel* como sendo preto ou branco, é o vulgarmente conhecido método de Otsu (Zhang & Wu, 2011; Singh, Satapathy, Dash, & Routray, 2011). Este método assume que a imagem é formada fundamentalmente por duas classes de *pixel* que definem uma distribuição de frequências bimodal quando representados em termos de cor. De facto, há *pixel* mais claros associados ao fundo, e *pixel* mais escuros associados às partículas. A determinação do *threshold* é a definição do nível de cinzento em que existe discriminação de *pixel*. Esse é calculado por forma a que a variância intra-classe seja mínima. Após a determinação do *threshold* a binarização é automaticamente levada a cabo, sendo atribuído um valor de 0 (branco) ou 1 (preto), a cada *pixel*. No caso do *software* utilizado, a determinação do *threshold* é feita automaticamente, bem como o processo de binarização.

Por último, o *software* de análise de imagem, ImageJ, faz a contagem e medição dos parâmetros utilizados para a caracterização das microsferas.

A partir do número de *pixel* associado a cada objecto da imagem na forma binária, é possível determinar um conjunto de parâmetros que podem ser agrupados em parâmetros de tamanho (área, perímetro e diâmetros de Feret) e em parâmetros de forma (circularidade e factor de forma).

1. A área é contabilizada em $pixel^2$. Este parâmetro é de crucial importância para a análise das microsferas, pois é com base nele que é obtido o diâmetro equivalente baseado na área da secção recta das microsferas. O diâmetro equivalente, d , é definido como o diâmetro do círculo cuja área é igual à área projectada da microsfera em estudo, sendo dado pela equação (2.1):

$$d = 2 \sqrt{\frac{\text{área}}{\pi}} \quad (2.1)$$

2. O perímetro é contabilizado em *pixel* e é obtido através do número de *pixel* que faz fronteira entre o objecto e o meio.

3. O diâmetro de Feret é definido como o máximo diâmetro de Feret ($F_{máx}$), ou como o mínimo diâmetro de Feret ($F_{mín}$). $F_{máx}$ representa a maior distância possível entre dois pontos numa partícula, e é também conhecido como a maior distância de paquímetro, $F_{mín}$ representa a menor distância possível entre dois pontos numa partícula, e é também conhecido como a menor distância de paquímetro (Malvern, 2012; Balagurunthan, Dougherty, & Bilinsky, 2001).

4. A circularidade é definida como a razão entre o quadrado do perímetro de um círculo com a mesma área da partícula (A_p) e o quadrado do perímetro da partícula (P). O valor da circularidade varia entre 0 e 1, sendo que o valor 1 representa um círculo perfeito, e à medida que o valor diminui, as partículas afastam-se da forma esférica (Malvern, 2012). A circularidade é formalmente representada por C , e para o caso de uma esfera, pode ser obtida pela equação (2.2):

$$C = \frac{4\pi \times A_p}{P^2} = 1 \quad (2.2)$$

5. O factor de forma é definido como a razão entre o maior e o menor eixo da elipse que melhor se ajusta à partícula em análise, como é mostrado na equação (2.3). O ajuste da elipse à partícula é calculado com base em métodos numéricos, que determinam o valor mínimo do erro das distâncias dos diferentes pontos da elipse à partícula. O valor do factor de forma, aqui representado por AR , é maior que um, mas é de notar que quanto mais próximo desse valor for, mais esféricas são as partículas:

$$AR = \frac{\text{Eixo maior}}{\text{Eixo menor}} \quad (2.3)$$

2.6.3. Análise estatística

Neste trabalho, as ferramentas estatísticas utilizadas foram de três tipos:

a) representação de distribuições granulométricas usando histogramas, o que permite captar tendências e avaliar se as partículas tem ou não distribuições próximas da distribuição normal;

b) cálculo de estatísticas descritivas correspondentes às distribuições obtidas. Aqui, foi calculada a média de cada um dos parâmetros dimensionais das partículas e o desvio padrão. A média caracteriza, aqui, o primeiro momento da distribuição e o desvio padrão da variabilidade;

c) análise de variância (ANOVA). Esta estatística visa avaliar se um determinado factor, objecto de variação no conjunto de experiências realizadas, tem de facto efeito nos parâmetros dimensionais analisados. Note-se que a análise de variância foi usada para comparar resultados de experiências, tendo-se usado as métricas das distribuições (primeiro momento) calculadas anteriormente. A seguir apresenta-se com maior detalhe as bases conceptuais da ANOVA.

A análise de variância visa testar a significância estatística das diferenças entre as médias de grupos e possibilita a comparação de parâmetros de várias populações simultaneamente (Field, 2000; Miller & Haden, 1988). Para garantir a fidelidade dos testes, impõe-se que os factores sejam independentes (Mitra, 1998).

O método implica a divisão da variabilidade total dos dados obtidos a partir de um conjunto de experiências em duas partes: a diferença entre as médias e o erro aleatório (dentro das populações estudadas) (Cardinal & Aitken, 2005).

O método envolve formular um teste de hipóteses em que a hipótese nula, H_0 , modela a situação em que as médias da variável dependente resultantes da variação de um dado factor num conjunto de experiências são iguais. A outra hipótese, H_1 , modela a situação em que elas são estatisticamente diferentes. A base para testar estas hipóteses passa por estimar a variância, σ^2 , por dois métodos diferentes: um que não depende da veracidade de H_0 e outro que depende da veracidade de H_0 , e comparar as duas estimativas. No caso de H_0 ser verdadeira, as duas estimativas apresentam valores próximos; no caso de H_0 demonstrar ser falsa, os valores devem diferir significativamente (Madrigal, 1998).

A variabilidade total das observações é dada pela soma dos quadrados das distâncias de cada observação à média global, vulgo SST , como se encontra demonstrado na equação (2.4). Esta variabilidade é definida como a soma da variabilidade das observações entre

grupos (correspondente à soma ponderada das variações das medidas de cada grupo em relação à media global) (SSE) e a variabilidade das observações dentro dos próprios grupos (corresponde à soma das variações das observações dentro de cada um dos grupos, calculadas em relação à media global desse grupo) ($SSTR$) (Mitra, 1998). Note-se que, neste contexto, um grupo é um conjunto de réplicas em que os níveis de todos os factores foram mantidos constantes.

$$SST = SSE + SSTR \quad (2.4)$$

Define-se, também, a média da soma dos quadrados entre grupos como MSE , a qual está definida na equação (2.5), onde p representa o número de tratamentos e r , o número de observações efectuadas. O coeficiente $p(r - 1)$ é indicativo do número de graus de liberdade envolvidos no modelo, pelo que:

$$MSE = \frac{SSE}{p(r - 1)} \quad (2.5)$$

À média da soma dos quadrados dentro dos grupos dá-se a designação de $MSTR$, e a fórmula de cálculo é apresentada na equação (2.6). O quociente $(p - 1)$ é o número de graus de liberdade do conjunto de tratamentos, donde vem:

$$MSTR = \frac{SSTR}{p - 1} \quad (2.6)$$

A análise de veracidade à hipótese H_0 envolve um teste de F , em que F representa o rácio entre $MSTR$ e MSE , como é apresentado na equação (2.7).

$$F = \frac{MSTR}{MSE} \quad (2.7)$$

Assim, $MSTR$ é a estimativa da variância da variável dependente no conjunto de todos os ensaios levados a cabo e MSE é a estimativa da variância da variável dependente no conjunto dos tratamentos (níveis diferentes de um factor). O valor de F é depois comparado com o valor crítico de f para um nível de significância α e $(p - 1)$ e $p(r - 1)$ graus de liberdade, respectivamente. Este valor crítico é aqui designado por $f_{\alpha, (p-1), p(r-1)}$. No caso de $F > f_{\alpha, (p-1), p(r-1)}$, então H_0 é rejeitada e conclui-se que um dado factor provoca diferenças significativas na média da variável dependente. Outra forma de decidir é calcular o valor de α para a qual $f_{\alpha, (p-1), p(r-1)} = F$. No caso deste valor ser inferior a 5%, então H_0 é rejeitada.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta secção descrevem-se os principais materiais usados na preparação de microsferas de quitosano reticuladas com genipin, bem como os métodos utilizados na execução experimental do trabalho.

3.1. Materiais

O quitosano utilizado na preparação das microsferas, com uma massa molecular de $\sim 2 \times 10^5$ Daltons e com um grau de desacetilação de 87%, é proveniente de crustáceos marinhos e foi adquirido à Sigma-Aldrich, Portugal, na forma de pó.

O genipin, cujo nome da IUPAC é metil-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclonona-4,8-dieno-5-carboxilato, usado como reticulante químico, foi fornecido pela Challenge Bioproducts, Taiwan, na forma de pó cristalino e com um grau de pureza analítico.

O óleo mineral, utilizado como fase contínua na preparação da emulsão água-em-óleo, com uma viscosidade de $16,8 \text{ mm}^2/\text{s}$ (a $40 \text{ }^\circ\text{C}$) e massa volúmica de $848,5 \text{ kg/m}^3$ (a $20 \text{ }^\circ\text{C}$) foi adquirido à empresa José Gomes dos Santos, Portugal.

Todos os outros reagentes e solventes usados no presente trabalho, foram de grau de pureza analítico.

3.1.1. Preparação de microsferas de quitosano reticuladas com genipin

A preparação das microsferas de quitosano reticuladas com genipin foi levada a cabo através da técnica de emulsão água-em-óleo (W/O), seguida de reticulação. O procedimento experimental adoptado, salvo ligeiras modificações, encontra-se descrito na literatura por diferentes autores (Kawadakar & Chauhan, 2012; Imsombut, Srisuwan, Srihanam, & Baimark, 2010; Wang, Sato, Adachi, & Horikoshi, 1996; Jose, et al., 2012).

A fase dispersa, polimérica, corresponde à solução aquosa de quitosano em ácido acético (0,5%, v/v), enquanto a fase contínua, orgânica, corresponde ao óleo mineral. Como agente surfactante foi utilizado o Span 80.

Um volume de 1,5 mL de solução aquosa de quitosano foi adicionado, gota a gota, a 20 mL de óleo mineral que continha 0,4 g de Span 80, sob agitação magnética, à temperatura ambiente. A emulsão água-em-óleo foi deixada estabilizar durante 15 minutos. De seguida adicionou-se, gota a gota, 0,5 mL de solução de genipin (em álcool, 70%) e colocou-se a emulsão na estufa sob contínua agitação magnética a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A reacção foi deixada prosseguir por um período de 6 horas. No final do ensaio as microsferas foram

separadas da fase contínua por decantação, lavadas três vezes com benzina e secas em estufa a 37 °C.

A Figura 3.1 ilustra o procedimento seguido na obtenção das microsferas de quitosano reticuladas com genipin.

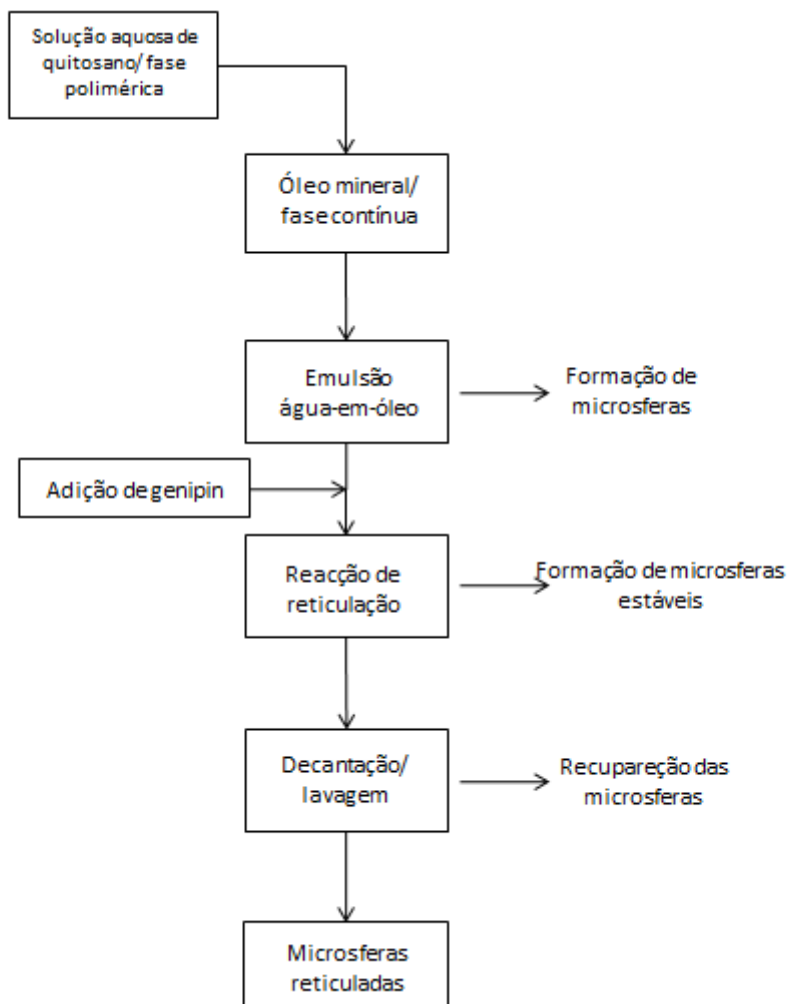


Figura 3-1: Representação esquemática do método utilizado para a preparação de microsferas.

Com o objectivo de avaliar o efeito de alguns parâmetros processuais na morfologia, no tamanho e na distribuição de tamanhos das microsferas, foram variados os seguintes factores:

- concentração do polímero (1% e 2%);
- concentração de genipin (1% e 6%);
- velocidade de agitação (400 e 800 rpm).

Ao fim de 6 horas, este método produz microsferas bem formadas, de um azul intenso em resultado da reacção de reticulação com genipin. Além disso, as microsferas demonstram elevada esfericidade, tal como é mostrado na figura 3.2.

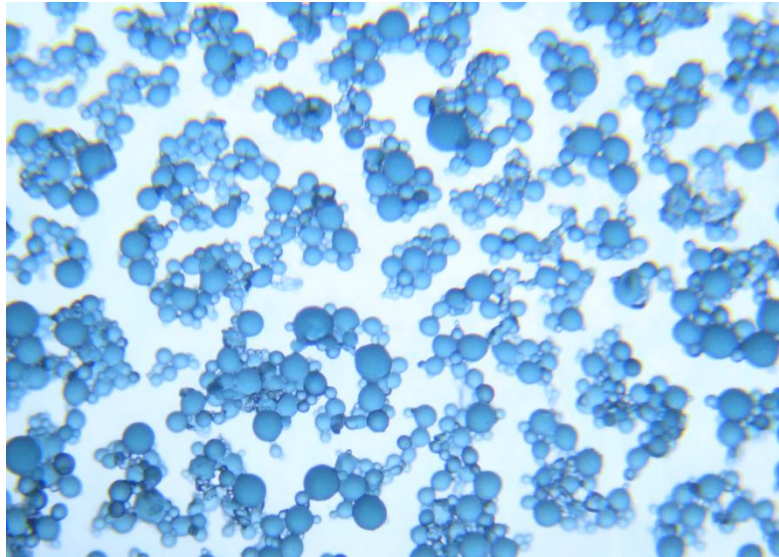


Figura 3-2: Exemplo de microsferas obtidas pelo método de emulsão água-em-óleo utilizado.

Uma vez preparadas, as microsferas foram submetidas a análise por espectroscopia de FTIR para avaliação da extensão da reacção de reticulação, e a análise de imagem para averiguar o impacto na morfologia, tamanho médio e na distribuição de tamanhos das mesmas.

É de notar que durante os ensaios verificou-se que as microsferas tendem a “partir” quando o tamanho aumenta, possivelmente devido à agitação da emulsão exercer mais tensão em entidades de maior tamanho. Um exemplo deste fenómeno é exibido na Figura 3.3. Observou-se ainda que com a diminuição do tamanho das microsferas, aumenta a dificuldade em manter as microsferas separadas após a preparação e durante a lavagem com éter de petróleo. De facto, elas tendem a agregar-se em resultado de haver um abaixamento da tensão superficial.

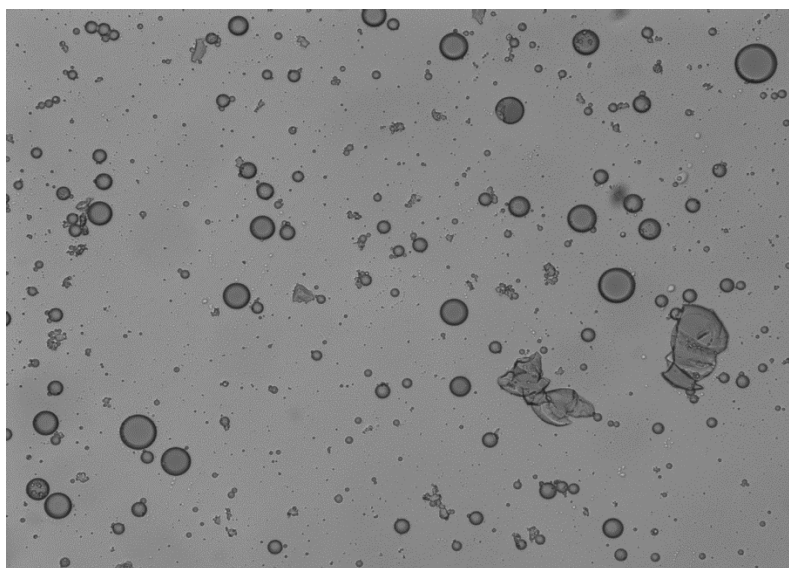


Figura 3-3: Exemplo de microsferas “partidas” devido à agitação da emulsão durante a preparação.

3.2. Espectroscopia de FTIR

A técnica de FTIR é comumente utilizada na caracterização química de materiais, designadamente na detecção de alterações na estrutura química de materiais poliméricos, como é o caso presente. De facto, a técnica de FTIR foi aqui utilizada para avaliar possíveis alterações na estrutura química das microsferas, resultantes da reacção entre o quitosano e o agente de reticulação usado, o genipin.

3.2.1. Condições experimentais

Antes de proceder à análise por espectroscopia de FTIR, foi necessário liofilizar uma pequena quantidade de microsferas. Para tal, as microsferas foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e depois liofilizadas (num liofilizador Snijders Scientific type 2040, Tilburg, Holland) sob vácuo (0,50 mbar) a uma temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 dias, para garantir a sublimação de todo o solvente. As microsferas desidratadas foram reduzidas a pó e misturadas com brometo de potássio (KBr) (numa proporção de 0,8 mg de microsferas para 80 mg de KBr), para preparar pastilhas de 7 mm de diâmetro.

O espectro de absorção (na zona de infravermelhos) foi obtido num espectrofotómetro Jasco FTIR-4200 (Tokyo, Japan). O espectro foi registado a 32 scans e a uma resolução de 4 cm^{-1} , numa gama de números de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . O espectro de FTIR do quitosano em pó foi também registado.

3.3. Análise de imagem

Como se referiu na secção 2.6.2, a técnica de análise de imagem foi utilizada com o intuito de caracterizar do ponto de vista da forma, do tamanho e da distribuição de tamanhos as microsferas de quitosano reticuladas com genipin. Para averiguar a reprodutibilidade e a fiabilidade dos resultados obtidos foram realizados 2 ensaios para cada combinação de condições experimentais (definidas na secção 3.1.1).

Na impossibilidade de proceder à análise de imagem de todas as microsferas produzidas para cada ensaio realizado, foram retiradas três gotas da emulsão água-em-óleo, colocadas em lâminas e fixadas com lamela para a posterior aquisição de imagens. As imagens foram adquiridas consecutivamente, num esquema de varrimento que implicou a divisão de cada lâmina em três secções (superior, central e inferior) no sentido longitudinal, para garantir a obtenção da maior variabilidade de objectos presentes na preparação. Este esquema de varrimento possibilitou a aquisição de um mínimo de 50 imagens por lâmina.

Cada imagem adquirida com a câmara Leica[®] acoplada ao microscópio óptico, foi tratada através de uma sequência de operações de manipulação com recurso ao *software* ImageJ (secção 2.6.2), de forma a facilitar a contagem e caracterização das microsferas obtidas.

De seguida, descreve-se a sequência de operações usada para o tratamento de imagem com o *software* em causa. Esta descrição irá ser acompanhada, sempre que possível, com a sequência de imagens correspondentes (Figura 3.4). Para tal, foi escolhida uma imagem que permite exemplificar todas as manipulações sofridas, bem como o resultado final a partir do qual são contabilizados os parâmetros em estudo.

A imagem representada na Figura 3.4 a) apresenta algumas “anomalias” nomeadamente, a presença de um objecto alongado, tipo fibra (canto superior direito), e a existência de muito ruído (canto superior esquerdo), que podem dar aso a uma interpretação incorrecta por parte do *software*, caso a imagem não seja tratada de modo conveniente. Além disso, a imagem exhibe algumas microsferas juntas, que na ausência de manipulação seriam contabilizadas como uma só, ou não seriam contabilizadas por não cumprirem os requisitos de circularidade que irão ser impostos. Nesta imagem, é ainda possível observar a heterogeneidade de tamanhos das microsferas.

Antes de proceder à binarização desta imagem, e por forma a não excluir objectos da mesma, procede-se a um melhoramento da imagem através do aumento de contraste objecto/meio (Figura 3.4 b)). Uma vez aumentado o contraste da imagem (de facto pode verificar-se que todas as microsferas apresentam uma maior definição em relação ao meio), segue-se a sua binarização. Esta operação transforma a imagem em tons de cinza numa imagem a preto (objecto) e branco (meio), tal como apresentado na Figura 3.4 c). No caso do *software* utilizado, a binarização é feita automaticamente, sem que o utilizador tenha de proceder à determinação do *threshold*.

No entanto, o binário da imagem pode apresentar alguns problemas, nomeadamente a nível do interior das microsferas. Estes problemas ocorrem com regularidade, dado que as microsferas apresentam muita transparência e reflectividade. Assim, há que executar uma nova operação, disponível no *software*, que visa preencher por completo o interior das microsferas (Figura 3.4 d)).

Todavia, na Figura 3.4 d) são ainda visíveis as “anomalias” detectadas na imagem original (Figura 3.4 a)). O *software* utilizado possibilita, através da aplicação de filtros, isto é, valores máximos e/ou mínimos para determinado parâmetro (por exemplo para a área, para a circularidade, etc), a eliminação, para cada imagem, dos objectos “indesejáveis”.

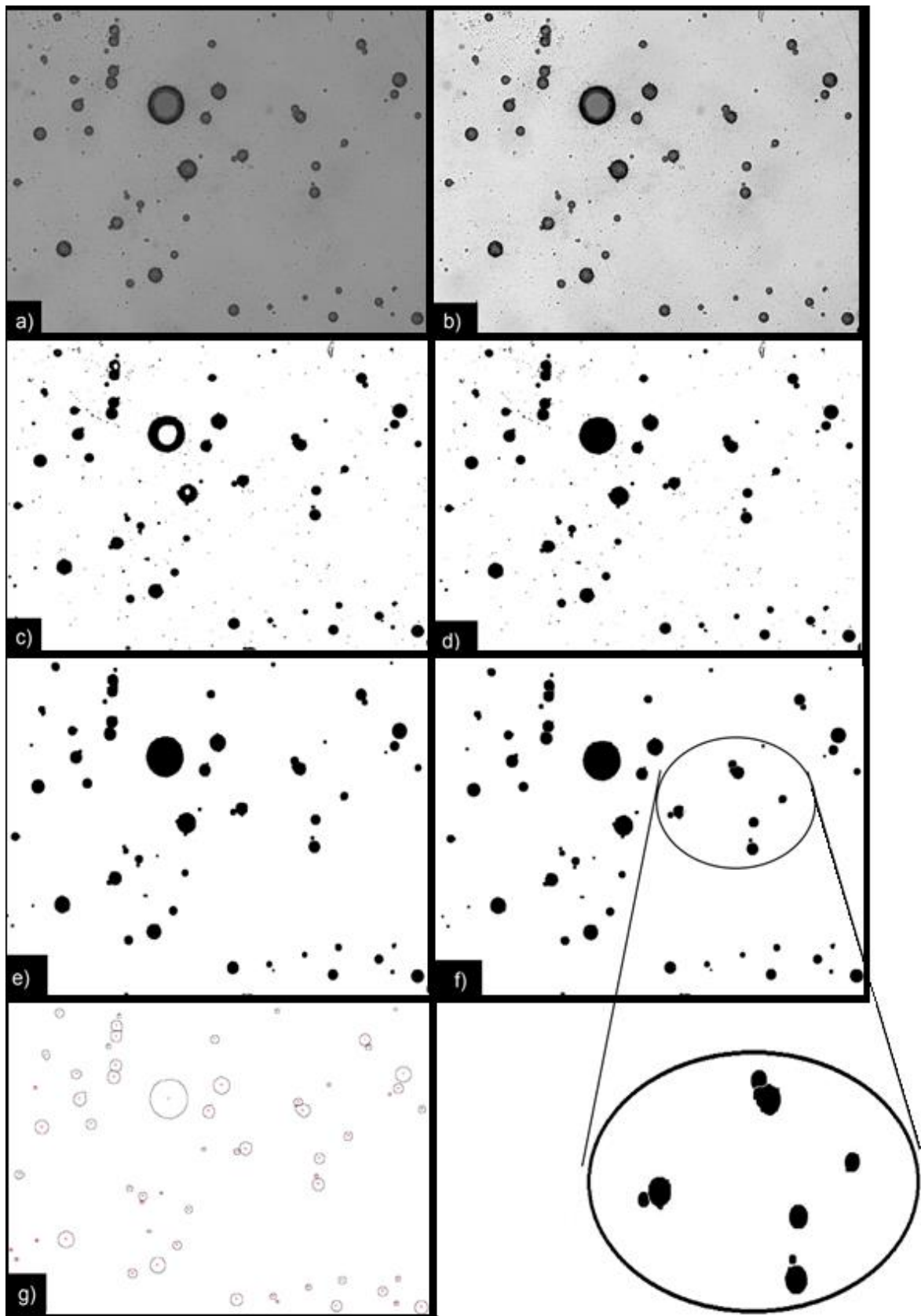


Figura 3-4: Sequência de imagens correspondentes a cada operação utilizada na caracterização das microsferas por análise de imagem. a) imagem adquirida ao microscópio óptico, b) imagem melhorada através do aumento de contraste objecto/meio, c) imagem binarizada, d) imagem obtida após o preenchimento do interior das microsferas, e) imagem obtida após a remoção dos objectos residuais “indesejáveis”, f) imagem obtida após a separação das microsferas juntas, g) imagem das microsferas contabilizadas, exibindo os pixel/fronteira.

No caso presente, isto é conseguido impondo dois filtros: um para a área mínima dos objectos e outro para a circularidade dos mesmos. Os valores impostos basearam-se num estudo preliminar em que se verificou que uma área de 9 *pixel* (3^2 *pixel*) e uma circularidade de 0,8 correspondiam a valores mínimos daqueles parâmetros apresentados pelas microsferas. Desta forma, foi possível excluir todos os objectos com área inferior a 9 *pixel* (como por exemplo objectos provenientes da ocorrência de ruído) e circularidade inferior a 0,8 (como é o caso de objectos com forma alongada). Além disso, as microsferas cuja área total não se encontre dentro do campo visual do microscópio óptico, não são consideradas, evitando assim erros associados à contabilização de áreas incompletas. O efeito desta manipulação encontra-se patente na Figura 3.4 e).

Como foi referido anteriormente, na imagem inicial são visíveis microsferas juntas. Para evitar erros de contagem relacionados com este fenómeno, é feita a separação das microsferas utilizando a ferramenta *watershed* do *software* ImageJ, que detecta dois objectos juntos e processa automaticamente a sua separação. Um exemplo de aplicação desta funcionalidade é apresentado na Figura 3.4 f), em particular na ampliação correspondente a uma pequena área da imagem.

Por último, é contabilizado o número de microsferas presentes na imagem e determinado o perímetro de cada uma, através do número de *pixel* que faz fronteira entre o objecto e o meio (Figura 3.4 g).

Todos os objectos presentes numa imagem foram contados e medidos automaticamente, através da execução sequencial do conjunto de operações descritas. Para cada imagem analisada foi criada uma folha de cálculo com os parâmetros medidos para cada microsfera, nomeadamente a área, o perímetro, a circularidade, os diâmetros de Feret (mínimo e máximo) e o factor de forma (AR).

Um dos problemas que surge frequentemente em análise de imagem é o da representatividade da amostra, já que as quantidades depositadas numa lâmina são muito pequenas. De modo a ter um critério de paragem que não fosse aleatório e fosse aplicável à medição dos vários parâmetros, adoptou-se um critério já anteriormente utilizado e presente na literatura (Moura, 1999). Calculou-se, com base no número de análises da amostra, uma distribuição t-student com um grau de probabilidade de 95% e n-1 graus de liberdade, e com base nesta distribuição, calculou-se o desvio padrão dos valores da amostra. Como critério de paragem para a assunção do valor da média procedeu-se à inclusão de microsferas até que o valor do desvio padrão fosse de 5% em relação à média, pelo que os valores obtidos apresentam um coeficiente de variação de 5%. De acordo com este procedimento o número de microsferas analisado, por ensaio, foi cerca de 1000.

As variáveis área, perímetro e diâmetro máximo e mínimo de Feret das microsferas, para que possam ser traduzidos em unidades métricas, necessitam de sofrer uma transformação de *pixel* para micrómetro, que é efectuada pela conversão directa fornecida pelo *software*

da câmara *Leika*® (numa ampliação de 10×, 66 *pixel* corresponde a 50 micrómetros e numa ampliação de 20×, 66 *pixel* corresponde a 100 micrómetros). Para efeitos de demonstração da conversão, será usado o exemplo do diâmetro equivalente das microsferas analisadas.

O tratamento é iniciado com a obtenção da área das microsferas preparadas, em $pixel^2$, que é posteriormente convertido para micrómetro² (μm^2). Para esse efeito faz-se a conversão entre $pixel^2$ e μm^2 , segundo a equação (3.1), válida para uma ampliação de 10×.

$$A (\mu m^2) = \frac{A (pixel^2) * 50^2}{66^2} \quad (3.1)$$

Após a conversão em μm^2 , a área das microsferas é transformada no diâmetro de uma esfera perfeita com a mesma área, vulgo o seu diâmetro equivalente (d). A transformação é feita a por recurso à equação (3.2).

$$d = 2 \sqrt{\frac{A (\mu m^2)}{\pi}} \quad (3.2)$$

Partindo do diâmetro equivalente calculado, foi calculado o valor médio dos diâmetros d_m da distribuição de microsferas. O valor médio foi obtido fazendo a divisão do somatório dos valores do diâmetro equivalente referentes a cada uma das microsferas pelo número de microsferas distintas (n), tal como indicado na equação (3.3):

$$d_m = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n} \quad (3.3)$$

onde d_i é o diâmetro equivalente da microsfere i .

A base de cálculo para o perímetro das microsferas produzidas passa pela obtenção dos valores de perímetro em *pixel* fornecidos pelo *software* ImageJ, o qual é sucessivamente transformando em micrómetro através da conversão facultada pelo *software* da câmara *Leika*®. A conversão dos diâmetros máximo e mínimo de Feret foi efectuada do mesmo modo.

Para os parâmetros circularidade e AR foram apenas calculadas as médias, uma vez que sendo grandezas adimensionais não carecem de conversão de unidades.

Capítulo 4 – Apresentação e Discussão de Resultados

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos relativos à preparação de microsferas de quitosano reticuladas com genipin através do método de emulsão água-em-óleo.

Inicialmente caracteriza-se o plano de experiências levado a cabo e, posteriormente, analisam-se os resultados quanto à influência de três factores (concentração de quitosano, concentração de genipin e velocidade de agitação) na distribuição de um conjunto de propriedades de tamanho (diâmetro equivalente, perímetro e diâmetros de Feret) e forma (circularidade e factor de forma) das micropartículas medidas por análise de imagem.

Numa primeira instância, a análise centra-se na forma das distribuições (curvas cumulativa e de frequência), a seguir nos parâmetros médios das propriedades, bem como na sua variabilidade. Finalmente, é estatisticamente testada a influência de cada um dos factores nos parâmetros médios, usando a ANOVA segundo um modelo linear multifactorial.

4.1. Plano de ensaios para a preparação de microsferas

A definição dos principais factores com influência nas propriedades das microsferas teve por base estudos de literatura (Harris, Lecumberri, & Heras, 2010; Ko, Park, Hwang, Park, & Lee, 2002). Com base neste quadro de conhecimento, foram definidas como variáveis controladas relevantes para as características dimensionais de tamanho e de forma das microsferas:

1. a concentração de quitosano;
2. a concentração de reticulante (genipin);
3. a velocidade de agitação.

Estas variáveis foram modificadas discretamente segundo o plano de experiências mostrado na Tabela 4.1. É de notar que o plano em causa é do tipo cuboidal, com os factores (variáveis controladas) variados à vez em dois níveis, considerados extremos relativamente à produção de micropartículas.

A execução dos ensaios fez-se de acordo com o procedimento indicado na secção 3.1.1 enquanto a caracterização dimensional das microsferas foi feita com base em análise de imagem, de acordo com o descrito na secção 3.3.

Tabela 4.1: Plano de experiências levado a cabo para análise da influência dos factores: concentração de quitosano, concentração de genipin e velocidade de agitação, no tamanho e na forma das microsferas.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentração de quitosano (% m/m)	1	1	1	1	2	2	2	2
Concentração de genipin (% relativa ao polímero, m/m)	1	6	1	6	1	6	1	6
Velocidade de agitação (rpm)	400	400	800	800	400	400	800	800

No final de cada um dos ensaios (após 6 horas de reacção), as microsferas resultantes foram separadas da fase contínua (parafina líquida), lavadas com benzina e secas ao ar. A Figura 4.1 mostra um exemplar de uma imagem obtida ao microscópio óptico das microsferas produzidas pelo método de emulsão água-em-óleo.

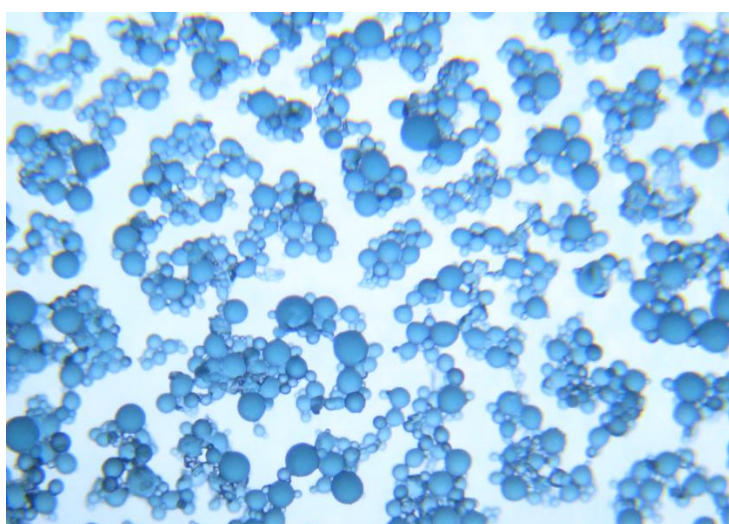


Figura 4-1: Exemplo de microsferas de quitosano reticuladas com genipin, obtidas pelo método de emulsão água-em-óleo.

Como se pode ver, as microsferas apresentam elevada esfericidade e uma coloração verde-azulada, resultado da reacção de reticulação entre o quitosano e o genipin. Além disso, pode observar-se pela Figura 4.1 uma certa tendência para a aglomeração, muito provavelmente devido ao facto de as microsferas se encontrarem secas.

4.2. Caracterização do mecanismo de reticulação por espectroscopia de FTIR

A ocorrência da reacção de reticulação entre os grupos amina do quitosano e a molécula de genipin foi confirmada por espectroscopia de FTIR.

A Figura 4.2 exhibe o espectro do quitosano juntamente com o espectro das microsferas de quitosano reticuladas com genipin.

As alterações na estrutura química das microsferas podem ser reveladas pelo desvio do pico atribuído à vibração do grupo carbonilo, dos grupos amida presentes nas unidades acetiladas do quitosano, de 1645 cm^{-1} para 1637 cm^{-1} , e pelo desvio do pico atribuído às aminas primárias de 1586 cm^{-1} para 1583 cm^{-1} . Além disso, a intensidade de absorção do sinal a 1586 cm^{-1} diminuiu no espectro das microsferas reticuladas, o que pode também confirmar a reacção entre os grupos amina do quitosano e a molécula de genipin. Foi com base em observações similares que outros autores (Butler, Pudney, & Ng, 2003) estabeleceram o mecanismo de reticulação químico entre o quitosano e o genipin (Figura 2.7).

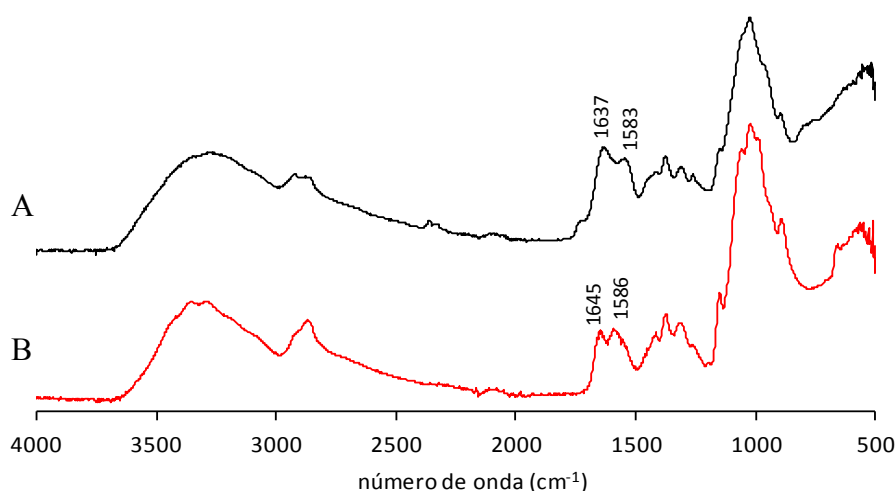


Figura 4-2: Espectros de FTIR: (A) do quitosano e (B) das microsferas de quitosano reticuladas com genipin.

4.3. Análise das distribuições das variáveis de tamanho e forma

De modo a verificar se as distribuições dos valores tomados pelos parâmetros estudados se aproximam de distribuições normais, foram representadas as distribuições para cada parâmetro. Para cada uma das variáveis de tamanho e de forma foram comparadas as distribuições com o intuito de detectar evidências a olho nu.

Com o propósito de simplificar a apresentação das distribuições e analisar o seu impacto nas propriedades, foi utilizada uma nomenclatura simples com base nas condições de preparação das microsferas que permite facilmente reconhecer a que condições estão associadas as curvas de distribuição mostradas. Assim, a terminologia indica apenas a percentagem de quitosano e genipin utilizado no ensaio em questão, bem como a velocidade de agitação que foi usada no mesmo, podendo ser descrita por xCHyGEzzz, em que x indica a concentração de quitosano (1 ou 2%), y a de genipin (1 ou 6%), e zzz a velocidade de agitação (400 ou 800 rpm).

Tabela 4.2: Tabela indicativa da terminologia utilizada para a apresentação das distribuições das microsferas preparadas.

Concentração de quitosano (%)	Concentração de genipin (%)	Velocidade de agitação (rpm)	
		400	800
1	1	1CH1GE400	1CH1GE800
	6	1CH6GE400	1CH6GE800
2	1	2CH1GE400	2CH1GE800
	6	2CH6GE400	2CH6GE800

A seguir, analisa-se em maior detalhe o efeito da variação dos factores em cada uma das propriedades, de tamanho e de forma, consideradas.

4.3.1. Impacto no diâmetro equivalente

As curvas de distribuição cumulativa e de frequência apresentadas na Figura 4.3 mostram o efeito da variação de cada um dos factores avaliados no presente estudo, nomeadamente a concentração de polímero, a concentração de reticulante e a velocidade de agitação, no diâmetro equivalente (equação 2.1) das microsferas de quitosano reticuladas com genipin pelo método de emulsão água-em-óleo. Para todas as condições experimentais as curvas de distribuição aproximam-se de distribuições log-normal.

O impacto da concentração de quitosano (1 e 2%, m/m) no diâmetro equivalente das microsferas produzidas é mostrado na Figura 4.3 (a1 e a2), para a mesma concentração de reticulante (1%) e para as velocidades de agitação de 400 e 800 rpm. Os resultados indiciam que concentrações de polímero mais elevadas conduzem a microsferas de maior tamanho. Isto acontece porque quanto maior for a concentração polimérica, maior é a viscosidade da solução, o que leva à formação de gotículas maiores durante o processo de emulsificação, que vão dar origem, naturalmente, a microsferas de maiores dimensões (Kawadakar & Chauhan, 2012). A análise das curvas de frequência da Figura 4.3 (a1 e a2) permite, ainda, concluir que as microsferas obtidas com soluções de quitosano de concentração mais elevada (2CH1GE400 e 2CH1GE800) exibem uma maior variabilidade de tamanhos (curvas de distribuição de frequência mais alargadas) que as obtidas com soluções poliméricas mais diluídas (1CH1GE400 e 1CH1GE800).

A concentração do reticulante é um parâmetro determinante na obtenção de microsferas bem formadas (estáveis). O efeito deste parâmetro nas curvas de distribuição de tamanhos (cumulativa e de frequência) das microsferas é exibido na Figura 4.3 (b1 e b2). Como referido anteriormente, depois de obtida a emulsão de quitosano em parafina líquida segue-se a adição, gota a gota, da solução de reticulante (solução de genipin), originando a reticulação das microsferas de quitosano a partir da superfície. Como se vê pelas distribuições apresentadas na Figura 4.3 (b1 e b2) para duas concentrações de genipin: 1 e 6 %, o aumento da carga de reticulante motiva um aumento da dimensão das microsferas (Karnchanajindanun, Srisa-ard, Srihanam, & Baymark, 2010). Este facto pode ser

explicado pela rápida reticulação da superfície para concentrações de genipin mais elevadas, impedindo a difusão do solvente (água) do polímero que forma as gotículas para a fase contínua (parafina) da emulsão e a conseqüente redução do tamanho das microsferas (Phromsopha & Baymark, 2010). Além disso, as curvas representadas na Figura 4.3 (b1 e b2) mostram que o efeito da concentração de genipin no tamanho das microsferas é mais relevante para concentrações de polímero mais baixas e para velocidades de agitação maiores (Figura 4.3 (b1)).

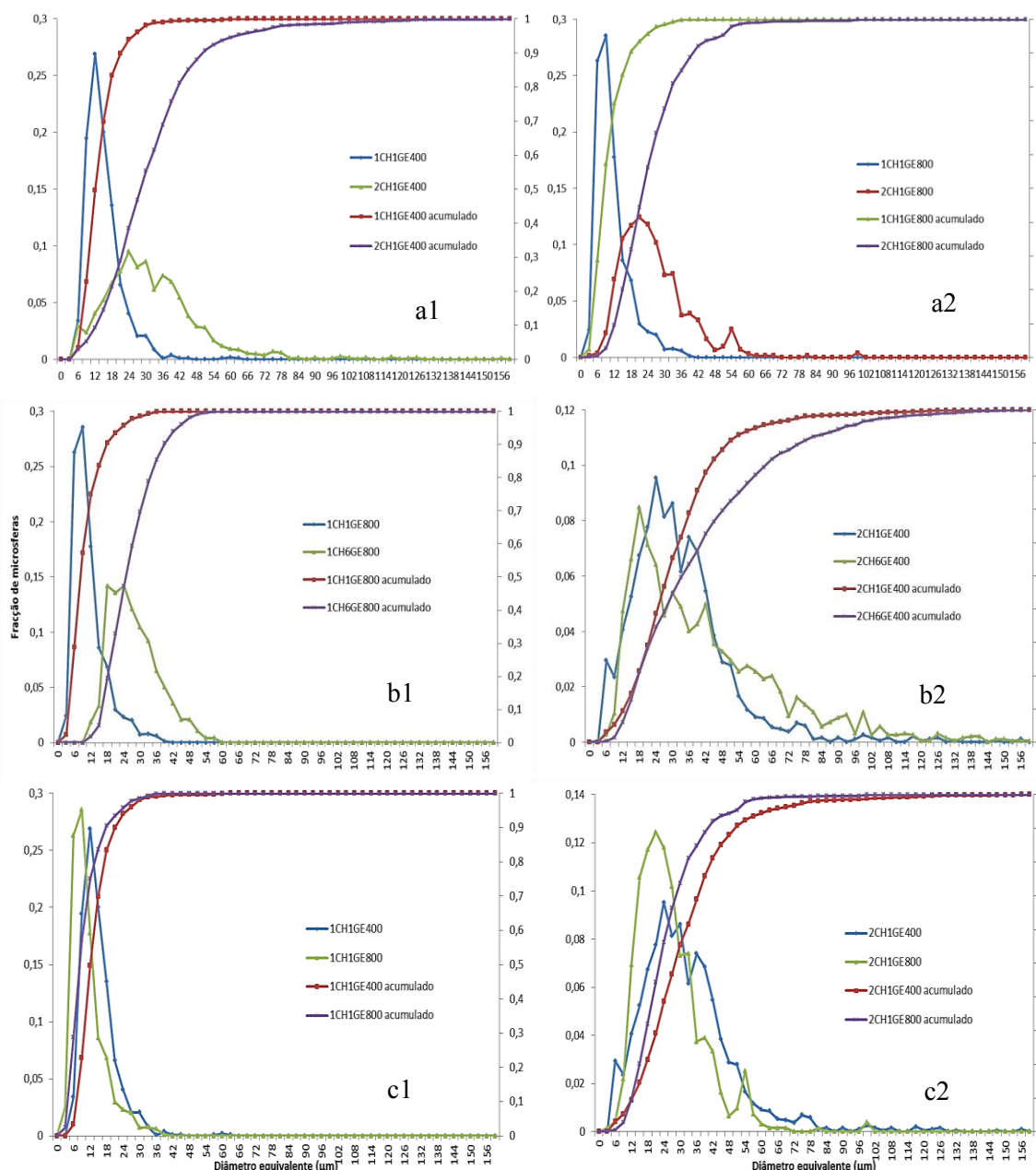


Figura 4-3: Curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) para o diâmetro equivalente de microsferas de quitosano reticuladas com genipin: a1 e a2 – efeito da concentração de quitosano (1 e 2 %); b1 e b2 – efeito da concentração de genipin (1 e 6 %); c1 e c2 – efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm).

Por último, o impacto da velocidade de agitação (400 rpm e 800 rpm) no diâmetro equivalente das microsferas está patente nas curvas de distribuição exibidas na Figura 4.3 (c1 e c2) para a mesma concentração de reticulante (1%) e para as concentrações de polímero 1 e 2 %. Como se sabe, o aumento da velocidade de agitação melhora a dispersão das gotículas da emulsão e, conseqüentemente, previne a agregação e a coalescência. Como resultado, verifica-se uma diminuição da dimensão das microsferas para velocidades de agitação superiores (1CH1GE800 e 2CH1GE800).

Em suma, as distribuições representadas na Figura 4.3 e, de um modo geral, os resultados de todos os ensaios efetuados, permitem concluir que o diâmetro equivalente das microsferas de quitosano reticuladas com genipin diminui com a diminuição quer da concentração de polímero quer da concentração de reticulante e com o aumento da velocidade de agitação. Tendências semelhantes, para a produção de microsferas com o mesmo sistema, são descritas na literatura (Kawadakar & Chauhan, 2012; Karnchanajindanun, Srisa-ard, Srihanam, & Baymark, 2010; Phromsopha & Baymark, 2010).

4.3.2. Impacto no perímetro

Em estudos que envolvam análise de sistemas de partículas, o perímetro é uma propriedade que agrega aspectos que são comuns a medidas quer de tamanho quer de forma, uma vez que quanto mais regular for a superfície de uma partícula, mais consistente é o seu perímetro. Ou seja, o perímetro está relacionado não só com o tamanho de uma partícula (quanto maior for o seu tamanho obviamente maior será o seu perímetro) mas também com a forma desta. Por outras palavras, duas partículas com a mesma área projectada (portanto, com igual tamanho) podem exibir valores de perímetro muito diferentes, bastando por exemplo, uma delas possuir uma superfície mais irregular ou uma forma mais alongada. Assim sendo, as distribuições com base nesta propriedade, só por si, não permitem inferir acerca do tamanho das partículas.

Na Figura 4.4 encontram-se representadas as curvas de distribuição cumulativa e de frequência que traduzem o efeito da variação de cada factor estudado no perímetro das microsferas (secção 2.6.2).

À semelhança das curvas de distribuição de diâmetros (Figura 4.3), também as curvas de distribuição de perímetros tendem para distribuições log-normal. Além disso, para todos os ensaios experimentais verificam-se as mesmas tendências que as observadas para o diâmetro equivalente, ou seja, concentrações mais baixas de quitosano e de reticulante e velocidades de agitação mais elevadas conduzem a microsferas com menor perímetro. Neste caso, poder-se-á dizer, muito provavelmente, que esta situação ocorre devido ao facto de as partículas também possuírem menor dimensão.

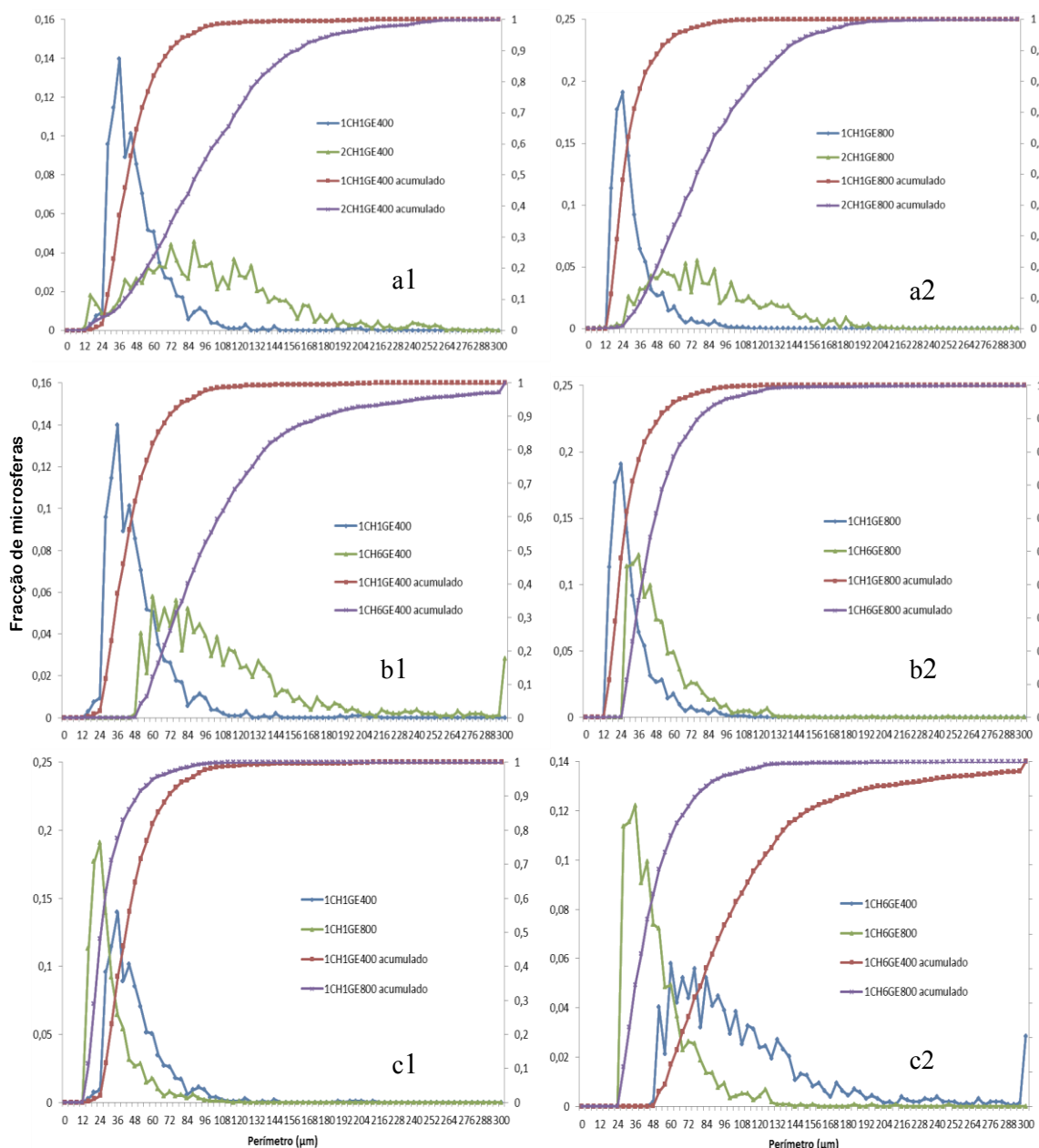


Figura 4-4: Curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) para o perímetro de microsferas de quitosano reticuladas com genipin: a1 e a2 – efeito da concentração de quitosano (1 e 2 %); b1 e b2 – efeito da concentração de genipin (1 e 6 %); c1 e c2 – efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm).

Relativamente às curvas de distribuição de frequência da Figura 4.4, as microsferas com maior perímetro apresentam distribuições mais alargadas (ou seja, uma maior variabilidade) face às distribuições exibidas pelas microsferas de menor perímetro.

4.3.3. Impacto nos diâmetros máximo e mínimo de Feret

Conforme mencionado na secção 2.6.2, os diâmetros de Feret medidos pelo *software* ImageJ são definidos como a maior (diâmetro de Feret máximo) e a menor (diâmetro de Feret mínimo) distância de paquímetro medida na partícula.

Para todos os ensaios realizados, os diâmetros de Feret (máximo e mínimo) apresentam distribuições muito semelhantes às representadas na Figura 4.5. Como pode ser observado na Figura 4.5 a1 e a2, o comportamento das duas curvas (curva do diâmetro de Feret máximo e curva do diâmetro de Feret mínimo) é praticamente coincidente, o que pode indicar, desde logo, valores de circularidade e de factor de forma próximos da unidade, ou seja, microsferas com elevada esfericidade.

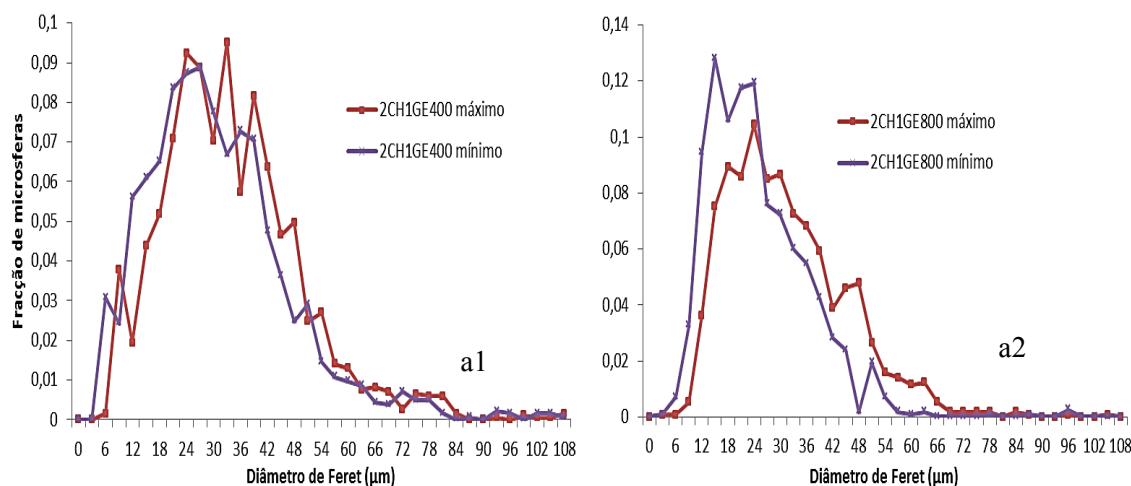


Figura 4-5: Curvas de distribuição de frequência típicas para os diâmetros de Feret (máximo e mínimo) de microsferas obtidas para uma concentração de quitosano de 2% e de genipin de 1%, para duas velocidades de agitação: a1 – 400 rpm e a2 – 800 rpm.

De seguida analisa-se e discute-se o impacto dos vários factores na forma das partículas, designadamente na circularidade e no factor de forma (AR).

4.3.4. Impacto na circularidade

Como anteriormente referido (secção 3.3) foi utilizado um filtro para a circularidade pelo que apenas partículas com circularidade superior a 0,8 foram contabilizadas pelo *software* de análise de imagem. As curvas de distribuição cumulativa e de frequência apresentadas na Figura 4.6 mostram o efeito da variação de cada um dos factores na circularidade das microsferas de quitosano reticuladas com genipin (equação 2.1). Recorde-se que a circularidade está relacionada com a esfericidade da partícula sendo que uma partícula perfeitamente esférica apresenta um valor daquela propriedade igual a 1. Quanto mais afastado o valor se encontrar da unidade mais alongada é a partícula.

Pela análise de todas as curvas de frequência apresentadas na Figura 4.6 e, de um modo geral, para todos os ensaios efectuados, a moda (valor da circularidade para o qual ocorre a maior frequência de partículas) surge para valores superiores a 0,9, o que indica que as microsferas obtidas, para diferentes condições experimentais, apresentam elevada esfericidade.

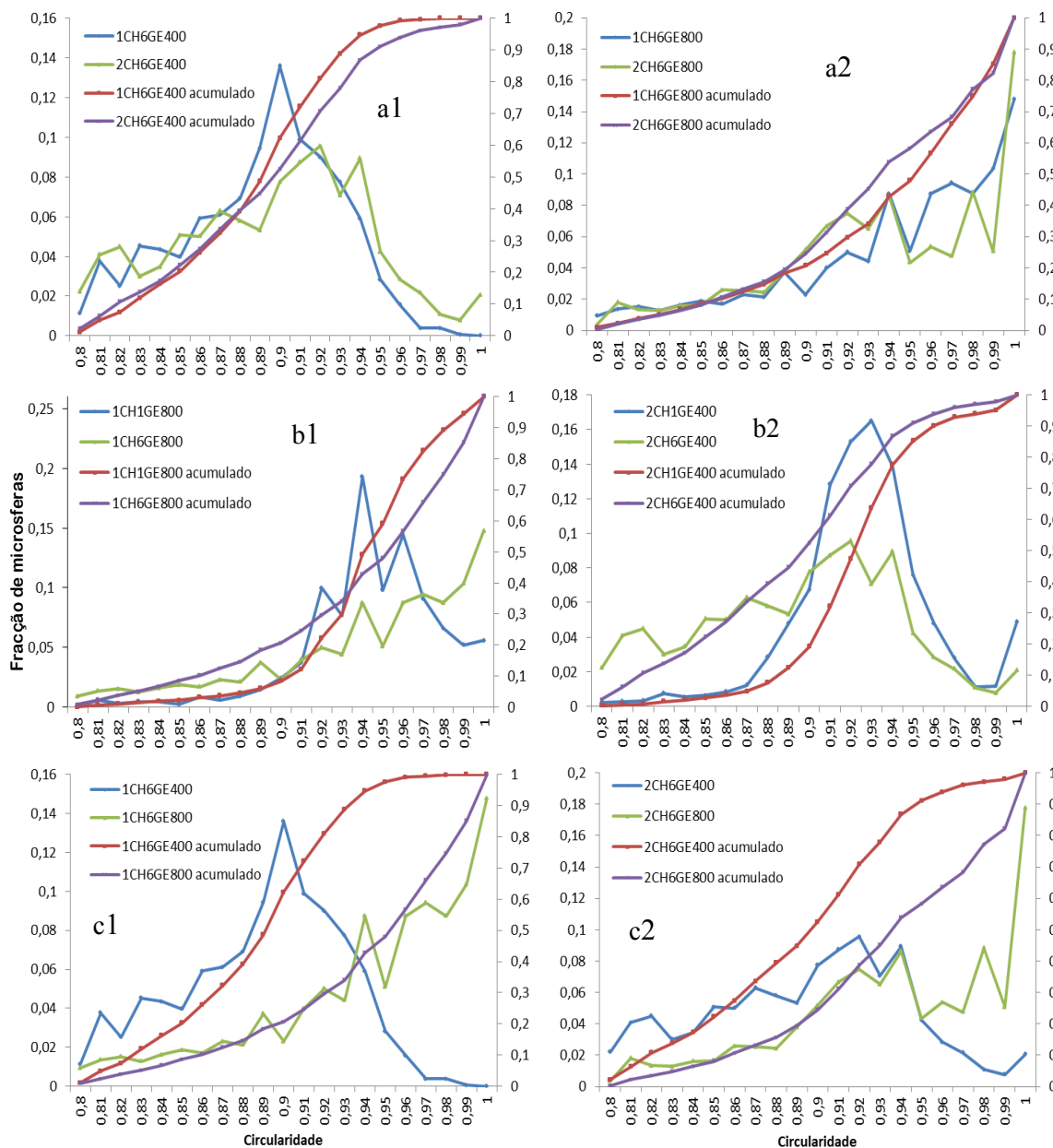


Figura 4-6: Curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) para a circularidade de microsféricas de quitosano reticuladas com genipin: a1 e a2 – efeito da concentração de quitosano (1 e 2 %); b1 e b2 – efeito da concentração de genipin (1 e 6 %); c1 e c2 – efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm).

Relativamente ao impacto de cada factor neste parâmetro de forma, a concentração de quitosano parece não revelar qualquer efeito sobre a circularidade das microsféricas (Figura 4.6 (a1 e a2)) embora as condições experimentais correspondentes às curvas representadas apontem para um impacto significativo da velocidade de agitação naquela propriedade.

As distribuições correspondentes ao impacto da concentração de genipin na circularidade mostram-se inconclusivas (Figura 4.6 (b1 e b2)).

Por último, e como já avançado, a velocidade de agitação afecta significativamente a circularidade das microsferas sendo que valores de agitação mais elevados produzem partículas com circularidade muito próxima de 1 (Figura 4.6 (c1 e c2)).

4.3.5. Impacto no factor de forma AR

Em primeiro lugar deve salientar-se que o factor de forma (AR) foi medido, pelo *software* de análise de imagem, para todas as microsferas com circularidade superior ou igual a 0,8. Em segundo lugar, os valores superiores à unidade estão relacionados com o modo como foi definida esta propriedade no presente trabalho (equação 2.3).

Relativamente ao impacto de cada um dos factores estudados nas propriedades de forma, designadamente no factor de forma, não foi possível estabelecer qualquer correlação como é evidenciado, a título de exemplo, pelas curvas de distribuição do factor de forma exibidas na Figura 4.7. Esta figura mostra o efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm) no factor de forma de microsferas obtidas a partir de formulações com as concentrações mais baixas e mais elevadas, quer de polímero quer de reticulante (1CH1GE400 e 1CH1GE800 versus 2CH6GE400 e 2CH6GE800). De facto, as curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) não denotam diferenças significativas para as duas velocidades de agitação testadas.

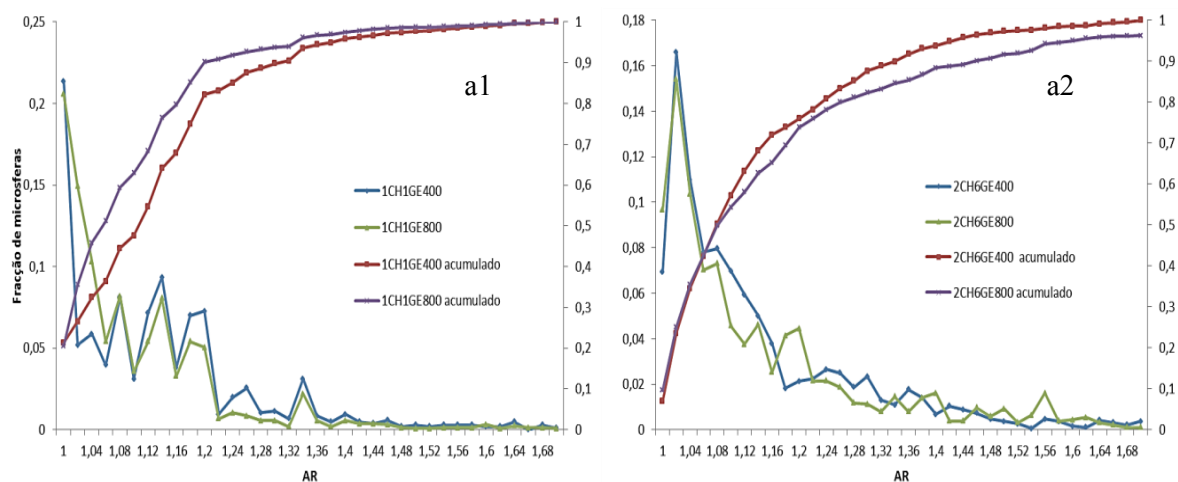


Figura 4-7: Curvas de distribuição (cumulativa e de frequência) para o factor de forma (AR) de microsferas de quitosano reticuladas com genipin: efeito da velocidade de agitação (400 e 800 rpm) para formulações obtidas a partir de a1 – 1% de quitosano e 1% de genipin e a2 – 2% de quitosano e 6% de genipin.

4.4. Efeito dos factores nos momentos das distribuições das propriedades

Os resultados apresentados nesta secção representam os momentos das distribuições obtidos para cada ensaio realizado. Aqui o primeiro momento é caracterizado pelo valor médio da propriedade e o segundo pelo desvio padrão. Todavia, tal como referido na secção 3.3, todos os valores foram obtidos com um desvio padrão de 5% relativamente ao valor médio, para um intervalo de confiança de 95%.

A Tabela 4.3 resume os valores médios para cada uma das propriedades medidas, quer de tamanho quer de forma, das microsferas de quitosano reticuladas com genipin.

Tabela 4.3: Factores variados e respectivos valores médios das propriedades avaliadas por análise de imagem para as microsferas de quitosano preparadas pelo método de emulsão água-em-óleo.

% CH	%GE	RPM	Diâmetro equivalente (μm)	Perímetro (μm)	Máximo de Feret (μm)	Mínimo de Feret (μm)	Circularidade	AR
1	1	400	14,81	47,04	19,19	13,87	0,94	1,12
1	1	800	10,47	31,96	11,51	9,03	0,95	1,08
1	6	400	32,70	107,21	37,98	29,35	0,88	1,17
1	6	800	21,91	71,67	26,67	19,05	0,90	1,19
2	1	400	31,43	101,16	33,28	29,78	0,92	1,12
2	1	800	23,60	81,80	28,84	25,83	0,91	1,20
2	6	400	38,69	128,29	44,33	36,21	0,90	1,13
2	6	800	30,57	100,93	35,04	28,23	0,91	1,09

CH – quitosano; GE – genipin; RPM – velocidade de agitação; AR – factor de forma

Conforme pode ser visualizado na Tabela 4.3, as formulações preparadas com a concentração de quitosano e de reticulante de 1% (as mais baixas testadas) e sujeitas à velocidade de agitação de 400 e 800 rpm (1CH1GE400 e 1CH1GE800) produziram as microsferas de diâmetro equivalente médio mais pequeno, cerca de 15 e 10 μm , respectivamente. A estas formulações correspondem, também, os valores mais baixos quer de perímetro quer de diâmetros de Feret. Por outro lado, as mesmas microsferas apresentam os valores mais elevadas para a circularidade (0,94 e 0,95, respectivamente) enquanto os valores do factor de forma (AR) são, praticamente, os mais próximos da unidade (1,12 e 1,08, respectivamente).

De sublinhar que a análise do tamanho das microsferas apenas com base nos valores médios das propriedades pode ser demasiado simplista pelo que deverá sempre ter-se em conta a largura das distribuições. Todavia, pelas curvas apresentadas na Figura 4.3, as microsferas resultantes das formulações em questão (1CH1GE400 e 1CH1GE800) são, também, as que exibem distribuições mais apertadas de diâmetros.

Decorrente da análise da Tabela 4.3, é possível identificar algumas relações entre os factores variados (concentração de quitosano, concentração de reticulante e velocidade de agitação) e algumas propriedades de tamanho exibidas pelas microsferas (diâmetro equivalente, perímetro e diâmetros de Feret). Todavia, a relação entre os factores e as propriedades de forma (circularidade e factor de forma) não parecem tão evidentes.

Assim, como já concluído através da análise das distribuições da Figura 4.3, o diâmetro equivalente médio das microsferas diminui para concentrações de polímero e de agente reticulante mais baixas e velocidades de agitação da emulsão W/O mais elevadas. A mesma tendência de variação é seguida pelos valores médios do perímetro das microsferas.

Relativamente aos diâmetros máximo e mínimo de Feret, observa-se o aumento de ambos com a diminuição da velocidade de agitação a que é sujeita a emulsão água-em-óleo durante a preparação das microsferas. A concentração da solução de quitosano e a concentração de reticulante afectam os diâmetros de Feret (máximo e mínimo) na medida em que estes aumentam com o aumento de ambas as concentrações. Por último, a discrepância entre os valores médios de ambos os diâmetros, ainda que pequena (no mínimo $\sim 2 \mu\text{m}$ e no máximo $\sim 8 \mu\text{m}$), é explicada, naturalmente, pelo facto de as microsferas não apresentarem uma esfericidade perfeita, como pode ser comprovado pela análise dos valores médios da circularidade e do factor de forma.

Assim, em relação às propriedades de forma, a circularidade não denota uma relação directa com os factores estudados (os valores médios são muito próximos), no entanto, verifica-se que as microsferas de menor diâmetro apresentam os valores mais elevados de circularidade.

Por outro lado, à semelhança do que foi dito para a circularidade, também para o factor de forma (AR) não é possível estabelecer uma relação com os factores, embora os valores médios mais próximos da unidade pareçam corresponder às microsferas mais pequenas.

Finalmente, os valores médios apresentados na Tabela 4.3 apontam para uma ligeira relação entre as propriedades de tamanho e as propriedades de forma, ou seja, as microsferas mais pequenas, de menor diâmetro equivalente, são as que, aparentemente, apresentam maior esfericidade. Relação semelhante foi estabelecida por outros autores aquando da preparação de microsferas de fibroína de seda através do método de emulsão água-em-óleo, seguido de reticulação com genipin (Imsombut, Srisuwan, Srihanam, & Baimark, 2010).

As relações vislumbradas nesta secção, entre os factores e as propriedades de tamanho e de forma das microsferas, poderão ser demonstradas pelo estudo estatístico apresentado de seguida.

4.5. Análise estatística

Nesta secção apresentam-se os resultados da ANOVA, que foi levada a cabo com o intuito de robustecer algumas das observações qualitativas que emergem da análise visual das distribuições de frequência e dos seus primeiros momentos. Os testes de ANOVA foram efectuados com recurso ao *package* Statistica® (versão 7).

O modelo que representa o sistema é mostrado na Figura 4.8.

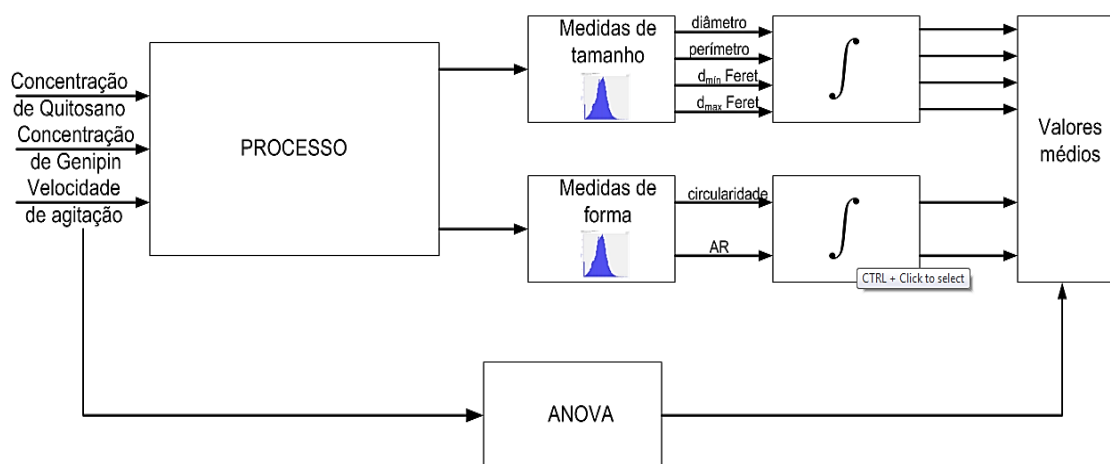


Figura 4-8: Representação esquemática do modelo conceitual do sistema.

4.5.1. ANOVA

A análise de variância foi efectuada para todos os factores em conjunto, vs uma variável de saída de cada vez, assumindo um nível de significância (α) de 5%. A média da distribuição de cada propriedade foi usada como medida agregada e, por isso, a ANOVA foi levada a cabo considerando que as variáveis de saída associadas a cada tratamento são quantificadas pela média.

A ANOVA envolve um teste de hipóteses, em que a primeira hipótese (hipótese nula) H_0 , implica que existe uma relação entre os factores (variáveis de entrada) e os parâmetros estudados (variáveis de saída), e a hipótese H_1 rejeita a existência de relação. Os valores p obtidos para o teste de hipóteses encontram-se na Tabela 4.4 encontrando-se assinalados a cor vermelha. Eles representam valores p inferiores ao nível de significância e estatisticamente validam a existência de uma relação entre os factores e as variáveis de saída (hipótese H_0).

Tabela 4.4: Valores p obtidos para os testes de ANOVA.

Parâmetros / Factores	Diâmetro equivalente (μm)	Perímetro (μm)	Máximo de Feret (μm)	Mínimo de Feret (μm)	Circularidade	Factor de Forma (AR)
Concentração de quitosano (%)	0,0074	0,0077	0,0091	0,0075	0,6609	0,9536
Concentração de genipin (%)	0,0079	0,0093	0,0063	0,0244	0,0772	0,6600
Velocidade de agitação (rpm)	0,0245	0,0350	0,0283	0,0500	0,6609	0,8922

Os resultados obtidos por ANOVA denotam que existem algumas relações com uma significância bastante acentuada entre os factores e os parâmetros de tamanho estudados, nomeadamente em relação ao diâmetro equivalente, ao perímetro e aos diâmetros máximo

e mínimo de Feret. Mais concretamente, o valor p apresentado para o diâmetro equivalente, em relação ao impacto da concentração de quitosano e concentração de genipin são muito reduzidos, de 0,0074 e 0,0079 respectivamente, que prova que estes factores tem de facto influência nos parâmetros dimensionais das microsferas. Esta influência pode ainda ser estendida para o perímetro e diâmetros máximo e mínimo de Feret, em relação à concentração de quitosano e de genipin. A Figura 4.9 mostra o efeito de alguns factores nalguns parâmetros. Nesta Figura, podemos verificar que a variação do diâmetro equivalente em resultado da variação da concentração de quitosano é significativa, sendo que não há qualquer tipo de sobreposição dos valores de diâmetro obtidos para os intervalos de confiança a 95%. A mesma análise denota que a velocidade de agitação é também um factor estatisticamente relevante no que diz respeito às características de tamanho das partículas. Estas conclusões estão em perfeita concordância com as observações que resultaram da análise qualitativa anteriormente levada a cabo.

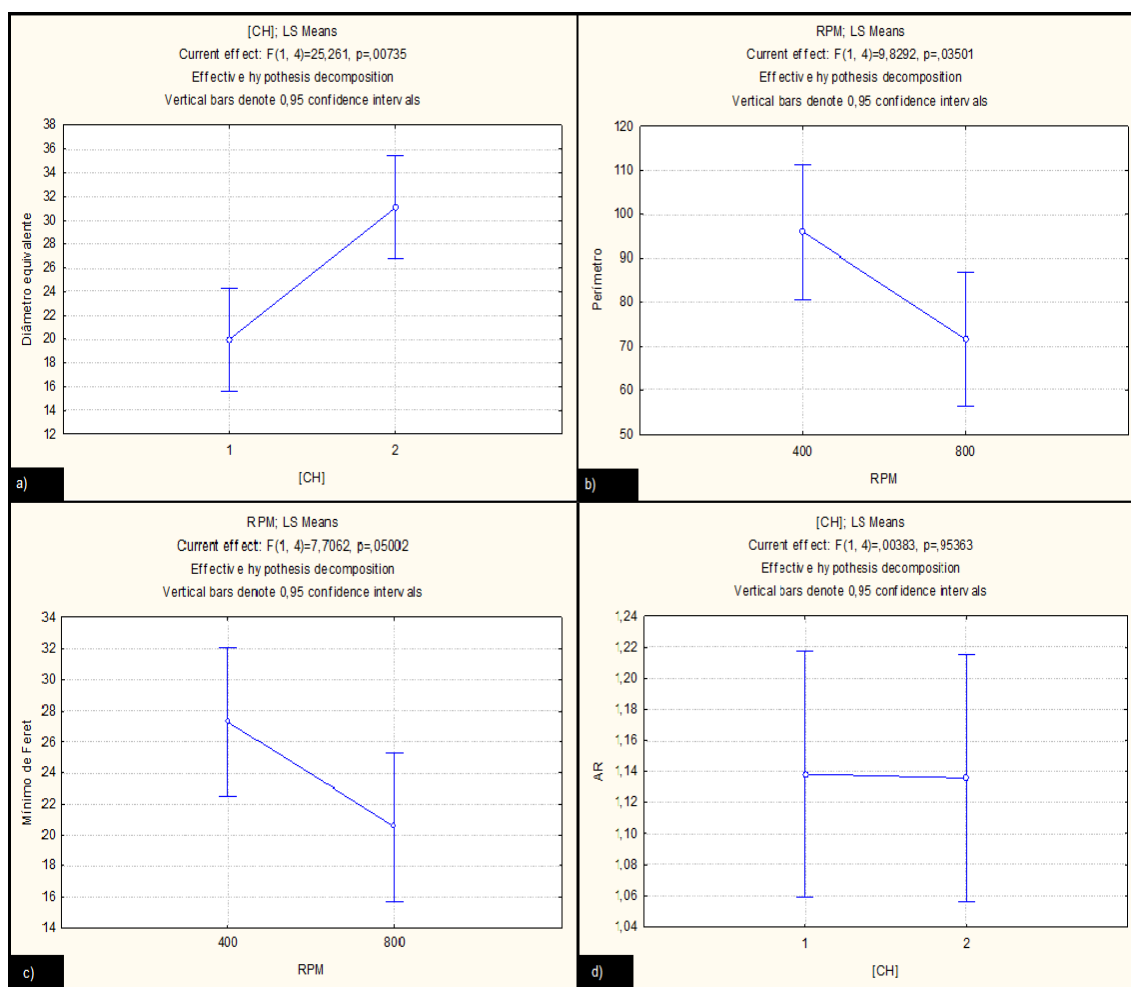


Figura 4-9: Representação da decomposição do teste de hipóteses para os factores e parâmetros a) concentração de quitosano e diâmetro equivalente, b) velocidade de agitação e perímetro, c) Velocidade de agitação e diâmetro mínimo de Feret, e d) Concentração de quitosano e Factor de forma AR.

A Figura 4.9 b) representa o efeito da velocidade de agitação no perímetro das partículas, sendo possível verificar que o perímetro é significativamente influenciado pela velocidade de agitação, com um valor p de 0,0380.

Observa-se que os factores não influenciam significativamente os parâmetros AR e circularidade, como havia sido constatado por análise qualitativa das distribuições. Estes resultados reforçam a ideia de que os factores variados não influenciam significativamente a forma das partículas, apesar de as partículas com menor tamanho apresentarem normalmente uma maior esfericidade.

Os parâmetros circularidade e AR, não apresentam valores p considerados significativos, uma vez que os valores obtidos são superiores a 0,05. A Figura 4.9 d) evidência uma tal situação, a qual resulta do impacto da concentração de quitosano no parâmetro de forma AR não ser estatisticamente significativo.

Na Tabela 4.5 é apresentada a síntese da variação causada nos parâmetros com face à alteração dos factores.

Tabela 4.5: Síntese da variação dos parâmetros face à alteração dos factores.

	Diâmetro equivalente	Perímetro (μm)	Máximo de Feret	Mínimo de Feret (μm)	Circularidade	AR
Concentração de quitosano (%)	S (\nearrow)	S (\nearrow)	S (\nearrow)	S (\nearrow)	N	N
Concentração de genipin	S (\nearrow)	S (\nearrow)	S (\nearrow)	S (\nearrow)	N	N
Velocidade de agitação	S (\searrow)	S (\searrow)	S (\searrow)	N	N	N

A designação “S” representa situações em que o impacto de um factor numa variável de saída é estatisticamente significativa, enquanto “N” representa a situação oposta. O símbolo “ \nearrow ” é usado para representar uma relação em que o aumento de um factor provoca o aumento da variável de saída. Por oposição, o símbolo “ \searrow ” é usado para representar uma relação em que o aumento de um factor provoca a diminuição de uma variável de saída. Verifica-se, como já foi referido anteriormente, que o aumento da concentração de quitosano, bem como o aumento da concentração de genipin, conduzem ao aumento das medidas de tamanho (diâmetro equivalente, perímetro e diâmetros máximo e mínimo de Feret) das microsferas produzidas, e também que o aumento da velocidade de agitação dá origem à diminuição das medidas de tamanho. Os factores parecem não ter qualquer influência nos parâmetros de forma (circularidade e AR) das micropartículas.

Capítulo 5 - Conclusões

5. CONCLUSÕES

A primeira conclusão a retirar do presente trabalho experimental, mostra que o método adoptado para a preparação de microsferas de quitosano reticuladas com genipin (método de emulsão água-em-óleo), produz microsferas de cor verde-azulada, de pequena dimensão (alguns micron) e elevada esfericidade. Além disso, a metodologia utilizada revelou ser de simples implementação e particularmente interessante, uma vez que a solução de partida contém apenas água e quitosano. Esta solução é, então, emulsionada numa fase orgânica, constituída por parafina, à qual se adiciona um reticulante químico – o genipin, um agente natural, biocompatível. Assim, não são necessários solventes orgânicos (ou outros aditivos), nem manipulações complexas ao processo de preparação das microsferas de quitosano reticuladas com genipin. As microsferas têm, pelo menos à primeira vista, capacidade para desempenharem o papel de sistemas de transporte de fármacos, necessitando para tal, apenas de ser carregados com os princípios activos em causa.

Muitas vezes a coloração das microsferas é usada como indicador da ocorrência de reacção de reticulação química entre o quitosano e as moléculas de genipin. No entanto, no presente trabalho esta pôde, também, ser confirmada com recurso a espectroscopia de FTIR. Alterações a nível da estrutura química puderam ser observadas no espectro de FTIR das microsferas de quitosano/genipin relativamente ao espectro obtido apenas com o polímero.

Foram analisados três factores como determinantes das características dimensionais das microsferas: concentração de quitosano, concentração de genipin e velocidade de agitação da emulsão. As características dimensionais, designadamente algumas propriedades de tamanho (diâmetro equivalente, perímetro e diâmetros máximo e mínimo de Feret) e algumas propriedades de forma (circularidade e factor de forma).

Os resultados mostram que o aumento, quer da concentração da solução aquosa de quitosano (de 1% para 2% em massa), quer da concentração de genipin (de 1% para 6%, percentagem mássica em relação ao polímero), provoca o aumento do tamanho das microsferas, tal como comprovado pelo aumento do diâmetro equivalente, do perímetro e dos diâmetros de Feret. Ao contrário, o aumento da velocidade de agitação (de 400 para 800 rpm), causa a diminuição de todas as propriedades de tamanho. Todavia, os três factores estudados não têm qualquer impacto nas propriedades de forma, nomeadamente na circularidade e no factor de forma das microsferas obtidas.

Por último, os resultados indiciam uma ligeira relação entre as propriedades de tamanho e as propriedades de forma, na medida em que as microsferas mais pequenas, de menor diâmetro equivalente, são as que, aparentemente, apresentam maior esfericidade.

A análise de variância (ANOVA) permitiu consolidar os resultados obtidos na análise qualitativa, no sentido em que atribui significância estatística à relação entre a concentração de quitosano, a concentração de genipin e a velocidade de agitação e a variação das propriedades de tamanho das microsferas (diâmetro equivalente, perímetro e diâmetros máximo e mínimo de Feret), e não indica qualquer significância estatística para a relação dos factores com as propriedades de forma (circularidade e factor de forma AR).

5.1. Sugestões de trabalho futuro

De modo a complementar o presente estudo, que incidiu apenas na preparação de microsferas de quitosano reticuladas com genipin e na sua caracterização dimensional e morfológica referem-se, de seguida, algumas sugestões para trabalhos futuros.

Seria importante proceder à imobilização de um fármaco nas microsferas obtidas pelo método de emulsão água-em-óleo. O impacto dos vários factores na determinação da eficiência de imobilização bem como a obtenção de perfis de libertação *in vitro* seriam alguns aspectos a investigar.

Todavia, conforme mencionado no Capítulo 1, pretende-se que as microsferas preparadas neste trabalho sejam usadas para imobilização de um anti-tumoral - a cisplatina, e para posterior dispersão numa matriz polimérica termosensível, capaz de ser produzida *in situ*. Neste contexto, seria interessante proceder à imobilização da cisplatina nas microsferas, dispersá-las na matriz polimérica e proceder a estudos de libertação *in vitro*. Perfis de libertação da cisplatina a partir das microsferas deveriam ser usados para comparação.

Por fim, para verificar se as relações entre os factores (concentração de quitosano, concentração de genipin e velocidade de agitação) e as propriedades são lineares ou apresentam uma forma não linear, sugere-se a realização de ensaios com valores intermédios dos factores.

Capítulo 6 - Bibliografía

6. BIBLIOGRAFIA

- Abreu, F. (2008). Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como carreadores de fármacos. Porto Alegre: Tese de mestrado.
- Adekogbe, I., & Ghanem, A. (2005). Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 26(35), pp. 7241-7250.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (5 de November de 2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), pp. 5-28.
- Ahmadi, R., & Bruijin, J. (2008). Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *Journal of Biomedical Material Research*, 86(3), pp. 824-832.
- Akbuğa, J., & Bergişadi, N. (1999). Effect of formulation variables on cis-platin loaded chitosan microsphere proprieties. *Journal of Microencapsulation*, 16(6), pp. 697-703.
- Balagurunthan, Y., Dougherty, E., & Bilinsky, H. (2001). Morphological granulomatrical analysis of sediment. Image Anaisysl Stereol.
- Bansal, V., Sharma, P. K., Sharma, N., P., P. O., & Malviya, R. (2011). Applications of Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery. *Advances in Biological Research*, 5(1), pp. 28-37.
- Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Valizadeh, H., Shadbad, M., Nokhodchi, A., Omid, V., et al. (2008). Kinetic Analysis of Drug Release From Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), pp. 167-177.
- Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Valizadeh, H., Shadbad, M., Nokhodchi, A., Omid, Y., et al. (2008). Kinetic Analysis of Drug Release From Nanoparticles. *Journal Pharm Pharmaceutical Sciences*, 11(1), pp. 167-177.
- Berguisadi, N., & Akbuga, J. (1999). Effect of formulation variables on cis-platin loaded chitosan microsphere properties. *Jpurnal of Microencapsulation*, 16(6), pp. 697-703.
- Branch, N. I. (s.d.). *Analyze Menu*. Obtido em 2 de 8 de 2013, de ImageJ Image processing and analisys in java: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html>

- Braun, R. (1987). *Introduction to instrumental analysis*.
- Butler, M., Pudney, P., & Ng, Y. (2003). Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41(12), pp. 3941–3953.
- Cardinal, R., & Aitken, M. (2005). *ANOVA for the Behavioral Sciences Researcher* (1^a Edição ed., Vol. 1). Psychology Press.
- Chang, S., Krammer, w., Feldman, S., Ballentine, R., & Frankel, L. (1981). Bioavailability of Allopurinol Oral and Rectal Dosage Forms. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 38(3), pp. 365-368.
- D'Ayala, G., Malinconico, M., & Laurienzo, P. (2008). Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. *Molecules*, 13(9), pp. 2069-2106.
- Das, S., Jagan, L., Isiah, R., Rajesh, B., Backianathan, S., & Subhashini, J. (2011). Nanotechnology in oncology: Characterization and in vitro release kinetics of cisplatin-loaded albumin nanoparticles: Implications in anticancer drug delivery. *Indian Journal Of Pharmacology*, 43(4), pp. 409–413.
- Dash, A., & Cudworth, G. (1998). Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 40(1), pp. 1-12.
- Dasha, M., Chiellini, F., Ottenbriteb, R., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical. *Progress in Polymer Science*, pp. 981–1014.
- Desa, G. K., & Park, H. P. (2005). Preparation and Characterization of Drug-Loaded Chitosan–Triphosphate Microspheres by Spray Drying. *Drug Development Research*, 64, pp. 114–128.
- Dubey, R. R., & Parikh, R. H. (2004). Two-Stage Optimization Process for Formulation of Chitosan Microspheres. *AAPS PharmSciTech*, 5(1).
- Eroglu, H., Alpar, R., & Öner, L. (2008). Chitosan in Steroid Delivery: Formulation of Microspheres By Factorial Design and Evaluation of In-Vitro Release Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33, pp. 144–150.
- Ferrari, S., Piuri, V., & Scotti, F. (2008). *Image Processing for Granulometry Analysis via Neural Networks*. Milano: CIMSA.
- Ferreira, T., & Rasband, W. (2012). ImageJ User Guide.
- Field, A. (2000). *Discovering Statistics using SPSS for Windows: advanced techniques for the beginner*. (1^a edição ed.). SAGE Publication.

- Harris, R., Lecumberri, E., & Heras, A. (2010). Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. *Marine Drugs*, 8, pp. 1750-1762.
- Imsombut, T., Srisuwan, Y., Srihanam, P., & Baimark, Y. (2010). Genipin-cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Powder Technology*, 203, pp. 603–608.
- Jose, S., Ansa, C., Cinu, T., Chacko, A., Aleykutty, N., Ferreira, S., et al. (2012). Thermo-sensitive gels containing lorazepam microspheres for intranasal brain targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 1(2), pp. 516-526.
- Kamiński, K., Zazakowny, K., Szczubiałka, K., & Nowakowska, M. (2008). pH-Sensitive Genipin-Cross-Linked Chitosan Microspheres For Heparin Removal. *Biomacromolecules*, 9(11), pp. 3127-3132.
- Karnchanajindanun, J., Srisa-ard, M., & Baimark, Y. (2011). Genipin-cross-linked chitosan microspheres prepared by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), pp. 674-680.
- Karnchanajindanun, J., Srisa-ard, M., Srihanam, P., & Baymark, Y. (2010). Preparation and Characterization of genipin-cross-linked chitosan microparticles by water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Natural Science*, 2(10), pp. 1061-1065.
- Kawadakar, J., & Chauhan, M. (2012). Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(3), pp. 563–572.
- Ko, J., Park, H., Hwang, S., Park, J., & Lee, J. (2002). Preparation and characterization of chitosan microparticles for controlled drug delivery. *Polimeros*, 249(1-2), pp. 165-174.
- Ko, J., Park, H., Park, Y., & Hwang, S. (2003). Chitosan microparticle preparation for controlled drug release by response surface methodology. *Journal of Microencapsulation*, 20(6), pp. 791-797.
- Kwan, K. (1997). Oral Bioavailability and First-pass Effect. (M. R. Laboratories, Ed.) *Drug metabolism and disposition*, 25(12), pp. 1329-1336.
- Laus, R., Costa, T., Szpoganicz, B., & Fávere, V. (2010). Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3), pp. 233–241.

- Lee, J., Cha, D., & Park, H. (2004). Survival of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in Chitosan-Coated Calcium Alginate Microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), pp. 7300-7305.
- López-León, T., Carvalho, E., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J., & Bastos-González, D. (2005). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behaviour. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283(2), pp. 344-351.
- Madrigal, L. (1998). *Statistics for Anthropology*. Cambridge, Cambridge: Cambridge University Press.
- Malvern. (2012). *A Basic Guide to Particle Characterization*. Malvern: Worcestershire.
- Marra, K., & Tan, H. (2010). Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), pp. 1746-1767.
- Mi, F., Sung, H., & Shyu, S. (2001). Release of Indometacin from Novel Chitosan Microsphere Prepared by a Naturally occurring Crosslinker: Examination of Crosslinking and Polycation-Anionic Drug Interaction. *Journal of Applied Polymer Science*, 81(7), pp. 1700-1711.
- Mia, F., Sungh, H., Shyuc, S., Sua, C., & Pengd, C. (2003). Synthesis and characterisation of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. *Polymer*, 44(21), pp. 6521-6530.
- Miller, J., & Haden, P. (1988). *Statistical Analysis With the General Linear Model*. Dunedin.
- Mitra, A. (1998). *Fundamentals of Quality Control and Improvement*. (2ª Edição ed.). New Jersey: Prentice Hall.
- Moura, M. (1999). *Caracterização morfológica da madeira de Eucalyptus globulus – Estudos de variabilidade numa árvore*. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.
- Moura, M. (2012). Aplicações do Quitosano em Libertação Controlada de Fármacos: Algumas Considerações. *Enciclopédia Biosfera*, 8(14), pp. 1489-1509.
- Moura, M., Figueiredo, M., & Gil, M. (2007). Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Biomacromolecules*, 8(12), pp. 3823–3829.
- Moura, M., Gil, M., Faneca, H., Lima, M., & Figueiredo, M. (2011). In Situ Forming Chitosan Hydrogels Prepared via Ionic/Covalent Co-Cross-Linking. *Biomacromolecules*, 12, pp. 3275–3284.
- Muller, G. S. (2009). FTIR-ATR spectroscopic analyses. *BioResources*, 4(1).

- Muzzarelli, R. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate polymers*, 77(1), pp. 1-9.
- Parikh, R., & Dubey, R. (2004). Two-Stage Optimization Process for Formulation of Chitosan Microspheres. *AAPS PharmSciTech*, 5(1), pp. 20-28.
- Park, H., Lee, J., & Cha, D. (2004). Survival of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in Chitosan-Coated Calcium Alginate Microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), pp. 7300-7305.
- Petrozzi, S. (2012). *Practical Instrumental Analysis: Methods, Quality Assurance and Laboratory Management*. WILEY-VCH.
- Phaechamud, T. (2008). Effect of Particle Size of Chitosan on Drug Release from Layered Matrix System Comprising Chitosan and Xanthan Gum. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 3(1), pp. 1-11.
- Phromsopa, T., & Baymark, Y. (2010). Chitosan Microparticles Prepared by the Water-in-Oil Emulsion Solvent Diffusion Method for Drug Delivery. *Biotechnology*, 9(1), pp. 61-66.
- Phromsopa, Y., & Baimark, T. (2010). Chitosan Microparticles Prepared by the Water-in-Oil Emulsion Solvent Diffusion Method for Drug Delivery. *Biotechnology*, 9, pp. 61-66.
- Pregoa, C., Paolicelli, P., Díazb, B., Vicentea, S., Sáncheza, A., González-Fernándezb, A., et al. (2010). Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine*, 28(0264-410X), pp. 2607–2614.
- Qi, J., Yao, P., He, F., Yu, C., & Huang, C. (2010). Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core—Doxorubicin loading and delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 393, pp. 176–184.
- Ramachandran, S., Nandhakumar, S., & DhanaRaju, M. (2011). Development and in vitro Evaluation of Biodegradable Chitosan Microspheres Loaded With Ranitidine and Cross Linked with Glutaraldehyde. *International Journal of PharmTech Research*, 3(1), pp. 488-496.
- Rao, N., Kulkarni, U., Deshmukh, A., & Suresh, D. (2010). Preparation and Characterization of Iontropic Cross-Linked Chitosan Microparticles for Controlled Release of Aceclofenac. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2(2), pp. 107-111.
- Rinaudo, M. (2007). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), pp. 603-632.

- Ringe, K., Walz, C., & Sabel, B. (2004). Nanoparticle Drug Delivery to the Brain. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 7, pp. 91-104.
- Roy, S., Panpalia, S., Nandy, B., Rai, V., Tyagi, L., Dey, S., et al. (2009). Effect of Method of preparation on Chitosan Microspheres of Mefenamic Acid. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 1(1), pp. 36-42.
- Sailaja, A. K., Amareshwar, P., & Chakravarty, P. (2010). Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1(3), pp. 474-484.
- Seijo, A., & Remuñán-López, C. (2005). Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(4-5), pp. 427-437.
- Silva, H., Santos, C., & Ferreira, E. (2006). Quitosana: Derivados hidrosolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29(4), pp. 776-785.
- Singh, K., Satapathy, L., Dash, B., & Routray, S. (2011). Comparative Study on Thresholding. *International Journal of Instrumentation, Control & Automation*, 1(1), pp. 73-77.
- Sinha, V., Singla, A., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., et al. (2004). Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274, pp. 1-33.
- Skoog, Holler, & Crouch. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (6 ed.). (S. Kiseleca, Ed.) Canada: David Harris.
- Soppimath, K. S., Aminabhavia, T. M., Kulkarnia, A. R., & Rudzinsky, W. (July de 2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, pp. 1-20.
- Swatantra, K., Awani, R., & Satyawan, S. (2010). Chitosan: A Platform for Targeted Drug Delivery. *International Journal of PharmTech Research*, 2(4), pp. 2271-2282.
- Tripathi, A., Gupta, R., & Sharaf, S. (2010). PLGA Nanoparticles of Anti Tubercular Drug: Drug Loading and Release Studies of a Water In-Soluble Drug. 2(3), 2116-2123. Lucknow: International Journal of PharmTech Research.
- Tsai, M., Hsu, C., & Yang, C. (2011). Effect of crosslinked condition on characteristics of chitosan/tripolyphosphate/genipin beads and their application in the selective adsorption of phytic acid from soybean whey. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), pp. 659-665.

- Veres, P. (2005). *FTIR Analysis of Particulate Matter Collected on Teflon Filters in Columbus, OH*. Ohio: The Ohio State University.
- Verma, P., Thakur, A., Deshmukh, K., Jha, A., & Verma, S. (2010). Routes of Drug Administration. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 1(1), pp. 54-59.
- Wang, Y., Sato, H., Adachi, I., & Horikoshi, I. (November de 1996). Optimization of the formulation design of chitosan microspheres containing cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(11), pp. 1204–1210.
- Wu, J., Liao, C., Wang, Z., Cheng, W., Zhoud, N., Wangb, S., et al. (2011). Chitosan-polycaprolactone microspheres as carriers for delivering glial cell line-derived neurotrophic factor. *Reactive and Functional Polymers*, 71(9), pp. 925-932.
- Xiong, Y., Yao, Y., Zhan, X., & Chen, G. (2010). Application of Polyhydroxyalkanoates Nanoparticles as Intracellular Sustained Drug-Release Vectors. *Journal of Biomaterials Science*, 21(1), pp. 127-140.
- Yu, L., & Ding, J. (2008). Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, 37(8), pp. 1473-1481.
- Yuan, Y., Chesnutt, B., Utturkar, G., Haggard, W., Yang, Y., Ong, J., et al. (2007). The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genpin on protein release. 68, pp. 561-567.
- Zarzycki, R., Modrzejewska, Z., Owczarż, P., & Wojtasz-Pająk, A. (2008). New chitosan structures in the form of the hermosensitive gels. *Progress in chemistry and application of chitin and its derivatives*, 13, pp. 35-42.
- Zhang, J., Du, Z., Xu, S., & Zhang, S. (2009). Synthesis and Characterization of Karaya Gum/Chitosan Composite Microspheres. *Iranian Polymer Journal*, 18(4-106), pp. 307-313.
- Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahiri, T., Gu, W., et al. (2010). Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 8(7), pp. 1962-1987.
- Zhang, Y., & Wu, L. (Junho de 2011). Fast Document Image Binarization Based on an Improved Adaptive Otsu's Method and Destination Word Accumulation. *Journal of Computational Information Systems*, 7(6), pp. 1886-1892.

