

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS DE QUITOSANA POR *SPRAY DRYING*  
COM DIFERENTES TIPOS DE RETICULAÇÃO PARA USO NA VACINAÇÃO  
GÊNICA**

Autor

Farm. Bergson Fogaça de Oliveira

Orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana

Co-orientadora

Dr<sup>a</sup> Maria Inês Ré

Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas, Junho de 2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

OL4p      Oliveira, Bergson Fogaça de  
Preparação de microesferas de quitosana por spray  
drying com diferentes tipos de reticulação para uso na  
vacinação gênica / Bergson Fogaça de Oliveira.--Campinas,  
SP: [s.n.], 2005.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana, Maria Inês  
Ré  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana. 2. Secagem em spray. 3. Aldeídos. I.  
Santana, Maria Helena Andrade. II. Ré, Maria Inês. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Química. IV. Título.

Titulo em Inglês: Preparation of spray dried chitosan microspheres with  
different kinds of crosslinking agents useful in genic  
vaccination

Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Spray drying e Aldehydes

Área de concentração: Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso e Cláudio Airoidi

Data da defesa: 10/06/2005

Dissertação de Mestrado defendida por Bergson Fogaça de Oliveira e aprovada em  
10 de Junho de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana

---

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso

---

Prof. Dr. Claudio Airoidi

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana

Aos meus pais, irmãos e tios, mas especialmente  
à Tia Déia e a minha esposa Valjeli,  
que me apoiaram incondicionalmente

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Maria Inês Ré pela co-orientação, confiança e incentivo durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Célio, Dr. José Maciel Rodrigues Júnior e Dr<sup>a</sup> Karla Melo Lima pela doação do pDNA e apoio nos ensaios *in vitro*.

A empresa O Boticário na pessoa do Sr. Carlos Eduardo de Oliveira Praes pela doação do hialuronato de sódio utilizado neste trabalho

A empresa Cyrbe do Brasil Ltda pela doação da quitosana utilizada neste trabalho

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da UNICAMP, Amós, Elaine, Raquel, Ana Paula, Gilson, Fernanda, Giuliana, Claudia, Reinaldo e Lucimara pela oportunidade de convívio.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Partículas do IPT, Pierre, Shirley, Maria Helena Zanin, Letícia, Leci, Rosana, Roseane, Érika, Klauss, Vinicius, Érika, Téo, Igor, Juliana, Rafael, Olívia, pela amizade, e em especial ao Roberson pelas calorosas discussões da parte experimental.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro

## RESUMO

A quitosana, um poliaminossacarídeo natural, tem atraído atenção considerável para uso na área de saúde como polímero com baixa toxicidade apresentando características favoráveis tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesividade. A quitosana tem sido usada em diferentes aplicações com engenharia de tecidos bem como em sistemas de liberação controlada de fármacos e vacinas por diferentes vias de administração incluindo as vias oral e nasal.

Para a maior parte das aplicações em sistemas de liberação controlada, devido às propriedades hidrofílicas da quitosana, a reticulação se torna uma estratégia para controlar propriedades desses sistemas como capacidade de adsorção de água, carga superficial, dentre outras que afetam diretamente a sua cinética de liberação.

A reticulação da quitosana pode ser de natureza química, formada por ligações covalentes irreversíveis, e reticulação física, formada por várias ligações reversíveis (ligações iônicas, complexos de polieletrólitos). Nesse trabalho, sistemas de liberação modificada à base de quitosana (microesferas) foram obtidos empregando-se a técnica de *spray drying*. Estudou-se, a seguir, a reticulação química e física das mesmas: 1) reticulação química com diferentes aldeídos, gliceraldeído (GAL) ou glutaraldeído (GLU); 2) reticulação física com hialuronato de sódio (HNa). As partículas foram caracterizadas quanto às propriedades de intumescimento, carga superficial, área superficial, análise térmica, teor de umidade, cristalinidade, espectroscopia no infravermelho e análise elementar.

Os resultados obtidos mostraram que a reticulação com GAL gerou propriedades de superfície tais como potencial zeta elevado e um melhor controle sobre o intumescimento. Essas microesferas foram testadas para a adsorção superficial de pDNA e analisadas quanto à capacidade de transfecção de células *in vitro*. Os resultados confirmaram a transfecção, apontando o uso potencial destas partículas como carreadoras de vacinas gênicas.

**Palavras-chave:** Gliceraldeído, Ácido Hialurônico, Microesferas de quitosana, reticulação, *spray drying*.

## ABSTRACT

In recent years, chitosan, a natural cationic polysaccharide, has attracted considerable attention as a new non-toxic polymer having favourable characteristics such as biocompatibility, biodegradability and mucoadhesiveness. Chitosan has found several applications as a biomaterial in tissue engineering as well in controlling drug release by various routes of delivery including oral and nasal.

For most of the drug delivery applications, due to its hydrophilic properties, chitosan crosslinking becomes a strategy to control properties of these systems such as swelling properties, superficial charge, among others that affect release kinetic.

The chitosan crosslinking can be chemical, formed by irreversible covalent bounds, and physical crosslinking, formed by several reversibles bounds (ionic bounds, polyelectrolyte complex). In this work, modified delivery system made of chitosan (microspheres) had been obtained using spray drying technique. It was studied, to follow, chemical and physical crosslinking of that: 1) chemical crosslinking with different aldehydes, glyceraldehyde (GAL) ou glutaraldehyde (GLU); 2) physical crosslinking with sodium hyaluronate (HNa). The particles had been characterized by swelling properties, surface charge, surface area, thermal analysis, humidity quantification, crystallinity, infrared spectroscopy and elemental analysis.

Obtained results had show that crosslinking with GAL generated surface properties such as high zeta potencial values and better swelling control. This microspheres had been tested for the pDNA surface adsorption and analysed by cellular *in vitro* transfection capacity. Results had confirmed the transfection, suggesting potential use of these particles as carrier of DNA vaccines.

**Key Words:** Glyceraldehyde, Hyaluronic acid, Chitosan Microspheres, crosslinking, spray drying



## SUMÁRIO

|                                                                         |       |
|-------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resumo.....                                                             | xi    |
| Abstract.....                                                           | xiii  |
| Sumário.....                                                            | xv    |
| Índice de figuras.....                                                  | xix   |
| Índice de quadros.....                                                  | xxiii |
| Índice de tabelas.....                                                  | xxv   |
| 1. Introdução .....                                                     | 01    |
| 2. Objetivo .....                                                       | 03    |
| 3. Revisão bibliográfica .....                                          | 05    |
| 3.1 Microesferas como sistema de liberação modificada de fármacos ..... | 05    |
| 3.2 Considerações gerais sobre quitosana .....                          | 06    |
| 3.3 Microesferas de quitosana .....                                     | 07    |
| 3.4 Preparação das microesferas de quitosana .....                      | 09    |
| 3.4.1 Gelificação ionotrópica .....                                     | 10    |
| 3.4.2 Coacervação .....                                                 | 10    |
| 3.4.2.1 Coacervação simples .....                                       | 10    |
| 3.4.2.2 Coacervação complexa .....                                      | 11    |
| 3.4.3 Emulsificação com evaporação de solvente .....                    | 11    |
| 3.4.4 <i>Spray drying</i> .....                                         | 12    |
| 3.5 Reticulação de microesferas de quitosana .....                      | 14    |

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.1 Reticulação química .....                                                                      | 15 |
| 3.5.1.1 Reticulação covalente de microesferas de quitosana .....                                     | 17 |
| 3.5.2 Reticulação física .....                                                                       | 21 |
| 3.5.2.1 Complexo de polieletrólitos (PEC) .....                                                      | 22 |
| 3.5.3 Considerações finais .....                                                                     | 27 |
| 3.6 Administração nasal de fármacos .....                                                            | 28 |
| 3.7 Tuberculose e vacinação gênica .....                                                             | 30 |
| 4. Material e métodos .....                                                                          | 33 |
| 4.1 Material .....                                                                                   | 33 |
| 4.2 Métodos .....                                                                                    | 33 |
| 4.2.1 Preparação das microesferas de quitosana .....                                                 | 33 |
| 4.2.2 Reticulação das microesferas de quitosana .....                                                | 35 |
| 4.2.2.1 Reticulação das microesferas de quitosana com D,L-gliceraldeído e<br>glutaraldeído.....      | 35 |
| 4.2.2.2 Reticulação superficial das microesferas de quitosana com hialuronato de<br>sódio (HNa)..... | 36 |
| 4.2.3 Adsorção de DNA plasmidial na superfície de microesferas de quitosana.....                     | 37 |
| 4.2.4 Caracterização das microesferas .....                                                          | 37 |
| 4.2.4.1 Análise granulométrica .....                                                                 | 37 |
| 4.2.4.2 Morfologia .....                                                                             | 38 |
| 4.2.4.3 Intumescimento .....                                                                         | 38 |
| 4.2.4.4 Área Superficial .....                                                                       | 39 |
| 4.2.4.5 Hidrofobicidade superficial .....                                                            | 39 |
| 4.2.4.6 Carga superficial .....                                                                      | 40 |
| 4.2.4.7 Teor de umidade .....                                                                        | 40 |

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.4.8 Análise térmica .....                                                                                                                               | 41 |
| 4.2.4.9 Estrutura cristalina .....                                                                                                                          | 41 |
| 4.2.4.10 Análise elementar.....                                                                                                                             | 41 |
| 4.2.4.11 Espectroscopia vibracional.....                                                                                                                    | 42 |
| 4.2.4.12 Interação pDNA-microesferas de quitosana.....                                                                                                      | 42 |
| 4.2.3.13 Transfecção de células <i>in vitro</i> .....                                                                                                       | 42 |
| 5. Resultados e discussão .....                                                                                                                             | 45 |
| 5.1 Efeito da concentração de quitosana sobre propriedades das microesferas .....                                                                           | 45 |
| 5.2 Efeito da reticulação química sobre as características das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> .....               | 48 |
| 5.2.1 Tipo de agente reticulante e tempo de reticulação .....                                                                                               | 48 |
| 5.2.2 Efeito da concentração dos agentes reticulantes .....                                                                                                 | 53 |
| 5.2.3 Área Superficial .....                                                                                                                                | 56 |
| 5.2.4 Hidrofobicidade .....                                                                                                                                 | 57 |
| 5.2.5 Análise Térmica .....                                                                                                                                 | 58 |
| 5.2.6 Teor de umidade .....                                                                                                                                 | 60 |
| 5.2.7 Análise de cristalinidade por difração de raios-X .....                                                                                               | 60 |
| 5.2.8 Espectroscopia na região do infravermelho.....                                                                                                        | 64 |
| 5.2.9 Análise elementar.....                                                                                                                                | 66 |
| 5.3 Efeito da reticulação com AH sobre as características das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> .....                | 67 |
| 5.4 Comparação das propriedades das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> após reticulação física e química .....        | 73 |
| 5.5 Efeito da adsorção do pDNA (DNA plasmidial) sobre as características das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> ..... | 76 |

|                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.5.1 Morfologia de microesferas de quitosana reticuladas e não reticuladas.....                                 | 76  |
| 5.5.2 Variação da proporção de pDNA durante o processo de adsorção em microesferas de quitosana reticuladas..... | 77  |
| 5.6 Avaliação da adsorção do pDNA em microesferas de quitosana reticuladas com GAL.....                          | 78  |
| 5.7 Estudos de transfecção <i>in vitro</i> .....                                                                 | 80  |
| 6. Conclusões.....                                                                                               | 83  |
| 7. Sugestões para próximos trabalhos.....                                                                        | 85  |
| 9. Referência bibliográfica.....                                                                                 | 87  |
| Anexos.....                                                                                                      | 103 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Estrutura química da quitosana .....                                                                                                                                                                      | 07 |
| Figura 2. Representação esquemática da estrutura de hidrogéis formados por (a) quitosana reticulada consigo mesma; (b) rede polimérica híbrida; (c) rede semi-interpenetrada (Adaptado de Berger et al. 2004) ..... | 16 |
| Figura 3. Estrutura química dos aldeídos utilizados na reticulação química de microesferas de quitosana .....                                                                                                       | 18 |
| Figura 4. Representação da estrutura de um complexo de polieletrólitos contendo a quitosana e polímero negativamente carregado (Adaptado da referência Berger et al., 2004) .....                                   | 22 |
| Figura 5. Estrutura química do ácido hialurônico .....                                                                                                                                                              | 25 |
| Figura 6. Esquema do <i>spray dryer</i> utilizado para a produção de microesferas de quitosana.....                                                                                                                 | 35 |
| Figura 7. Diagrama esquemático do processo de reticulação de microesferas de quitosana pré-formadas com D,L-gliceraldeído e glutaraldeído .....                                                                     | 36 |
| Figura 8. Diagrama esquemático do aparato utilizado para determinação de propriedades de intumescimento .....                                                                                                       | 38 |
| Figura 9. Influência da concentração de polímero e pH da solução aquosa de quitosana sobre a viscosidade .....                                                                                                      | 45 |
| Figura 10. Fotografias das microesferas de quitosana obtidas pela técnica de <i>spray drying</i> a partir de soluções aquosas com concentração mássica de quitosana de: (a) 0,5%; (b) 2,5% (aumento de 3500x) ..... | 47 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11. Comportamento do intumescimento das microesferas de quitosana obtidas pela técnica de <i>spray drying</i> a partir de soluções aquosas com concentrações mássica de quitosana de 0,5% e 2,5% .....                                                                               | 48 |
| Figura 12. Efeito do tempo de reticulação sobre o grau de intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com D,L-gliceraldeído (GAL) e glutaraldeído (GLU) .....                                                                                                                  | 49 |
| Figura 13. Efeito do tempo de reticulação sobre o potencial zeta das microesferas de quitosana reticuladas com D,L-gliceraldeído e glutaraldeído .....                                                                                                                                      | 50 |
| Figura 14. Relação entre o grau de intumescimento no equilíbrio e o potencial zeta das microesferas de quitosana quimicamente reticuladas com D,L-gliceraldeído ( $0,015 \text{ Kg}_{\text{GAL}}/\text{Kg}_{\text{quitosana}}$ ) durante intervalos de tempo variando de 15 a 120 min ..... | 51 |
| Figura 15. Efeito do pH de incubação sobre o intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com $0,015 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ e $0,015 \text{ kg}_{\text{GLU}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ .....                                                 | 52 |
| Figura 16. Fotografias de microesferas de quitosana produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> depois do tratamento com: (a) $0,015 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{Kg}_{\text{quitosana}}$ . (b) $0,015 \text{ kg}_{\text{GLU}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ (aumento de 3500x) .....   | 53 |
| Figura 17. Efeito da concentração de D,L-gliceraldeído sobre o comportamento do intumescimento das microesferas de quitosana reticulas por 120 min .....                                                                                                                                    | 54 |
| Figura 18. Efeito do pH de incubação sobre o intumescimento das microesferas reticuladas com GAL em diferentes concentrações ( $0,015$ e $0,060 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ ).....                                                                                | 55 |
| Figura 19. Efeito da concentração dos agentes de reticulação D,L gliceraldeído (GAL) e glutaraldeído (GLU) sobre o potencial zeta das microesferas de quitosana .....                                                                                                                       | 56 |
| Figura 20. Transição vítrea das microesferas de quitosana antes e depois da reticulação com GAL e GLU em estado sólido, e intumescidas em água .....                                                                                                                                        | 59 |

|                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 21. Teor de umidade das microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU em diferentes concentrações e tempo de reticulação de 120 min .....                                                                                                | 60 |
| Figura 22. Efeito da reticulação química com diferentes agentes de reticulação sobre a cristalinidade de microesferas de quitosana: (a) 0,015 kg <sub>GAL</sub> /kg <sub>quitosana</sub> ; (b) 0,015 kg <sub>GLU</sub> /kg <sub>quitosana</sub> ..... | 61 |
| Figura 23. Efeito da reticulação química de diferentes agentes de reticulação sobre a cristalinidade de microesferas de quitosana: (a) 0,060 kg <sub>GAL</sub> /kg <sub>quitosana</sub> ; (b) 0,060 kg <sub>GLU</sub> /kg <sub>quitosana</sub> .....  | 63 |
| Figura 24. Espectros na região do infravermelho das microesferas de quitosana reticuladas com GAL (a) e GLU (b).....                                                                                                                                  | 65 |
| Figura 25. Fotografia das microesferas de quitosana reticuladas fisicamente com HNa: (a) aumento de 2000x; (b) aumento de 5000x .....                                                                                                                 | 68 |
| Figura 26. Intumescimento das microesferas de quitosana não reticuladas e reticuladas fisicamente com HNa .....                                                                                                                                       | 69 |
| Figura 27. Efeito da reticulação física com HNa das microesferas de quitosana sobre o grau de intumescimento no equilíbrio comparativamente as microesferas não reticuladas .....                                                                     | 69 |
| Figura 28. Efeito do pH de incubação sobre o intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com HNa.....                                                                                                                                    | 70 |
| Figura 29. Efeito da reticulação física com HNa sobre a cristalinidade de microesferas de quitosana .....                                                                                                                                             | 71 |
| Figura 30. Espectros de infravermelho de (a) microesferas de quitosana reticuladas com HNa e (b) microesferas de quitosana não reticuladas.....                                                                                                       | 72 |
| Figura 31. Transição vítrea das microesferas de quitosana antes e depois da reticulação com HNa, e intumescidas em água .....                                                                                                                         | 73 |

- Figura 32. Grau de intumescimento no equilíbrio de microesferas de quitosana com reticulação química com 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>, 0,015 kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub> e reticulação física com AH (ácido hialurônico) com tempo de reticulação de 120 min ..... 74
- Figura 33. Intumescimento de microesferas de quitosana reticuladas com: 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>, 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> e 0,16 kg<sub>AH</sub>/kg<sub>quitosana</sub> ..... 75
- Figura 34. Potencial zeta das microesferas de quitosana não reticuladas, reticuladas com 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>, 0,015 kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub> e AH (ácido hialurônico) ..... 75
- Figura 35. Morfologia das microesferas de quitosana após a adsorção do pDNA e liofilizadas: (a) não reticuladas e (b) reticuladas com 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> por 2h..... 77
- Figura 36. Potencial zeta de diferentes complexos formados em diferentes proporções de pDNA:microesferas de quitosana: (a) sem pDNA, (b) 1:100, (c) 1:50, (d) 1:25 e (e) 1:10..... 78
- Figura 37. Fotografias da adsorção do pDNA corado com brometo de etídio em microesferas de quitosana por microscopia ótica: (a) microesferas sem pDNA por microscopia ótica sem fluorescência (1000x); (b) microesferas com pDNA por microscopia ótica sem fluorescência (1000x); (c) microesferas com pDNA-EtBr por microscopia ótica com fluorescência (1000x); (d) microesferas sem pDNA por microscopia ótica com fluorescência (1000x)..... 79
- Figura 38. Avaliação da expressão de hsp65, imunocitoquímica, em células J774 transfectadas por diferentes métodos: células J774 – controle negativo (a) 400x e (b) 1000x; células J774-hsp65 – controle positivo – células transfectadas com lipofectina + DNA (c) 400x e (d) 1000x; células J774 tratadas com microesferas de quitosana sem pDNA (e) 400x e (f) 1000x; células J774 tratadas com microesferas de quitosana contendo pDNA (g) 400x e (h) 1000x..... 81



## ÍNDICE DE QUADROS

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1. Exemplos de diferentes categorias de fármacos em partículas de quitosana e suas vias de administração ..... | 09 |
| Quadro 2. Exemplos de microesferas de quitosana preparadas pela técnica de <i>spray drying</i> .....                  | 14 |
| Quadro 3. Exemplos de microesferas de quitosana reticuladas covalentemente e suas aplicações .....                    | 21 |
| Quadro 4. Poliânions que formam complexos de polieletrólitos com quitosana e exemplos de aplicações .....             | 24 |
| Quadro 5. Principais características da reticulação química e física da quitosana .....                               | 27 |
| Quadro 6. Principais razões para explorar a rota nasal para a vacinação .....                                         | 28 |
| Quadro 7. Vantagens da vacinação gênica .....                                                                         | 30 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Quantidades de quitosana e ácido acético utilizadas para a preparação de soluções de quitosana com diferentes pHs e concentrações .....  | 34 |
| Tabela 2. Condições operacionais usadas nos experimentos por <i>spray drying</i> .....                                                             | 35 |
| Tabela 3. Influência da concentração de quitosana sobre as propriedades das microesferas produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> .....      | 46 |
| Tabela 4. Área superficial das microesferas de quitosana .....                                                                                     | 57 |
| Tabela 5. Hidrofobicidade relativa das microesferas de quitosana .....                                                                             | 58 |
| Tabela 6. Percentuais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e relação carbono/nitrogênio nas microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU..... | 67 |

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um interesse crescente no uso de sistemas poliméricos como carreadores de fármacos. Estes sistemas podem ser usados na forma de polímeros solúveis (no qual o fármaco pode ser ligado de alguma forma ao polímero) ou microesferas biodegradáveis (no qual o fármaco é incorporado) (Illum & Davis, 1988).

As vantagens potenciais de utilizar sistemas de liberação incluem: (1) manutenção contínua dos níveis do fármaco no sangue na faixa terapêutica desejada; (2) redução efeitos colaterais prejudiciais devido à liberação vetorizada a algum tecido ou tipo de célula; (3) potencialmente diminuem a quantidade de fármaco necessário; (4) diminuem o número de administrações do medicamento, levando a um maior comprometimento do paciente ao tratamento; e (5) facilidade na administração de fármacos com meia-vida biológica curta, por exemplo, proteínas e peptídeos (Langer, 1998). Por outro lado, ao desenvolvimento de cada sistema de liberação estão também associados outros aspectos como a toxicidade dos polímeros e seus produtos de degradação, o desconforto causado pelo sistema ou meio de inserção e o custo do sistema devido aos materiais de encapsulação ou técnicas de preparação (Langer, 1998).

O desenvolvimento de sistemas de liberação em que a liberação do fármaco é de algum modo condicionado pelo sistema físico-químico onde está inserido, tem levado a um maior estudo dos mecanismos que ocorrem durante esse processo. Assim, enquanto a velocidade de dissolução é uma característica do fármaco, a velocidade de liberação é o resultado do sistema em que o fármaco está inserido (Costa & Lobo, 1999). Existem três mecanismos gerais pelos quais os fármacos são liberados a partir de sistemas poliméricos: (1) difusão do fármaco a partir do sistema de liberação; (2) uma reação química ou enzimática levando a degradação do sistema, ou clivagem do fármaco a partir do sistema; e (3) ativação do sistema de liberação tanto através de osmose ou intumescimento. Uma combinação destes mecanismos também é possível (Langer, 1998).

Vacinas gênicas têm aparecido como uma tecnologia promissora para alcançar a transfecção de genes *in vivo* e controlar uma determinada função gênica. No entanto, a sua utilização na maioria das vezes requer uma quantidade elevada de plasmídeo para estimular uma resposta imune adequada (Lima et al, 2000). A busca por alternativas para administração de vacinas levou Preis & Langer (1979) a aplicarem a tecnologia da liberação controlada de fármacos no campo da imunização.

As microesferas poliméricas surgiram como alternativa de sistema de liberação controlada que pudesse ser administrado de maneira simples, sem a necessidade de técnicas cirúrgicas, contando apenas com o auxílio de seringa (Lima et al., 2000). A possibilidade de uso da quitosana como sistema de liberação para vacinas gênicas foi primeiramente relatada por Mumper et al (1995). A quitosana é considerada forte candidata no desenvolvimento de sistemas de liberação de vacinas, visto que apresenta carga positiva em pH menor que 6,5 podendo complexar-se com o DNA plasmidial negativamente carregado (Aral et al., 2000).

Produzir e modular as propriedades físico-químicas de microesferas de quitosana pode ser um caminho interessante para controlar a liberação de fármacos, neste caso o DNA plasmidial, e conseqüentemente melhorar a administração e índice terapêutico deste tipo de vacina. A reticulação é uma estratégia para manipular estas propriedades das microesferas de quitosana, podendo alterar a liberação (intumescimento), carga superficial e hidrofobicidade entre outros fatores. Segundo Alpar et al (1996), fatores como hidrofobicidade e carga superficial podem alterar a ação imunológica.

Segundo Berger et al (2004 a,b) a reticulação é dividida basicamente em: química e física. Dentre estas categorias diferentes propriedades são geradas como intumescimento, toxicidade, resistência e dissolução. Neste trabalho, foi estudada a produção de microesferas de quitosana pela técnica de *spray drying*, seguida da reticulação física e química dessas microesferas pré-formadas. Também foi avaliada a capacidade de adsorção e transfecção do pDNA pelas microesferas reticuladas com GAL. A contribuição desta pesquisa não está só no estudo da produção de microesferas de quitosana reticuladas, mas, sobretudo no controle das propriedades destas partículas como sistemas de liberação controlada como potencial carreador de vacinas e fármacos.

## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de microesferas de quitosana pela técnica de *spray drying*, com diferentes tipos de reticulação das microesferas pré-formadas, avaliação das propriedades destas partículas, adsorção de pDNA na superfície das partículas e avaliação da transfecção *in vitro*

O estudo foi feito nas seguintes etapas:

- Produção de microesferas de quitosana pela técnica de *spray drying*, avaliando os efeitos da concentração da solução de quitosana sobre as microesferas formadas;
- Reticulação química das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying*, avaliando o efeito do tipo de agente reticulante, tempo de reticulação e a concentração do agente reticulante, sobre as características das partículas, para completar;
- Reticulação física das microesferas de quitosana pré-formadas avaliando o efeito da reticulação com ácido hialurônico sobre as características das microesferas produzidas pela técnica de *spray drying*;
- Adsorção superficial de DNA plasmidial em microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* e avaliação *in vitro*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microesferas como sistema de liberação modificada de fármacos

Por muitos anos a pesquisa na indústria farmacêutica esteve centrada na síntese de novas moléculas, mas atualmente, cada vez mais, tem aumentado o interesse na utilização de novos sistemas de administração de fármacos. Podemos destacar a expectativa e os avanços da genética e da biotecnologia como uma potente ferramenta na descoberta de novos fármacos (Venter, 2001) e atentando-se ao fato de que estas moléculas têm uma fraca habilidade de atravessar a barreira gástrica, será necessário propor novas estratégias de administração (Jain, 1998).

O conceito de microencapsulação surgiu da idealização do modelo celular. Neste, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material na célula (Ré, 2000). Os primeiros relatos da utilização de microesferas datam da década de 30, porém a indústria farmacêutica só começou a aproveitar este sistema com maior intensidade a partir dos anos 60 (Burgess & Hickey, 1994).

Este sistema pode ser definido como um sistema matricial micrométrico, composto de partículas aproximadamente esféricas em uma faixa de tamanho que vai de 1 a 1000µm (Benoit et al., 1996), utilizando como principal matéria-prima polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. A aplicação desta plataforma tecnológica para a área farmacêutica tem como principais interesses:

- proteção de fármacos contra agentes agressores externos (temperatura, oxidação, interação com outros excipientes, luz, umidade, calor, pH);
- vetorização de fármacos a sítios específicos de ação;
- possibilidade de modificação e controle da liberação de substâncias encapsuladas;

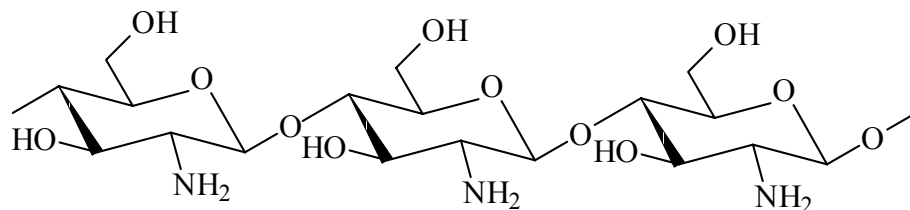
Existe uma variedade de polímeros biodegradáveis, podendo ser sintéticos ou naturais, embora poucos deles sejam biocompatíveis. Entre os polímeros sintéticos

comumente usados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos os polímeros e co-polímeros dos ácidos láctico e glicólico são os mais utilizados devido a sua segurança e uso autorizado para aplicações em humanos (Amass et al., 1998).

Já entre os polímeros naturais utilizados na produção de microesferas podemos citar a albumina (Kumar et al., 2000), gelatina (Ulubayram et al., 2002), colágeno (Rossler et al., 1995), quitosana (He et al., 1999), entre outros. No entanto, a quitosana é um polímero natural muito abundante, tendo uma produção de baixo custo e ecologicamente interessante (Peter, 1995). O Japão e os EUA são os países que vem se destacando como os maiores produtores, consumidores e pesquisadores destes polissacarídeos e derivados (Nifantev, 1998). O Brasil tem demonstrado grande potencial em produzir quitina e quitosana em larga escala. Três empresas brasileiras: Polimar Indústria Comércio Importação e Exportação LTDA, situada em Fortaleza-CE, Kito Química Fina LTDA localizada em Palhoça-SC e a Cyrbe do Brasil LTDA, situada em Sumaré-SP têm se destacado na produção e comercialização destes biopolímeros.

### 3.2 Considerações gerais sobre quitosana

A história da quitosana data do último século, quando Rouget discute a forma desacetilada da quitosana em 1859 (Dodane & Vilivalam, 1998). A obtenção deste polissacarídeo linear é por desacetilação alcalina da quitina (Roberts, 1992). Devido a uma solubilidade limitada da quitina em soluções aquosas, a quitosana é mais apropriada para aplicações industriais (Mima et al., 1983). Quitina é o principal componente de cutículas protetoras de crustáceos tais como caranguejos, camarões, lagostas e paredes de células de alguns fungos como *aspergillus* e *mucor*. A quitina é um homopolímero linear composto de unidades N-acetil-glicosamina com ligações  $\beta$ -(1,4), enquanto que a quitosana compreende de copolímeros de glicosamina e N-acetil-glicosamina (Kas, 1997). A quitosana tem um grupo amino primário e dois grupos hidroxila livres para cada unidade  $C_6$  (Figura 1).



**Figura 1. Estrutura química da quitosana**

Devido à fácil disponibilidade de grupos amino livre na quitosana, este polímero é positivamente carregado em pHs ácidos ( $< 6,5$ ) e desta forma reage com muitas superfícies/polímeros negativamente carregados e também faz quelação com íons metálicos (Fukuda, 1980). Quitosana é uma base fraca, sendo insolúvel em água e solventes orgânicos, no entanto, é solúvel em soluções aquosas ácidas diluídas ( $\text{pH} < 6,5$ ), a qual pode converter a unidade glicosamina na forma solúvel  $\text{R-NH}_3^+$  (Chandy&Sharma, 1990). Precipita em soluções alcalinas ou com poliânions e forma um gel em pH baixo.

Tem massa molar variando entre 3.800 e 2.000.000 Da e desacetilação de 66 a 95% (Kas, 1997). Entre as características importantes da quitosana que influenciam as propriedades de formulações estão tamanho de partícula, densidade, viscosidade, grau de desacetilação e massa molar (Sinha et al., 2004). Propriedades tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade fazem este polímero favorável para uso em formulações farmacêuticas e bioprodutos (Illum et al., 2001), sendo extensivamente investigado para a preparação de microesferas como sistemas de liberação controlada.

### 3.3 Microesferas de quitosana

Microesferas de quitosana têm sido usadas como potencial carreador para liberação prolongada de fármacos e macromoléculas, vetorização, aumento de biodisponibilidade de substâncias degradáveis e aumento da absorção de substâncias hidrofílicas através de camadas epiteliais.

Microesferas de quitosana, como um sistema de liberação prolongada, contendo progesterona foram preparadas utilizando a técnica de reticulação química com



glutaraldeído (Jameela et al., 1998). O estudo da biodisponibilidade *in vivo* depois da administração intramuscular mostrou a manutenção da concentração plasmática (1-2 ng/ml) até um período de cinco meses sem um grande efeito “*burst*”.

Kochisch et al. (2003) estudaram o potencial de vetorização *in vitro* de microesferas poliméricas na cavidade oral, avaliando o potencial mucoadesivo. No experimento *in vitro* envolvendo um desafio com saliva artificial, as microesferas de quitosana ficaram retidas sobre a mucosa oral por muito mais tempo que as microesferas produzidas com poli (acrílico). Os autores atribuíram estes resultados ao comportamento do intumescimento das microesferas de quitosana e sua natureza catiônica, sugerindo um bom desempenho destas partículas como sistemas mucoadesivos.

Um estudo realizado com insulina em microesferas de quitosana administrada por via oral mostrou um efeito antihiperглиcêmico em ratos com diabetes induzida (Huang et al., 2001), demonstrando desta forma o potencial destas partículas em aumentar a biodisponibilidade de substâncias degradáveis.

A eficácia da quitosana como promotor de aumento na absorção de calcitonina de salmão através do epitélio nasal foi confirmada *in vivo* através de um modelo em ratos (Tengamnuay & Mitra, 1997). A biodisponibilidade da calcitonina foi ligeiramente maior em animais tratados com quitosana a 1% quando comparados com ratos que receberam dimetil- $\beta$ -ciclodextrina a 5%. Os autores notaram que os efeitos deletérios na mucosa foram muitos menores com a quitosana, produzindo apenas irritação leve a moderada.

O Quadro 1 apresenta as principais classes de fármacos que vem sendo investigadas com partículas de quitosana, com diferentes vias de administração testadas.

**Quadro 1. Exemplos de diferentes categorias de fármacos em partículas de quitosana e suas vias de administração**

| <b>Classe do fármaco</b>                       | <b>Fármaco</b>         | <b>Via de administração</b> | <b>Referência</b>               |
|------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Antineoplásicos                                | Mitoxantrona           | Intramuscular               | Jameela et al., 1996            |
|                                                | Citarabina             | Implante subcutâneo         | Blanco et al., 2000             |
| Antiinflamatórios                              | Indometacina           | Oral                        | Shiraishi et al., 1993          |
| Agentes cardíacos                              | Propranolol            | -                           | Lim&Wan, 1998                   |
| Antibióticos                                   | Tetraciclina           | Oral                        | Hejazi&Amiji, 2002              |
| Antitrombóticos                                | Heparina               | -                           | Gallo&Hassan, 1988              |
| Esteróides                                     | Progesterona           | Intramuscular               | Jameela et al., 1998            |
| Proteínas                                      | Antígenos              | -                           | Mi et al., 1999c                |
| Hormônios                                      | Insulina               | Nasal                       | Fernandez-Urrusuno et al., 1999 |
|                                                | Melatonina             | Oral                        | Lee et al., 1998                |
| Terapia gênica                                 | DNA                    | Intramuscular               | Aral et al., 2000               |
| Agentes com ação sobre sistema nervoso central | Pentazocina            | Nasal                       | Sankar et al., 2001             |
|                                                | Morfina                | Nasal                       | Illum et al., 2002              |
| Agentes anti-infecciosos                       | Clorexidina            | Mucosa oral                 | Giunchedi et al., 2002          |
| Agentes gastrointestinais                      | Cimetidina, famotidina | -                           | He et al., 1999                 |
| Antivirais                                     | Aciclovir              | Oftálmica                   | Genta et al., 1997              |

### 3.4 Preparação das microesferas de quitosana

O processamento da quitosana para a preparação de microesferas tem sido extensamente estudado desde a década de 80. Dentre inúmeras, somente quatro técnicas principais têm sido propostas: (a) gelificação ionotrópica com um polieletrólito de carga oposta, tais como o tripolifosfato (TPP) ou alginato; (b) coacervação simples ou complexa; (c) emulsificação com evaporação de solvente; e (d) secagem por atomização (Kas, 1997).

### **3.4.1 Gelificação ionotrópica**

Neste método, solução de quitosana é preparada e extrudada através de uma agulha em uma solução aquosa de tripolifosfato ou outro ânion sob agitação. As esferas são removidas da solução iônica por filtração, lavadas com água destilada, secas em temperatura ambiente.

Ko et al. (2002) prepararam microesferas de quitosana pela técnica de gelificação ionotrópica utilizando o tripolifosfato como agente físico de reticulação, encapsulando a felodipina. A liberação do fármaco a partir das microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato diminuiu quando o tempo de reticulação foi aumentado.

Como uma vantagem apresentada por este método, está a não utilização de agentes de reticulação que podem induzir a efeitos tóxicos e outros efeitos indesejáveis (Dumitriu & Chornet, 1998).

### **3.4.2 Coacervação**

Esta técnica de preparo de microesferas é conhecida desde a década de 60, e desde então, diversos trabalhos têm descrito os princípios e métodos de preparação de micropartículas por coacervação, que pode ser simples ou complexa:

#### **3.4.2.1 Coacervação simples**

Neste processo, o polímero é solubilizado e então é adicionado um soluto, o qual forma um derivado do polímero insolúvel com a conseqüente precipitação. O processo de coacervação usa o fenômeno de desolvatação parcial dos polímeros e sua agregação em resposta a trocas químicas ou físicas no meio (Porte & Couarraze, 1994).

Este processo evita o uso de solventes orgânicos e agentes químicos de reticulação. Berthold et al. (1996) prepararam microesferas de quitosana encapsulando o fármaco prednisolona, utilizando o sulfato de sódio como precipitante. A adição de sulfato de sódio à solução de quitosana resultou em um decréscimo da solubilidade da quitosana, levando à precipitação da quitosana como um derivado pouco solúvel.

### 3.4.2.2 Coacervação complexa

Micropartículas de quitosana também podem ser preparadas pela coacervação complexa. Estas micropartículas são formadas pela interação interiônica entre polímeros de cargas opostas. Bartkowiak (2001) revisou a influência dos parâmetros mais pronunciados que podem ser usados para modular as propriedades de micropartículas binárias. Estes parâmetros foram divididos em duas categorias; a primeira inclui a massa molar do poliânion, pH, força iônica e concentração de ambos polieletrólitos, que podem ser manipuladas simultaneamente para controlar as propriedades mecânicas e estruturais. O segundo grupo, a massa molar do poliânion e o tempo de reação, influenciam somente a resistência mecânica.

Gaserod et al. (1998) estudaram a interação entre quitosana e alginato na formação de micropartículas, tanto gotejando a solução de alginato na solução de quitosana, quanto o inverso. Eles observaram que a interação entre alginato e quitosana era favorecida pela redução da massa molar da quitosana ( $< 20$  KDa), pela redução da fração de N-desacetilação e pelo aumento do pH (faixa de 4-6). A estabilidade das partículas era fortemente dependente da quantidade de quitosana que interagiu com o alginato (Gaserod et al., 1999).

### 3.4.3 Emulsificação com evaporação de solvente

Este método é o mais usado para a microencapsulação, por ser considerado o método mais simples. Este método envolve a formação de uma emulsão entre a solução polimérica e uma fase contínua imiscível, sendo aquosa formará uma emulsão O/A e se oleosa formará uma emulsão A/O. A emulsão formada é submetida à agitação até a maior parte do solvente orgânico evaporar, levando a solidificação das microesferas. As microesferas podem então ser lavadas, centrifugadas e liofilizadas para obter microesferas secas.

Bogataj et al. (2000) prepararam microesferas pela técnica de evaporação de solvente usando os solventes acetona/parafina líquida. A solução de fármaco (em acetona) foi dispersa em uma solução de quitosana e esta mistura foi emulsificada em parafina líquida e agitada. A suspensão das microesferas foi filtrada, lavada e seca. Estearato de

magnésio foi adicionado como agente de prevenção da aglomeração. Os resultados mostraram que o tamanho médio de partícula diminuiu com o aumento da quantidade de estearato de magnésio usada na preparação das microsferas.

Emulsões múltiplas também podem ser preparadas pela técnica por evaporação de solvente utilizando o processo de emulsificação em três etapas. A solução aquosa do fármaco e a fase oleosa contendo estabilizadores da emulsão são combinadas para formar uma emulsão água-em-óleo (etapa 1). Depois a emulsão A/O é dispersa na solução polimérica (etapa 2). E por fim a evaporação do solvente (etapa 3). As microsferas podem então ser lavadas, centrifugadas e liofilizadas para obter microsferas secas.

Pavanetto et al. (1996) avaliaram os parâmetros de processo envolvidos na preparação de microsferas pelo de emulsão múltipla O/A/O. A influência das variáveis críticas, concentração de ácido acético e proporção polímero/fármaco, foram avaliadas em função da morfologia e eficiência de encapsulação das microsferas resultantes. O método produziu microsferas bem formadas com bons rendimentos. A concentração de ácido acético na solução polimérica influenciou o tamanho de partícula e a eficiência de encapsulação das microsferas, sendo que foi obtida uma alta eficiência de encapsulação com a menor proporção de quitosana/fármaco.

#### **3.4.4 *Spray drying***

A técnica de *spray drying*, é uma tecnologia muito utilizada em diversos segmentos industriais incluindo o farmacêutico. Embora necessite de investimentos médios ou elevados em instalações e operação, várias vantagens justificam a sua utilização crescente. Dentre essas vantagens está a produção reprodutível de partículas, a aplicabilidade da técnica tanto com materiais sensíveis quanto resistentes à temperatura, a capacidade de processar diversas matérias-primas e a flexibilidade na formulação. Os fatores de formulação e os parâmetros de processo determinam as propriedades das partículas produzidas (Wendel&Çelik, 1997).

O processo envolve quatro estágios sequenciais: (a) Atomização dos materiais de alimentação através de um bico atomizador; (b) Contato das gotículas produzidas com o ar; (c) Secagem (d) Coleta do produto sólido (micropartículas) obtido (Broadhead et al., 1992).

Em comparação com as outras técnicas de microencapsulação, a secagem por atomização oferece a vantagem de ser um processo de etapa única. Adicionalmente tem-se a rapidez, pequena dependência sobre as características de solubilidade do fármaco e do polímero, e facilidade de escalonamento. Essas características fazem com que a avaliação das suas potencialidades como um método de encapsulação de fármacos tenha se tornado uma área de pesquisa de interesse crescente (Ré, 1998, Ré, 2002, He et al., 1999, Huang et al., 2003b).

He et al. (1999) avaliaram a influência dos parâmetros de processo de *spray drying* (tamanho do bico, vazão de alimentação, fluxo de ar e temperatura de entrada) sobre o tamanho de microesferas de quitosana e seu potencial zeta. O tamanho dessas microesferas preparadas usando o bico padrão (0,5 mm) foi 3,63  $\mu\text{m}$ , e 4,83  $\mu\text{m}$  quando um bico de 1,0 mm foi usado. Com o aumento da vazão de alimentação (15 ml/min) microesferas de maior tamanho foram obtidas. Quando o fluxo de ar foi reduzido de 10 para 6 l/min ocorreu um pequeno aumento aparente no tamanho das partículas de 3,32 a 3,81  $\mu\text{m}$ . Microesferas com um pequeno tamanho de partícula foram produzidas usando altas vazões de ar, e a temperatura de entrada teve pequena influência sobre o tamanho das partículas. Os parâmetros de processo (tamanho do bico, vazão de alimentação e fluxo de ar) afetaram o tamanho das microesferas resultantes, porém mantiveram a sua densidade de cargas na superfície devido ao mesmo nível de reticulação.

Microesferas com diferentes tamanhos e densidades de carga puderam ser produzidas pelo método de *spray drying* sob diferentes condições de processo (He et al., 1999; Huang et al., 2003b). He et al. (1999) também estudaram a influência da concentração da quitosana sobre o tamanho das partículas. Com o aumento da concentração das soluções de quitosana (0,1 – 0,5%), o diâmetro médio das partículas foi aumentado de 2,69 para 4,22  $\mu\text{m}$ .

Microesferas de quitosana têm sido preparadas para diferentes propostas de aplicação/interesses através do uso da técnica de *spray drying*, bem como com diferentes fármacos. O Quadro 2 apresenta alguns exemplos da literatura.

**Quadro 2. Exemplos de microesferas de quitosana preparadas pela técnica de *spray drying***

| Fármaco                             | Aplicação/Interesse                      | Referência                   |
|-------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------|
| Teofilina                           | Pós secos para inalação                  | Asada et al., 2004           |
| Carbamazepina                       | Modificação do perfil de liberação       | Filipovic-Grcic et al., 2003 |
| Progesterona                        | Liberação controlada                     | Cerchiara et al., 2003b      |
| Vitamina D2                         | Liberação sustentada e gastroresistência | Shi&Tan, 2002                |
| Hidrocortisona                      | Aumento do perfil de dissolução          | Filipovic-Grcic et al., 2000 |
| Vancomicina                         | Liberação sustentada por via nasal       | Cerchiara et al., 2003a      |
| Metoclopramida                      | Liberação controlada                     | Ganzá-Gonzalez et al., 1999  |
| Cimetidina, Famotidina e nizatidina | Liberação controlada                     | He et al., 1999              |
| Betametasona                        | Liberação pulmonar                       | Huang et al., 2003a          |
| Ampicilina                          | Liberação controlada                     | Giunchedi et al., 1998       |
| Diclofenaco de sódio                | Liberação cólon específica               | Lorenzo-Lamosa et al., 1998  |
| Clorexidina                         | Comprimidos orais                        | Giunchedi et al., 2002       |

### 3.5 Reticulação de microesferas de quitosana

A reticulação interliga as cadeias poliméricas por agentes de reticulação para a formação de uma estrutura tridimensional. As propriedades dos hidrogéis reticulados dependem principalmente da sua densidade de reticulação, ou seja, a razão molar de agente reticulante por unidade monomérica do polímero (Peppas, 1986).

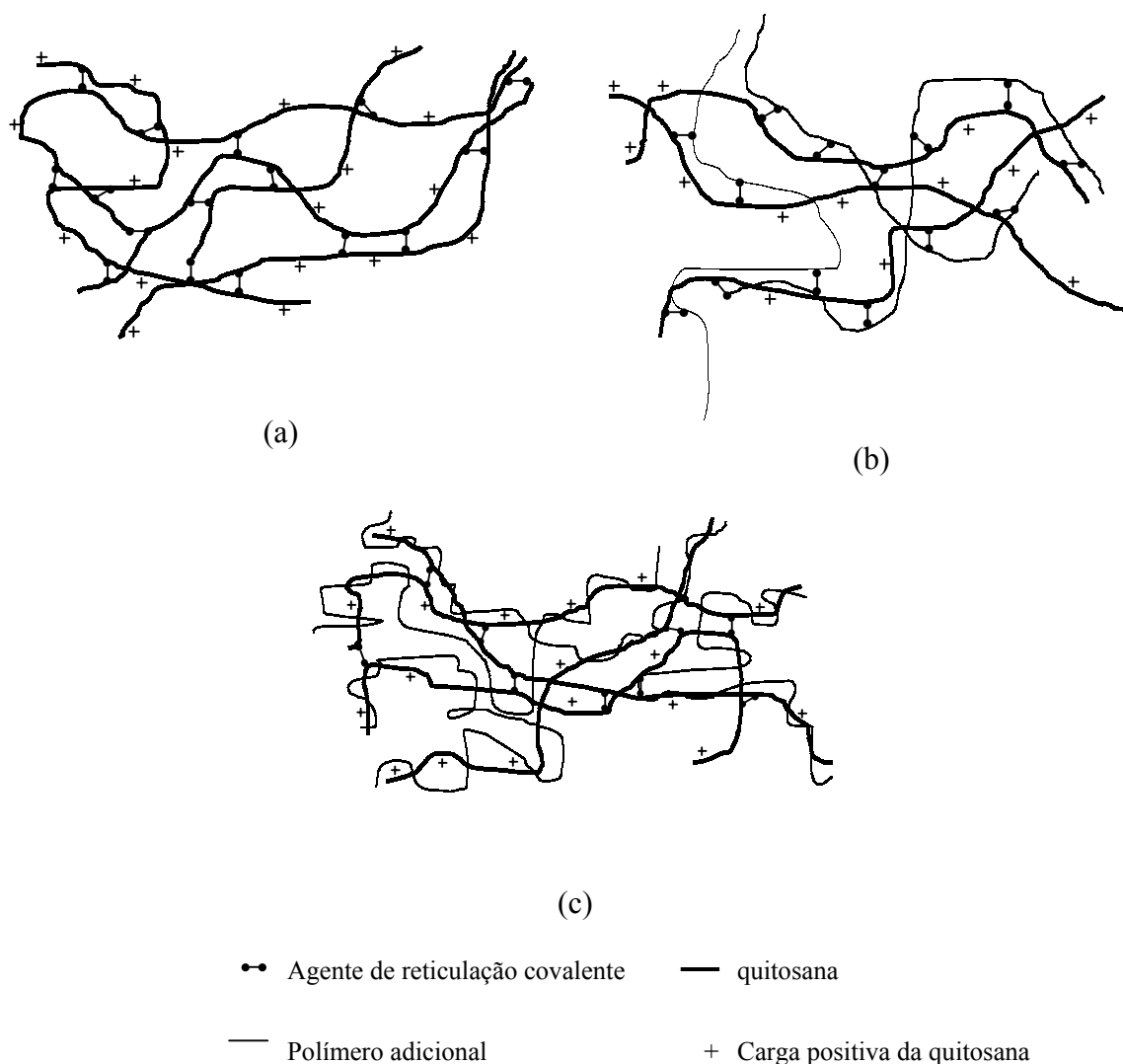
A reticulação pode ocorrer simultaneamente ao processo de formação das microesferas em diferentes técnicas de preparação, ou com microesferas pré-formadas por diferentes técnicas. As microesferas de quitosana também podem ser classificadas como hidrogéis, os quais são definidos como redes macromoleculares intumescidas em água ou fluidos biológicos (Peppas, 1986, Langer & Peppas, 2003). A reticulação de hidrogéis de quitosana pode ser dividida em duas classes (Berger et al., 2004 a,b):

- Reticulação química: é formada por ligações covalentes irreversíveis; sendo que o intumescimento e a liberação não são considerados sensíveis ao pH.
- Reticulação física: é formada por várias ligações reversíveis, como por exemplo, interações iônicas, complexos de polieletrólitos; sendo que o intumescimento e a liberação são considerados pH dependentes.

### **3.5.1 Reticulação química**

Neste tipo de reticulação os agentes de reticulação são moléculas de massa molar muito menor que a massa molar das cadeias entre duas reticulações consecutivas (Peppas, 1986). Berger et al. (2004) revisaram a reticulação de hidrogéis de quitosana, dividindo os hidrogéis covalentemente reticulados em três tipos com relação a sua estrutura: quitosana reticulada consigo mesma (Figura 2a), rede polimérica híbrida (Figura 2b) e rede polimérica semi ou completamente interpenetrada (Figura 2c).





**Figura 2. Representação esquemática da estrutura de hidrogéis formados por (a) quitosana reticulada consigo mesma; (b) rede polimérica híbrida; (c) rede semi-interpenetrada (Adaptado de Berger et al., 2004a).**

Em cada um destes três tipos de estruturas, ligações covalentes são as principais interações que formam a rede, mas outras interações não podem ser excluídas (Wang et al., 2001). A estrutura mais simples apresentada aqui é a quitosana reticulada consigo mesmo. Como representado na Figura 2a, a reticulação envolve duas unidades estruturais que podem ou não pertencer à mesma cadeia polimérica de quitosana (Monteiro et al., 1999).

Em hidrogéis formados por rede polimérica híbrida, a reação ocorre entre a unidade estrutural da cadeia da quitosana e uma unidade estrutural de uma cadeia

polimérica de outro tipo (Figura 2b), mesmo se a reticulação de duas unidades estruturais do mesmo tipo e/ou pertencendo à mesma cadeia polimérica não pode ser excluída. Finalmente, rede polimérica semi ou completamente interpenetrada contém um polímero não reativo adicionado à solução de quitosana anteriormente à reticulação. Isto leva à formação de uma rede de quitosana reticulada na qual um polímero não reativo é aprisionado (semi-interpenetrado). Também é possível reticular ainda mais este polímero adicional a fim de se ter duas redes reticuladas aprisionadas, formando uma completa interpenetração.

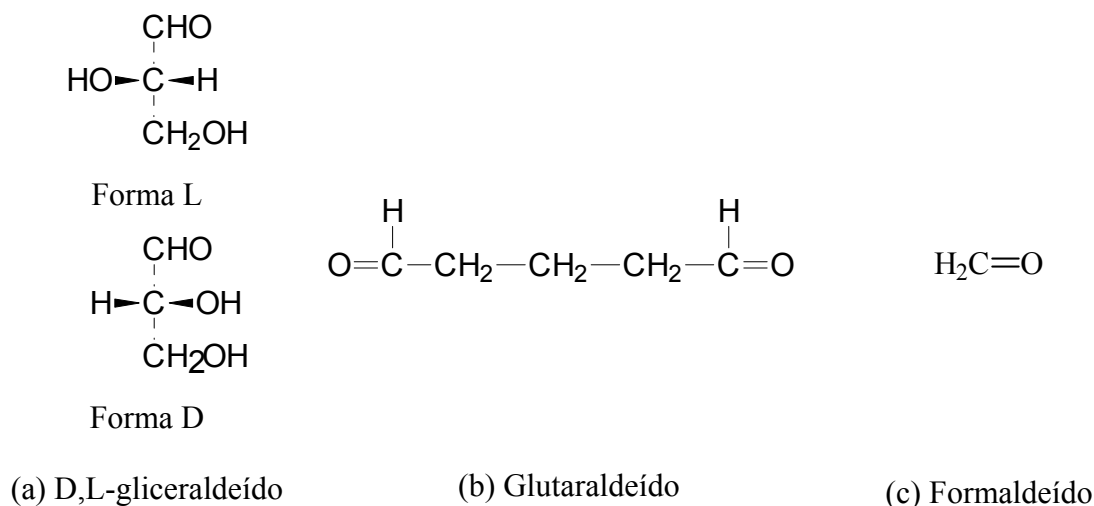
### **3.5.1.1 Reticulação covalente de microesferas de quitosana**

A reticulação das microesferas de quitosana tem sido realizada experimentalmente de diversas formas com as diferentes técnicas de preparação de microesferas de quitosana. Existem basicamente duas formas de reticular as microesferas: durante a preparação das microesferas e com microesferas pré-formadas. Pela técnica de emulsificação com evaporação de solvente Dini et al. (2003) prepararam uma emulsão estável (~1 h) com a quitosana, e depois adicionaram o glutaraldeído como reticulante controlando o tempo para modulação da densidade de reticulação. Berthold et al. (1996) prepararam microesferas de quitosana pela técnica de coacervação simples. Os autores adicionaram a uma solução de quitosana uma solução de sulfato de sódio durante a agitação a 400 rpm juntamente com sonicação. As microesferas resultantes foram separadas por centrifugação e lavadas com água. No procedimento de reticulação as microesferas de quitosana pré-formadas foram adicionadas em uma solução de glutaraldeído por diferentes tempos.

Diversos agentes têm sido empregados para a reticulação de microesferas de quitosana, no entanto os aldeídos são os mais utilizados, especialmente o glutaraldeído (Dini et al., 2003; Conti et al., 1998; Berthold et al., 1996; Chithambara et al., 1992). Dentre os aldeídos também podemos citar o formaldeído (He et al., 1999; Ganzá-Gonzalez, 1999). O inconveniente encontrado na utilização destes reticulantes é que eles são geralmente considerados tóxicos (Ballantyne&Jordan, 2001; Leung, 2001), como mostra a  $DL_{50}$  em ratos do glutaraldeído, de 595 mg/kg (Budavari, 1996).

O D,L-gliceraldeído tem sido apontado mais recentemente como interessante alternativa aos outros aldeídos devido a sua baixa toxicidade (Oliveira et al., 2004; Conti et

al., 1998). De fato o D,L-gliceraldeído pode ser considerado um agente de reticulação não tóxico, sua  $DL_{50}$  em ratos sendo de 2000 mg/kg. Além disso, a forma destrógiara deste aldeído é fosforilada pela triosequinase no corpo humano formando D-gliceraldeído-3-fosfato que entra no ciclo da glicose (Görög et al., 1965), demonstrando grande potencial para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. A estrutura química destes aldeídos utilizados como agentes de reticulação estão apresentadas na Figura 3.



**Figura 3. Estrutura química dos aldeídos utilizados na reticulação química de microesferas de quitosana**

Os mecanismos das reações e estruturas dos compostos formados pela quitosana e estes aldeídos não têm sido estudados em detalhes, sendo um campo aberto a muitas suposições. Normalmente, para a reticulação da quitosana com glutaraldeído três estruturas distintas são sugeridas: (a) formação de somente uma base de Schiff, com um grupo aldeído do glutaraldeído, e o outro grupo aldeídico permanece livre, e é comumente usado para uma reação subsequente (Cestari & Airoidi, 1997); (b) a reticulação é formada com somente uma molécula de glutaraldeído e duas unidades monoméricas da quitosana, resultando na formação de duas bases de Schiff envolvendo ambos os grupos aldeídicos da molécula de glutaraldeído (Hsien & Rorrer, 1995); (c) a reticulação não é formada somente com uma molécula de glutaraldeído, mas polimerização do glutaraldeído, conseqüentemente formando uma cadeia de reticulação grande (Roberts & Taylor, 1996).

Monteiro et al. (1999) realizaram alguns estudos da interação entre a quitosana e o glutaraldeído. Segundo dados obtidos por estes autores, foi sugerido que a reticulação formada engloba 20 moles de glutaraldeído para cada unidade monomérica da quitosana, e que o processo é devido à polimerização do glutaraldeído. A reticulação final formada retém duas ou mais unidades monoméricas da quitosana, as quais podem ou não vir a ser da mesma cadeia polimérica. Os resultados de RMN, infravermelho e espectroscopia Raman evidenciaram a formação de ligações iminas estabilizadas pela ressonância com ligações etilênicas adjacentes.

Outros agentes de reticulação covalente também têm sido testados como a genipina (Mi et al., 2002), epicloridrina (He et al., 1999), ácido sulfúrico (Kumbar et al., 2002), entre outros. A genipina também tem sido apontada como um promissor agente de reticulação covalente, devido a sua utilização em fitoterápicos e corante de alimentos (Mi et al., 2002). A biocompatibilidade da genipina em humanos não foi avaliada ainda, mas *in vitro* demonstrou não ser citotóxica (Sung et al., 1999).

A reticulação covalente leva a formação de uma estrutura porosa permanente permitindo a difusão livre de água e aumentando as propriedades mecânicas da quitosana (Yin et al., 2000, Dal Pozzo et al., 2000). Devido a estes poros, hidrogéis de quitosana reticulados covalentemente podem ser usados com sistemas de liberação controlada para fármacos, a partir do qual estes são liberados por difusão (Thacharodi & Rao, 1993). Além disso, um aumento ou decréscimo do grau de intumescimento pode alterar consideravelmente o tamanho dos poros da rede polimérica, podendo modular a liberação do fármaco.

Robert & Buri (1985) avaliaram o efeito da densidade da reticulação sobre o transporte de água em micropartículas produzidas a partir de polímeros hidrofílicos. Os autores observaram que em micropartículas com uma alta densidade de reticulação ocorria uma difusão de acordo com a lei de Fick, no entanto à medida que foi diminuída a densidade de reticulação o mecanismo de difusão não obedeceu à lei de Fick. Duas razões foram atribuídas a este comportamento: (a) houve um efeito considerável da reticulação sobre o tempo de relaxação das cadeias poliméricas, e (b) a difusão do líquido penetrante na estrutura reticulada diminuiu mais rapidamente que o tempo de relaxação, como uma função da densidade de reticulação. A análise do comportamento do intumescimento

permite ganhar uma introspecção no comportamento da liberação do fármaco a partir de microesferas. Dini et al. (2001) reticularam microesferas de quitosana com glutaraldeído variando a densidade de reticulação e observando o efeito sobre o intumescimento e a liberação de hidroquinona. Os resultados demonstraram que à medida que a densidade de reticulação diminuiu o grau de intumescimento e a liberação do fármaco aumentaram.

A difusão também é influenciada pela natureza do agente de reticulação. A natureza química e o comprimento das ligações entre as unidades monoméricas influenciam a porosidade, captura de água e intumescimento (Crescenzi et al., 2000). O intumescimento e a difusão também são influenciados pela hidrofobicidade (Guan et al., 1996). Williams et al. (1998) estudaram o comportamento de microesferas de quitosana reticuladas com diferentes agentes de reticulação (reticuladas com glutaraldeído,  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , Tripolifosfato) em meio gasoso úmido para aerossolização de partículas por via pulmonar. Os resultados obtidos demonstram que as microesferas que tiveram uma maior hidrofobicidade (reticuladas com glutaraldeído) em relação às outras como menor hidrofobicidade ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ , Tripolifosfato, não reticuladas) tiveram menor influência da água (intumescimento), com uma conseqüente estabilidade no meio gasoso.

Sistemas formados de microesferas de quitosana reticuladas covalentemente (cadeias poliméricas reticuladas consigo mesma) são usados como sistemas de liberação controlada devido à possibilidade do fármaco difundir. Uma variedade de tais sistemas é apresentada no Quadro 3.

**Quadro 3. Exemplos de microesferas de quitosana reticuladas covalentemente e suas aplicações**

| Reticulante                                        | Fármaco                                                 | Aplicação                 | Referência                     |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Gliceraldeído,<br>Glutaraldeído,<br>Epilcloridrina | Cetilpiridina                                           | Desinfetante/cicatrizante | Conti et al., 1998             |
| Gliceraldeído                                      | -                                                       | Liberação controlada      | Oliveira et al., 2004          |
| Formaldeído,<br>Glutaraldeído                      | Cimetidina,<br>famotidina,<br>nizatidina                | Liberação controlada      | He et al., 1999                |
| Glutaraldeído                                      | -                                                       | Liberação controlada      | Berthold et al., 1996          |
| Glutaraldeído                                      | -                                                       | Liberação pulmonar        | Williams III et al.,<br>1998   |
| Glutaraldeído                                      | Teofilina, ácido<br>acetil salicílico,<br>griseofulvina | Liberação controlada      | Chithambara et al.,<br>1992    |
| Glutaraldeído                                      | mitoxantrona                                            | Liberação controlada      | Jameela&Jayakrishnan,<br>1995. |
| Glutaraldeído                                      | -                                                       | Liberação controlada      | Baki&Odabasi, 2000             |
| Glutaraldeído                                      | -                                                       | Mucoadesivos              | Genta et al., 1998             |
| Genipina                                           | -                                                       | Injetável                 | Mi et al., 2002                |

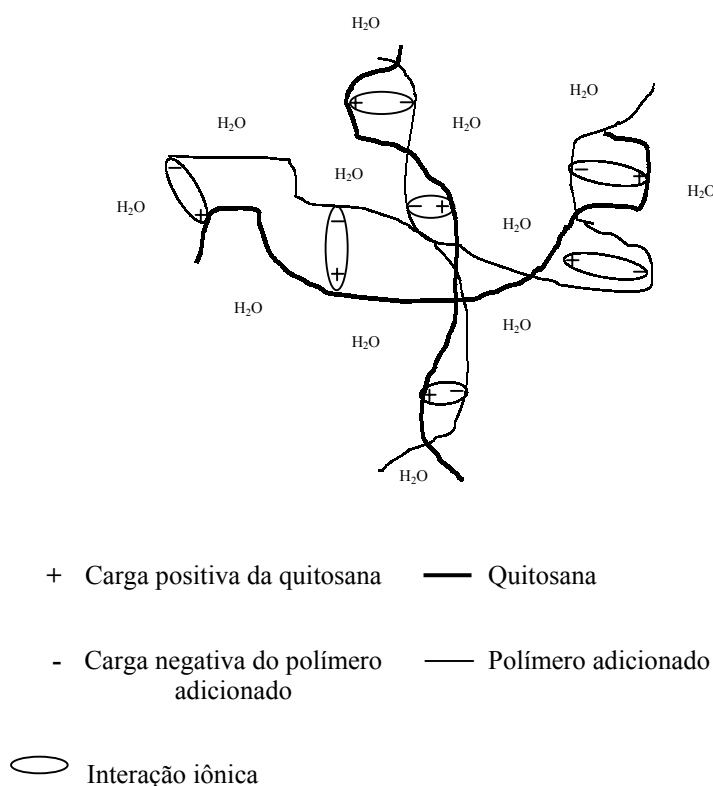
### 3.5.2 Reticulação física

A reticulação física pode ser feita através de diferentes tipos de reticulação, entre elas a reticulação iônica, complexos de polieletrólitos, complexação da quitosana/PVA e quitosana enxertada. A reticulação iônica ocorre por interação de íons com os grupos amino da quitosana positivamente carregados. Visto que a natureza destas interações é a mesma do que com complexos de polieletrólitos, a diferença está em que a massa molar dos agentes de reticulação iônica são muito menores que os da reticulação com complexos de polieletrólitos. Berger et al. (2004a) classificam como reticulação iônica as entidades que são moléculas iônicas ou íons com massa molar bem definido. Em contraste, com complexos de polieletrólitos, os agentes reticulantes são polímeros com uma distribuição grande de massa molar. A complexação da quitosana/PVA é similar ao complexo de polieletrólitos, mas é formado por diferentes interações (Koyano et al., 2000). O enxerto da

quitosana é feito através da inserção de derivados funcionais covalentemente ligados aos grupos amino ou carboxílico da quitosana como uma forma de aumentar as propriedades de complexação (Chen & Wang, 2001).

### 3.5.2.1 Complexo de polieletrólitos (PEC)

PEC são geralmente polímeros biocompatíveis que exibem intumescimento pH dependente. A formação destes complexos é formada como representado pela Figura 4, sendo caracterizado por um microambiente hidrofílico com alto teor de água e densidade elétrica de carga. A atração eletrostática entre os grupos amino catiônicos da quitosana e os grupos aniônicos do outro polieletrólito são a principal interação para a formação do PEC (Denuziere et al., 1996).



**Figura 4. Representação da estrutura de um complexo de polieletrólitos contendo a quitosana e polímero negativamente carregado (Adaptado da referência Berger et al., 2004b).**

A preparação de PECs necessita somente, além da quitosana, um polímero polianiónico. Para a formação de PECs, ambos os polímeros devem estar ionizados e possuir cargas opostas. Isto significa que a interação irá ocorrer nos valores de pH na vizinhança do intervalo de  $pK_a$  dos dois polímeros (Kim et al., 2004b). Como apenas a densidade de reticulação governa as propriedades dos complexos de polieletrólitos, as propriedades são principalmente determinadas pelo grau de interação entre os polímeros. A interação depende essencialmente da densidade de cargas e determina a sua proporção relativa na formação do PEC (Berger et al., 2004a).

Como esta proporção e o ambiente químico são os principais fatores que influenciam o intumescimento, é possível modular as propriedades de PECs pelo controle da complexação. O fator mais importante a ser controlado é o pH da solução, mas a temperatura, força iônica (Lee et al., 1997) e ordem de mistura (Fukuda & Kikuchi, 1974) também são importantes. Há fatores secundários como flexibilidade dos polímeros (Takahashi et al., 1990), massa molar e grau de desacetilação da quitosana (Yan et al., 2001), o grau de substituição de outro polieletrólito e a natureza do solvente (Yao et al., 1997). Existem muitos parâmetros que influenciam a preparação de PECs sendo um dos principais inconvenientes, o que explica as dificuldades encontradas com processos em larga escala (Long & VanLuyen, 1996).

PECs exibem intumescimento pH dependente não somente em condições ácidas, mas também em condições básicas. Com uma mudança de pH, o balanço de cargas é modificado com conseqüente mudança no grau de interação entre os dois polímeros e o intumescimento ocorre pela dissociação do complexo. Em meio ácido, o políácido é neutralizado e devido aos grupos amino livres da quitosana apareceram cargas positivas. O intumescimento é causado pela repulsão mútua e a entrada de água junto com contra-íons. No meio básico o mecanismo é o mesmo, mas o intumescimento é induzido por cargas negativas livres do políácido (Sakiyama et al., 1999). O intumescimento também é dependente dos íons presentes (Chu et al., 1996) e elasticidade dos polímeros (Sakiyama et al., 1999). Como o intumescimento de complexo de polieletrólitos é influenciado por muitos fatores, é possível obter uma modulação mais precisa para liberação de fármacos (Berger et al., 2004a).

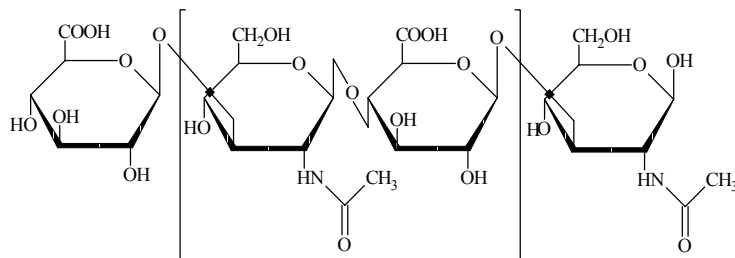


Os poliânions comumente utilizados na preparação de PECs com quitosana e exemplos de aplicações como sistemas de liberação controlada estão apresentados no Quadro 4.

**Quadro 4. Poliânions que formam complexos de polieletrólitos com quitosana e exemplos de aplicações**

| Classe química       | Polieletrólito      | Grupo ácido        | Aplicação                                   | Referência             |
|----------------------|---------------------|--------------------|---------------------------------------------|------------------------|
| Polissacarídeos      | Ácido hialurônico   | -COO <sup>-</sup>  | Liberação controlada gentamicina            | Lim et al., 2000       |
|                      | Alginato            | -COO <sup>-</sup>  | Liberação controlada nicardipina            | Takka & Acartürk, 1999 |
|                      | Dextrana            | -OSO <sup>3-</sup> | Liberação controlada por via oral           | Sakiyama et al., 2001  |
|                      | Pectina             | -COO <sup>-</sup>  | Vetorização e liberação controlada no cólon | Munjeri et al., 1997   |
| Proteína             | Colágeno            | -COO <sup>-</sup>  | Liberação controlada propranolol            | Zhang et al., 1997     |
| Polímeros sintéticos | Ácido polifosfórico | -OPO <sup>3-</sup> | Liberação sustentada da 6-mercaptopurina    | Mi et al., 1999a       |
|                      | Polifosfato         | -OPO <sup>3-</sup> | Liberação controlada da 6-mercaptopurina    | Mi et al., 1999b       |

O ácido hialurônico, um polissacarídeo de alta massa molar (Figura 5), foi descoberto por Meyer&Palmer em 1934 em humor vítreo de olhos de gatos, como citado por Lapcik et al. (1998). É um polímero linear não ramificado, composto de unidades repetidas do dissacarídeo N-acetil-D-glicosamina e ácido D-glicurônico com ligação  $\beta$  1-4 (Rapport et al., 1951). Os dissacarídeos são ligados através de ligações  $\beta$  1-3 para a formação das cadeias do ácido hialurônico.



**Figura 5. Estrutura química do ácido hialurônico**

A obtenção do AH foi primeiramente realizada através de extração de cordão umbilical e crista de galo. De forma promissora, a via biotecnológica vem sendo usada para obtenção de AH (Mashimoto et al., 1988). A partir das diferentes formas de obtenção do AH, é possível obter diferentes graus de pureza e massa molar. A massa molar do AH varia de  $10^4$  a  $10^7$  Da. O valor de pK obtido através da extrapolação de  $\alpha = 0$  foi estimado em 2,9 (Reed et al., 1989). Desde a década de 80 o AH e seus derivados vêm sendo intensivamente explorados como sistema de liberação controlada nasal, parenteral, tópico e implantes para uma variedade de fármacos, como revisado por Lapcik et al. (1998).

A complexação de polieletrólitos na superfície de partículas pré-formadas tem apontado recentemente como uma nova estratégia para reforçar ou gerar novas propriedades a sistemas microparticulados. Barbault-Foucher et al. 2002 empregaram três estratégias para revestir nanosferas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) (1) cobrindo o núcleo de PCL durante a formação das partícula por entrelaçamento entre as cadeias dos polímeros (2) cobertura das PCL pré-formadas por adsorção do AH e (3) cobertura por interação eletrostática entre o AH carregado negativamente e tensoativos catiônicos tais como o cloreto de benzalcônio ou o lipídio estearilamina usados na formulação. No primeiro caso a distribuição de tamanho de partículas foi drasticamente alterada. No procedimento de adsorção do AH na superfície das nanoesferas, os resultados mostraram uma interação muito fraca do polímero hidrofóbico PCL com o polímero hidrofílico AH. No entanto, quando as nanoesferas foram formadas com tensoativos catiônicos a interação do AH com a superfície das nanoesferas apresentou um grande aumento, sugerindo que a adsorção é dependente de cargas positivas.

A complexação de polímeros na superfície de partículas pré-formadas tem sido explorada em sistemas que utilizam polímeros hidrofóbicos com baixa densidade de cargas,

sendo necessário à presença de moléculas auxiliares para estabilizar a complexação. No entanto, Denuziere et al. (1996) demonstraram através de um estudo físico-químico que um forte PEC é formado entre quitosana e ácido hialurônico sem presença de qualquer molécula adicional. Lim et al. (2000) prepararam microesferas para liberação nasal compostas de quitosana/AH entrelaçados, AH, e quitosana, para encapsulação de gentamicina, pelo método de evaporação de solvente. As microesferas de AH tiveram diâmetro médio 19,91  $\mu\text{m}$ , enquanto que a combinação quitosana/AH e a quitosana sozinha produziram microesferas com diâmetros médios 28,60  $\mu\text{m}$  e 29,47  $\mu\text{m}$  respectivamente. As eficiências de incorporação do fármaco modelo, gentamicina foram 46,90 %, 28,04 e 13,32 % para os sistemas AH, AH/quitosana e quitosana, respectivamente. A mucoadesão foi investigada pelo método da taxa de transporte mucociliar, sendo que as microesferas de AH e AH/quitosana foram às formulações que apresentaram maior mucoadesividade.

Kim et al. (2004 a,b) prepararam PECs compostos de várias proporções de quitosana e AH. Os PECs formados exibiram um alto intumescimento, demonstrando ser pH e temperatura dependentes, como um resultado da dissociação das ligações iônicas e incrementos da temperatura. A formação foi investigada por espectroscopia de infravermelho e análise térmica (Kim et al., 2003).

Lee et al. (2003) também prepararam PECs compostos de quitosana e AH em várias regiões de pH e com diferentes proporções dos polieletrólitos. Em baixos pHs uma interação iônica forte entre os grupos  $\text{NH}_3^+$  da quitosana e os grupos  $\text{COO}^-$  e  $\text{COOH}$  do AH foi formada. A formação do PEC resultou em um decréscimo na cristalinidade e estabilidade térmica, causada pela interação entre os polieletrólitos. Foi realizada uma avaliação em ratos da atividade cicatrizante de esponjas formadas de quitosana e AH. A análise histológica revelou uma proliferação de fibroblastos nas feridas com uma conseqüente redução da infecção.

### 3.5.3 Considerações finais

A escolha entre a utilização da reticulação física ou química da quitosana será baseada principalmente na necessidade de cada aplicação, levando-se em conta as propriedades geradas por cada tipo de reticulação. O Quadro 5 apresenta um resumo das características revisadas e discutidas por Berger et al. (2004 a,b) que são geradas pela reticulação química e física de hidrogéis de quitosana.

**Quadro 5. Principais características da reticulação química e física de hidrogéis de quitosana**

|                          | Reticulação química         | Reticulação física                   |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Preparação               | Simples                     | Simples e condições brandas          |
| Intumescimento/liberação | pH dependente em meio ácido | pH dependente em meio ácido e básico |
| Tipo de reticulação      | Irreversível                | Reversível                           |
| Toxicidade               | Questionável                | Boa                                  |
| Propriedades mecânicas   | Alta                        | Baixa                                |
| Dissolução               | Baixa                       | Alta                                 |
| Escalonamento            | Simples                     | Complicado                           |

Vimos durante o desenvolver desta revisão bibliográfica que tanto a reticulação química quanto a reticulação física de microesferas de quitosana podem gerar propriedades diferentes que as tornam bastante interessantes como sistemas de liberação controlada de fármacos. Aproveitando este fato, neste trabalho realizou-se uma série de reticulações, tanto química quanto física, nas microesferas de quitosana gerando novas propriedades nestas partículas, as quais foram avaliadas quanto ao intumescimento, hidrofobicidade, morfologia, granulometria, área superficial, carga superficial, teor de umidade, análise térmica e estrutura cristalina.

### 3.6 Administração nasal de fármacos

A administração de fármacos por vias não invasivas tais como: oral, nasal, ocular e transdérmica vem atualmente ganhando destaque por aliarem os benefícios da terapia com o conforto do paciente. O nariz humano representa uma rota alternativa para liberação sistêmica de uma ampla faixa de agentes terapêuticos, evitando a sua degradação no trato gastrointestinal. Para muitos pacientes, a via nasal pode ser preferida, pois evita problemas associados à deglutição, minimiza o estresse gástrico, aumenta o comprometimento, e potencialmente reduz custos de repetidas visitas ao médico. Finalmente, a via nasal pode oferecer uma melhora no perfil de fármacos no mercado em combinação com a geração da propriedade de um novo sistema de liberação (Illum et al., 2002).

As principais razões para a utilização da rota nasal para a vacinação estão apresentadas no Quadro 6 (Illum, 2003).

**Quadro 6. Principais razões para explorar a rota nasal para a vacinação (adaptado de Illum, 2003).**

- A mucosa nasal é o primeiro lugar de contato com antígenos inalados
- As passagens nasais são ricas em tecidos linfóides (NALT\*)
  - NALT é conhecida como o anel de Waldeyer em humanos
    - Adenóide ou tonsilas nasofaríngeas
    - Bandas linfóides bilaterais
    - Trompa bilateral e facial ou tonsilas palatina
    - Tonsila lingual bilateral
- Criação de respostas imune sistêmicas (IgG) e em mucosas (sIgA)
- Baixo custo, amigável ao paciente, não injetável, seguro.

---

(\*) NALT, do inglês, *nasal-associated lymphoid tissue*

Na administração por via nasal, existem três fatores principais que limitam a absorção de fármacos: o mais importante para fármacos polares especialmente os de elevada massa molecular, tais como peptídeos e proteínas, é a baixa permeabilidade da membrana (Huang&Donovan, 1998); os outros fatores são o mecanismo de eliminação (“*clearance*”) mucociliar, o qual conduz a tempos de residência pequenos no sítio de absorção limitando a liberação sistêmica de polipeptídios (Schipper et al., 1991), e a possibilidade de uma degradação enzimática das moléculas dentro do lúmen da cavidade nasal ou durante a passagem através da barreira epitelial (Illum, 2003).

A produção de microesferas utilizando polímeros mucoadesivos fornece proteção ao fármaco (principalmente proteínas e peptídeos) da degradação por enzimas, além de ser possível a liberação controlada, obtendo-se desta forma perfis de liberação adequados (Edman et al., 1992). Embora o tempo de residência na cavidade nasal é consideravelmente aumentado para microesferas que absorvem água em contato com a mucosa e formam um gel, parece que este não é o único fator que aumenta a absorção de fármacos hidrofílicos grandes. Quando as microesferas absorvem água do muco e se intumescem, as células epiteliais ficam desidratadas e causam a separação das junções celulares. Visto que o processo é reversível, um aumento na absorção de fármacos que são transportados via paracelular acontecerá principalmente durante um curto período de tempo quando as junções celulares estão separadas (Pereswetoff-Morath, 1998).

O polissacarídeo quitosana tem sido um dos polímeros bioadesivos mais estudados para liberação de fármacos por via nasal. Mais recentemente o ácido hialurônico tem também sido investigado tanto para a produção de microesferas nas formas de éster ou sal sódico (Pritchard, 1996), como também para revestimento de microesferas preparadas com outros materiais, visando melhorar a sua mucoadesividade (Barbault-Foucher et al., 2002).

Dentre os fatores físicos que afetam a utilização desta via de administração está o tamanho de partícula, pois afeta a deposição no trato respiratório. Um diâmetro de partícula maior que 10  $\mu\text{m}$  minimiza as perdas de fármaco para os pulmões (Florence & Attwood, 2003). O tamanho de partículas de microesferas usadas em estudos de sistema de liberação controlada por via nasal é cerca de 45  $\mu\text{m}$  no estado intumescido (Pereswetoff-Morath, 1998).

O intumescimento de um polímero contribui para o comportamento de mucoadesividade. No entanto, a idéia de que aumentando-se o intumescimento contribuirá para um aumento na adesividade não é correta. Tem sido demonstrado em estudos com hidrocolóides que embora a força adesiva aumente com o aumento da capacidade de intumescimento, um conteúdo excessivo de água leva a uma ruptura abrupta na ligação adesiva (Learnerts et al., 1990).

O tempo de intumescimento é uma importante estimativa de adesão. Tem sido mostrado que imediatamente após o início do intumescimento a adesão ocorrerá, mas a ligação formada não é muito forte. Existe uma quantidade ótima de água necessária para

partículas de hidrocolóides desenvolverem a máxima força adesiva. Se determinado hidrocolóide vem a ser muito susceptível a permeação de água, este pode ser deslocado pela água e conseqüentemente perder a adesividade (Learnerts et al., 1990).

### 3.7 Tuberculose e vacinação gênica

A tuberculose atingiu nos tempos atuais 10 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes por ano, sendo 18,5% de todas as mortes em adultos entre 15 e 59 anos – a fase mais produtiva da população mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 32% da população mundial está infectada com o bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*).

Apesar de haver fármacos eficientes para o combate à tuberculose, a vacinação representa ainda a melhor alternativa para a proteção dos indivíduos contra essa doença. O Quadro 7 apresenta as principais vantagens da vacinação gênica (Silva, 1999).

**Quadro 7. Vantagens da vacinação gênica (adaptado de Silva, 1999).**

- 
- Previne o estabelecimento da infecção e da doença
  - Elimina a infecção causada pelo bacilo da tuberculose
  - Cura casos crônicos e doença disseminada
  - Resolve casos de tuberculose causada por bactérias altamente resistentes aos medicamentos usados no combate à doença
  - Impede a reativação da doença quando os animais são submetidos a uma imunodepressão pelo tratamento com fármacos imunossupressores
  - Permite que o período de tratamento efetivo contra a tuberculose seja encurtado de 8 para 2 meses pela administração concomitante de medicamentos e aplicação da vacina
- 

A vacina de DNA está baseada num pedaço do código genético do agente causador da doença. Aplicado por meio de injeção intramuscular, esse DNA cria condições para a produção da proteína antigênica pelas próprias células do indivíduo vacinado. O DNA leva a mensagem para a síntese do antígeno apropriado no interior das células do indivíduo vacinado. Este tipo de vacinação apresenta uma grande vantagem, pois fornece ao organismo hospedeiro a informação genética necessária para que ele produza o antígeno

com todas as características importantes para a geração de uma resposta imune. Isto, sem os efeitos colaterais que podem ser gerados pela introdução de patógenos no organismo, ou problemas proporcionados pela introdução das vacinas de subunidades associadas a adjuvantes que são frequentemente tóxicos (Silva, 1999).

Desde 1991, o Laboratório de Vacinas Gênicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP vem desenvolvendo projeto de pesquisa, visando à descoberta de uma nova vacina contra a tuberculose. Os resultados mostraram que a vacina gênica desenvolvida pelo grupo não só tem atividade preventiva contra o estabelecimento da tuberculose experimental como também alta atividade terapêutica contra a doença já estabelecida (Lowrie et al., 1999). Entretanto, para se alcançar tais resultados, foram necessárias três injeções, por via intramuscular, de grande quantidade de DNA (50 a 100 µg por animal). Com o objetivo de otimizar a utilização da vacina, possibilitando a redução da quantidade e do número de administrações do DNA sistemas de liberação controlada vem sendo testados (Lima et al., 2000).

Lima et al., 2003 co-encapsularam pDNA e trealose em microesferas constituídas de poliésteres do ácido lático e glicólico (PLGA). Foi administrado em camundongos microesferas de PLGA contendo pDNA (6 µg pDNA/mg de microesferas) e trealose, que produziram em lavados células esplênicas altos níveis do anti-corpo do subtipo IgG2a e altas quantidades de Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), conferindo à mesma proteção que a administração de três doses de pDNA nu. Esta nova formulação também permitiu uma redução em 10 vezes a dose administrada quando comparada ao pDNA nu. Desta forma, a combinação de pDNA e adjuvantes com propriedades carreadoras e imunomoduladoras demonstram potencial para uma melhora na vacina contra tuberculose.

Uma mistura de duas microesferas de PLGA (75:25 e 50:50) contendo pDNA que apresentaram perfis de liberação rápido e lento foi utilizada na tentativa de sustentar a liberação (Ruberti et al., 2004). Os níveis dos anticorpos específicos (anti-hsp65) permaneceram altos durante 90 dias após a vacinação, enquanto que o pDNA nu não conseguiu manter os níveis dos anticorpos específicos durante o mesmo período. Assim, esta estratégia parece ser uma estratégia promissora uma resposta imune sustentada.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os principais materiais, bem como os procedimentos utilizados nos ensaios.

### 4.1 Material

Para a produção das microesferas de quitosana foram utilizados os seguintes materiais:

- . Quitosana purificada fabricada pela Cyrbe<sup>®</sup> Ltda., Brasil, com massa molar 455.000 Da e grau de desacetilação 74,8%.
- . D,L-gliceraldeído e glutaraldeído (25% em solução aquosa) com massa molar 90,08 e 100,12 Da, respectivamente, adquiridos da Sigma (St. Louis, EUA),
- . Hialuronato de sódio fabricado pela Contipro<sup>®</sup>, República Checa, com massa molar  $1 \times 10^6$  Da e grau de pureza maior que 93%.

O DNA Plasmidial (pDNA) utilizado foi o pVAX-hsp 65 kDa, desenvolvido para vacinação gênica contra tuberculose, gentilmente fornecido pelo Centro de Pesquisa em Tuberculose da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto.

Os reagentes ácido acético glacial, acetona e etanol, foram adquiridos de diferentes fabricantes, todos com grau analítico.

A água utilizada em todos os experimentos foi destilada e purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup>.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Preparação das microesferas de quitosana

As microesferas de quitosana foram preparadas pela técnica de *spray drying*. Para a solubilização da quitosana foi utilizada solução aquosa de ácido acético para obtenção de

soluções de quitosana nas concentrações de 2,5 e 0,5% em massa com pH 5,0 e 4,0. Para o preparo das soluções nas diferentes concentrações, foram adicionadas quantidades diferentes de ácido acético dependendo da concentração de quitosana na solução e do pH final a ser obtido (Tabela 1). As soluções foram filtradas à vácuo com filtros de papel nº 41, Whattman (Inglaterra).

A viscosidade das soluções de quitosana foi medida à  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  usando um viscosímetro de Brookfield DVII-L (LVT-DVII).

**Tabela 1. Quantidades de quitosana e ácido acético utilizadas para a preparação de soluções de quitosana com diferentes pHs e concentrações**

| Concentração de quitosana<br>% em massa | pH final da solução | Concentração de ácido acético<br>% em massa |
|-----------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------|
| 2,5                                     | 5,0                 | 0,7                                         |
| 2,5                                     | 4,0                 | 2,2                                         |
| 0,5                                     | 5,0                 | 0,2                                         |
| 0,5                                     | 4,0                 | 0,45                                        |

O equipamento utilizado para a produção das microesferas de quitosana foi um mini-secador *spray dryer* Büchi 190 (Suíça) com capacidade nominal de evaporação de 1,5 kg H<sub>2</sub>O/h, dotado de um sistema de aquecimento de ar, um sistema de injeção e um sistema de exaustão de gases, conforme esquematizado na Figura 6. Este *spray dryer* operou continuamente com fluxos concorrentes de ar e solução de quitosana e com um atomizador duplo fluido com mistura externa de fluidos com orifício de 0,7 mm. O material particulado produzido era aspirado e coletado por um ciclone conectado à extremidade inferior do secador. Os finos não retidos no ciclone eram coletados por um filtro manga colocado na linha de evacuação de gás do laboratório.

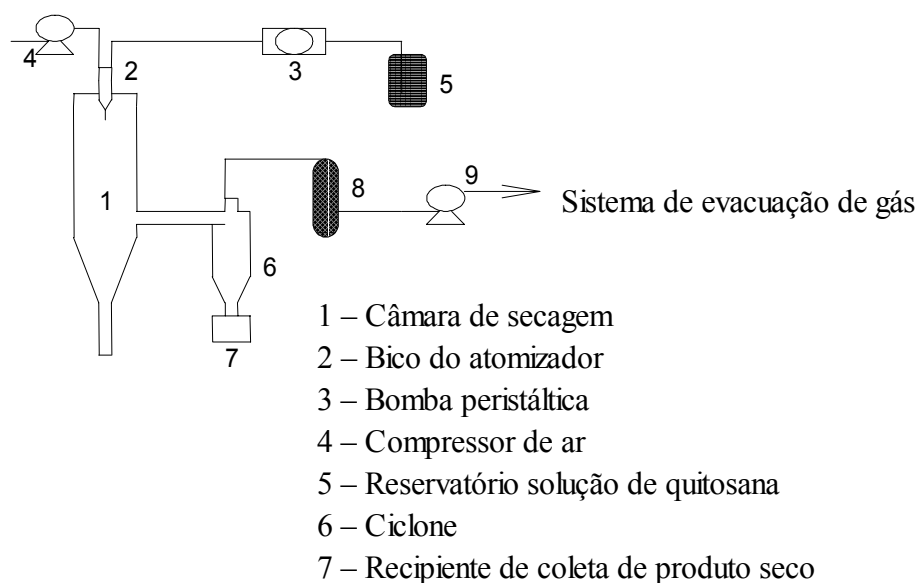


Figura 6. Esquema do *spray dryer* utilizado para a produção de microesferas de quitosana

As condições experimentais usadas no *spray dryer* para a produção das microesferas de quitosana são apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2. Condições operacionais usadas nos experimentos de *spray drying***

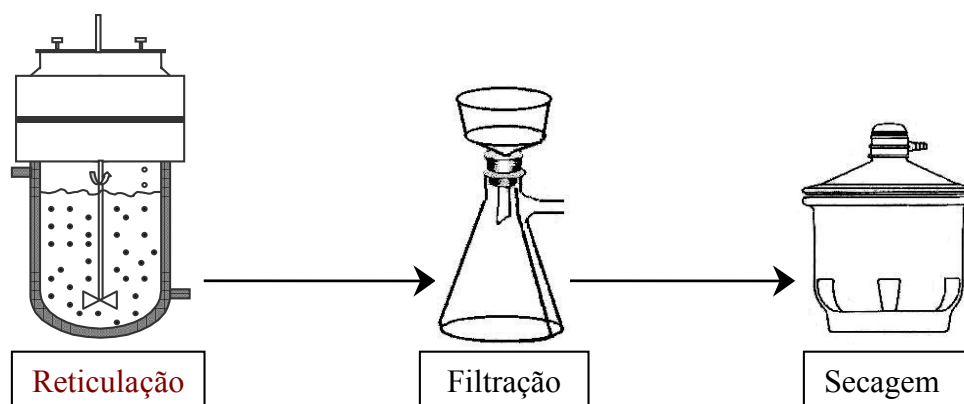
| Condições de operação                        |           |
|----------------------------------------------|-----------|
| Vazão de alimentação (mL/min)                | 6         |
| Vazão do ar de atomização (NL/h)             | 500       |
| Temperatura de entrada do ar no secador (°C) | 122 – 125 |
| Temperatura de saída do ar do secador (°C)   | 85 – 90   |

#### 4.2.2 Reticulação das microesferas de quitosana

##### 4.2.2.1 Reticulação das microesferas de quitosana com D,L-gliceraldeído e glutaraldeído

O procedimento de reticulação das microesferas de quitosana com GAL e GLU foi baseado no trabalho realizado por Vandelli et al. (2001), onde foi realizado a reticulação de microesferas de gelatina com GAL. Para a reticulação química das microesferas de

quitosana com o D,L-gliceraldeído ou glutaraldeído foi utilizado o processo que se encontra esquematizado na Figura 7. Fixou-se uma concentração mássica de 2,5% para a solução de quitosana usada na preparação das microesferas pela técnica de *spray drying*. Depois de formadas, as microesferas eram então recuperadas e suspensas em uma solução de acetona:água (2:1) contendo D,L-gliceraldeído ou glutaraldeído sob agitação de 500 rpm com diferentes tempos de reação (15, 30, 60 e 120 min ). Após o procedimento de reticulação, as microesferas foram filtradas a vácuo em filtro de papel nº 42 (Whattmann – Inglaterra) e lavadas com 60 ml de acetona. A temperatura de 5 °C foi mantida durante todo processo. As partículas foram finalmente secas em dessecador à vácuo durante 24 h em temperatura ambiente.



**Figura 7. Diagrama esquemático do processo de reticulação de microesferas de quitosana pré-formadas com D,L-gliceraldeído e glutaraldeído**

#### **4.2.2.2 Reticulação superficial das microesferas de quitosana com hialuronato de sódio (HNa)**

Para a reticulação das microesferas de quitosana com o HNa foi utilizado basicamente o mesmo processo esquematizado na Figura 7. A concentração da solução de quitosana também foi mantida em 2,5% em massa para a preparação das microesferas de quitosana pela técnica de *spray drying*, a serem reticuladas com hialuronato de sódio. As microesferas de quitosana não reticuladas foram suspensas em uma solução de etanol:tampão fosfato pH 7,5 (1:2) contendo hialuronato de sódio a 0,16 kg<sub>HNa</sub>/kg<sub>quitosana</sub> sob agitação de 500 rpm por 120 min. Após o procedimento de reticulação, as microesferas foram filtradas a vácuo em filtro de papel nº 42 (Whattmann – Inglaterra) e lavadas três

vezes, respectivamente com 20 ml de etanol com 30% (v/v) de tampão fosfato pH 7,5, etanol com 15% (v/v) de tampão fosfato pH 7,5 e etanol anidro. A temperatura de 25 °C foi mantida durante todo processo. Para a secagem final, as partículas foram colocadas dentro de dessecador a vácuo durante 24 h em temperatura ambiente.

#### **4.2.3 Adsorção de DNA plasmidial na superfície de microesferas de quitosana**

A adsorção do DNA plasmidial foi realizada em microesferas de quitosana produzidas em diferentes condições: (a) não reticuladas, (b) reticuladas com GAL por 15 min e (c) reticuladas com GAL por 120 min, seguindo os procedimentos previamente descritos nas seções 4.2.1 e 4.2.2.1 deste capítulo.

A adsorção de DNA plasmidial foi realizada por incubação, onde inicialmente 50 mg de microesferas de quitosana foram dispersas em 25 ml de etanol:tampão fosfato pH 5,5 na proporção de 1:2. Foi adicionado pDNA em diferentes quantidades, ficando incubado por 2 h à temperatura de 37 °C sob agitação constante. As microesferas foram então separadas por centrifugação em centrífuga Hitachi CR22G (Japão) a 7.000 rpm por 5 min, lavadas com solução salina e liofilizadas por 24 h em liofilizador Labconco Freeze Dryer 5 (EUA).

#### **4.2.4 Caracterização das microesferas**

##### **4.2.4.1 Análise granulométrica**

As distribuições granulométricas das microesferas de quitosana geradas neste trabalho foram analisadas por difração a laser em aparelho Malvern Mastersizer/E (Malvern Instruments, Inglaterra), que opera pelo princípio de difração de raios laser. Pequenas quantidades de microesferas foram dispersadas em etanol absoluto P.A. com auxílio de ultra-som até atingirem o índice de obscuração requisitado pelo aparelho e analisadas na faixa de 0,020 - 2000  $\mu\text{m}$ .

O tamanho médio de partícula foi expresso com o diâmetro médio em volume ( $D_{4,3}$ ). A polidispersidade foi dada pelo índice *span* o qual foi calculado por ( $D_{0,9} -$

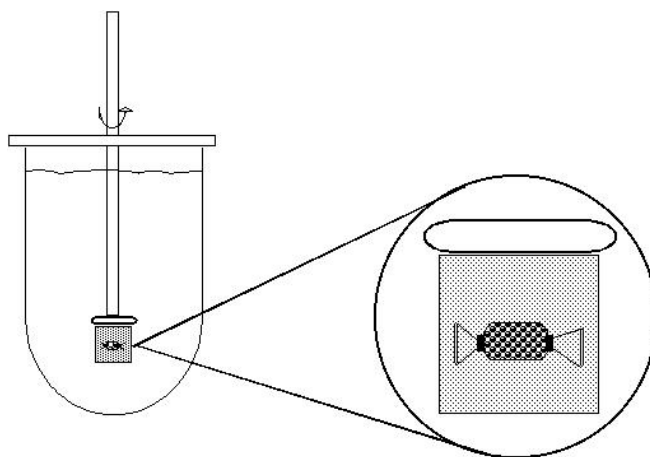
$D_{0,1}/D_{0,5}$ ), onde  $D_{0,9}$ ,  $D_{0,5}$  e  $D_{0,1}$  são respectivamente os diâmetros de partícula correspondente a 90, 50 e 10 % da distribuição acumulada.

#### 4.2.4.2 Morfologia

A morfologia das microesferas de quitosana foi verificada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com um microscópio JEOL JSM5200. Amostras de microesferas foram depositadas sobre fita de cobre com dupla-face, recobertas por uma fina película de ouro e analisadas a 15 kV, com diferentes aumentos.

#### 4.2.4.3 Intumescimento

A capacidade de captura de água das microesferas de quitosana não reticuladas e reticuladas foi determinada gravimetricamente pelo intumescimento das microesferas em tampão fosfato a temperatura constante de 37 °C em diferentes pHs (3, 6 e 9), através da variação de massa durante o intumescimento. Primeiramente certa quantidade de microesferas foi pesada dentro de uma membrana de diálise (Spectrum®, modelo Spectrapor, EUA) que foi então introduzida em meio com agitação contínuo a 50 rpm (Dissolutor com aparato tipo cesto, modelo 299/6, Nova Ética, Brasil) como esquematizado na Figura 8.



**Figura 8. Diagrama esquemático do aparato utilizado para determinação de propriedades de intumescimento**

As amostras intumescidas foram removidas periodicamente (0, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 min) e pesadas em balança analítica digital (Mettler Toledo Ag 285, Suíça),

após retirada do excesso de meio absorvido na superfície com papel de filtro. Cada experimento de intumescimento foi repetido duas vezes e a média dos valores foi assumida como o grau de intumescimento, calculado pela Equação 1.

$$\text{Grau de Intumescimento} = \frac{M_t - M_0}{M_0} \quad (1)$$

Onde  $M_t$  representa a massa de amostra intumescida no tempo  $t$ , e  $M_0$  a massa inicial de amostra antes do intumescimento.

#### 4.2.4.4 Área Superficial

Todas as amostras primeiramente sofreram um pré-tratamento para retirada de umidade em estufa a vácuo EDG, modelo Edgcon 5P (Brasil), a 50 °C por aproximadamente 12 h. A área superficial foi medida pela técnica de Brunauer, Emmett e Teller (BET), utilizando o equipamento ASAP 2010, Micromeritics (EUA), com isotermas de adsorção e desorção de nitrogênio na temperatura de ebulição sob pressão atmosférica. Na faixa de validade da isoterma de BET, a área específica foi calculada a partir do coeficiente angular e intercepto da linha formada por cinco pontos de medida. A massa de amostra de aproximadamente 0,5g foi usada para garantir resultados exatos e reproduzíveis.

#### 4.2.4.5 Hidrofobicidade superficial

O procedimento usado por Williams III et al. (1998) para determinar a hidrofobicidade de microesferas de quitosana foi modificado e aplicado para as microesferas de quitosana preparadas neste estudo. A hidrofobicidade superficial das microesferas de quitosana foi quantificada pela determinação da extensão da adsorção do corante hidrofóbico Rosa de Bengala (Nuclear®, Brasil). Diferentes quantidades de microesferas de quitosana foram dispersadas em solução tampão de Rosa de Bengala (0,1 M Bórax, pH = 10) de concentração 20 µg/ml. Depois de 2 h, as amostras foram filtradas

em filtro (Millipore®, EUA) 0,45 µm para remover as microesferas de quitosana e o filtrado foi coletado para análise. A quantidade de Rosa de Bengala adsorvida pelas microesferas de quitosana foi quantificada pela diferença entre a quantidade inicial utilizada e a quantidade final que permaneceu em solução, determinada através de curva padrão obtida por espectrofotometria UV/Vis a 548 nm. A fase aquosa e a superfície das partículas são consideradas como duas fases, e a Rosa de Bengala particionará entre estas fases. Para cada concentração de microesferas de quitosana, determinou-se o quociente de partição (QP), definido segundo a Equação 2.

$$QP = \frac{\text{Quantidade de rosa de bengala na superfície das microesferas}(g)}{\text{Quantidade de rosa de bengala no meio de dispersão}(g)} \quad (2)$$

Em gráfico representando o quociente de partição determinado pela Equação 2 versus a área superficial total por volume das partículas em várias concentrações, uma regressão linear foi ajustada para cada formulação de microesfera. Os coeficientes angulares obtidos foram usados para medir o grau de hidrofobicidade superficial; quanto maior o coeficiente angular, maior a hidrofobicidade relativa. As análises foram feitas em duplicata.

#### 4.2.4.6 Carga superficial

As microesferas de quitosana foram primeiramente dispersas em água com pH corrigido para 6,0 e as medidas de potencial zeta das microesferas de quitosana foram determinadas em um aparelho Zetamaster (Malvern Instruments, Inglaterra). A dispersão das microesferas de quitosana para as medidas de potencial zeta foi preparada em duplicata e cada amostra foi medida 10 vezes.

#### 4.2.4.7 Teor de umidade

A quantificação do teor de umidade nas microesferas foi determinada utilizando o titulador automático do tipo Karl-Fischer, modelo DL 38, Mettler-Toledo (Suíça). A metodologia utilizada foi adaptada da Norma NBR 5758/86 “Água - determinação usando o reagente de Karl Fischer – Guia Geral”. As medidas foram realizadas em triplicata.



#### 4.2.4.8 Análise Térmica

Todas as medidas Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) realizadas das microesferas foram feitas em DSC fabricado pela Mettler-Toledo (Suíça), modelo 822e, e as curvas foram analisadas com auxílio do programa STARe, Mettler-Toledo, Suíça. Aproximadamente 5 mg de amostra foram pesadas em cada cadinho. Para as microesferas intumescidas a massa utilizada foi de aproximadamente 1,5 mg de microesferas e 40 µl de água por um período de tempo de 15 min. O excesso de água era então rapidamente retirado da superfície das microesferas com auxílio de um papel de filtro, e repesados. Os cadinhos eram pesados novamente antes de iniciar o experimento e repesados depois para verificar se não houve perda de massa durante a análise. As amostras foram aquecidas de 20 °C a 200 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 4.2.4.9 Estrutura cristalina

Diferentes amostras de microesferas de quitosana foram submetidas à análise de difração de raios-X, em um equipamento marca Shimadzu, modelo XRD 6000 (Japão). Os ensaios foram realizados nas seguintes condições: radiação  $\text{CrK}\alpha$ , ângulo de varredura variando de 2° a 35° a uma velocidade de 2° por minuto, tensão de varredura 40 kV, corrente de varredura 20 mA e rotação da amostra 40 rpm.

#### 4.2.4.10 Análise elementar

Todas as partículas analisadas sofreram pré-tratamento, permanecendo por 24 h em estufa à vácuo com temperatura constante de 40 °C. O percentual de CHN foi determinado através da análise orgânica clássica pela técnica de Pregl-Dumas utilizando o analisador Elemental Analyser 2400 CHN (Perkin Elmer) onde ocorreu uma combustão, em presença de oxigênio puro, a 925 °C. Os gases formados ( $\text{C} \rightarrow \text{CO}_2$ ,  $\text{H} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{N} \rightarrow \text{N}_2$ ) foram arrastados pelo gás hélio e separados por uma coluna cromatográfica, para posterior quantificação através de Detector de Condutividade Térmica (TCD).

#### 4.2.4.11 Espectroscopia vibracional

Os espectros na região do infravermelho das diferentes formulações de microesferas de quitosana foram obtidos usando pastilhas de KBr com 1% de amostra na faixa de  $1000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  em espectrômetro Nicolet Magna IR system 750, USA.

#### 4.2.4.12 Interação pDNA-microesferas de quitosana

A interação do pDNA com a superfície das microesferas de quitosana foi caracterizada através da análise por microscopia de fluorescência de microesferas com pDNA corados com brometo de etídio (EtBr). Primeiramente o pDNA foi misturado com EtBr na proporção de 1:10 sob agitação constante por 2 h à temperatura constante de  $37^\circ\text{C}$ . Após esta etapa, a adsorção do pDNA nas microesferas de quitosana seguiu o mesmo procedimento descrito no item 4.2.3 deste capítulo. A interação pDNA-microesferas de quitosana foi observada em microscópio Aristoplan (Leitz) acoplado ao sistema de fotografia MC80DX e a análise foi realizada com auxílio do programa de Image-pro Plus versão 3 para Windows após a captura da imagem da microscopia por meio da câmara digital SONY CCD-IRIS acoplada ao microscópio.

#### 4.2.3.13 Transfecção de células *in vitro*

A transfecção das células J774 pelas microesferas de quitosana com proporção mássica de 1:50 de pDNA:quitosana foi realizada em placas sendo detectada por imunocitoquímica e observada através de imagens obtidas após 24 h de incubação por microscópio óptico Aristoplan (Leitz) nos aumentos de 400x e 1000x, acoplado ao sistema de fotografia MC80DX. As imagens obtidas foram tratadas com o programa Image-pro Plus versão 3 para Windows após a captura da imagem da microscopia por meio da câmara digital SONY CCD-IRIS acoplada ao microscópio.

Para realização da imunocitoquímica foi aplicado protocolo utilizado por Lima (2002), onde as células foram lavadas por três vezes consecutivas em solução de PBS 0,01 M, pH 7,2 contendo 1% de BSA (SIGMA, St Louis, USA). Em seguida, elas foram fixadas

em paraformaldeído 4% por 30 min à temperatura ambiente e novamente lavadas. Todas as lavagens foram realizadas por três vezes consecutivas. Posteriormente, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação com PBS contendo 3% de peróxido de hidrogênio por 30 min à temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS-BSA 1%, as células foram incubadas com tampão de bloqueio (3% de soro de coelho, 1% de BSA e 0,01% de Triton X 100) por 1 h à temperatura ambiente a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Adicionou-se a seguir, o anticorpo anti-hsp65 e incubou-se em câmara úmida à 4 °C durante a noite. O anticorpo monoclonal utilizado foi diluído (1:100) em tampão bloqueio, após o período de incubação realizaram-se as lavagens consecutivas e foi feita a incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à biotina (B-7022, Sigma) diluído (1:200) em tampão bloqueio por 1 h à temperatura ambiente. Depois de novas lavagens consecutivas com PBS-BSA 1% as lamínulas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente com o complexo streptoavidina biotina-peroxidase (Streptoavidin-Dako, Carpinteria, CA, USA) preparado 30 min antes do uso, em tampão bloqueio. Posteriormente às lavagens consecutivas com PBS-BSA 1%, procedeu-se a revelação da reação utilizando o substrato 3-3'-Diaminobenzidina (SIGMA) (5 mg em 10 ml de PBS) adicionado a 180 µl de peróxido de hidrogênio (20 volumes). A revelação foi feita por 10 a 20 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As reações foram interrompidas com água destilada e as lamínulas contra-coradas com hematoxilina de Mayer previamente filtrada, por 5 a 10 min, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada por duas vezes, azuladas com água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%) e, novamente lavadas com água destilada, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas com Bálsamo do Canadá. O controle negativo das reações foi realizado através da substituição dos anticorpos primários por PBS ou isótopos de imunoglobulinas não relacionados.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da concentração de quitosana sobre propriedades das microesferas

A viscosidade desempenha um papel importante na determinação das propriedades de microesferas produzidas pela técnica de *spray drying*, podendo alterar propriedades tais como morfologia, tamanho e eficiência de encapsulação (Ré, 1998). Como mostra a Figura 9, a viscosidade das soluções de quitosana nos pHs 4,0 e 5,0 aumentou exponencialmente ( $R^2 = 0,9847$  e  $0,9864$ , respectivamente) com o aumento da concentração mássica de 0,5 a 2,5%. Como pode ser visto, não houve variação significativa da viscosidade com a modificação do pH da solução aquosa de quitosana. A partir destes resultados optou-se por trabalhar com o maior valor de pH da solução aquosa de quitosana, levando em consideração que uma grande parte de fármacos, proteínas e peptídeos apresentam a tendência de alterar a estabilidade química em condição de pH muito básica ou muito ácida.

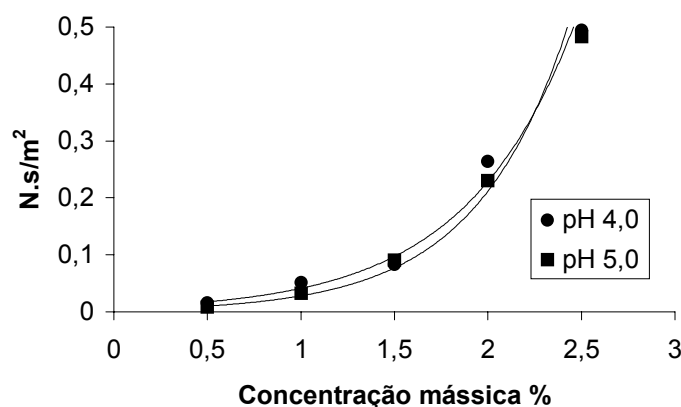


Figura 9. Influência da concentração de polímero e pH da solução aquosa de quitosana sobre a viscosidade

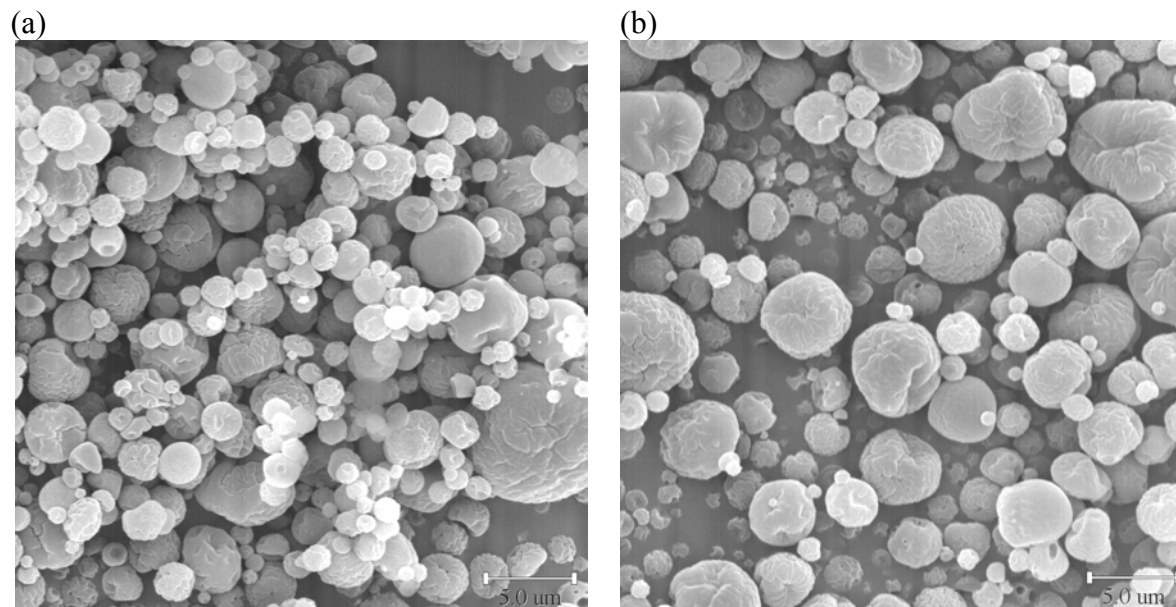
Microesferas de quitosana sem a adição de qualquer agente de reticulação (não reticuladas) foram preparadas pela técnica de *spray drying*. Duas concentrações de quitosana (0,5% e 2,5%, em massa) foram escolhidas a partir das determinações da relação exponencial entre a concentração de quitosana e a viscosidade da solução (Figura 9). Testes preliminares mostraram que as soluções com uma concentração mássica de quitosana maior que 2,5% eram muito viscosas para garantir, durante a atomização, a formação de gotas com tamanho e morfologia controlados.

As microesferas obtidas a partir de soluções de quitosana de 0,5% e 2,5% em massa foram caracterizadas com relação à distribuição de tamanhos, características morfológicas, potencial zeta e intumescimento. A Tabela 3 mostra os resultados de viscosidade, distribuição de tamanhos e potencial zeta. Como pode-se notar na Tabela 3, as micropartículas de quitosana apresentaram carga positiva, e um tamanho médio de partícula de 3,4 a 6,7  $\mu\text{m}$ . Microesferas maiores, e com dispersão de tamanho maior, foram formadas a partir da solução de quitosana mais concentrada e mais viscosa. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por He et al. (1999). Esses autores prepararam microesferas de quitosana pela técnica de *spray drying* aumentando a concentração mássica de quitosana de 0,1 a 0,5%, resultando em um aumento do tamanho médio de partícula. Isto provavelmente se deve ao efeito da viscosidade da solução sobre o tamanho das gotas formadas durante a etapa de atomização. Em geral, o tamanho médio das gotas formadas por atomização é proporcional à viscosidade e à tensão superficial (Ré, 1998) e afeta o tamanho das partículas geradas, sendo uma variável importante de processo.

**Tabela 3. Influência da concentração de quitosana sobre as propriedades das microesferas produzidas pela técnica de *spray drying***

| Solução de quitosana          |                                      | Microesferas de quitosana produzidas pela técnica de <i>spray drying</i> |                  |                  |      |                        |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------|------------------------|
| Concentração<br>(%, em massa) | Viscosidade<br>(N.s/m <sup>2</sup> ) | Tamanho ( $\mu\text{m}$ )                                                |                  |                  |      | Potencial Zeta<br>(mV) |
|                               |                                      | D <sub>4.3</sub>                                                         | D <sub>0.1</sub> | D <sub>0.9</sub> | Span |                        |
| 0,5                           | 0,008                                | 3,42                                                                     | 1,06             | 6,65             | 1,99 | + 53,7 $\pm$ 1,2       |
| 2,5                           | 0,483                                | 6,74                                                                     | 1,13             | 13,44            | 2,21 | + 55,3 $\pm$ 0,6       |

A morfologia das microesferas de quitosana preparadas pela técnica de *spray drying* é apresentada nas fotografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) na Figura 10, mostrando sua forma aproximadamente esférica, independente da concentração de quitosana em solução aquosa.



**Figura 10. Fotografias das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* a partir de soluções aquosas com concentração mássica de quitosana de: (a) 0,5%; (b) 2,5% (aumento de 3500x).**

O comportamento do intumescimento das microesferas de quitosana obtidas a partir das soluções de quitosana 2,5% e 0,5% foi investigada em água pH 6,0. A Figura 11 mostra a evolução da capacidade dessas microesferas de capturar água como uma função do tempo de incubação. Pode ser visto que as microesferas de quitosana foram hábeis em capturar diversas vezes o seu peso em água, alcançando um equilíbrio de intumescimento depois de um período de tempo de cerca de 30 min. Nota-se aqui o efeito da concentração da solução de quitosana a ser processada pela técnica de *spray drying* sobre o equilíbrio de intumescimento das microesferas resultantes: a solução mais concentrada e mais viscosa levou à obtenção de microesferas com maior capacidade de intumescimento.

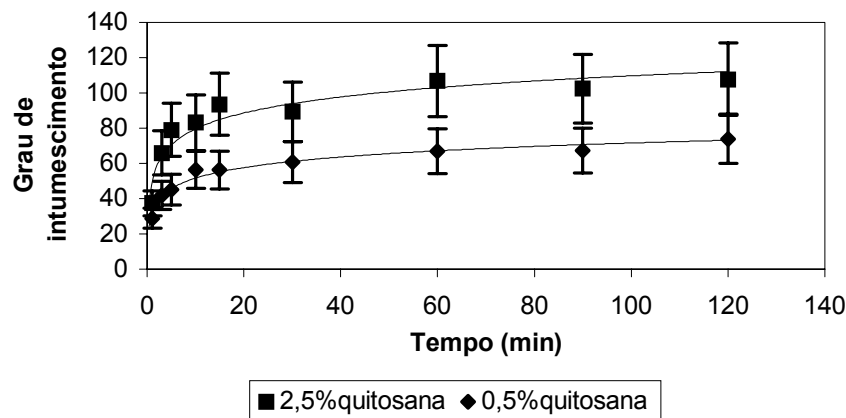


Figura 11. Comportamento do intumescimento das microesferas de quitosana obtidas pela técnica de *spray drying* a partir de soluções aquosas com concentrações mássica de quitosana de 0,5% e 2,5%.

## 5.2 Efeito da reticulação química sobre as características das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying*

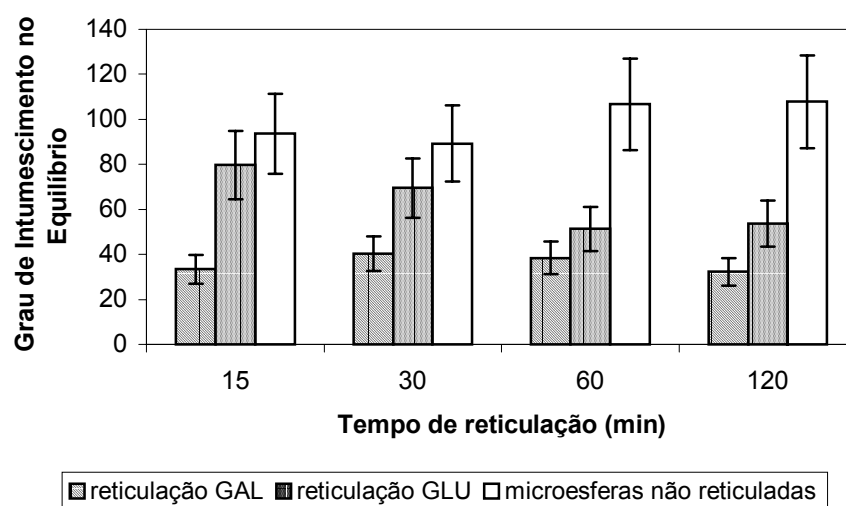
### 5.2.1 Tipo de agente reticulante e tempo de reticulação

Para a preparação de microesferas com capacidade de absorção de água controlada, D,L-gliceraldeído (GAL) foi testado como novo agente de reticulação químico para a quitosana. Microesferas de quitosana também foram reticuladas com glutaraldeído (GLU) como um controle, já que este é o aldeído utilizado com maior frequência para reticular proteínas (Bulgarelli et al. 1999) e também quitosana (He et al. 1999; Berthold et al. 1996).

O efeito do GAL sobre o comportamento do intumescimento das microesferas de quitosana quimicamente reticuladas é mostrado na Figura 12, comparado ao GLU (pH 6,0). Como pode-se notar, ambos os agentes de reticulação química foram hábeis em controlar a capacidade de intumescimento das microesferas não reticuladas, também apresentado na mesma figura como uma referência. À medida que o tempo de reticulação aumenta, o grau de intumescimento no equilíbrio decresce. O GAL demonstrou ser mais efetivo que o GLU no controle das propriedades de intumescimento das microesferas de quitosana, quando usado em condições similares de concentração e tempo de reticulação.

Conti et al (1998) avaliaram o efeito da exposição de microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* em vapor de gliceraldeído (GAL), glutaraldeído

(GLU) e epiclorigidrina. Os resultados encontrados por estes autores também demonstraram que o GAL foi mais efetivo que o GLU em modular a liberação da droga cetilpiridina. Os autores discutem esse resultado com a hipótese do GAL reagir sobre 3 grupos amino da quitosana simultaneamente, o que explicaria uma maior reatividade do GAL em comparação ao GLU, para uma mesma quantidade molar desses agentes reticulantes. No entanto, a nosso conhecimento, essa hipótese ainda não está comprovada, existindo poucos estudos físico-químicos sobre o mecanismo de reação desses agentes reticulantes com a quitosana.

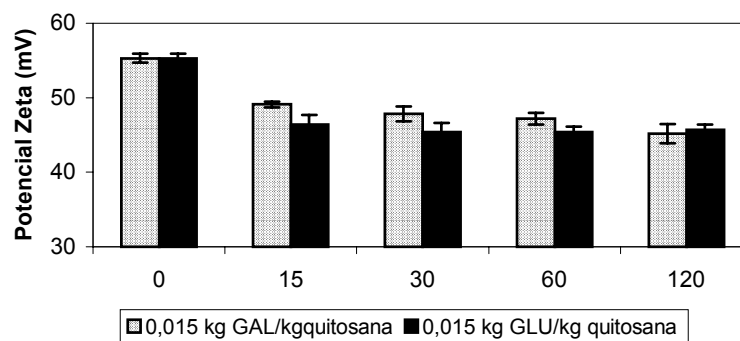


**Figura 12.** Efeito do tempo de reticulação sobre o grau de intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com D,L-gliceraldeído (GAL) e glutaraldeído (GLU).

A extensão da reticulação pode determinar o número de grupos amino livre, responsáveis pela superfície positivamente carregada das microesferas de quitosana. O efeito do tempo de reticulação sobre a carga superficial das microesferas de quitosana foi também investigado e está apresentado na Figura 13. Como pode-se verificar, a reticulação com glutaraldeído levou a um decréscimo do potencial zeta das microesferas de quitosana de +55 mV para aproximadamente +47 mV nos primeiros 15 min. No entanto, depois deste intervalo de tempo, a carga superficial permaneceu praticamente inalterada.

Contrariamente, o potencial zeta das microesferas de quitosana reticuladas com D,L-gliceraldeído diminuiu gradualmente com o aumento do tempo de reticulação levando após 120 min de reticulação, a um decréscimo do potencial zeta de +55 mV para +45 mV.





**Figura 13. Efeito do tempo de reticulação sobre o potencial zeta das microesferas de quitosana reticuladas com D,L-gliceraldeído e glutaraldeído**

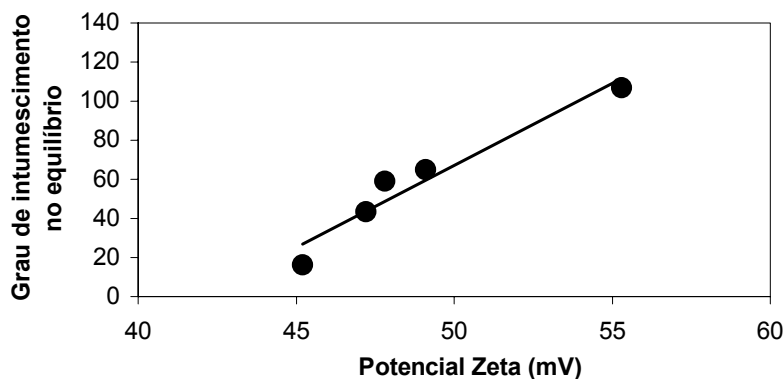
Com base na literatura, era esperado que a reação entre os agentes de reticulação e a quitosana alterassem o potencial zeta. Na reticulação com GLU o tempo de reticulação não afetou a carga superficial após 15 min, contrariamente ao observado com GAL, que variou até 120 min (Figura 13). No entanto, a reticulação tanto com GAL como com o GLU alterou o grau de intumescimento no equilíbrio em função do tempo de reticulação (Figura 12). Esses resultados sugerem que, no caso do GLU o processo de reticulação não está limitado à uma reticulação superficial, podendo o aldeído ter penetrado e reagido no interior das microesferas. Berthold et al. (1996) também observaram pequena influência do tempo de reticulação sobre a carga superficial de microesferas de quitosana.

Já para o GAL a reação pode estar ocorrendo predominantemente sobre a superfície das microesferas. Os trabalhos da literatura não avaliam as razões para estes resultados, e os dados obtidos neste trabalho não são suficientes para explicá-los. Assim a interpretação destes dados novamente recai sobre um melhor entendimento sobre a reatividade de ambos os agentes químicos de reticulação e como suas estruturas moleculares afetam a extensão da reticulação com a quitosana, não sendo o objetivo principal deste trabalho.

No entanto, Gerrard et al (2002) estudaram a reação dos aldeídos glutaraldeído, formaldeído e gliceraldeído em proteínas alimentícias. Dados obtidos por técnicas eletroforéticas demonstraram que todas os agentes utilizados reticularam a proteína RNase, porém a taxa de reação do glutaraldeído em relação ao gliceraldeído e formaldeído foi

muito maior. Os autores atribuem este efeito a diferentes mecanismos de reação destes aldeídos na proteína, pois o glutaraldeído apresenta dois grupos reativos contra apenas um para o gliceraldeído e formaldeído. Apesar destes resultados terem sido obtidos com proteínas, pode-se esperar um comportamento similar de reatividade destes aldeídos com a quitosana, que associado a outros fatores pode contribuir para o entendimento do efeito do tempo de reticulação sobre a carga superficial das microesferas de quitosana.

A partir do tratamento dos resultados, uma relação linear foi encontrada entre a capacidade de intumescimento e a carga superficial das microesferas de quitosana reticuladas com D,L-gliceraldeído, como apresentado na Figura 14. A densidade de reticulação nas microesferas pode ser aumentada pela duração do tratamento químico, assim reduzindo e controlando o efeito da hidratação e o número de grupos de amino livre os quais são responsáveis pela superfície positivamente carregada das microesferas de quitosana. A intensidade deste efeito foi diretamente proporcional ao aumento da duração do tratamento químico. Os trabalhos da literatura não avaliam a carga superficial de microesferas de quitosana reticuladas com GAL, bem como a relação estabelecida entre o intumescimento e potencial zeta.

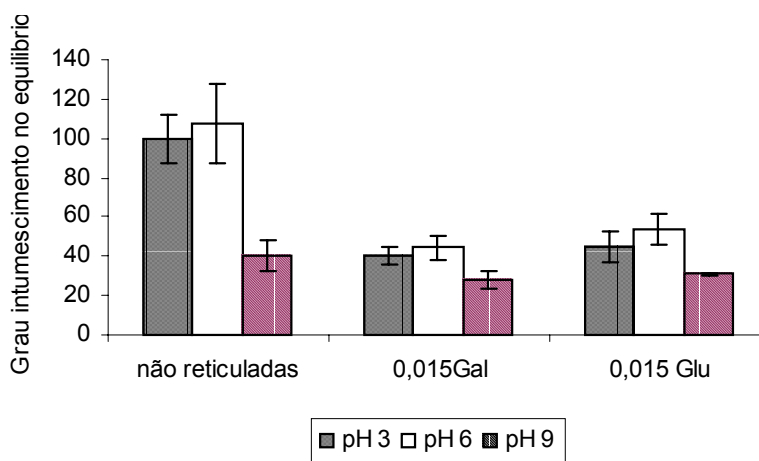


**Figura 14. Relação entre o grau de intumescimento no equilíbrio e o potencial zeta das microesferas de quitosana quimicamente reticuladas com D,L-gliceraldeído ( $0,015 \text{ Kg}_{\text{GAL}}/\text{Kg}_{\text{quitosana}}$ ) durante intervalos de tempo variando de 15 a 120 min.**

As redes formadas pela reticulação química da quitosana são consideradas porosas e permanentes, desta forma sendo o intumescimento e a liberação considerados sensíveis à

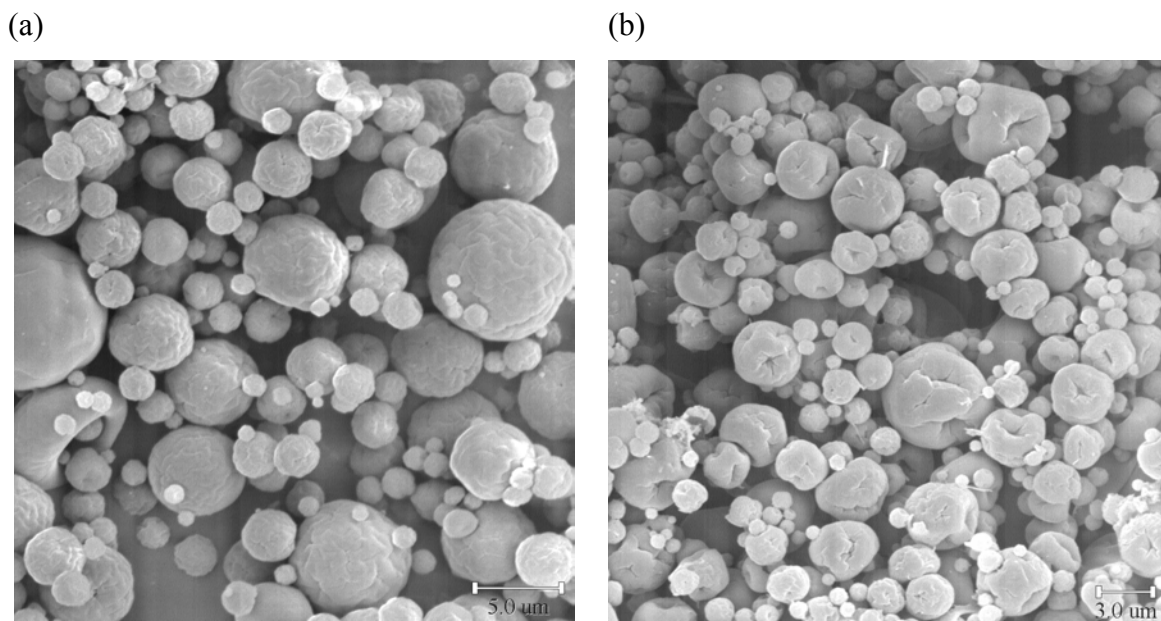
variação em pH ácido (Berger et al., 2004a). O efeito do pH de incubação sobre o intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com GAL está apresentado comparativamente ao GLU na Figura 15.

A capacidade de intumescimento das microesferas de quitosana não reticuladas não apresentou variação significativa em meio ácido (pH 3,0 e 6,0). No entanto, a capacidade de intumescimento diminuiu quando o pH foi aumentado para 9,0 provavelmente devido a uma desprotonação dos grupos amino da quitosana, diminuindo a capacidade de formar ligações de hidrogênio com as moléculas da água. Comparativamente às microesferas não reticuladas, o efeito da variação do pH de ácido (pH 3,0 ou 6,0) para alcalino (pH 9,0), foi menor para as microesferas reticuladas com GAL ou GLU. Esse efeito está provavelmente relacionado a uma menor capacidade de intumescimento devido a uma redução do tempo de relaxação das cadeias poliméricas após a reticulação, juntamente com a diminuição da capacidade de formação de ligações de hidrogênio com a água. Também confirma que o GAL se equipara ao GLU em termos de capacidade de reticulação e controle do intumescimento com a variação do pH.



**Figura 15. Efeito do pH de incubação sobre o intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> e 0,015 kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub>**

Fotografias por MEV das microesferas de quitosana reticuladas com D,L-gliceraldeído e glutaraldeído estão comparadas na Figura 16. Não foi possível notar alterações visíveis no aspecto morfológico das microesferas de quitosana devido à reticulação química quando comparadas às microesferas não reticuladas, anteriormente apresentadas na Figura 10.



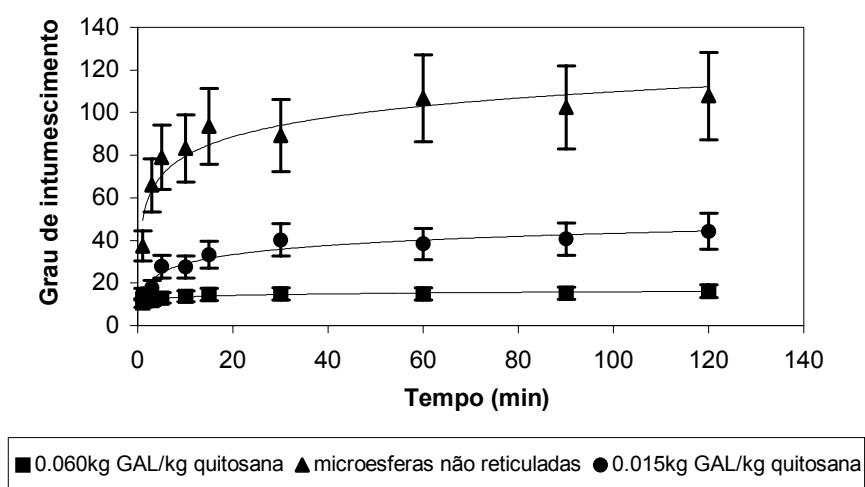
**Figura 16.** Fotografias de microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* depois do tratamento com: (a) 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>• (b) 0,015 kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub> (aumento de 3500x)

### 5.2.2 Efeito da concentração dos agentes reticulantes

A fim de verificar se a extensão da reticulação era proporcional à concentração de D,L-gliceraldeído, microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* foram também tratadas com 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> durante 120 min, e caracterizadas com relação às suas características de intumescimento, potencial zeta, área superficial, hidrofobicidade, propriedades térmicas, teor de umidade, cristalinidade, espectroscopia na região do infravermelho e análise elementar.

A evolução do grau de intumescimento de microesferas de quitosana tratadas com 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> em função do tempo de incubação em água pH 6,0 pode ser visto na Figura 17. Como ilustrado, para o mesmo tempo de tratamento (120 min), as microesferas de quitosana tiveram sua capacidade de intumescimento reduzidas quando a concentração do agente reticulante foi aumentada de 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> para 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>. Em todos os casos as microesferas alcançaram um equilíbrio no grau de intumescimento dentro de 30 – 60 min. Este tempo para o equilíbrio no intumescimento também foi observado por Denkbas&Odabasi (2000) quando microesferas de quitosana foram reticuladas com glutaraldeído.

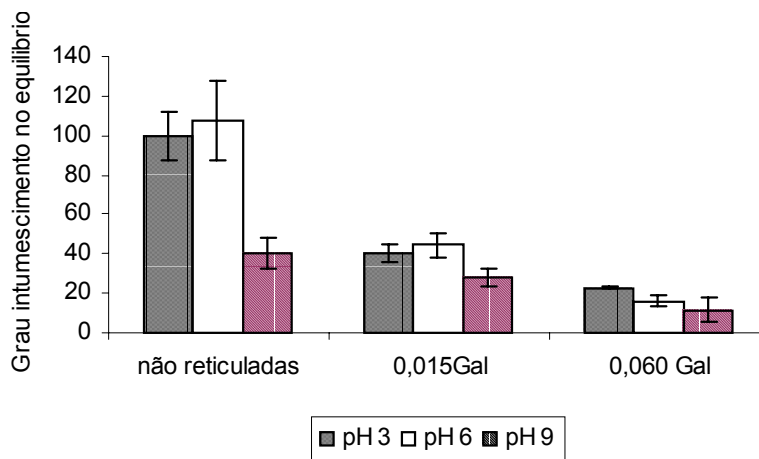
Diversos autores encontram uma diminuição do intumescimento de microesferas de quitosana com aumento da densidade de reticulação com o glutaraldeído (Dini et al. 2003; Denkbasi&Odabasi 2000). Em estudo realizado por Musale & Kumar (2000) observou-se uma diminuição no intumescimento de membranas de quitosana com o aumento da densidade de reticulação com o glutaraldeído, e esses resultados foram atribuídos a efeitos combinados de aumento de hidrofobicidade, e um aumento da tortuosidade dos poros com o aumento da densidade de reticulação.



**Figura 17. Efeito da concentração de D,L-gliceraldeído sobre o comportamento do intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas por 120 min**

Também foi avaliado o efeito da variação de pH do meio de incubação sobre a capacidade de intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com GAL em diferentes concentrações, como mostra a Figura 18. O aumento da concentração de 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> para 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> levou à uma diminuição na capacidade de intumescimento em meio ácido (pH 3,0 e 6,0) e também em meio básico (pH 9,0), embora esta última seja menos pronunciada. Segundo Berger et al. (2004) ainda não são conhecidos exemplos de hidrogéis de quitosana reticulados quimicamente que exibem intumescimento sensível à variação de pH, visto que a interação intercadeias formada pela reticulação inibe o intumescimento e a maioria dos grupos amino da quitosana deve ter reagido com o reticulante. No entanto, após a reticulação das microesferas de quitosana, a capacidade de intumescimento e a carga superficial foram diminuídas, mas como sugerem estes dados

ainda existe a possibilidade de aumentar a densidade de reticulação a fim de diminuir ainda mais a capacidade de intumescimento e o potencial zeta, o que provavelmente explica a diferença de comportamento discutida por estes autores.



**Figura 18.** Efeito do pH de incubação sobre o intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com GAL em diferentes concentrações (0,015 e 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>)

O efeito da concentração dos agentes reticulantes sobre o potencial zeta foi avaliado, fixando-se o tempo de reticulação em 2h. A Figura 19 apresenta os resultados obtidos, mostrando que o aumento da concentração de 0,015 kg<sub>reticulante</sub>/kg<sub>quitosana</sub> para 0,060 kg<sub>reticulante</sub>/kg<sub>quitosana</sub> para ambos reticulantes GAL e GLU, levou à diminuição da carga superficial das microesferas de quitosana. Foi encontrado uma variação de +45,2 mV para +32,8 mV no caso do GAL, e para o GLU de +45,7 mV para +37,3 mV. Na concentração de 0,060 kg<sub>reticulante</sub>/kg<sub>quitosana</sub> o GAL foi mais efetivo em diminuir o potencial zeta das microesferas de quitosana que o GLU. Não foi encontrado na literatura estudo semelhante envolvendo a avaliação do efeito da concentração do agente reticulante sobre o potencial zeta de microesferas de quitosana.

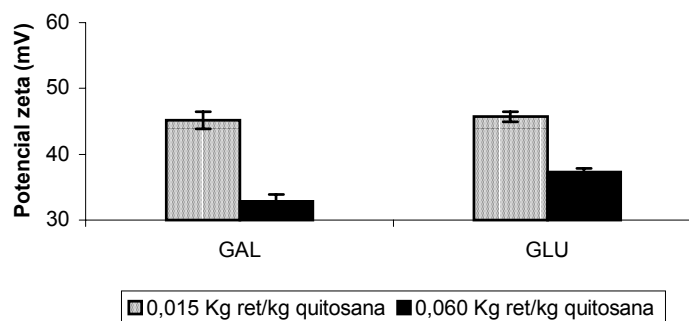


Figura 19. Efeito da concentração dos agentes de reticulação D,L gliceraldeído (GAL) e glutaraldeído (GLU) sobre o potencial zeta das microesferas de quitosana

### 5.2.3 Área Superficial

Os valores das áreas superficiais calculadas pelo método de BET para as microesferas de quitosana e microesferas de quitosana reticuladas (GAL e GLU) estão apresentados na Tabela 4. Foram tomados cinco pontos de pressão nas análises, que apresentaram coeficientes de correlação com boa linearidade para as amostras. Esses resultados concordam com os valores obtidos por Martins et al (2004), onde foi encontrado para microesferas de quitosana preparadas pela técnica de *spray drying* uma área superficial de 2 m<sup>2</sup>/g. Os valores obtidos são 10 vezes maiores que a área superficial de microesferas de PLGA produzidas por Hausberger&DeLuca (1995). Assumindo que a área superficial de microesferas biodegradáveis pode afetar sua taxa de biodegradação, microesferas de quitosana com uma área superficial grande podem apresentar vantagens para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada.

**Tabela 4. Área superficial das microesferas de quitosana**

| Microesferas de quitosana | Tempo de reticulação (min) | Concentração de agente reticulante ( $\text{Kg}_{\text{ag. reticulante}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ ) | Área superficial ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) | Coef. Correlação ( $R^2$ ) |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------|
| Não reticuladas           | -                          | -                                                                                                        | $2,15 \pm 0,09$                            | 0,9880                     |
| Reticuladas com GLU       | 15                         | 0,015                                                                                                    | $5,80 \pm 0,20$                            | 0,9981                     |
|                           | 30                         | 0,015                                                                                                    | $2,46 \pm 0,09$                            | 0,9977                     |
|                           | 60                         | 0,015                                                                                                    | $2,79 \pm 0,11$                            | 0,9934                     |
|                           | 120                        | 0,015                                                                                                    | $2,68 \pm 0,11$                            | 0,9978                     |
|                           | 120                        | 0,060                                                                                                    | $2,64 \pm 0,10$                            | 0,9973                     |
| Reticuladas com GAL       | 15                         | 0,015                                                                                                    | $2,51 \pm 0,22$                            | 0,9904                     |
|                           | 30                         | 0,015                                                                                                    | $3,30 \pm 0,18$                            | 0,9977                     |
|                           | 60                         | 0,015                                                                                                    | $2,66 \pm 0,22$                            | 0,9981                     |
|                           | 120                        | 0,015                                                                                                    | $3,02 \pm 0,39$                            | 0,9799                     |

#### 5.2.4 Hidrofobicidade

A escolha de um agente de reticulação e a extensão da reticulação pode influenciar a carga superficial das microesferas de quitosana, bem como a hidrofobicidade. Nesse trabalho, o grau de hidrofobicidade das microesferas de quitosana, reticuladas ou não, foi medido utilizando-se o método de partição de Rosa de Bengala, utilizado por autores como Muller et al (1997) e Dailey et al (2003) para outros sistemas. O coeficiente angular de cada curva é o parâmetro de hidrofobicidade superficial: quanto maior o coeficiente angular, maior a hidrofobicidade.

O grau de hidrofobicidade das microesferas de quitosana está apresentado na Tabela 5. Os resultados encontrados mostram que os agentes de reticulação utilizados afetam a hidrofobicidade das microesferas de quitosana. A reticulação com GLU aumentou a hidrofobicidade das microesferas comparado às microesferas não reticuladas, como indicado pelo aumento no coeficiente angular do quociente de partição da Rosa de Bengala versus área superficial/volume das microesferas de quitosana. Estes dados concordam com os resultados obtidos por William III et al (1998), onde foi demonstrado um grande aumento na hidrofobicidade para microesferas de quitosana reticuladas com GLU.



O grau de hidrofobicidade das microesferas não reticuladas foi de  $56,71 \pm 11,72$  ml/m<sup>2</sup>. Já para as reticuladas com GLU o coeficiente angular atingiu  $115,16 \pm 28,52$  ml/m<sup>2</sup> com o aumento do tempo de reticulação até 30 min, após este tempo ocorreu um decréscimo para aproximadamente 90 ml/m<sup>2</sup>, mantendo este valor mesmo com o aumento da concentração do agente reticulante. A reticulação com GAL produziu coeficientes angulares que variam de  $70,26 \pm 5,76$  a  $51,82 \pm 1,66$ , apresentando grau de hidrofobicidade inverso ao aumento do tempo de reticulação. Da mesma forma, o aumento da concentração do GAL para 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> diminuiu o grau de hidrofobicidade para  $37,33 \pm 4,90$  ml/m<sup>2</sup>, sendo menor que as microesferas de quitosana não reticuladas. Estes dados ainda não puderam ser explicados, necessitando um melhor entendimento dos mecanismos de reação envolvidos entre os grupos amino da quitosana e os grupos aldeídicos dos agentes de reticulação.

**Tabela 5. Hidrofobicidade relativa das microesferas de quitosana**

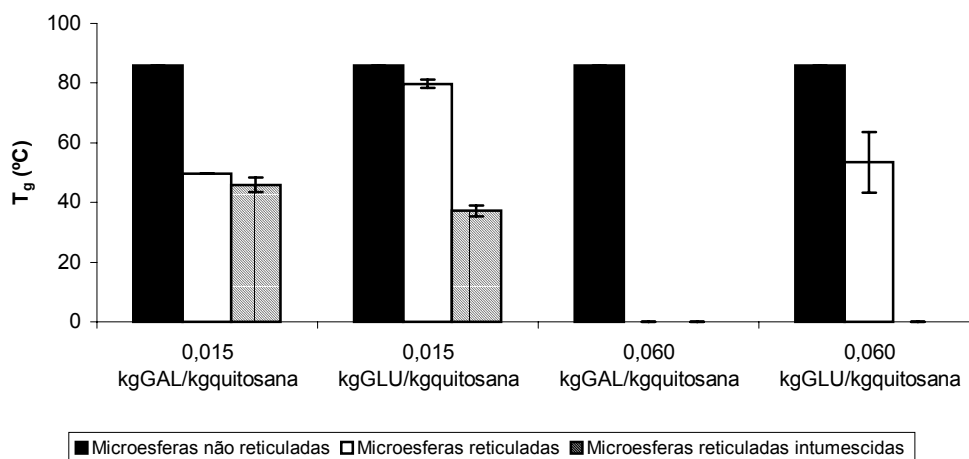
| Microesferas quitosana | Tempo de reticulação (min) | Concentração agente reticulante (kg <sub>ag. reticulante</sub> /kg <sub>quitosana</sub> ) | Grau de hidrofobicidade (ml/m <sup>2</sup> ) | R <sup>2</sup> (Coeficiente de correlação) |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Não reticuladas        | —                          | —                                                                                         | $56,71 \pm 11,72$                            | 0,9713                                     |
| Reticuladas com GAL    | 15                         | 0,015                                                                                     | $70,26 \pm 5,76$                             | 0,9849                                     |
|                        | 30                         | 0,015                                                                                     | $63,88 \pm 3,29$                             | 0,9339                                     |
|                        | 60                         | 0,015                                                                                     | $59,73 \pm 1,23$                             | 0,9839                                     |
|                        | 120                        | 0,015                                                                                     | $51,82 \pm 1,66$                             | 0,9854                                     |
|                        | 120                        | 0,060                                                                                     | $37,33 \pm 4,90$                             | 0,9791                                     |
| Reticuladas com GLU    | 15                         | 0,015                                                                                     | $96,34 \pm 9,37$                             | 0,9912                                     |
|                        | 30                         | 0,015                                                                                     | $115,16 \pm 28,52$                           | 0,9653                                     |
|                        | 60                         | 0,015                                                                                     | $90,88 \pm 1,58$                             | 0,9587                                     |
|                        | 120                        | 0,015                                                                                     | $91,61 \pm 6,31$                             | 0,9879                                     |

### 5.2.5 Análise Térmica

A temperatura de transição vítrea foi determinada por calorimetria exploratória diferencial para investigar a influência da reticulação sobre as propriedades térmicas das microesferas de quitosana, com o objetivo de entender os resultados obtidos. Também foi

investigado o efeito do intumescimento sobre a  $T_g$ , e desta forma o efeito plasticizante da água capturada pelas diferentes microesferas de quitosana.

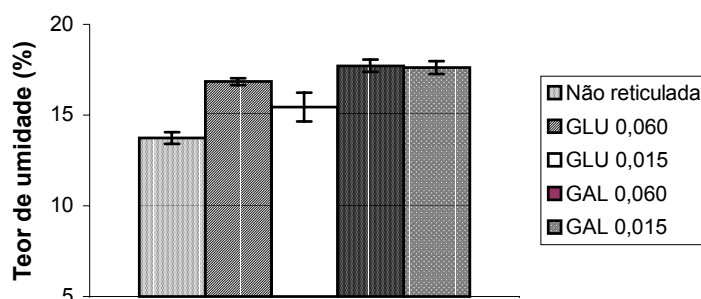
A  $T_g$  das microesferas de quitosana e microesferas de quitosana intumescidas em água estão apresentadas comparativamente na Figura 20. A reticulação da matriz das microesferas de quitosana provocou um decréscimo na  $T_g$  de  $85,8 \pm 0,1$  °C para  $79,8 \pm 1,4$  e  $49,6 \pm 0,1$  °C para GLU e GAL, respectivamente. Um aumento na concentração do GLU de  $0,015$  kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub> para  $0,060$  kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub> resultou em nova diminuição da  $T_g$  de  $79,8 \pm 1,4$  °C para  $53,5 \pm 10,2$  °C; já para o GAL a  $T_g$  não apareceu nas condições de análise testada, pois provavelmente esta esteja abaixo da temperatura de início da análise (20 °C). Estes resultados são diferentes daqueles geralmente observados que mostram que um aumento na densidade de reticulação provoca um aumento na  $T_g$  pela restrição na mobilidade molecular imposta pela reticulação (Montserrat, 1995; Chang, 1992). As curvas também mostraram um decréscimo significativo na  $T_g$  das microesferas intumescidas em água de  $49,6 \pm 0,1$  °C para  $45,9 \pm 2,5$  °C nas microesferas reticuladas com GAL ( $0,015$  kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>), sendo o efeito plasticizante mais pronunciado com o GLU ( $0,015$  kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub>),  $79,8 \pm 1,4$  para  $37,2 \pm 1,9$  °C. Para as microesferas de quitosana reticuladas com  $0,060$  kg/kg<sub>quitosana</sub> de GAL e GLU no estado intumescido, a  $T_g$  também não apareceu nas condições de análise testadas, provavelmente também devido à temperatura de início da análise (20 °C). O efeito da alteração da  $T_g$  pode ser uma função do teor de umidade (efeito plasticizante da água) ou cristalinidade (estrutura mais amorfa).



**Figura 20.** Transição vítrea das microesferas de quitosana antes e depois da reticulação com GAL e GLU em estado sólido, e intumescidas em água

### 5.2.6 Teor de umidade

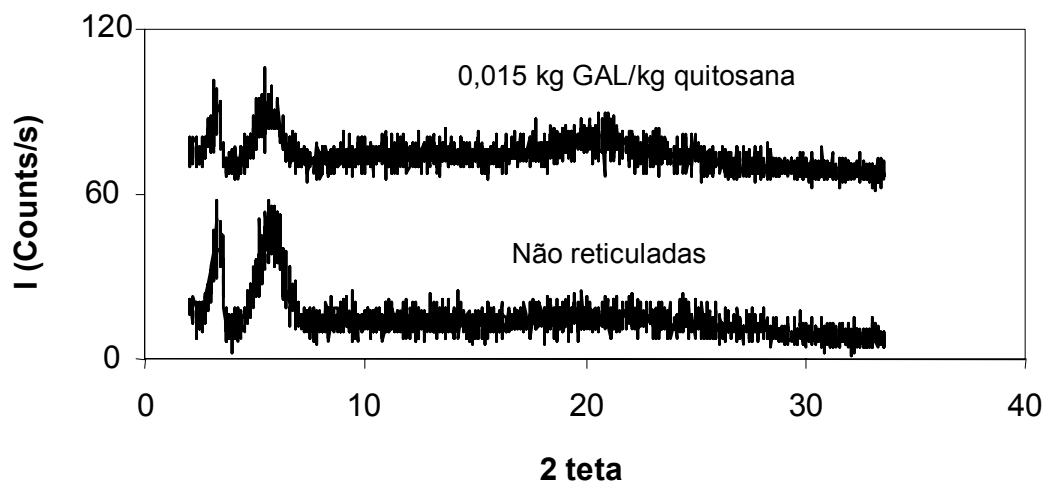
O teor de umidade das microesferas de quitosana foi medido pela técnica de Karl-Fischer para avaliar se as variações da  $T_g$  observadas nas análises de DSC (Figura 20) não estavam relacionadas à umidade contida nas microesferas após o processamento. Como pode ser visto, através da Figura 21, o teor de umidade das microesferas de quitosana teve uma pequena variação insuficiente para que a variação da  $T_g$  possa ser atribuída apenas ao efeito plasticizante do teor de umidade.



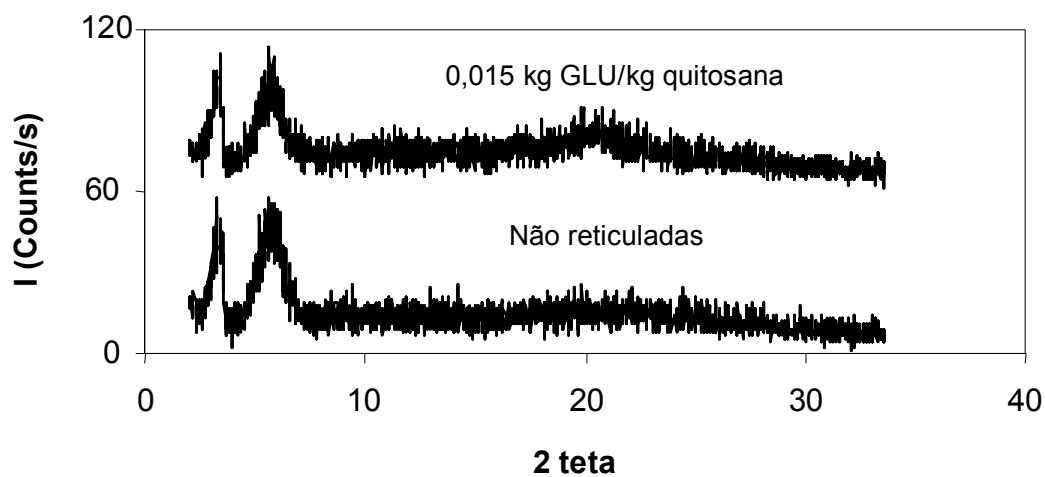
**Figura 21.** Teor de umidade das microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU em diferentes concentrações e tempo de reticulação de 120 min

### 5.2.7 Análise de cristalinidade por difração de raios-X

A análise da difração de raios-X das microesferas de quitosana não reticuladas indicou a presença de dois picos aparecendo em  $3,4^\circ$  e  $5,8^\circ$  relacionados a cristais da quitosana. No caso de microesferas de quitosana reticuladas com  $0,015 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$  e  $0,015 \text{ kg}_{\text{GLU}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$  não houve o aparecimento de novos picos, mas uma diminuição da intensidade dos picos (Figura 22 (a) e (b)). Isto sugere uma diminuição da cristalinidade das microesferas de quitosana com a reticulação.



(a)



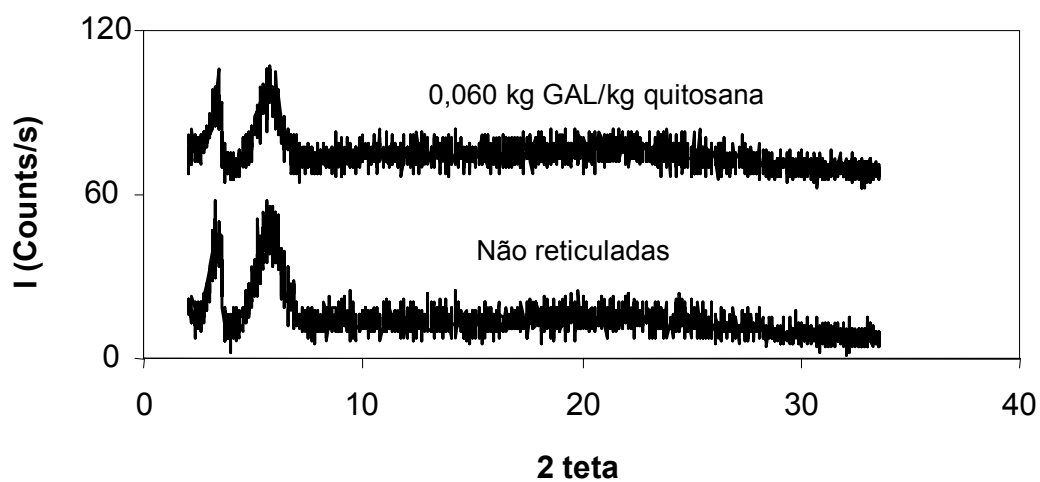
(b)

**Figura 22.** Efeito da reticulação química com diferentes agentes de reticulação sobre a cristalinidade de microesferas de quitosana: (a) 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>; (b) 0,015 kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub>

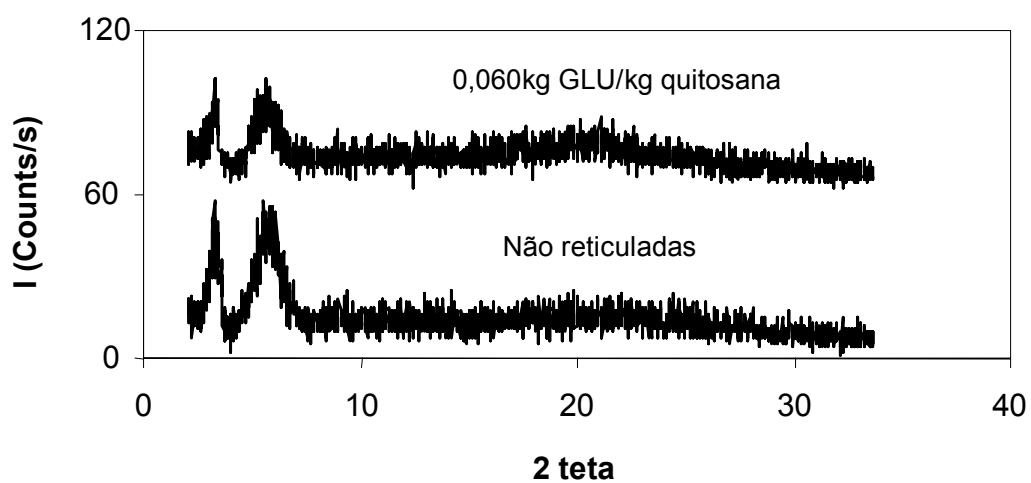
Com o aumento da concentração dos agentes reticulantes (GAL e GLU) de 0,015 para 0,060 kg<sub>reticulante</sub>/kg<sub>quitosana</sub> ocorreu novamente uma diminuição da intensidade dos picos

da quitosana, como apresentado nos difratogramas das Figuras 23 (a) e (b). No entanto, o efeito da variação de concentração dos agentes reticulantes não foi marcante sobre a intensidade dos picos da quitosana.

Os dados obtidos concordam com Monteiro Jr.&Aioldi (1999) que observaram um decréscimo no grau de cristalinidade com o aumento da quantidade de GLU no polímero. Os autores também obtiveram uma diminuição da largura dos picos característicos a 10,54 e 19,98° no difratograma, no entanto, não foi possível observar tal comportamento no presente trabalho, provavelmente devido à utilização de uma concentração do agente reticulante bem maior por aqueles autores, além do grau de desacetilação da quitosana utilizada ter sido menor (63,8%).



(a)



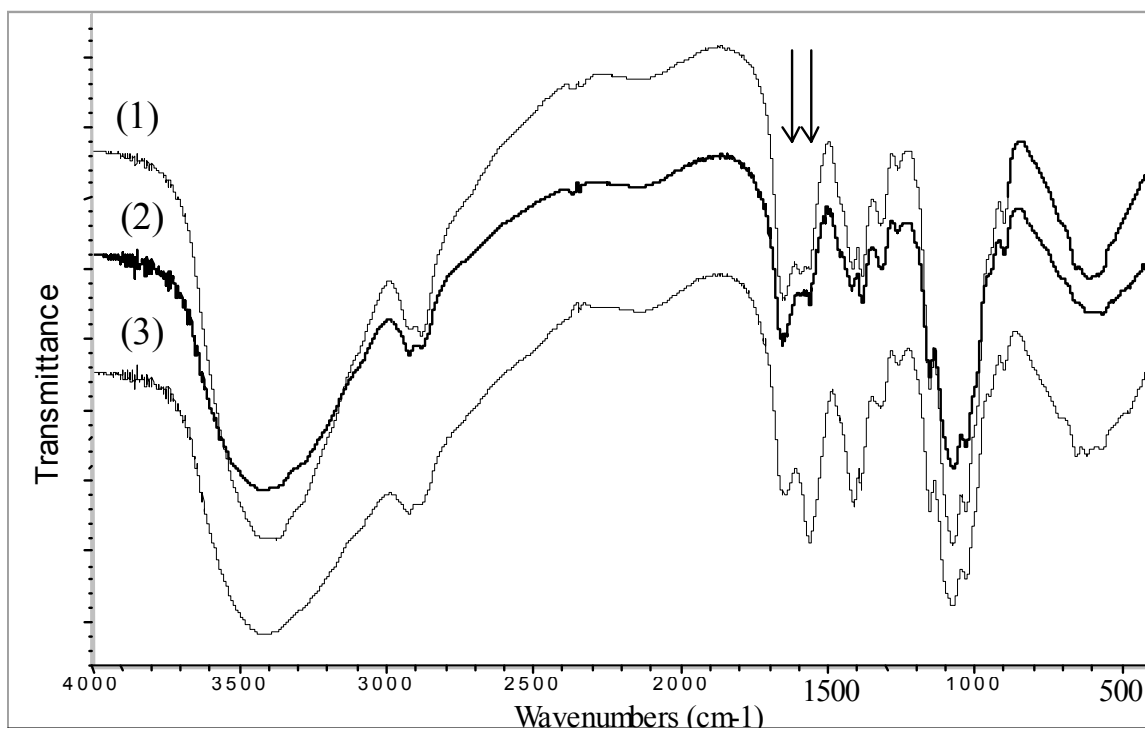
(b)

Figura 23. Efeito da reticulação química de diferentes agentes de reticulação sobre a cristalinidade de microesferas de quitosana: (a)  $0,060 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ ; (b)  $0,060 \text{ kg}_{\text{GLU}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$

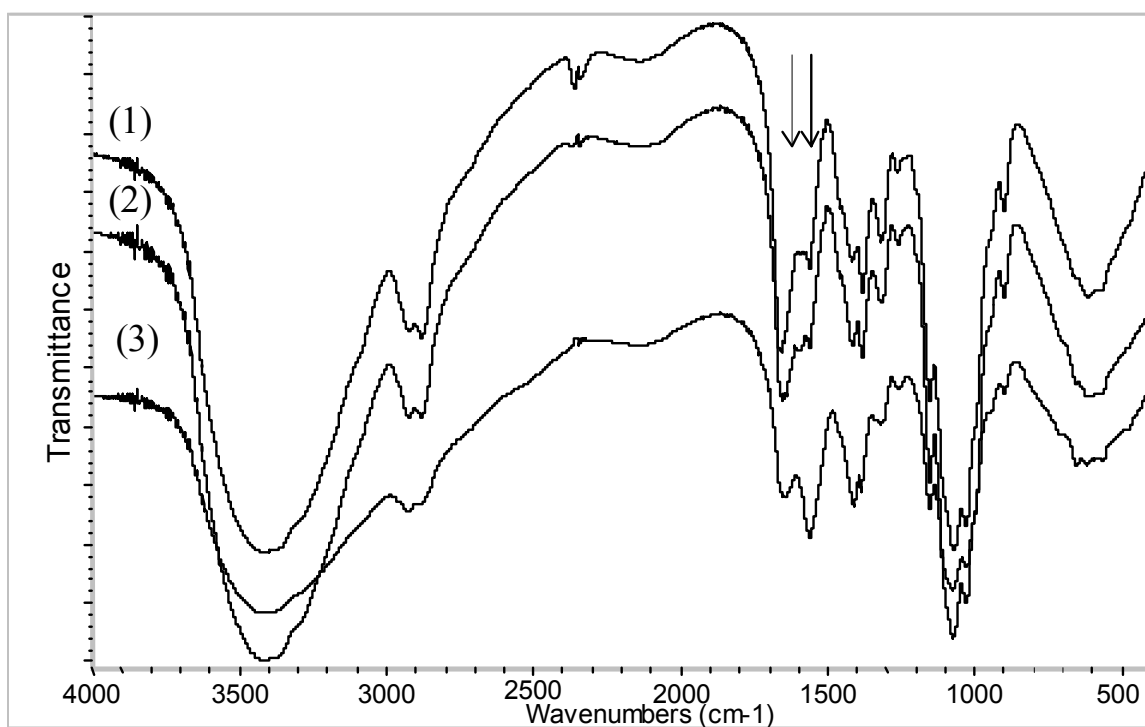
Os difratogramas de raios-X apresentados nas Figuras 22 e 23 auxiliam o entendimento dos dados obtidos por DSC onde houve uma diminuição da  $T_g$  (diminuição da cristalinidade), com o aumento do tempo de reticulação, e com a variação da concentração do agente reticulante, o que sugere que a técnica de DSC foi mais sensível na detecção das alterações pela reticulação das microesferas de quitosana com GLU e GAL em baixas concentrações destes agentes, pois ocorreram mudanças significativas na  $T_g$  sobre a influência da variação da concentração dos agentes reticulantes utilizados.

#### **5.2.8. Espectroscopia na região do infravermelho**

Os espectros na região do infravermelho das microesferas de quitosana e das microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU em diferentes concentrações e com tempo de reticulação de 2 h estão representados nas Figuras 24 (a) e (b), respectivamente.



(a): (1) 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> 2 h (2) 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> 2 h (3) Microesferas de quitosana



(b): (1) 0,060 kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub> 2 h (2) 0,015 kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub> 2 h (c) Microesferas de quitosana

Figura 24. Espectros na região do infravermelho das microesferas de quitosana reticuladas com GAL (a) e GLU (b)



Comparando-se os espectros observa-se o surgimento de duas novas bandas nas microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU nas concentrações de 0,015 kg<sub>ag.reticulante</sub>/kg<sub>quitosana</sub> e 0,060 kg<sub>ag.reticulante</sub>/kg<sub>quitosana</sub>, fixando-se o tempo de reticulação em 2 h. A primeira, em torno de 1649 cm<sup>-1</sup>, pode ser atribuída à ligação imina N=C e uma segunda, em torno de 1553 cm<sup>-1</sup>, está associada à ligação etilênica C=C. Entretanto, não foi detectada a banda característica do grupo aldeídico livre em torno de 1720 cm<sup>-1</sup> nos espectros das microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU, como mostram as Figuras 24 (a) e (b), demonstrando que não há grupos aldeídicos remanescentes em proporções consideráveis para serem detectados por esta técnica. Esses dados sugerem que nas microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU há presença de ligação imina conjugada com dupla ligação etilênica, em concordância com os dados obtidos por Monteiro et al (1999) para a quitosana reticulada com o GLU.

#### 5.2.9. Análise elementar

A análise elementar pode ser uma ferramenta útil para avaliar a densidade de reticulação pelos aldeídos em microesferas de quitosana, pois espera-se que, quanto maior a densidade de reticulação, menor será o percentual de nitrogênio, ou seja, maior será a relação C/N encontrado nas microesferas de quitosana. O percentual de CHN foi determinado através da análise orgânica clássica pela técnica de Pregl-Dumas que consiste em transformar os compostos orgânicos em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub> gasoso, sendo separados por uma coluna cromatográfica e quantificados por um detector de condutividade térmica.

A Tabela 6 mostra os percentuais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e a relação carbono/nitrogênio encontrados nas microesferas de quitosana e nas microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU. Como pode se notar, a densidade de reticulação aumentou com o tempo de incubação no meio de reticulação. O aumento da concentração dos agentes reticulantes de 0,015 kg<sub>Ag.reticulante</sub>/kg<sub>quitosana</sub> para 0,060 kg<sub>Ag.reticulante</sub>/kg<sub>quitosana</sub> também aumentou a densidade de reticulação. A razão C/N mudou com a reticulação, comprovando a incorporação dos agentes reticulantes (GAL e GLU) nas microesferas de quitosana.

Por outro lado, o percentual de nitrogênio das microesferas não reticuladas é menor que as microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU. Este resultado se

deve, possivelmente, às condições de preparação utilizadas para as diferentes formulações. Para a preparação das microesferas pela técnica de *spray drying* a quitosana foi solubilizada com auxílio de uma solução aquosa de ácido acético formando o sal acetato de quitosana, conforme é demonstrado por Nunthanid et al (2004). No entanto, durante o procedimento de reticulação, estas microesferas são suspensas em um meio contendo água/acetona, o que provavelmente faz com que o ânion acetato seja solubilizado neste meio. Desta forma, a massa utilizada para o cálculo dos elementos CHN nas microesferas sem reticulação não pode ser considerada como sendo puramente de quitosana, mas do sal formado, o que explicaria o aumento da razão C/N observado nas microesferas sem reticulação.

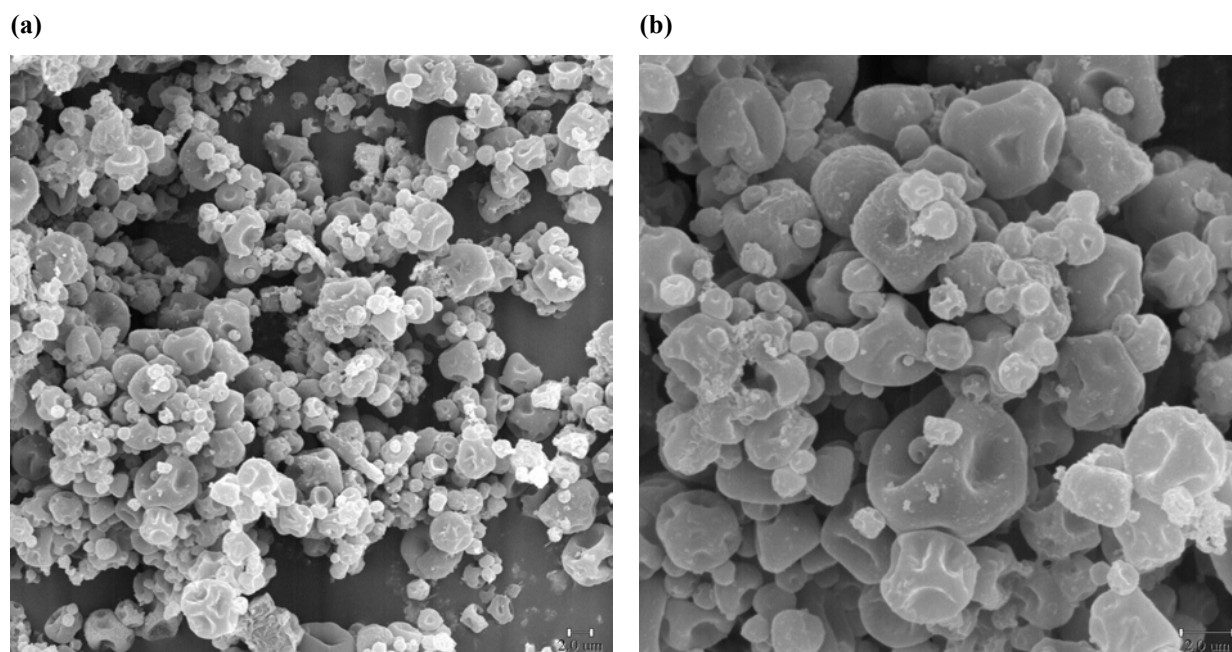
**Tabela 6. Percentuais de carbono, hidrogênio, nitrogênio e relação carbono/nitrogênio nas microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU**

|                                                                            | Não reticuladas | GAL        |            |            | GLU        |            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| Conc. reticulante<br>(Kg <sub>reticulante</sub> /Kg <sub>quitosana</sub> ) | -               | 0,015      | 0,015      | 0,060      | 0,015      | 0,015      | 0,060     |
| Tempo reticulação<br>(min)                                                 | -               | 15         | 120        | 120        | 15         | 120        | 120       |
| % C                                                                        | 41,63±0,07      | 42,01±0,11 | 42,73±0,08 | 42,94±0,06 | 42,24±0,03 | 41,95±0,11 | 43,71±0,2 |
| % H                                                                        | 6,73±0,03       | 6,63±0,03  | 6,69±0,06  | 6,78±0,11  | 6,96±0,18  | 6,87±0,04  | 6,85±0,20 |
| % N                                                                        | 6,61±0,06       | 7,44±0,02  | 7,53±0,02  | 7,09±0,13  | 7,47±0,06  | 7,24±0,06  | 7,08±0,03 |
| C/N                                                                        | 6,30            | 5,65       | 5,68       | 6,06       | 5,66       | 5,79       | 6,17      |

### 5.3 Efeito da reticulação superficial com HNa sobre as características das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying*

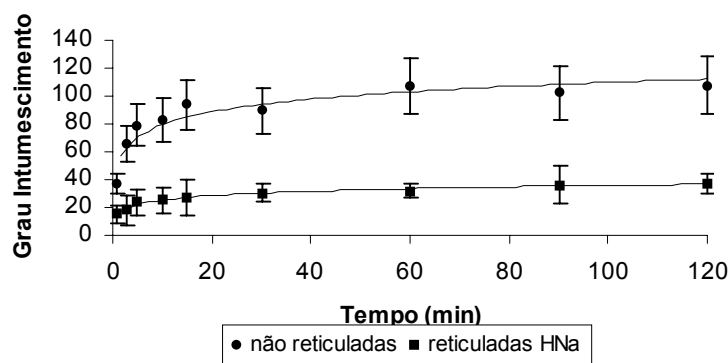
Microesferas de quitosana apresentam uma alta densidade de cargas positivas não sendo necessário adicionar tensoativos, o que favorece a interação entre a superfície das microesferas com um polieletrólito de carga oposta e pode apresentar vantagens na utilização *in vivo* por não utilizar aditivo na sua preparação. Complexos de polieletrólitos são formados quando policações e poliânions de dois polímeros de carga oposta interagem. O complexo de polieletrólitos composto de microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* com HNa foi feito através de método por incubação e caracterizado com relação às suas características morfológicas, intumescimento, carga superficial, estrutura cristalina, análise térmica e espectroscopia na região do infravermelho.

Fotografias por MEV das microesferas de quitosana reticuladas fisicamente com HNa estão apresentadas na Figura 25. Não foi possível notar mudanças visíveis no aspecto morfológico das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* devido à reticulação física com HNa quando comparadas às microesferas não reticuladas, anteriormente apresentadas na Figura 10.



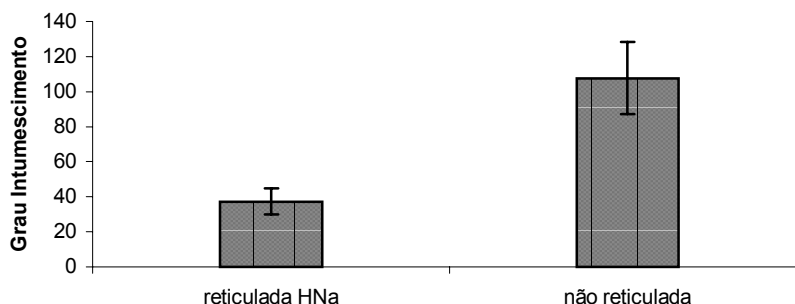
**Figura 25.** Fotografia das microesferas de quitosana reticuladas fisicamente com HNa: (a) aumento de 2000x; (b) aumento de 5000x

A cinética de intumescimento das microesferas de quitosana obtidas a partir da reticulação física com HNa foi avaliada em água à temperatura de 37 °C. A Figura 26 apresenta a capacidade de capturar água em função do tempo de incubação. As microesferas reticuladas intumesceram diversas vezes o seu peso em água, alcançando rapidamente um equilíbrio de intumescimento em torno de 30 min. Kim et al (2004a) estudaram o comportamento do intumescimento de complexos de polieletrólitos de quitosana e HNa observando, similarmente, um equilíbrio no intumescimento em torno de 30 min. Kim et al (2004b) avaliaram o efeito do pH e da temperatura sobre o intumescimento deste tipo de PEC, concluindo que o intumescimento é dependente do pH e da temperatura.



**Figura 26.** Intumescimento das microesferas de quitosana não reticuladas e reticuladas fisicamente com HNa

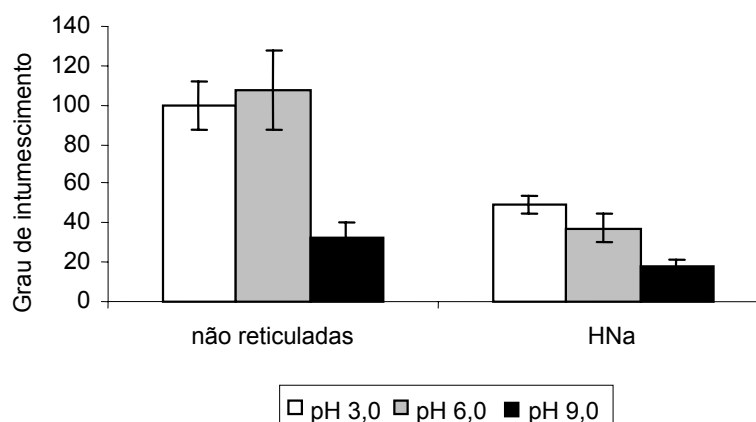
Na Figura 27 está apresentado o efeito da reticulação física com HNa sobre o grau de intumescimento no equilíbrio. A reticulação com HNa levou a uma diminuição em torno de 65 % no grau de intumescimento no equilíbrio em relação às microesferas de quitosana não reticuladas.



**Figura 27.** Efeito da reticulação física com HNa das microesferas de quitosana sobre o grau de intumescimento no equilíbrio comparativamente as microesferas não reticuladas

Os PECs exibem intumescimento dependente do pH, tanto em meio ácido como também em condições básicas (Berger et al, 2004b). Com uma mudança de pH, o balanço de cargas é modificado com conseqüente mudança no grau de interação entre os dois polímeros e o intumescimento ocorre pela dissociação do complexo. Para caracterizar a resposta do PEC às variações do pH externo, as microesferas reticuladas com HNa foram intumescidas até o equilíbrio em diferentes condições de pH (3,0; 6,0 e 9,0), à temperatura constante de 37 °C. O efeito observado está apresentado na Figura 28, onde pode-se

constatar que a capacidade de intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com HNa decresceu gradualmente com o aumento do pH do meio. Pode-se inferir que o PEC formado pela quitosana e HNa é mais estável em valores de pH em torno da neutralidade e mais instável em condições ácidas do que básicas. O grau de intumescimento do PEC aumentou quando o pH do meio ficou abaixo do pH 6,0, o qual foi causado pela dissociação das ligações iônicas no PEC. Neste caso, o pH do meio causa a dissociação das ligações iônicas e como a maioria dos grupos carboxílicos estão carregados, estes mudam para a sua forma protonada. Em condições de pH muito baixas, a maioria dos grupos carboxílicos do HNa estão na forma  $\text{COOH}$ , e a maioria dos grupos amino da quitosana estão na forma  $\text{NH}_3^+$ . Por outro lado, em pH básico, a maioria dos grupos amino da quitosana estão na forma  $-\text{NH}_2$  e a maioria dos grupos carboxílicos do HNa estão na forma  $-\text{COO}^-$ . Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Kim et al. (2004a), onde os autores observam comportamento similar em hidrogéis de compostos de quitosana e HNa no grau de intumescimento em função da variação de pH do meio.



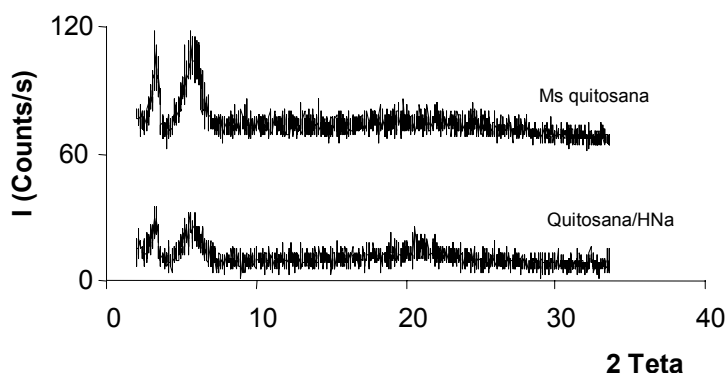
**Figura 28. Efeito do pH de incubação sobre o intumescimento das microesferas de quitosana reticuladas com HNa**

O efeito da reticulação física das microesferas de quitosana com HNa sobre a carga superficial das microesferas de quitosana foi investigado. A reticulação física com HNa levou a um decréscimo acentuado do potencial zeta das microesferas de quitosana de  $+55,3 \pm 0,6$  mV para  $+8,3 \pm 1,8$  mV, indicando a formação de complexo de polieletrólitos entre a quitosana e o HNa. Este decréscimo mais acentuado na reticulação física com HNa

do que com a reticulação química, comprova o fato desta interação entre os grupos amino da quitosana com os grupos carboxílicos do HNa ocorrer predominantemente na superfície das microesferas de quitosana pré-formadas devido à massa molar elevada do HNa ( $1 \times 10^6$  Da).

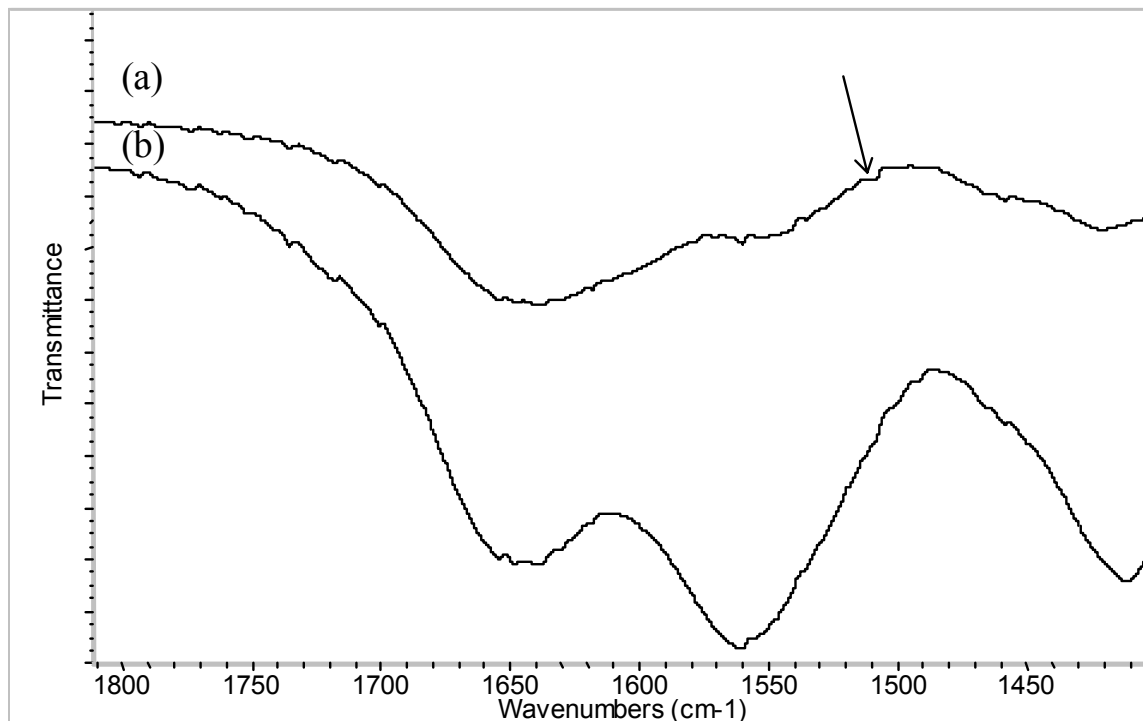
A cristalinidade das microesferas de quitosana com HNa foi avaliada por difração de raios-X e está apresentada na Figura 29. Os picos em  $3,4^\circ$  e  $5,8^\circ$  apresentaram uma diminuição da intensidade, indicando uma diminuição da cristalinidade das microesferas de quitosana com a reticulação física com HNa. Lee et al. (2003) avaliaram a cristalinidade de complexos de polieletrólitos em esponjas de quitosana e HNa, encontrando uma diminuição da intensidade do pico  $19,3^\circ$  e o desaparecimento do pico em  $9,8^\circ$ . Para os autores, isto representou que os grupos carboxílicos do HNa participaram na formação de ligações iônicas com os grupos amino da quitosana e que os PECs mostraram uma cristalinidade relativamente baixa. Esse efeito de desaparecimento dos picos provavelmente não foi observado no difratograma obtido, em função das condições de pH menos favoráveis à formação do PEC, porém necessárias para manter as microesferas de quitosana estáveis em suspensão para promover a interação com o HNa.

Kim et al. (2004b) utilizaram a espectroscopia de infravermelho para confirmação da estrutura química dos complexos de polieletrólitos da quitosana com HNa. Na continuidade deste trabalho esta técnica também foi utilizada na tentativa de confirmação da formação desta estrutura.



**Figura 29.** Efeito da reticulação física com HNa sobre a cristalinidade de microesferas de quitosana

A Figura 30 mostra o espectro de infravermelho das microesferas de quitosana não reticuladas e microesferas de quitosana reticuladas com HNa. Os picos característicos da quitosana aparecem a  $1650$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$  devido às bandas de amida I e II, respectivamente. Os picos característicos do HNa (na forma de sal sódico) podem ser vistos a  $1630$  e  $1570\text{ cm}^{-1}$ . A formação do complexo de polieletrólitos entre a quitosana e o HNa mostra uma pequena banda de absorção em torno de  $1520\text{ cm}^{-1}$  devido ao  $-\text{NH}_3^+$  da quitosana após a formação do complexo de polieletrólitos. Este pico não aparece no espectro das microesferas de quitosana não reticuladas. Os dados obtidos concordam com os resultados por Kim et al (2004b) e Lee et al (2003), onde estes autores atribuem a banda de absorção em torno de  $1520\text{ cm}^{-1}$  à formação do complexo de polieletrólitos entre a quitosana e o HNa.



**Figura 30. Espectros de infravermelho de (a) microesferas de quitosana reticuladas com HNa e (b) microesferas de quitosana não reticuladas**

A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi usado para determinar a  $T_g$  das microesferas de quitosana reticuladas fisicamente com HNa, a fim de avaliar os efeitos da reticulação e do intumescimento. Os resultados estão apresentados comparativamente às microesferas não reticuladas na Figura 31. A reticulação física com HNa das microesferas de quitosana aumentou a  $T_g$  de  $85,80 \pm 0,13\text{ }^\circ\text{C}$  para  $105,25 \pm 0,16\text{ }^\circ\text{C}$ .

Kim et al (2003) analisaram as características térmicas dos complexos de polieletrólitos formados por quitosana e HNa. Medidas dielétricas foram conduzidas para observar a  $T_g$  dos PECs, sendo que foi considerado por estes autores o valor da  $T_g$  de 170 °C para os complexos formados na proporção de 1:1 de quitosana e HNa. Os autores atribuíram o aumento da  $T_g$  à presença do PEC, atribuindo este efeito como uma consequência ao decréscimo nos efeitos estéricos limitando os movimentos micro-Brownianos das cadeias principais. Como mostra a Figura 31, quando as microesferas de quitosana reticuladas com HNa foram intumescidas, não se detectou uma transição vítrea ( $T_g$ ) na faixa de temperatura investigada, provavelmente devido a efeito plasticizante marcante da água sobre o PEC formado.

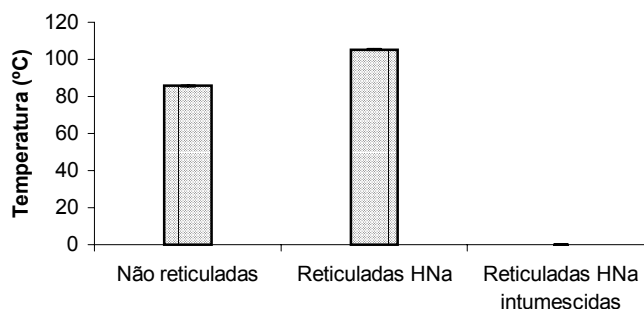


Figura 31. Transição vítrea das microesferas de quitosana antes e depois da reticulação com HNa, e intumescidas em água

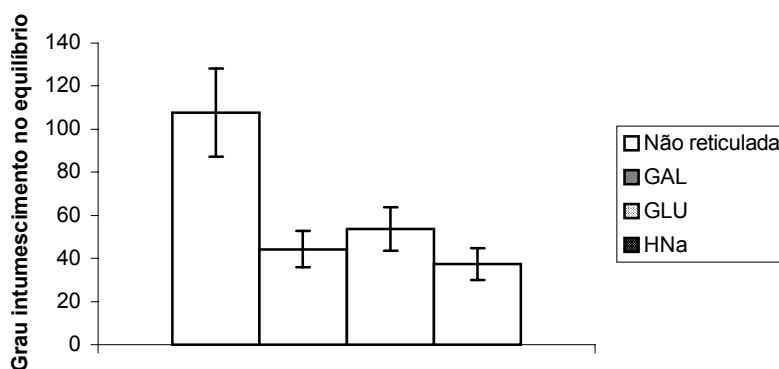
#### 5.4 Comparação das propriedades das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* após reticulação física e química

Os diferentes tipos de reticulação levam à formação de estruturas particulares, o que conseqüentemente gera propriedades diferentes para as microesferas. As microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* reticuladas física e quimicamente são analisadas comparativamente com relação ao intumescimento, carga superficial e hidrofobicidade.

O grau de intumescimento no equilíbrio das microesferas de quitosana obtidas a partir das reticulações química e física está apresentado comparativamente na Figura 32. Pode-se notar que a reticulação física com 0,16 kg<sub>HNa</sub>/kg<sub>quitosana</sub> apresentou intumescimento das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying* 15,9 % menor do



que a reticulação com química com  $0,015 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$  e 30,6 % em relação à reticulação com  $0,015 \text{ kg}_{\text{GLU}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ . Provavelmente isso se deve ao mecanismo de intumescimento envolvido, na reticulação com GAL e GLU provavelmente está relacionado com a partícula como um todo (*bulk*), tendo como principais limitações o tamanho de poros e a hidrofobicidade. Já com o HNa deve estar relacionado com a superfície da partícula onde ocorre a interação entre os polieletrólitos, provavelmente formando uma barreira hidratada na forma de gel que controla a difusão da água para dentro da partícula.

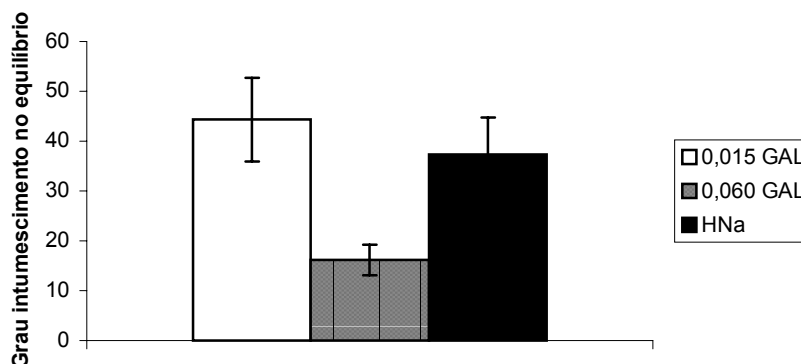


**Figura 32. Grau de intumescimento no equilíbrio de microesferas de quitosana com reticulação química com  $0,015 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ ,  $0,015 \text{ kg}_{\text{GLU}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$  e reticulação física com HNa com tempo de reticulação de 120 min**

Com o aumento da densidade de reticulação pelo aumento da concentração dos agentes químicos de reticulação de  $0,015 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$  para  $0,060 \text{ kg}_{\text{GAL}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$  a reticulação demonstrou ser mais efetiva do que com  $0,16 \text{ kg}_{\text{HNa}}/\text{kg}_{\text{quitosana}}$ , conforme apresentado na Figura 33. A concentração de GAL é aproximadamente 10 vezes menor que a concentração de HNa necessária para atingir aproximadamente o mesmo controle sobre o intumescimento das microesferas de quitosana. Esta diferença é atribuída ao mecanismo de intumescimento devido aos diferentes tipos de reticulação, sendo reticulação química considerada como *bulk* e a reticulação física como superficial.

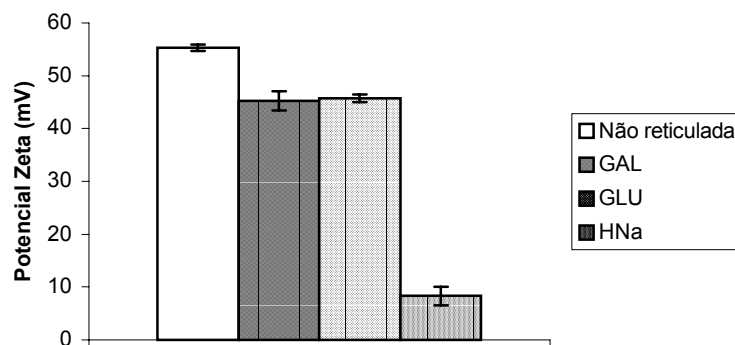
Comparativamente aos agentes químicos de reticulação o HNA apresenta uma alta viscosidade, desta forma a concentração do agente reticulante pode representar uma

variável importante de processo a ser considerada na reticulação física, levando-se em conta o controle que se deseja obter sobre o intumescimento.



**Figura 33. Intumescimento de microesferas de quitosana reticuladas com: 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>, 0,060 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> e 0,16 kg<sub>HNa</sub>/kg<sub>quitosana</sub>**

A análise comparativa do potencial zeta das microesferas de quitosana com reticulação química (GAL e GLU) e física (HNa) está apresentado na Figura 34. A reticulação física com HNa foi mais efetiva em modificar o potencial zeta das microesferas de quitosana em relação a reticulação com GAL e GLU. Esta diferença deve estar associada a reticulação predominantemente superficial com HNa em relação a uma reticulação *bulk* dos aldeídos GAL e GLU.



**Figura 34. Potencial zeta das microesferas de quitosana não reticuladas, reticuladas com 015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>, 0,015 kg<sub>GLU</sub>/kg<sub>quitosana</sub> e HNa (Hialuronato de sódio)**

A hidrofobicidade das microesferas de quitosana reticuladas com GAL e GLU foi comparada conforme apresentado na Tabela 5. Pode-se notar uma modificação da hidrofobicidade relativa após o tratamento químico com esses agentes reticulantes. Apesar de não ter sido testada, não espera-se que a reticulação com HNa altere a hidrofobicidade relativa visto que os dois polímeros utilizados são hidrofílicos.

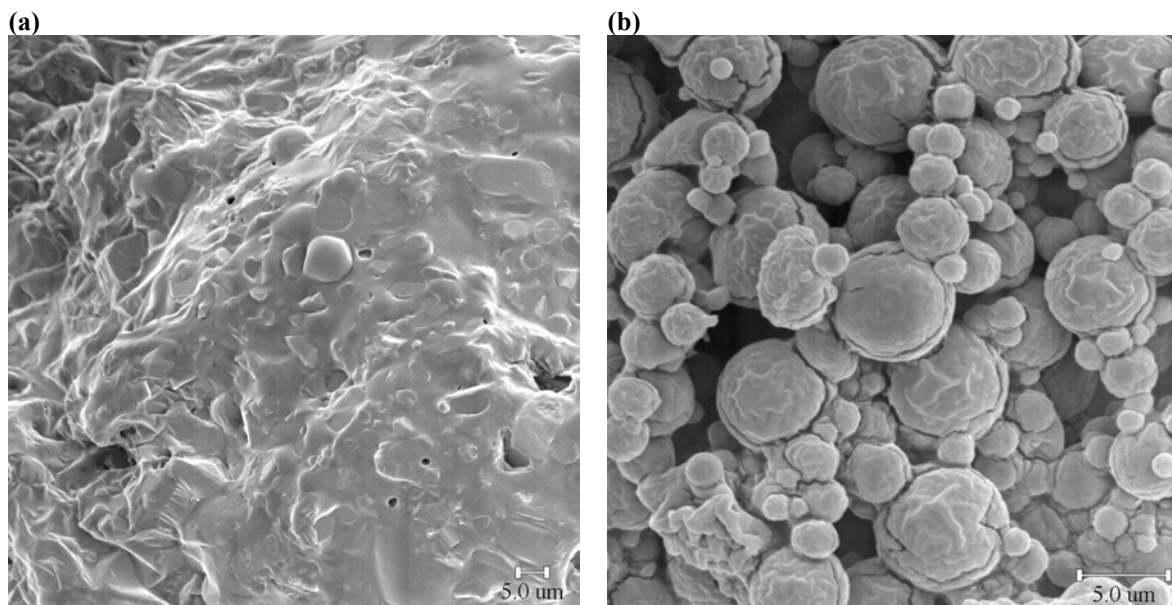
### **5.5 Efeito da adsorção do pDNA (DNA plasmidial) sobre as características das microesferas de quitosana produzidas pela técnica de *spray drying***

A associação do pDNA foi feita somente com microesferas de quitosana reticuladas com GAL, devido a estas partículas apresentarem intumescimento controlado, potencial zeta elevado; além disso, o agente de reticulação tem sido apontado como interessante alternativa aos outros aldeídos devido à baixa toxicidade (Oliveira et al., 2004; Conti et al., 1998). Apesar das microesferas de quitosana reticuladas com GLU também apresentarem uma alta densidade de cargas e intumescimento controlado, a literatura relata que este aldeído pode provocar efeitos indesejáveis na utilização *in vivo* (Ballantyne&Jordan, 2001; Leung, 2001). Na reticulação com HNa, também foi possível modular o intumescimento e os polímeros usados apresentam baixa toxicidade, no entanto as partículas resultantes apresentaram baixo potencial zeta, o que pode comprometer significativamente a eficiência de adsorção do pDNA na superfície das microesferas de quitosana.

#### **5.5.1 Morfologia de microesferas reticuladas e não reticuladas**

Neste estudo foi feita a adsorção de pDNA sobre a superfície de microesferas de quitosana não reticuladas, e reticuladas com GAL (0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub>) com diferentes tempos de reticulação (30 e 120 min). Foi avaliada a morfologia das diferentes microesferas que estão apresentadas na Figura 35. Na adsorção de pDNA nas microesferas de quitosana não reticuladas a estrutura das microesferas resultantes foi completamente desestabilizada, pois provavelmente a interação eletrostática entre a quitosana e o pDNA é mais lenta que o intumescimento e/ou a relação de pDNA/quitosana não foi suficiente para manter a estrutura estável. Desta forma, fica aqui comprovado que a reticulação é necessária para manter a estrutura física das partículas durante o processo de adsorção do pDNA. As

microesferas reticuladas com GAL permaneceram praticamente inalteradas, indicando que a reticulação foi eficiente em manter a estrutura física estável durante o processo de adsorção do pDNA.



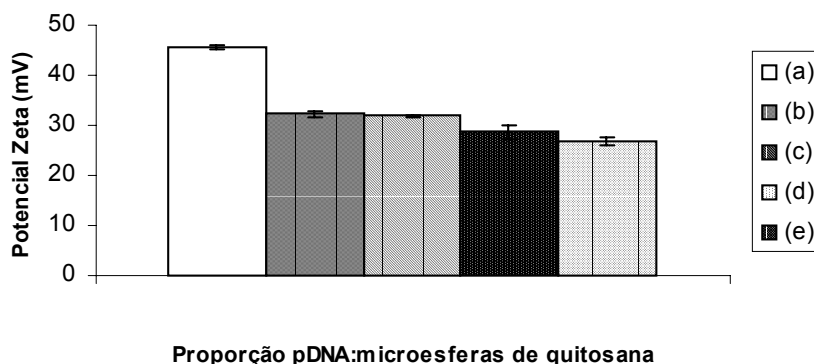
**Figura 35. Morfologia das microesferas de quitosana após a adsorção do pDNA e liofilizadas: (a) não reticuladas e (b) reticuladas com 0,015 kg<sub>GAL</sub>/kg<sub>quitosana</sub> por 2 h.**

#### **5.5.2. Variação de proporção de pDNA durante o processo de adsorção em microesferas de quitosana reticuladas**

A literatura tem mostrado que a quitosana tem um grande potencial para complexação com pDNA, negativamente carregado, devido às suas características catiônicas (Roy et al., 1999; MacLaughlin et al., 1998). Quando a quitosana é misturada com espécies aniônicas com cargas opostas, uma interação forte pode ocorrer, resultando na formação de um complexo de polieletrólitos.

Um material carregado negativamente atualmente de grande interesse farmacêutico é o pDNA. A interação entre as microesferas de quitosana e o pDNA foi avaliada através de medidas de carga superficial (potencial zeta) e, como resultado, observou-se que foi possível produzir partículas com diferentes cargas superficiais utilizando diferentes proporções mássicas de pDNA:microesferas de quitosana, como mostra a Figura 36.

Na medida em que se diminui a proporção mássica de pDNA para quitosana são produzidas partículas com menor potencial zeta. Na proporção mássica de 1:25 (pDNA:microesferas de quitosana) as partículas apresentaram potencial zeta abaixo de +30 mV, sendo que a partir deste valor nominal de carga superficial há normalmente uma tendência de instabilidade e agregação de partículas. Assim, neste trabalho, optou-se por trabalhar com a proporção de 1:50 (pDNA:microesferas de quitosana), o que equivale a uma concentração de 0,17 mg/mL de pDNA no meio de incubação contendo 500 mg de microesferas de quitosana, para que fosse possível produzir micropartículas estáveis e apropriadas para os estudos de transfecção em células *in vitro*, bem como para um boa performance *in vivo*. Para obtenção de uma resposta imune suficiente para vacinação de camundongos é necessário a administração de três doses de 100 µg por via intramuscular (Lima et al., 2000), entretanto as microesferas obtidas demonstraram ter grande capacidade de adsorção demonstrando desta forma a potencialidade das partículas como carreadoras do pDNA.

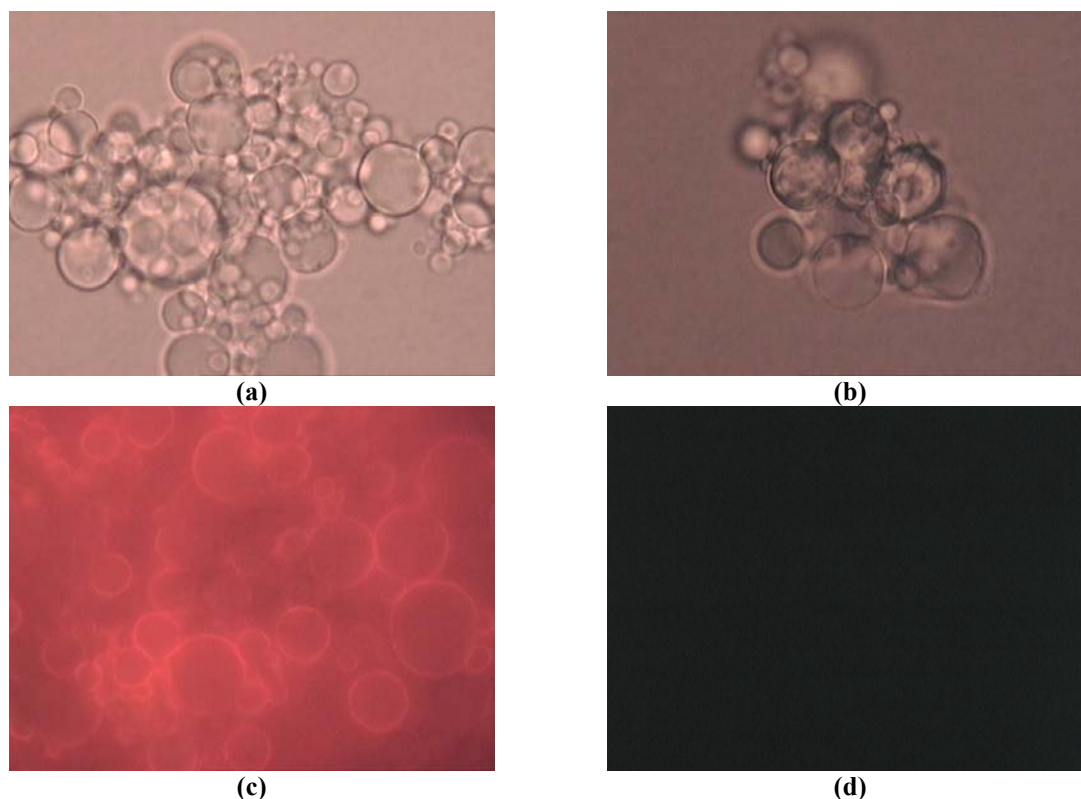


**Figura 36. Potencial zeta de diferentes complexos formados com diferentes proporções de pDNA:microesferas de quitosana: (a) sem pDNA, (b) 1:100 , (c) 1:50, (d) 1:25 e (e) 1:10.**

## **5.6. Avaliação da adsorção do pDNA em microesferas de quitosana reticuladas com GAL**

A natureza da interação envolvida no processo de adsorção do pDNA nas microesferas de quitosana é predominantemente eletrostática, sendo possível a visualização da formação deste complexo através de microscopia com fluorescência por coloração do pDNA com Brometo de Etídio (EtBr), demonstrando a formação de um complexo de polieletrólitos entre a quitosana e o pDNA. As fotografias obtidas por microscopia ótica

com e sem fluorescência de contraste em microesferas de quitosana com pDNA-EtBr adsorvido, apresentadas na Figura 37, mostram que as microesferas de quitosana adsorveram o pDNA-EtBr e que este se encontra predominantemente adsorvido na superfície das partículas. As Figuras 37 (a) e (b) são fotografias obtidas através de microscopia ótica sem fluorescência, sendo microesferas sem pDNA e microesferas com pDNA, respectivamente. Nas Figuras 37 (c) e (d) estão as fotografias obtidas por microscopia ótica com fluorescência de contraste, sendo microesferas com pDNA-EtBr e sem pDNA-EtBr, respectivamente.



**Figura 37. Fotografias da adsorção do pDNA corado com brometo de etídio em microesferas de quitosana por microscopia ótica: (a) microesferas sem pDNA por microscopia ótica sem fluorescência (1000x); (b) microesferas com pDNA por microscopia ótica sem fluorescência; (c) microesferas com pDNA-EtBr por microscopia ótica com fluorescência (1000x); (d) microesferas sem pDNA por microscopia ótica com fluorescência.**

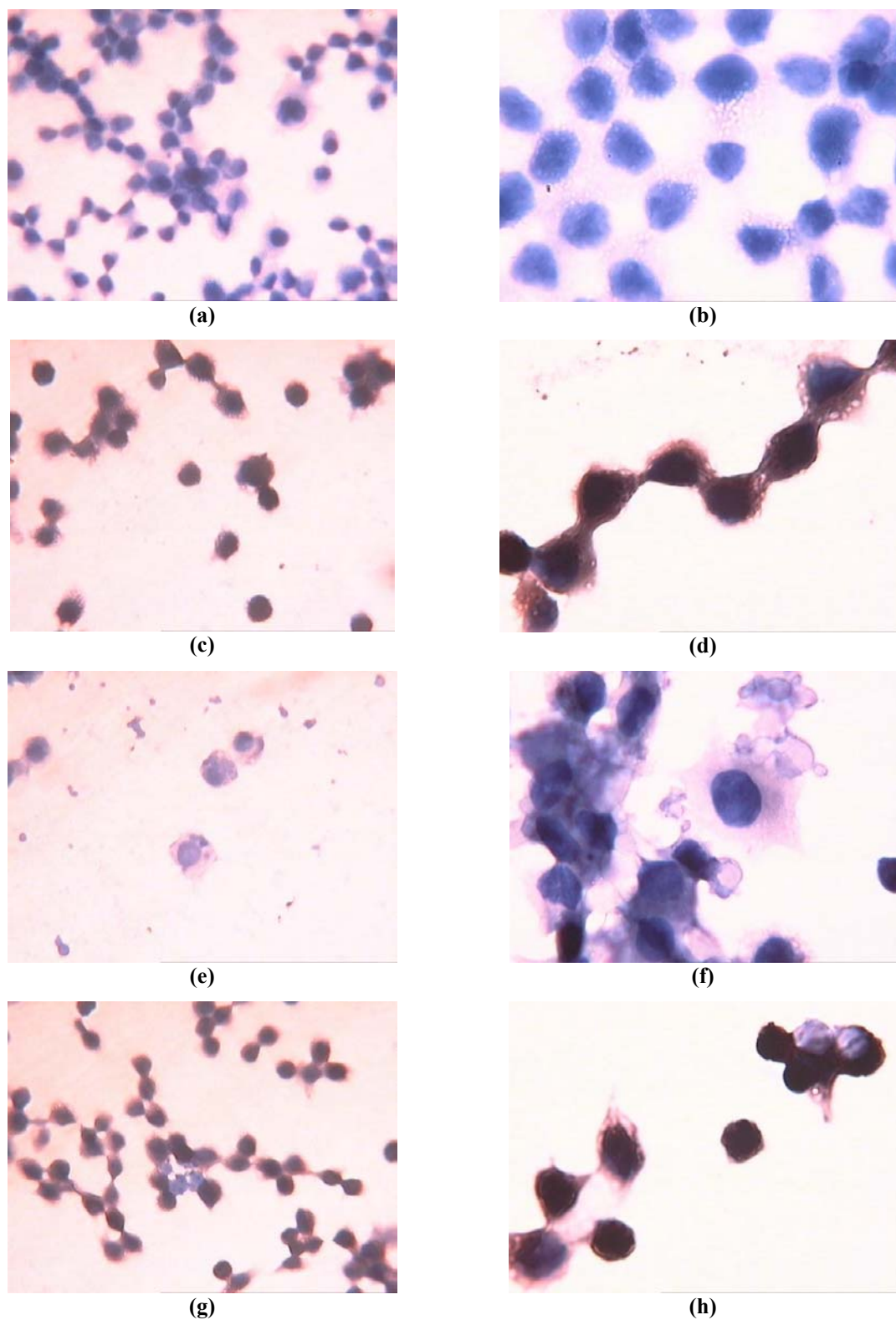
Utilizando as condições de adsorção de pDNA nas microesferas de quitosana descritas no item 4.2.3, a eficiência de adsorção foi cerca de 78 %. Apesar da técnica espectrofotométrica não ser muito sensível para a quantificação do pDNA, este resultado já indica uma grande eficiência de adsorção, lembrando, no entanto, que no entanto dados de literatura relatam eficiências de encapsulação normalmente maiores que 95% (Leong et al., 1998).

### 5.7. Estudos de transfecção *in vitro*

A transfecção pode depender de muitos fatores tais como a estrutura química dos polímeros, tamanho e composição dos complexos formados entre a quitosana e o pDNA, a interação entre as células e estes complexos, dentre outros (Lee et al., 1998).

A fim de avaliar a potencialidade das microesferas de quitosana em carrear o pDNA e mediar a transfecção celular, células J774 (linhagem de macrófagos murinos) foram tratadas por 24 h com as microesferas contendo o pDNA-hsp65 adsorvido na superfície. Pode-se observar, por análise microscópica (Figura 38), que as microesferas foram capturadas pelas células. É interessante notar que as células permaneceram viáveis durante o curso deste estudo, dando indícios de uma baixa citotoxicidade. Também é possível observar através da Figura 38 (e) e (f) um aspecto “espalhado”, sugerindo que as partículas intumesceram e perderam a morfologia. A análise da expressão da proteína heteróloga, a hsp65 da *M. leprae* pelas células murinas foi feita por imunocitoquímica e os resultados indicam que o plasmídeo adsorvido nas microesferas de quitosana reticuladas com GAL é capaz de atingir o núcleo da célula onde dirige a síntese da proteína em questão. A expressão da proteína pode ser visualizada pela coloração marrom do citoplasma celular (Figura 38 (g) e (h)). Como controle positivo da transfecção utilizou-se lipofectina (*In Vitrogen*), que são lipossomas catiônicos complexados com o pDNA-hsp65 (Figura 38 (c) e (d)). Como controle negativo utilizou-se células não tratadas com microesferas de quitosana sem o pDNA (Figura 38 (a) e (b)). Estes dados demonstram que as microesferas de quitosana são capazes de adsorver o pDNA e que a sua funcionalidade não é anulada pelo processo de adsorção utilizado. Além disto, as microesferas de quitosana reticuladas com GAL são capazes de carrear o pDNA para o interior das células mediando sua transfecção.

As microesferas de quitosana reticuladas com GAL preparadas pela técnica de *spray drying* reticuladas com GAL demonstraram grande potencial em relação a outras técnicas de preparação, pois o pDNA não foi exposto a solventes orgânicos e altas forças de cisalhamento por longos períodos de tempo como na maior parte das outras técnicas de preparação de microesferas, o que provavelmente explica a manutenção da atividade do pDNA após o processamento.



**Figura 38.** Avaliação da expressão de hsp65, imunocitoquímica, em células J774 transfectadas por diferentes métodos: células J774 - controle negativo (a) 400x e (b) 1000x; células J774-hsp65 – controle positivo - células transfectadas com lipofectina + DNA (c) 400x e (d) 1000x; células J774 tratadas com microesferas de quitosana sem pDNA (e) 400x e (f) 1000x; células J774 tratadas com microesferas de quitosana contendo pDNA (g) 400x e (h) 1000x.



## 6. CONCLUSÕES

Deste estudo de preparação de microesferas de quitosana por *spray drying*, com diferentes tipos de reticulação, pode-se elencar como principais conclusões:

- O intumescimento das microesferas de quitosana não reticuladas é influenciado pela concentração de quitosana na solução usada para preparação pela técnica de *spray drying*.

- A reticulação das microesferas de quitosana com GAL e GLU pode ser confirmada quimicamente através da técnica espectroscopia na região do infravermelho (presença de ligação imina conjugada com dupla ligação etilênica) e, por análise elementar (variação da proporção C/N nas microesferas).

Do estudo de reticulação química (GAL e GLU), pode-se verificar que propriedades como a carga superficial, o grau de intumescimento, propriedades térmicas, cristalinidade e a hidrofobicidade de microesferas de quitosana puderam ser manipuladas através do uso de diferentes agentes reticulantes, do tempo de reticulação e da concentração do agente reticulante, tendo a área superficial e a morfologia das microesferas permanecido praticamente inalteradas.

- A formação do complexo de eletrólitos entre a superfície das microesferas de quitosana e o HNa pode ser confirmada através de análises de espectroscopia na região do infravermelho e análises calorimétricas exploratórias diferenciais.

- Através da reticulação física com HNa pode-se manipular o grau de intumescimento, carga superficial e a cristalinidade das microesferas de quitosana produzidas por *spray drying*, mantendo a morfologia praticamente inalterada.

- O controle das propriedades das microesferas de quitosana tais como intumescimento e carga superficial através da reticulação possibilitou a adsorção do pDNA na superfície das partículas mantendo uma densidade de cargas superficial relativamente elevada e obtendo uma eficiência de adsorção de cerca de 80%.

- Os estudos de transfecção *in vitro* em cultura de células demonstraram que as microesferas de quitosana reticuladas com GAL contendo o pDNA adsorvido na superfície em proporção mássica de 1:50 (pDNA:quitosana) conseguiram mediar a transfecção das células conforme demonstrado através da técnica de imunocitoquímica.

Numa análise global, os resultados aqui obtidos sugerem que a preparação das microesferas de quitosana pela técnica de *spray drying* seguida por reticulação química ou física pode ser um caminho promissor para produzir microesferas com morfologia, distribuição de tamanhos adequados e manipular propriedades superficiais com interesse na utilização destas para o *design* de sistemas de liberação controlada de proteínas, peptídeos, fármacos, etc.

## 7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Determinar a capacidade de mucoadesividade através de técnicas físico-químicas e *in vivo* das diferentes formulações produzidas para avaliar a potencialidade destas partículas como um sistema para administração nasal de fármacos e vacinas.

Na reticulação física com HNa a carga superficial foi reduzida a valores baixos o que provavelmente faria com que ocorresse a inversão de cargas de positiva para negativa após a adsorção do pDNA na superfície das partículas, sugere-se então estudar diferentes proporções de HNa/quitosana na tentativa de disponibilizar uma densidade de cargas positiva maior na superfície das microesferas.

A quantificação do pDNA que foi adsorvido na superfície das microesferas ficou dificultada, pois o processo de desorção a partir das solubilização das microesferas de quitosana com solução ácida provavelmente degradaria o pDNA, sugere-se então utilizar enzimas tais como quitosanases na tentativa de disponibilizar o pDNA para quantificação e avaliação de sua integridade através de eletroforese.

Diante dos resultados obtidos através da avaliação *in vitro* da transfecção do DNA plasmidial em cultura de células, sugere-se avaliação *in vivo* em diferentes vias de administração tais como nasal e intramuscular.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALPAR, H.O., OZSOY, Y., BOWEN, J., EYLES, J.E., CONWAY, B.R., WILLIAMSON, E.D; Genetic immunisation via mucosal and parenteral routes using microsphere carriers, **Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials**, Vol. 23, p. 861-862, 1996
- AMASS, W., AMASS, A., TIGHE, B.; A review of biodegradable polymers: uses, current development in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of polymers and recent advances in biodegradation studies, **Polymer Internacional**, 47, p. 89-144, 1998.
- ARAL, C., ÖZBAS-TURAN, S., KABASAKAL, L., KEYER-UYSAL, M., AKBUGA, J; Studies of effective factors of plasmid DNA-loaded I. Plasmid size, chitosan concentration and plasmid addition techniques, **S.T.P. Pharma Sciences**, Vol. 10, n. 1, p. 83-88, 2000.
- ASADA, M., TAKAJASHI, H., OKAMOTO, H., TANINO, H., DANJO, K; Theophylline particle desing using chitosan by the spray drying, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol 270, n. 1-2, p. 167-174, 2004.
- BAKI, E., ODABASI, M; Chitosan microspheres and sponges: preparation and characterization, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 76, p. 1637-1643, 2000.
- BALLANTYNE, B., JORDAN, S.L; Toxicological, medical and industrial aspects of glutaraldehyde with particular reference to its biocidal use in cold sterelization procedures, **Journal of Applied Toxicology**, Vol. 21, p. 131-151, 2001.

- BARBAULT-FOUCHER, S., GREF, R., RUSSO, P., GUECHOT, J., BOCHOT, A; Design of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery, **Journal of Controlled Release**, Vol. 83, p. 365-375, 2002.
- BARTKOWIAK, A; Optimal conditions of transplantable binary polyelectrolyte microcapsules, **Annals of the New York Academy of Sciences**, Vol. 944, p. 120-134, 2001.
- BENOIT, J.P., MARCHAIS, H., ROLLAND, H., VELDE, V.V; Biodegradable microspheres: Advances in production technology, p. 35-72 In: **Microencapsulation – Methods and Industrial Applications**, Nova Iorque: Marcel Dekker, 1996.
- BERGER, J., REIST, M., MAYER, J.M., FELT, O., GURNY, R; Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Vol. 57, p. 35-52, 2004 a.
- BERGER, J., REIST, M., MAYER, J.M., FELT, O., PEPPAS, N.A., GURNY, R; Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Vol. 57, p. 19-34, 2004 b.
- BERTHOLD, A., CREMER, K., KREUTER, J.; Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs, **Journal of Controlled Release**, Vol 39, p. 17-25, 1996.
- BLANCO, M.D., GOMEZ, C., OLMO, R., MUNIZ, E., TEIJON, J.M; Chitosan microspheres in PLG films as devices for cytarabine release, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 202, p. 29-39, 2000.
- BOGATAJ, M., MRHAR, A., GRARBNAR, I., RAJTMAN, Z., BUKOVEC, P., SRCIC, S., URLEB, U; The influence of magnesium stearate on the characteristics of mucoadhesive microspheres, **Journal of Microencapsulation**, Vol. 17, p. 499-508, 2000.
- BROADHEAD, J., ROUAN, S.K.E., RHODES, C.T. The spray-drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Vol. 18, p. 1169 – 1206, 1992.

- BUDAVARI, S., O'NEIL, M.J., SMITH, A., HECKELMAN, P.E., KINNEARY, J; **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**, Merck&Co., Inc., 1996.
- BULGARELLI, E., FORNI, F., BERNABEI, M.T; Casein/gelatin beads: I. Cross-linker solution composition effect on cross-linking degree, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 190, p. 175-182, 1999.
- BURGESS, D.J., HICKEY, A.J; Microsphere Technology and Applications. In: SWARBRRICK, J., BOYLAN, J.C; **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, Nova Iorque: Marcel Dekker, Vol. 10, p. 1-29, 1994.
- CERCHIARA, T., LUPPI, B., BIGUCCI, F., ZECCHI, V; Chitosan salts as nasal sustained delivery systems for peptidic drugs, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Vol. 55, n. 12, p. 1623-1627, 2003 a.
- CERCHIARA, T., LUPPI, B., BIGUCCI, F., ZECCHI, V; Effect of chitosan on progesterone release from hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexes, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 258, n. 1-2, p. 209-215, 2003 b.
- CESTARI, A.R., AIROLDI, C; Diamine immobilization on silica gel through sol-gel process and the increase in organic chain by using glutaraldehyde followed by ethelenediamine, **Langmuir**, vol. 13, p. 2681-2686, 1997.
- CHANDY, T., SHARMA, C.P.; Chitosan – as a biomaterial, **Biomaterials, artificial cells, and artificial organs**, Vol. 18, p. 1-24, 1990.
- CHANG, S.S; Effect of curing history on ultimate glass-transition temperature and network structure of cross-linking polymers, **Polymer**, Vol. 33, n. 22, p. 4768-4778, 1992.
- CHEN, S., WANG, Y; Study on  $\beta$ -cyclodextrin grafting with chitosan and slow release of its inclusion complex with radioactive iodine, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 82, p. 2414-2421, 2001.
- CHITHAMBARA, B., THANOO, M., SUNNY, M.C., JAYAKRISHNAN, A; Cross-linked chitosan microspheres: preparation and evaluation as a matrix for the controlled release of pharmaceuticals, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Vol 44, p. 283-286, 1992.

- CHU, C.H., KUMAGAI, H., SAKIYAMA, T., IKEDA, S., NAKAMURA, K; Development of a model for analyzing the swelling rate of ionic gels on the basis of the diffusion of mobile ions – application to the pH-sensitive swelling of a polyelectrolyte complex gel prepared from xanthan and chitosan, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Vol. 60, p. 1627-1632, 1996.
- CONTI, B., MODENA, T., GENTA, I., PERUGINI, P., PAVANETTO, F; A proposed new method for the crosslinking of chitosan microspheres, **Drug Delivery**, Vol. 5, p. 87-93, 1998.
- COSTA, P., LOBO, S; Formas farmacêuticas de libertação modificada, **Revista Portuguesa de Farmácia**, Vol. XLIX, n. 4, p. 181-190, 1999.
- CRESCENZI, V., DENTINI, M., DE NOOY, A.E.J, FRANCESCANGELI, A., MASCI, G; Novel synthetic routes to hydrogels, **Polymers preparation**, Vol. 41, p. 718-719, 2000.
- DAILEY, L.A., SCHMEHL, T., GESSLER, T., WITTMAR, M., GRIMMINGER, F., SEEGER, W., THOMAS, K; Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features, **Journal of Controlled Release**, Vol. 86, p. 131-144, 2003.
- DAL POZZO, A., VANINI, L., FAGNONI, M., GUERRINI, M., DE BENEDITIS, A., MUZZARELLI, R; Preparation and characterization of poly(ethyleneglycol)-crosslinked reacylated chitosans, **Carbohydrate polymers**, Vol 42, p. 201-206, 2000.
- DENKBAS, E.B., ODABASI, M; Chitosan microspheres and sponges: preparation and characterization, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 76, p. 1637-1643, 2000.
- DENUZIERE, A., FERRIER, D., DOMARD, A; Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: Physico-chemical aspects, **Carbohydrate Polymers**, Vol. 29, p. 317-323, 1996.
- DINI, E., ALEXANDRIDOU, S., KIPARISSIDES, C; Synthesis and characterization of crosslinked microparticles for drug delivery, **Chimia**, Vol. 55, n. 3, p. 239-241, 2001.

- DINI, E., ALEXANDRIDOU, S., KIPARISSIDES, C; Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications, **Journal of Microencapsulation**, Vol. 20, n. 3, p. 375-385, 2003.
- DODANE, V., VILIVALAM, V.D; Pharmaceutical applications of chitosan, **Pharmaceutical Science and Technology Today**, Vol. 1, n. 6, p. 246-253, 1998.
- DUMITRIU, S., CHORNET, E.; Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complex, **Advanced Drug Delivery Reviews**, Vol. 31, p. 223-246, 1998.
- EDMAN, P., BJÖRK, E., RYDÉN, L. Microspheres as a nasal delivery sytem for peptide drugs. **Journal of Controlled Release**, Vol. 21, p. 165 – 172, 1992.
- FERNANDES-URRUSUNO, R., CALVO, P., REMUNAN-LOPEZ, C., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J; Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles, **Pharmaceutical Research**, Vol. 16, p. 1576-1581, 1999.
- FILIPOVIC-GRIC, J., PERISSUTTI, B., MONEGHINI, M., VOINOVICH, D., MARTINAC, A., JALSENJAK, I; Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterization, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Vol. 55, p. 921-931, 2003.
- FILIPOVIC-GRIC, J., VOINOVICH, D., MONEGHINI, M., BECIREVIC-LACAN, M., MAGARATO, L., JALSENJAK, I; Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vol. 9, n. 4, p. 373-379, 2000.
- FLORENCE, A. & ATTWOOD, D; **Princípios físico-químicos em farmácia**, São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 576-577, 2003.
- FUKUDA, H., KIKUCHI, Y; In vitro clot formation on the polyelectrolyte complexes of sodium dextran surface with chitosan, **Journal of Biomedical Material Research**, Vol. 12, p. 531-539, 1974.
- FUKUDA, L.; Polyelectrolyte complexes of chitosan carboxymethyl cellulose. **Bulletin of Chemical Society of Japan**, Vol. 53, p. 837-840, 1980.
- GALLO, J.M., HASSAN, E.E; Receptor-mediated magnetic carriers: basis for targeting, **Pharmaceutical Research**, Vol. 5, p. 300-304, 1988.



- GANZA-GONZALEZ, A., ANGUIANO-INGEA, S., OTERO-ESPINAR, F.J., BLANCO MENDEZ, J.; Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide, *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, Vol. 48, p. 149-155, 1999.
- GASEROD, O., SANNES, A., SKJAK-BRAEK, G; Microcapsules of alginate-chitosan – II. A study of capsule stability and permeability, **Biomaterials**, Vol 20, n. 8, p. 773-783, 1999.
- GASEROD, O., SMIDSROD, O., SKJAK-BRAEK, G; Microcapsules of alginate-chitosan – I. A quantitative study of interaction between alginate and chitosan, **Biomaterials**, Vol. 19, n. 20, p. 1815-1825, 1998.
- GENTA, I., CONTI, B., PERUGINI, P., PAVANETTO, F., SPADARO, A., PUGLISI, G; Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Vol. 49, p. 737-742, 1997.
- GENTA, I., COSTANTINI, M., ASTI, A., CONTI, B., MONTANARI, L; Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres, **Carbohydrate Polymers**, Vol. 36, p. 81-88, 1998.
- GERRARD, J.A., BROWN, P.K., FAYLE, S.E; Maillard crosslinking of food proteins I: the reaction of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde with ribonuclease, **Food Chemistry**, Vol. 79, p. 343-349, 2002.
- GIUNCHEDI, P., GENTA, I., CONTI, B., MUZZARELLI, R.A., CONTE, U; Preparation and characterization of ampicilin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres, **Biomaterials**, Vol 19, p. 157-161, 1998.
- GIUNCHEDI, P., JULIANO, C., GAVINI, E., COSSU, M., SORRENTI, M.; Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Vol. 53, p. 233-239, 2002
- GÖRÖG, P., SZPORNY, L; Effect of metabolic poisons on anaphylatic shock, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Vol. 17, p. 814-816, 1965.

- GUAN, Y.L., SHAO, L., YAO, K.D; A study on correlation between water state and swelling kinetics of chitosan-based hydrogels, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 61, p. 2325-2335, 1996.
- HAUSBERGER, A.G., DELUCA, P.P; Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymer and microspheres, **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, Vol. 13, n. 6, p. 747-760, 1995.
- HE, P., DAVIS, S.S., ILLUM, L; Chitosan microspheres prepared by spray drying, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 187, p. 53-65, 1999.
- HEJAZI, R., AMIJI, M.; Stomach-specific anti-H. pylori therapy I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 235, p. 87-94, 2002.
- HSIEN, T-Y., RORRER, G.L., Effects of acylation and crosslinking on the material properties and cadmium ion adsorption capacity of porous beads, **Separation Science and Technology**, vol. 30, p. 2455-2475, 1995.
- HUANG Y.C., YEH, M.K., CHENG, S.N., CHIANG, C.H; The characteristics of betamethasone-loaded chitosan microparticles by spray-drying method, **Journal of Microencapsulation**, Vol. 20, p. 247-260, 2003 a.
- HUANG, H., TIAN, H., LI, X., ZHAO, G; Hypoglycemic effect of chitosan-microencapsulated insulin on the blood glucose level of streptozotocin-diabetic Wistar rats, **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**, Vol. 18, p. 425-427, 2001.
- HUANG, Y., DONOVAN, M.D; Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption, **Advanced Drug Delivery Reviews**, Vol. 29, n. 1-2, p. 147-155, 1998.
- HUANG, Y.C., CHIANG, C.H., YEH, M.K. Optimizing formulation factors in preparing chitosan microparticles by spray-drying method. **Journal of Microencapsulation**, Vol. 20. n. 2, p. 247 – 260, 2003 b.
- ILLUM ,L., DAVIS, S.S; Polymeric microspheres as drug carriers, **Biomaterials**, Vol. 9, p. 111-115, 1988.

- ILLUM L; Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions, **Journal of Controlled Release**, Vol. 87, p. 187-198, 2003.
- ILLUM, L., JABBAL-GILL, I., HINCHELIFFE, M., FISHER, A.N., DAVIS, S.S; Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines, **Advanced Drug Develirly Reviews**, Vol. 51, p. 81-96, 2001.
- ILLUM, L., WATTS, P., FISHER, A.N., HINCHCLIFFE, M., NORBURY, H., JABBAL-GILL, L., NANKERVIS, R., DAVIS, S.S; Intranasal delivery of morphine, **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Vol. 301, p. 391-400, 2002.
- JAIN R. et al, Controlled Drug Delivery by Biodegradable Poly(Éster) Devices: Different Preparative Approaches, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 24, n. 8, 703-727, 1998.
- JAMEELA, S.R., JAYAKRISHNAN, A; Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle, **Biomaterials**, Vol 16, p. 769-775, 1995.
- JAMEELA, S.R., JAYAKRISHNAN, A; Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle, **Biomaterials**, Vol. 16, p. 769-775, 1995.
- JAMEELA, S.R., KUMARY, T.V., LAL, A.V., JAYAKRISHANAN, A; Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system, **Journal of Controlled Release**, Vol. 52, p. 17-24, 1998.
- JAMEELA, S.R., LATHA, P.G., SUBRAMONIAM, A., JAYAKRISHNAN, A.; Antitumor activity of mitoxantrone-loaded chitosan microspheres against Ehrlich ascites carcinoma, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Vol. 48, p.685-688, 1996.
- KAS, H.S; Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems, **Journal of Microencapsulation**, Vol. 14, n. 6, p. 689-711, 1997.

- KIM, S.J., LEE, K.J., KIM, S.I; Swelling behavior of polyelectrolyte complex hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 93, p. 1097-1101, 2004 a.
- KIM, S.J., SHIN, S.R., LEE, K.B., PARK, Y.D., KIM, S.I; Synthesis and characteristics of polyelectrolyte complexes composed of chitosan and hyaluronic acid, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 91, p. 2908-2913, 2004 b.
- KIM, S.J., SHIN, S.R., LEE, S.M., KIM, I.Y., KIM, S.I; Thermal characteristics of polyelectrolyte complexes composed of chitosan and hyaluronic acid, **Journal of Macromolecular Science**, Vol. A40, n.8, p. 807-815, 2003.
- KO, J.A., PARK, H.J., HWANG, S.J., PARK, J.B., LEE, J.S.; Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 249, p. 165-174, 2002.
- KOCHISCH, S., REES, G.D., YOUNG, S.A., TSIBOUKLIS, J., SMART, J.D; Polymeric microspheres for drug delivery to the oral cavity: an in vitro evaluation for mucoadhesive potential, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vol. 92, p. 1614-1623, 2003.
- KOYANO, T., KOSHIZAKI, N., UMEHARA, H., NAGURA, M., MINOURA, N; Surface states of PVA/chitosan blended hydrogels, **Polymer**, Vol. 41, p. 4461-4465, 2000.
- KUMAR, M.N.V.R; Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices, **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Vol. 3, n. 2, p.234-258, 2000.
- KUMBAR, S.G., KULKARNI, A.R., AMINABHAVI, T.M; Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent, **Journal of Microencapsulation**, Vol 19, n.2, p. 173-180, 2002.
- LANGER, R., PEPPAS, N. A; Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology, **AIChE Journal**, Vol. 49, n. 12, 2003.
- LANGER, R; Drug delivery and targeting, **Nature**, Vol. 392, p. 5-10, 1998.
- LAPCIK JR, L., LAPCIK, L., DE SMEDT, S., DEMEESTER, J., CHABRECEK, P; Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications, **Chemical Reviews**, Vol. 98, n. 8, 1998.

- LEARNERTS, V., GURNY, R. Semisolid dosage forms as buccal bioadhesives, In: **Bioadhesive drug delivery systems**, E.U.A.: Flórida, CRC Press, p. 153-167, 1990.
- LEE, B.J., CHOE, J.S., KIM, C.K; Preparation and characterization of melatonin-loaded stearyl alcohol microspheres, **Journal of Microencapsulation**, Vol. 15, p. 775-787, 1998.
- LEE, K.Y., PARK, W.H., HA, W.S; Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 63, p. 425-432, 1997.
- LEE, S.B., LEE, Y.M., SONG, K.W., PARK, M.H; Preparation and properties of polyelectrolyte complex sponges composed of hyaluronic acid and chitosan and their biological behaviors, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 90, p. 925-932, 2003.
- LEONG, K.W., MAO, H.Q., TRUONG-LE, V.L., ROY, S.M., WALSH, J.T., DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles, **Journal of Controlled Release**, 53, p. 183-193, 1998.
- LEUNG, H.W; Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Vol. 49, p. 26-39, 2001.
- LIM, L.Y., WAN, L.S; Effect of magnesium stearate on chitosan microspheres prepared by an emulsification-coacervation technique, **Journal of Microencapsulation**, Vol. 15, p. 319-333, 1998.
- LIM, S.T., MARTIN, G.P., BERRY, D.J., BROWN, M.B; Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan, **Journal of Controlled Release**, Vol., 66, p. 281-292, 2000.
- LIMA, K.M., SILVA, C.L., RODRIGUES JUNIOR, J.M; Microesferas biodegradáveis: uma alternativa para administração de vacinas de DNA, **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, Vol. 12, p. 10-13, 2000.
- LIMA, K; Avaliação imunológica de diferentes vias e métodos de administração de vacinas de DNA contra a tuberculose experimental, **Tese de Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

- LONG, D.D., VANLUYEN, D; Chitosan-carboxymethylcellulose hydrogels as supports for cell immobilization, **Journal of Macromolecular Science – Pure and Applied Chemistry**, Vol. A33, p. 1875-1884, 1996.
- LORENZO-LAMOSA, M.L., REMUNAN-LOPEZ, C., VILA-JATO, J.L., ALONSO, M.J; Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery, **Journal of Controlled Release**, Vol. 52, p. 109-152, 1998.
- LOWRIE, D.B., TASCAN, R.E., BONATO, V.L., LIMA, V.M., FACCIOLI, L.H., STAVROPOLOUS, E., COLSTON, M.J., HEWINSON, R.G., MOELLING, K., SILVA, C.L; Therapy tuberculosis in mice by DNA vaccination, **Nature**, Vol.400, p. 269-271, 1999.
- MACLAUGHLIN, F.C., MUMPER, R.J., WANG, J., TAGLIAFERRI, J.M., GILL, I., HINCHCLIFFE, M., ROLLAND, A.P; Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery, **Journal of Controlled Release**, Vol. 56, p. 259-272, 1998.
- MARTINS, A.O., SILVA, E.L., CARASEK, E., LARANJEIRA, M.C.M., FÁVERE, V.T; Sulphoxine immobilized onto chitosan microspheres by spray-drying: application for metal ions preconcentration by flow injection analysis, **Talanta**, Vol. 63, p. 397-403, 2004.
- MASHIMOTO, M., SAEGUSA, H., CHIBA, S., KITAGAWA, H., MYOSHI, T; Patente Japonesa nº 63.123.392, 1988.
- MEYER, K. e PALMER, J.W; The polysaccharide of the vitreous humor, **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 107, p. 629-634, 1934.
- MI, F.L. (a), SHYU, S.S., KUAN, C.Y., LEE, S.T., LU, K.T., JANG, S.F; Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug: I. Effect of phosphorous polyelectrolyte complex and enzymatic hydrolysis do polymer, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 74, p. 1868-1879, 1999 a.
- MI, F.L. (b), SHYU, S.S., WONG, T.B., JANG, S.F., LEE, S.T., LU, K.T; Chitosan polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug: II. Effect of pH-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex

- using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 74, p. 1093-1107, 1999 b.
- MI, F.L., SHYU, S.S., CHEN, C.T., SCHOUNG, J.Y; Porous chitosan microspheres for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release, **Biomaterials**, Vol. 20, p. 1603-1612, 1999 c.
- MI, F.L., TAN, Y.C., LIANG, H.F., SUNG, H.W; In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan based implant, **Biomaterials**, Vol. 23, p. 181-191, 2002.
- MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R; Highly deacetylated chitosan and its properties, **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 28, p.1909-1917, 1983.
- MONTEIRO, O.A.C., AIROLDI, C; Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 26, p. 119-128, 1999.
- MONTSERRAT, S; Effect of crosslinking density on  $\Delta C_p$  ( $T_g$ ) in an epoxy network, **Polymer**, Vol. 36, p. 435-436, 1995.
- MÜLLER, R.H., RÜHL, D., LÜCK, M., PAULKE, B.R; Influence of fluorescent labelling of polystyrene particles on phagocytic uptake, surface hydrophobicity, and plasma protein adsorption, **Pharmaceutical Research**, Vol. 14, n. 1, 1997.
- MUMPER, R.J., WANG, J., CLASPELL, J.M., ROLLAND, A.P; Novel polymeric condensing carriers for gene delivery, **Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials**, Vol. 22, p. 178-179, 1995.
- MUNJERI, O., COLLETT, J.H., FELL, J.T; Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release, **Journal of Controlled Release**, Vol. 46, p. 278-283, 1997.
- MUSALE, D., KUMAR, A; Solvent and pH resistance of surface crosslinked chitosan/poly(acrylonitrile) composite nanofiltration membranes, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 77, n. 8, p. 1782-1793, 2000.

- NINFATEV, N.E., CHERNETSKII, V.N; **Mendeleev Chemistry Journal** Vol. 41, p. 96-100, 1998.
- NUNTHANID, J., LAUGTNA-ANAN, M., SRIAMORNSAK, P., LIMMATVAPIRAT, S., PUTTIPIPATKHACHORN, S., LIM, L.Y., KHOR, E; Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets, **Journal of Controlled Release**, Vol., 99, p. 15-26, 2004.
- OLIVEIRA, B.F., SANTANA, M.H.A., RÉ, M.I; Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation and characterization, **Proceedings of 14<sup>th</sup> International Drying Symposium**, Vol. 1, p. 1166-1173, 2004.
- PAVANETTO, F., PERUGINI, P., CONTI, B., MODENA, T., GENTA, I; Evaluation of process parameters involved in chitosan microsphere preparation by the o/w/o multiple emulsion method, **Journal of Microencapsulation**, Vol 13, n. 6, p. 679-688, 1996.
- PEPPAS, N.A; **Hydrogels in Medicine and Pharmacy: Fundamentals**, Vol. 1, CRC Press, 1986.
- PERESWETOFF-MORATH, L; Microspheres as nasal drug delivery systems, **Advanced Drug Delivery Reviews**, Vol. 29, n. 1-2, p. 185-194, 1998.
- PETER, M.G.; Applications and environmental aspects of chitin and chitosan, **Journal of Macromolecular Sciences**, Vol. 32, p. 629-640, 1995.
- PORTE, H., COUARRAZE, G; Microencapsulation processes for the manufacture of systems providing modified release of the active constituent. In: CHULIA, D., DELAIL, M., POURCELOT, Y.; **Powder technology and pharmaceutical processes**, Amsterdam: Elsevier Science, p. 513-543, 1994.
- PREIS, I., LANGER, R.S; A single-step immunization by sustained antigen release, **Journal of Immunology Methods**, Vol. 28, n. 1-2, p. 193-197, 1979.
- PRITCHARD, K., LANSLEY, A.B., MARTIN, G.P., HELLIWELL, M., MARRIOTT, C., BENEDETTI, L.M; Evaluation of the bioadhesive properties of hyaluronan derivatives: detachment weight and mucociliary transport rate studies, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 129, p. 137-145, 1996.



- RAPPORT, M.M.M., WEISMANN, B., LINKER, A., MEYER, K; Isolation of a crystalline disaccharide, hyalobiuronic acid, from hyaluronic acid, **Nature**, vol. 169, n. 4284, p. 996-970, 1951.
- RÉ, M. I.; Microencapsulação: em busca de produtos ‘inteligentes’, **Ciência Hoje**, 27, n. 162, p. 24-29, 2000.
- RÉ, M.I; Formulation of Multiparticulate Delivery Systems by Spray Drying In: **Cahier de l'AFSIA**, Villeurbanne : AFSIA- ESCPE, v.20, p. 147-158. , 2002.
- RÉ, M.I; Microencapsulation by spray drying, **Drying Technology**, Vol. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.
- REED, C.E., LI, X., REED, W.F; The effects of pH on hyaluronateas observed by light scattering, **Biopolymers**, vol. 28, n. 11, p. 1981-2000, 1989.
- ROBERT, C.C.R., BURI, P.A; Effect of degree of crosslinking on water transport in polymer microparticles, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 30, p. 301-306, 1985.
- ROBERTS, G.A.F., TAYLOR, K.E; The formationof gels by reactionof chitosan with glutaraldehyde, **Makromolecular Chemistry**, vol. 190, p. 951-960, 1996.
- ROBERTS, G.A.F; **Chitin Chemistry**, Mcmillan, Londres, 1992.
- ROSSLER, B., KREUTER, J., SCHERER, D; Collagen microparticles: preparation and properties, **Journal of Microencapsulation**, Vol. 12, n. 1, p.49-57, 1995.
- ROY, K., MAO, H.Q., HUANG, S.K., LEONG, K.W; Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy, **Nature Medical**, Vol. 5, p. 387-391, 1999.
- RUBERTI, M., LIMA, K.M., SANTOS, S.A., BRANDÃO, I.T., SOARES, E.G., SILVA, C.L., RODRIGUES JR, J.M; Prime-boost vaccination based on DNA and protein-loaded microspheres for tuberculosis prevention, **Journal of Drug Targeting**, Vol. 12, n. 4, p.195-203, 2004.
- SAKIYAMA, T., TAKATA, H., KIKUCHI, M., NAKANISHI, K; Polyelectrolyte complex gel with high pH-sensitivity prepared from dextran sulfate and chitosan, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 73, p. 2227-2233, 1999.

- SAKIYAMA, T., TAKATA, H., TOGA, T., NAKANISHI, K; pH-sensitive shrinking of a dextran sulfate/chitosan complex gel and its promotion effect on the release of polymeric substances, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 81, p. 667-674, 2001.
- SANKAR, C., RANI, M., SRIVASTAVA, A.K., MISHRA, B; Chitosan based pentazocine microspheres for intranasal systemic delivery: development and biopharmaceutical evaluation, **Pharmazie**, Vol. 56, p. 223-226, 2001.
- SANTANA, M. H. A., OGRODOSKI, C. S., HOKKA, C. O; Produção de Ácido Hialurônico por Streptococcus: Estudo da Fermentação e Caracterização do Produto In: Simpósio Nacional das Fermentações, **Anais do Simposio Nacional das Fermentações**, 2003.
- SCHIPPER, N.G., VERHOEF, J.C., MERKUS, F.W; The nasal mucociliary clearance: relevance to nasal drug delivery, **Pharmaceutical Research**, Vol. 8, n. 7, p. 807-814, 1991.
- SHI, X.Y., TAN, T.W; Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of vitamin D2, **Biomaterials**, Vol. 23, n. 23, p. 4469-4473, 2002.
- SHIRAISHI, S., IMAI, T., OTAGIRI, M; Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation, **Journal of Controlled Release**, Vol. 25, p. 217-225, 1993.
- SILVA., C.L; Tuberculose: Uso da biotecnologia para o desenvolvimento de uma vacina de DNA que previne e cura a doença, **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Vol. 2, n. 10, 1999.
- SINHA, V.R., SINGLA, A.K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, R; Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 274, p. 1-33, 2004.
- SUNG H.W., HUANG, R.N., HUANG, L.L., TSAI, C.C; In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation, **Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition**, Vol. 10, p. 63-78, 1999.

- TAKAHASHI, T., TAKAYAMA, K., MACHIDA, Y., NAGAI, T; Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 61, p. 35-41, 1990.
- TAKKA, S., ACARTÜRK, F; Calcium alginate microparticles for oral administration: I. Effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency, **Journal of Microencapsulation**, Vol. 16, p. 275-290, 1999.
- TENGAMNUAY, S.P., MITRA, A.K; Bile salt-fatty acid mixed micelles as nasal absorption promoters of peptides. II. In vivo nasal absorption of insulin in rats and effects of mixed micelles on the morphological integrity of the nasal mucosa, **Pharmaceutical Research**, vol. 7, n. 4, p.370-375, 1997.
- THACHARODI, D., RAO, K.P; Propranolol hydrochloride release behaviour of crosslinked chitosan membranes, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Vol. 58, p. 177181, 1993.
- ULUBAYRAM, K., EROGLU, I., HASIRCI, N.; Gelatin microspheres and sponges for delivery of macromolecules, **Journal of Biomaterials Applications**, Vol. 16, n. 3, p.227-241, 2002.
- VANDELLI, M.A., RIVASI, F., GUERRA, P., FORNI, F., ARLETTI, R; Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 215, n. 1-2, p. 175-184, 2001.
- VENTER, J.C; A genética e o futuro da indústria farmacêutica, **Pharmaceutical Technology - Ed. Brasileira**, Vol. 5, n. 5, p.50-56, 2001.
- WANG, M.Z., FANG, Y., HU, D.D; Preparation and properties of chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) full-IPN hydrogels, **Reactive and Functional Polymers**, Vol. 48, p. 215-221, 2001.
- WENDEL, S.C. & ÇELIK, M; An overview of spray drying applications, **Pharmaceutical Technology**, Vol. 21, n. 10, p. 124-156, 1997.
- WILLIAMS III, R.O., BARRON, M.K., ALONSO, M.J; Investigation of a pMDI system containing chitosan microspheres and P134a, **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 174, 209-222, 1998.

- YAN, X.L., KHOR, E., LIM, L.Y; Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weight, **Journal of Biomedical Material Research**, Vol. 58, p. 358-365, 2001.
- YAO, K.D., TU, H., CHENG, F., ZHANG, J.W., LIU, J; pH-sensitivity of the swelling of a chitosan-pectin polyelectrolyte complex, **Angew Makromolecular Chemistry**, Vol. 245, p. 63-72, 1997.
- YIN, Y.J., ZHAO, F., SONG, X.F., YAO, K.D., LU, W.W., LEONG, J.C; Preparation and characterization of hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 77, p. 2229-2938, 2000.
- ZHANG, Q.Q., LIU, L.R., REN, L., WANG, F.J; Preparation and characterization of collagen-chitosan composites, **Journal of Applied Polymer Science**, Vol. 64, p. 2127-2130, 1997.

## ANEXOS

## PUBLICAÇÃO ACEITA

OLIVEIRA, B.F; SANTANA, M.H; RÉ, M.I; Spray-dried Chitosan Microspheres Cross-linked with D,L-Glyceraldehyde as a Potential Drug Delivery System: Preparation and Characterization, **Drying 2004 – Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Drying Symposium**, São Paulo, Brazil, Vol. B, pp. 1166-1173, 2004.