

Ana Moniz Côrte-Real Granja Bento

DESENVOLVIMENTO DE GÉIS INJETÁVEIS COM LIBERTAÇÃO CONTROLADA E LOCALIZADA DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química,
Apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Abril 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Moniz Côrte-Real Granja Bento

DESENVOLVIMENTO DE GÉIS INJETÁVEIS COM LIBERTAÇÃO CONTROLADA E LOCALIZADA DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, sob orientação da Professora Doutora Ana Maria A. Dias e do Professor Doutor Herminio C. Sousa, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Supervisores:

Professora Doutora Ana Dias
Professor Doutor Hermínio Sousa

Coimbra

2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Se eu vi mais longe que outros homens, foi porque estava aos ombros de gigantes”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho não teria sido possível sem o apoio, incentivo e a orientação de diversas pessoas que me acompanharam ao longo de todo o meu percurso académico.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, em especial à Doutora Ana Dias, por todo o apoio, dedicação e pela partilha de conhecimentos durante todo o trabalho, e ao Professor Doutor Hermínio Sousa, pelos conselhos, dedicação e por todas as ideias trocadas. Agradeço também à Doutora Mara Braga por todo o apoio e disponibilidade demonstrada durante este trabalho.

Queria agradecer à Professora Doutora Maria da Graça Rasteiro pela disponibilização de equipamentos essenciais à realização do presente trabalho.

À Dona Dulce Pancas e ao Senhor José Santos, pela sua constante disponibilidade e ajuda no laboratório.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pela ajuda durante o trabalho laboratorial, bem como por todo o companheirismo e conhecimentos partilhados.

A todos os meus amigos que contribuíram para muito daquilo que sou hoje, em especial à Ana Bandeira, Cátia Correia, João Costa, Mafalda Cardoso, Marta Coelho, Marta Moura, Ricardo Santos, Sérgio Miranda, Sónia Mendes, Stacy Morgado e Tiago Henriques, por todo o apoio e motivação durante o meu percurso académico, por toda a amizade e pelos momentos que passámos juntos que certamente ficarão para à vida, muito obrigado. Agradeço também à Ana Carvalho e à Patrícia Amado por todo o apoio e motivação que demonstraram também nesta fase final.

Por último, à minha família por todo o apoio, incentivo, esforço, compreensão e carinho durante todo este percurso, em especial aos meus pais, aos meus irmãos António e Joana e à avó Goia, por terem sempre acreditado em mim. Sem vocês não teria sido possível. Obrigada do fundo do coração.

A todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho e que não foram aqui mencionados, obrigado.

RESUMO

Este trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento de géis injetáveis para libertação controlada e localizada de fármacos em feridas. Desta forma, prepararam-se nanopartículas para encapsular o fármaco em estudo que foram posteriormente incorporadas num gel, que pode ser injetado no local pretendido. Estes sistemas de libertação controlada de fármacos (SLCs) foram produzidos a partir de polímeros de base natural, biodegradáveis e biocompatíveis, como o quitosano e o *k*-carragenano e usando um fármaco também de origem natural, o naringin.

O encapsulamento do naringin, um flavonóide com diversas propriedades terapêuticas, entre elas anti-inflamatórias e anti ulcerosa, foi efetuado em nanopartículas de quitosano preparadas através do método de gelificação iónica. As nanopartículas foram formadas por reticulação com tripolifosfato de sódio (TPP), usando um método já reportado na literatura, e pela primeira vez com o citrato de dihidrogenado de colina (CD), um líquido iónico que revelou ser um bom reticulante alternativo ao TPP. A distribuição de tamanhos das nanopartículas, assim como a estabilidade ao longo do tempo, foi estudada com recurso à técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (Dynamic Light Scattering – DLS) que revelou tamanhos médios próximos de 180 nm para o caso das nanopartículas reticuladas com TPP e 330 nm para as nanopartículas reticuladas com CD, apresentando ambas uma boa estabilidade durante as 72 horas do estudo. A morfologia das nanopartículas foi ainda avaliada por Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM).

No decorrer do trabalho, foram estudados diferentes sistemas de libertação de naringin nomeadamente nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP ou com CD, géis de *k*-carragenano com e sem reticulante iónico (KCl) e sistemas combinados de nanopartículas de quitosano incorporadas nos géis de *k*-carragenano, por forma a concluir sobre a eficiência de cada sistema na libertação controlada do fármaco.

Os perfis de libertação foram estudados em solução fosfato salina a pH 7 e a 37 °C para todos os SLCs preparados. Os resultados obtidos mostram que os sistemas compostos apenas pelas nanopartículas apresentaram perfis de libertação do naringin mais rápidos, com 60 % do naringin libertado ao fim de 1 h e a quase totalidade ao fim de 4 h de monitorização. A libertação do naringin a partir dos géis de *k*-carragenano revelou ser mais controlada, embora o fármaco também se tenha libertado quase na sua totalidade ao fim de cerca de 6 h de monitorização. Finalmente, verificou-se que a libertação do naringin através dos géis de *k*-carragenano reticulados com KCl, com e sem nanopartículas incorporadas, é uma alternativa eficaz para

garantir uma liberação do fármaco mais controlada, uma vez que, com este sistema, apenas cerca de 30 % de naringin foi libertado ao fim de 1 h de monitorização. Estes dois sistemas (com e sem nanopartículas de quitosano) apresentaram perfis de liberação muito semelhantes, verificando-se a liberação de apenas cerca de metade da quantidade total de fármaco durante 10 dias de monitorização. Os perfis de liberação medidos foram correlacionados com um modelo matemático semi-empírico baseado na resolução simplificada da segunda lei de difusão de *Fick* (equação de *Peppas*). A partir do modelo foram calculados parâmetros cinéticos que facilitam a comparação entre os diferentes perfis de liberação medidos e permitem inferir sobre os mecanismos que controlam a liberação do fármaco a partir dos diferentes SLCs estudados.

ABSTRACT

This work has as main goal the development of injectable gels for the controlled release of drugs into wounds. For that purpose, nanoparticles were prepared to encapsulate the envisaged drug and those were subsequently incorporated into a gel that can be injected at the desired location. These drug delivery systems (DDS) were produced from natural-based, biodegradable and biocompatible polymers, such as chitosan and *k*-carrageenan and also using naringin as a natural-origin drug. Naringin, a flavonoid with various therapeutic properties, including anti-inflammatory and anti-ulcer, was encapsulated in chitosan nanoparticles prepared by the ionic gelation method. Nanoparticles were formed by cross-linking chitosan with sodium tripolyphosphate (TPP), using a method already reported in literature, and for the first time with choline dihydrogen citrate (CD), an ionic liquid that has proven to be a good crosslinker alternative to TPP.

In this work, different naringin delivery systems were studied including nanoparticles of chitosan crosslinked with TPP or CD; *k*-carrageenan gels with and without ionic crosslinking (KCl) and combined systems of chitosan nanoparticles incorporated in *k*-carrageenan gels, in order to conclude on the efficiency of each system in the controlled release of the drug. The release profiles of all DDS were studied in a phosphate buffered saline solution at pH 7 and 37 °C. The results showed that the systems composed only by nanoparticles presented faster naringin release profiles, with 60% of naringin released after the 1st hour and almost 100% within 4 h of monitoring. The release of naringin from *k*-carrageenan gels revealed to be more controlled although the drug has been also almost completely released within about 6 h of monitoring. Finally, it was found that the release of the naringin through *k*-carrageenan gels crosslinked with KCl, with and without incorporated nanoparticles, is an effective alternative to ensure a more controlled release of the drug, since only about 30% of naringin was released after 1 h of monitoring with this system. These two systems (with and without chitosan nanoparticles) showed very similar release profiles, being verified the release of only about half of the total amount of drug over 10 days of monitoring. The measured release profiles were correlated with a semi-empirical mathematical model based on simplified resolution of the second Fick's law of diffusion (Peppas equation). From this model, kinetic parameters were calculated to facilitate comparison between the different measured release profiles, and infer about the mechanisms which control the drug release from the different studied DDS.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
NOMENCLATURA E SÍMBOLOS	xix
ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO	1
OBJETIVOS	5
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos	7
1.2 SLC à base de nanopartículas para encapsulamento de fármacos	9
1.3 SLCs à base de géis para libertação de fármacos	11
1.4 SLCs à base de partículas e géis de quitosano.....	13
1.5 SLCs à base de géis de <i>k</i> -carragenano	17
1.6 Fármacos de base natural usados no tratamento de feridas de diabéticos	19
2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 Materiais/Reagentes.....	23
2.2 Procedimento Experimental.....	24
2.3 Modificação do quitosano.....	26
2.3.1 Caracterização do quitosano (RMN).....	27
2.4 Preparação de nanopartículas.....	28
2.4.1 Encapsulamento do fármaco nas nanopartículas	29
2.4.2 Métodos de caracterização das nanopartículas	30
2.5 Preparação de géis à base de <i>k</i> -carragenano carregado com naringin	32
2.6 Preparação de géis à base de <i>k</i> -carragenano e nanopartículas de quitosano carregadas com naringin.....	34

2.7	Estudos de libertação de naringin a partir de diferentes matrizes	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1	Análise morfológica dos diferentes sistemas preparados.....	37
3.2	Distribuição de tamanhos das nanopartículas ao longo do tempo.....	41
3.3	Estudos de libertação do naringin a partir de diferentes matrizes	45
4	CONCLUSÕES	57
5	PERSPETIVAS FUTURAS	61
	BIBLIOGRAFIA.....	63
	ANEXOS.....	67
	ANEXO I – Ensaio de otimização das nanopartículas	68
	ANEXO II – Ensaio de síntese dos géis à base de quitosano	69
	ANEXO III – Ensaio dos géis de quitosano reticulados com CD	70
	ANEXO IV – Ensaio de síntese dos géis à base de <i>k</i> -carragenano	71
	ANEXO V – Curva de calibração do naringin.....	72
	ANEXO VI – Ensaio de preparação das nanopartículas	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da quitina (Croisier e Jérôme, 2013).	14
Figura 2 - Estrutura química do quitosano (Croisier e Jérôme, 2013).	14
Figura 3 - Estrutura química do k-carragenano (Necas e Bartosikova, 2013).	17
Figura 4 - Esquema representativo da formação do gel devido à agregação de hélices após arrefecimento de uma solução quente de carragenano (adaptado de Gulrez <i>et al.</i> , 2011).	19
Figura 5 - Estrutura química do naringin (Sigma Aldrich).	20
Figura 6 – Etapas do procedimento experimental.	25
Figura 7 – Espectro de RMN do quitosano.	27
Figura 8 – Partículas reticuladas com TPP (a) e reticuladas com CD (b).	37
Figura 9 – Géis de <i>k</i> -carragenano 2.5% (w/v) incorporados com naringin (à esquerda) e incorporados com nanopartículas carregadas com naringin (à direita).	38
Figura 10 - NP/CS/TPP/NAR0.5: ampliadas 15000 vezes (a); ampliadas 20000 vezes (b); ampliadas 35000 vezes (c). CRR2.5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (d). NP/CS/CD/NAR0.5: ampliadas 15000 vezes (e); ampliadas 20000 vezes (f); ampliadas 35000 vezes (g). CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 (h).	39
Figura 11 - CRR2.5/NAR0.5 (a) e CRR2.5/KCl5/NAR0.5 (b) ampliados 15000 vezes.	40
Figura 12 - CRR2.5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (a) e CRR2.5/KCl5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (b) ampliados 15000 vezes e com um detalhe de 35000 vezes.	40
Figura 13 - CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 ampliado 20000 vezes (a) e CRR2.5/KCl5/NP/CS/CD/NAR0.5 (b) ampliado 15000 vezes e com um detalhe de 35000 vezes.	41
Figura 14 – <i>Z-average</i> (nm) das partículas de quitosano reticuladas com TPP (a) e reticuladas com CD (b) com incorporação de naringin (■) e sem incorporação de naringin (□).	42
Figura 15 - PDI das partículas de quitosano reticuladas com TPP (a) e reticuladas com CD com incorporação de naringin (■) e sem incorporação de naringin (□).	43
Figura 16 - Potencial zeta das partículas de quitosano reticuladas com TPP (a) e reticuladas com CD (b) com incorporação de naringin (■) e sem incorporação de naringin (□).	44
Figura 17 - Perfis de libertação NP/CS/TPP/NAR0.5 () e NP/CS/CD/NAR0.5 ().	45
Figura 18 - Perfis de libertação do CRR2.5/NAR0.5 (△) e CRR2.5/NAR1 (▲) em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b). ..	46

Figura 19 - Perfis de libertação do CRR2.5/KCl15/NAR1 (○), CRR2.5/KCl10/NAR1 (●) e CRR2.5/NAR1 (▲), em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).....	47
Figura 20 - Perfis de libertação do CRR2.5/KCl15/NAR0.5 (●) e CRR2.5/NAR0.5 (Δ), em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).....	48
Figura 21 - Perfis de libertação do CRR1.25/NP/CS/CD/NAR0.5 (□), CRR1.25/NP/CS/CD/NAR0.5 (■), CRR1.25/NP/CS/TPP/NAR0.5 (◊) e CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 (◆), em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).....	49
Figura 22 - Perfis de libertação do CRR2.5/KCl15/NP/CS/TPP/NAR0.5 (□) e CRR2.5/KCl15/NP/CS/CD/NAR0.5 (▲), e CRR2.5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (◆) e CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 (◇), em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).....	50
Figura 23 - Perfis de libertação do: NP/CS/(TPPa/CDb)/NAR0.5(□); CRR2.5/NAR0.5(Δ); CRR2.5/NP/CS/(TPPa/CDb)/NAR0.5(◆); CRR2.5/KCl15/NAR0.5 (X); CRR2.5/KCl15/NP/CS/(TPPa/CDb)/NAR0.5(●).....	51
Figura 24 - Esquema representativo das possíveis interações presentes nos géis: CRR2.5/KCl15/NAR0.5; CRR2.5/NP/CS/(TPP/CD)/NAR0.5; CRR2.5/KCl15/NP/CS/(TPP/CD)/NAR0.5.....	51
Figura 26 – Imagens relativas aos ensaios dos géis de quitosano reticulados com CD a 4 °C e a 37 °C.....	70
Figura 27 – Curva de calibração do naringin para os ensaios de libertação.....	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos de preparação de nanopartículas.....	16
Tabela 2 – Lista de reagentes utilizados.....	23
Tabela 3 -Parâmetros cinéticos para a $Mt/M_{\infty} < 60\%$	53
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos para a Mt/M_{∞} linear.....	54
Tabela 5 – Concentrações utilizadas nos ensaios de otimização das nanopartículas	68
Tabela 6 – Concentrações utilizadas nos ensaios de síntese dos géis à base de quitosano	69
Tabela 7 – Concentrações utilizadas nos ensaios de síntese dos géis à base de <i>k</i> -carragenano.	71
Tabela 8 – Concentrações finais utilizadas para a preparação das nanopartículas carregadas com naringin e respetiva estabilidade.....	73

NOMENCLATURA E SÍMBOLOS

- CB - *Choline Bitartrate* (Bitartarato de colina)
CD - *Choline dihydrogen citrate* (Citrato de dihidrogenado de colina)
CRR - Carragenano
CS - Quitosano
DDS - *Drug Delivery System*
DLS - *Dynamic Light Scattering* (Dispersão Dinâmica da Luz)
ECM - *Extra Cellular Matrix* (Matriz Extracelular)
ELS - *Electrophoretic Light Scattering* (Dispersão Eletroforética da Luz)
GD - Grau de Desacetilação
GP - *Glycerol Phosphate disodium* (Fosfato dissódico de glicerol)
LDV - *Laser Doppler Velocimetry*
PBS - *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato-salino)
pKa - Constante de dissociação ácida
RET - Reticulante
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
SEM - *Scanning Electron Microscopy* (Microscopia eletrônica de varrimento)
SLC - Sistema de Libertação Controlada
TICS - Temperatura Inferior Crítica de Solução
TPP - *Sodium tripolyphosphate* (tripolifosfato de sódio)
UV - Ultravioleta

ENQUADRAMENTO E MOTIVAÇÃO

Nos últimos anos, o interesse por parte da comunidade científica, no que se refere ao desenvolvimento de sistemas de libertação controlada (SLCs), tem vindo a crescer fortemente, dadas as numerosas vantagens que estes apresentam comparativamente com as formas de dosagem convencionais.

Os SLCs funcionam como veículos transportadores de fármacos, protegendo-os e garantindo uma libertação controlada diretamente no local de ação. As formas de dosagem comuns têm a desvantagem de serem, em parte, degradadas pelo organismo até chegarem ao local pretendido, reduzindo assim a quantidade de princípio ativo necessário para o efeito terapêutico desejado. Para além disso, a exposição do fármaco aos tecidos envolventes, desde a administração até ao local de ação, poderá causar nos pacientes efeitos secundários não desejados. Por outro lado, o tratamento convencional requer repetidas administrações de fármaco para garantir que a sua concentração se encontre dentro do intervalo correspondente ao nível terapêutico. Os SLCs permitem contornar estes problemas, possibilitando uma libertação controlada do fármaco, de forma a fornecer doses mais eficazes e seguras aos pacientes.

O desempenho de um SLC é dependente de um vasto conjunto de fatores, que estão relacionados com o local de ação do fármaco, as características do fármaco que se pretende libertar e o tipo de material polimérico onde se vai incorporar o fármaco. Há que destacar a importância dos materiais poliméricos, biocompatíveis e biodegradáveis, os quais aplicados *in vivo* não causam reações adversas significativas por parte do organismo. Os materiais poliméricos podem dividir-se em duas categorias principais, nomeadamente sintéticos e naturais, sendo que estes últimos têm ganho especial interesse na preparação de SLCs por apresentarem boas características de biocompatibilidade e interação celular. Para além disso, e devido às suas semelhanças com a matriz extracelular, os polímeros naturais podem mimetizar muitas das características e, portanto, favorecer a migração, o crescimento e a organização das células, durante a regeneração dos tecidos e cicatrização de feridas. Nos polímeros de base natural, há que destacar o quitosano por ser considerado um transportador polimérico interessante na medida em que possui propriedades importantes tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade, que o tornam adequado para uso biomédico e formulações farmacêuticas.

Um outro aspeto relevante, no que diz respeito à utilização de materiais poliméricos em SLCs, consiste na possibilidade em desenvolver sistemas particulados, nomeadamente

nanopartículas de dimensões adequadas para administração por via injetável. Estes sistemas transportadores têm como função proteger as moléculas encapsuladas de fatores externos, preservando assim a sua funcionalidade e possibilitando a entrega eficaz dos compostos ativos ao local de ação.

Para além das nanopartículas, existem outros SLCs utilizados como veículo para o transporte de substâncias ativas até ao local pretendido, como é o caso dos géis. Estes sistemas são usados para descrever estruturas de redes poliméricas reticuladas através de um mecanismo designado por gelificação, podendo classificar-se em fortes ou fracos. Neste tipo de SLCs é de referir o uso do carragenano, um polissacarídeo sulfatado, que apresenta relativa baixa toxicidade e boas propriedades para aplicações biomédicas.

A maior parte dos SLCs têm o problema da libertação das substâncias ativas ser demasiado rápida. Desta forma, neste trabalho, pretende-se incorporar num gel nanopartículas de quitosano carregadas com fármaco para o tratamento de feridas, criando assim uma dupla barreira, de forma a retardar a libertação de fármaco.

O presente trabalho encontra-se organizado em cinco capítulos principais cujo foco se resume da seguinte forma:

O **Capítulo 1**, *Introdução*, apresenta uma breve revisão bibliográfica sobre os principais aspetos relacionados com o presente trabalho. Inicialmente, é feito um enquadramento geral do tema, apresentando diversos conceitos subjacentes aos SLCs e, posteriormente é feita uma descrição sobre o desenvolvimento de nanopartículas e géis para o encapsulamento de fármacos, detalhando as principais características destes e os seus métodos de preparação frequentemente descritos na literatura. Serão focados, em particular, partículas, géis e combinações de ambos à base de quitosano e carragenano para libertação controlada de naringin.

No **Capítulo 2**, *Materiais e Métodos*, são apresentados e caracterizados os diversos materiais utilizados, bem como os métodos utilizados para a realização do trabalho laboratorial. O capítulo apresenta ainda as técnicas utilizadas para a caracterização dos sistemas preparados (nanopartículas, géis e nanopartículas incorporadas no géis) e os ensaios de libertação de naringin dos mesmos.

No **Capítulo 3**, *Resultados e Discussão*, são apresentados e discutidos os resultados obtidos relativos à caracterização das nanopartículas, realizada pelas técnicas de DLS e SEM e os perfis de libertação dos vários tipos de sistemas preparados. Neste capítulo, são apresentados ainda os modelos teóricos que descrevem as curvas de libertação e identificam os mecanismos que predominam em cada caso.

Por último, o **Capítulo 4**, *Conclusões*, resume as principais conclusões do trabalho e o **Capítulo 5**, *Perspetivas Futuras*, apresenta algumas sugestões para o desenvolvimento de trabalhos futuros relacionados com esta área.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver sistemas de libertação controlada (SLCs) à base de biopolímeros, do tipo polissacáridos, para libertação controlada e localizada de um composto bioativo de base natural para o tratamento de feridas em diabéticos. Os SLCs preparados incluem nanopartículas à base de quitosano, géis à base de carragenano e sistemas combinados de ambos visando um maior controlo do perfil de libertação do composto bioativo.

As nanopartículas de quitosano foram preparadas com base no método de gelificação iónica, descrito na literatura, usando o reticulante TPP. Para além deste, neste trabalho será proposto pela primeira vez o uso de um outro reticulante (CD) para formar as partículas. O tamanho e a morfologia das nanopartículas foi estudada por técnicas como a Dispersão Dinâmica da Luz (DLS) e Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM), respetivamente. A estabilidade das partículas ao longo do tempo e à temperatura ambiente foi também estudada por monitorização do tamanho (DLS) e potencial zeta a diferentes tempos durante cerca de 72 horas.

Em seguida, foi preparado o gel de carragenano por fusão do biopolímero com temperatura e posterior gelificação por arrefecimento. Foi também estudada a influência da reticulação iónica com solução salina de KCl no perfil de libertação do composto bioativo a partir do gel.

Com o objetivo de obter um perfil de libertação mais controlado, combinaram-se ainda os dois sistemas, partículas e géis. O sistema combinado foi testado para os dois tipos de nanopartículas (TPP e CD) e incorporados em géis de carragenano com e sem reticulante.

O composto bioativo em estudo é o naringin por ser um fenólico de base natural obtido a partir de espécies de frutas cítricas e com atividade farmacológica já demonstrada no tratamento de feridas diabéticas.

Por fim, pretende-se obter e comparar os perfis de libertação do composto bioativo com o objetivo de avaliar o desempenho dos vários SLCs preparados. Para compreender melhor os mecanismos que controlavam a libertação do fármaco a partir dos SLCs preparados, recorreu-se ainda a modelos matemáticos que permitiram estimar os parâmetros cinéticos.

1 INTRODUÇÃO

No presente capítulo apresenta-se uma breve revisão bibliográfica sobre os principais aspectos relacionados com o tema do trabalho proposto. Inicialmente, será feita uma descrição geral sobre sistemas de libertação controlada (SLCs) e, posteriormente, sobre o desenvolvimento de nanopartículas e géis para o encapsulamento de fármacos, detalhando as principais características destes e os seus métodos de preparação, com vista ao tratamento e cicatrização de feridas.

1.1 Sistemas de libertação controlada (SLC) de fármacos

Os Sistemas de Libertação Controlada (SLC) são frequentemente constituídos por estruturas poliméricas biocompatíveis nas quais se incorporam agentes terapêuticos para o tratamento de determinadas doenças. Estas estruturas funcionam como sistemas transportadores de compostos ativos (fármacos, proteínas e outros agentes terapêuticos) até ao local de ação pretendido, proporcionando a libertação controlada destes, de forma a fornecer doses mais eficazes e seguras para os pacientes (Shaik *et al.*, 2012). O desempenho de um SLC depende de um conjunto variado de fatores que incluem o local de ação do fármaco, as características do fármaco que se pretende libertar, o tipo de material polimérico onde se vai incorporar o fármaco e as interações entre estes (local de ação, fármaco e matriz polimérica).

O tratamento convencional requer o uso de fármacos cuja absorção e, conseqüentemente a biodisponibilidade, depende de diversos fatores, tais como solubilidade no meio a libertar, pKa (no caso de fármacos disponíveis na forma de sal), peso molecular e estabilidade química, os quais podem influenciar a resposta terapêutica (Vilar *et al.*, 2012). Com o objetivo de efetivar a resposta farmacológica, reduzindo os efeitos secundários e diminuindo o número de doses de fármaco, desenvolveram-se os SLCs que procuram melhorar a sua atividade farmacológica, melhorando a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco) e alterando as propriedades farmacodinâmicas, como o mecanismo de ação, resposta farmacológica e afinidade para o local da ação (Vilar *et al.*, 2012).

Alguns fármacos têm um intervalo de concentração ótimo de forma a serem eficazes nos locais de ação e para se obter o benefício máximo, uma vez que concentrações acima ou abaixo deste intervalo podem ser tóxicos ou não ter qualquer efeito terapêutico (Shaik *et al.*, 2012). Ao controlar a quantidade de fármaco no local desejado e reduzir o tempo de exposição nos tecidos adjacentes contribui-se para o aumento da eficácia dos tratamentos e reduz-se a

toxicidade e os efeitos secundários, melhorando assim a adesão e a confiança por parte do paciente. Desta forma, a utilização de SLCs apresenta algumas vantagens comparativamente com os sistemas de dosagem convencional (Chien e Lin, 2007), tais como: controlo da taxa de libertação e da dose terapêutica; manutenção da concentração de fármaco dentro do intervalo correspondente ao efeito terapêutico; maximização da relação dose-eficácia; redução dos efeitos secundários; diminuição do número de administrações; e aumento da confiança por parte do paciente.

A taxa de libertação de fármaco nos SLCs depende das características do polímero utilizado e da estrutura polimérica, uma vez que influenciam o acesso do meio ao fármaco. Assim, a libertação dos agentes terapêuticos é feita através de mecanismos de erosão/dissolução dos materiais poliméricos e de mecanismos difusionais através do meio de libertação.

Atualmente existe uma vasta gama de SLCs, bem como de materiais utilizados na sua preparação. Há que destacar a importância dos materiais poliméricos, não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, os quais aplicados *in vivo* não causam reação adversa significativa por parte do organismo, que promovem interações celulares favoráveis e o desenvolvimento do tecido. Tendo em conta estas características, podem dividir-se os materiais poliméricos utilizados em sistemas transportadores em duas classes que são os SLCs desenvolvidos à base de polímeros sintéticos ou naturais. Os materiais de origem natural estão a ser amplamente utilizados devido às suas semelhanças com a matriz extracelular e por apresentarem boa biocompatibilidade e interação celular (Huang e Fu, 2010). Além disso, os polímeros naturais podem ser manipulados para libertar fatores de crescimento e outros agentes terapêuticos em resposta a sinais fisiológicos tentando imitar o processo de cicatrização natural e promover a regeneração rápida de tecidos reduzindo a formação de cicatrizes de feridas (Huang e Fu, 2010).

O recurso a materiais de origem natural para o desenvolvimento de SLCs tem sido considerado essencial em engenharia de tecidos. Tem-se como exemplo os *scaffolds* que funcionam como substitutos biológicos que restauram e mantêm o normal funcionamento de tecidos ou órgãos danificados (Lee e Atala, 2013). Estes sistemas são estruturas poliméricas artificiais que, com o tempo, são gradualmente degradáveis e substituídas pelo tecido neoformado. Uma das aplicações fundamentais em engenharia de tecidos consiste na preparação de um *scaffold* artificial para proliferação e diferenciação celular, pelo facto do processo de regeneração e reparação natural de um tecido danificado, fornecendo apenas células ao local pretendido, ser um processo difícil, uma vez que a matriz extracelular também é perdida aquando da lesão do tecido (Huang e Fu, 2010).

Os polímeros naturais podem mimetizar muitas características da matriz extracelular e, portanto, favorecer a migração, o crescimento e a organização das células durante a regeneração dos tecidos e cura de feridas (Huang e Fu, 2010). Nos dias de hoje, têm sido utilizados vários polímeros naturais à base de proteínas para aplicações em engenharia de tecidos, como o colagênio, gelatina e fibrina, os quais podem fornecer não só suporte físico para a regeneração dos tecidos, mas também matrizes biomiméticas com funções biológicas capazes de induzir ativamente a regeneração dos tecidos (Huang e Fu, 2010). Desta forma, podem ser desenvolvidos para encapsular fatores de crescimento e outros agentes terapêuticos nas suas matrizes porosas e proporcionar a entrega sustentada para melhorar o crescimento celular e morfogênese, conduzindo assim a um tecido organizado funcionalmente (Huang e Fu, 2010).

Os polímeros de origem natural são geralmente considerados materiais biocompatíveis para aplicações de engenharia de tecidos. A utilização deste tipo de materiais ajuda a evitar um dos principais inconvenientes da utilização de polímeros sintéticos que consiste na falta de sinais de reconhecimento celular, apesar dos polímeros naturais serem difíceis de processar e a taxa de degradação ser difícil de controlar (Huang e Fu, 2010).

1.2 SLC à base de nanopartículas para encapsulamento de fármacos

As nanopartículas têm recebido grande atenção graças ao seu potencial terapêutico e comparando estas com as micropartículas, o tamanho sub-micro das nanopartículas oferece um número de vantagens das quais se destaca a absorção intracelular mais elevada. As nanopartículas são definidas como transportadores de fármacos de tamanho sub-micro (1-1000 nm) que podem ser constituídos por polímeros naturais ou sintéticos, e serem ou não biodegradáveis (Reis *et al.*, 2006). O termo nanopartícula é o nome comum atribuído tanto a nanosferas como a nanocápsulas. As nanoesferas apresentam uma estrutura do tipo matriz, na qual os fármacos podem ser adsorvidos pela superfície da esfera ou encapsulados dentro da mesma (Reis *et al.*, 2006). As nanocápsulas são sistemas vesiculares, em que o fármaco está confinado a uma cavidade que consiste em um núcleo interior rodeado por uma membrana polimérica. Neste caso, as substâncias ativas são geralmente dissolvidas no núcleo interno, mas podem ser também adsorvidas na superfície da cápsula (Reis *et al.*, 2006).

Os sistemas transportadores à base de nanopartículas, têm como função proteger as moléculas encapsuladas de degradação devido a fatores externos, preservar a sua funcionalidade e entregar eficazmente e de forma controlada os compostos ativos no local alvo (Janaswamy e Youngren, 2012). A encapsulação de fármacos nestes sistemas pode ser alcançada por incorporação na matriz ou por absorção à superfície das nanopartículas (Martinho

et al., 2011). No entanto, estes podem apresentar incompatibilidades com o sistema digestivo humano, sendo este um dos seus principais desafios para a otimização deste tipo de SLCs (Janaswamy e Youngren, 2012).

No que diz respeito à absorção intestinal, para além das propriedades relativas ao seu tamanho, a combinação de cargas positivas e negativas da superfície de nanopartículas com consequente aumento da hidrofobicidade da matriz parecem favorecer a absorção gastrointestinal (Reis *et al.*, 2006). Desta forma, a superfície das nanopartículas tem um papel fundamental no que se refere à libertação controlada de fármacos. Uma vez na corrente sanguínea, as nanopartículas sem modificação da superfície ou com carga negativa podem ser rapidamente sujeitas a fagocitose e eliminadas pelos macrófagos. O sistema reticuloendotelial, principalmente o fígado e o baço, é um grande obstáculo para o direcionamento ativo devido à sua capacidade em reconhecer esses sistemas, removê-los da circulação sistémica, e, conseqüentemente, evitar a efetiva entrega das nanopartículas para outros órgãos que não os do sistema reticuloendotelial (Kumar *et al.*, 2001). A modificação da superfície destes sistemas de nanopartículas com polímeros hidrofílicos é a forma mais comum de controlar o processo de fagocitose e melhorar as propriedades da superfície do sistema (Soppimath *et al.*, 2001). As propriedades das nanopartículas podem ser adaptadas usando diferentes polímeros ou proteínas. As estratégias mais recentes utilizam novos polímeros sintéticos biodegradáveis e polímeros modificados à base de produtos naturais tais como quitosano e albumina.

Tendo em conta as características dos sistemas transportadores descritos anteriormente, a composição polimérica das nanopartículas (hidrofobicidade, carga superficial e perfil de biodegradação) e o fármaco encapsulado (peso molecular e carga), é de notar a grande influência destes na absorção, no padrão de biodistribuição e na eliminação do fármaco.

Atualmente existem vários métodos disponíveis para a preparação de nanopartículas. Dependendo das características físico-químicas do fármaco e do local que se pretende tratar, é possível escolher o melhor método e o melhor polímero para encapsular o fármaco de forma eficaz. Os métodos de preparação de nanopartículas podem ser classificados em duas categorias principais consoante a sua formulação seja obtida a partir de uma reação de polimerização ou diretamente a partir de uma macromolécula ou de um polímero pré-formado (Reis *et al.*, 2006).

1.3 SLCs à base de géis para libertação de fármacos

Para além das nanopartículas, existem outros SLCs utilizados como veículo para o transporte de substâncias ativas até ao local de ação, como é o caso dos géis. Estes sistemas são usados para descrever estruturas de redes poliméricas reticuladas através de um mecanismo designado por gelificação, podendo classificar-se em fortes ou fracos (Ferry, 1980).

O processo de gelificação consiste na ligação de cadeias macromoleculares que levam à formação de uma estrutura em forma de rede. A gelificação pode ocorrer através de uma variedade de mecanismos que podem ser de natureza física ou química (Djabourov *et al.*, 2013), podendo assim os géis classificar-se em géis químicos (ou permanentes) e géis físicos (ou reversíveis). A gelificação química envolve a formação de ligações covalentes fortes e estáveis (Hennink & Nostrum, 2002), resultando num gel forte (Gulrez *et al.*, 2011). A gelificação química pode ocorrer através de mecanismos de condensação ou polimerização de adição. Por outro lado, nos géis físicos, a gelificação ocorre por ligações físicas, podendo ainda classificar-se em géis fortes e fracos (Gulrez *et al.*, 2011). Os géis fortes têm ligações físicas fortes entre cadeias de polímeros e são considerados efetivamente permanentes consoante as condições experimentais, sendo desta forma semelhantes aos géis químicos. Frequentemente formam estruturas em forma de duplas e triplas hélices. Os géis físicos fracos têm ligações reversíveis formadas a partir de associações temporárias entre cadeias, como por exemplo ligações de hidrogénio e iónicas, podendo estas quebrar e reestruturar continuamente. A reticulação entre as diferentes cadeias poliméricas resulta num comportamento viscoelástico e, por vezes, puramente elástico, favorecendo a estrutura do gel (rigidez), elasticidade e contribuindo para a viscosidade (Gulrez *et al.*, 2011).

Um hidrogel é uma estrutura de rede tridimensional obtida a partir de polímeros naturais ou sintéticos que podem absorver e reter grandes quantidades de água (Rosiak & Yoshii, 1999). Os hidrogéis apresentam na sua estrutura grupos hidrofílicos polares que lhes conferem características importantes como a capacidade de retenção de água e a permeabilidade (Gulrez *et al.*, 2011). Estes sistemas quando colocados num meio aquoso conseguem absorver grandes quantidades de água através de interações que se estabelecem entre os grupos hidrofílicos e a água, atingindo, ao fim de um certo tempo, o estado de equilíbrio. Devido ao teor significativo de água que conseguem acumular, os hidrogéis possuem um grau de flexibilidade semelhante ao tecido vivo natural. Dependendo da natureza e composição, após atingirem o nível máximo de *swelling*, o hidrogel começa a desintegrar-se e/ou a dissolver-se, se as cadeias da rede forem degradáveis. No caso de se pretender melhorar as funcionalidades dos hidrogéis, é possível alterar a sua estrutura química controlando a sua polaridade, as propriedades de superfície, as

propriedades mecânicas e o comportamento de *swelling* (Gulrez *et al.*, 2011). Como exemplo de hidrogéis, podem citar-se redes reticuladas de polímeros sintéticos (Yang *et al.*, 2014; Matanović *et al.*, 2014) ou de biopolímeros naturais, tais como, alginato, quitosano, carragenano, colagénio, agarose e gelatina (Gulrez *et al.*, 2011, Lee e Mooney, 2001).

Os hidrogéis biodegradáveis que contêm ligações estáveis são vantajosos para aplicações como engenharia dos tecidos, cicatrização de feridas e libertação de fármacos (Gulrez *et al.*, 2011). A biocompatibilidade é outra característica importante exigida para um hidrogel, uma vez que este tem que produzir o mínimo de efeitos nocivos quando em contacto com tecidos vivos ou fluidos corporais. Para além disso, os seus produtos de degradação não devem ser tóxicos e devem ser idealmente metabolizados em produtos inofensivos ou excretados pelo sistema renal (Gulrez *et al.*, 2011).

Atualmente existem algumas técnicas descritas na literatura para a preparação de hidrogéis como a reticulação física, reticulação química, polimerização de enxerto (*grafting*) e reticulação por radiação (Gulrez *et al.*, 2011). No presente trabalho, irão ser discutidos com maior detalhe os hidrogéis preparados por reticulação física, uma vez que este processo apresenta algumas vantagens comparativamente com os restantes, tendo sido utilizado este mecanismo para a preparação dos géis em laboratório.

Os géis físicos ou reversíveis têm vindo a ganhar especial interesse devido à relativa facilidade de preparação e por não ser necessário utilizar agentes reticulantes para a formação de géis. Estes agentes podem afetar a integridade das substâncias bioativas que vão ser incorporadas e necessitam de ser removidos antes da aplicação *in vivo*. A seleção cuidadosa do tipo de hidrocolóide, concentração e pH podem levar à formação de uma ampla variedade de texturas de gel (Gulrez *et al.*, 2011).

Para além das características dos hidrogéis anteriormente descritas, estes podem ainda ser sensíveis a estímulos externos, exibindo variações de volume significativas em resposta a pequenas alterações do meio como pH, temperatura, força iónica, campo elétrico e luz (Rosiak & Yoshii, 1999; Gulrez *et al.*, 2011). Os hidrogéis sensíveis à temperatura são também conhecidos por géis termosensíveis ou termogéis e atualmente existem inúmeros polímeros sensíveis a este estímulo, tais como, poliésteres, polipéptidos, quitosano e carragenano (Gulrez *et al.*, 2011).

Este tipo de géis termosensíveis têm sido estudados para o desenvolvimento de hidrogéis injetáveis que se formam *in situ* após aplicação, constituindo uma abordagem interessante para o transporte de substâncias ativas para um local de ação específico de uma maneira minimamente invasiva. Os hidrogéis injetáveis são sistemas promissores para aplicações em engenharia de tecidos, devido ao alto teor de água, capacidade de encapsular

homogeneamente células, transferência de massa eficiente, propriedades físicas facilmente manipuláveis e liberação de fármacos (Tan e Marra, 2010; Lee e Mooney, 2001). Os hidrogéis altamente hidratados podem imitar os ambientes químicos e físicos da matriz extracelular (ECM - *Extra Cellular Matrix*), criando um microambiente propício para a proliferação e diferenciação celular. Para desenvolver um hidrogel adequado como transportador de substâncias ativas, a taxa de degradação e as propriedades mecânicas do hidrogel devem complementar o crescimento do tecido e a ECM natural (Tan e Marra, 2010).

A transição de fase por meio de estímulos externos como a temperatura tem vindo a ser utilizada para a regeneração de tecidos uma vez que a gelificação pode ser realizada através do aumento da temperatura acima da temperatura inferior crítica de solução (TICS), que se designa ser abaixo da temperatura corporal (Tan e Marra, 2010).

1.4 SLCs à base de partículas e géis de quitosano

Um dos polímeros mais utilizados no que se refere à preparação de SLCs é o quitosano que tem demonstrado ser relativamente seguro como biomaterial para aplicações biomédicas. O quitosano é considerado um transportador polimérico interessante na medida em que possui propriedades importantes tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e mucoadesividade, que o tornam adequado para uso biomédico e formulações farmacêuticas (Vilar *et al.*, 2012; Martinho *et al.*, 2011).

Tendo em conta que um dos objetivos do trabalho é a preparação de nanopartículas de quitosano, esta 2ª categoria será focada com maior detalhe. Falar-se-á, inicialmente, da estrutura e propriedades mais importantes do quitosano e, posteriormente, serão apresentados os vários métodos de preparação de nanopartículas de quitosano já descritos na literatura.

O quitosano é um polímero natural, pertencente à classe dos polissacarídeos, quimicamente preparado a partir da desacetilação alcalina da quitina a elevada temperatura, em que o grupo acetamida da quitina é convertido no grupo amina do quitosano (Lavertu *et al.*, 2003; Kushwaha *et al.*, 2010; Croisier e Jérôme, 2013). A quitina, Figura 1, é um polissacarídeo de origem natural, presente no exoesqueleto de crustáceos e na parede celular de alguns fungos, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza a seguir à celulose (Rinaudo, 2006; Kushawaha *et al.*, 2010).

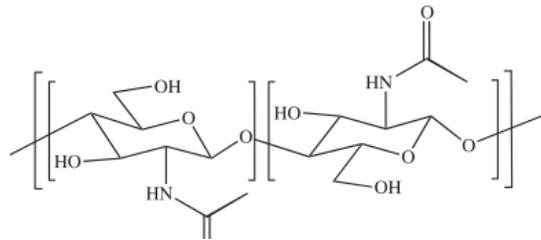


Figura 1 - Estrutura química da quitina (Croisier e Jérôme, 2013).

O quitosano (Figura 2) é um polímero linear, cristalino, composto por duas unidades de repetição, N-acetil-2-amino-2-D-glucopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose, unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4)-glicosídicas (Rinaudo, 2006; Shukla *et al.*, 2013).

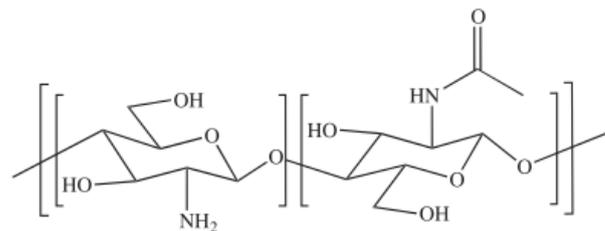


Figura 2 - Estrutura química do quitosano (Croisier e Jérôme, 2013).

O grau de desacetilação (GD) do quitosano indica-nos o número de grupos amina presentes nas cadeias e, para o polímero em questão ser denominado por quitosano, a quitina desacetilada deve conter pelo menos 60% de grupos amina (Croisier e Jérôme, 2013; Kushwaha *et al.*, 2010). Dependendo das condições utilizadas durante o tratamento alcalino, este parâmetro influencia o peso molecular e o grau de pureza final do quitosano (Kushwaha *et al.*, 2010). Para além disso, o grau de desacetilação afeta a solubilidade, a hidrofobicidade e a sua capacidade para interagir electrostaticamente com polianiões através dos grupos amina protonáveis do quitosano (Nagpal *et al.*, 2010). Geralmente, o quitosano com baixo peso molecular e baixo grau de desacetilação exhibe maior solubilidade e uma taxa de degradação mais rápida (Tiyaboonchai, 2003; Nagpal *et al.*, 2010).

O quitosano tem uma constante de dissociação ácida, pKa, de cerca de 6.5, o que significa que a um pH inferior a 6, os grupos amina estão protonados refletindo o comportamento policatiónico do quitosano, permitindo que este seja solúvel na maioria das soluções ácidas (Djabourov *et al.*, 2013; Croisier e Jérôme, 2013).

O quitosano possui uma ampla gama de propriedades, devido à presença do grupo funcional -NH_2 , que lhe confere uma série de características importantes, permitindo-lhe ser aplicado em áreas como libertação controlada de fármacos, cicatrização de feridas, dispositivos biomédicos, tratamento de águas, entre muitas outras aplicações (Kushwaha *et al.*, 2010; Shukla

et al., 2013; Croisier e Jérôme, 2013). Assim, este polissacarídeo apresenta propriedades peculiares, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, e analgésica, mucoadesividade e efeito regenerativo sobre o tecido conjuntivo (Shukla *et al.*, 2013; Croisier e Jérôme, 2013). O quitosano pode ser biodegradado em resíduos não tóxicos (oligossacarídeos), que podem ser facilmente metabolizados ou ainda serem excretados, exibindo a sua biocompatibilidade em meio fisiológico (Croisier e Jérôme, 2013), sendo que a taxa da sua degradação está relacionada com a massa molecular e o seu grau de desacetilação.

Os métodos comumente usados para a preparação de nanopartículas de quitosano baseiam-se na formação espontânea de complexos entre o quitosano e polianiões (Calvo *et al.*, 1997) ou na gelificação de uma solução de quitosano dispersa numa emulsão de óleo (Reis *et al.*, 2006). No caso das nanopartículas de quitosano obtidas pela formação de complexos entre as cargas positivas do quitosano e entre as cargas negativas dos polianiões, tem-se o exemplo do polianião tripolifosfato (TPP) (Calvo *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 2012) que permite a formação de partículas com diâmetros entre os 200-500 nm que apresentam uma forma quase esférica em Microscopia Eletrônica de Transmissão (Reis *et al.*, 2006). No que diz respeito ao método de gelificação em emulsão, é possível obter nanopartículas com um diâmetro de 400 nm. Este método apresenta uma grande desvantagem comparativamente com a primeira técnica, uma vez que envolve a utilização de solventes orgânicos durante o isolamento das partículas, que são difíceis de remover após a formação das partículas, podendo causar toxicidade (Reis *et al.*, 2006).

Na Tabela 1 apresentam-se com algum detalhe os métodos mais estudados para preparar nanopartículas à base de quitosano.

Recentemente têm sido desenvolvidos hidrogéis de quitosano sensíveis à temperatura e ao pH que quando injetados sob a forma de “sol” no corpo, são capazes de formar um gel *in situ*, devido ao aumento da temperatura ambiente para a temperatura corporal de 37 °C. Estes géis são obtidos a partir da adição de um sal polioliol, como por exemplo o fosfato disódico de glicerol, a uma solução aquosa de quitosano, em que as cargas positivas do quitosano e a parte aniônica do sal interagem entre si através de ligações de hidrogénio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas para formar um hidrogel (Chenite *et al.*, 2000). Estes sais são agentes ideais para transformar soluções de quitosano puramente dependentes de pH em soluções de quitosano dependentes de pH e controladas por temperatura. Os sais de fosfato dão um comportamento único, permitindo que as soluções de quitosano permaneçam líquidas a um pH fisiológico e temperatura ambiente, facilitando assim a encapsulação de substâncias ativas, e que se transformem num gel quando aquecidas à temperatura do corpo (Chenite *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Métodos de preparação de nanopartículas.

Método	Procedimento/Princípio	Referências
Gelificação Iônica	O quitosano é dissolvido em meio ácido (por exemplo numa solução de ácido acético), sendo posteriormente adicionado um polianião (por exemplo TPP) sob agitação mecânica. O mecanismo de formação das nanopartículas é baseado na interação eletrostática entre os grupos amina do quitosano e as cargas negativas do polianião.	(Calvo <i>et al.</i> , 1997) (Fan <i>et al.</i> , 2012) (Shu e Zhu, 2002) (Agnihotri <i>et al.</i> , 2004)
Método Micelar Reverso/ Microemulsão	O surfactante é dissolvido num solvente orgânico (<i>n</i> -hexano) para preparar micelas reversas. Posteriormente, o quitosano dissolvido numa solução ácida e o fármaco são adicionados com agitação constante à solução com surfactante. A fase aquosa é regulada de forma a manter a mistura numa fase de microemulsão opticamente transparente. A esta solução transparente, é adicionado um agente reticulante (por exemplo, glutaraldeído) com agitação constante. O solvente orgânico é evaporado para se obter a massa seca transparente. O material é disperso em água e é adicionando um sal de forma a precipitar o surfactante para ser removido. A mistura é então submetida a centrifugação e a solução sobrenadante, que contém as nanopartículas com o fármaco, é decantada. A dispersão aquosa é imediatamente dialisada durante cerca de 1 hora e o líquido é liofilizada para pó seco.	(Agnihotri <i>et al.</i> , 2004) (Nagpal <i>et al.</i> , 2010)
Spray Drying	Este método baseia-se na secagem de gotículas atomizadas numa corrente de ar quente. Inicialmente, o quitosano é dissolvido numa solução aquosa de ácido acético, o fármaco é dissolvido ou disperso na solução e, em seguida, um agente reticulante é adicionado. Esta solução é então atomizada numa corrente de ar quente, ocorrendo a formação de pequenas gotículas, a partir das quais o solvente evapora instantaneamente, levando à formação de partículas de fluxo livre. Para se obter o tamanho desejado devem ser controlados vários parâmetros do processo, tais como o tamanho do bocal, o caudal de pulverização, a pressão de atomização, a temperatura do ar de entrada e a extensão da reticulação.	(Agnihotri <i>et al.</i> , 2004) (Kushwaha <i>et al.</i> , 2010)
Método de emulsão de coalescência de gotículas	Numa primeira fase, produz-se uma emulsão contendo uma solução aquosa de quitosano juntamente com o fármaco em óleo de parafina líquida. De seguida, é preparada outra emulsão contendo uma solução aquosa de NaOH. As duas emulsões são misturadas sob agitação a alta velocidade, levando à formação de partículas de quitosano de tamanho pequeno.	(Agnihotri <i>et al.</i> , 2004)
Coacervação/ Precipitação	Este método utiliza a propriedade físico-química do quitosano, em que este é insolúvel em meio alcalino, mas sofre precipitação/coacervação quando entra em contacto com uma solução alcalina. As partículas são produzidas dispersando a solução de quitosano numa solução alcalina como o hidróxido de sódio, NaOH-metanol ou etanodiamina utilizando um bocal de ar comprimido, para formar gotículas coacervadas. A separação e purificação das partículas é feita por meio de filtração/centrifugação, seguida por lavagem sucessiva com água quente e fria.	(Nagpal <i>et al.</i> , 2010) (Agnihotri <i>et al.</i> , 2004)

1.5 SLCs à base de géis de *k*-carragenano

O termo carragenano é usado como nome genérico para a família de polissacarídeos sulfatados de alto peso molecular com propriedades gelificantes, obtidos pela extração de espécies de algas marinhas vermelhas da classe das *Rhodophyceae* (Necas e Bartosikova, 2013, Li *et al.*, 2014). O carragenano é formado por unidades de D-galactose sulfatadas e 3,6-anidro-galactose (3,6-AG), que podem ser ou não sulfatadas consoante o tipo de carragenano, ligadas entre si por ligações α -1,3 e β -1,4 glicosídicas (Necas e Bartosikova, 2013). Este biopolímero é utilizado na preparação de produtos alimentares e de higiene pelas suas propriedades gelificantes, espessantes e emulsificantes, em aplicações farmacêuticas e em medicina experimental para testar agentes anti-inflamatórios (Necas e Bartosikova, 2013).

Existem diferentes tipos de carragenano dependendo da fonte de onde é extraído, da sua estrutura química (Li *et al.*, 2014) ou da sua solubilidade em cloreto de potássio (Necas e Bartosikova, 2013). Os três tipos de carragenano mais importantes, do ponto de vista comercial, são o kappa (*k*), o iota (τ) e o lambda (λ). As diferenças principais entre os diferentes tipos e que influenciam as suas propriedades são o número e a posição dos grupos éster sulfato, bem como o teor de unidades 3,6-AG (Necas e Bartosikova, 2013). O *k*-carragenano é constituído por unidades de D-galactose-4-sulfato e unidades de 3,6-anidro-D-galactose, sendo então caracterizado por um teor de éster sulfato de cerca de 25% e um teor de 3,6-AG de cerca de 34% (Li *et al.*, 2014). A estrutura química do *k*-carragenano encontra-se representada na Figura 3.

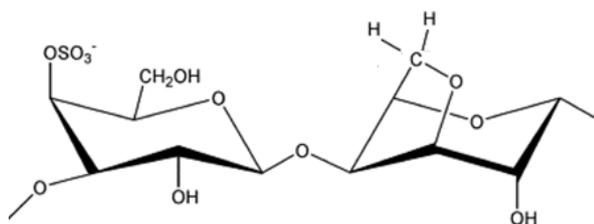


Figura 3 - Estrutura química do *k*-carragenano (Necas e Bartosikova, 2013).

O carragenano exhibe características de solubilidade apresentadas normalmente por colóides hidrofílicos, sendo solúvel em água e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. A solubilidade do carragenano em água é influenciada por diferentes fatores tais como, o tipo de carragenano (número de grupos hidrofílicos (hidroxilo e sulfato) e hidrofóbicos (3,6-AG) presentes na estrutura), os contra-íons presentes na solução, temperatura e pH (CP Kelco, 2002). Comparativamente com os restantes tipos de carragenano, o *k*-carragenano é menos hidrofílico

e, por isso, menos solúvel, uma vez que apresenta um maior número de grupos 3,6-AG e menos grupos sulfato.

Para a maioria das aplicações a funcionalidade do carragenano depende em grande parte das suas propriedades reológicas. Tendo em conta que o carragenano forma soluções altamente viscosas, a viscosidade é um parâmetro importante na caracterização destes géis. Esta é dependente da concentração, da temperatura, da presença de outros solutos, do tipo de carragenano e do seu peso molecular (Necas e Bartosikova, 2013). A viscosidade aumenta quase exponencialmente com a concentração e diminui com a temperatura. Outros fatores que podem influenciar as propriedades do carragenano são o pH e a temperatura. A altas temperaturas e a um pH baixo, este composto pode perder a sua funcionalidade. Na presença de ácidos o carragenano é suscetível a despolimerização por meio de hidrólise ácida levando à perda de propriedades físicas através da clivagem das ligações glicosídicas (Necas e Bartosikova, 2013). O carragenano em solução apresenta estabilidade máxima a um pH igual a 9 e não deve ser processado termicamente a valores de pH abaixo de 3.5 (CP Kelco, 2002).

No que diz respeito à atividade biológica destes polissacarídeos sulfatados, é de destacar que estes apresentam propriedades que incluem atividade anticoagulante, propriedades imunomoduladoras, antivirais e efeito antitumoral (Necas e Bartosikova, 2013; Li *et al.*, 2014). Relativamente à toxicidade do carragenano, estudos efetuados sugerem que não existem grandes diferenças nos efeitos dos vários tipos de carragenano, concluindo que estes possuem relativamente baixa toxicidade, mostrando também não ser teratogénicos (Necas e Bartosikova, 2013).

Os géis reticulados fisicamente podem ser formados quando se arrefecem, por exemplo, soluções quentes de carragenano. Neste método, a formação do gel ocorre devido à formação de hélices, associação de hélices e formação de zonas de junção (Gulrez *et al.*, 2011; Djabourov *et al.*, 2013). No caso do carragenano, quando este se encontra em solução quente, acima da temperatura de fusão, apresenta uma conformação aleatória enrolada, que, após arrefecimento, se transforma num conjunto de hélices rígidas. Este processo é termoreversível. Outro mecanismo de formação de géis físicos é através da interação iónica entre os grupos funcionais dos compostos. O *k*-carragenano gelifica facilmente na presença de catiões mono e divalentes como o potássio e o cálcio (Li *et al.*, 2014). A presença de iões de cálcio origina um gel de *k*-carragenano frágil, enquanto um gel com iões de potássio é elástico, coesivo e transparente (CP Kelco, 2002). A rigidez do gel de *k*-carragenano aumenta com o aumento de concentração de iões de potássio. O princípio subjacente a este método é a gelificação de uma solução de polieletrólito com um ião multivalente com cargas opostas como acontece na formação de géis de quitosano reticulados com o sal fosfato de glicerol (Gulrez *et al.*, 2011; Chenite *et al.*, 2000).

Na presença de um sal, por exemplo K^+ , devido à presença dos grupos sulfônicos do carragenano (SO_3^-), as duplas hélices agregam-se para formar géis mais estáveis (Gulrez *et al.*, 2011). O processo de formação do gel com *k*-carragenano encontra-se representado na Figura 4.

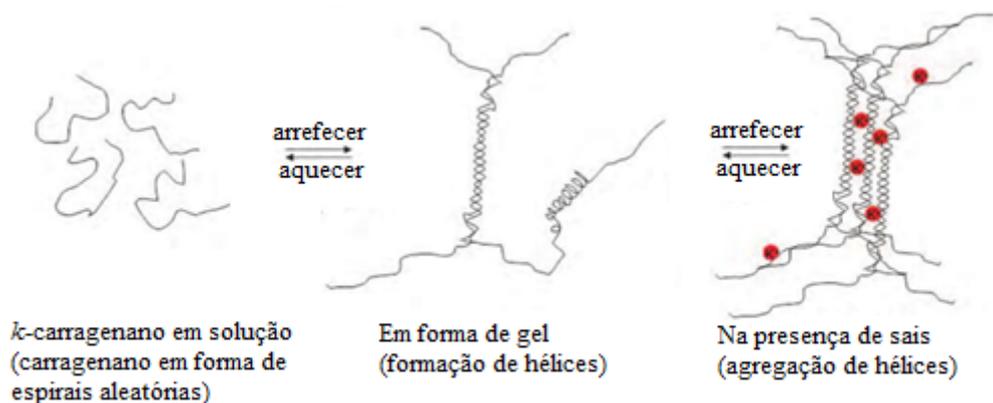


Figura 4 - Esquema representativo da formação do gel devido à agregação de hélices após arrefecimento de uma solução quente de carragenano (adaptado de Gulrez *et al.*, 2011).

1.6 Fármacos de base natural usados no tratamento de feridas de diabéticos

A cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve a interação entre células e sistemas mediadores. Este processo encontra-se dividido em várias fases, tais como, a coagulação, inflamação, proliferação, reepitelização e remodelagem. A transição entre as fases depende da maturação e diferenciação dos queratinócitos, fibroblastos, mastócitos e macrófagos que são as principais células envolvidas na cicatrização de feridas (Liane *et al.*, 2013).

A neuropatia diabética é uma complicação crónica associada à doença de diabetes, caracterizada por danos temporários ou permanentes no tecido nervoso, que levam à perda progressiva de fibras nervosas periféricas, causada por uma diminuição do fluxo sanguíneo e por elevados níveis de glicémia. Esta doença e a doença arterial periférica, que consiste numa diminuição do fluxo sanguíneo nos membros superiores e inferiores, são geralmente os principais fatores para o aparecimento de úlceras, como é o caso da doença do pé diabético (Liane *et al.*, 2013).

Na literatura é possível encontrar inúmeras substâncias ativas para o tratamento de úlceras provocadas pela doença de diabetes, tais como, fatores de crescimento, células

estaminais, proteínas, produtos naturais, entre outros. Dentro dos produtos de base natural encontram-se, por exemplo, o extrato de *Lithospermum erythrorhizon* que diminui a permeabilidade vascular, permite a formação de tecido e acelera a cicatrização de feridas (Fujita *et al.*, 2003); a planta da família das *Rehmanniae radix* que promove a cicatrização das úlceras, acelerando o processo de regeneração dos tecidos, angiogênese e inflamação (Lau *et al.*, 2009); e o extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) que reduz a inflamação e aumenta a contração de feridas, promovendo a reepitelização e regeneração de tecido, angiogênese e deposição de colagénio nas feridas tratadas (Abu-al-Basal *et al.*, 2010).

Estudos recentes apresentam o naringin como substância bioativa para o tratamento de feridas de diabéticos, tendo sido o fármaco escolhido para ser incorporado nas várias matrizes preparadas neste trabalho.

O naringin, cuja estrutura química encontra-se representada na Figura 5, é um glicosídeo flavanona (4',5,7-trihidroxiflavanona-7-ramnoglicosídeo), extraído de espécies de frutas cítricas e uvas, que, dadas as suas características, contém um enorme potencial terapêutico (Kandhare *et al.*, 2014). Segundo a literatura, este flavonóide possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-úlceras, anti-cancro, antiaterogénica, hepatoprotetora e atividades neuroprotetoras (Kandhare *et al.*, 2014; Kandhare *et al.*, 2012). Para além disso, é um potencial metal quelante, bem como agente de eliminação de radicais livres, apresentando também atividade cardioprotetora e neuroprotetora *in vivo* e *in vitro* (Kandhare *et al.*, 2012; Kandhare *et al.*, 2014).

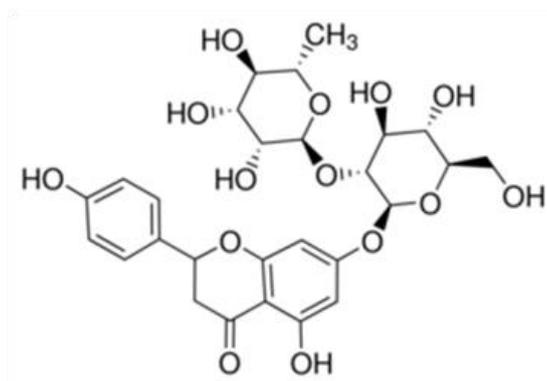


Figura 5 - Estrutura química do naringin (Sigma Aldrich).

O naringin apresenta-se sob a forma de um pó bege, com peso molecular de 580.53 g/mol (Sigma-Aldrich®). Este composto é solúvel em álcool, acetona e em água, sendo a sua solubilidade em água de 0.5 mg/ml a 20 °C (Pulley, 1936).

Estudos realizados por Kandhare *et al.*, 2014 mostraram resultados promissores após utilização de naringin em pomada (4% w/w) para promover a cicatrização de feridas em ratos.

Para além disso, outros estudos realizados em ratos diabéticos relataram que o naringin apresenta propriedades antidiabéticas e anti-apoptóticas (Kandhare *et al.*, 2014).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos experimentais usados/adotados para a concretização dos objetivos propostos. Primeiramente, faz-se uma descrição dos reagentes e dos procedimentos experimentais utilizados para a preparação das nanopartículas e para a preparação dos géis. Por fim, serão descritas as técnicas analíticas usadas para a caracterização dos mesmos.

2.1 Materiais/Reagentes

Os reagentes químicos utilizados nos diferentes procedimentos experimentais, as suas características (CAS number, peso molecular, pureza, distribuidor, etc) encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Lista de reagentes utilizados.

Nome (Fórmula Química)	Características	CAS	Distribuidor
Quitosano (C ₆ H ₁₁ O ₄ N) _n	Baixo Peso molecular (161).n Grau de desacetilação 75-85%	9012-76-4	Sigma-Aldrich®
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Pureza: ≥98%	1310-73-2	Eka (Akzo Nobel Company)
Ácido Acético (C ₂ H ₄ O ₂)	Pureza: ≥99%	64-19-7	Fluka (Riedel-de Haën)
Ácido Clorídrico (HCl)	Pureza: 37%	7647-01-0	Panreac Quimica SA
Tripolifosfato de Sódio (Na ₅ P ₃ O ₁₀)	Peso molecular: 367.864 g/mol	7758-29-4	Sigma-Aldrich®
Bitartarato de Colina (C ₉ H ₁₉ NO ₇)	Peso molecular: 253.25 g/mol	87-67-2	Sigma-Aldrich®

Citrato dihidrogenado de colina (C ₁₁ H ₂₁ NO ₈)	Peso molecular: 295.29 g/mol Pureza: ≥98%	77-91-8	Sigma-Aldrich®
τ-carragenano (C ₂₄ H ₃₆ O ₂₅ S ₂)	Peso molecular: >100000 g/mol	9062-07-1	Sigma-Aldrich®
k-carragenano (C ₂₄ H ₃₆ O ₂₅ S ₂)	Peso molecular: >100000 g/mol	11114-20-8	Sigma-Aldrich®
Fosfato Dissódico de Glicerol (C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P)	Peso molecular: 216.04 g/mol	55073-41-1	Sigma-Aldrich®
Naringin (C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄)	Peso molecular: 580.53 g/mol Pureza: ≥95%	10236-47-2	Sigma-Aldrich®
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	Pureza: ≥93%	10043-52-4	Sigma-Aldrich®
Cloreto de potássio (KCl)	Pureza: ≥99%	7447-40-7	Sigma-Aldrich®

2.2 Procedimento Experimental

Neste trabalho pretende-se desenvolver sistemas de libertação controlada (SLCs) com o objetivo de encapsular um fármaco, o naringin, para o tratamento de feridas. Para o encapsulamento do fármaco produziram-se nanopartículas de quitosano com base na técnica de gelificação iónica e caracterizaram-se as nanopartículas com recurso às técnicas de *Dynamic Light Scattering* (DLS) e *Scanning Electron Microscopy* (SEM). Posteriormente, incorporaram-se as nanopartículas carregadas com naringin em géis de carragenano e procedeu-se à caracterização destes por SEM. Para além disto, realizaram-se ensaios de libertação dos vários sistemas individuais (partículas, géis e partículas incorporadas no géis) para comparar os vários perfis obtidos. A Figura 6 esquematiza as várias etapas do trabalho experimental que serão descritas mais sucintamente de seguida.

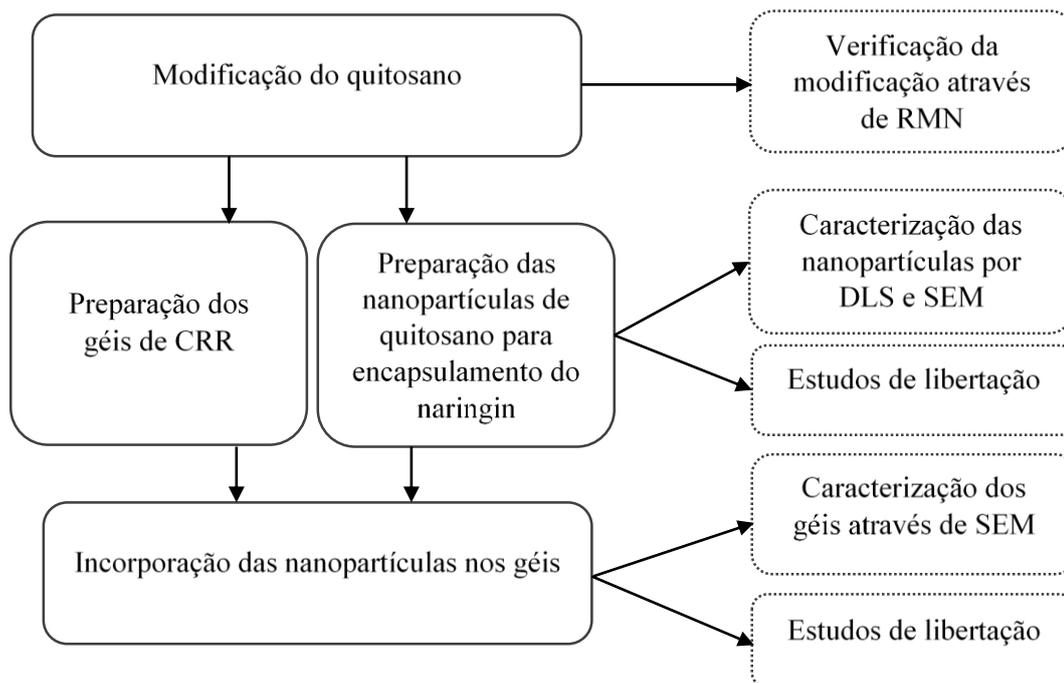


Figura 6 – Etapas do procedimento experimental.

De forma a facilitar a leitura das legendas das figuras apresentadas no capítulo seguinte, utilizaram-se os seguintes códigos para representar os diferentes tipos de sistemas preparados:

- NP/CS/TPP/NAR0.5 – Nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP incorporadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- NP/CS/CD/NAR0.5 – Nanopartículas de quitosano reticuladas com CD incorporadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- CRR2.5/NAR0.5 – géis de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) com 0.5 mg de naringin incorporado;
- CRR2.5/NAR1 – géis de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) com 1 mg de naringin incorporado;
- CRR2.5/KCl5/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) reticulados com 5% de KCl e com 0.5 mg de naringin incorporado;
- CRR2.5/KCl5/NAR1 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) reticulados com 5% de KCl e com 1 mg de naringin incorporado;
- CRR2.5/KCl10/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) reticulados com 10% de KCl e com 0.5 mg de naringin incorporado;

- CRR2.5/KCl10/NAR1 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) reticulados com 10% de KCl e com 1 mg de naringin incorporado;
- CRR2.5/NP/CS/TPP/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) com nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP carregadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) com nanopartículas de quitosano reticuladas com CD carregadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- CRR1.25/NP/CS/TPP/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 1.25% (w/v) com nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP carregadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- CRR1.25/NP/CS/CD/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 1.25% (w/v) com nanopartículas de quitosano reticuladas com CD carregadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- CRR2.5/KCl5/NP/CS/TPP/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) reticulados com 5% de KCl e com incorporação de nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP carregadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- CRR2.5/KCl5/NP/CS/CD/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) reticulados com 5% de KCl e com incorporação de nanopartículas de quitosano reticuladas com CD carregadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- CRR2.5/KCl10/NP/CS/TPP/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) reticulados com 10% de KCl e com incorporação de nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP carregadas com 0.5 mg/ml de naringin;
- CRR2.5/KCl10/NP/CS/CD/NAR0.5 – géis à base de *k*-carragenano com uma concentração de 2.5% (w/v) reticulados com 10% de KCl e com incorporação de nanopartículas de quitosano reticuladas com CD carregadas com 0.5 mg/ml de naringin.

2.3 Modificação do quitosano

Antes da síntese das nanopartículas, modificou-se o quitosano, de forma a aumentar o seu grau de desacetilação (GD), ou seja, aumentar o número de grupos 2-amino-2-desoxi-D-

glucopirranose (unidades desacetiladas). Esta modificação foi feita para aumentar o número de grupos amina disponíveis na cadeia do quitosano, que após protonados irão fortalecer o processo de reticulação física deste com os agentes reticulantes utilizados na preparação das nanopartículas.

A modificação do quitosano foi feita tendo em conta a temperatura e a concentração de NaOH, uma vez que o grau de desacetilação aumenta com o aumento da temperatura e com a concentração de NaOH (Chang *et al.*, 1997). Esta etapa foi realizada com uma solução alcalina de 60% (m/v) de NaOH, 26 ml da solução alcalina por grama de quitosano e à temperatura de 100 °C durante 4 horas, segundo as condições experimentais utilizadas por Chang *et al.*, 1997.

Para determinar o grau de desacetilação obtido após modificação, recorreu-se à técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do Laboratório do Centro de Química de Coimbra que será descrita de seguida para melhor compreensão do seu funcionamento.

2.3.1 Caracterização do quitosano (RMN)

A técnica de RMN tem por base um fenómeno físico em que os núcleos de determinados átomos sujeitos a um campo magnético absorvem e reemitem radiação eletromagnética. Esta energia corresponde a uma frequência de ressonância específica que depende da intensidade do campo magnético e das propriedades magnéticas dos átomos (Hornak, 2011). Esta técnica é não destrutiva e permite obter informação estrutural, físico-química e eletrónica no estado sólido ou líquido assim como informação acerca da dinâmica molecular.

A preparação das amostras para a análise passou por dissolver 10 mg de quitosano em 1 ml de água deuterada e 5 µl de ácido acético. O espectro obtido está representado na Figura

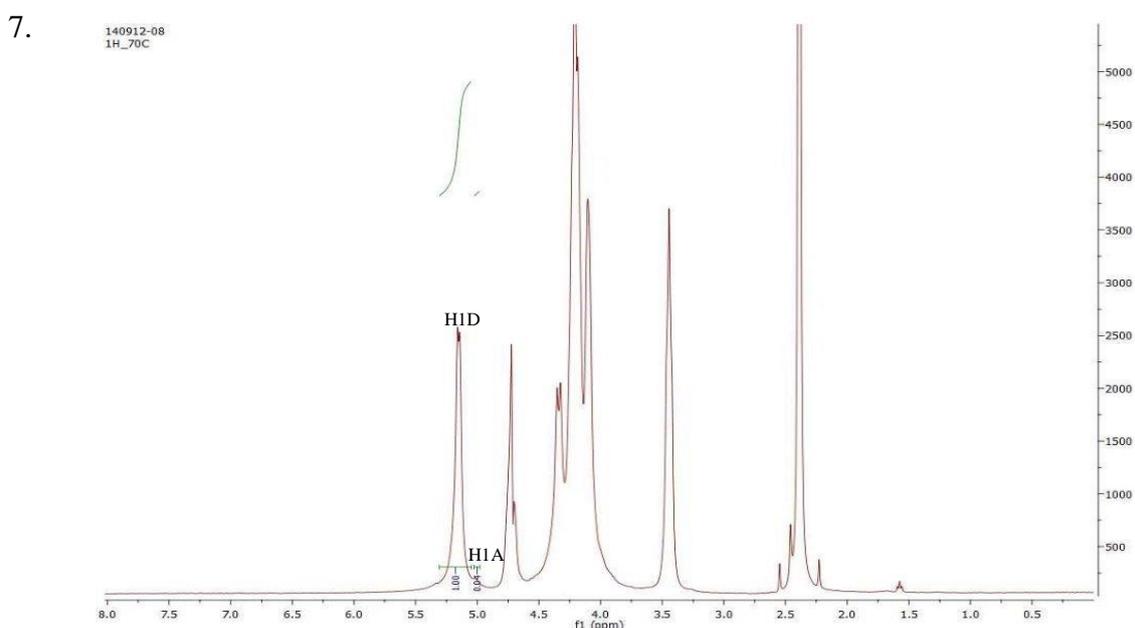


Figura 7 – Espectro de RMN do quitosano.

Por integração dos picos H1D e H1A e através da **Equação 1** (Lavertu *et al.*, 2003) calculou-se que o grau de desacetilação obtido foi de 96%, verificando-se, assim, um aumento neste parâmetro em relação ao quitosano comercial (75-85%, valor indicativo de acordo com o distribuidor).

$$GD(\%) = \left(\frac{H1D}{H1D+H1A} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.4 Preparação de nanopartículas

Para o encapsulamento do fármaco, naringin, foram produzidas nanopartículas com base na técnica de gelificação iónica do quitosano (Fan *et al.*, 2011) utilizando diferentes reticulantes. Nesta secção será apenas explicado a síntese das nanopartículas, uma vez que foi necessário otimizar previamente as nanopartículas para posteriormente se imobilizar o fármaco nas mesmas. Na subsecção seguinte (Subsecção 2.4.1) será descrita a metodologia desenvolvida para o encapsulamento do fármaco.

Na produção das nanopartículas foram preparadas várias soluções de quitosano para testar vários reticulantes: Tripolifosfato de Sódio (TPP), Bitartarato de Colina (CB) e Citrato dihidrogenado de Colina (CD). Inicialmente, testaram-se diferentes concentrações de quitosano e de reticulante até otimizar o tamanho de partícula pretendido (ver Anexo I).

Outro parâmetro que se estudou foi a influência da dissolução do quitosano em ácido acético (CH₃COOH) e ácido clorídrico (HCl). Quando se dissolveu o quitosano numa solução de ácido clorídrico não se observou a formação de nanopartículas com o tamanho pretendido nem com boa estabilidade quando comparado com o ácido acético. Segundo Gartner *et al.*, 2011 o quitosano diluído em meio ácido contém unidades de glucosamina sob a forma de amins protonadas e neutras. Quando o quitosano está dissolvido num meio fraco, como o CH₃COOH, apenas uma fração dos grupos amina estará protonada, ao contrário do que acontece com um ácido forte, como o ácido clorídrico, em que os grupos amina vão estar todos protonados. A fração dissociada do ácido desempenha um papel importante na força iónica da solução e quando o CH₃COOH está em excesso, o grau de dissociação continua a ser bastante baixo ao contrário do que acontece com o HCl. Um excesso de CH₃COOH ou outro ácido fraco é mais favorável para a solubilidade do quitosano, uma vez que não se observa *salting out* (precipitação), ao contrário do que acontece quando se utiliza HCl em concentrações maiores que 1 M (Rinaudo *et al.*, 1999). Para além disso, Gartner *et al.*, 2011 verificou que quando o quitosano era dissolvido em HCl as interações eletrostáticas eram muito mais fortes e as estruturas mais rígidas ao contrário do CH₃COOH, em que as interações eram mais fracas e as estruturas apresentavam maior mobilidade. O tipo de ácido utilizado na dissolução do quitosano

também influencia a viscosidade da solução de quitosano. Com o CH_3COOH a viscosidade é muito menos influenciada do que quando o HCl (Rinaudo *et al.*, 1999).

Tendo em conta todos os factos apresentados anteriormente fez-se a dissolução do quitosano em ácido acético. A produção de nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP foi feita com base no procedimento já descrito na literatura (Fan *et al.*, 2012). Cerca de 5 mg de quitosano foram dissolvidas em 10 ml de uma solução de ácido acético com uma concentração de 0.2 mg/ml. A solução de quitosano foi misturada com um agitador magnético durante cerca de 42 horas à temperatura ambiente. O pH da solução resultante foi aproximadamente 3.7, sendo este ajustado para 4.7-4.8 usando uma solução de NaOH com uma concentração de 0.005 g/ml. Antes do ajuste do pH, a solução de quitosano foi filtrada com recurso a um filtro de seringa (tamanho do poro 1.2 μm) para remover os possíveis resíduos insolúveis presentes na solução.

Os reticulantes usados foram dissolvidos em 3 ml de água destilada com diferentes concentrações (1.5 mg/ml, 1.75 mg/ml), sendo que o TPP foi colocado no frigorífico à temperatura de aproximadamente 4 °C. Os restantes reticulantes foram mantidos à temperatura ambiente, uma vez que quando se experimentou utilizá-los a 4 °C, exibiram resultados piores.

A solução de quitosano foi aquecida num banho-maria a 60 °C durante 10 minutos. Posteriormente, esta solução foi colocada a agitar a 800 rpm numa placa de agitação e a solução de reticulante foi adicionada gota a gota à solução de quitosano, deixando esta a agitar durante 10 minutos. O procedimento foi o mesmo para todos os reticulantes, no entanto para o reticulante CD, ainda se experimentou trocar a ordem de adição, ou seja, adicionou-se a solução de quitosano à solução de CD. É de referir que, para cada tipo de reticulante, fizeram-se duas soluções de nanopartículas por forma a avaliar a reprodutibilidade do procedimento.

2.4.1 Encapsulamento do fármaco nas nanopartículas

O encapsulamento do naringin e a síntese das nanopartículas foi efetuada em simultâneo, uma vez que o quitosano e o naringin foram dissolvidos no mesmo meio sendo posteriormente adicionado o agente reticulante para a formação das nanopartículas carregadas com o fármaco.

O procedimento para a síntese das nanopartículas carregadas com naringin foi essencialmente o mesmo que para as nanopartículas sem o naringin. Inicialmente procedeu-se às mesmas etapas descritas no Secção 2.4. até à adição do agente reticulante. A introdução do fármaco foi feita quando se aqueceu a solução de quitosano num banho-maria a 60 °C e deixou-se dissolver o naringin na solução de quitosano durante mais 10 minutos. A concentração do

naringin utilizada foi de 0.5 mg/ml e 1 mg/ml, tendo sido colocado 6.5 mg e 13 mg, respetivamente, nos 10 ml de solução de quitosano. Posteriormente, adicionou-se o reticulante nas mesmas condições descritas anteriormente.

A síntese das nanopartículas carregadas com naringin foi feita utilizando apenas o TPP e a CD, uma vez que foram estes os agentes reticulantes que apresentavam melhores resultados relativamente ao tamanho e à estabilidade das partículas ao longo do tempo.

2.4.2 Métodos de caracterização das nanopartículas

A distribuição de tamanhos das partículas foi analisada através de uma técnica de Dispersão Laser, mais especificamente a Dispersão Dinâmica da Luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS), conhecida também por *Quasi-Elastic Light Scattering* (QELS) ou *Photon Correlation Spectroscopy* (PCS). Esta é uma técnica não invasiva e bem estabelecida para a medição do tamanho de partículas ou moléculas, menores que 1 μm , de soluções ou suspensões (Malvern, 2014).

O equipamento utilizado para a determinação da distribuição de tamanhos foi o ZetaSizer Nano da Malvern do Laboratório de Tecnologia de Sólidos do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (FCTUC). Este equipamento permite medir não só o tamanho de partícula através da Dispersão Dinâmica da Luz mas também o potencial zeta através da Dispersão Eletroforética da Luz (*Electrophoretic Light Scattering*-ELS) (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004).

O princípio de funcionamento para determinar o tamanho das partículas é simples: a amostra é iluminada por um feixe de laser e o movimento browniano das partículas em suspensão faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004). A análise dessas flutuações de intensidade da luz dispersa permite determinar a velocidade à qual as partículas são difundidas devido ao movimento Browniano. O sistema ZetaSizer Nano mede esta taxa de flutuação da intensidade e, em seguida, utiliza-a para calcular o tamanho de partículas (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004). Com a distribuição do coeficiente de difusão é possível a conversão para uma distribuição do diâmetro hidrodinâmico utilizando a equação de *Stokes-Einstein* (Equação 2) (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004; Horiba Scientific, 2014).

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_h} \quad (2)$$

onde D é o coeficiente de difusão, K_B é a constante de Boltzman, T é a temperatura absoluta, μ é a viscosidade dinâmica e D_h é o diâmetro hidrodinâmico.

O *Z-average* é o parâmetro usado em DLS, também conhecido pela média de cumulantes, que traduz o melhor resultado da distribuição do diâmetro hidrodinâmico (Malvern Instruments Worldwide, 2011). Para caracterizar o tamanho das partículas utiliza-se o diâmetro hidrodinâmico (D_h) que é o diâmetro equivalente de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão translacional da partícula que está a ser medida.

No que diz respeito ao potencial zeta, o princípio físico fundamental aqui utilizado é o da eletroforese. A dispersão é injetada numa célula que contém dois elétrodos e, posteriormente, é aplicado um campo elétrico a esses elétrodos. As partículas que têm carga efetiva deslocam-se em direção ao elétrodo com carga oposta com uma velocidade designada por mobilidade que está relacionada com o seu potencial zeta. Esta velocidade das partículas é medida utilizando o *Laser Doppler Velocimetry* (LDV). A velocidade das partículas é dependente da força do campo elétrico, da constante dielétrica do meio, da viscosidade do mesmo e do potencial zeta das partículas (Malvern, 2014).

Como referido anteriormente, o potencial zeta foi medido através da Dispersão da Luz Eletroforética que é uma técnica utilizada para medir a mobilidade eletroforética das partículas em dispersão ou moléculas em solução (Malvern, 2014). Esta mobilidade é medida pelo ZetaSizer Nano e de seguida convertida em potencial zeta através da aplicação da equação de Henry (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004). Para tal, recorreu-se à (Equação 3).

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(ka)}{3 \eta} \quad (3)$$

onde U_E é a mobilidade eletroforética, z é o potencial zeta, ε é a constante dielétrica, η é a viscosidade e $f(ka)$ é a função de Henry.

O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou atração eletrostática entre as partículas e é um dos parâmetros fundamentais que afeta a estabilidade (Malvern, 2014). Este parâmetro serve para caracterizar se a partícula imersa num líquido tende a flocular ou não. Se todas as partículas em suspensão tiverem um grande potencial zeta negativo ou positivo então estas têm tendência para se repelirem umas das outras e não floculam. Contudo, se as partículas tiverem valores de potencial zeta baixos significa que não existe nenhuma força para prevenir que as partículas se agreguem e floculem. Desta forma, consideram-se partículas estáveis aquelas que possuem potencial zeta mais positivo que +30 mV ou mais negativo que -30 mV (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004).

Um dos fatores que mais afeta o potencial zeta é o pH. Se se adicionar uma solução mais alcalina a uma partícula em suspensão com potencial zeta negativo as partículas tendem a adquirir uma carga mais negativa. No caso de se adicionar ácido a esta suspensão será alcançado um ponto em que as cargas negativas são neutralizadas. Se se ultrapassar o ponto em que as partículas estão totalmente neutralizadas existirá um aumento das cargas positivas. O ponto em que o potencial zeta é zero é conhecido por ponto isoelétrico significando que o sistema coloidal está menos estável (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004).

Relativamente à morfologia das partículas, esta foi analisada através da Microscopia Eletrónica de Varrimento (*Scanning Electron Microscopy* - SEM) disponibilizada pelo Instituto Pedro Nunes (IPN) em Coimbra. O SEM permitiu avaliar não só a morfologia das partículas, mas também o seu tamanho e as suas características de superfície. O princípio de funcionamento do Microscópio Eletrónico de Varrimento é relativamente simples. Um feixe de eletrões é produzido na parte superior do microscópio através de uma espécie de canhão de eletrões. Este feixe é direcionado verticalmente para a amostra ao longo do microscópio, o qual é mantido em vácuo. Até atingir a amostra, o feixe de eletrões atravessa campos e lentes eletromagnéticas que focam o feixe na direção pretendida. Quando o feixe atinge a amostra, eletrões e raios-X são ejetados a partir desta, sendo coletados a partir de detetores que os convertem num sinal que é enviado para um monitor, produzindo a imagem final (Purdue University, 2014). Estes sinais, que derivam das interações entre o feixe de eletrões e a amostra, podem fornecer informações sobre a amostra, incluindo morfologia externa, composição química, estrutura cristalina e orientação dos materiais que a compõem (Geochemical Instrumentation and Analysis, 2014) normalmente quando conjugados com outras técnicas de análise.

Para a preparação das amostras de nanopartículas para a análise, espalharam-se pequenas gotas numa fita adesiva de grafite, colocada sobre o suporte metálico do microscópio eletrónico e secaram-se as amostras a 40 °C. Como se tratam de partículas poliméricas, foi necessário o seu revestimento com uma camada de ouro uma vez que estas não são condutoras.

2.5 Preparação de géis à base de *k*-carragenano carregado com naringin

Um dos principais objetivos do trabalho é retardar o perfil de libertação do fármaco. Para tal, produziram-se nanopartículas de quitosano para serem incorporadas em géis possíveis de serem injetados no local pretendido. Assim, foram estudados os géis de forma individual para posteriormente se incorporarem as nanopartículas.

Numa primeira fase, produziram-se hidrogéis de quitosano segundo as condições de Chenite *et al.*, 2000, utilizando glicofosfato (GP) como reticulante físico, uma vez que é um termogel que gelifica a 37 °C, e tentou-se incorporar as nanopartículas nestes. As concentrações utilizadas neste ensaio encontram-se apresentadas no Anexo II. Inicialmente, produziram-se apenas os hidrogéis de quitosano e avaliou-se a influência do tipo de ácido (ácido acético ou ácido clorídrico) utilizado para dissolver o quitosano na formação do gel. Verificou-se que, neste caso (e ao contrário da formação das nanopartículas de quitosano), o HCl era o mais indicado, uma vez que levou à formação de um gel, ao contrário do ácido acético que não originou a formação de um gel nem de qualquer tipo de estrutura rígida. Posteriormente, incorporaram-se as nanopartículas de quitosano no hidrogel de quitosano dissolvido em HCl mas o sistema apresentou pouca estabilidade. Isto talvez pelo facto das nanopartículas apresentarem carga positiva bem como o hidrogel de quitosano, não havendo qualquer tipo de interação (havendo provavelmente repulsão de cargas) entre os dois tipos de sistemas para manter a estrutura estável.

Para além dos ensaios descritos anteriormente, foram feitos testes para produzir géis de quitosano usando líquidos iónicos como agentes de gelificação. Foram testados os mesmos líquidos iónicos utilizados para a preparação das nanopartículas, como a CB e a CD. Os resultados mostraram que a CB não apresentou qualquer ação gelificante, ao contrário da CD, em que se produziram estruturas próximas de um gel. Contudo, após incorporação das nanopartículas de quitosano nestes sistemas, não se verificou a formação de géis estáveis (ver Anexo II e Anexo III).

Para contornar este facto recorreu-se a outro biopolímero que possui grupos carregados negativamente na sua estrutura e um maior poder gelificante, tal como referido na Secção 1.3. Inicialmente, testaram-se o τ -carragenano e *k*-carragenano com diferentes concentrações até se concluir qual o tipo e concentração de carragenano mais indicado para a aplicação desejada, tendo-se decidido pela utilização do *k*-carragenano numa concentração de 2.5 % (w/v) (ver Anexo IV).

Para a preparação do gel carregado com naringin dissolveram-se 50 mg de *k*-carragenano em 2 ml de água destilada num banho a 70 °C durante 1 h com uma agitação de 1200 rpm. Posteriormente, diminui-se a temperatura para 60 °C e adicionou-se 0.5 mg ou 1 mg de naringin (concentração de naringin de 0.25 mg/ml e 0.5 mg/ml, respetivamente), deixando este a dissolver durante mais 1 h. Retiraram-se as amostras do banho e deixaram-se a arrefecer/envelhecer durante cerca de 14 h. A síntese do gel foi realizada em seringas para facilitar a obtenção de géis com dimensão uniforme em forma de disco.

2.6 Preparação de géis à base de *k*-carragenano e nanopartículas de quitosano carregadas com naringin

Após o estudo individual dos sistemas de libertação preparados, conjugaram-se os dois sistemas, nanopartículas e géis, com o objetivo de retardar o perfil de libertação, uma vez que ao incorporar as nanopartículas nos géis tem-se duas resistências à transferência de massa.

Prepararam-se previamente as nanopartículas de quitosano carregadas com naringin segundo a metodologia descrita na Subsecção 2.4.1. De seguida, procedeu-se à preparação dos géis à base de *k*-carragenano em seringas. Dissolveram-se 2.5% de *k*-carragenano em 1 ml de água destilada num banho a 70 °C durante 1 hora com uma agitação próxima de 1200 rpm e, após arrefecer o banho para 60 °C, adicionou-se 1 ml da solução de nanopartículas encapsuladas com naringin, deixando a agitar a 800 rpm durante mais 1 h. Retiraram-se as amostras do banho e deixaram-se a arrefecer/envelhecer durante a noite.

2.7 Estudos de libertação de naringin a partir de diferentes matrizes

Por forma a determinar o perfil de libertação do naringin foram realizados testes *in vitro* a partir de diferentes matrizes (nanopartículas, gel e nanopartículas incorporadas no gel) em meio fisiológico simulado, constituído por uma solução tampão fosfato-salino (PBS) com um pH próximo de 7. As amostras foram colocadas em frascos de 20 ml imersas em 15 ml de PBS e deixadas sob agitação orbital (100 rpm) e a 37 °C (no *thermoshaker*), tendo-se efetuado recolhas do meio sobrenadante a vários tempos para, posteriormente, quantificar o naringin libertado por espectrofotometria UV/visível.

Para efetuar os ensaios de libertação a partir das nanopartículas, colocou-se cerca de 1 ml das mesmas em membranas de diálise que por sua vez foram colocadas em frascos de 20 ml com 15 ml de PBS. No caso dos géis, com e sem incorporação de nanopartículas, colocaram-se os cilindros que se formaram dentro da seringa (tal como descrito nas secções 2.5 e 2.6) diretamente na solução de PBS (15 ml). Para além disso, realizaram-se os brancos dos diferentes sistemas utilizados.

Em intervalos de tempo definidos, $t(h)=0; 0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 4; 5; 6; 7; 8$, retiraram-se amostras de cerca de 2.5 ml e analisaram-se num espectrofotómetro UV/visível Jasco, modelo V650. Inicialmente, esta técnica foi utilizada para a determinação da curva de calibração do naringin e, posteriormente, para determinar o perfil de libertação deste através das várias matrizes.

A espectroscopia é uma técnica que mede a interação de moléculas com a radiação eletromagnética. A luz perto do ultravioleta (UV) e na gama do visível do espectro eletromagnético tem uma energia correspondente de cerca de 150-400 kJ mol⁻¹ (Schmid, 2001). A energia da luz permite aos elétrons que se encontram no estado fundamental passem para o estado excitado. Um espectro é obtido quando a absorção de luz é medida como uma função da sua frequência ou do seu comprimento de onda (Schmid, 2001).

Os espectrofotômetros contêm normalmente duas fontes de luz: uma lâmpada de deutério, que emite luz na região do UV e uma lâmpada de tungsténio-halogéneo para a região do visível. A luz depois de passar por um monocromador é focada na cuvete e a quantidade de luz que passa através da amostra é detetada por um fotomultiplicador ou um fotodíodo que, por sua vez, produz o espectro da amostra analisada (Schmid, 2001).

A espectrofotometria tem como base a lei de Lamber-Beer (Equação 4) que relaciona a absorção da luz com as propriedades do material através do qual a luz atravessa (Braga, 2010):

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

Onde A é absorvância, ϵ é o coeficiente de absorção, c é a concentração e d é a distância percorrida pelo feixe através da amostra.

A quantidade de luz que atravessa a solução é designada por transmitância, T , e é expressa pela razão entre a intensidade da luz transmitida, I_t , e a intensidade da luz inicial do feixe de luz, I_0 (Braga, 2010):

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (5)$$

Estas duas equações apresentadas anteriormente podem relacionar-se entre si, uma vez que a absorvância (A) é o inverso logarítmico da transmitância, sendo, assim, possível conhecer A através de T :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \epsilon cd \quad (6)$$

Assim, obtendo a absorvância a partir do espectrofotómetro foi possível determinar a concentração do naringin na amostra, relacionando a absorvância obtida com a curva de calibração do fármaco (ver Anexo IV). A equação da curva de calibração encontra-se representada na Equação 7, sendo c a concentração e A a absorvância, tendo-se obtido um coeficiente de correlação de 0.9955.

$$c = 0.0362A \quad (7)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos neste trabalho, bem como a respetiva discussão, no que respeita a caracterização das partículas e dos géis, e os ensaios de libertação feitos a partir dos diferentes sistemas preparados para libertação controlada do fármaco naringin. Sempre que necessário foram também analisados os sistemas sem fármaco para efeitos comparativos e melhor compreensão dos sistemas.

3.1 Análise morfológica dos diferentes sistemas preparados

A Figura 8 mostra o aspeto da solução de partículas obtidas da reticulação com TPP (Fig. 8 (a)) e das partículas reticulada com CD (Fig. 8 (b)). No caso das nanopartículas reticuladas com TPP, a solução ficou com um aspeto turvo, confirmando a formação de nanopartículas. No caso das partículas reticuladas com CD, a solução ficou com um aspeto mais límpido, provavelmente pelo facto de se terem formado um menor número de partículas com tamanho ligeiramente maior.

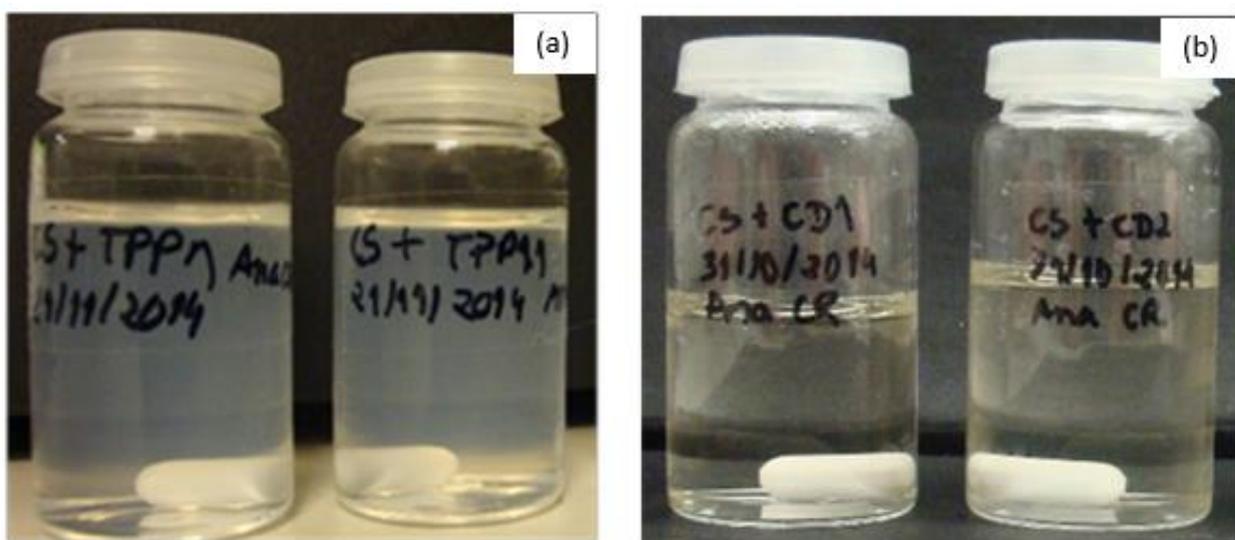


Figura 8 – Partículas reticuladas com TPP (a) e reticuladas com CD (b).

Tal como já foi descrito, as nanopartículas foram incorporadas em géis de *k*-carragenano, resultando em estruturas com aspeto de gelatina, como se pode observar pela Figura 9. Do lado esquerdo da imagem, encontram-se dois géis com naringin, apresentando uma estrutura mais transparente e ligeiramente amarelada, e do lado direito, encontram-se dois géis com partículas incorporadas, apresentando um aspeto mais turvo.



Figura 9 – Géis de *k*-carragenano 2.5% (w/v) incorporados com naringin (à esquerda) e incorporados com nanopartículas carregadas com naringin (à direita).

Para avaliar a morfologia dos diferentes SLCs, recorreu-se à técnica de SEM que teve por objetivo confirmar a existência de partículas com tamanhos à escala nano, para além de conhecer a sua morfologia, e características de superfície. Tal como ilustra a Figura 10 (a, b e c) obtiveram-se nanopartículas de TPP com uma morfologia quase esférica. Através da Figura 10 (e, f e g) é possível verificar a existência de partículas de CD com características semelhantes às partículas preparadas com TPP, apresentando também uma forma quase esférica. No que respeita ao tamanho, constata-se que as partículas de CD parecem ser as que têm um maior tamanho. Para além disso, no caso das imagens das nanopartículas reticuladas com TPP, é visível uma maior densidade de partículas, quando comparadas com as imagens das nanopartículas de CD. É de notar ainda que os tamanhos das partículas apresentados pelo SEM aparentam ser ligeiramente menores do que aqueles revelados pelo DLS (ver Secção 3.2), uma vez que as amostras para a análise de SEM terem que ser secas previamente, revelando diâmetros de partículas secas o que não acontece no caso do DLS, onde os diâmetros obtidos são característicos de partículas consideradas hidratadas.

No caso dos géis de *k*-carragenano com nanopartículas carregadas com naringin, foi possível concluir através da Figura 10 (d, h), a existência de nanopartículas no meio dos géis. Através das várias imagens apresentadas, é possível observar-se ainda a presença de partículas com tamanhos maiores do que aqueles obtidos para as nanopartículas, que devem resultar de possíveis aglomerações entre partículas.

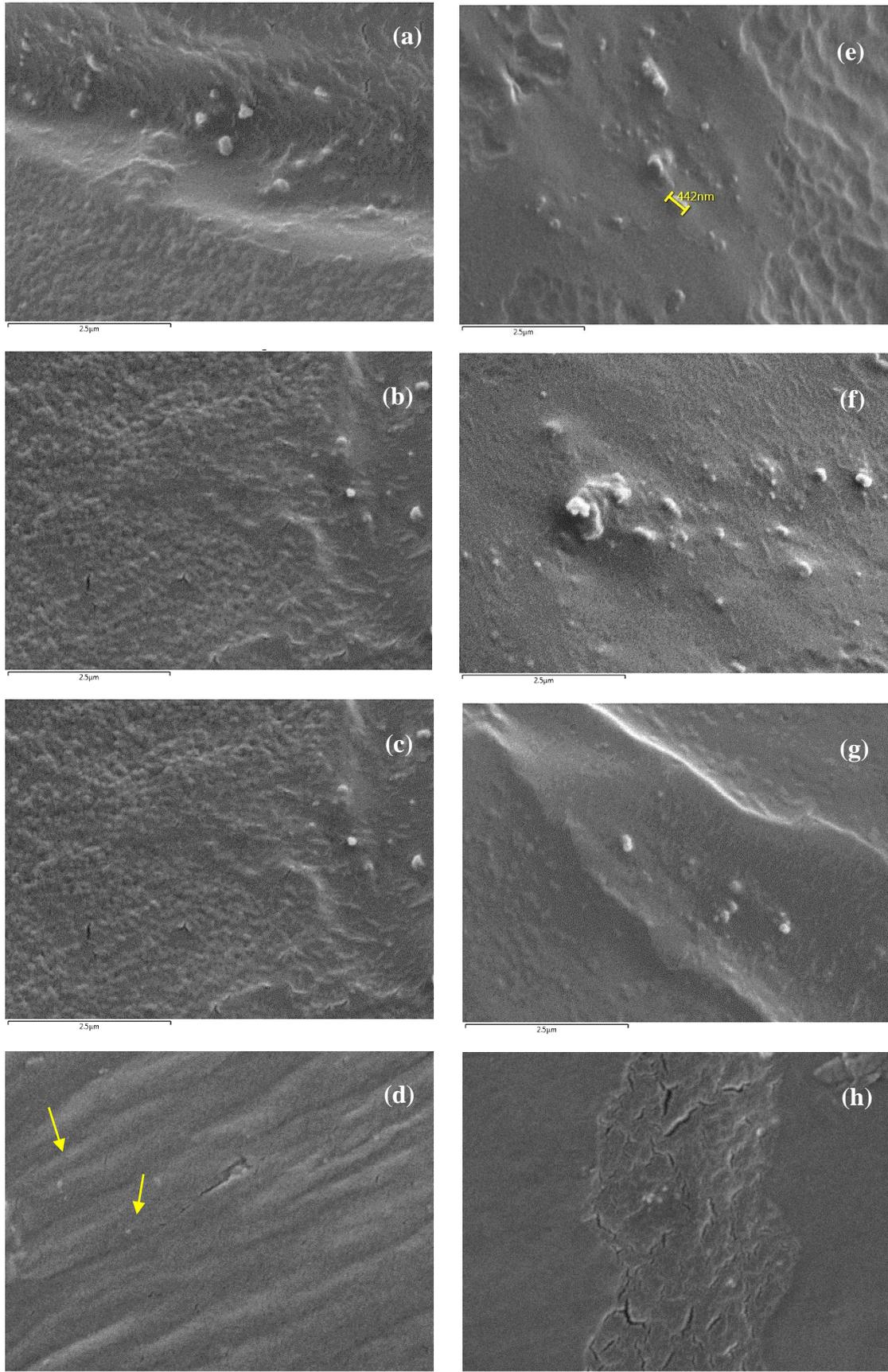


Figura 10 - NP/CS/TPP/NAR0.5: ampliadas 15000 vezes (a); ampliadas 20000 vezes (b); ampliadas 35000 vezes (c). CRR2.5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (d). NP/CS/CD/NAR0.5: ampliadas 15000 vezes (e); ampliadas 20000 vezes (f); ampliadas 35000 vezes (g). CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 (h).

Na Figura 11 encontram-se representadas as imagens ampliadas 15000 vezes relativas ao gel de *k*-carragenano com naringin (a) e ao gel com naringin reticulado com 5% de KCl (b), sendo possível concluir através destas que a reticulação induz maior rugosidade à matriz de carragenano.

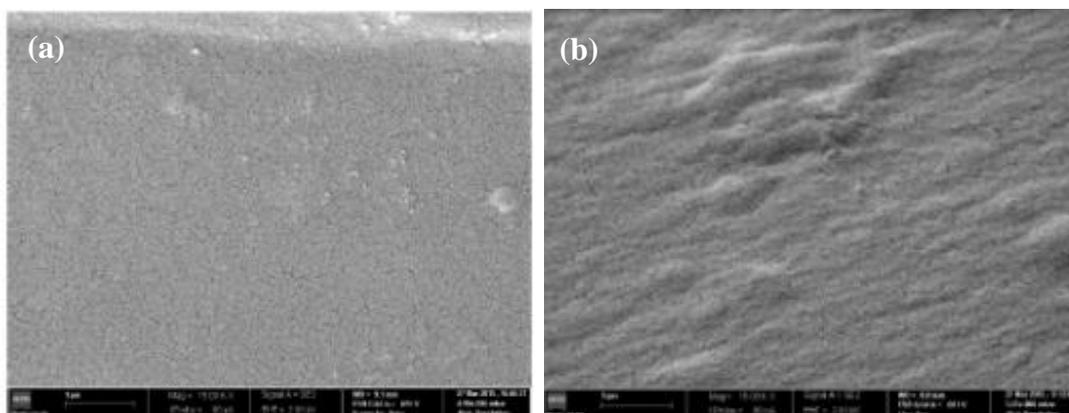


Figura 11 - CRR2.5/NAR0.5 (a) e CRR2.5/KCl5/NAR0.5 (b) ampliados 15000 vezes.

A Figura 12 representa o gel de carragenano com nanopartículas de TPP carregadas com naringin (Fig. 12 (a)) e o gel de carragenano reticulado com 5% de KCl e com nanopartículas de TPP carregadas com naringin (Fig. 12 (b)), ampliados 15000 vezes. Ao observar a figura é de notar mais uma vez que a reticulação veio tornar a matriz mais densa e com mais rugosidade, verificando-se também com mais detalhe nas imagens ampliadas 35000 vezes. Para além disso, é observável a falta de presença de nanopartículas nos dois casos, podendo significar que estas estão mais integradas na matriz, não se verificando a sua presença à superfície.

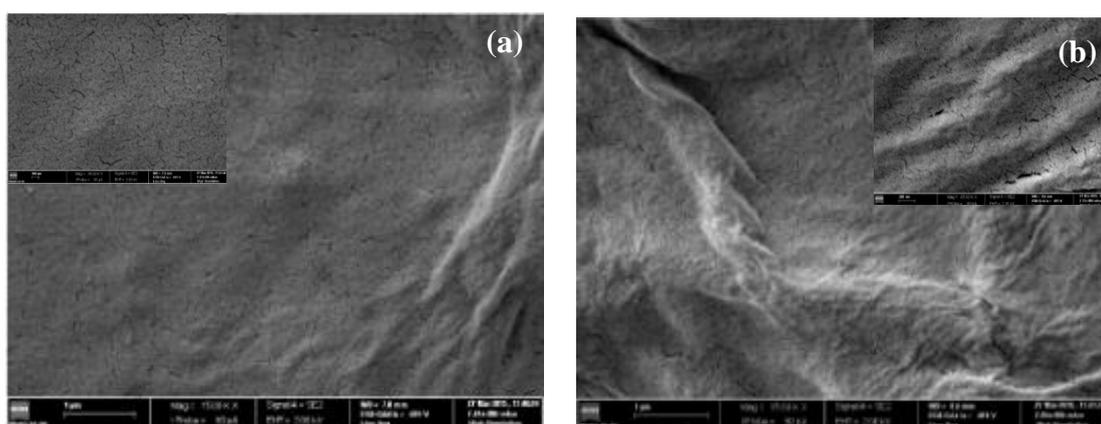


Figura 12- CRR2.5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (a) e CRR2.5/KCl5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (b) ampliados 15000 vezes e com um detalhe de 35000 vezes.

Na Figura 13 encontram-se representados o gel de *k*-carragenano com nanopartículas de CD carregadas com naringin (Fig. 13 (a)), ampliado 20000 vezes, e o mesmo gel reticulado

com 5% de KCl (Fig. 13 (b)), ampliado 15000 vezes. É possível concluir novamente através destas imagens que a reticulação induz rugosidade ao sistema. No entanto, contrariamente ao que acontece com a matriz de carragenano com as nanopartículas de TPP, aqui são visíveis as nanopartículas de CD, apresentando-se em algumas zonas em forma de aglomerados, o que deve significar que as partículas de TPP devem estar mais integradas na matriz do que as de CD. Contudo, seriam precisas mais imagens de SEM para tirar conclusões mais esclarecedoras acerca desta questão.

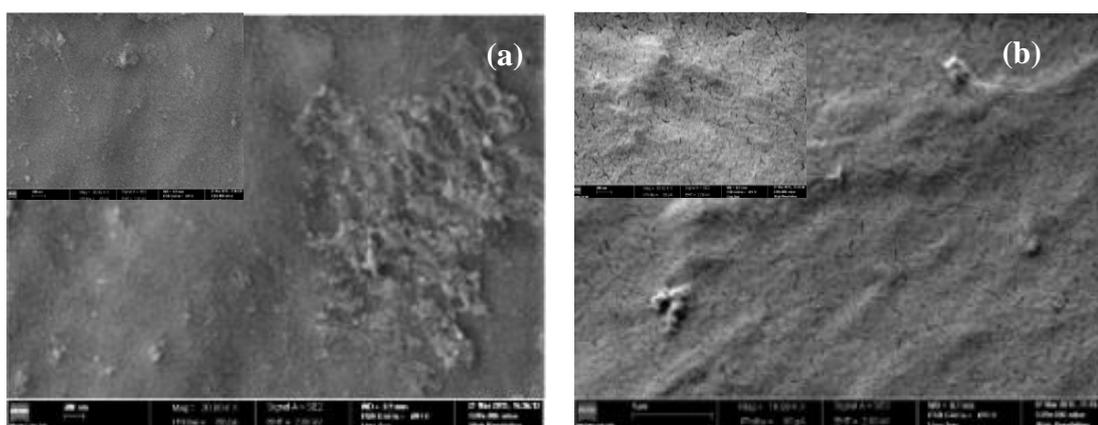


Figura 13 - CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 ampliado 20000 vezes (a) e CRR2.5/KCl5/NP/CS/CD/NAR0.5 (b) ampliado 15000 vezes e com um detalhe de 35000 vezes.

3.2 Distribuição de tamanhos das nanopartículas ao longo do tempo

O tamanho das partículas é um dos parâmetros mais importantes no que diz respeito ao seu uso como SLC, uma vez que influencia significativamente muitas propriedades das partículas, designadamente a cinética de libertação do fármaco. Desta forma, procedeu-se à análise da distribuição de tamanhos das nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP e com CD, fazendo um estudo do seu comportamento ao longo do tempo. Nesta secção serão apresentados três parâmetros essenciais para a caracterização das nanopartículas nomeadamente o tamanho (aqui definido como *Z-average*), o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta. Estes parâmetros foram avaliados com recurso à técnica DLS.

A Figura 14 (a) apresenta os resultados obtidos do tamanho das partículas de quitosano reticuladas com TPP, com e sem incorporação de naringin. É possível verificar a existência de partículas à escala nano e, considerando que os erros experimentais associados são relativamente pequenos (desvio padrão baixo), verifica-se que as partículas com naringin aumentaram ligeiramente o seu tamanho. De qualquer forma as nanopartículas mantêm-se

estáveis ao longo das 72 h de monitorização tendo-se verificado um aumento de ~ 4 % e ~ 16 % no caso das partículas sem e com fármaco, respetivamente. O aumento verificado para as partículas com fármaco ocorreu entre as 2 e as 24 h após síntese das nanopartículas, mantendo-se constante (dentro do erro experimental) após esse período. Estes resultados parecem indicar que na presença de naringin o sistema precisa de mais algum tempo para atingir o equilíbrio e tornar-se um sistema estável.

A Figura 14 (b) apresenta os resultados obtidos para o tamanho das partículas de quitosano reticuladas com CD, com e sem incorporação do fármaco. É de salientar, desde já, que por lapso o tamanho das partículas sem o fármaco não foi feito para as 24 e 48 h. No entanto, ao fim de 72h verificou-se que o sistema se encontrava estável.

Os resultados indicam que é possível obter nanopartículas estáveis usando a CD como reticulante do quitosano. No entanto, obtiveram-se partículas com um tamanho relativamente maior aos das partículas reticuladas com TPP. No caso das nanopartículas sem naringin, o tamanho variou entre 213 e 222 nm. Para as partículas com naringin obtiveram-se valores ligeiramente maiores, com variações entre 331 e 347 nm, e de acordo com os resultados obtidos usando o TPP como reticulante. De notar que os ensaios de estabilidade das partículas sem o fármaco prolongaram-se para além das 72 h, obtendo-se um valor de *Z-average* de 217 nm ao fim de 10 dias. Contudo, como as variações não foram significativas, não se encontram apresentados aqui a continuação destes estudos.

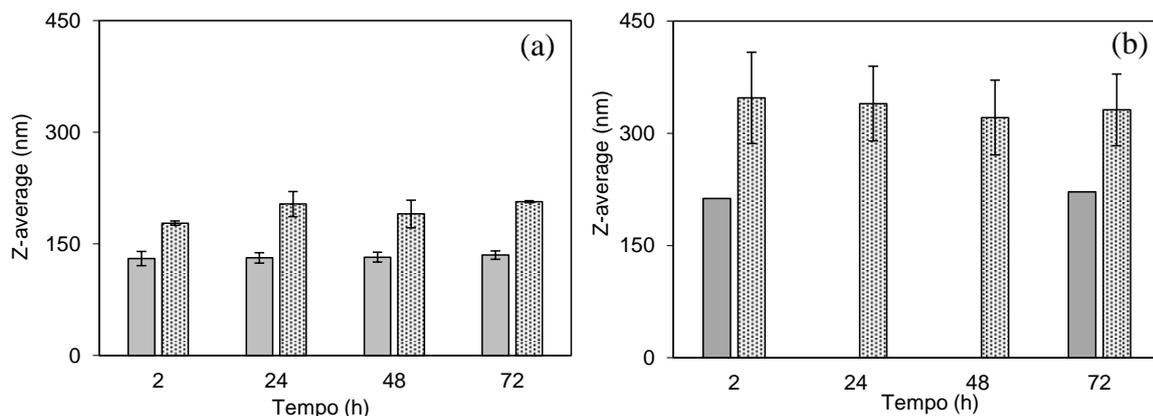


Figura 14 – *Z-average* (nm) das partículas de quitosano reticuladas com TPP (a) e reticuladas com CD (b) com incorporação de naringin (▨) e sem incorporação de naringin (■).

No que diz respeito ao PDI, como se pode observar pela Figura 15 (a), verificou-se que as partículas reticuladas com TPP e sem o fármaco apresentam um PDI mais elevado do que as partículas com fármaco. Nas partículas sem naringin, o PDI não varia de forma significativa, apresentando um valor próximo de 0.27 ao longo das 72 h. No caso das partículas com naringin, o PDI também se mantém relativamente constante com um valor aproximado de 0.20. É de

notar que no caso das partículas com naringin, os desvios foram consideravelmente elevados, provavelmente devido a erros do operador e a fatores inerentes ao equipamento. Tendo em conta que os valores de PDI nos dois casos foram relativamente baixos ($PDI < 0.5$), pode-se afirmar que se está próximo de um sistema monodisperso (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004). Este resultado é importante para os estudos de libertação, uma vez que a polidispersividade limita seriamente a eficiência de libertação do fármaco (Fan *et al.*, 2012).

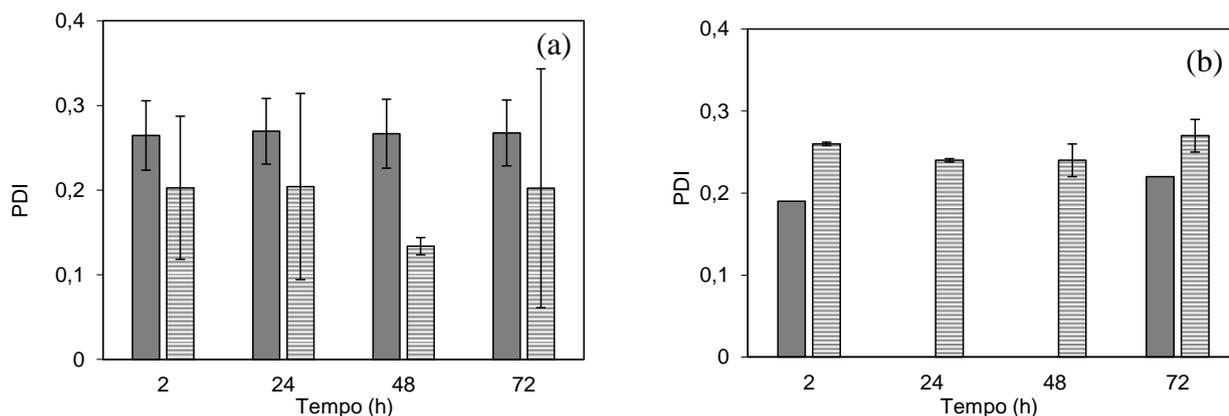


Figura 15 - PDI das partículas de quitosano reticuladas com TPP (a) e reticuladas com CD com incorporação de naringin (▨) e sem incorporação de naringin (■).

No caso das partículas de quitosano reticuladas com CD (Figura 15(b)) conclui-se que o valor do PDI é mais elevado para o caso das partículas com fármaco. Para as partículas sem o fármaco obteve-se um PDI com valores entre 0.19 e 0.22 e no caso das partículas com o fármaco obteve-se um PDI com valores entre 0.24 e 0.27, com valores de desvios padrão consideravelmente pequenos. Estes valores revelam que os dois sistemas, partículas sem o fármaco e partículas com o fármaco, como apresentam valores de PDI consideravelmente pequenos, estão próximos de um sistema monodisperso.

Na Figura 16 (a) encontram-se representados os valores obtidos para o potencial zeta das partículas reticuladas com TPP, com e sem o fármaco. No caso das nanopartículas sem naringin, o potencial zeta variou aproximadamente entre +48 mV e +50 mV, apresentando desvios relativamente elevados. Já para as nanopartículas com naringin, os valores obtidos foram ligeiramente mais baixos (~18 %). O valor positivo do potencial zeta indica que as partículas possuem carga positiva em torno da sua superfície, como seria de esperar, devido aos grupos protonados do quitosano. Isto verificou-se também nas partículas incorporadas com o fármaco, o que indica que este está incorporado na matriz e não aderido à superfície. Para as partículas serem consideradas estáveis, como referido na Subsecção 2.4.2, têm que apresentar um potencial zeta de ± 30 mV (Zetasizer Nano Series User Manual, 2004), o que não acontece

em nenhum dos casos. No entanto, é de notar que no caso das partículas com naringin estas apresentam um valor de potencial zeta mais próximo do valor referente às partículas quando se encontram estáveis. Com o reticulante CD (Figura 16 (b)) obteve-se um potencial zeta que varia entre 37 e 40 mV para as partículas sem fármaco e valores ligeiramente maiores, variando aproximadamente entre 41 e 43 mV para as partículas com fármaco. Desta forma, é possível concluir que, tal como no caso das nanopartículas reticuladas com TPP, estas partículas estão próximas de se encontrar estáveis.

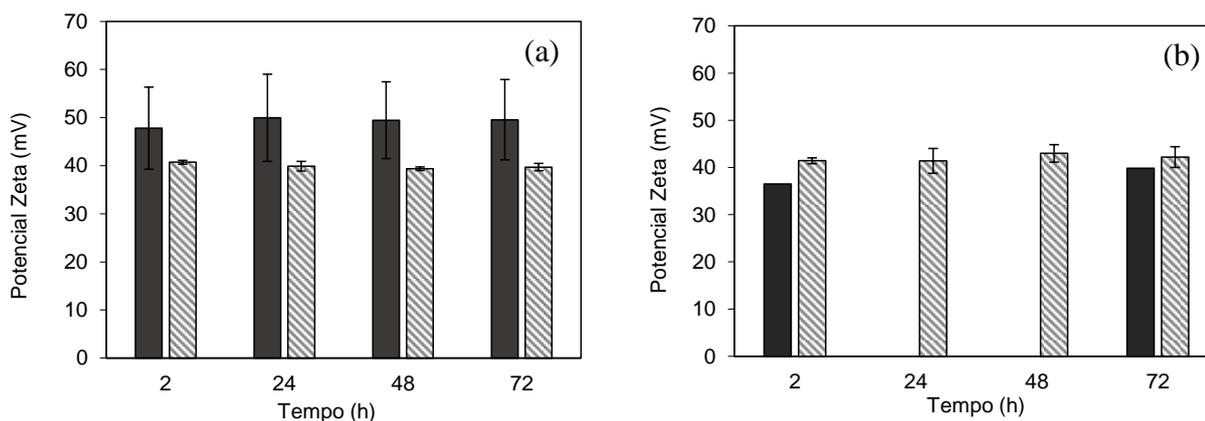


Figura 16 - Potencial zeta das partículas de quitosano reticuladas com TPP (a) e reticuladas com CD (b) com incorporação de naringin (▨) e sem incorporação de naringin (■).

Ao analisar os resultados dos parâmetros obtidos das nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP preparadas no laboratório, verifica-se que estes estão muito próximos dos já reportados na literatura. Fan *et al.*, 2012 estudou o efeito de vários parâmetros na formação destas nanopartículas com o objetivo de melhorar a estabilidade e aumentar a monodispersividade destas, tendo obtido partículas de tamanho entre 130 e 240 nm, com um PDI que variava entre 0.05 e mais que 0.2 e com um potencial zeta que variava entre + 26 mV e + 40 mV.

Ao comparar os resultados obtidos para as partículas reticuladas com TPP e as partículas reticuladas com CD, observa-se que os valores dos parâmetros avaliados, quando se usa o reticulante CD, são relativamente maiores. No entanto, estes resultados continuam dentro da gama de valores esperada, concluindo que o CD pode ser usado como reticulante em alternativa ao TPP.

É de referir ainda o papel fundamental do pH no que se refere à estabilidade das partículas ao longo do tempo, uma vez que quando não se acerta o pH da solução de quitosano para 4.8 (tal como descrito na Secção 2.4) estas apresentam tamanhos médios superiores.

3.3 Estudos de libertação do naringin a partir de diferentes matrizes

Os ensaios de libertação do naringin *in vitro* permitiram obter diferentes curvas de libertação consoante a matriz utilizada. Os perfis de libertação do naringin, obtidos a partir dos diferentes sistemas, serão apresentados de seguida com a sua correspondente análise.

Na Figura 17 encontram-se representados os perfis de libertação do naringin a partir das nanopartículas de quitosano reticuladas com TPP e com CD.

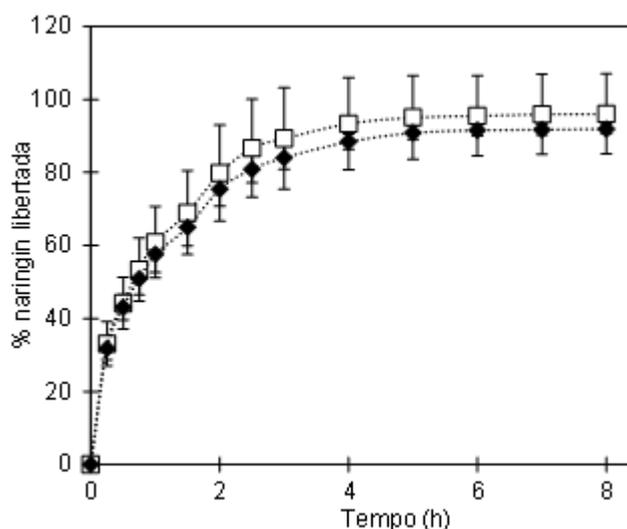


Figura 17- Perfis de libertação NP/CS/TPP/NAR0.5 (□) e NP/CS/CD/NAR0.5 (◆).

Ao observar as duas curvas, e tendo em conta o desvio experimental, é possível concluir que não existe uma diferença significativa entre os dois tipos de reticulante no que diz respeito à percentagem de naringin libertada. Os perfis de libertação para os dois reticulantes são muito semelhantes até ao final da primeira hora de libertação, quando se liberta cerca de 60% de naringin. A partir das 6 h de libertação o perfil acabou por estabilizar, verificando-se a libertação quase total do fármaco: 96 % de naringin para as partículas reticuladas com TPP e 92% para as reticuladas com CD.

A libertação a partir das nanopartículas foi bastante rápida, o que pode ser justificado pelo facto do fármaco não apresentar carga e, assim, não existir qualquer tipo de interação iónica com o quitosano, por forma a permitir um melhor controlo da libertação, como acontece na maioria dos sistemas encontrados na literatura (Dong *et al.*, 2013; Yoksan *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 1997).

A partir da Figura 18 (a) e (b) é possível avaliar o efeito da concentração do fármaco nos géis à base de *k*-carragenano 2.5% (w/v) carregados com 0.5 mg de naringin e com 1 mg de naringin, respetivamente. Os perfis de libertação estão representados em relação à massa de

naringin libertada por massa de carragenano (Fig. 18(a)) e em termos de percentagem de naringin libertada (Fig. 18 (b)).

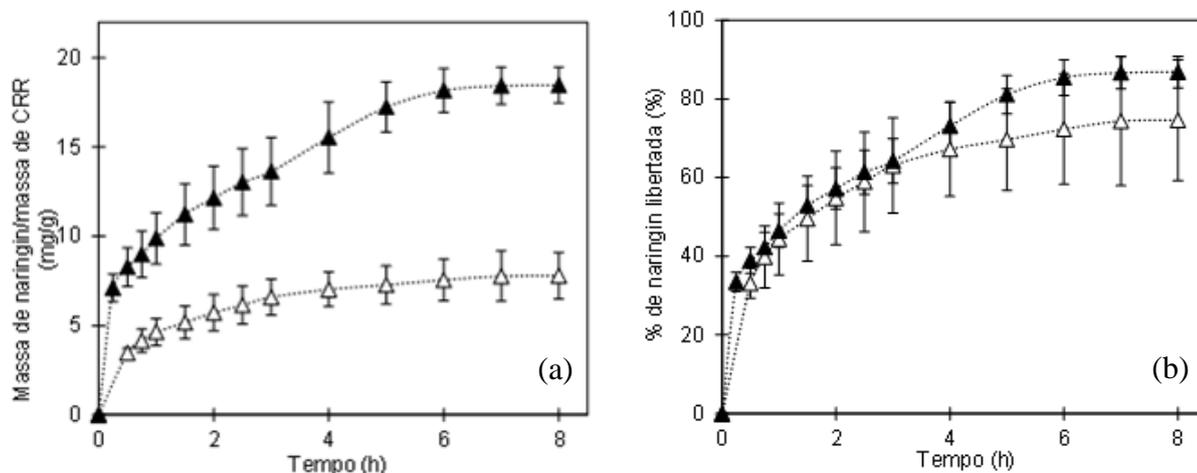


Figura 18 - Perfis de libertação do CRR2.5/NAR0.5 (Δ) e CRR2.5/NAR1 (\blacktriangle) em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).

Ao observar a Figura 18, conclui-se que o gel com uma quantidade menor de naringin liberta menos fármaco comparativamente com o que tem uma maior quantidade de naringin. No entanto, em termos de % de naringin libertada, obtém-se resultados idênticos ambos com desvios relativamente pequenos.

De acordo com as massas de naringin incorporadas no gel de *k*-carragenano é possível preparar sistemas de libertação que correspondem a diferentes dosagens terapêuticas, nomeadamente 10 mg naringin/g de carragenano e 20 mg naringin/g carragenano (Fig. 18 (a)). Estes valores teóricos não são atingidos pelo que se conclui que a libertação de naringin não é total, sendo a dosagem conseguida *in vitro* e nas condições testadas de 7.8 mg de naringin/g de carragenano e 18.5 mg de naringin/g de carragenano, respetivamente. Ao analisar a Figura 18 (b) verifica-se que o perfil de libertação das duas curvas é muito semelhante até às 3 h do ensaio (com libertação de 63% para o gel com 0.5 mg de naringin e cerca de 64% para o gel com 1 mg de naringin). A partir dessa hora, a percentagem de naringin libertada é maior para o gel com 1 mg de naringin, libertando-se até 87%, e menor para o gel com 0.5 mg de naringin, libertando-se cerca de 75%.

A Figura 19 mostra o efeito da utilização do KCl em diferentes concentrações, 5% e 10%, atuando como reticulante do *k*-carragenano e tendo sido incorporado 1 mg de naringin nos diferentes géis.

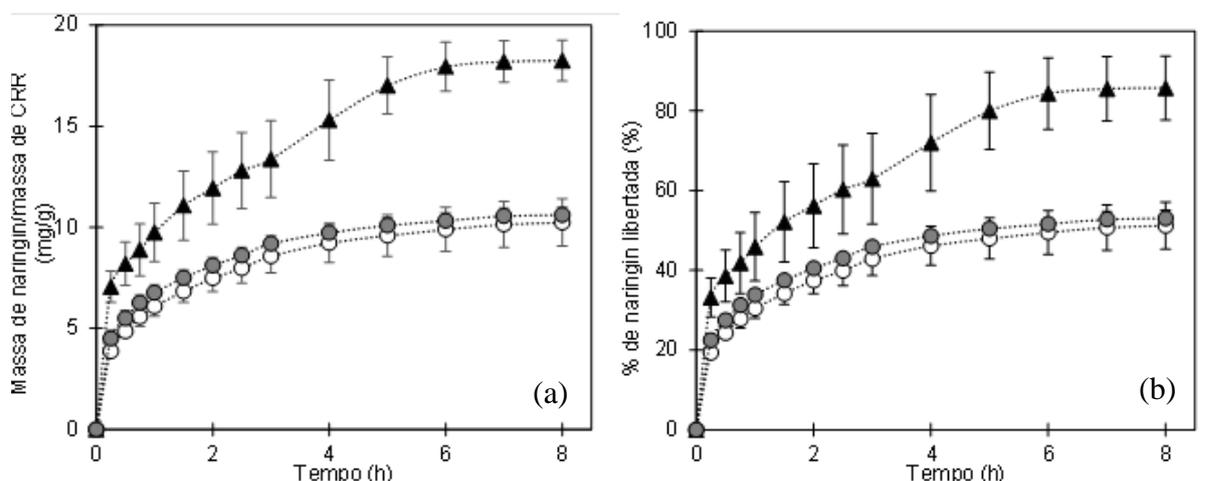


Figura 19 - Perfis de libertação do CRR2.5/KCl15/NAR1 (○), CRR2.5/KCl10/NAR1 (●) e CRR2.5/NAR1 (▲), em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).

Através das curvas representadas na Figura 19 (a) é possível observar-se o efeito da utilização do reticulante KCl em termos de massa de naringin libertada por massa de carragenano, podendo concluir-se que os géis reticulados, através da imersão destes numa solução de KCl, libertam menos naringin que o gel sem reticulante, uma vez que se estabelecem ligações entre os iões positivos K^+ e os grupos negativos OSO_3^- do carragenano, levando à formação de uma estrutura mais reticulada e mais rígida. Para além disso, verifica-se que as duas concentrações de KCl testadas, 5% e 10%, têm o mesmo efeito na libertação, apresentando um perfil semelhante nos dois casos. Isto acontece, provavelmente, pela razão de que 5% de KCl seja suficiente para reticular todos os grupos carregados do carragenano. É de notar também que os perfis de libertação dos géis reticulados a partir das 3 h tendem a estabilizar, libertando uma dose de cerca de 10 mg de naringin/g de carragenano, enquanto o gel sem reticulante só a partir das 6 h é que começa a estabilizar, libertando cerca de 18 mg de naringin/g de carragenano. De acordo com a Figura 19 (b) conclui-se que o sistema sem reticulante liberta cerca de 86% de naringin ao fim de 8 h enquanto os géis com reticulante libertaram apenas cerca de 53% e 51% de naringin, para 10% e 5% de KCl, respectivamente e para o mesmo período de tempo.

Perfis de libertação e conclusões semelhantes foram observadas para géis de *k*-carragenano (2.5% m/v) carregados com 0.5 mg de naringin com 5% de KCl e sem reticulante, tal como apresentado na Figura 20 (a) e (b). Neste caso os géis não reticulados com KCl libertaram mais naringin, atingindo cerca de 7.6 mg de naringin/g de carragenano ao fim de 8

h e os géis reticulados com 5% de KCl libertaram apenas cerca de 5.4 mg de naringin/g de carragenano. Na Figura 20 (b) observa-se que o gel não reticulado apresenta um perfil de libertação ligeiramente mais rápido, comparativamente ao gel reticulado com 5% de KCl. Ao fim de 3 h de libertação, o gel sem reticulante liberta cerca de 60% de naringin e o gel reticulado liberta cerca de 45% de naringin. É de referir que nenhum dos géis libertou o fármaco na totalidade ao fim de 8 h, *in vitro* e nas condições experimentais estudadas, sendo que o gel sem reticulante libertou cerca de 72% de naringin e o gel com reticulante libertou cerca de metade, 54% de naringin.

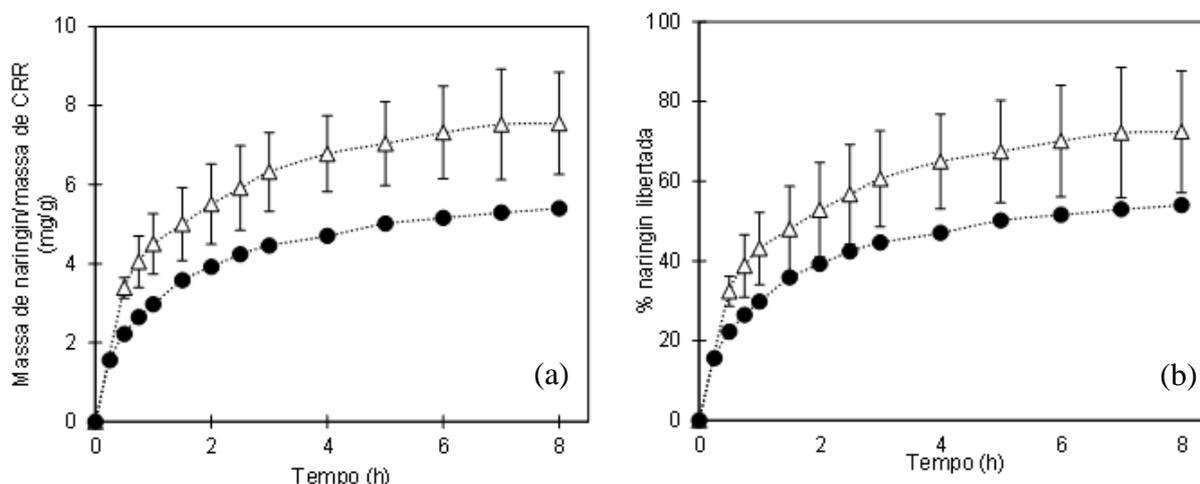


Figura 20- Perfis de libertação do CRR2.5/KCl5/NAR0.5 (●) e CRR2.5/NAR0.5 (Δ), em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).

Estes resultados mostram que é possível controlar a dosagem terapêutica de naringin a partir de géis de *k*-carragenano alterando quer a quantidade de naringin incorporada quer a percentagem de reticulação do gel com KCl.

Tendo em conta, que o desempenho dos sistemas individuais não apresentaram os resultados pretendidos, procedeu-se à introdução das nanopartículas nos géis com o objetivo de obter uma libertação mais controlada, uma vez que conjugando estes dois sistemas ter-se-iam duas resistências à difusão do fármaco.

Nas Figura 21 (a) e (b) encontram-se representadas as curvas correspondentes aos géis com nanopartículas carregadas com uma concentração de naringin de 0.5 mg/ml e com duas concentrações de *k*-carragenano, 1.25% e 2.5% (w/v). Ao observar as diferentes curvas verifica-se novamente que o tipo de reticulante utilizado na preparação das nanopartículas não exhibe uma diferença significativa em termos de dose de naringin libertada. Para além disso, é de notar ainda a existência de um degrau nos perfis dos géis com 1.25% de carragenano entre as 3 e as

4 h de monitorização (com um aumento de cerca de 35% na quantidade de naringin libertado por massa de *k*-carragenano) atingindo a máxima libertação, 20 mg de naringin/g de carragenano, ao fim de 8 h. No caso dos géis com 2.5% de carragenano o fármaco vai-se libertando mais gradualmente, verificando-se a existência de um degrau muito mais ténue entre as 4 e 6 h de libertação monitorização (com um aumento de cerca de 18% na quantidade de naringin libertado por massa de *k*-carragenano). Ao analisar a Figura 21 (b) verifica-se que os géis com uma concentração de 1.25% de carragenano libertam a totalidade do naringin incorporado enquanto os géis mais concentrados libertam cerca de 90%. Isto deve-se talvez pelo facto do carragenano estar a atuar como reticulante do quitosano das nanopartículas, uma vez que o carragenano apresenta cargas negativas e o quitosano cargas positivas, estabelecendo-se uma ligação iónica entre estes dois compostos. Além disso a maior concentração de *k*-carragenano também aumenta a resistência que o fármaco tem que vencer para se libertar da matriz.

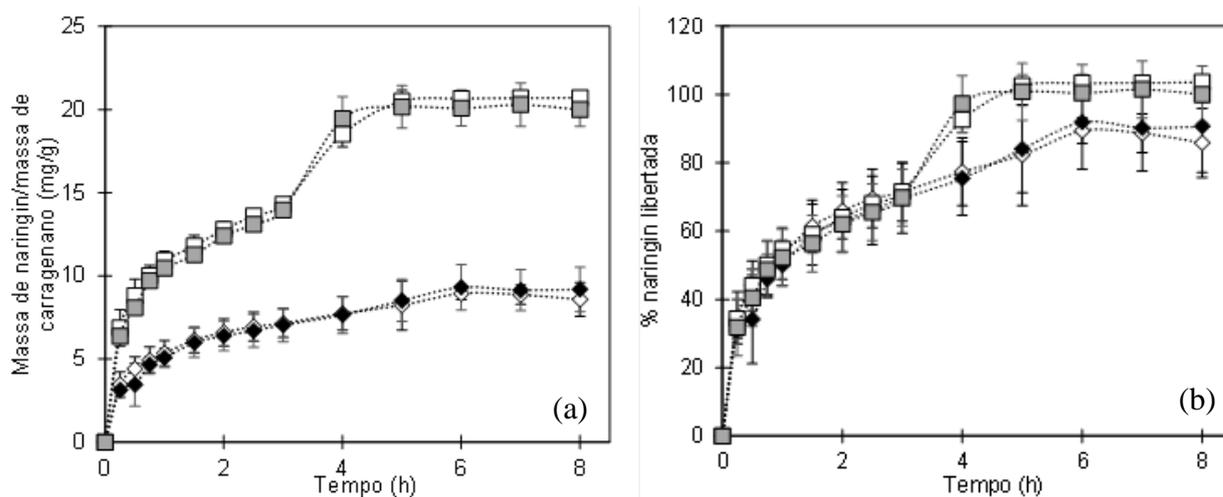


Figura 21 - Perfis de libertação do CRR1.25/NP/CS/CD/NAR0.5 (□), CRR1.25/NP/CS/CD/NAR0.5 (■), CRR1.25/NP/CS/TPP/NAR0.5 (◇) e CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 (◆), em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).

O efeito do reticulante KCl no perfil de libertação dos sistemas compostos por partículas e géis foi também estudado. A Figura 22 (a) e (b) apresentam os perfis de libertação dos géis constituídos por 2.5% (m/v) de *k*-carragenano com nanopartículas carregadas com uma concentração de 0.5 mg/ml de naringin e com e sem reticulação do gel com uma solução de 5% de KCl.

Tal como discutido anteriormente o reticulante KCl induz uma diminuição na quantidade de naringin libertada pelos géis reticulados. Ao fim das 3 h de libertação, os géis com nanopartículas não reticulados libertaram cerca de 7 mg de naringin/g de carragenano enquanto os géis com nanopartículas reticulados libertaram cerca de 4.5 mg de naringin/g de

carragenano. No final da libertação, 8 h, os géis sem reticulação libertaram o naringin quase totalmente, aproximadamente 9 mg de naringin/g de carragenano, e os géis reticulados com 5% de KCl libertaram 5 mg de naringin/g de carragenano, o que corresponde a cerca de metade da quantidade de fármaco incorporada no sistema (Figura 22 (b)). Ao fim das 8 h de libertação os géis sem reticulação libertaram 90% de naringin, ao contrário dos géis reticulados que libertaram apenas 51% de naringin.

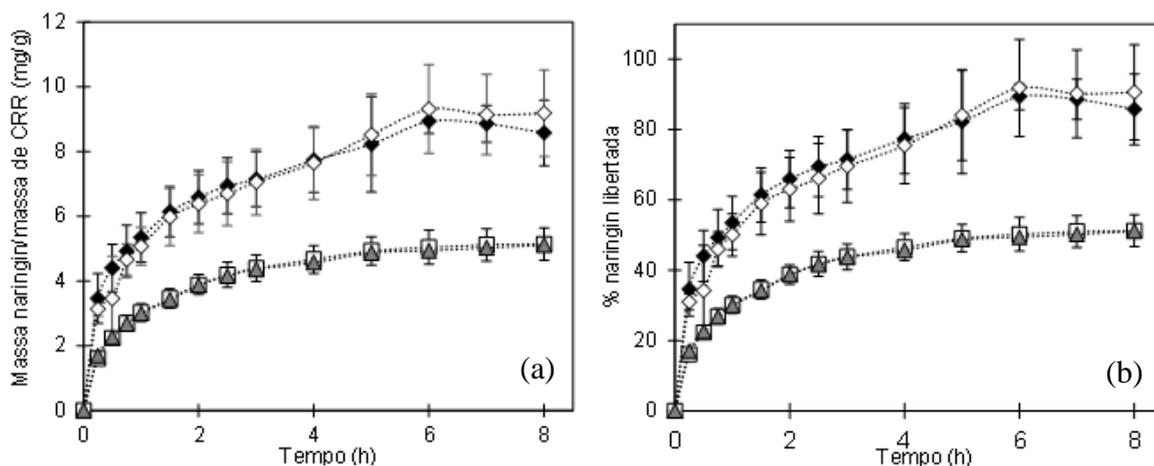


Figura 22 - Perfis de libertação do CRR2.5/KCl5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (□) e CRR2.5/KCl5/NP/CS/CD/NAR0.5 (▲), e CRR2.5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (◆) e CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 (◇), em relação à massa de naringin libertada por massa de carragenano (a) e em % de naringin libertada (b).

Para efeitos comparativos apresentam-se na Figura 23 os perfis de libertação do naringin a partir dos diferentes sistemas de libertação preparados. A Figura 23 (a) e (b) apresentam os sistemas à base de nanopartículas reticuladas com TPP e CD, respetivamente. Tal como discutido anteriormente, os sistemas que permitem obter uma libertação do fármaco mais controlada são os sistemas reticulados com KCl (gel reticulado com 5% de KCl com e sem nanopartículas) apresentando estes dois sistemas, perfis de libertação muito semelhantes. O sistema constituído apenas pelo gel de k-carragenano apresenta um perfil de libertação intermédio enquanto os sistemas constituídos pelas nanopartículas de quitosano são os que apresentam uma libertação mais rápida e total do naringin. Estas conclusões são válidas e muito semelhantes para os dois tipos de nanopartículas preparadas neste trabalho o que mais uma vez confirma que a CD é uma alternativa ao TPP como reticulante das nanopartículas

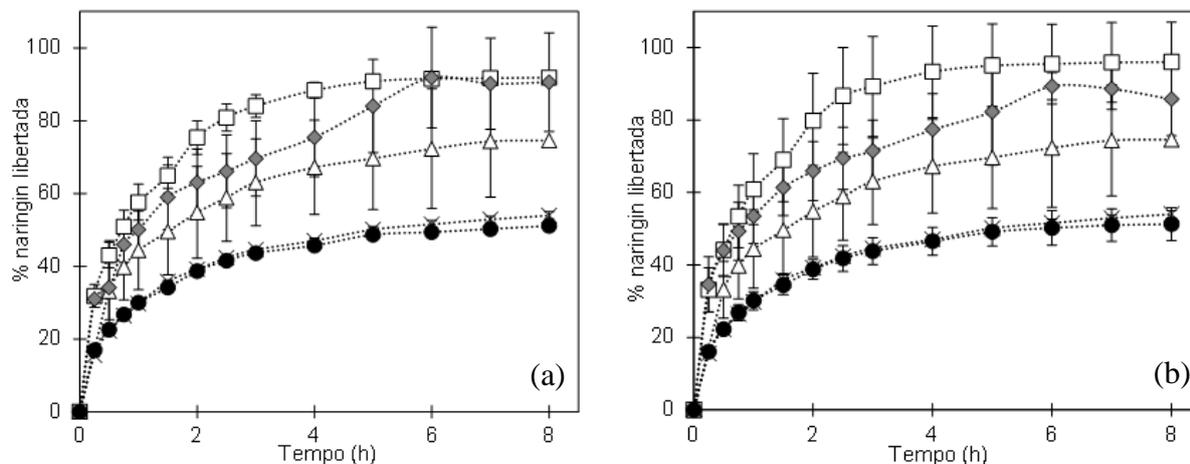


Figura 23 - Perfis de liberação do: NP/CS/(TPPa/CDb)/NAR0.5(□); CRR2.5/NAR0.5(△); CRR2.5/NP/CS/(TPPa/CDb)/NAR0.5(◆); CRR2.5/KCl5/NAR0.5 (X); CRR2.5/KCl5/NP/CS/(TPPa/CDb)/NAR0.5(●).

Para uma melhor compreensão dos fenômenos que ocorrem nas estruturas das diferentes matrizes, na Figura 24 estão representadas as possíveis interações existentes nos géis de *k*-carragenano reticulados com KCl e com naringin incorporado (a), nos géis de *k*-carragenano com nanopartículas carregadas com naringin (b) e nos géis à base de *k*-carragenano com nanopartículas carregadas com naringin e reticulados com KCl (c).

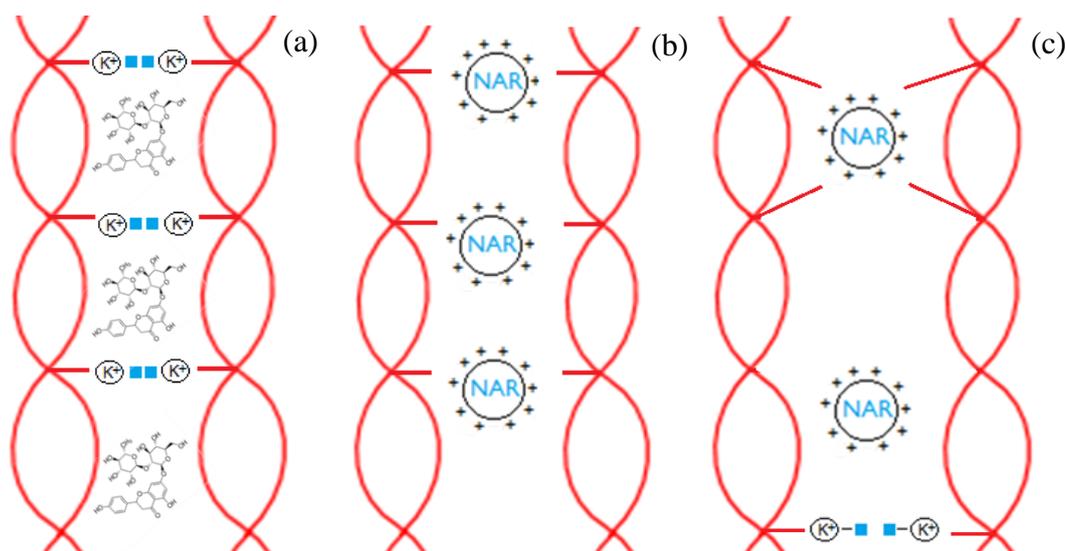


Figura 24 - Esquema representativo das possíveis interações presentes nos géis: CRR2.5/KCl5/NAR0.5; CRR2.5/NP/CS/(TPPa/CD)/NAR0.5; CRR2.5/KCl5/NP/CS/(TPPa/CD)/NAR0.5.

Ao analisar a Figura 24 (a) pode inferir-se que o que acontece ao reticular o gel com naringin é que um par de hélices estabelece interações por pontes de hidrogénio. O ião sódio liga-se a uma parte dos grupos sulfato presentes na hélice para equilíbrio de cargas, resultando em interações entre hélices fracas, mediadas por moléculas de água. No segundo caso, Figura 24 (b), em que as nanopartículas estão incorporadas na matriz de carragenano, as interações dão-se através dos grupos sulfato negativos do carragenano e as cargas positivas do quitosano. No caso dos sistemas combinados, Figura 24 (c), supõe-se que existem os dois tipos de interações, ou seja, interações entre cargas positivas do quitosano e cargas positivas dos iões de sódio com as cargas negativas do *k*-carragenano.

Pela observação dos perfis de libertação dos vários sistemas apresentados anteriormente, pode supor-se que a libertação do naringin a partir das diferentes matrizes esteja dividida essencialmente em duas etapas. A primeira etapa corresponde a um período de libertação mais rápida, seguindo-se uma segunda etapa correspondente a um período de libertação mais lento. Para compreender melhor os mecanismos que controlam a libertação do fármaco a partir dos SLCs preparados, recorreu-se a modelos matemáticos que permitem estimar os parâmetros cinéticos e, assim, inferir sobre os mecanismos predominantes da libertação.

Os coeficientes cinéticos de libertação foram calculados a partir da equação *Korsmeyer-Peppas* (Equação 8) (Korsmeyer *et al.*, 1983), fazendo o ajuste das respetivas curvas de libertação do naringin. Ao determinar o logaritmo da Equação 8 é possível chegar-se à Equação 9. Representando o $\log \frac{M_t}{M_\infty}$ em função do $\log t$ é possível determinar os valores dos parâmetros cinéticos, *n* e *k*.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (8)$$

$$\log \frac{M_t}{M_\infty} = \log k + n \cdot \log t \quad (9)$$

Onde M_t representa a massa de naringin libertada num tempo *t*, M_∞ a massa de naringin libertada num tempo infinito, *k* é a constante de libertação, *t* representa o tempo de libertação e *n* o expoente de libertação.

Os parâmetros cinéticos calculados através da Equação 9 até $\frac{M_t}{M_\infty} < 60\%$, para os vários sistemas utilizados para a libertação do naringin, estão apresentados na Tabela 3. No caso dos sistemas constituídos por géis, os resultados mostram que os valores do expoente de libertação (*n*) para a maior parte dos sistemas estudados são inferiores a 0.45. Isto sugere que,

considerando os géis como sistemas cilíndricos, a libertação do naringin para estes sistemas ocorreu por um mecanismo de difusão pseudo-*Fickiana* até aos 60% de libertação do fármaco (Natu *et al.*, 2008).

Tabela 3-Parâmetros cinéticos para a $\frac{M_t}{M_\infty} < 60\%$.

Sistemas	$\frac{M_t}{M_\infty} < 60\%$				
	n (média)	Desvio	k/h ⁻ⁿ (média)	Desvio	R ² (média)
Nanopartículas (TPP)	0.435	0.001	0.626	0.022	0.998
Nanopartículas (CD)	0.427	0.010	0.627	0.043	0.999
Géis	0.404	0.142	0.598	0.007	0.992
Géis reticulados com KCl	0.469	0.006	0.558	0.020	0.997
Géis + Nanopartículas (TPP)	0.323	0.049	0.631	0.019	0.996
Géis + Nanopartículas (CD)	0.347	0.031	0.560	0.017	0.996
Géis + Nanopartículas (TPP) reticulados com KCl	0.457	0.042	0.593	0.001	0.999
Géis + Nanopartículas (CD) reticulados com KCl	0.412	0.017	0.588	0.007	0.999

Exceções foram detetadas para a libertação do naringin a partir dos sistemas gel reticulado com KCl e gel com nanopartículas de TPP reticulado com KCl onde a difusão ocorreu através de um mecanismo de transporte anómalo (difusão associada com *swelling*), uma vez que apresentam um valor de *n* superiores a 0.45 (0.469 e 0.457, respetivamente) (Siepmann & Siepmann, 2008). No caso das nanopartículas, considerando que estas apresentam uma forma esférica, o mecanismo que controla a libertação é a difusão *Fickiana* ($n \sim 0.43$) (Siepmann & Siepmann, 2008).

No que diz respeito à constante de libertação *k*, as nanopartículas e os géis com nanopartículas de TPP incorporadas apresentam valores muito idênticos e os maiores ($k=0.63$), o que significa que estes sistemas apresentam uma difusão mais rápida quando comparados com os restantes. O gel com naringin e o gel com as nanopartículas reticulado com KCl apresentam um *k* próximo dos 0.60, sendo o gel com naringin reticulado com KCl e o gel com nanopartículas de CD, os sistemas com um valor de *k* mais pequeno ($k=0.56$), sugerindo uma libertação mais controlada em comparação com os outros sistemas.

Na Tabela 4 encontram-se apresentados os valores dos parâmetros cinéticos para a região em que $\frac{M_t}{M_\infty}$ é linear. Os resultados mostram que as nanopartículas apresentam um valor do expoente de libertação muito semelhante ($0.40 < n < 0.41$), concluindo-se que o mecanismo que controla a libertação do naringin a partir destas matrizes, admitindo que as partículas são esféricas, é uma difusão do tipo *Fickiana*. No caso dos géis, e considerando que estes sistemas apresentam uma forma cilíndrica, como estes apresentam valores de n entre 0.31 e 0.44, conclui-se, através da Tabela 4, que o mecanismo que predomina durante a fase inicial da libertação é também uma difusão do tipo pseudo-*Fickiana*. Ao comparar estes valores da gama linear com os valores de $\frac{M_t}{M_\infty} < 60\%$, conclui-se que abrangendo os pontos em que o modelo matemático se encontra linear, os valores dos parâmetros cinéticos diminuem, mas o tipo de mecanismo associado a cada sistema mantém-se.

Relativamente à constante de libertação, os sistemas que apresentam um valor de k maior são as nanopartículas reticuladas com TPP e o gel com as nanopartículas de TPP ($k=0.62$), o que sugere que estes sistemas apresentam um mecanismo de difusão mais rápido que os restantes sistemas. As nanopartículas apresentam uma constante de libertação próxima de 0.61, seguindo-se os géis com um valor de k de cerca 0.60. Os géis reticulados com KCl e com nanopartículas de TPP e CD incorporadas apresentam uma constante de libertação da ordem dos 0.57. De seguida, com os menores valores da constante de libertação ($k=0.55$), encontram-se os géis com nanopartículas reticuladas com CD e os géis reticulados com KCl, o que revela que estes sistemas apresentam uma libertação mais sustentada.

Tabela 4- Parâmetros cinéticos para a $\frac{M_t}{M_\infty}$ linear.

Sistemas	Gama linear				
	n (média)	Desvio	k/h ⁿ (média)	Desvio	R ² (média)
Nanopartículas (TPP)	0.413	0.001	0.616	0.033	0.997
Nanopartículas (CD)	0.400	0.015	0.613	0.039	0.997
Géis	0.404	0.142	0.597	0.008	0.992
Géis reticulados com KCl	0.439	0.010	0.546	0.017	0.995
Géis + Nanopartículas (TPP)	0.307	0.001	0.623	0.015	0.997
Géis + Nanopartículas (CD)	0.323	0.032	0.552	0.015	0.994
Géis + Nanopartículas (TPP) reticulados com KCl	0.407	0.003	0.571	0.009	0.994
Géis + Nanopartículas (CD) reticulados com KCl	0.381	0.009	0.575	0.010	0.998

Na Figura 25 encontram-se representados os resultados dos modelos considerando a utilização da equação de *Korsmeyer-Peppas* na gama $\frac{M_t}{M_\infty} < 60\%$ e $\frac{M_t}{M_\infty}$ linear. Os resultados permitem concluir que em todos os caso o modelo descreve bem os sistemas até 60% da percentagem de naringin libertada, gama em que a difusão é provavelmente o mecanismo de libertação mais importante. No caso dos sistemas gel com partículas de TPP e gel com partículas de CD verifica-se que a difusão é o mecanismo predominante durante todo o período de libertação uma vez que o modelo ajusta de forma bastante razoável toda a curva.

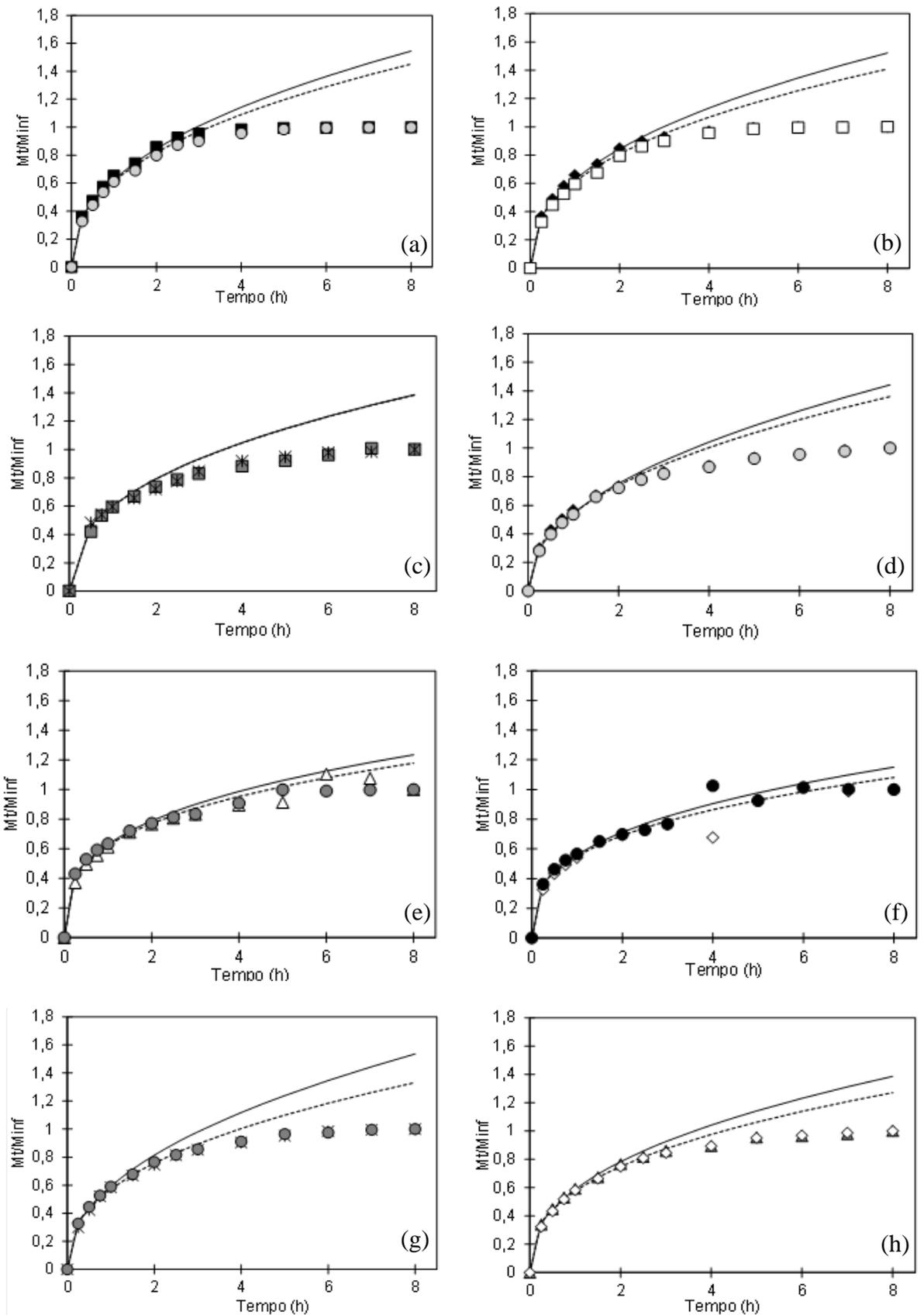


Figura 25 - Modelos de ajuste para: NP/CS/TPP/NAR0.5 (a); NP/CS/CD/NAR0.5 (b); CRR2.5/NAR0.5 (c); CRR2.5/KCl5/NAR0.5 (d); CRR2.5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (e); CRR2.5/NP/CS/CD/NAR0.5 (f); CRR2.5/KCl5/NP/CS/TPP/NAR0.5 (g); CRR2.5/KCl5/NP/CS/CD/NAR0.5 (h). A linha a cheio representa $\frac{M_t}{M_{\infty}} < 60\%$ e a linha a tracejado representa $\frac{M_t}{M_{\infty}}$ linear.

4 CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar as características e o desempenho dos SLCs preparados na forma de nanopartículas, géis e nanopartículas incorporadas em géis para a libertação controlada de um fármaco de origem natural, o naringin.

Numa primeira fase, foram produzidas nanopartículas de quitosano através do método de gelificação iónica, utilizando um reticulante já conhecido, o TPP, e outro reticulante, CD, tendo-se estudado, com recurso à técnica de DLS, a distribuição de tamanhos destas partículas ao longo do tempo. Através desta técnica foi possível verificar que as nanopartículas com o fármaco encapsulado apresentavam tamanhos médios de 180 nm, para o caso das nanopartículas reticuladas com TPP, e 330 nm para as nanopartículas reticuladas com CD, apresentando, nos dois casos, um potencial zeta próximo dos +40 mV, verificando-se uma boa estabilidade durante as 72 horas do estudo. Para além disso, foi possível concluir que o reticulante CD apresenta ser uma boa alternativa ao TPP, sendo fundamental realizar mais estudos para otimizar a quantidade de CD necessária à preparação de nanopartículas. As imagens de SEM permitiram concluir novamente que foram produzidas partículas com forma esférica e com tamanhos à escala nano.

Na etapa seguinte do trabalho, procedeu-se à síntese de géis à base de *k*-carragenano com naringin incorporado e de géis com nanopartículas carregadas com naringin. Procedeu-se à caracterização destes sistemas com recurso a SEM e, por comparação entre as imagens obtidas dos dois sistemas, foi possível concluir a existência de nanopartículas no gel.

Posteriormente, realizaram-se ensaios de libertação dos três sistemas preparados, para avaliar os seus desempenhos como sistemas de libertação controlada, concluindo-se que as nanopartículas carregadas com naringin eram o sistema com o perfil de libertação mais rápido, seguindo-se os géis com as nanopartículas carregadas com naringin e, por último, os géis com o naringin. Ao analisar com maior detalhe os perfis de libertação, concluiu-se que as nanopartículas, ao fim de 1 h do ensaio, libertaram cerca de 60% da quantidade total de naringin incorporada, sendo que ao fim de 4 h, já tinham libertado o fármaco na sua totalidade, verificando-se um perfil semelhante para as partículas reticuladas com TPP e com CD. Uma das razões prováveis que justificam a libertação ser mais rápida a partir das nanopartículas, é talvez pelo facto do naringin não apresentar carga negativa capaz de interagir com os catiões presentes no quitosano e, assim, retardar o perfil de libertação. No que diz respeito às nanopartículas incorporadas no gel, estas libertaram cerca de 52% do naringin ao fim da

primeira hora e ao fim das 8 h do estudo libertaram cerca de 91%, apresentando novamente um perfil bastante semelhante quando se utilizava partículas reticuladas com TPP e com CD, comprovando novamente que o reticulante CD é uma boa alternativa ao TPP. O perfil de libertação do naringin a partir dos géis, estudado com uma quantidade de naringin de 0.5 mg e de 1 mg, revelou ser ligeiramente melhor, uma vez que ao fim da primeira hora, em ambos os casos, libertou-se cerca de 45% do naringin e, ao fim de 8 h, o gel com 0.5 mg de naringin libertou cerca de 75% e o gel com 1 mg de naringin libertou 87%.

Com o objetivo de obter uma libertação mais prolongada do fármaco estes sistemas, gel com naringin e gel com nanopartículas carregadas com naringin, foram ainda reticulados com KCl. Estes dois sistemas foram também analisados com recurso à técnica de SEM e, a partir das imagens obtidas, foi possível concluir que a reticulação induziu maior rugosidade à matriz de carragenano. Para além disso, as imagens dos géis com nanopartículas, sugerem que as partículas de TPP estão mais integradas na matriz do que as de CD, uma vez que as partículas reticuladas com TPP não são tão visíveis como as partículas de CD. No entanto, seriam precisas mais imagens para comprovar estas questões.

No que se refere aos perfis de libertação do fármaco a partir dos géis com naringin e aos géis com nanopartículas carregadas com naringin, ambos reticulados com KCl, concluiu-se que o efeito do KCl garantia uma libertação mais controlada do fármaco, apresentando estes dois sistemas, perfis de libertação do naringin bastante idênticos, verificando-se apenas a libertação de cerca de metade do fármaco durante os 10 dias de estudo. Os géis com naringin foram reticulados com 5% e 10% de KCl, concluindo-se que não existia grande diferença entre as duas concentrações, significando que 5% de KCl era suficiente para garantir uma reticulação eficaz.

Comparando, de forma geral, os perfis de libertação das várias matrizes utilizadas, é possível concluir que os sistemas que permitem ter uma libertação do fármaco mais controlada são o gel reticulado com 5% de KCl com nanopartículas de CD e o gel com nanopartículas de TPP carregadas com 0.5 mg/ml de naringin, seguindo-se o gel com 0.5 mg de naringin reticulado com 5% de KCl, apresentando estes dois sistemas perfis de libertação muito semelhantes. A estes dois sistemas, segue-se o gel com 0.5 mg de naringin e, posteriormente, o gel com nanopartículas de CD, bem como o gel com nanopartículas de TPP carregadas com 0.5 mg/ml de naringin, sendo os sistemas de partículas de quitosano reticuladas com CD e TPP com 0.5 mg/ml de naringin os que apresentam uma libertação mais rápida e total do naringin.

Para compreender melhor os mecanismos que controlavam a libertação do fármaco a partir dos SLCs preparados, recorreu-se ainda a modelos matemáticos que permitiram estimar

os parâmetros cinéticos da libertação, tendo sido aplicados os modelos para $\frac{M_t}{M_\infty} < 60\%$ e para a gama em que $\frac{M_t}{M_\infty}$ é linear. Para $\frac{M_t}{M_\infty} < 60\%$ conclui-se que para a maior parte dos sistemas géis, exceto o gel reticulado com KCl e o gel com nanopartículas de TPP reticulado com KCl, a libertação do naringin ocorreu por um mecanismo de difusão pseudo-*Fickiana*. A libertação do naringin a partir dos sistemas gel reticulado com KCl e gel com nanopartículas de TPP reticulado com KCl foi feita através de um mecanismo de transporte anómalo (difusão associada com *swelling*). No caso das nanopartículas, considerando que estas apresentam uma forma esférica, o mecanismo que controla a libertação foi essencialmente difusão *Fickiana* tanto para as partículas reticuladas com TPP como CD. No que diz respeito à constante de libertação k , as nanopartículas e os géis com nanopartículas de TPP incorporadas apresentam valores muito idênticos e os maiores ($k=0.63$) quando comparados com os restantes sistemas, o que significa que estes sistemas apresentam uma difusão mais rápida quando comparados com os restantes. O gel com naringin e o gel com as nanopartículas reticulado com KCl apresentam um k próximo dos 0.60, sendo o gel com naringin reticulado com KCl e o gel com nanopartículas de CD, os sistemas com um valor de k mais pequeno ($k=0.56$), sugerindo uma libertação mais controlada em comparação com os outros sistemas. Para a gama em que $\frac{M_t}{M_\infty}$ é linear, os valores dos parâmetros cinéticos diminuem, mas verificam-se os mesmos mecanismos de libertação. Os resultados indicam que os géis com nanopartículas reticuladas com CD e os géis reticulados com KCl apresentam uma libertação mais sustentada, revelando-se os mais indicados para a aplicação que se pretende.

5 PERSPETIVAS FUTURAS

Face a alguns resultados obtidos durante a realização deste trabalho, sugeriram novas ideias com o objetivo de resolver determinados problemas encontrados aquando da investigação.

Uma das etapas fundamentais do trabalho foi a modificação do quitosano que teve como objetivo aumentar o número de grupos funcionais do quitosano passíveis de reticulação iónica. Este processo de modificação foi realizado com um tratamento de hidróxido de sódio em condições de temperatura e concentrações muito fortes que poderão ter levado à quebra da cadeia do polímero. Tendo em conta estas questões, tentou-se medir o peso molecular do quitosano com recurso à Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC). No entanto, os resultados obtidos não permitiram tirar conclusões sobre o peso molecular do quitosano, sendo necessário mais tempo para otimizar as condições necessárias para a realização desta técnica.

Outro dos problemas detetados foi o facto de não ter sido possível quantificar o naringin encapsulado nas nanopartículas. A quantificação do fármaco tinha como objetivo verificar se este tinha sido incorporado na sua maioria. Pretendia-se, assim, precipitar ou sedimentar as nanopartículas e analisar o sobrenadante para verificar se existia algum fármaco neste. Inicialmente, centrifugaram-se as nanopartículas para a sua sedimentação, porém a centrífuga disponível no laboratório não foi suficiente para as fazer sedimentar. Desta forma, recorreu-se a um método alternativo, concretamente à precipitação das partículas com adição de GP e analisou-se o sobrenadante com recurso a espectrofotometria. Contudo, verificou-se a desestabilização das nanopartículas com este procedimento, não sendo possível realizar a quantificação do fármaco encapsulado. Para poder contornar os problemas existentes e quantificar o fármaco de forma eficaz, seria necessário o recurso a uma ultra centrífuga para que fosse possível sedimentar as nanopartículas sem as destabilizar.

Outro aspeto importante a considerar no futuro é a otimização das nanopartículas de quitosano reticuladas com CD. A quantidade deste reticulante usada no presente trabalho foi fixa relativamente à proporção utilizada de TPP para efeitos comparativos. No entanto, e apesar dos resultados das nanopartículas com CD terem sido bastante satisfatórios, dever-se-ão fazer mais estudos de forma a otimizar a proporção quitosano e CD para a preparação deste tipo de nanopartículas.

No que diz respeito à síntese dos géis de *k*-carragenano reticulados com KCl, outra questão bastante importante a estudar no futuro é a percentagem de reticulante a usar.

Efetivamente os resultados obtidos mostraram que sem a reticulação do gel a libertação era muito rápida, e que com 5% e 10% de reticulante era demasiado lenta não se verificando a libertação total do fármaco. Seria então interessante estudar melhor o efeito de concentrações menores de reticulante para favorecer a libertação controlada do naringin. Este estudo é importante tanto para controlar os perfis de libertação dos géis como as propriedades reológicas destes. Relativamente às propriedades reológicas do gel, estas não foram possíveis de ser avaliadas por problemas no equipamento que não permitiram a execução dos ensaios em tempo útil. A realização destes ensaios seria de extrema importância para conhecer a viscosidade e o comportamento reológico dos géis em função da temperatura, propriedades essenciais para o desenvolvimento de géis injetáveis. Esta técnica, pode ajudar a otimizar o processo de gelificação através do conhecimento da temperatura de gelificação uma vez que a concentração de reticulante usada no presente trabalho poderá não ser a mais indicada para que o gel seja injetável no corpo.

Por fim, seria necessário realizar testes *in vivo* para conhecer a concentração de naringin ideal ao tratamento das feridas e a possível toxicidade associada a estes sistemas. A realização destes testes seria também importante para avaliar o comportamento dos géis em organismos vivos, uma vez que a degradação do polímero será provavelmente muito maior do que a verificada nos ensaios *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

- Abu-Al-Basal MA (2010). *Healing potential of Rosmarinus officinalis L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice*. Journal of Ethnopharmacology, 131, 443-450.
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). *Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery*. Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society, 100(1), 5–28.
- Braga, M. (2010). Drug Release in vitro, Laboratory of Polymer Processing and Supercritical Technology, Protocol nº 009.
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L., & Alonso M.J. (1997). *Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers*. Journal of Applied Polymer Science, 125–132.
- Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J. & Fu, W (1997). *Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution*, Carbohydrate Research, 303 (1997), 327-332.
- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M.D., Hoemann, C.D., Leroux, J.C., Atkinson, B.L., Binette, F., & Selmani, A. (2000). *Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ*. Biomaterials, 21(21), 2155–2161.
- Chien, Y. W., & Lin, S. (2007). *Drug Delivery : Controlled Release - Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 1082–1103. Informa Healthcare USA.
- CP Kelco. (2002). *GENU ® Carrageenan Book*. Ved Banen 16, Lille Skensved Denmark
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). *Chitosan-based biomaterials for tissue engineering*. European Polymer Journal, 49(4), 780–792.
- Djabourov, M., Nishinari, K., & Ross-Murphy, S. B. (2013). *Physical Gels from Biological and Synthetic Polymers*, 6–7.
- Dong, Y., Ng, W. K., Shen, S., Kim, S. & Tan, R. B. H. (2013). *Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers*. Carbohydrate polymers, 94(2), 940-945.
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). *Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique*. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 90, 21–27.
- Ferry, J. D. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*. John Wilet & sons, New York, 486-544.
- Fujita, N., Sagaguchi, I., Kobayashi, H., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M. (2003). *An Extract of the Root of Lithospermum erythrorhison Accelerates Wound Healing in Diabetic Mice*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26, 329-35.
- Gartner, C., López, B. L., Sierra, L., Graf, R., Spiess, H. W. & Gaborieau, M. (2011). *Interplay between Structure and Dynamics in Chitosan Films Investigated with Solid-State NMR, Dynamic Mechanical Analysis, and X-ray Diffraction*. Biomacromolecules, 12 (4), 1380-1386.
- Geochemical Instrumentation and Analysis, *Scanning Electron Microscopy (SEM)*. Disponível em: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html no dia 16 de Novembro de 2014.

- Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S., & Phillips, G. O. (2011). *Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications in Molecular and Environmental Bioengineering*. Glyndwr University, Wrexham United Kingdom
- Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2002). *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 223-236
- Horiba Scientific, *Stokes Einstein: Relating Particle Size to Particle Motion*. Disponível em: <http://www.horiba.com/scientific/products/particle-characterization/technology/dynamic-light-scattering/> no dia 15 de Novembro de 2014.
- Hornak, J.P., (2011). *The Basics of NMR, Chapter 1*. Disponível em <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm> no dia 19 de Novembro de 2014.
- Huang, S., & Fu, X. (2010). *Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration*. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 142(2), 149–159.
- Janaswamy, S., & Youngren, S. R. (2012). *Hydrocolloid-based nutraceutical delivery systems*. *Food & Function*, 3, 503.
- Kandhare, A. D., Ghosh, P., & Bodhankar, S. L. (2014). *Naringin, a flavanone glycoside, promotes angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis through modulation of inflammatory and growth factor expression in diabetic foot ulcer in rats*. *Chemico-Biological Interactions*, 219, 101–112.
- Kandhare, A. D., Raygude, K. S., Ghosh, P., Ghule, A. E., & Bodhankar, S. L. (2012). *Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy*. *Fitoterapia*, 83(4), 650–9.
- Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A. (1983). *Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers*. *International Journal of Pharmaceutics*. 15, 25–35.
- Kumar, N., Ravikumar, M. N. V., & Domb, A. J. (2001). *Biodegradable block copolymers*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 23-44.
- Lau, T.W., Lam, F.F., Lau, K.M., Chan, Y.W., Lee, K.M., Sahota, D.S., et al. (2009). *Pharmacological investigation on the wound healing effects of Radix Rehmanniae in an animal model of diabetic foot ulcer*. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 155-162.
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Buschmann, M.D., & Gupta, A. (2003). *A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1149–1158.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). *Hydrogels for Tissue Engineering*. *Chemical Reviews*, 101(7), 1869–1880.
- Li, L., Ni, R., Shao, Y., & Mao, S. (2014). *Carrageenan and its applications in drug delivery*. *Carbohydrate Polymers*, 103, 1–11.
- Malvern Instruments Worldwide (2011). *Dynamic light scattering common terms defined*.
- Malvern, *Dynamic Light Scattering (DLS)*. Disponível em http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/default.aspx?gclid=CL2smYaG7sECFW_JtAod5B0AOA no dia 15 de Novembro de 2014.

Malvern, *Electrophoretic Light Scattering (ELS)*. Disponível em: <http://www.malvern.com/en/products/technology/electrophoretic-light-scattering/default.aspx> no dia 16 de Novembro de 2014.

Malvern, *Zeta Potential*. Disponível em: <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential/default.aspx?gclid=COy69czgicUCFWvKtAodyA8Axg> no dia 16 de Novembro de 2014.

Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., & San Biagio, P. L. (2003). *Thermoreversible gelation of k-Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation*. *Biophysical Chemistry*, 104, 95–105.

Martinho, N., Damgé, C., & Pinto Reis, C. (2011). *Recent Advances in Drug Delivery Systems*. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 02(05), 510–526.

Matanović, M. R., Kristl, J., & Grabnar, P. A. (2014). *Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications*. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1-2), 262–275.

Moura, L. I. F., Dias, A. M. A., Carvalho, E., Sousa, H. C. (2013). *Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - a review*. *Acta Biomaterialia*, 9(7), 7093-7114.

Nagpal, K., Singh, S. K., & Mishra, D. N. (2010). *Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(11), 1423-1430.

Natu, M.V., Gil, M.H., Sousa, H.C. (2008). *Supercritical solvent impregnation of poly(α -caprolactone)/poly(oxyethylene-*b*-oxypropylene-*b*-oxyethylene) and poly(α -caprolactone)/poly(ethylene-vinyl acetate) blends for controlled release applications*, *Journal of Supercritical Fluids*, 47, 93-102

Necas, J., & Bartosikova, L. (2013). *Carrageenan: a review*. *Veterinari Medicina*, 58(4), 187–205.

Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(1), 8–21.

Pulley, G.N (1936). *Solubility of naringin in water*. *Industrial and Engineering Chemistry*, 8(5), 360.

Purdue University, Radiological and Environmental Management, *Scanning Electron Microscope*. Disponível em: <http://www.purdue.edu/epps/rem/rs/sem.htm> no dia 16 de Novembro de 2014.

Rinaudo, M., Pavlov, G. & Desbrières, J. (1999). *Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan*. *Polymer*, 40, 7029-7032.

Rinaudo, M. (2006). *Chitin and chitosan: Properties and applications*. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.

Rosiak, J. M., & Yoshii, F. (1999). *Hydrogels and their medical applications*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 151, 56–64.

Schmid, F. (2001). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*, *Encyclopedia of life sciences*.

- Shaik, M. R, Korsapati, M., Panati, D. (2012). *Polymers in controlled drug delivery systems*. International Journal Of Pharma Sciences, 2(4), 112–116.
- Shu, X. ., & Zhu, K. . (2002). *The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 54(2), 235–243.
- Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. a, & Mamba, B. B. (2013). *Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review*. International Journal of Biological Macromolecules, 59, 46–58.
- Siepmann, J. & Siepmann, F. (2008). *Mathematical modeling of drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 364, 328-343.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 70, 1–20.
- Swatantra, K., Awani R., & Satyawan, S. (2010). *Chitosan: a platform for targeted drug delivery*. International Journal of PharmTech Research, 2(4), 2271–2282.
- Tan, H., & Marra, K. G. (2010). *Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications*. Materials, 3, 1746–1767.
- Tiyaboonchai, W. (2003). *Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery*. Naresuan University Journal, 11(3), 51–66.
- Vilar, G., Tulla-Puche, J., & Albericio, F. (2012). *Polymers and drug delivery systems*. Current Drug Delivery, 9, 367–394
- Yang, J.-A., Yeom, J., Hwang, B. W., Hoffman, A. S., & Hahn, S. K. (2014). *In situ-forming injectable hydrogels for regenerative medicine*. Progress in Polymer Science, 39(12), 1973–1986.
- Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., Arpo, K. (2010). *Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 76 (1), 292-297.
- Zetasizer Nano Series User Manual (2004), Malvern Instruments Ltd. 2004. Disponível em http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf no dia 15 de Novembro de 2014.

ANEXOS

ANEXO I – Ensaios de otimização das nanopartículas

Tabela 5 – Concentrações utilizadas nos ensaios de otimização das nanopartículas

RET	Massa CS mg	Vol CS ml	[CS] mg/ml	[CS] % (wt)	Massa RET mg	Vol RET ml	[RET] mg/ml	[RET] % (wt)	Vf solução ml	[CS] corrigida mg/ml	[CS] corrigida % (wt)	[RET] corrigida mg/ml	[RET] corrigida % (wt)	
TPP	TPP1	8.75	5	1.750	0.0018	1.960	2	0.980	0.0010	7	1.250	0.0013	0.280	0.00030
	TPP2	5	10	0.500	0.0005	1.500	3	0.500	0.0005	13	0.385	0.0004	0.120	0.00012
	TPP3	5	10	0.500	0.0005	1.750	3	0.583	0.0006	13	0.385	0.0004	0.135	0.00013
CB	CB1	5	10	0.500	0.0005	1.500	3	0.500	0.0005	13	0.385	0.0004	0.115	0.00012
	CB2	5	10	0.500	0.0005	1.750	3	0.583	0.0006	13	0.385	0.0004	0.135	0.00013
	CB3	5	10	0.500	0.0005	1.250	3	0.417	0.0004	13	0.385	0.0004	0.096	0.00010
CD	CD1	5	10	0.500	0.0005	1.500	3	0.500	0.0005	13	0.385	0.0004	0.115	0.00012
	CD2	5	10	0.500	0.0005	1.750	3	0.583	0.0006	13	0.385	0.0004	0.135	0.00013
	CD3*	5	10	0.500	0.0005	1.70	3	0.583	0.0006	13	0.385	0.0004	0.135	0.00013

*Neste caso o quitosano foi adicionado ao reticulante.

ANEXO II – Ensaios de síntese dos géis à base de quitosano

Tabela 6 – Concentrações utilizadas nos ensaios de síntese dos géis à base de quitosano

RET	Massa CS mg	Vol CS ml	[CS] mg/ml	[CS] % (wt)	Massa RET mg	Vol RET ml	[RET] mg/ml	[RET] % (wt)	Vf solução ml	[CS] corrigida mg/ml	[CS] corrigida % (wt)	[RET] corrigida mg/ml	[RET] corrigida % (wt)	
CD	CD1	200	9	22.222	0.0222	250	1	25	0.025	10	20	0.020	25	0.025
	CD2	200	9	22.222	0.0222	500	1	50	0.050	10	20	0.020	50	0.050
	CD3	200	9	22.222	0.0222	750	1	75	0.0750	10	20	0.020	75	0.075
	CD4	200	9	22.222	0.0222	1000	1	100	0.100	10	20	0.020	100	0.100
GP	GP1	200	9	22.222	0.0222	560	1	560	0,56	10	20	0.020	56	0.056

ANEXO III – Ensaio dos géis de quitosano reticulados com CD



Figura 25 – Imagens relativas aos ensaios dos géis de quitosano reticulados com CD a 4 °C e a 37 °C.

ANEXO IV – Ensaios de síntese dos géis à base de *k*-carragenano

Tabela 7 – Concentrações utilizadas nos ensaios de síntese dos géis à base de *k*-carragenano.

RET	Massa CRR mg	Vol CRR ml	[CRR] mg/ml	[CRR] % (wt)	Massa RET mg	Vol RET ml	[RET] mg/ml	[RET] % (wt)	Vf solução ml	[CRR] corrigida mg/ml	[CRR] corrigida % (wt)	[RET] corrigida mg/ml	[RET] corrigida % (wt)	
KCl	KCl1	10	1	10	1	5	0.5	10	1	1.5	6.666	0.007	3.333	0.003
	KCl2	10	1	10	1	10	0.5	20	2	1.5	6.666	0.007	6.666	0.007
	KCl3	40	2	20	2	25	0.5	50	5	2.5	16	0.016	10	0.01
	KCl4	40	2	20	2	50	0.5	100	10	2.5	16	0.016	20	0.02
	KCl5	40	1	40	4	100	1	100	10	2	20	0.02	50	0.05
	KCl6	50	2	25	2.5	50	0.5	100	10	2.5	20	0.02	20	0.02
	KCl7	50	2	25	2.5	100	0.5	200	20	2.5	20	0.02	40	0.04
CaCl ₂	CaCl 1	40	1	40	4	100	1	100	10	2	20	0.02	50	0.05
	CaCl 2	5	2	2.5	2.5	50	0.5	100	10	2.5	2	0.002	20	0.02
	CaCl 3	50	2	25	2.5	100	0.5	200	20	2.5	20	0.02	40	0.04

ANEXO V – Curva de calibração do naringin

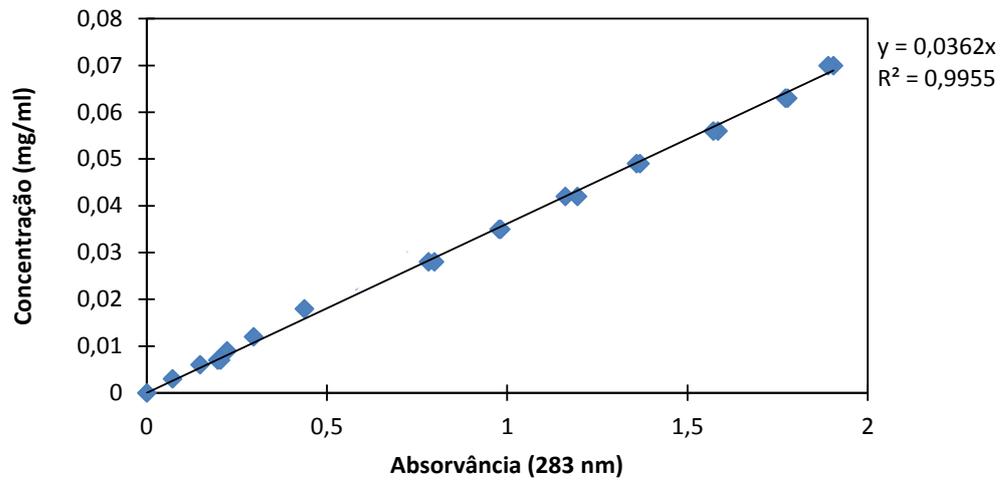


Figura 26 – Curva de calibração do naringin para os ensaios de libertação.

ANEXO VI – Ensaios de preparação das nanopartículas

Tabela 8 – Concentrações finais utilizadas para a preparação das nanopartículas carregadas com naringin e respetiva estabilidade.

RET	Soluções	massa CS mg	Vol CS ml	[CS]corrigida mg/ml	massa RET mg	Vol RET ml	[RET]corrigida mg/ml	Vf solução ml	[CS]/[RET]	pH	pH final
	TPP1	5	10	0,385	1,5	3	0,115	13	3,33	4,89	4,98
TPP	TPP1.1	5	10	0,385	1,5	3	0,115	13	3,33	4,84	4,92
	CD1	5	10	0,385	1	3	0,077	13	5,00	4,82	4,79
CD	CD1.1	5	10	0,385	1	3	0,077	13	5,00	4,82	4,79

RET	Soluções	Teste 1 (2h depois)			Teste 2 (24h depois)			Teste 3 (48h depois)			Teste 4 (3 dias depois)		
		Tamanho partícula Zeta-Average d.nm	PDI	Potencial zeta mV	Tamanho partícula Zeta-Average d.nm	PDI	Potencial zeta mV	Tamanho partícula Zeta-Average d.nm	PDI	Potencial zeta mV	Tamanho partícula Zeta-Average d.nm	PDI	Potencial zeta mV
	TPP1	175,8	0,263	40,45	215,5	0,282	39,2	177,05	0,1265	39,1	207,75	0,302	39,15
TPP	TPP1.1	179,85	0,143	41	191,55	0,1265	40,6	203,45	0,141	39,65	205,8	0,1025	40,25
	media	177,825	0,203	40,725	203,525	0,20425	39,900	190,250	0,134	39,375	206,775	0,202	39,700
	desvio	2,864	0,084	0,389	16,935	0,110	0,990	18,668	0,010	0,389	1,379	0,141	0,778
	CD1	304,2	0,258	41,85	304,3	0,24	43,25	285,85	0,22	44,3	365,2	0,254	40,65
CD	CD1.1	390,6	0,262	41	375,15	0,24	39,55	356,35	0,25	41,65	297,4	0,282	43,75
	media	347,400	0,260	41,425	339,725	0,239	41,400	321,100	0,236	42,975	331,300	0,268	42,200
	desvio	61,094	0,002	0,601	50,099	0,002	2,616	49,851	0,022	1,874	47,942	0,020	2,192

